

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

Слободяник Людмила Олександрівна

УДК 612.35:612.14:612.15

**РОЛЬ СІРКОВОДНЮ ТА МОНООКСИДУ АЗОТУ У
РЕГУЛЯЦІЇ КРОВООБИГУ В ПЕЧІНЦІ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук, професор
Янчук Петро Іванович

КИЇВ – 2015

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Регуляція печінкового кровообігу.....	12
1.1.1. Структурно-функціональні особливості печінки та її судинного русла.....	12
1.1.2. Нервова регуляція кровообігу в печінці.....	16
1.1.3. Вплив гуморальних факторів на печінковий кровообіг.....	18
1.2. Участь газових трансмітерів сірководню та монооксиду азоту у регуляції печінкової гемодинаміки.....	21
1.2.1. Утворення і метаболізм сірководню.....	26
1.2.2. Вплив сірководню на судини.....	28
1.2.3. Синтез і метаболічні перетворення монооксиду азоту.....	30
1.2.4. Судинорухові ефекти монооксиду азоту.....	32
1.3. Особливості регуляції печінкового кровообігу при портальній гіпертензії.....	35
1.3.1. Обмін і регуляторні ефекти сірководню та монооксиду азоту при портальній гіпертензії.....	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	41
2.1. Об'єкт досліджень.....	41
2.2. Реєстрація тиску в кровоносних судинах.....	41
2.3. Вимірювання тканинного кровотоку в печінці щурів методом кліренсу водню з електрохімічною його генерацією.....	42
2.4. Реєстрація кровонаповнення печінки.....	48
2.5. Експериментальна модель портальної гіпертензії.....	50
2.6. Визначення вмісту нітрит-аніону в плазмі крові щурів з портальною гіпертензією.....	50

2.7. Гістологічне дослідження тканини печінки.....	52
2.8. Використані препарати.....	52
2.9. Статистична обробка результатів досліджень.....	53
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	54
3.1. Участь сірководню у регуляції кровообігу в печінці щурів.....	54
3.1.1. Вплив попередника синтезу сірководню L-цистеїну на печінковий кровообіг та тиск крові в її артерійних і ворітних судинах.....	55
3.1.2. Дія донора сірководню NaHS на гемодинаміку в печінці щурів.....	70
3.1.3. Вплив сірководню на кровообіг в печінці за умов портальної гіпертензії.....	77
3.2. Участь монооксиду азоту у регуляції печінкового кровообігу.....	90
3.2.1. Роль NO у регуляції печінкового кровообігу.....	92
3.2.2. Ефекти L-аргініну на печінковий кровообіг в умовах блокади NO-синтаз.....	97
3.2.3. Участь монооксиду азоту у регуляції кровообігу в печінці при портальній гіпертензії.....	104
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	116
ВИСНОВКИ.....	131
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	132

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АСТ	-	аспартатамінотрансфераза
АЛТ	-	аланінамінотрансфераза
АТФ	-	аденозинтрифосфат
АХ	-	ацетилхолін
В/п	-	внутрішньопортально
В/оч	-	внутрішньоочеревинно
В/р	-	внутрішньоректально
ВВ	-	ворітна вена
ВНС	-	вегетативна нервова система
ГМК	-	гладеньком'язова клітина
ЕТ-1	-	ендотелін-1
iNOS	-	індуцибельна NO-синтаза
КНП	-	кровонаповнення печінки
ЛК	-	локальний кровотік
НА	-	норадреналін
ПА	-	печінкова артерія
ПВ	-	печінкові вени
ЦНС	-	центральна нервова система
ШКТ	-	шлунково-кишковий тракт
ПГ	-	портальна гіпертензія
pO ₂	-	напруження кисню
cNOS	-	конститутивна NO-синтаза
САТ	-	системний артеріальний тиск
Твв	-	тиск у ворітній вені
цГМФ	-	циклічний гуанозинмонофосфат
ЦНС	-	центральна нервова система
ЦСО	-	цитохром-с-оксидаза

NOS	-	NO-синтаза
NO ₃ ⁻	-	нітрат-аніон
NO ₂ ⁻	-	нітрит-аніон
NO	-	монооксид азоту
nNOS	-	нейрональна NO-синтаза
NaHS	-	гідросульфід натрію
L-NAME	-	ефір N-нітро-L-аргінінметиловий
iNOS	-	індуцибельна ізоформа синтази оксиду азоту
H ₂ S	-	сірководень
EDHF	-	ендотелій-залежний гіперполяризуючий фактор
CSE	-	цистатіонін-γ-ліаза
CSD	-	цистеїн сульфінат декарбоксилаза
cNOS	-	конститутивна ізоформа синтази оксиду азоту
CDO	-	цистеїндиоксигеназа
CNMT	-	гліцин-N-метилтрансфераза
CBS	-	цистатіонін-β-синтаза
MAT	-	метіонінаденозилтрансфераза
3-MPST	-	3-меркаптопіруват сульфуртрансфераза

ВСТУП

Актуальність теми. Сірководень (H_2S) і монооксид азоту (NO) належать до групи газових трансмітерів, що мають потужну судинорозширювальну дію та широко досліджуються в останні роки. Їх унікальність полягає у здатності діяти аутокринно та паракринно, а також без зв'язування з рецепторами на поверхні клітинної мембрани і без залучення вторинних посередників проникати всередину клітини та брати участь у регуляції фізіологічних процесів на рівні клітин та органів [253]. Фізіологічні ефекти H_2S та NO пов'язані з регуляцією діяльності серцево-судинної, імунної, ендокринної, дихальної, видільної, сенсорної та нервової систем [85, 210, 113]. Також доведена їх важлива гепатопротекторна роль [71, 152]. Так, сірководень сприяє покращенню процесів регенерації в печінці, запобігає окисненню ліпідів, є потужним антиоксидантом, має антиапоптозні властивості [71, 75, 148], тоді як у високих концентраціях може спричиняти патологічні стани [176]. Він здатний розширювати печінкову артерію, ворітну та порожнисту вени [158]. Разом з тим, його донор Na_2S викликає звуження синусоїдів печінки при ендотоксемії та призводить до зростання тиску у ворітній вені [128].

NO сприяє посиленню антиоксидантних властивостей і підвищенню ферментативної активності печінки [229, 263]. В умовах блокади NO -синтази рівень NO в плазмі крові щурів знижується, кровотік в печінці зменшується, а системний артеріальний тиск підвищується, що може призвести до розвитку гіпертензії [56, 204]. Попередник синтезу NO L-аргінін посилює проходження перфузату через печінку, викликаючи розширення її судин [31]. Інші дослідники на підставі ультразвукового вимірювання товщини часток печінки дійшли висновку, що NO не відіграє

істотної ролі у депонуванні крові залозою [54]. Також зазначено, що при застосуванні методу доплерографії дослідження кровотоку в залозі NO не справляє судинорозширювальну дію та не покращує загальний функціональний стан печінки при ішемії реперфузії [56]. Разом з тим, за результатами інших авторів NO виявляє судинорозширювальну дію в печінці і запобігає ішемічному її ураженню [53, 104].

У високих дозах (100-200 мг/кг) L-аргінін може викликати патологічні стани печінки та інших органів шлунково-кишкового тракту, зокрема підшлункової залози [11, 172]. На противагу цьому є відомості про те, що дози від 50 до 500 мг/кг сприяють зростанню печінкового кровообігу, посилюють надходження кисню до залози та виявляють лікувальні властивості [64].

Таким чином, вищезгадані автори подають суперечливі відомості стосовно впливу NO і H_2S на різні судини печінки. Так, при дії NO описують зміни кровотоку в магістральних судинах залози (печінковій артерії та ворітній вені), котрі є судинами опору, та зміни тонуусу цих судин, тоді як вплив даного трансмітера на тканинний кровотік в залозі та її ємнісні судини майже не вивчено. До того ж, суперечливими є свідчення стосовно дії одних і тих же доз попередника синтезу NO L-аргініну на печінкову гемодинаміку. А щодо впливу H_2S на судинне русло печінки, то це питання залишається взагалі майже не дослідженим. Надзвичайно актуальним є також з'ясування участі цих газових трансмітерів у регуляції печінкового кровообігу при портальній гіпертензії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планам, темами. Дисертаційна робота виконана згідно плану науково-дослідних робіт НДІ фізіології імені академіка Петра Богача ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми № 11БФ036-01 "Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій" (2011-2015 рр., № держреєстрації 0111U004648).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати роль газових трансмітерів сірководню та монооксиду азоту у регуляції печінкового кровообігу в нормі та за умов портальної гіпертензії.

Відповідно до мети дисертаційного дослідження поставлено наступні завдання:

1) вивчити вплив попередника синтезу сірководню L-цистеїну на тиск у ворітній вені, кровонаповнення печінки та тканинний кровотік в ній у щурів в дослідах *in vivo*;

2) з'ясувати роль цистатіонін- γ -ліази у реалізації судинорухових ефектів L-цистеїну в печінці;

3) дослідити дію донора сірководню NaHS на печінкову гемодинаміку;

4) з'ясувати роль попередника синтезу монооксиду азоту L-аргініну у регуляції депонування крові печінкою та її тканинного кровотоку;

5) дослідити участь L-цистеїну у регуляції кровообігу в печінці за умов портальної гіпертензії у щурів;

6) вивчити залучення L-аргініну до регуляції печінкового кровообігу при портальній гіпертензії.

Об'єкт дослідження: кровообіг в печінці щурів.

Предмет дослідження: регуляція сірководнем та монооксидом азоту печінкового кровообігу щурів.

Методи дослідження: фізіологічні, біохімічні, гістологічні та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено, що сірководень бере активну участь у регуляції кровообігу в печінці, свідченням чому є розширення внутрішньопечінкових судин, зумовлене внутрішньопортальним введенням попередника синтезу H_2S L-цистеїну або його донора NaHS. На фоні дії DL-пропаргілгліцину (блокатора цистатіонін- γ -ліази) відбувається пригнічення синтезу H_2S як з ендogenous

його попередників, так і з екзогенного L-цистеїну, що зумовлює звуження кровоносних судин печінки.

Показано, що попередник синтезу монооксиду азоту L-аргінін викликає розширення мікроциркуляторних та ємнісних кровоносних судин печінки, що призводить до збільшення тканинного кровотоку і об'єму депонованої в ній крові. Блокада NO-синтаз за допомогою L-NAME повністю усуває ефекти L-аргініну, принічуючи синтез NO як з нього, так і з ендогенних попередників, що циркулюють у кровоносному руслі. В результаті цього відбувається звуження внутрішньопечінкових судин і, як наслідок, зменшення тканинного кровотоку в органі та його кровонаповнення.

Вперше показано, що тривале (впродовж 20 діб) внутрішньоочеревинне введення щурам з натрій-йодною моделлю портальної гіпертензії L-цистеїну або L-аргініну призводить до нормалізації тиску в судинах печінки і тканинного кровотоку в ній, при цьому спостерігається часткова регенерація тканини залози. Встановлено, що при портальній гіпертензії вміст стабільного метаболіту монооксиду азоту – NO_2 в судинному руслі печінки збільшується, що може бути зумовлено додатковою активацією ендотеліальної та індуцибельної форм NOS. Двадцятиденне введення L-аргініну призводить до повернення концентрації NO_2 до вихідного рівня і за механізмом зворотнього зв'язку пригнічує активність eNOS і синтез NO в судинах печінки. L-цистеїн підвищує вміст цього метаболіту в плазмі крові ворітної вени портальногіпертензивних тварин, активуючи NOS.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в роботі експериментальні результати мають як теоретичне, так і практичне значення, оскільки дають змогу доповнити сучасні уявлення про роль газових трансмітерів сірководню та монооксиду азоту у регуляції кровообігу в печінці. Вивчення дії H_2S і NO на печінкову гемодинаміку є також важливим для з'ясування механізмів виникнення та розвитку

багатьох захворювань печінки та біліарної системи, зокрема портальної гіпертензії. Так, при цій патології порушується синтез і, як наслідок, фізіологічна рівновага у крові вазомоторних чинників, у тому числі й газових трансмітерів, внаслідок чого внутрішньопечінкові судини звужуються, тиск крові у портальному руслі зростає, виникають зміни архітектоники печінки. L-аргінін та L-цистеїн призводять до нормалізації гемодинаміки печінки та її мікроструктури. Отримані у роботі результати щодо шляхів реалізації дії L-цистеїну і L-аргініну, як попередників синтезу потужних судинорозширювальних факторів сірководню та монооксиду азоту, дають змогу рекомендувати ці амінокислоти до впровадження в клінічну практику для лікування ідіопатичної форми портальної гіпертензії.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто опрацьовано першоджерела літератури, проведено експериментальну роботу, статистичну обробку та аналіз результатів досліджень. Планування досліджень, обговорення і аналіз отриманих результатів та формулювання висновків здійснено разом з науковим керівником, доктором біологічних наук, професором П.І. Янчуком.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювалися на X Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2014 р.), на VII Міжнародній науковій конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (Київ, 2014), Міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем», приуроченій 70-літтю біологічного факультету та 230-літтю кафедри фізіології Львівського університету (Львів, 2014 р.), на VI Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2014), конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, 2015), XI Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2015), XIX

З'їзді Українського фізіологічного товариства, присвяченому 90-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Львів, 2015).

Публікації. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 14 наукових праць, з яких 6 статей у вітчизняних наукових фахових виданнях, рекомендованих Департаментом акредитації кадрів України, з них 1 у науково-метричній базі; 9 тез наукових конференцій і форумів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел з 290 найменувань. Робота викладена на 164 сторінках, ілюстрована 40 рисунками і містить 11 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Регуляція печінкового кровообігу

Печінка є органом шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та виконує багато функцій пов'язаних з регуляцією метаболізму і бере участь у системах захисту організму. Роботу печінки пов'язують зі знешкодженням хімічних речовин (отрут, токсинів, алергенів), а також виведенням токсичних продуктів обміну, гормонів та інших сполук. Однак реалізація цих функцій можлива лише за належного кровопостачання і нормального функціонування клітин залози, які і забезпечують біологічні процеси в ній.

Кров, яка надходить до печінки збагачена біологічно активними речовинами, які, потрапляючи до кровоносного русла печінки, можуть регулювати у ній кровотік. Крім того, до регуляції печінкового кровообігу залучається вегетативна та центральна нервові системи, які є провідними факторами контролю діяльності більшості органів та систем організму. Варто зазначити, що центральна нервова система (ЦНС) знаходиться у тісному взаємозв'язку з ендокринною системою. Певні структури мозку, наприклад гіпоталамус та гіпофіз, здатні продукувати гормони, які можуть впливати на кровообіг в печінці.

1.1.1. Структурно-функціональні особливості печінки та її судинного русла. Внаслідок індивідуальної і кооперативної діяльності клітин печінки відбуваються метаболічні, біосинтетичні, дезінтоксикаційні та екскреторні процеси синтезу та розпаду різноманітних екзо- та ендогенних сполук, що і забезпечують нормальне функціонування організму в цілому.

Клітини печінки поділяють на паренхімні та непаренхімні. До першої групи відносять гепатоцити, що складають близько 90% маси органу, а до другої – ендотеліальні макрофаги (клітини Купфера), перисинусоїдні клітини (жировмісні клітини) та великі гранулярні лімфоцити (Pit-клітини). Основною структурно-функціональною одиницею печінки є часточка, яка складається із гепатоцитів. В них проходить більше тисячі найрізноманітніших біохімічних реакцій. Інший тип клітин – зірчасті клітини Купфера – виконують важливу захисну роль, мають властивості фіксованих макрофагоцитів, які поглинають із крові бактерії і деякі токсичні речовини.

Відомо, що клітини Купфера становлять близько 70% від усієї макрофагальної популяції організму та є унікальними органоспецифічними макрофагами. Проте вони не тільки виконують фагоцитарну функцію, яка притаманна всім клітинам гісто-моноцитарного ряду, але й беруть участь у виконанні органоспецифічних функцій печінки [277]. Злущуючись в просвіт синусоїдів, вони [250] виконують роль вільних макрофагів та мають здатність до локальної проліферації. Найбільша їх кількість локалізована у периферичних відділах печінкових часточок (поблизу порталних трактів) де вони разом з ендотеліоцитами утворюють синусоїдне вистилання.

Pit – клітини [191], як правило, розташовані у просвіті синусоїдів або в просторі Діссе, фіксуючись відростками до ендотелію. За низкою ознак ці клітини подібні до природних кілерів та мають високу протипухлинну активність.

Печінка може брати участь у синтезі білків, з яких за умов дезамінування амінокислот утворюються сечовина, креатин, фактори згортання крові та фібринолізу. А ферменти, що синтезуються печінкою, забезпечують перетворювання амінокислот в резервне джерело енергії і матеріал для синтезу власних протеїнів в організмі, з яких утворюються білки плазми крові (альбуміни, глобуліни, фібриноген). Ферментні системи

також здатні здійснювати і регуляцію ліпідного обміну. Процеси обміну жирів у печінці сприяють утворенню тригліцеридів, фосфоліпідів, холестерину, жовчних кислот і ліпопротеїдів, а їх надходження до органів забезпечує нормальне функціонування мембранних структур. Важлива роль печінки виявляється і в депонуванні вітамінів (особливо жиророзчинних А, D, Е, К), мікроелементів (залізо, мідь, марганець, кобальт, молібден) та електролітів. Їх вивільнення обумовлюється мірою метаболічної потреби. У вуглеводному обміні функція печінки полягає в перетворенні галактози та фруктози в глюкозу, синтезі та розпаді глікогену, окисленні глюкози та утворенні глюкуронової кислоти [267].

Але головна властивість печінки полягає у виробленні жовчі, за рахунок якої розщеплюються і всмоктуються жири в кишечнику, посилюється його перистальтика. Специфічні компоненти жовчі – жовчні кислоти, є регуляторами холерезу і жовчних пігментів. Жовчні кислоти активують печінкові цитоферменти, впливають на транспортну активність ентероцитів, ресинтез в них тригліцеридів, регулюють проліферацію, пересування і відторгнення ентероцитів з кишкових ворсинок. Регуляторний вплив жовчі поширюється на секрецію шлунка, підшлункової залози та тонкої кишки. Жовч забезпечує всмоктування амінокислот, холестерину, жиророзчинних вітамінів і солей кальцію, пригнічує розмноження бактерій [247, 267].

Отже, печінка в організмі виконує складні та різноспрямовані функції. Проте нормальна їх реалізація можлива лише за умов належного кровопостачання. Разом з тим, кровообіг в залозі є унікальним і відрізняється від кровообігу інших органів.

Печінка характеризується подвійним кровопостачанням і забезпечується одночасним надходженням артеріальної та венозної крові. Умовно регуляцію кровообігу в печінці можна поділити на три ланки: 1) система притоку крові до часточок; 2) система циркуляції крові всередині часточок; 3) система відтоку крові від часточок.

Надходження крові до органа здійснюється по ворітній вені (ВВ), яку утворюють, зливаючись, верхня і нижня брижові вени та селезінкова вена, і яка збирає кров від всіх непарних органів черевної порожнини та печінковій артерії (ПА), що є продовженням гілки черевної аорти. Основним джерелом печінкового кровопостачання є портальна вена, оскільки саме по ній здійснюється найбільше надходження крові (70-90%) до печінки, забезпечуючи виконання специфічних її функцій. У воротах залози обидві судини галузяться на більш дрібні. Варто зазначити, повного розділення цих двох систем кровотоку у печінці не існує, оскільки на рівні печінкових синусоїдів обидва потоки крові зливаються і виходять з печінки єдиним відтоком через печінкові вени. Така фізіологічна особливість полягає у живленні паренхіми залози артеріальною та венозною кров'ю [149, 267].

Система внутрішньопечінкової мікроциркуляції представлена ворітними венулами, печінковими артеріолами, синусоїдами, а також печінковими венулами [181]. Синусоїди є еквівалентом капілярів і виконують їхню функцію, але відрізняються за розмірами та будовою. Так, діаметр синусоїдів досягає 20-40 мкм, а в своїх стінках вони містять отвори, крізь які проходять макромолекули та клітини крові. Стінка синусоїдів утворена одним шаром ендотеліоцитів, поміж яких включені зірчасті ретикулоендотеліоцити (клітини Купфера), та клітини Іто, що прилягають до ендотеліоцитів ззовні судини. Навколосинусоїдний простір (простір Діссе), утворений плазматичними мембранами гепатоцитів і стінкою синусоїдів. Через пори в цитоплазмі ендотеліоцитів простір Діссе сполучається з просвітом синусоїдів.

Відтік крові з синусоїдів здійснюється через печінкові венули та вени, що впадають у нижню порожнисту вену. Регуляція кровообігу в цьому органі опосередковується і системою сфінктерів. Розрізняють вхідні сфінктери, які локалізовані в місцях переходу дрібних розгалуджень артеріол та портальних венул до синусоїдів та вихідні – на межі впадання

синусоїдів у центральні венули. В стінках печінкових вен знаходиться сфінктер Піка, а в місці впадання цих вен у нижню порожнисту вену знаходиться сфінктер Бауера. Ці сфінктери регулюють внутрішньопечінковий портальний тиск і кровонаповнення органу [181]. Крім того, роль додаткових сфінктерів у системі портального кровообігу виконує і м'язовий шар в оболонці стінок артерій і артеріол. Така система допомагає печінці зберігати великі об'єми крові і посилює її депонуючу функцію. Однак варто зазначити, що кровоносна система печінки зазнає впливів і від ЦНС та ВНС, які здатні активно регулювати кровообіг в залозі.

1.1.2. Нервова регуляція кровообігу в печінці. Кровоносні судини організму постійно перебувають у стані помірного напруження – судинного тону. Ця регуляція забезпечується завдяки роботі нервової системи та впливу гуморальних чинників. За умов розтягнення стінок судин ГМК скорочуються, а при зниженні тиску у кровоносному руслі ці клітини зумовлюють розширення судин. Така ауторегуляція необхідна для належного кровонадходження до органів і тканин. Проте, у переважній більшості кровоносних судин відсутність судинозвужувальних чинників не призводить до повного розслаблення ГМК і абсолютного розширення судин. Низка факторів спричиняють специфічну реакцію розслаблення м'язових клітин стінки судин і відповідно її розширення.

Нервова регуляція печінки здійснюється за участю симпатичної та парасимпатичної нервових систем. Всередині залози вони формують нервові плетива, гілки яких поширюються до медії і закінчуються на гладеньком'язових волокнах та здійснюють вазомоторну функцію [47]. Стимуляція артеріального нервового плетива призводить до підвищення судинного опору в артеріальному та венозному судинному руслі залози, викликаючи значне зменшення печінкового кровотоку [52]. А подразнення ворітного симпатичного плетива призводить до зниження кровотоку в

печінці опосередкованому ПА та ВВ [52]. Слід зазначити, що така стимуляція зумовлює і закриття синусоїдів, в результаті чого відбувається перерозподіл мобілізованої в печінці крові [72].

Численні дослідження [47] показали, що ворітна вена слугує своєрідним безперебійним постачальником крові до печінки, оскільки при стимуляції печінкових нервів і при підвищенні судинного опору у ворітній вені тиск крові у портальних судинах зростає, а кровотік в печінці лишається незмінним.

Відомо, що за рахунок електричної стимуляції блукаючого нерва, а саме периферичного його кінця печінковий кровотік в собак та котів не змінювався, однак стимуляція з частотою 10 Hz [146] викликала розширення синусоїдів печінки. А білатеральне перерізання вагуса призводило до звужування синусоїдів і перерозподілу крові в цьому органі. Доведено, що подразнення блукаючого нерва опосередковується прямою іннервацією пресинусоїдного сфінктера та скороченням базальної мембрани ендотеліоцитів синусоїдів [146]. Така реакція судин печінки засвідчує залучення вегетативної нервової системи (ВНС) до регуляції портальнопечінкового кровообігу [52].

Центри ВНС розташовані у структурах гіпоталамуса та довгастого мозку. Подразнення цих центрів відіграють важливу роль у регуляції таких вісцеральних функцій, як травлення, терморегуляція, діяльність серцево-судинної системи. Слід зауважити, що до вище зазначених функцій залучена печінка.

Подразнення більшості досліджуваних структур гіпоталамуса у собак зумовлювало поряд зі зрушеннями рівня pO_2 в печінці також зміни її кровообігу. Тиск у судинах печінки під час електростимуляції гіпоталамуса, як правило, підвищувався у залежності від місця подразнення. Так, активація симпатогальмівної зони призводила до зниження артеріального тиску, тоді як подразнення середнього і заднього гіпоталамуса (вентромедіальне, латеральне гіпоталамічне і медіальне

мамільярне ядра) призводило до підвищення опору у внутрішньопечінкових артеріальних судинах та зменшення кровотоку в ПА. Варто зазначити, що при цьому опір судин черевних органів і у ворітному руслі печінки зростає більше, ніж опір у внутрішньопечінкових артеріальних судинах. Однак, при подразненні симпатогальмівної зони і латерального гіпоталамічного ядра амплітуда реакцій не перевищувала 28%, поряд із різнонаправленими змінами тиску і кровотоку в судинах печінки [178, 280].

В результаті проведених в нашій лабораторії Цибенко В. А. та співавтори показали [282, 284], що подразнення середнього і заднього гіпоталамуса впливає на метаболізм печінки і споживання кисню. Зміни pO_2 при стимуляції структур переднього гіпоталамуса не пов'язані із зсувом метаболізму печінки і споживання нею кисню, а є пасивним відображенням змін кровопостачання залози. Автори припускають, що підвищення тиску у ворітній вені і зниження тканинного кровотоку в печінці відбуваються в результаті судинорухових реакцій в системі портальної вени, викликаних змінами активності α -адренергічної симпатичної іннервації ядер [178, 272, 275].

Ці дослідження проведені *in vivo*, тому не можна виключати, що кровообіг у печінці регулюється не тільки нервовою системою, але і опосередковується гуморальними факторами, які утворилися під час метаболізму в її тканині.

1.1.3. Вплив гуморальних факторів на печінковий кровообіг. Кров, яка надходить до печінки збагачена великою кількістю біологічно активних речовин, які можуть впливати не тільки на її функціональний стан, але і регулюють судинну систему в ній. Вплив багатьох гормонів ШКТ, катехоламінів та амінокислот на судини печінки було досліджено в гострих експериментах на тваринах. Виявилось, що печінкові судини чутливі до регуляторного впливу значної кількості гуморальних факторів. Частина з яких має яскраво виражений вазоконстрикторний вплив саме на судини

печінки. Так, олігопептидний гормон ангіотензин викликає звуження артеріальних і венозних судин печінки. Зменшуючи одночасно надходження до неї кисню і пригнічуючи тканинне дихання органу. А холецистокінін слабо впливає на тонус печінкових судин, проте, підвищує надходження крові до залози за рахунок розширення брижових артерій та вен зумовлюючи зростання транспорту кисню до печінки [288].

До потужних судинозвужувальних факторів належать ендотеліни – пептиди, родина яких налічує чотири види. Серед них ендотелін-1 (ЕТ-1, або просто ендотелін), ендотелін-2 (ЕТ-2), ендотелін-3 (ЕТ-3) та ендотелін-4 (ЕТ-4) що відрізняються кількома амінокислотними залишками [62]. Ефекти ендотелінів регулюються за рахунок зв'язування з ET_A і ET_B -рецепторами. Ці рецептори належать до G-білок-зв'язаних рецепторів, активація яких призводить до зростання внутрішньоклітинної концентрації вільного (незв'язаного) кальцію. За сучасними уявленнями відомо, що при активації ET_A -рецепторів, синтез NO в судинах зменшується, що і призводить до їхнього звуження. Однак, приєднавшись до ET_B -рецепторів спостерігається протилежний ефект, синтез монооксиду азоту збільшується, а утворення цАМФ гальмується, зумовлюючи розширення судин. Поряд з цим, монооксид азоту здатний пригнічувати утворення ЕТ-1 і через цГМФ-незалежний механізм [143].

Але, варто зазначити, будь-які порушення у системі цілісності ендотелію судин печінки, можуть викликати гемодинамічні зміни на рівні цілого організму.

Загально відомо, що особлива роль у регуляції судинного тонуусу і, відповідно, кровообігу належить катехоламінам. Реакція судин печінки на введення адреналіну та норадреналіну виражається у звуженні внутрішньопечінкових судин і зменшенні кровонаповнення печінки [279]. Такий ефект у відповідь на дію норадреналіну реалізується не лише за рахунок звуження печінкових судин, але і за участі сфінктерної її ділянки. Доведено, що підвищення ворітного тиску обумовлене скороченням саме

сфінктерів печінкових вен, а реалізація цих реакції здійснюється через активацію α -адренорецепторів.

Також виявлено, що деякі регуляторні пептиди виявляють складний вплив на кровоносну систему печінки. Наприклад, пентагастрин, так само як і секретин, розширює внутрішньопечінкові ворітні судини та судини черевних органів, зумовлюючи підвищення кровотоку в печінці. Однак, в іншій серії досліджень цей гормон підвищував кровотік у печінковій артерії і ворітній вені, зменшуючи тканинний кровотік в органі [288]. Тобто вплив пентагастрину на судинне русло печінки опосередковане двохфазною реакцією. За тих самих умов, що і у попередніх дослідках, вивчали ефекти, викликані вазоактивним інтенстинальним поліпептидом (ВІП) у судинах печінки. Встановлено, що ця речовина викликає короткочасне (до 5 хв) розширення артеріальних судин печінки та мезентеріальних органів і звуження внутрішньопечінкових ворітних судин. Після цього спостерігалися тривалі реакції збільшення ворітного кровотоку. Вважають, що ВІП безпосередньо впливає лише на печінкову артерію, в той час як ворітний кровотік змінюється за рахунок реакцій мезентеріальних судин [192, 288]. Встановлено, що гормон гіпоталамуса вазопресин при внутрішньопортальному введенні собакам викликав значне підвищення печінкового артеріального тиску та зниження опору ворітної вени, що супроводжувалося відповідним підвищенням і зниженням тиску крові у цих судинах [274]. Окрім того, спостерігалось хоч і незначне, проте закономірне зниження об'єму крові в печінці. Таким чином, немає однозначної оцінки дії вазопресину на ворітні судини печінки. А окситоцин незалежно від дози знижував опір в печінковій артерії і підвищував кровотік у цьому судинному руслі. Одночасно реєстрували підвищення кровонаповнення печінки. Показники ж ворітного кровотоку практично не змінювались [274]. Автори вважають, що зміни кровонаповнення печінки при введенні вазопресину та окситоцину, швидше за все, зумовлені реакціями пресинусоїдних ворітних судин

печінки, що депонують кров. Нерівномірний розподіл вазопресинових і окситоцинових рецепторів в артеріальному та порталному руслах печінки якраз і пояснюють різницю в реакціях на введення цих речовин у ворітну вену. Гормон гіпофіза кортикотропін шляхом безпосередньої дії на брижові і внутрішньопечінкові судини викликає їх звуження, а тривалий судинорозширюючий вплив кортикотропіну опосередковувався через гормони наднирників. Соматотропін знижував ворітний кровотік шляхом звуження брижових судин [288].

Деякі гуморальні фактори здатні чинити вазодилаторний вплив на печінкові судини. Так, внутрішньопортальне введення секретину у собак викликає переважно тривале розширення мезентеріальних і внутрішньопечінкових судин, при цьому швидкість поглинання кисню печінкою підвищується. Доведено, що такий вплив на артеріальні судини здійснюється за участю метаболічних посередників або гормонів, які потрапляють до кровоносної системи за рахунок його дії [274, 281].

Серед судинорозширювальних факторів особливе місце посідають газові трансмітери, перед усім NO та H₂S. Оскільки ці речовини мають специфічні властивості розглянемо їх ефекти більш детально у наступних підрозділах огляду літератури.

1.2. Участь газових трансмітерів сірководню та монооксиду азоту у регуляції печінкової гемодинаміки

В останні роки стало відомо, що регуляторні гази здатні впливати на міжклітинні взаємозв'язки в організмі і тим самим викликати зміни не тільки на рівні клітин, але і впливати на загальний функціональний стан органів. Так, NO та H₂S беруть участь у більшості метаболічних процесів, що відбуваються в печінці [119, 152, 213]. Відмічено, що ці посередники можуть виявляти гепатопротекторні властивості. Вони здатні сприяти

регенераційним процесам в печінці, бути потужними антиоксидантами, запобігати окисленню ліпідів та володіють антиапоптозними властивостями [71, 241].

Захисна роль сірководню на роботу залози була продемонстрована у щурів з ішемією печінки [75, 89]. Введення його донора NaHS у дозі 14 моль/кг за 30 хв до експериментальної ішемії-реперфузії зумовлювало зменшення травмування органу. А введення іншого донору H₂S ІК 1001 за 5 хв до реперфузії, у печінці мишей призводило до зниження рівня АЛТ і АСТ в крові разом з посиленням синтезом тіоредотоксину-1, який в свою чергу бере участь в окисно-відновних процесах в печінці [89]. Подібні дослідження були підтверджені й іншими авторами [75], в яких також була відзначена позитивна роль H₂S на печінковий кровообіг в умовах ішемії.

Варто зазначити, сірководень є токсичним газом і його високі концентрації можуть призводити до виникнення патологій в організмі [143, 176]. Так, сірководень інгібує цитохром-с-оксидазу (ЦСО), яка здатна каталізувати перенесення електронів на O₂ в процесі окисного фосфорилування і тому в даному контексті H₂S розглядається як задушливий газ. Відомо, що розчинений сірководень є слабкою кислотою і може дисоціювати на HS⁻ та S₂⁻. При його високій концентрації і зв'язуванні з ЦСО аеробне дихання в печінці пригнічується, а токсичний вплив на гепатоцити посилюється [152]. Є відомості, що у працівників нафтопереробних заводів виявлено пошкодження печінки різного ступеню складності [143]. Перевіряючи цей факт [176] мишей помістили на 16 год в камеру, де кількість H₂S становила 63 проміле і на 22 хв, де концентрація сірководню була 500 проміле. Виявилось, що у тварин першої групи виникла гіперемія, а в другій – спостерігалась інтоксикація організму та некроз гепатоцитів [176]. Також відзначено, що рівень H₂S у людей та мишей із зараженням крові зростає, а внутрішньоочеревинне введення блокатора його синтезу DL-пропаргілгліцину (50 мг/кг) знижує його концентрацію в крові та сприяє покращенню роботи печінки [128].

Доведено, під час опромінення гепатоцитів зменшується синтез глутатіону, який володіє потужними антиоксидантними властивостями. Оскільки останній містить у своєму складі між аміногрупою цистеїна і карбоксильною групою глутамату пептидний зв'язок, тому його руйнування може бути пов'язане з синтезом H_2S [176].

На ізольованих препаратах печінки методом перфузії було показано, що донор сірководню Na_2S призводить до зростання тиску у ворітній вені та викликає звуження синусоїдів печінки [128]. А DL-пропаргілгліцин послаблює цей констрикторний ефект. Така реакція печінкових судин, як пояснюють автори, може бути обумовлена відсутністю м'язової стінки навколо синусоїдів та додатковою активацією ET-1 [171]. Тонус синусоїдів регулюється за допомогою гемопоетичних стовбурових клітин (похідних мезодерми) [171]. Тому кровообіг в печінці є складним і за характером реакції відрізняється від більшості судин організму.

Проте у більшості випадків вплив H_2S на судини організму пояснюють як судинорозширювальний, що опосередковується прямою дією на K_{ATP} - канали або K-потенціал-залежні канали. Відкриття цих каналів призводить до гіперполяризації мембрани та закриття потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів, що в результаті призводить до зниження концентрації внутрішньоклітинного кальцію, а разом і з тим до дилатації судини. Відомо також, що H_2S впливаючи на гладенькі м'язи судин призводить до вивільнення ендотелійзалежних-розширюючих факторів та монооксиду азоту. При контакті H_2S з гладенькими м'язами рівень NO знижується. Це пов'язано з тим, що взаємодія H_2S з монооксидом азоту призводить до утворення нітрозотіолів, а вони, в свою чергу, спричиняють гальмування eNOS і знижують активність цАМФ [160].

У 2003 році [157] було показано, що введення L-аргініну призводить до звуження ворітної вени. А інгібітор NOS N- ω -циклопорил-L-аргінін не впливав на спонтанні скорочення у ВВ. Цей вазоконстрикторний ефект обумовлений підвищенням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} і

пов'язаний з інгібуванням АТФ чутливих K^+ -каналів. Тобто отримані результати підтверджують взаємозв'язок у судинних реакціях сірководню та монооксиду азоту.

Безпосередня участь NO у роботі печінки є добре вивченою і полягає у покращенні функціонування органа [229, 263].

Доведено, що монооксид азоту здатний синтезуватися гепатоцитами, клітинами Купфера, синусоїдними та артеріальними ендотеліоцитами. NO захищає печінку від впливу патогенних чинників, запобігає адгезії лейкоцитів і тромбоцитів, які здатні ініціювати пошкодження ендотелію, а при трансплантації печінки перешкоджає її пошкодженню [30, 229, 263]. Він здатний інгібувати білковий синтез, а також справляти регуляторний вплив на гомеостаз глюкози, завдяки пригніченню активованого глюкагоном глюконеогенезу у печінці тварин. Відзначено важливу роль NO і у регуляції процесів утворення та секреції жовчі, а також у неспецифічній імунній відповіді [213].

За літературними даними відомо, що амінокислота аргінін може сприяти дезінтоксикаційним процесам в печінці та впливати на жировий обмін організму. Відомо, що за умов зниження рівня ліпопротеїнів дуже низької щільності синтез ліпопротеїнів високої щільності в крові посилюється. При жировій дистрофії та цирозах печінки цю амінокислоту використовують як лікувальний засіб, оскільки L-аргінін здатний гальмувати абсорбцію спожитого з їжею жиру [243, 273].

L-аргінін володіє і захисними властивостями. Так, при ішемії-реперфузії печінки, ефект L-аргініну може бути обумовлений модифікацією функціональних властивостей гемоглобіну, яка пов'язана з його участю у надходженні кисню до тканин (підтриманням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі) та покращенням мікроциркуляції в органі. Також ця амінокислота нормалізує тканинне напруження кисню, а антиоксидантні його властивості сприяють стабілізації мембранного потенціалу і запобігають проникненню активних

форм кисню до гідрофобного шару плазматичної мембрани [257]. Іншим механізмом NO-опосередкованого захисту печінки є антиапоптозний вплив монооксиду азоту. В моделях гострої недостатності печінки *in vivo*, донор монооксиду азоту нітропрусид натрію зменшував ураження цього органу та блокував апоптоз гепатоцитів [78].

В умовах *in situ* на перфузованій печінці щурів було показано, що L-аргінін (3 мкмоль/мл) підвищує об'ємну швидкість проходження крові через печінку, а селективний інгібітор NOS аміногуанідин дозозалежно (3-18 мкмоль/мл) викликає констрикцію судини печінки і знижує швидкість проходження перфузата. Також встановлено, що аміногуанідин пригнічує вазодилатацію судин печінки стимульовану ацетилхоліном [92].

Регуляцію тиску в артеріях печінки може здійснювати NO. Так, при введенні попередника синтезу монооксиду азоту L-аргініну артеріальні судини печінки розширюються, а введення неселективного інгібітора NOS L-NAME призводить до звуження цих судин. Показано, що констрикторний ефект в судинах печінки викликаний норадреналіном посилюється на фоні дії L-NAME, а L-аргінін усуває цей ефект зумовлюючи розширення судин в печінці [121]. Довгострокове гальмування синтезу NO, після введення L-NNA, призводить до зниження тиску в системному артеріальному руслі і не змінює тонуусу ворітної вени. Такі результати свідчать про те, що за відсутності монооксиду азоту вазомоторна реакція у печінці також відсутня [91, 93].

Отже, виходячи з літературних відомостей описаних вище можна сказати, що сірководень та монооксид азоту здатні впливати на кровоносну систему печінки і виявляти свої ефекти не тільки у судинному розширенні, але й спричиняти їх звуження. Механізми реалізації цих впливів та процесів утворення NO і H₂S є різними. Тому, наступний етап в пошуках літератури полягав у вивченні їх метаболізму та регуляції судинного тонуусу в різних системах та органах.

1.2.1. Утворення і метаболізм сірководню. H_2S є нещодавно відкритим представником групи газових трансмітерів. В організмі він виявлений в недисоційованій формі, аніон-гідросульфідній і сульфід-аніонній. Катаболізм сірководню включає декілька шляхів: окислення в мітохондріях, метилювання в цитозолі і зв'язування з гемоглобіном [190].

Ендогенно сірководень здатний синтезуватися ферментативним та неферментативним шляхами. Субстратом для ферментативного утворення H_2S є сірковмісна амінокислота L-цистеїн, яка і посідає перше місце в організмі для синтезу H_2S . Важливо зазначити, що ця амінокислота здатна надходити до організму разом з продуктами харчування або утворюватися з інших ендогенних амінокислот, наприклад з L-метіоніну [45, 187]. Ферментативний шлях синтезу H_2S в різних тканинах та органах здійснюється за участю трьох ензимів: цистатіонін β -синтази (CBS), цистатіонін γ -ліази (CSE) та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (MPST). Ці ферменти в нормі зустрічаються майже у всіх системах організму. Однак, за метаболізм синтезу з L-цистеїну відповідають CBS та CSE [24]. CBS локалізована переважно у нервовій системі та сприяє утворенню H_2S у відповідь на збудження нейронів. Найбільшу кількість CBS було виявлено в клітинах Пуркінє мозочка і гіпокампі [187]. Відомо, що активність цього ферменту може регулюватися на рівні транскрипції глюкокортикоїдами, АДФ, S-аденозил-L-метіоніном і піридоксаль-5-фосфатом [79]. На синтез сірководню з цистатіонін β -синтази можуть впливати NO і CO [73]. Так, CO здатний пригнічувати активність CBS шляхом зв'язування з її N-кінцевою частиною, яка складається з 70 амінокислотних залишків і виступає в ролі окисно-відновного сенсору, що і є мішенню для CO [73], а нітропрурид натрію підвищує активність CBS внаслідок хімічної модифікації цистеїнових груп цього ферменту. Також відзначено, що монооксид азоту здатний інактивувати CBS, проте його дія є слабшою від CO і тому, CBS може бути мішенню для монооксиду вуглецю в головному мозку [107].

Фермент CSE на сьогодні є мало вивченим, однак відомо що експресується він безпосередньо у серцево-судинній системі, печінці, нирках та легенях. Відомо, що у серці мишей синтез CSE на 24 % вищий порівняно з грудною аортою [202]. Не високі концентрації CSE виявлені також у тонкому кишечнику та шлунку гризунів [170]. Тоді як у ембріонів не виявлено функціонування даного ферменту, а з'являється він тільки після народження. Активація CSE здійснюється за участю Ca^{2+} -кальмодуліну та гемоксигенази. Селективними інгібіторами цього ферменту є DL-пропаргілгліцин та β -ціано-L-аланін [22].

Ензим MPST разом з цистеїнамінотрансферазою відповідають за синтез H_2S в головному мозку та ендотелії судин [124]. MPST виявлено в цитозольній та мітохондріальній фракції нирок та печінці щурів, тоді як CBS та CSE локалізовані лише в цитозолі [73].

Високі концентрації сірководню присутні в кишечнику завдяки бактеріям, що утилізують сульфати, сірковмісні амінокислоти (цистеїн, метіонін), а також ліпіди та полісахариди. Зазвичай ця утилізація здійснюється з метою захисту мікрофлори кишечника від високих концентрацій сульфіда та запобігання надходження великої кількості сірководню до організму [50]. Існує також декілька неорганічних джерел H_2S в організмі, наприклад неферментативне відновлення сірки в реакціях окислення глюкози в еритроцитах [50].

Ендогенне утворення сірководню починається з метіоніну, який під впливом метіонаденозилтрансферази (methionine adenosyltransferase – MAT) перетворюється на S-аденозилметіонін. Гідроліз S-аденозилметіоніна на гомоцистеїн опосередковується гліцин-N-метилтрансферазою (glycine N-methyltransferase - GNMT). CBS каталізує синтез цистатіоніну, перетворюючи серин в гомоцистеїн, а CSE - цистатіонін в цистеїн. Тоді як CSE каталізує β -дисульфідні зв'язки в реакціях з утворенням пірувату, NH_4^+ і тіоцистеїну. Останній, в свою чергу, може вступати у взаємодію з цистеїном або іншими тіолами. Другим

шляхом метаболізму цистеїну є його окиснення в цистеїнсульфінат під дією цистеїндіоксигенази (cysteine dioxygenase – CDO), яка за участі цистеїнсульфінатдекарбоксилази (sulfoalanine decarboxylase – CSD) перетворюється в гіпотаурин, і далі без залучення ферментів в таурин. Обидві реакції протікають в цитозолі клітини [24].

1.2.2. Вплив сірководню на судини. Відомо, що H_2S є потужним судиннорозширювальним фактором і вперше з'являється у процесі еволюції в амфібій, що свідчить про його філогенетичну давність [124]. Велика кількість літератури свідчить про те, що H_2S в якості посередника може забезпечувати не тільки локальну, але і дистантну регуляцію в гладеньких м'язах.

В 1997 було вперше показано судинорозширювальний ефект сірководню на аорту щурів [61]. Подальші дослідження над цією тематикою були підтверджені і в 2001 році [208]. Після цього стало відомо, що сірководень призводить до зниження тонуусу судин і прямо активує K_{ATP} -канали [102].

Вазодилататорний ефект сірководню на гладенькі м'язи шлунку добре досліджено в експериментах *in vitro* [187]. Було продемонстровано, що у мишей позбавлених гену, котрий відповідає за експресію CSE, на 12-тижні почала розвиватись гіпертонія, а внутрішньовенна ін'єкція гідросульфиду натрію призводила до стабілізації тиску [202].

Найбільш сильне розширення судин під впливом сірководню спостерігається в брижових артеріях ШКТ мишей. Цей ефект пов'язаний з гіперполяризацією мембрани та відкриттям калієвих ATP -залежних каналів, які активуються внаслідок зв'язування з фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфатом. Клітини, що не здатні синтезувати CSE або є каталітично неактивні і зв'язуватись з фосфатидилінозитолом-4,5-бісфосфатом не можуть, гіперполяризації мембрани не викликають і вазодилататорний ефект у судинах відсутній. Судинне розширення частково опосередковане і

активацією $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, що здійснюється за рахунок зниження внутрішньоклітинного pH [93, 105].

Відзначено, що сірководень володіє кардіопротекторними властивостями [135, 141]. Його позитивна роль відзначена у регуляції таких захворювань як атеросклероз, гіпертонія, інфаркт міокарду та легенева гіпертензія [122, 141]. Показано, що дефіцит у синтезі сірководню призводить до системної та легеневої гіпертензії [202, 206, 209]. А при екзогенному введенні H_2S системний артеріальний тиск знижується разом зі зменшенням тонузу в легневих судинах [197]. Доведено, що вазодилататорна реакція пов'язана з активацією CSE, оскільки у мутантних щурів, в яких цей фермент відсутній, ендотелій-залежне розширення судин на введення сірководню знижується [202].

На сьогодні є відомості, що крім судинорозширювального ефекту H_2S може викликати і судинне звуження. Так, при введенні NaHS у дозі 1 мкмоль/л спостерігається розширення аорти, а його введення у дозі 50-1000 мкмоль/л призводить до звуження судин з поступовим їх розслабленням тривалістю 30хв.[164] В концентрації 50, 100 та 200 мкмоль/л NaHS спричиняє судинне звуження з поступовим його розширенням, після чого знову настає ефект звуження судин. Однак, введення великих доз – 500 та 1000 мкмоль/л спостерігається вазодилататорний вплив на аорту щурів [164, 165]. Фазний характер впливу NaHS було підтверджено і на легневій артерії. Показано, що після введення донору спостерігається звуження судини, а на 20-30 хвилині настає розширення, після чого передуює знову констрикторний ефект [133]. Проте, нещодавні дослідження показали, що легневі артерії морських левів на введення донору сірководню реагують тільки розширенням судин.

Виходячи з вище описаних ефектів H_2S щодо його впливу на тонузу судин можна зауважити, що вони є досить неоднозначні. З одного боку прийнято вважати, що сірководень є потужним вазодилататором, а з

іншого його вплив на легеневі та судини серця проявляються у вигляді вазоконстрикції. Такі результати дають підставу в актуальності майбутніх досліджень на різні судини організму та з'ясуванні механізмів за рахунок яких реалізуються ці впливи.

1.2.3. Синтез і метаболічні перетворення монооксиду азоту.

Монооксид азоту утворюється в результаті окислення амінокислоти L-аргініну з одночасним синтезом іншої амінокислоти L-цитруліну, під впливом ферменту NO-синтази (NOS). М. Марлетт описавши реакцію ферментативного утворення NO запропонував її схематичне зображення (рис.1.1).

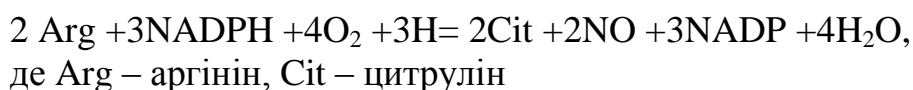


Рис. 1.1. Схема синтезу монооксиду азоту в організмі тварин [111, 186].

Існує кілька ізоформ NOS, названих за типом клітин, де вони були вперше виділені – нейрональна (nNOS, NOS I), ендотеліальна (eNOS, NOS III) та макрофагальна або індукована (iNOS, NOS II). NOS I та NOS III ізоформи ферменту постійно експресуються і тому їх називаються конститутивними [111, 137, 232]. Здатність синтезувати монооксид азоту в невеликих кількостях і активуватися за наявності Ca^{2+} або кальмодуліну в середині клітини пояснюється їх фізіологічною важливістю. Адже NO продукований eNOS справляє судиннорозширювальну дію, інгібує агрегацію та адгезію тромбоцитів, і проліферацію ГМК. Зменшення синтезу монооксиду азоту ендотеліальними клітинами вважають однією з основних причин дисфункції ендотелію. Це, в свою чергу, може призвести до розвитку цукрового діабету 2 типу, артеріальної гіпертонії, серцевої недостатності та гіперхолістеринемії. На відміну цим ізоформам, NOS II вперше було індуковано в макрофагах, проте пізніше її було виявлено і в ГМК, фібробластах, епітеліальних клітинах та гепатоцитах. Активність

макрофагальної ізоформи не залежить від внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , а синтезована кількість NO в 1000 раз перевищує продукцію цієї молекули кальмодулінзалежними ізоформами. Експресія iNOS здійснюється протизапальними цитокінами (фактор некрозу пухлини- α , інтерлейкін-1 β), тому утворена молекула NO обумовлює цитотоксичну і протипухлинну дію. Відмічено, патологічні стани серцево-судинної системи також призводять до збільшення кількості цього ферменту [224].

Біологічна активність NO стимулюється деякими агоністами, включаючи L-аргінін, ацетилхолін, брадикінін тощо. Однак, синтез NO може гальмуватися різними аналогами L-аргініну, які є конкурентними інгібіторами NOS. Так, N-омега-циклопорил-L-аргінін є селективним інгібітором eNOS, а аміногуанідин – iNOS. Деякі інші аналоги L-аргініну, такі як N-монометил-L-аргінін (L-NMMA), N-нітро-L-аргінінметиловий ефір (L-NAME), N-нітро-L-аргінін (L-NNA) здатні гальмувати вироблення NO обома ферментами. Виділення NO може гальмуватися або припинятися під впливом гемопротейнів, метиленового блакитного, супероксид радикалів, етанолу, глюкокортикостероїдів, індометацину [212, 142].

Однак, синтез монооксиду азоту може здійснюватися і без залучення у реакцію ферментів. Тоді цей шлях називають неферментативним. Він полягає у відновленні нітратів або нітритів до монооксиду азоту. Реакція утворення NO здійснюється за умов диспропорційного відношення нітриту та азотної кислоти в кислому середовищі ($\text{pH} < 6$) [70]. Такий механізм спостерігається при патологічних станах організму (ішемія, запалення). А за нейтрального рН спостерігається прямий шлях відновлення нітриту/нітрату до монооксиду азоту. Цей шлях реалізується за допомогою гемвмісних білків, які володіють нітратредуктазною активністю. Серед них виділяють гемоглобін, міоглобін, цитохро-с-оксидазу і цитохром P-450 [70, 261].

Кількість нітратів (NO_3^-) і нітритів (NO_2^-) визначається як маркер стабільного монооксиду азоту. Більше 90% цих метаболітів виводиться нирками. Їх солі добре розчинні у воді і не депонуються клітинами, але можуть акумулюватися в плевральних і асцидних рідинах [163, 174]. Однак, якщо надходження NO_3^- і NO_2^- до організму з водою та продуктами харчування є незмінними, а в серозних порожнинах не накопичується рідина, то коливання сечової екскреції нітратів/нітритів адекватно відображають зміни швидкості біосинтезу NO [138, 163].

Доведено, що вікові зміни призводять до зменшення продукції NO_3^- і NO_2^- . Так, у віці 60-70 років спостерігається зниження концентрації нітритів у крові. Припускають [236], що це може виникнути в результаті пошкодження клітин ендотелію або їх виснаження після тривалого впливу сполук, що стимулюють синтез NO. Такі дослідження були підтверджені і на щурах. Однак, у тварин старечого віку рівень iNOS зростає за рахунок надмірного утворення і накопичення пероксинітриту [234], що справляє на організм цитотоксичну дію.

1.2.4. Судинорухові ефекти монооксиду азоту. За нормальних умов невелика кількість монооксиду азоту постійно продукується ендотелієм, а хімічні, механічні, бактеріальні та вірусні впливи значно посилюють його виділення. При септичному шоці велика кількість мікробів, що циркулює в кровоносній системі, активують синтез газу викликаючи сильне і тривале розширення судин, значно знижуючи артеріальний тиск. Тому для нормалізації стану організму використовують препарати, які здатні знижувати його виділення і підтримувати тиск на оптимальному рівні [237].

Дослідження серцево-судинної системи показали, що монооксид азоту покращує ефективність роботи серця, збільшуючи кровотік і доставку кисню до серцевих м'язів. Також відмічено, що при стенокардії цей газ здатний знімати спазм в судинах, зміцнювати стінки і посилювати

їх проникність. Збільшення кровотоку при варикозному розширенні вен призводить до ліквідації тромбів та атеросклеротичних бляшок. Показано, у щурів з цукровим діабетом тонус в коронарних судинах та в аорті збільшується, а рівень конститутивних NOS та вміст вільного L-аргініну у плазмі крові зменшується. Доведено, низькі концентрації L-аргініну лише частково впливають на ендотелій судин вивільняючи NO. Однак, середній та високий вміст амінокислоти в плазмі призводить до прямої вазодилатації та стимуляції у виділенні інсуліну та соматотропіну [14]. Виходячи з цього екзогенне введення попередника синтезу NO L-аргініну викликає розширення судин серця, а неселективний інгібітор NOS L-NAME усуває його дію [251, 259]. Однак є дані, які свідчать про те, що судиннорозширювальний ефект аргініну здійснюється без участі монооксиду азоту. А дилатація коронарних судин кози в умовах *in vitro* опосередкована активацією K-АТФ-залежних каналів [29]. На цих самих судинах була проведена серія досліджень у з'ясуванні реактивності судин при введенні ET-1, L-аргініну, L- глутаміну. Виявилось, що на фоні дії ET-1, L-аргінін не спричиняє вазодилатації. А амінокислота L-глутамін розширює коронарні судини. Такі результати є свідченням обмеженого синтезу NO аргініном. І реакція коронарних судин може змінюватись в залежності від додавання амінокислоти [123].

За умов недостатньої кількості монооксиду азоту легеневі судини звужуються. А при бронхіальній астмі введення аргініну сприяє збільшенню легеневого кровотоку і розширенню судин. Внаслідок цього газообмін (надходження кисню та виведення вуглекислого газу) покращується, а задуха, бронхіт та всі астматичні прояви припиняються. Також відмічена роль NO і при легеневій гіпертензії. Це захворювання супроводжується зменшеним вмістом монооксиду азоту та його метаболітів в плазмі крові, а введення цитруліну збільшує їх концентрацію справляючи протекторний вплив на легеневу гемодинаміку [26]. В умовах експериментальної гіпоксії L-аргінін пригнічує утворення

ендотеліну-1 сприяючи розширенню судин в цьому кровоносному руслі [23, 127].

Відмічений судинорозширювальний вплив монооксиду азоту і на інші системи організму. Так, збільшення надходження крові до кишківника посилює регенераційні процеси при виразках в шлунку та дванадцятипалій кишці [113, 142]. А в підшлунковій залозі NO регулює гормональний фон [113]. При зниженому тиску і підвищеному кровотоці здатність до виведення сечовини та відпрацьованих білкових сполук в нирках зростає [225].

NO збільшуючи кровообіг в м'язовій тканині, забезпечує надходження необхідних поживних речовин до м'язів та виведення з них продуктів розпаду і токсинів. Роль монооксиду азоту в регуляції судинного тону вивчали за допомогою використання конкурентного інгібітора NOS – L-NMMA. Експерименти показали судинозвужуючий вплив N-монометил-L-аргініну у скелетних м'язах. Проте, введення L-аргініну, сприяє поступовому розширенню цих судин [39].

Вплив монооксиду азоту на регуляцію мозкового кровообігу полягає у тому, що NOS міститься в нейронах головного мозку та в ендотеліоцитах гладеньких м'язів. Нервові відростки, які обплітають дрібні кровоносні судини утворюють переваскулярну оболонку. Активація астроцитів будь-якої ділянки мозку призводить до виділення NO, а разом і з цим, до локального розширення судин та покращення мозкового кровообігу [104].

Регуляція тону судин в організмі та залучення до цих реакцій нервової системи полягає у наступному: від органу чи тканини, яка потребує додаткової активації NO нервові імпульси надходять до спинного та головного мозку. В ЦНС формується комплекс сигналів і по нервовим закінченням стимул передається до відповідної системи. Новоутворена кількість монооксиду азоту проникаючи через мембрану

клітин призводить до покращення функціонального стану та розширює судини [104, 212].

1.3. Особливості регуляції печінкового кровообігу при портальній гіпертензії

Портальна гіпертензія (ПГ) – це стан, для якого характерне стійке підвищення тиску у басейні ворітної вени до 15-20 мм рт. ст., тоді як в нормі він становить 5-10 мм рт. ст. Тривалий високий тиск може призвести до анатомічних і функціональних перебудов у системах портальної вени, печінкових вен та нижньої порожнистої вени [77, 193]. Наслідки, які супроводжують такий стан викликають низку захворювань різної етіології, об'єднаних єдиним патофізіологічним фактором – порушенням портосистемного дренажу крові. Ці захворювання обумовлені розладами циркуляції крові в судинах печінки і можуть стати першопричиною розвитку варикозного розширення вен стравоходу, шлунку, гемороїдальних вен, вен передньої черевної стінки, спленомегалії та асциду [193].

Портальна гіпертензія може протікати як самостійне захворювання або бути наслідком інших патологій. Найчастішими причинами розвитку ПГ є цироз печінки та структурні аномалії печінкових судин. При цирозах спостерігаються зміни в архітектоніці залози. Так, прогресивне відкладання колагену в просторі Діссе і утворення вузлів регенерації, збільшують опір у ворітному руслі печінки та зменшують її здатність у депонуванні великих об'ємів крові. Накопичення великої кількості рідини в черевній порожнині може призвести до розвитку асциду [205]. Накопичення лімфи в черевній порожнині пов'язане з посиленням надходженням крові до печінки від інших органів. Залоза, в свою чергу, не в змозі профільтрувати настільки великі об'єми рідини і тому витісняє

кров через венозну стінку капілярів в оточуючі тканини та лімфатичне русло. Тобто в патогенезі асцити вирішальна роль належить не порушенням прохідності в системі ворітної вени, а є результатом розладу крово- і лімфовідтоку на рівні печінкових часточок [205].

Іншими причинами у розвитку гіпертензії портальної вени можуть бути синдром Бадда-Кіарі, тромбоз ВВ та лівостороння ПГ. Синдром Бадда-Кіарі виникає, як правило, при тромбозі печінкових вен, зумовлюючи виражені системні гемодинамічні зміни: збільшений серцевий викид, низький загальносистемний опір судин і відносна системна артеріальна гіпотензія. А лівостороння ПГ виникає внаслідок хронічного гепатиту або раку підшлункової залози [166].

В залежності від порушень току крові до печінки виділяють надпечінкову (блокада настає в стовбурі ВВ або в її гілках), внутрішньопечінкову (на рівні синусоїдів печінки) та позапечінкову (порушення відтоку крові у нижній порожнистій вені) портальну гіпертензію.

Функціональні зміни у перебудові архітекtonіки залози призводять до формування дифузного фіброзу. Утворені вузли регенерації тиснуть на синусоїди та печінкові вени, викликаючи при цьому збільшення опору у системі ВВ [105]. Внаслідок зростання тиску у ворітному руслі печінки, колатеральні вени розширюються, формуючи портокавальні шунти. Однак, нормалізація тиску не настає, а навпаки, гіпердинамічний стан внутрішньоорганного кровотоку посилюється і кровотік у печінці зменшується. Цей стан супроводжується збільшенням серцевого викиду і зменшенням периферичного судинного опору [34].

На ранньому етапі патологічного процесу клінічні прояви виражені слабо. Проте прогресування захворювання викликає тяжкі ускладнення (кровотеча із варикозно розширених вен стравоходу), які часто стають причиною смерті. Так, потовщення стінки ворітної вени, колагенізація простору Діссе, набухання гепатоцитів, підвищення опору в

портосистемних коллатерелях та спазмування клітин Іто є наслідками ПГ і потребує своєчасного виявлення.

Розвиток ПГ є несприятливою прогностичною ознакою для хворих, оскільки середня тривалість життя у людей з цією паталогією становить близько 19 місяців [16]. Проте, для лікування цього захворювання, останнє десятиріччя, використовують некардіоселективні β -адреноблокатори. Препарати «Індерал» та «Надолол» продемонстрували значну ефективність у зниженні портального тиску і профілактиці рецидиву кровотечі. А при варикозному розширенні вен стравоходу, у комплексному лікуванні, включають метаклопромід, який шляхом констрикції нижнього езофагального сфінктера зменшує проходження крові по коллатерелях і, таким чином, зменшує трансмуральний тиск. Проте, на сьогодні досліджуються й інші речовини (антагоністи серотоніну, α -2-адреноблокатори, блокатори кальцієвих каналів, нітрати з тривалою дією), які можуть бути використані у лікуванні ПГ [16]. Однак є відомості, що регуляторні гази здатні також впливати на кровоносну систему печінки, та можливо, за рахунок своєї здатності розширювати судини здатні регулювати кровотік в печінці при ПГ.

1.3.1. Обмін і регуляторні ефекти монооксиду азоту та сірководню при портальній гіпертензії. При портальній гіпертензії порушується синтез судинозвужувальних і судинорозширювальних речовин. Такі зміни супроводжуються підвищенням судинного опору та дисфункцією синусоїдів. ET-1, ангіотензин II, норадреналін, простагландин F2, тромбоксан A2 і тромбін – є головними судинозвужувальними факторами в печінкових судинах, а простагландин-E2, AX, NO, CO та H₂S викликають протилежний ефект і сприяють розширенню просвіту судин [67, 149]. Проте, у регуляції внутрішньопечінкового кровотоку найбільше значення приділяють ендотеліну-1 та монооксиду азоту, оскільки дисбаланс у їх синтезі є ключовим фактором розвитку гемодинамічних

порушень викликаних ПГ. Досліджуючи зв'язок між цими речовинами, було встановлено: при перетисканні ворітної вени портально-гіпертензивним тваринам рівень NO та ET-1 в сироватці крові зростає, а опір крові у портальному руслі печінки підвищується. Однак, введення L-NAME та аміногуанідину призводять до зниження тиску у ворітних судинах, підвищують кровотік в печінці та зменшують кількості NO та ET-1 в сироватці крові [177]. Проте, дослідження останніх років заперечують цей факт і свідчать про те, що вплив ET-1 на кровоносну систему портальногіпертензивних мишей не пов'язаний з активацією NOS [173].

Як вже було зазначено, монооксид азоту володіє гепатопротекторними властивостями. З метою лікування фіброзів, що утворюються під час ПГ, було створено спеціальні наночастинки, які містять у своєму складі NO. Виявилось, що введення цих наночастинок безпосередньо до синусоїдів печінки викликають зниження тиску у ворітній вені на 20% порівняно з контролем, послаблюють вплив ET-1 та покращують відтік жовчі у портальногіпертензивних тварин [38].

Враховуючи, що значне підвищення тиску у кровоносному руслі печінки є важливим фактором розвитку ПГ при цирозі печінки. Для методів корекції цього захворювання використовують різні селективно діючі судиннорозширювальні фактори. Введення донору NO – ізосорбід-5-монітрат призводить до зменшення тиску у ворітній вені, а дуже малі дози цієї речовини викликають статистично достовірні зниження артеріального тиску. Доведено, що при ПГ активність eNOS знижується, а експресія білка кавеоліна-1 зростає. Зв'язування кавеоліну з ферментом призводить до зменшення фосфорилування eNOS і розпадом NO [19].

Іншими авторами [44] було показано, що введення специфічного донора монооксиду азоту NCX-1000 у дозі 28 мг/кг/добу у щурів з вторинним біліарним цирозом печінки призводить до значного зниження ворітного тиску, а в подальшому і ослабленню пресорної відповіді на

норадреналін. При цьому в гомогенаті печінки було виявлено підвищену кількість цГМФ засвідчуючи той факт, що NCX-1000 призводить до утворення NO, який і справляє регулюючий вплив на кровообіг в печінці при цирозі.

В останні роки стало відомо, що зниження синтезу H_2S за участю CSE пов'язано з підвищенням внутрішньопечінкового тиску і розвитком портальної гіпертензії. Виходячи з цього на CCl_4 моделі ПГ [46] було показано, що введення донору сірководню NaHS послаблює гепатотоксичність, знижує рівень АСТ та АЛТ в сироватці крові та призводить до зменшення гістопатологічних перебудов [169]. Також було засвідчено антифіброзну активність H_2S при цирозі печінки. Доведено, що сірководень сприяє зменшенню кількості колагенових волокон у печінці та покращенню регенераційних процесів у залозі [169]. Крім того, NaHS інгібує синтез факторів запалення, включаючи TNF- β , IL-1 α , IL-6, розчинного ICAM-1 [35]. Отже, H_2S протидіє пошкодженню судин та володіє профілактичними та терапевтичними ефектами при циротичній перебудові тканини печінки [33].

Відомо, що експресія сірководню здійснюється гепатоцитами та зірчастими клітинами печінки. Впливаючи на ці клітини, сірководень призводить до розширення мікросудин у залозі не тільки у щурів з нормальним портальним тиском, але і в групі з цирозом печінки [51, 46].

Виходячи з вище описаної літератури можна зробити висновок, що участь регуляторних газів, таких як NO та H_2S є надзвичайно важливою для нормального функціонування організму. Не дивлячись на велику кількість досліджень, знання про роль сірководню та монооксиду азоту у фізіологічних і патологічних процесах залишаються мало вивченими. Особливу зацікавленість на сьогодні становить вивчення впливу цих газових посередників на регуляцію кровообігу в печінці щурів у нормі та в умовах портальної гіпертензії. А також дослідження механізмів, за рахунок яких опосередковуються судинорухові ефекти в залозі. Цікавим є

дослідження ролі ендогенного і екзогенного NO та H₂S у регуляції тонусу судин у різних системах організму, а також залучення до цих реакцій ендотелію та адвентиції, що і дає перспективу на майбутні дослідження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт досліджень

Дослідження проведені за умов гострого експерименту на 297 білих лабораторних щурах масою 250 – 350 г обох статей, які утримувались в умовах акредитованого віварію ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно «Стандартних правил по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)» з дотриманням загальних принципів біоетики у відповідності до Хельсінської декларації [Всесвітня медична асамблея, 1964], Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [Страсбург, 1986], Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

За добу до початку експерименту щурам здійснювали харчову депривацію з вільним доступом до води. У якості наркозу використовували уретан (етилловий ефір карбамінової кислоти) в дозі 1 г/кг маси тіла, що вводився внутрішньоочеревинно. Впродовж дослідів у щурів реєстрували внутрішньоректально температуру тіла за допомогою електротермометра ТПЕМ-1 і підтримували її на рівні $37,5 \pm 0,5$ °C за допомогою електрообігрівача.

Після закінчення дослідів еутаназію щурів здійснювали шляхом введення підвищеної дози наркозу.

2.2. Реєстрація тиску в кровносних судинах

У дослідів реєстрували системний артеріальний тиск (САТ) та тиск у

ворітній вені (Твв). Під час проведення оперативної частини досліду у тварин здійснювали трахеотомію та лапоротомію.

Для реєстрації артеріального і венозного тиску, здійснювали катетеризацію загальної сонної артерії та ворітної вени. Катетери попередньо були заповнені розчином гепарину. Досліджувані речовини вводили в одну із гілок брижової вени або безпосередньо у ворітну вену. Вільні кінці катетерів, під'єднували до датчиків електроманометра ЕМТ-31 ("Elema – Schönander", Швеція). Показники записували на шлейфному реєстраторі Н.071.6М.

2.3. Вимірювання тканинного кровотоку в печінці щурів методом кліренсу водню з електрохімічною його генерацією

Метод вимірювання локального кровотоку за швидкістю кліренсу водню був розроблений Auckland et al. [5-8].

Коротко метод можна описати так: тканина насичується молекулярним воднем. В подальшому завдання полягає у вимірюванні експоненційної швидкості вимивання (кліренсу) водню з тканини після припинення його подачі.

Швидкість вимивання є пропорційною до швидкості кровотоку в досліджуваній ділянці. Водень було обрано у якості індикатора кровотоку оскільки, по-перше, він метаболічно інертний, по-друге, в нормі його немає в тканинах тварин. Теоретичною основою цього методу є принцип Фіка. Згідно з ним, кількість газу накопиченого або виведеного з рівномірно насиченої тканини (w) за час t , визначається за формулою:

$$WdC_i = (C_a - C_v) Fdt \quad (2.1)$$

де w – об'єм тканини; C_i , C_a , C_v – відповідно тканинна, артеріальна і венозна концентрації газу; F – кровотік через об'єм тканини w .

Для добре дифундуючих газів можна прийняти, що тканинна і венозна концентрації знаходяться в стані дифузної рівноваги протягом

усього періоду насичення і вимивання. Тобто, тканинну концентрацію газу можна виразити через формулу: $C_i = \lambda C_v$, де λ – коефіцієнт розподілу газу між тканиною і венозною кров'ю. Замінивши потім C_v на C_i / λ отримаємо:

$$WdC_i = (C_a - C_i / \lambda) Fdt \quad (2.2)$$

Так як насичення артеріальної крові добре дифундуючим газом короткочасне, то ним можна знехтувати ($C_a = 0$), тоді рівняння (2.2) набуде вигляду:

$$WdC_i = C_i Fdt / \lambda \quad (2.3)$$

Проінтегрувавши рівняння (2.3) від 0 до t отримаємо формулу:

$$C_i = C_{i0} e^{-Ft / \lambda W} \quad (2.4)$$

Якщо в рівнянні (2.4) час, за який C_{i0} зменшиться вдвоє (тобто C_{i0} стане дорівнювати $C_{i0}/2$), позначити через $T_{1/2}$, то для F отримаємо:

$$F = \lambda \ln 2 W / T_{1/2} \quad (2.5)$$

Оскільки для водню $\lambda = 1$, то з розрахунку на 100 грамів тканини формула для кровотоку матиме вигляд:

$$F = 0,693 / T_{1/2} * 100 \text{ мл/100гр/хв} \quad (2.6)$$

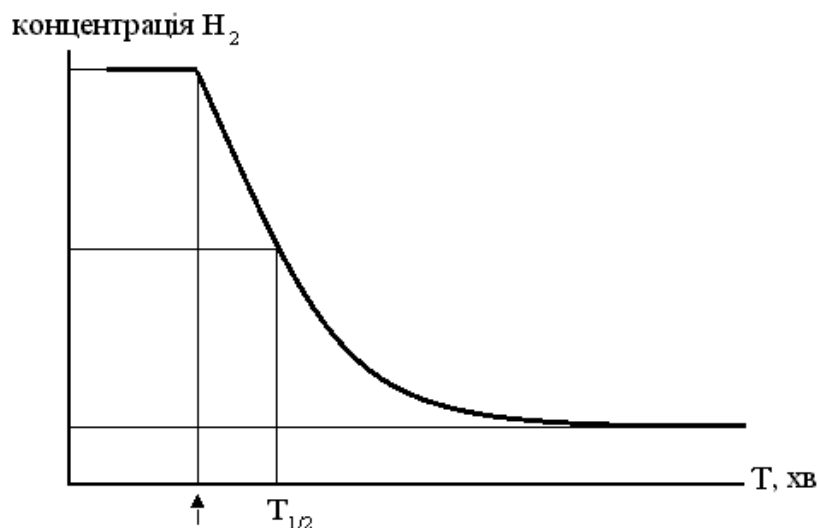


Рис. 2.1. Запис кривої кліренсу водню (\uparrow - момент вимкнення електрохімічної генерації водню).

Однак вищезазначена формула не враховує неконвективні (тобто без

участі кровотоку) втрати водню, а простіше кажучи дифузію газу в тканині, тому для підвищення точності досліджень ми використовували наступний спосіб розрахунку:

$$F = \lambda * 69,3 (1/T_{п1/2} - 1/T_{нп1/2}) \text{ мл/100гр/хв (2.7)}$$

де F – об'ємна швидкість кровотоку, $\lambda=1$, $T_{п1/2}$ – період напіввиведення водню, $T_{нп1/2}$ – період напіввиведення водню після зупинки серця.

Формула (2.7) є більш точною, оскільки в ній враховуються неконвективні (тобто без участі кровотоку) втрати водню, а простіше кажучи проста дифузія газу в тканині.

Метод електрохімічної генерації дозволяє водню генеруватися безпосередньо у тканині шляхом відновлення водневих іонів до молекулярного водню за допомогою платинового електроду, зануреного у тканину, по якому пропускається постійний струм від катода. Анод електричного ланцюга генерації зазвичай виготовляють із хлорованого срібла і розташовують на певній відстані від катода (під шкіру тварини). У такій модифікації даний метод може застосовуватися до будь-яких об'єктів.

Зміни концентрації водню реєстрували полярографічно. В основі полярографії водню лежить окисна реакція: $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$, в результаті якої генеруються електрони. При наявності акцепторної поверхні (платини) водень віддає свої електрони електроду, викликаючи електричний струм. Поглинання електронів покращується коли електрод позитивно заряджений. Поляризуюча напруга на електроді визначає інтенсивність хімічної реакції на його поверхні. У випадку окислення водню – чим більшим буде позитивний заряд на полярографічному електроді, тим більшою буде ймовірність переносу електронів. Це справедливо доти, доки постачання електрода електронами не врівноважиться дифузією. Дифузійне обмеження реакції призводить до виникнення плато електричної відповіді. Таке плато виникає при величині

заряду приблизно 240 мВ. Надалі, зі збільшенням позитивного заряду на електроді струм через нього практично не збільшується, аж до 800 мВ – при такій напрузі спостерігається різке збільшення струму, що обумовлено електролізом води [230].

З напругою поляризації пов'язаний також час досягнення електродом стійкого стану. Зі збільшенням напруги поляризації інтенсивність реакцій на полярографічному електроді зростає. В результаті в навколоелектродному просторі виникає дуже крутий концентраційний градієнт, що робить більшим час досягнення стійкого стану. Але найбільш важливим з усього, що визначає вибір напруги поляризації електрода в кожному окремому випадку – це те, які реакції будуть відбуватися на електроді при цій напрузі, і що врешті рэшт що саме ми хочемо дослідити за допомогою цього електрода.

Теоретично, струм в полярографічному електроді буде виникати в результаті реакції з будь-якою речовиною, що буде обмінюватися електронами з цим електродом. Однак перехід електронів обмежений потенційним енергетичним бар'єром, тобто величиною тієї енергії, що пов'язує електрон з реагуючою молекулою або електродом. Якщо цей бар'єр потенційної енергії урівноважується напругою поляризації електрода, то імовірність переходу електрона зростає. Для зручності оптимальну напругу поляризації для даної реакції можна назвати редокс-потенціалом. Потрібно відзначити, що редокс-потенціал являє собою не одиничне порогове значення напруги, а швидше, в залежності від структури електродної поверхні і здатності електрода діяти як каталізатор, та чи інша реакція може мати місце в певних межах напруг на електроді. На практиці використовують поняття потенціалу напівхвилі або напівмаксимального потенціала, при якому дана реакція досягає половини своєї максимальної швидкості [230].

Поляризований електрод буде окислювати або відновлювати будь-які хімічні речовини, які матимуть редокс-потенціал близький до напруги

поляризації. Таким чином електрод поляризований до +200 мВ буде окислювати не лише водень, але й аскорбінову кислоту, катехоламіни, гемоглобін, сукцинати та інші речовини, що легко окислюються. Крім того, той же електрод буде відновлювати деякі речовини, наприклад кисень. Експериментальні дослідження показали, що оптимальною напругою поляризації при вимірюванні концентрації водню в тканині є +250 мВ [5, 8, 230, 290]. При більших величинах буде збільшуватися струм, обумовлений аскорбіновою кислотою, та деякими іншими речовинами.

Для наших досліджень ми обрали електроди відкритого типу з платини діаметром 100 мкм (реєструючий електрод) та 200 мкм (генеруючий електрод). Чистота платини не менше 99,98%. Електроди були надійно ізолюваними по всій довжині, окрім кінчиків, що вводилися безпосередньо у печінку. У якості ізолятора використовувався спеціальний нетоксичний електростійкий лак (цапон-лак). З метою підвищення локальності вимірювань і збільшення сили сигналу, що реєструється, генеруючий та реєструючий електроди рекомендується розташовувати якомога ближче один до одного. Проте існує деяка мінімальна відстань, зменшення якої призводить до викривлення результатів. При товщині генеруючого платинового електрода 200 мкм, рекомендована відстань між кінчиками генеруючого та реєструючого електрода складала 300-400 мкм. Контур реєстрації замикається індиферентним електродом, що розташовується на певній відстані від вимірювального платинового електрода. Якась частина струму, що генерується полярографічний електродом, таким чином, проходить через індиферентний електрод, оскільки обидва електроди оточені середовищем, що проводить струм. Щоб не впливати на полярографічний сигнал, індиферентний електрод повинен мати низький опір, пропускати струм в обох напрямках без змін та не генерувати власний струм. Крім того, він не повинен реагувати на будь-які зміни хімічного середовища. Оскільки індиферентний електрод

для моніторингу водню заряджений від'ємно по відношенню до полярографічного електрода, він може відновлювати кисень і таким чином може бути чутливим до змін концентрації кисню. Ідеальний індиферентний електрод повинен мати добрий електричний контакт з препаратом, проте бути якомога більше ізольованим від хімічного середовища тканини. На практиці це досягається розміщенням індиферентного електрода в скляну піпетку, заповнену концентрованим розчином хлористого калія (KCl). Одним з найбільш розповсюджених електродів такого типу є КФК-3, який ми і використали в наших дослідженнях.

В якості індиферентного електрода в ланцюгу генерації було використано хлорований срібний електрод, що мав вигляд прямокутної пластинки.

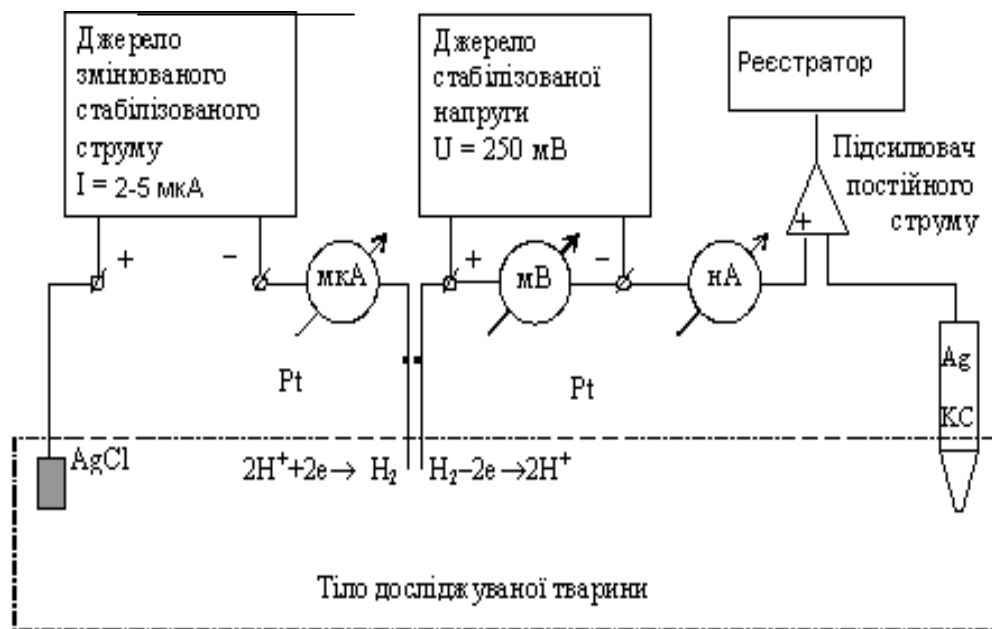


Рис. 2.2. Принципова схема пристрою вимірювання водневого кліренсу шляхом електрохімічної генерації водню.

Для електрохімічної генерації водню в тканинах використовується сила струму на катоді від 100 нА до 100 мкА. Частіше всього його величина становить 1 – 5 мкА [87]. Прямими спостереженнями мікросудин було доведено, що використання струму більшої величини може призвести до вазомоторних реакцій у місці локального прикладення електричного струму [32].

2.4. Реєстрація кровонаповнення печінки

На сьогодні відомо багато методів, які дозволяють реєструвати зміни кровонаповнення різних органів і тканин. Одним із найпоширеніших методів є імпедансна плетизмографія (реографія) [117, 222, 242, 262, 278]. Цей метод оснований на тому, що кров у порівнянні із іншими тканинами має найбільшу електропровідність, завдяки чому зміни опору будь-якого органу зумовлені, як правило, зміною його кровонаповнення. Проте, згадані вище автори використовували модифікацію, за допомогою якої реєструються лише пульсові коливання електричного опору паренхіми печінки. Таким чином можна лише вивчати відносні зміни пульсового об'єму крові у цьому органі. Але ж печінка отримує основну частину крові шляхом мало пульсуючого потоку по ворітній вені. А пульсові коливання реограми печінки зумовлені головним чином артеріальним кровотоком. Тому для реєстрації кровонаповнення печінки у наших експериментах більш прийнятним був модифікований варіант реографічної методики, розроблений Цибенком та Янчуком [272]. Перевагою цієї модифікації є можливість реєструвати повільні зміни кровонаповнення печінки за рахунок згладжування пульсових коливань реограми спеціальним R-C фільтром.

У роботі використовували модифікований реограф РГ 4-01, сигнал з якого через посилювач УБП 2-03 та інтегруючий ланцюг подавався на шлейф реєстратора Н.071.6М.

Для реєстрації КНП застосовували електроди, що мали форму круглих платівок з латуні чи міді, анодованої сріблом, діаметром 10 мм. Два електроди накладали на протилежні поверхні долі печінки і фіксували тонкою ниткою, яка проходила крізь товщу печінки і отвори в центрі електродів. На зовнішню поверхню кожного електрода накладали поролонову прокладку та целулоїдну платівку для забезпечення постійного і надійного контакту електродів із печінкою при змінах її об'єму.

Кількісне калібрування системи (в мм запису на мл об'єму) здійснювали *in situ* після закінчення досліду. Для цього перетискали всі судини печінки, вводили в орган через ворітну вену відомі об'єми фізіологічного розчину. Амплітуда запису змін електричного опору печінки була прямо пропорційна змінам об'єму крові в ній. Зміни КНП перераховували на 100 г маси органу.

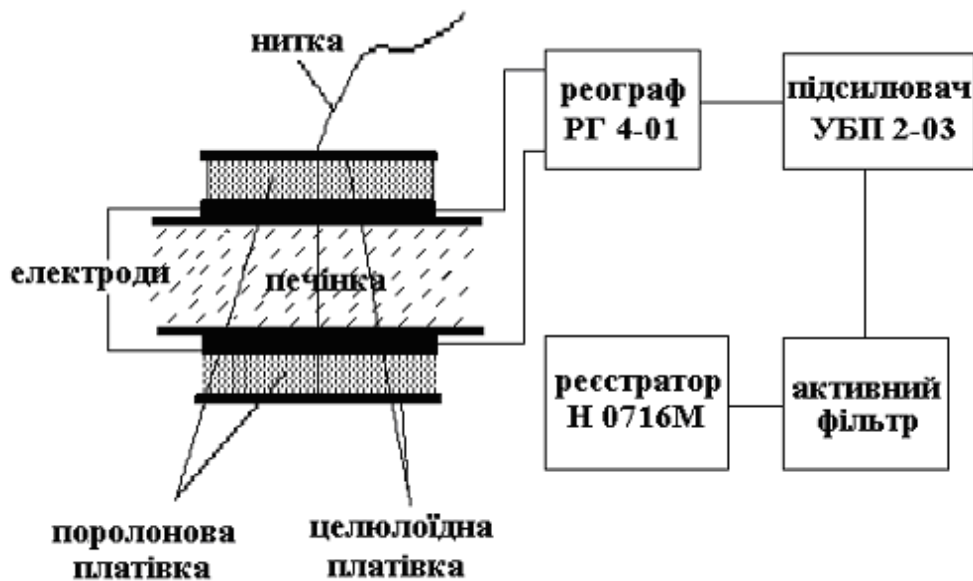


Рис. 2.3. Блок – схема установки для реєстрації показників кровонаповнення в досліді *in vivo*.

Об'єм крові (V), що знаходився в печінці, визначали після закінчення експерименту, використовуючи метод кількісного визначення гемоглобіну крові за допомогою фотоелектроколориметра [216]. Перетискали всі

судини печінки, видаляли орган та переносили в ємність. Потім через катетер у ворітній вені перфузували печінку відомим об'ємом фізіологічного розчину. За допомогою фотокolorиметра КФК-3 визначали концентрацію гемоглобіну в крові, яка знаходилась в печінці до перфузії, і його концентрацію в перфузаті. Знаючи співвідношення між вмістом гемоглобіну в крові ($Hb_{\text{крові}}$) і в перфузаті ($V_{\text{перфузату}}$), а також кількість перфузату ($V_{\text{перфузату}}$), визначали об'єм крові в печінці ($V_{\text{крові}}$) за формулою:

$$V = V_{\text{перфузата}} \cdot \frac{Hb_{\text{перфузата}}}{Hb_{\text{крові}}} \quad (\text{мл}) \quad (2.8)$$

2.5. Експериментальна модель портальної гіпертензії

Модель портальної гіпертензії виробляли за методикою П.І. Янчука [288], яка полягала у триразовому з інтервалом в три дні внутрішньоректальному (в/р) введенні 12%-го водного розчину йодистого натрію (NaI) із розрахунку 0,5 мл/100 г. Після цього тварин було поділено на групи.

Для корекції портальної гіпертензії ми внутрішньоочеревинно (в/оч) впродовж 20 діб вводили L-цистеїн в дозі 40 мг/кг, а також використовували амінокислоту L-аргінін 20 мг/кг, яку також протягом 20 днів здійснювали (в/оч) ін'єкцію щурам іншої групи.

2.6. Визначення вмісту нітрит-аніону в плазмі крові щурів з портальною гіпертензією

Кількість NO_2^- визначали в безбілкових аліквотах проб в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса за методом Гріна

[219, 220, 235]. Безбілкові аліквоти проб готували наступним чином: до 0,5 мл зразка додавали 0,1 мл 35% сульфосаліцилової кислоти, перемішували один раз через 5 хв протягом 30 хвилин, потім центрифугували при 10000g протягом 10 хв. Надосадкову (кислотнонерозчинну фракцію, що містить NO_2^-) нейтралізували 5% розчином NaOH та в її аліквоті визначали NO_2^- , додаючи реактив Гріса в співвідношенні 1:1.

Визначали величину екстинції на спектрофотометрі (СФ-26) при довжині хвилі 543 нм через 5 хв після змішування. Кількість NO_2^- розраховували за калібрувальною кривою, побудованою для стандартних розчинів NaNO_2 .

Отримані кількості перераховували на 1 мг загального білка за методом Лоурі. Чутливість методу від 5 до 100 мкг білка/мл. Для визначення білка за цим методом використовували такі матеріали: спектрофотометр або, ФЕК (довжина хвилі максимуму поглинання 750 нм), кювети (пластикові), піпетки, пробірки та штатив для пробірок.

Були приготовані робочі розчини А, В, С і D. Розчин А містив 0,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 1 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (цитрат натрію) на 100 мл дистильованої води. Розчин В містив 20 г Na_2CO_3 і 4 г NaOH на 1 л дистильованої води, розчини А і В стійкі до кімнатної температури. Розчин С містив у своєму складі 50 мл розчину В і 1 мл розчину А (готували перед визначенням). Розчин D являє собою розведений у 2 рази дистильованою водою, перед визначенням, реактив Фоліна.

Процедура визначення полягала в змішуванні 0,5 мл проби, білка і 2,5 мл розчину С. Після перемішування і інкубації при кімнатній температурі 5-10 хв додавали 0,25 мл розчину D, перемішували, витримували при кімнатній температурі 20-30 хв і вимірювали оптичну щільність розчину при 750 нм.

Описаний вище метод дозволив нам виміряти концентрацію NO_2^- в плазмі крові щурів з портальною гіпертензією.

2.7. Гістологічне дослідження тканини печінки

Для морфологічного дослідження шматочки печінки після фіксації 10% нейтральним формаліном були зневодненні в спиртах висхідної міцності, оброблені за загальноприйнятою гістологічною методикою і були залиті у парафін [250]. Зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином і піддавали світлооптичному дослідженню. Використана методика дозволила нам проаналізувати зміни у морфології печінки щурів до та після корекції тиску у ворітній вені при портальній гіпертензії.

2.8. Використані препарати

Для виконання поставлених задач були використані наступні препарати: донор синтезу H_2S NaHS (Sigma, USA у дозі 7 мг/кг маси тіла•1 мл фізіологічного розчину) та амінокислоти L-цистеїн (Sigma, USA за умов гострого експерименту у дозі 15–30 мг/кг маси тіла•1 мл фізіологічного розчину, а в умовах хронічного – 40 мг/кг) і L-аргінін (Sigma, USA у дозі 2,5–5 мг/кг маси тіла•1 мл фізіологічного розчину, а в умовах хронічного – 20 мг/кг).

DL-пропаргілгліцин (Sigma, USA у дозі 11 мг/кг маси тіла•1 мл фізіологічного розчину), що є аналогом L-цистеїну та інгібує CSE і L-NAME (L-N^G-нітро-аргінінметиловий ефір) – конкурентний інгібітор NO-синтаз (Sigma, USA у дозі 20 мг/кг маси тіла•1 мл фізіологічного розчину). Норадреналін (у дозі 5 мкг/кг маси тіла•1 мл фізіологічного розчину). Щурам контрольної групи вводили воду для ін'єкцій із розрахунку 0,5 мл/100 г маси тіла.

2.9. Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою аналітичного пакету «Statistica 8.0». 0 [254, 255, 269, 270]. Для оцінки нормальності розподілу використовувався тест Шапіро-Вілка. Для оцінки значущих відмінностей між вибірками з нормальним розподілом даних використовувався критерій Стюдента (з використанням критерія Левена) та модифікований критерій Стюдента, а для оцінки значущих відмінностей між вибірками з ненормальним розподілом даних використовувався критерій Мана-Вітні. Данні в тексті і в таблицях представлені у вигляді Me [25; 75] (Me – медіана; 25 і 75 – 1-й і 3-й квартилі) або $M \pm SD$ (де M – середнє арифметичне, SD – середньоквадратичне відхилення). Відмінності між групами вважались достовірними при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Участь сірководню у регуляції кровообігу в печінці щурів

Експериментально доведено, що кровоносні судини печінки на відміну від переважної більшості інших судин організму мають певні особливості реагування на дію вазоактивних речовин. Так, ворітні (пресинусоїдні) та венозні (постсинусоїдні) судини органу відповідають звуженням на дію такого типового вазодилататора, як ацетилхолін (АХ) [286, 290]. Було показано, що АХ, звужуючи венозні судини печінки, викликає мобілізацію крові із органу, і розширює сфінктери печінкових вен (ПВ) на виході з печінки, сприяючи посиленню відтоку депонованої в печінці крові. Констрикторні реакції венозних судин печінки на АХ реалізуються шляхом активації М-холінорецепторів ендотеліоцитів з подальшим залученням посередника, ймовірно, норадреналіну, який активує α -адренорецептори на гладеньком'язових клітинах цих судин. Розслаблення сфінктерів ПВ здійснюється завдяки виділенню в стінках судин під впливом АХ посередника, можливо, адреналіну, який, у свою чергу, активує β -адренорецептори на ГМК ПВ. До останніх реакцій, ймовірно, частково залучений і монооксид азоту, який відноситься до групи газових посередників [290]. До цієї групи відноситься також і сірководень, який є не менш важливим газовим трансмітером. Ендогенний синтез H_2S відбувається з амінокислоти L-цистеїну, яка може надходити до організму разом з продуктами харчування або утворюватися під час розпаду білків і синтезуватися з L-метіоніну в процесі

транссульфування. Існують два головних шляхи катаболізму L-цистеїну. Одним з них є окиснення SH-групи діоксигеназою цистеїну з утворенням цистеїн-сульфіату, який потім може за допомогою декарбоксілювання перетворитися на гіпотаурин або на піруват і сульфід. Другий шлях полягає у видаленні атома сірки з цієї амінокислоти та без її окиснення утворює молекулу сірководню. Каталіз цих процесів здійснюється за допомогою піридоксаль-5'-фосфат-залежних ферментів – цистатіонін-β-синтази (CBS) та цистатіонін-γ-ліази (CSE) [18]. За механізмом синтезу сірководню CSE відрізняється від CBS тим, що у першому випадку цистеїн перетворюється в тіоцистеїн, піруват і амоній [22, 98, 99]. А в результаті неферментативного розпаду тіоцистеїну утворюється L-цистеїн та H₂S. Інший шлях за участю CBS відбувається при конденсації цистеїну з гомоцистеїном, синтезуючи цистатіонін з вивільненням сірководню. Варто зазначити, що ці ферменти поширені в тканинах організму. Проте переважна більшість CBS зосереджена в центральній нервовій системі, а CSE – в серцево-судинній. У деяких органах, наприклад в печінці та нирках, виявлено обидва типи ферментів. Тому було досліджено роль попередника сірководню L-цистеїну та його донора NaHS кровообіг в печінці щурів.

3.1.1. Вплив попередника синтезу сірководню L-цистеїну на печінковий кровообіг та тиск крові в її артеріальних і ворітних судинах. За умов внутрішньопортального (в/п) болюсного введення L-цистеїну у дозах 15 і 30 мг/кг спостерігалось зниження системного артеріального тиску та тиску у ворітній вені. При цьому швидкість локального кровотоку в печінці і її кровонаповнення зростали. Вихідні значення досліджуваних показників кровообігу щурів у групі експериментів з в/п введенням L-цистеїну у дозі 15 мг/кг становили: системний артеріальний тиск (САТ) – $85,7 \pm 7,3$ мм рт. ст., тиск у ворітній вені (Твв) – $9,0 \pm 3,1$ мм рт. ст.,

кровонаповнення печінки (КНП) – $20,5 \pm 2,2$ мл/100г маси органу, локальний кровотік в печінці (ЛК) – $93,4 \pm 7,3$ мл/хв•100г. При введенні амінокислоти у вказаній дозі САТ і Твв знижувались на 17,6% ($p < 0,05$) і 24,5% ($p < 0,05$) відповідно, а КНП та ЛК у печінці збільшувались на 28,2% ($p < 0,01$) та 24,4% ($p < 0,01$) відповідно (рис.3.1, табл. 3.1.).

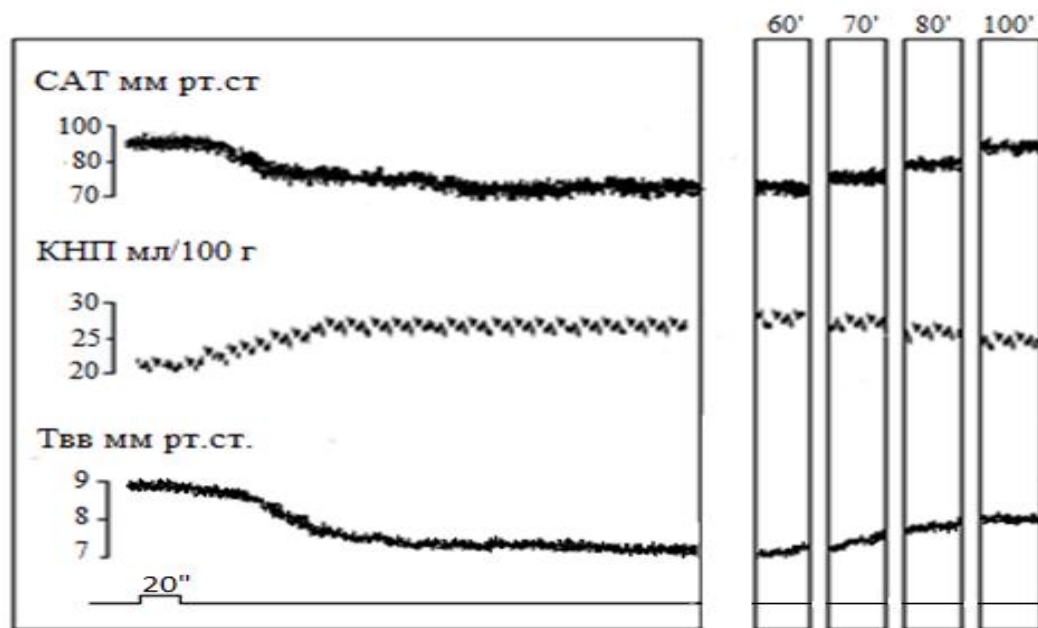


Рис. 3.1. Зміни системного артеріального тиску (САТ), кровонаповнення печінки (КНП) та тиску у ворітній вені (Твв) шурів, у відповідь на внутрішньопортальне введення L-цистеїну (15 мг/кг).

Примітка: внизу відмітка введення речовини.

Латентні періоди реакцій системного артеріального тиску, тиску у ворітній вені та кровонаповнення печінки дещо різнилися в часі. Так, зміни САТ, Твв і КНП розпочиналися через $5,1 \pm 4,5$ с, $9,1 \pm 3,2$ с, $13,2 \pm 10,5$ с відповідно з моменту введення L-цистеїну. Максимального розвитку реакції САТ набували на $34,1 \pm 4,8$ хв, Твв на $45 \pm 3,5$ хв, КНП на $56,3 \pm 2,7$ хв після введення амінокислоти у цій концентрації (табл.3.2).

Таблиця 3.1

Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв), кровонаповнення печінки (КНП) та локального кровотоку (ЛК) в печінці щурів при внутрішньопортальному введенні L-цистеїну в дозі 15 мг/кг ($M \pm SD$, $N=30$)

Показники	Вихідний рівень	Максимум реакції	% реакції від вихідного рівня
САТ мм рт.ст.	85,7 ± 7,3	70,7 ± 9,7 *	82,4
Твв мм рт.ст.	9,0 ± 3,1	6,8 ± 2,4 *	75,5
КНП мл/100 г	20,5 ± 2,2	26,3 ± 1,7 **	128,2
ЛК мл/хв•100г	93,4 ± 7,3	116,2 ± 11,9 **	124,4

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – порівняно з вихідним рівнем

Вихідні значення показників кровообігу в печінці у групі тварин зі збільшеною дозою L-цистеїну (30 мг/кг) становили: САТ – 85,1 ± 3,8 мм рт. ст., Твв – 9,1 ± 2,4 мм рт. ст., КНП – 23,0 ± 2,2 мл/100г маси органу, ЛК – 87,9 ± 5,5 мл/хв•100г. Введення амінокислоти у вказаній дозі зумовлювало зниження САТ на 15,8% ($p < 0,05$), Твв на – 23,8% ($p < 0,01$) та збільшення КНП і ЛК на 24,4% ($p < 0,01$) і 24% ($p < 0,01$) відповідно до вихідних рівнів цих показників.

Латентні періоди САТ і Твв розпочиналися через 6,6±2,6 с та 12,7±3,2 с відповідно, а КНП – 26,6±6,4 с. Часові характеристики цих показників максимального розвитку у реакціях набували: САТ на 25,4±3,4 хв, Твв на 32,5±8,6 хв, а КНП на 41,8±7,4 хв після введення L-цистеїну (табл. 3.2, 3.3).

Таблиця 3.2

Часові характеристики реакцій системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та кровонаповнення печінки (КНП) на внутрішньопортальне введення L-цистеїну (15 мг/кг і 30 мг/кг) та NaHS (7 мг/кг), (M±SD, n=43)

Показники	Часові параметри	L-цистеїн 15 мг/кг	L-цистеїн 30 мг/кг	NaHS 7 мг/кг	Кількість дослідів
САТ мм рт.ст.	ЛП (сек)	5,1±4,5	6,6±2,6	5,5±2,1	n = 17
	t _{max} (хв)	34,0±4,8	25,4±3,4	28,0±2,6	
Твв мм рт.ст.	ЛП (сек)	9,1±3,2	12,7±3,2	7,5±3,6	n = 14
	t _{max} (хв)	45,0±3,5	32,5±8,6	27,5±4,8	
КНП мл/100 г	ЛП (сек)	13,2±10,5	26,6±6,4	12,6±5,3	n = 12
	t _{max} (хв)	41,8±7,4	56,3±2,7	30,1±5,4	

Примітки: ЛП – латентний період реакції, t_{max}-час розвитку максимуму реакцій відносно вихідного рівня

Такі часові характеристики реакцій печінкового кровообігу свідчать про те, що внутрішньопортально введений L-цистеїн, який є джерелом для синтезу сірководню, призводить до розширення артеріальних і ворітних судин печінки швидше, порівняно з внутрішньопечінковими ємнісними судинами. Це може бути пов'язано із особливостями будови та функціонування судинного русла печінки. Стінки артеріальних та ворітних судин мають більш потужний м'язовий шар і тому здатні реагувати на дію гуморальних чинників швидше, тоді як в стінках печінкових вен м'язовий шар розвинений слабо, тому і вазодилататорні реакції в них розвиваються повільніше.

Таблиця 3.3

Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв), кровонаповнення печінки (КНП) та локального кровотоку (ЛК) в печінці щурів при внутрішньопортальному введенні L-цистеїну в дозі 30 мг/кг ($M \pm SD$, $n=35$)

Показники	Вихідний рівень	Максимум реакції	% реакції від вихідного рівня
САТ мм рт.ст.	85,1±11,8	71,7 ± 14,4 *	84,2
Твв мм рт.ст.	9,1 ± 2,4	6,9 ± 2,2 **	76,2
КНП мл/100 г	23,0 ± 2,2	28,0 ± 2,1 **	124,4
ЛК мл/хв•100г	87,9 ± 5,5	109,0± 4,9 **	124,0

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – порівняно з вихідним рівнем

Враховуючи вище викладене можна стверджувати, що сірководень відіграє важливу роль у регуляції кровообігу в печінці, оскільки призводить до розширення кровоносних судин залози. Слід зазначити, що L-цистеїн є заміною амінокислотою, яка здатна призводити до активації інших сполук (цистину, глутатіону, коферменту А, таурину тощо) тому не варто виключати, що продукти метаболізму, що утворилися при розщепленні L-цистеїну, в свою чергу, здатні також справляти ефекти на кровообіг в залозі і пояснювати довготривалу дію амінокислоти.

Варто зауважити, що однією з основних хімічних властивостей L-цистеїну є наявність у її складі трьох різних функціональних груп: SH, NH₂

та COOH. За класифікацією Пірсона, в цій молекулі наявна реакційно здатна сульфгідрильна група (SH), що може окислюватися як спонтанно, так і під дією спеціальних ферментів. Вона характеризується низькою електронегативністю, легкою поляризацією та окиснювальністю. Під впливом десульфогідрازی відбувається розщеплення цистеїну та утворення пірвіноградної кислоти і сірководню.

Оскільки цистеїн здатний легко віддавати водень, то дві молекули цистеїну через дисульфідний зв'язок утворюють нову сірковмісну амінокислоту – цистин. Цистеїн та цистин, в свою чергу, здатні легко перетворюватися один в одного за умов окисно-відновного процесу [266]. Таке перетворення сульфгідрильних груп цистеїну з цистином відіграють важливу роль у регуляції процесів обміну речовин в організмі. Наявність аміногрупи – NH₂ – свідчить про здатність молекули бути проміжною основою, в той час як карбоксильна – COOH – має щільну електронну будову, високу електронегативність та низьку поляризацію [215, 226, 245].

Біосинтез цистеїну в рослинах та деяких мікроорганізмах відбувається за участю ацетилкоферменту А та шляхом заміни гідроксильної групи (OH) на меркаптогрупу (SH) в L-серині. Тоді як в організмі ссавців цистеїн утворюється з L-метіоніну або L-серину, при обов'язковій присутності вітаміну B₆ і аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ), з обов'язковим залученням до цих реакцій CSE [98-100]. У разі відсутності метіоніну чи при порушенні його перетворення в цистеїн, можуть виникнути ускладнення з обмінними процесами в організмі та виведенням важливих мікроелементів з організму.

Утворення H₂S в печінці відбувається внаслідок деградації L-цистеїну із залученням до цих процесів цистатіонін-γ-ліази та цистатіонін-β-синтази. Схематично утворення сірководню можна зобразити так: цистеїн + H₂O → піруват + H₂S + NH₃ [41, 42, 107, 126, 203].

мРНК CSE виявлено в ендотелії судин та зірчастих клітинах залози і тому, не можна виключити, що судинорозширювальна дія амінокислоти

практично повністю реалізується за рахунок продукції сульфїду водню [46]. Але, як вже було зазначено, не виключається і безпосередній вплив L-цистеїну на тонус ГМК ворітних судин печінки, без перетворення на H₂S [260]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідити ефекти цієї амінокислоти на печінкову гемодинаміку за умов дії селективного інгібітора цистатіонін-γ-ліази DL-пропаргілгліцину.

Вихідні значення у цій групі дослідів становили: САТ – 90,9 ± 7,3 мм рт.ст., Твв – 7,2 ± 1,7 мм рт. ст., КНП – 19,6 ± 4,2 мл/100 г, ЛК – 102,7 ± 7,7 мл/хв•100г. У відповідь на болюсне внутрішньопортальне введення DL-пропаргілгліцину спостерігалось підвищення САТ на 17,7% (p<0,05) і Твв на 33,3% (p<0,01), та зниження КНП на 14,3% (p<0,05) і ЛК на 15,3% (p<0,05) відносно вихідного рівня (табл.3.5).

Таблиця 3.5.

Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв), кровонаповнення печінки (КНП) та локального кровотоку (ЛК) в печінці щурів при внутрішньопортальному введенні DL-пропаргілгліцину в дозі 11 мг/кг; (M±SD, N=14)

Показники	Вихідний рівень	Максимум реакції	Відсоток реакції від вихідного рівня
САТ, мм рт.ст.	90,9 ± 7,3	107,0 ± 5,4 *	117,7
Твв, мм рт.ст.	7,2 ± 1,7	9,6 ± 1,4 **	133,3
КНП, мл/100 г	19,6 ± 4,2	16,8 ± 2,1 *	85,7
ЛК, мл/хв•100г	102,7 ± 7,7	87,0 ± 8,9 *	84,7

Примітка: *-p<0,05;**-p<0,01 – порівняно з вихідним рівнем

Така реакція судин кровеносного русла печінки свідчить про те, що DL-пропаргілгліцин заблокував дію фермента CSE, завдяки чому пригнічувався ендогенний синтез сірководню з його попередників, що

знаходяться в крові. Внаслідок цього внутрішньопечінкові судини звужились, що і призвело до підвищення в них тиску і зменшення швидкості тканинного кровотоку в печінці та об'єму депонованої в ній крові.

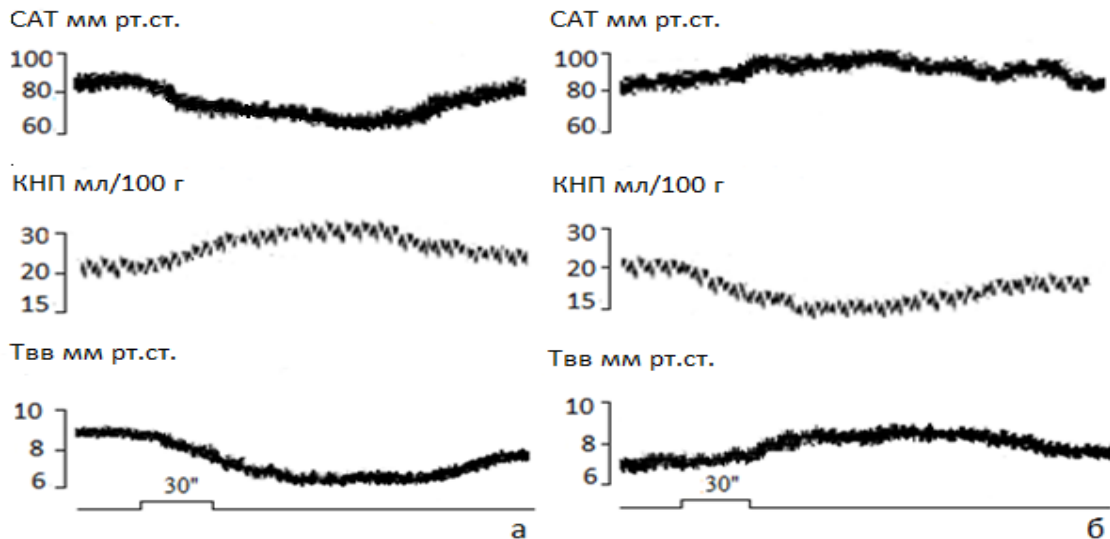


Рис.3.2. Вплив внутрішньопортального введення L-цистеїну (15 мг/кг) на системний артеріальний тиск (САТ), кровонаповнення печінки (КНП) та тиск у ворітній вені (Твв) щурів до (а) та після (б) введення DL-пропаргілгліцину (11 мг/кг).

Примітка: внизу відмітка введення препарату

Відзначено, що введення одного лише DL-пропаргілгліцину негативно впливає на функціонування систем та органів. Було показано, що блокатор CSE призводить до розвитку глюкозурії та пошкодження проксимальних каналців у нирках і як наслідок, до зниження рівня глюкози в крові та погіршення реабсорбції води організмом [87].

А його введення мишам викликає значне підвищення тиску крові у ворітній вені, зумовлюючи розвиток портальної гіпертензії, що пов'язана з пошкодженням судин печінки. Показано також, що у вагітних тварин зупиняється ріст плоду. Доведено, що ці патологічні процеси пов'язані з пригніченим синтезом H_2S [184]. Так, введення донора сірководню

GYU4137 посилює регенеративні процеси в залозі та відновлює розвиток ембріону [183, 184]. Однак, ефекти L-цистеїну в умовах блокади синтезу сірководню в кровоносному руслі печінки є маловивченими, тому наступним етапом нашої роботи було дослідити участь попередника синтезу сірководню на кровообіг в печінці щурів за умов блокади CSE.

Вихідні значення досліджуваних показників у наступній групі щурів були такі: САТ – $87,5 \pm 5,9$ мм рт.ст., Твв – $7,2 \pm 1,8$ мм рт. ст., КНП – $22,5 \pm 3,2$ мл/100 г, а ЛК – $101,8 \pm 15,9$ мл/хв•100г (рис.3.2).

При введенні L-цистеїну у дозі 15 мг/кг на фоні дії блокатора відбувалось підвищення САТ на 13,6%, Твв на 28,9% ($p < 0,05$) і зниження КНП і ЛК на 21,5% та 17,7% відповідно (рис.3.2, 3.3., 3.4, 3.5, 3.6).

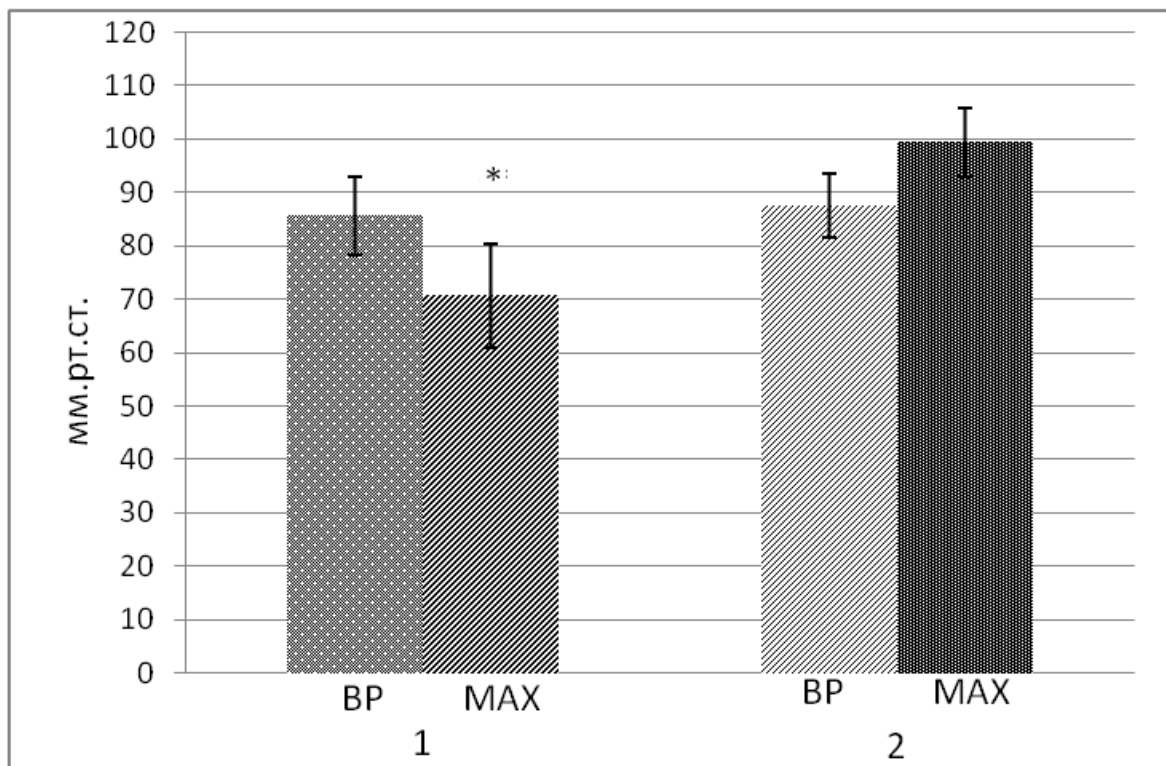


Рис.3.3. Зміни системного артеріального тиску (САТ) при введенні L-цистеїну (15 мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11 мг/кг); $M \pm SD$, $n=16$.

Примітка: * - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Таким чином, пропаргліцин, блокуючи синтез сірководню цистатіонін- γ -ліазою, а саме цей фермент переважно здійснює синтез цього газу в печінці, унеможлиблює реалізацію ефектів L-цистеїну на печінковий кровообіг.

Як і слід було очікувати L-цистеїн, що є попередником сірководню, який у свою чергу, виступає в ролі потужного вазодилатора і викликає розширення артеріальних судин з відповідним зниженням артеріального тиску (рис.3.3). Те, що саме сірководень опосередковує судинорозширювальні ефекти підтверджується відсутністю зниження САТ при введенні L-цистеїну на фоні блокади цистатіонін- γ -ліази пропаргліцином (рис.3.3).

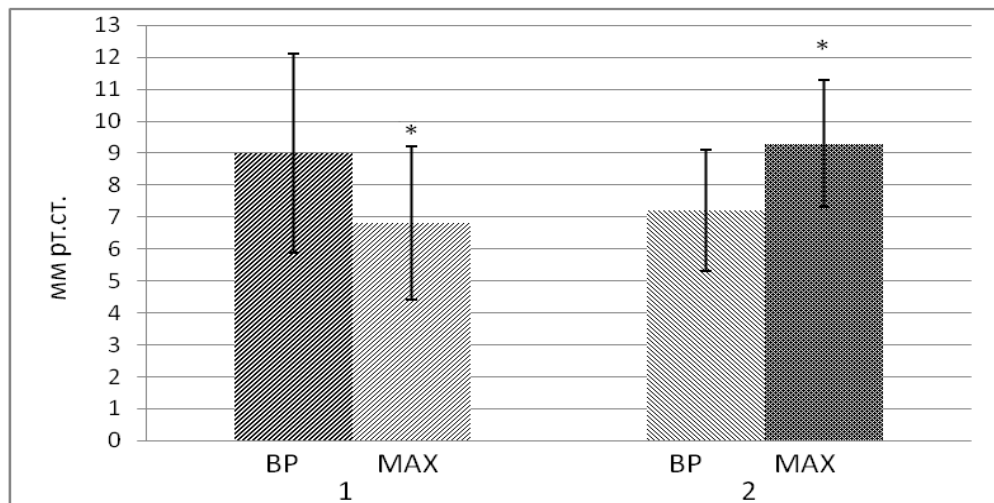


Рис.3.4. Зміни тиску у ворітній вені (Твв) за умов введення L-цистеїну (15 мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргліцину (11 мг/ кг); $M \pm SD$, $n=18$.

Примітки: * - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Відомо, що ворітна вена характеризується особливими механізмами регуляції її тону. Зокрема, на введення такого типового вазодилатора як ацетилхолін, ворітна вена реагує звуженням, що засвідчує її атипову реакцію на цю регуляторну сполуку. Однак, як виявлено в нашому

дослідженні ворітна вена реагує розширенням на введення L-цистеїну у зазначеній вище дозі, внаслідок чого знижується в ній тиск Твв (рис. 3.4). При цьому блокатор цистатіонін- γ -ліази пропаргілгліцин усуває судинорозширювальний вплив амінокислоти та викликає зростання тиску у ворітній вені щурів (рис. 3.4).

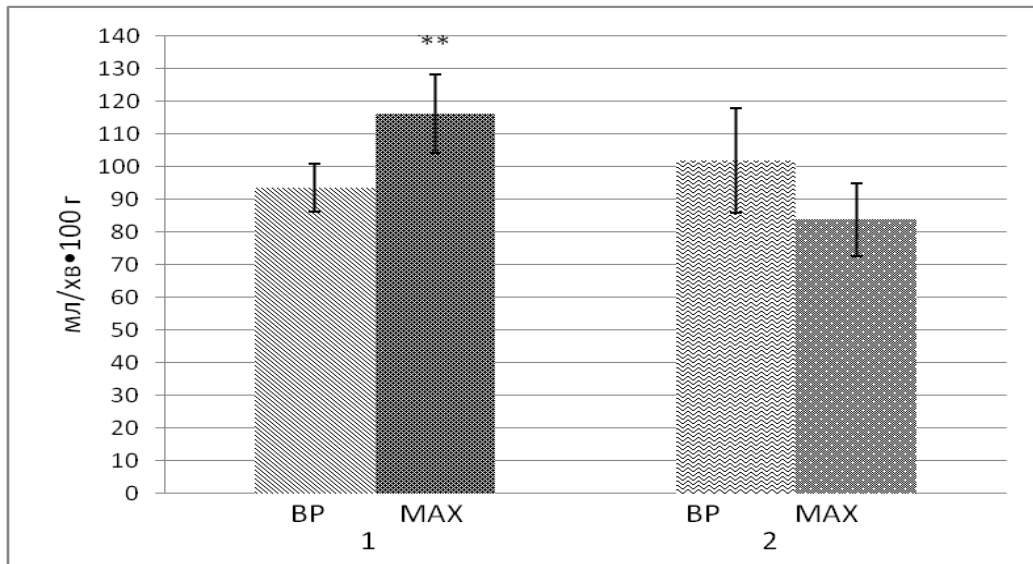


Рис.3.5. Зміни локального кровотоку (ЛК) за умов введення L-цистеїну (15 мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11 мг/кг); $M \pm SD$, $n=12$.

Примітки: ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Внутрішньопортальне введення L-цистеїну (15 мг/кг) призводить до змін й інших показників кровообігу у залозі, зокрема до збільшення швидкості тканинного кровотоку та кровонаповнення печінки (рис.3.5, рис.3.6).

Блокада цистатіонін- γ -ліази пропаргілгліцином усуває дію амінокислоти на локальний кровотік та кровонаповнення печінки, що свідчить про провідну роль сірководню в реалізації вазомоторних реакцій на L-цистеїн не тільки судин опору, в першу чергу ворітних судин, але і емнісних кровоносних судин (рис.3.5, рис.3.6).

При введенні амінокислоти із потенційними судиноруховими властивостями особливо велике значення має доза речовини. Іноді навіть відносно не значне збільшення кількості введеної регуляторної сполуки може призвести до зміни ефекту на протилежний, або ж мати

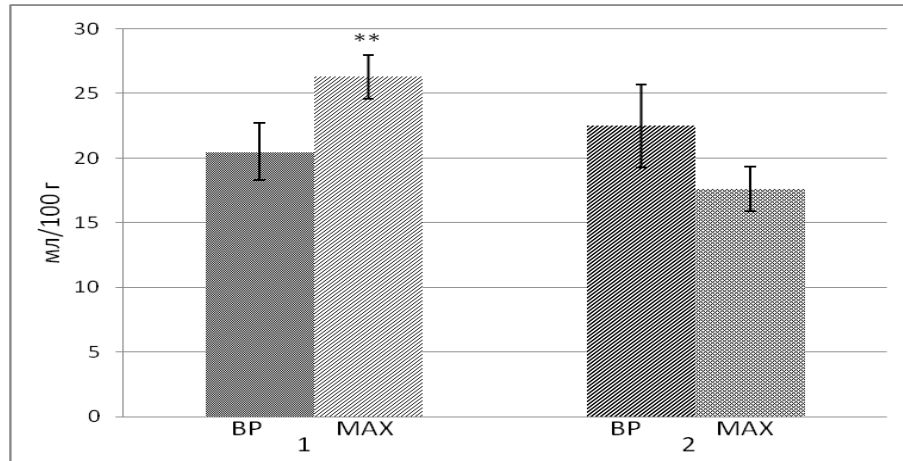


Рис.3.6. Зміни кровонаповнення печінки (КНП) при введенні L-цистеїну (15 мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11 мг/ кг); $M \pm SD$, $n=10$.

Примітка: ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

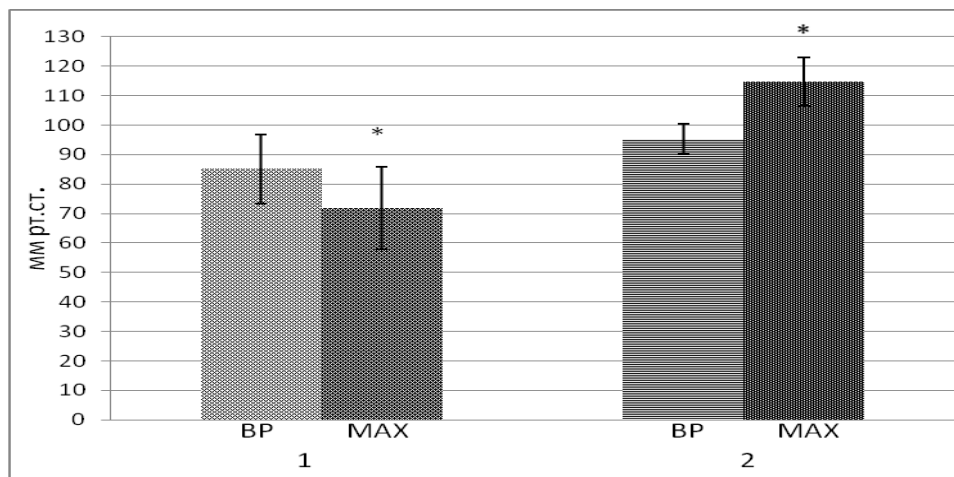


Рис.3.7. Зміни системного артеріального тиску (САТ) при введенні L-цистеїну (30 мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11 мг/кг); $M \pm SD$, $n=8$.

Примітки: * - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня.

значну побічну дію. Тому було проведено дослідження із застосуванням L-цистеїну в двічі більшій дозі (рис.3.7, 3.8, 3.9, 3.10).

Усунення реакцій у судинному руслі печінки на дію L-цистеїну в обох дозах, за умов попереднього введення DL-пропаргілгліцину вказує на те, що ініціюються ці вазодилаторні ефекти сірководнем, який синтезується кровоносними судинами як із введеного ззовні L-цистеїну, так і з попередників H_2S , що циркулюють у кровоносній системі (рис.3.7, 3.8, 3.9, 3.10).

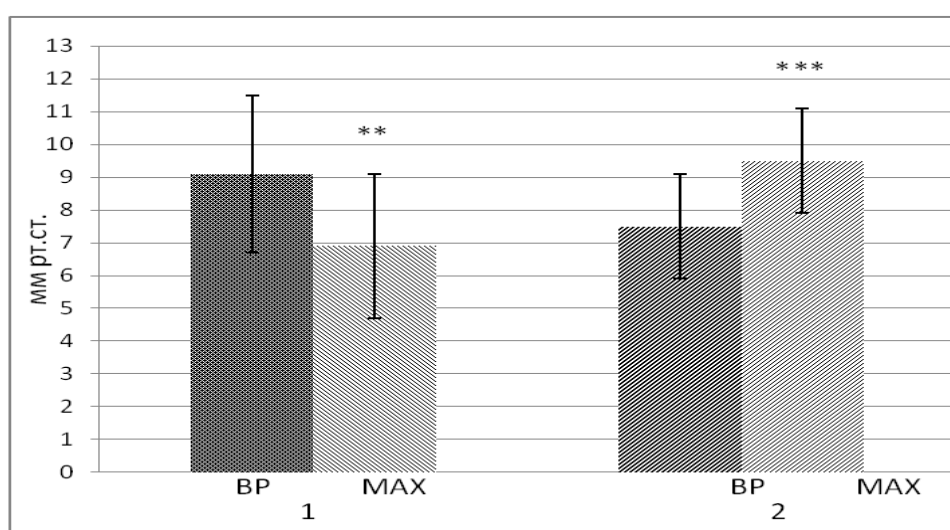


Рис.3.8. Зміни тиску у ворітній вені (Твв) за умов введення L-цистеїну (30 мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11 мг/кг); $M \pm SD$, $n=8$.

Примітки: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня.

Свій вазодилаторний ефект на ворітні судини печінки H_2S може здійснювати за рахунок активації АТФ-чутливих калієвих каналів (K_{ATP} -каналів) [260]. Головним компонентом дії цієї молекули є гіперполяризація – феномен, який не пов'язаний з активацією гуанілатциклази [120]. Сірководень, впливаючи на калієві канали, які чутливі до концентрації аденозинтрифосфату (АТФ) викликає гіперполяризацію мембран ГМК [20,

69]. Причому зв'язування H_2S з сірковмісними групами білків цих каналів, викликає зміни в їх просторовій конфігурації [256], що призводить до посиленого виходу іонів калію з клітини в міжклітинний простір. Водночас, активація K_{ATP} -каналів супроводжується пригніченням потенціал-чутливих кальцієвих каналів L-типу, котрі забезпечують надходження іонів кальцію всередину клітини. Висока внутрішньоклітинна концентрація кальцію є необхідною умовою розвитку скорочення ГМК. Закриття цих каналів спричиняє зменшення концентрації вільного внутрішньоклітинного кальцію [196]. Тому інгібування останніх викликає зниження внутрішньоклітинної концентрації кальцію та розслаблення судин.

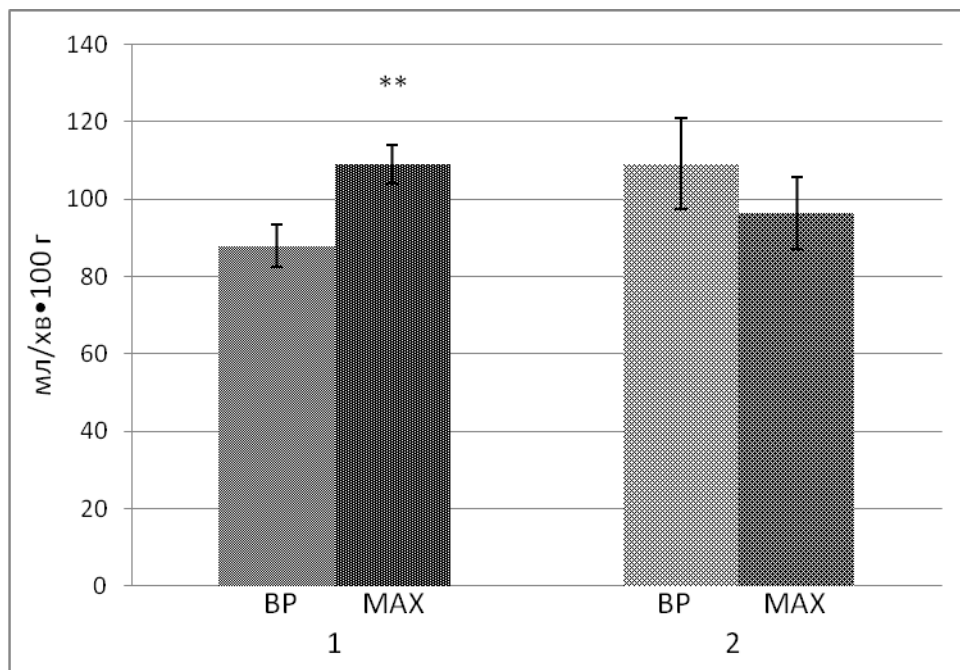


Рис.3.9. Зміни локального кровотоку (ЛК) за умов введення L-цистеїну (30 мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11мг/кг); $M \pm SD$, $n=8$.

Примітки: ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Поряд з цим, дослідження останніх років свідчать про те, що реакції розширення судин здійснюються за участю різних типів K-каналів. Так,

введення NaHS у концентрації 1мкМ-3мМ активуючи K_{-ATP} -залежні, потенціал-залежні та напруго-залежні K -канали сприяє розширенню артеріальних судин сітківки ока. Тоді як видалення ендотелію та блокада NOS не пригнічує вазодилататорні

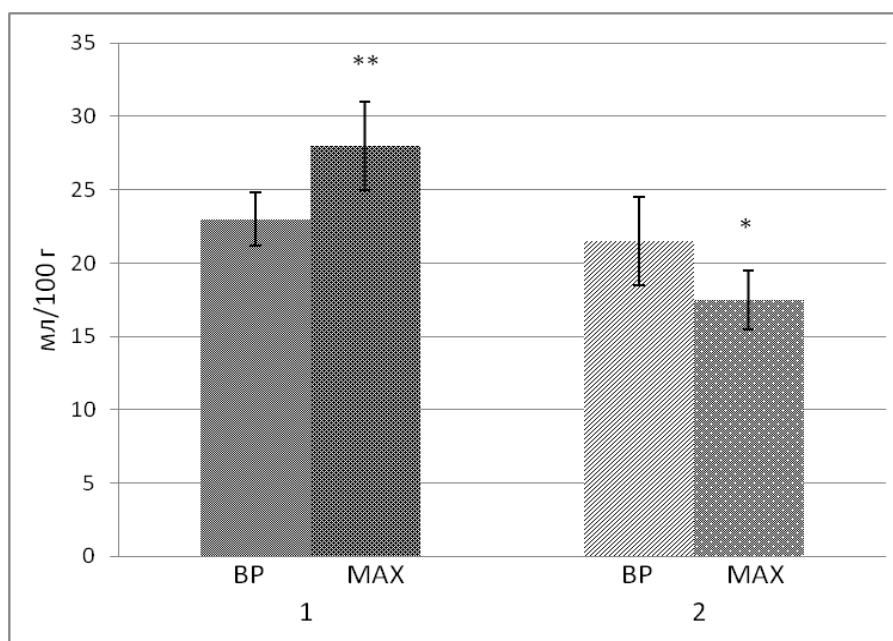


Рис.3.10. Зміни кровонаповнення печінки (КНП) за умов введення L-цистеїну (30мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11мг/кг); $M \pm SD$, $n=18$.

Примітки: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

реакції. Але пропаргілгліцин цей ефект значно зменшує [168]. До регуляції ниркового кровообігу залучена Na-K-ATP-аза [195]. А у розширенні коронарних судин беруть участь 4-амінопіридин чутливі- K -канали та не відіграють суттєвої ролі, Na-K-канали та EDRF [20]. Тобто ці результати свідчать про те, що механізми регуляції судинного тону за участю сірководню, у різних органах опосередковуються K -каналами, але механізми активації якихостаточно ще не з'ясовано.

Слід зауважити, що на синтез сірководню можуть впливати

ацетилхолін та брадикінін. Так, при стимуляції клітин ендотелію цими речовинами посилюється синтез інозитол 1, 4, 5-трифосфата, який активуючи кальцієві канали, посилює надходження Ca^{2+} до клітини в комплексі з білком кальмодуліном та активує фермент CSE стимулюючи синтез сірководню.

3.1.2. Дія донора сірководню NaHS на гемодинаміку в печінці щурів. Відомо, що сірководень у різних концентраціях здатний справляти не тільки розширювальний ефект на судини, але й призводити до їхнього звуження [165, 133]. Вплив введення гідросульфїду натрію, який у розчині частково дисоціює та утворює Na^+ і HS^- , з подальшим синтезом H_2S було досліджено на серцево-судинну систему. Виявилось, NaHS у дозі 1 мкмоль/л призводить до розширення аорти, а його введення у дозі 50-1000 мкмоль/л викликає звуження судини з поступовим його розслабленням [165]. Також показано, що після введення донору H_2S спостерігається звуження легеневої артерії, а на 20-30 хвилині настає розширення, після чого спостерігається знову констрикторний ефект [133]. Однак, інформації щодо впливу NaHS на судинне русло печінки нема і тому, для реєстрації змін показників печінкової гемодинаміки ми застосували донор сірководню NaHS у дозі 7 мг/кг. Так, внутрішньопортальне введення цієї сполуки призводило до зниження САТ і Твв на 20,8% ($p < 0,05$) і 26,2% ($p < 0,01$) відповідно до вихідного рівня, що становив для САТ – $102,8 \pm 10,8$ мм рт.ст., і Твв – $8,8 \pm 1,3$ мм рт. ст., а також викликало підвищення КНП на 30,9% ($p < 0,05$), а ЛК на 16,4 % ($p < 0,01$) відповідно, вихідні значення яких були $20,3 \pm 4,8$ мл/100 г та $75,8 \pm 5,9$ мл/хв•100г відповідно (рис. 3.11, табл. 3.6).

Отримані нами результати свідчать про те, що як попередник ендогенного синтезу сірководню L-цистеїн, так і його донор NaHS викликають розширення кровоносних судини печінки, внаслідок чого

тиск крові в них знижується, а швидкість тканинного кровотоку в органі та його кровонаповнення збільшуються.

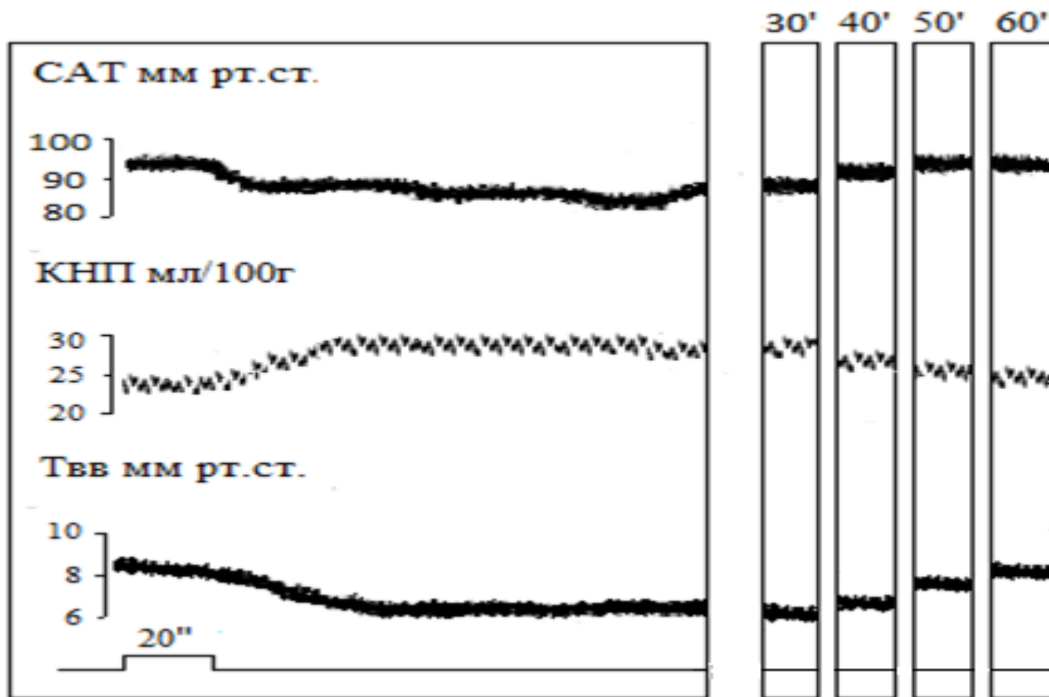


Рис. 3.11. Реакції системного артеріального тиску (САТ), кровонаповнення печінки (КНП) та тиску у ворітній вені (Твв) щурів, у відповідь на внутрішньопортальне введення NaHS (7 мг/кг).

Примітка: внизу відмітка введення речовини

Часові характеристики реакцій мали такі значення: латентний період змін системного артеріального тиску тривав у середньому $5,5 \pm 2,1$ с. Максимальну амплітуду зниження САТ реєстрували на $28,0 \pm 2,6$ хв після початку введення NaHS.

Часовий проміжок від моменту введення речовини та початку реакції у ворітних судинах складав $7,5 \pm 3,6$ с. Максимального значення у реакціях набували на $27,5 \pm 4,8$ хв. Змінам кровонаповнення печінки передувало латентний період тривалістю $12,6 \pm 5,3$ с., а максимальний розвиток спостерігався на $30,1 \pm 5,4$ хвилині (табл.3.2).

Таблиця 3.6

Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв), кровонаповнення печінки (КНП) та локального кровотоку (ЛК) в печінці щурів при внутрішньопортальному введенні NaHS в дозі 7 мг/кг ($M \pm SD$, $n=32$)

Показники	Вихідний рівень	Максимум реакції	відсоток реакції від вихідного рівня
САТ, мм рт.ст.	102,8±10,6	81,5 ±7,8 *	79,2
Твв, мм рт.ст.	8,8 ± 1,3	6,5 ± 2,1 *	75,5
КНП, мл/100 г	22,0 ± 2,2	28,8 ± 2,3 *	130,9
ЛК, мл/хв•100г	75,8 ± 5,9	88,3 ± 5,6 *	116,4

Примітка: * - $p < 0,05$ – порівняно з вихідним рівнем

Варто зазначити, що градієнт концентрації синтезу сірководню у тканинах органів мишей дещо варіюється. Так, дуже низький рівень ($< 0,050$ мкмоль/кг) вільного H_2S зосереджений в мозку, печінці, серці, нирках та посмугованих м'язах стравоходу. Однак його кількість в аорті на 20 – 100 одиниць є вищою порівняно з вищеперерахованими органами [97]. Тому, можливо, різницю латентних періодів реакцій у різних регіонах судинного русла печінки можна пояснити тим, що внутрішньопортально введений донор, в першу чергу впливає на тонус ворітних та артеріальних судин печінки (пре синусоїдних), які мають більш потужний м'язевий шар порівняно з ємнісними судинами – печінковими венами, які розташовані дистальніше від перших, тобто за синусоїдами.

Як засвідчили наші подальші дослідження введення донора сірководню NaHS у дозі 7 мг/кг на фоні дії блокатора CSE DL-пропаргілгліцину зумовлювало дещо менше зниження Твв (20,9%; $p < 0,05$), з тим, що спостерігалось до дії блокатора (26,2%), збільшувало КНП на 30,9% ($p < 0,05$) і не викликало вірогідних змін САТ і ЛК (рис.3.12.-3.16).

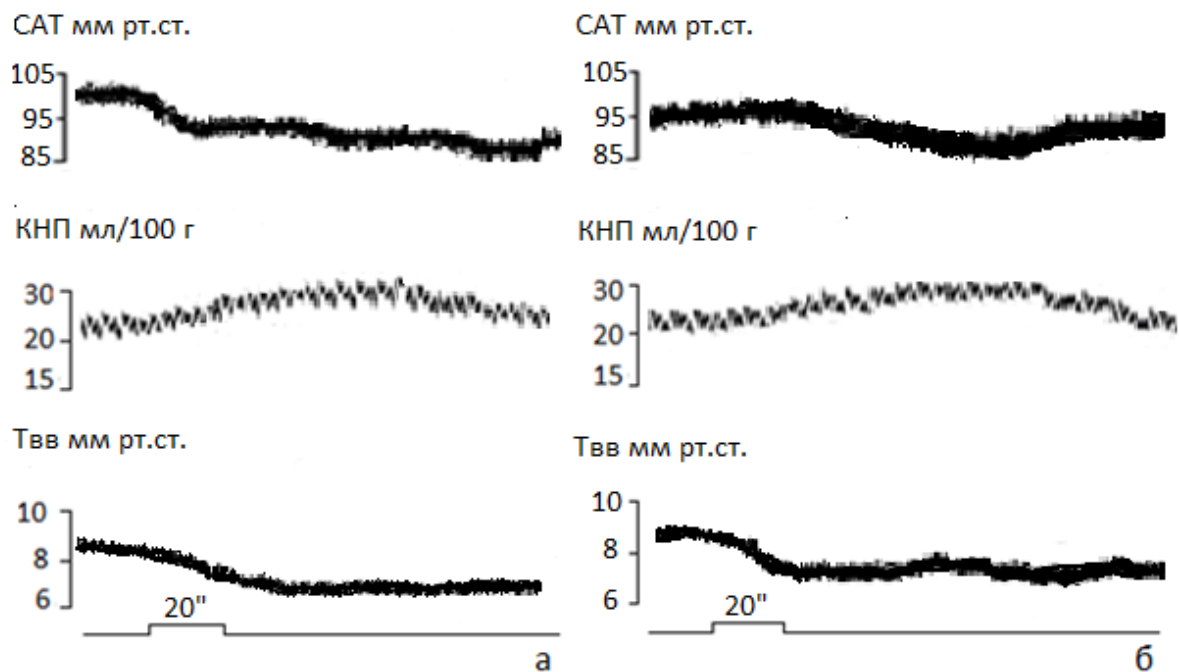


Рис. 3.12. Системний артеріальний тиск (САТ), кровонаповнення печінки (КНП) та тиск у ворітній вені (Твв) щурів під впливом NaHS (7 мг/кг): а – до та б – після введення DL-пропаргілгліцину (11 мг/кг).

Примітка: внизу відмітка введення препарату

Але в різних судинних регіонах печінки реалізація дії NaHS відбувається не однаково. Як засвідчили результати наших досліджень його вплив на венозні судини залози і синусоїди (як ворітні, так і власне печінкові вени) опосередковується без залучення ферментів CSE, тому щоблокатор останнього DL-пропаргілгліцин майже не впливає на реакції

розширення ворітних судин печінки (зниження Твв), і печінкових вен та синусоїдів (збільшення КНП).

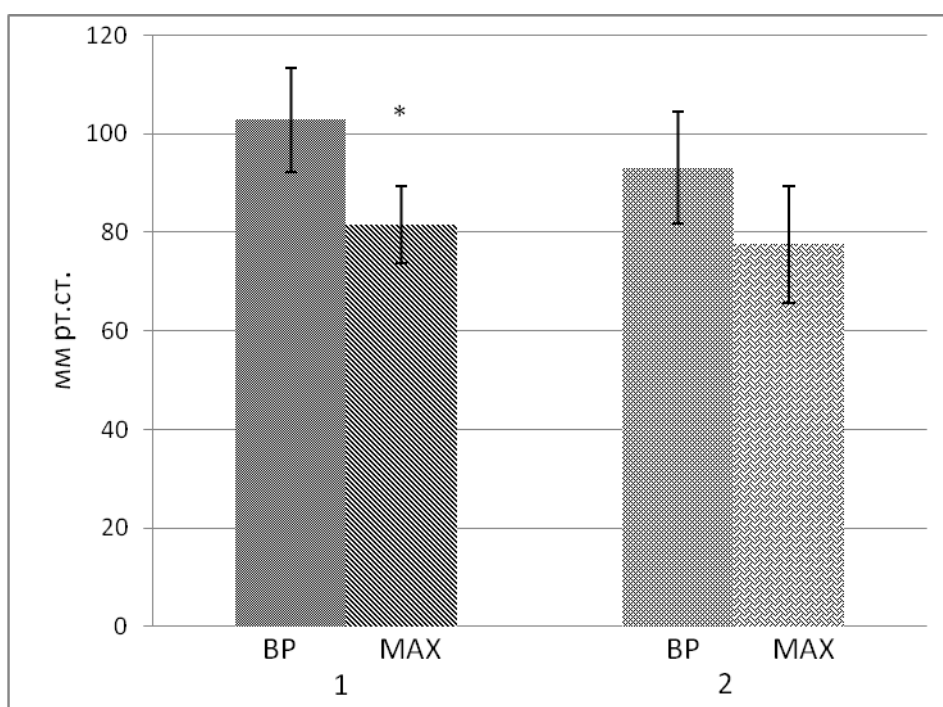


Рис.3.13. Зміни системного артеріального тиску (САТ) за умов введення NaHS (7мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілглїцину (11мг/кг); $M \pm SD$; $n=8$.

Примітки: * - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Поряд з цим, дія NaHS на артеріальні судини реалізується за участю CSE, адже блокада цього фермента усувала як реакції САТ, так і ЛК. Та ці результати не лише проливають світло на деякі шляхи реалізації дії NaHS на судини печінки, але й ставлять нові запитання.

По-перше, чому вплив цього донора сірководню на артеріальні судини здійснюється із залученням CSE? І, по-друге, чому зміни тканинного кровотоку в печінці при введенні NaHS формуються винятково артеріальними судинами без участі інших (ворітних та печінкових вен, синусоїдів).

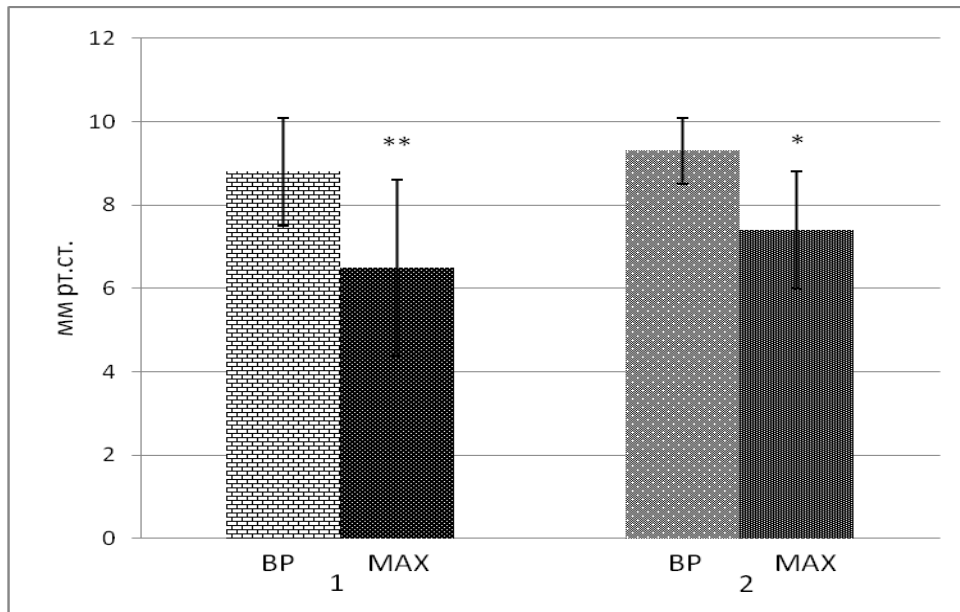


Рис. 3.14. Зміни тиску у ворітній вені (Твв) за умов введення NaHS (7мг/кг) до (1); та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11мг/кг); $M \pm SD$; $n=12$.

Примітки: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

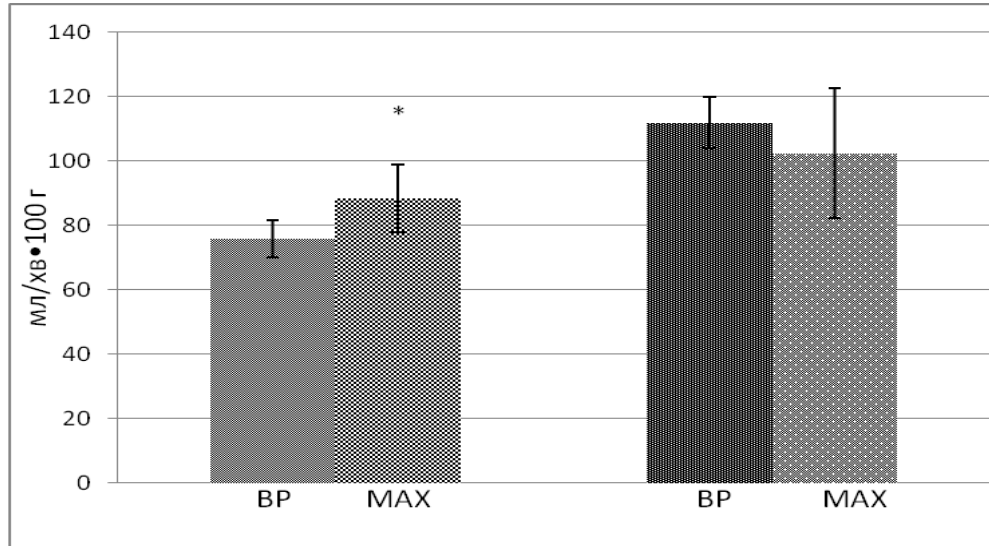


Рис. 3.15. Зміни локального кровотоку (ЛК) за умов введення NaHS (7мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілгліцину (11мг/кг); $M \pm SD$ $n=13$.

Примітки: * - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Виявлені особливості реакції печінкового судинного руслу на донор сірководню NaHS при його дії на фоні пригнічення синтетичної активності

цістатіонін- γ -ліази DL-пропаргілглїцином потребують подальшого дослідження. Ми припускаємо, що істотний вплив блокатора ферменту, який синтезує сірководень на судинорухові ефекти

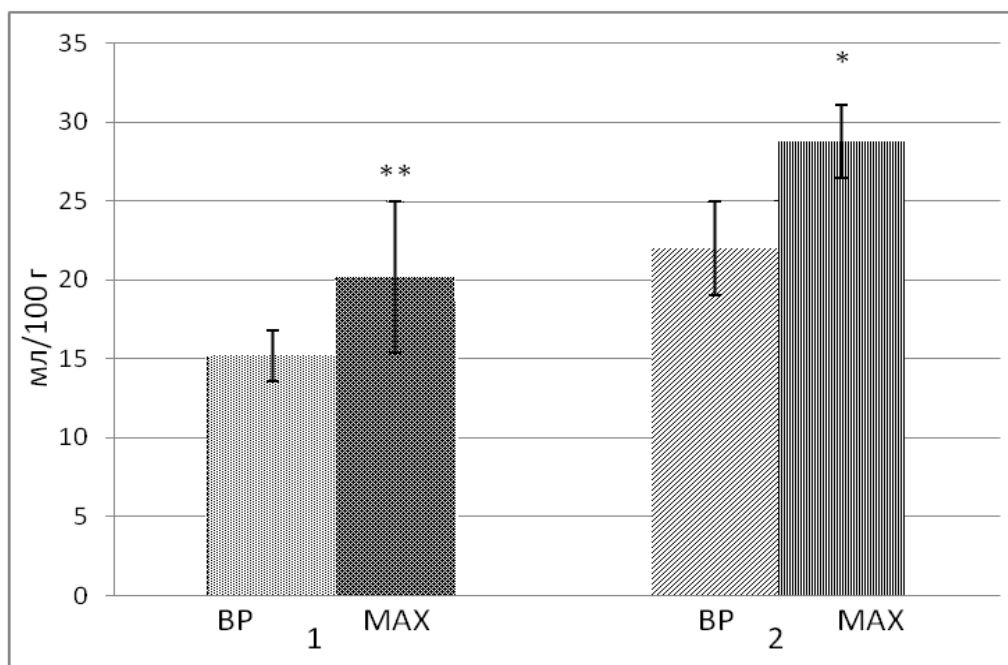


Рис. 3.16. Зміни кровонаповнення печінки (КНП) за умов введення NaHS (7мг/кг) до (1) та на фоні (2) дії DL-пропаргілглїцину (11мг/кг); $M \pm SD$; $n=13$.

Примітки: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

NaHS може бути пов'язаний із певними побічними токсичними властивостями DL-пропаргілглїцину та із порушенням ендогенної рівноваги у синтезі газових трансмітерів у судинному руслі печінки та організму в цілому при внутрішньопортальному введенні цього блокатора.

Таким чином, сірководень відіграє важливу роль у контролі як печінкового кровообігу, що показано нашими дослідженнями, так і в регуляції гемодинаміки інших судинних регіонів організму, про що свідчать дані інших дослідників [260]. Порушення рівноваги синтезу цього

газового трансмітера можуть викликати виникнення та розвиток патологічних процесів у серцево-судинній системі, зокрема такого важкого захворювання, як портальна гіпертензія. Тому, на нашу думку, сірководень завдяки своїм фізіологічним властивостям може бути застосований для корекції зрушень функціонування та захисту кардіоваскулярної системи від пошкоджень при різних її захворюваннях.

3.1.3. Вплив сірководню на кровообіг в печінці за умов портальної гіпертензії. В останні роки велике зацікавлення науковців викликає питання щодо ролі сірководню (H_2S) у виникненні та розвитку захворювань печінки. Ця молекула постійно синтезується в організмі та є потужним поліфункціональним біологічним посередником у всіх органах і тканинах ссавців. У 2003 році [140] було показано, що суміш газів, яка містить H_2S , може призводити до біохімічних перебудов у тканині печінки та сприяти покращенню її роботи під час цирозу. Цироз печінки, як відомо, є поширеним хронічним захворюванням, яке супроводжується підвищенням тиску у ворітній вені (синдром портальної гіпертензії) та викликає деструктивні зміни у тканині печінки. Прояв ПГ супроводжується не тільки порушенням роботи залози, але розвитком спленомегалії та асцити. Тому, наступним етапом нашої роботи було дослідити залучення H_2S у регуляції кровообігу в печінці щурів за умов експериментальної ПГ.

У наших дослідженнях було створено п'ять груп щурів: перша – інтактні (контроль); друга – тварини, яким трьохразово внутрішньоректально вводили воду для ін'єкцій, третя – щурі, яким інтраректально вводили воду для ін'єкцій та протягом 20 діб в/оч

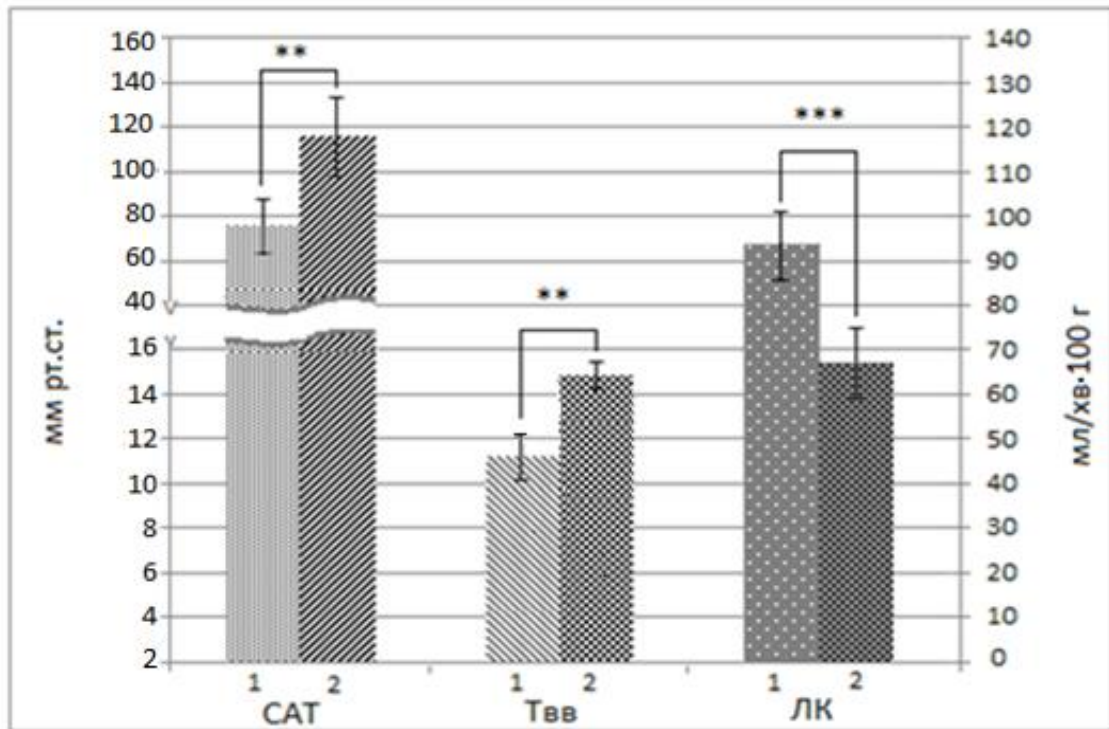


Рис.3.17. Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та локального кровотоку (ЛК) в печінці щурів при внутрішньоректальному введенні 12%-го водного розчину NaJ ($M \pm SD$; $n=10$).

Примітки: 1 – контроль; 2 – дія NaJ; ліворуч – шкала (у мм рт.ст.) для тиску крові в артеріальних і ворітних судинах; праворуч – шкала (у мл/хв • 100г) для тканинного кровотоку в печінці; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ – вірогідність змін відносно контролю

вводили L-цистеїн (40 мг/кг); четверта – внутрішньоректально тваринам вводили NaJ за вищевказаною методикою; п'ята – щурам після трьохразового ректального введення NaJ, вводили L-цистеїн (40 мг/кг) впродовж 20 діб.

Досліджувані показники печінкового кровообігу у щурів контрольної групи становили: САТ – $78,6 \pm 6,0$ мм рт.ст., Твв – $9,0 \pm 0,8$ мм рт.ст., ЛК – $93,4 \pm 7,7$ мл/хв • 100г. Триразове з інтервалом в три дні в/р введення водного розчину NaJ у щурів призводить до підвищення САТ на 37% ($p < 0,01$), Твв

на 75,5% ($p < 0,01$) та зменшення ЛК у печінці на 28,5% ($p < 0,001$) порівняно з контролем (рис.3.17).

А після триразового з інтервалом в три дні в/р введення води для ін'єкцій із розрахунку 0,5 мл/100 г вірогідних змін досліджуваних показників гемодинаміки порівняно з контролем виявлено було.

Такі результати отриманих показників гемодинаміки свідчать про розвиток портальної гіпертензії у щурів з NaJ-моделлю. Але для перевірки даної гіпотези ми здійснювали гістологічний аналіз печінок тварин з портальною гіпертензією та тварин контрольної групи (рис. 3.18).

У портальногіпертензивних щурів порівняно з контрольними спостерігається виражена дистрофія і некроз невеликих ділянок печінки. Просвіт венул та артеріол різко звужений, вміщує в собі еритроцити та продукти їх гемолізу. Синусоїди розширені, особливо в місцях розташування центральних вен і також заповнені еритроцитами. Відбувається сильна проліферація клітин Купфера, крім того в синусоїдах з'являються колагенові волокна. Також спостерігається розширення центральної вени. Що стосується трабекулярного опису дольок гепатоцитів, то спостерігається не чітке їх зображення та локальний міжгепатоцитарний набряк. Цитоплазма гепатоцитів нерівномірно зафарбована, що свідчить про виражений поліморфізм у розмірах ядер. На окремих гепатоцитах з вакуолізацією цитоплазми спостерігається розвиток некробіозу. Подібні зміни у перебудові тканини печінки мають місце і у людини при ідіопатичному цирозі, а особливо при цирозі алкогольного походження [114]. Частина судин у тріаді гіалінізована. З'являються витягнуті клітини з подовженими темними ядрами, які, мабуть, є сполучнотканинними, і надалі можуть бути джерелом склерозитування судин у тріадах і тріад вцілому (рис.3.18, Б).

Ці результати є свідченням того, що застосована нами методика призвела до розвитку портальної гіпертензії у піддослідних щурів.

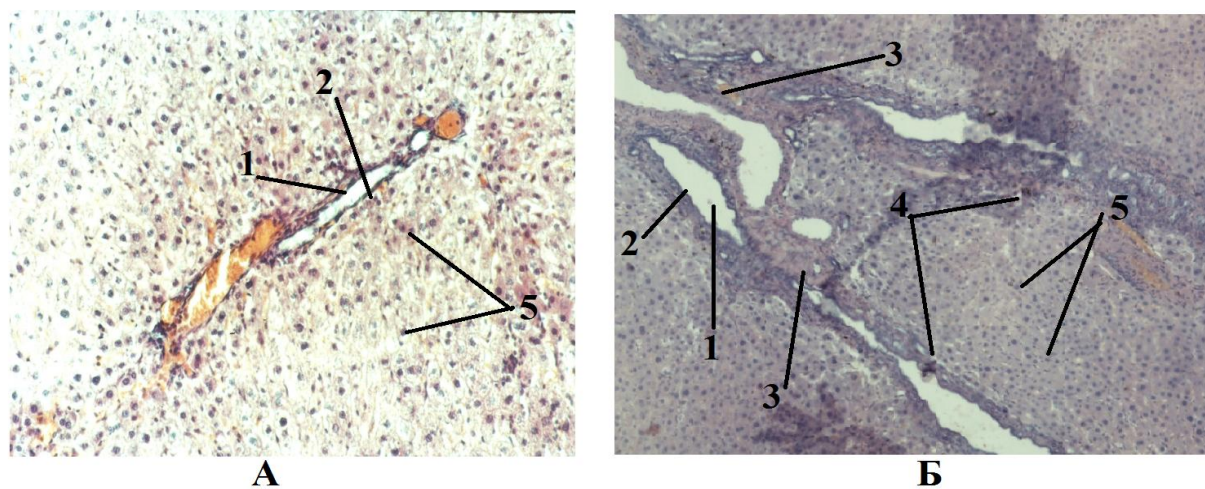


Рис. 3.18. Мікрофотографії зрізів печінки щурів контрольної групи (А) та при портальній гіпертензії (Б). Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. X 100 .

Примітка: 1. – судина; 2. – ендотелій; 3. – фіброз; 4. – некротичні ділянки; 5. – гепатоцити

Внаслідок дифузного фіброзу, що виникає при ПГ, спостерігається зміна архітекtonіки печінки [103]. Сформовані вузли регенерації тиснуть на синусоїди та печінкові вени, викликаючи при цьому збільшення опору у портальній системі печінки. В результаті чого, тиск у ворітному руслі зростає, а колатеральні вени розширюються, формуючи портокавальні шунти. Проте, нормалізація тиску не настає, гіпердинамічний стан внутрішньоорганного кровотоку посилюється, а кровопостачання функціональних елементів печінки зменшується. Цей стан супроводжується збільшенням серцевого викиду і зменшенням периферичного судинного опору [34].

Як вже зазначалось, H_2S також має здатність діяти місцево, та є потужним вазодилататором. Тому, щоб перевірити чи здатний H_2S впливати на кровообіг в печінці у тварин з ПГ, ми використовували попередник його синтезу амінокислоту L-цистеїн (40 мг/кг), який вводили в/оч протягом 20 днів.

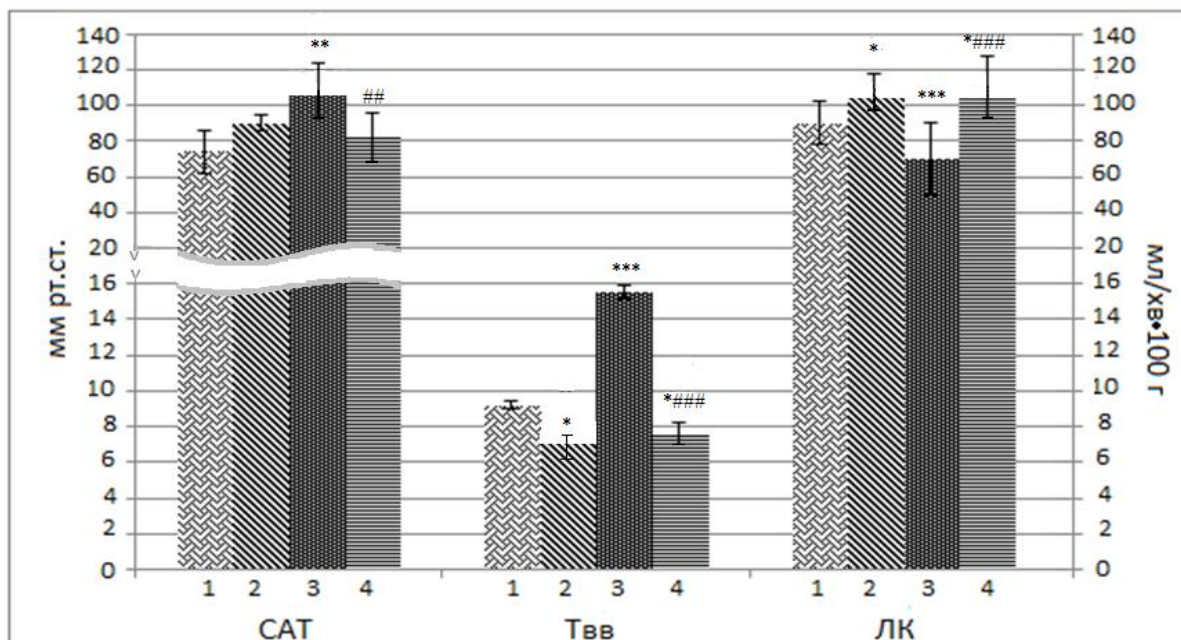


Рис.3.19. Зміни САТ, Твв та ЛК в печінці щурів контрольної групи (1), H_2O+L -цистеїн (2), ПГ (3) та ПГ+L-цистеїн (4) ; $M \pm SD$; $n=34$.

Примітки: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,01$ – порівняно з групою контролю (H_2O в/р); ## - $p < 0,01$; #### - $p < 0,001$ – порівняно з показниками при ПГ

Виявилось, що у портальногіпертензивних тварин вихідні рівні показників кровообігу становили: САТ – $107,7 \pm 12,9$ мм рт.ст., Твв – $15,0 \pm 1,5$, ЛК – $67,6 \pm 12,2$ мл/хв•100 г, тоді як тривале введення L-цистеїну знижує САТ на 20,3% ($p < 0,01$), Твв на 35,9% ($p < 0,001$) та підвищує ЛК на 54,2% ($p < 0,001$), що наблизило значення цих показників до таких, як у щурів групи контролю (рис.3.19).

За літературними даними відомо, що L-цистеїн та його похідні здатні до комплексоутворення з іонами металів [226]. Тому, ці комплексні сполуки розглядаються як моделі для вивчення біологічних процесів. Зв'язування цистеїну з міддю сприяє її знешкодженню, адже в надлишковому його утворенні розвивається хвороба Вільсона. Також відзначено захисну роль цієї амінокислоти і при впливі інших токсичних сполук. Так, він здатний зв'язувати миш'як, розщеплювати ціанід,

утворюючи тiazолідин, а також сприяти синтезу меркаптопуринових кислот з ароматичних вуглеводнів [223]. Проте, особливе значення приділяють здатності цистеїну вступати в реакцію з розчинним залізом. Оскільки цистеїн є хелатною сполукою і має у своєму складі металеві групи, то вплив цієї амінокислоти на печінку розглядається як дезінтоксикаційний фактор, що попереджає її жирове переродження [215, 226].

Антиокисні властивості цистеїну також пов'язують з утворенням ще одного важливого її похідного – глутатіону (γ -глутамілцистеїнілгліцину). Він бере участь у багатьох біохімічних процесах, що сприяють захисту клітин від реакційно-здатних інтермедіатів кисню, дії іонізуючої радіації та окислювальному стресі іншого походження [151, 231]. Глутатіон має потужну детоксикаційну дію, що виражається у нейтралізації надлишку сірки, монооксиду азоту, спиртів та важких металів. Ця молекула є поліфункціональною, тому найголовнішими функціями системи глутатіону є: захист клітин від активних форм кисню, відновлення дисульфідних зв'язків, вплив на активність ферментів, підтримання оптимального стану біомембран, реалізація коферментних функцій, функціонування у якості резерву цистеїну, участь в біосинтезі нуклеїнових основ, підвищення клітинної стійкості до інтоксикацій, стимулювання імунологічного захисту організму, підвищення фагоцитарної активності лейкоцитів, участь в метаболізмі ксенобіотиків, стимуляція поділу клітин, відновлення клітин печінки та забезпечення пластичних і енергетичних потреб організму [58, 207, 231].

Виходячи з вищеперерахованих властивостей L-цистеїну можна припустити, що ця амінокислота може бути використана як лікувальний засіб у клінічній практиці. Оскільки, L-цистеїн здатний сприяти покращенню функціонального стану організму як в якості амінокислоти, так і в якості попередника синтезу сульфїду водню, ми вирішили провести гістологічний аналіз тканини печінки після 20-ти денного введення L-

цистеїну у дозі 40 мг/кг.

Виявилось, що гістологічна картина печінки у цій групі тварин покращилась (рис. 3.20.).

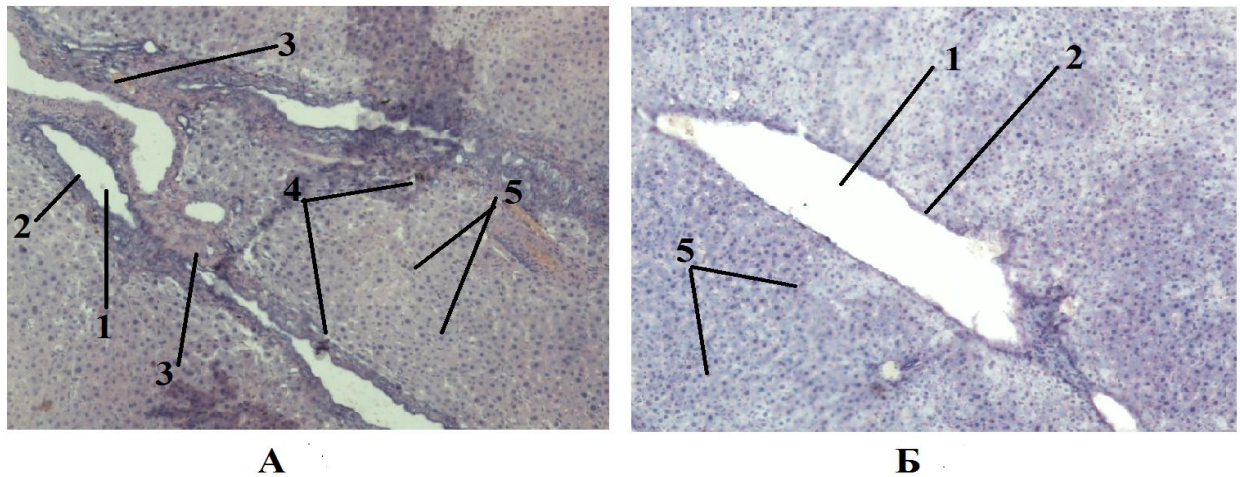


Рис. 3.20. Мікрофотографії зрізів печінки щурів з ПГ (А) та після 20-ти денного введення L-цистеїну (40 мг/кг; Б). Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. X 100.

Примітка: 1. – судина; 2. – ендотелій; 3. – фіброз; 4. – некротичні ділянки; 5 – гепатоцити

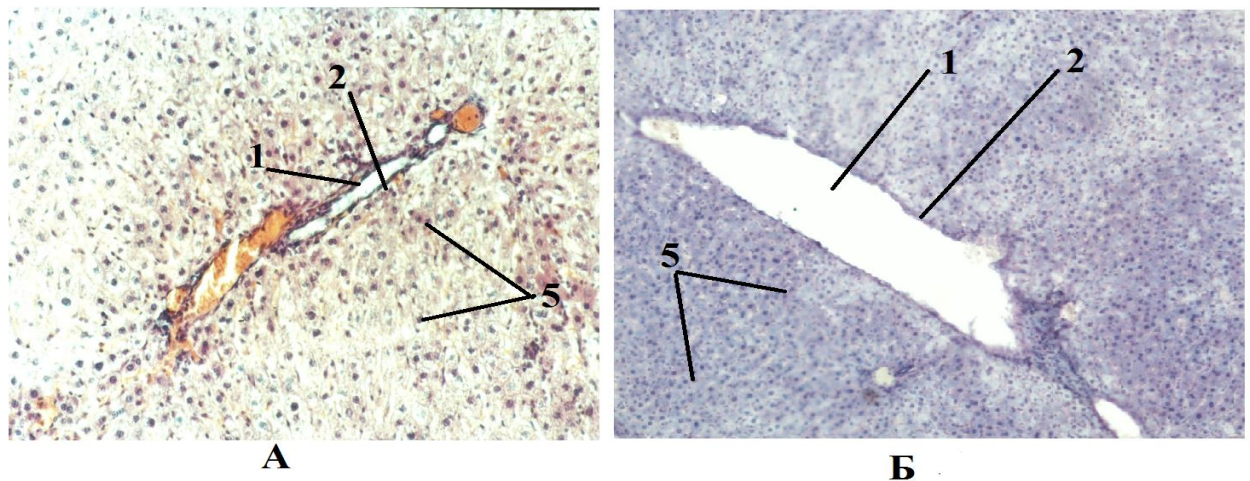


Рис. 3.21. Мікрофотографії зрізів печінки щурів контрольної (А) та після 20-ти денного введення тваринам з ПГ L-цистеїну (40 мг/кг; Б). Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. X 100.

Примітка: 1. – судина; 2. – ендотелій; 5 – гепатоцити

Спостерігались чітко зафарбовані ядра клітин та зник міжклітинний набряк. Гепатоцити, в свою чергу, зменшились в розмірах та мають більш чітку форму, однак їх розташування залишилось хаотичним. Зменшилось потовщення центральної вени, а міжтрабекулярний простір збільшився (рис. 3.20). Однак, міждолькові вени були повнокровними з потовщеними стінками та втрченою трабекулярною цілісністю (рис.3.21).

Такий млоефективний прояв у регенераційних процесах паренхіми печінки і її кровоносних судинх може бути обумовлений нетривалим введенням амінокислоти або токсичною дією H_2S . Тому, можливо, для остаточного відновлення її структури було б доцільно вводити цистеїн протягом більш тривалого періоду та зменшити його концентрацію.

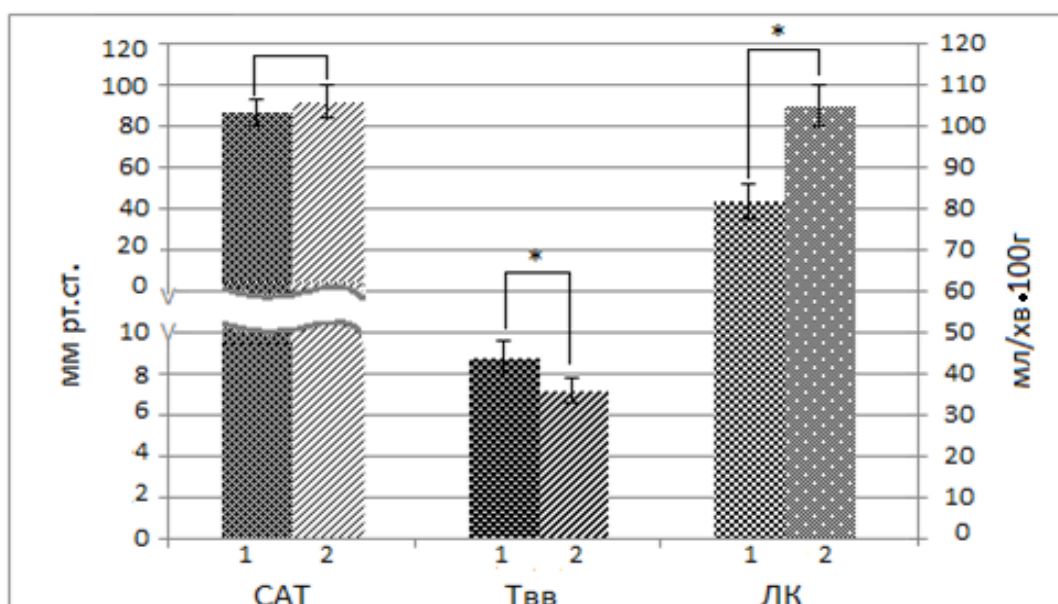


Рис. 3.22. Системний артеріальний тиск (САТ), тиск у ворітній вені (Твв) та локальний кровотік (ЛК) у печінці щурів при 20-ти денному внутрішньоочеревинному введенні L-цистеїну ($M \pm SD$; $n=23$).

Примітки: 1 – тварини з 3-ох разовим в/р введенням води для ін'єкцій із розрахунку 0,5 мл/100г г; 2 – L-цистеїн (40 мг/кг); ліворуч – шкала (у мм рт.ст.) для тиску крові в артеріальних і ворітних судинах; праворуч – шкала (у мл/хв•100г) для тканинного кровотоку в печінці; * - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

В іншій групі тварин, яким в/р вводили воду для ін'єкцій вихідні рівні становили: САТ – $83,4 \pm 0,5$ мм рт.ст, Твв – $8,8 \pm 0,7$ мм рт.ст., ЛК – $81,9 \pm 2,0$ мл/хв 100г. Після 20-ти денного в/оч введення цим щурам L-цистеїну (40 мг/кг) САТ вірогідно не змінився, Твв знизився на 14,2% ($p < 0,05$), а ЛК в печінці збільшився на 12,4% ($p < 0,05$) (рис.3.22).

Отримані нами результати свідчать про те, що L-цистеїн чинить односпрямовані реакції як у портальногіпертензивних, так і у нормотензивних тварин. При цьому спостерігалось розширення кровоносних судин в залозі, в результаті чого тканинний кровотік в ній зростає, а тиск крові в артеріальних і ворітних судинах знижувався. Подібні дослідження були проведені й іншими авторами [46], які показали,

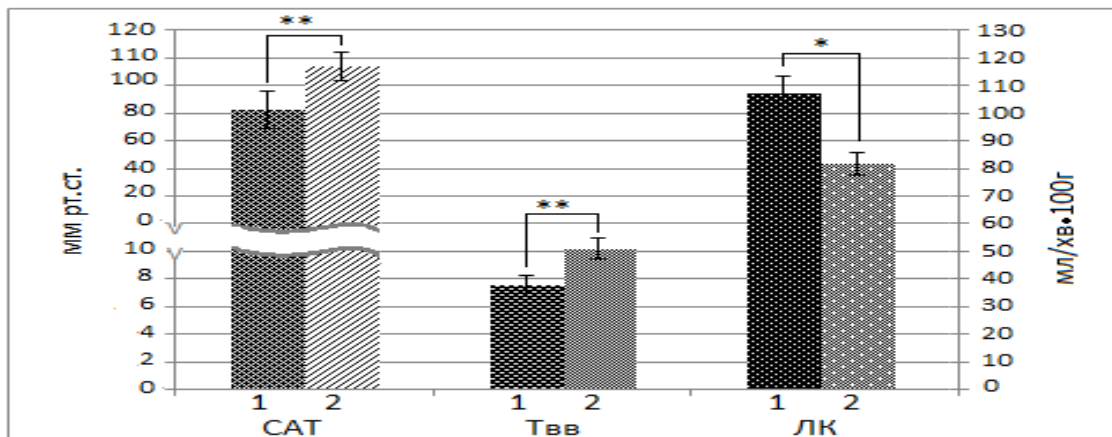


Рис. 3.23. Реакції на норадреналін (5 мкг/кг) системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та локального кровотоку (ЛК) у печінці щурів з ПГ, яким впродовж 20 діб вводили L-цистеїн (40 мг/кг); $M \pm SD$, $n=21$.

Примітки: 1 – вихідний рівень показників кровообігу; 2 – максимум реакції при введенні норадреналіну; ліворуч – шкала (у мм рт.ст.) для тиску крові в артеріальних і ворітних судинах; праворуч – шкала (у мл/хв•100г) для тканинного кровотоку в печінці; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

що в/оч введення донора сірководню NaHS протягом 5 днів тваринам з

цирозом печінки спричиняє у них дилатацію внутрішньопечінкових судин і зниження тиску у ворітній вені. Разом з тим, за результатами наших досліджень L-цистеїн більш інтенсивно розширює кровоносні судини у портальногіпертензивних тварин порівняно з нормотензивними. Це, ймовірно, пов'язано зі значно більшим вихідним рівнем констрикції судин печінки у щурів з ПГ, а тому й можливістю їх стінок до більшого розширення.

З літературних джерел відомо, що ендотелій відіграє істотну роль у реалізації судинних ефектів сульфиду водню, так як деендотелізовані препарати здатні до істотно меншої H_2S -індукованої вазодилатації [239]. Для того, щоб перевірити реактивність ворітних судин ми використовували адреноміметик норадреналін (5 мг/кг), який вводили внутрішньопортально (рис.3.23, рис.3.24).

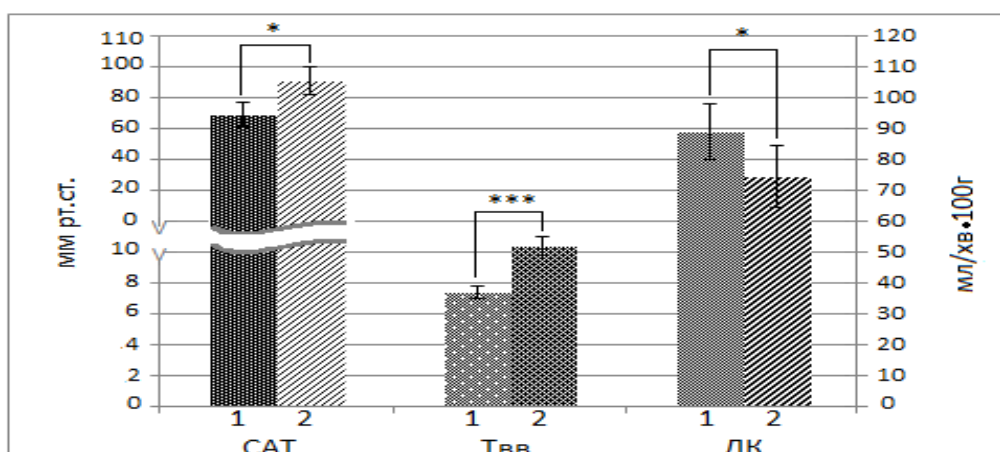


Рис.3.24. Реакції на норадреналін (5 мкг/кг) системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та локального кровотоку (ЛК) у печінці щурів, яким вводили воду для ін'єкцій та впродовж 20-ти діб L-цистеїн (40 мг/кг); $M \pm SD$, $n=22$.

Примітки: 1 – вихідний рівень показників; 2 – максимум реакції при введенні норадреналіну; ліворуч – шкала (у мм рт.ст.) для тиску крові в артеріальних і ворітних судинах; праворуч – шкала (у мл/хв•100г) для тканинного кровотоку в печінці; * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

У всіх піддослідних щурів при цьому відбувалось підвищення САТ, і Твв. У портальногіпертензивних щурів з 20-денним введенням L-цистеїну норадреналін зумовлює підвищення САТ і Твв на 33% ($p < 0,01$) і 41,5% ($p < 0,01$) відповідно та зменшення ЛК в печінці на 23,5% ($p < 0,05$) відносно вихідного рівня (рис.3.20). Тоді як у тварин, яким вводили воду і L-цистеїн, норадреналін підвищував САТ на 25% ($p < 0,05$), Твв на 52% ($p < 0,001$) та зменшував ЛК у печінці на 16,5% ($p < 0,05$; рис.3.24).

Тобто, реакції САТ на норадреналін у тварин з ПГ були менші на 12% від щурів контрольної групи, а реакції Твв пригнічені ще більше - на 28,5% ($p < 0,05$). Це свідчить про зменшення реактивності ворітних судин печінки у тварин з ПГ. У портальногіпертензивних щурів, яким впродовж 20 діб вводили L-цистеїн, реакції САТ і Твв на норадреналін вірогідно не відрізнялись від контролю. Що вказує на відновлення реактивності судин у ПГ-тварин при тривалому введенні їм попередника H_2S .

На сьогодні є відомості про те, що судинорозширювальні ефекти сірководню значною мірою опосередковуються NO [45, 46]. Оскільки монооксид азоту та пероксинітрит здатні взаємодіяти з сульфідом водню, утворюючи нітрозотіол, який регулює фізіологічну дію NO та H_2S . Важливо зазначити, що на відміну від інших нітрозотіолів (R-S-NO), котрі є джерелом NO і часто повторюють його дію, нітрозотіоли, що формуються при взаємодії H_2S і NO є неактивними. Виходячи з цього, авторами Licks F *et.al* [101] було показано, що при створенні експериментальної моделі портальної гіпертензії з частковим перетисканням ворітної вени, рівень нітритів та нітратів у плазмі крові зростає, а активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази знижується. Тоді як 7-денне внутрішньоочеревинне введення N-ацетилцистеїну (10 мг/кг) призводить до зменшення уражень слизової оболонки шлунка та зменшує рівень нітратів і нітритів у плазмі крові щурів, посилюючи антиокисидантні процеси в печінці. Такі результати свідчать

про те, що сірководень разом з монооксидом азоту забезпечують підтримку детоксикаційної функції печінки [76, 129].

Виходячи з цього, наступним етапом нашої роботи було перевірити рівень похідних монооксиду азоту та виміряти концентрацію метаболіту NO₂ у плазмі крові портальногіпертензивних щурів та у групі тварин після 20-денного введенню L-цистеїну.

Вміст стабільного метаболіту NO₂ у плазмі крові контрольної групи щурів становив 5,2±0,1 ммоль/мг загального вмісту білка. В той час як у тварин з портальною гіпертензією рівень NO₂ зріс на 37,7% (p<0,01) і становив 32,4±2,7 ммоль/мг білка. 20-ти денне введення L-цистеїну не призводило до зниження рівня NO-метаболітів у плазмі крові щурів (табл.3.6).

Таблиця 3.6.

Середні значення вмісту NO₂ в плазмі крові щурів (ммоль/мг білка; M±m, N=22)

№ проби	Інтактні (I)	NaI-модель (II)	NaI-модель +L-цистеїн (III)
1	5,2±0,1	32,4±2,7 ***	35,3±5,8 ***
Внутрішньопортальне введення норадреналіну 5 мкг/кг			
2	4,7±1,1	16,8±4,0 **	30,9±5,8 ***
Внутрішньопортальне введення норадреналіну 5 мкг/кг			
3	5,3±0,4	39,2±1,4 ***	22,7±8,2 ***

Примітка: * - вірогідність відносно групи I; ** - p<0,01; *** - p<0,001

Збільшення рівня концентрації похідних монооксиду азоту за умов портальної гіпертензії може бути зумовлене адаптивною реакцією судин спрямованою на подолання підвищеного опору портопечінковому кровотоку [154].

На стадії судинної компенсації спостерігається зростання тиску у ворітній вені, що і зумовлює підвищення опору у системі печінкових судин. Судиннорозширювальні властивості монооксиду азоту допомагають зберегти внутрішньопечінкову мікроциркуляцію на рівні, який необхідний для повноцінного функціонування гепатоцитів. Зменшення ж синтезу NO призводить до порушення регуляції тонуусу кровоносних судин [234]. Тому, як ми вважаємо, додаткова активація eNOS, сприяючи збільшенню утворення монооксиду азоту, намагається подолати внутрішньопечінковий опір та справити розширювальний ефект на внутрішньопечінкові судини, а, отже, і нормалізувати мікроциркуляцію в органі.

Крім того не варто виключати і те, що при виникненні портальної гіпертензії пошкодження виникають і на рівні клітин. Як відомо, [264] різні стресові стани, в тому числі і травмування клітин, можуть впливати на кальцій-залежні каналні структури, викликаючи експресію NO індукцибельною NOS. Варто зазначити, що активація iNOS призводить до високого рівня синтезу монооксиду азоту протягом тривалого часу[191]. В той час як eNOS експресує NO короткочасно і лише за умов екзогенних та ендогенних стимулів, у тому числі при збільшенні напруження розтягнення судин. Тому, можливо, високий рівень метаболіту NO обумовлений саме активацією ферментів його синтезу eNOS та iNOS. Однак, судинне розширення не настає, оскільки синтез місцеводіючих речовин при запальних процесах порушується і навіть високий рівень NO не в змозі подолати створений внутрішньопечінковий опір.

З літературних джерел відомо, що у обстежуваних з ПГ рівень сірководню в плазмі крові значно знижується порівняно зі здоровими

людьми. Причому це зниження корелює зі зменшеною активністю CSE. Аналогічні дослідження були підтверджені і на кролях [185]. Так, активація синтезу H_2S у портальногіпертензивних тварин запобігає функціональній перебудові судин печінки, посилює проліферацію клітин та допомагає підтримувати судинний гомеостаз. У наших дослідженнях ми виявили, що внутрішньопортальне введення норадреналіну 5мкг/кг призводить до зниження рівня NO_2 у тварин досліджуваних груп після першого введення катехоламіну. Так, у інтактних щурів норадреналін спричиняв зниження NO_2 на $9,7\%$, у групі з NaJ-моделлю – на $48,2\%$, а у тварин з NaJ-моделлю, яким вводили L-цистеїн – на $12,5\%$ відносно проби №1. Після 10-хвилинної перерви повторне введення норадреналіну спричиняло відновлення показників NO_2 . Отримані результати свідчать про синергічну дію норадреналіну та монооксиду азоту. Тобто судиннорозширювальний ефект в печінці нейтралізується введенням норадреналіну. Але зменшення концентрації NO_2 в плазмі крові щурів обумовлюється нетривалим часом, оскільки повторне введення катехоламіну не викликає зменшення NO_2 .

3.2. Участь монооксиду азоту у регуляції печінкового кровообігу

В 1998 році Furchgott, L. Ignarro и F. Murad вперше дослідили вплив NO на серцево-судинну систему, за що їм і була присуджена Нобелівська премія в галузі медицини та фізіології [15]. Це здійснило суттєвий переворот у науці та надало підстави проведення досліджень дії газових посередників на інші системи організму. Не виключенням стала і гепатобіліарна система. Відомо, що NO здатний сприяти антиоксидантним властивостям печінки, підвищувати її ферментативну активність, бути гальмівним фактором у процесах детоксикації та

відігравати роль потужного гепатопротектора [244]. А блокада ферменту (NOS), за участю якого утворюється ця молекула, може призвести до розвитку гіпертензії, зниження рівня NO в плазмі крові щурів та зменшення периферичного кровотоку [56]. Відомо, що середній добовий рівень споживання попередника синтезу NO L-аргініну для людини складає 5,4 г [95], тоді як екзогенне введення великих доз амінокислоти щурам (100-200 мг/кг) може спричинити розвиток патологічних процесів у печінці та інших органах шлунково-кишкового тракту [11].

Показано, що наявність NO в крові може бути умовою, яка обумовлює його біологічний ефект. У низьких його концентраціях (<1 мкМ) спостерігаються прямі ефекти монооксиду азоту, що спрямовані на підтримання гомеостазу в серцево-судинній та нервовій системах. Тоді як високі (>1 мкМ) – спричиняють непрямі впливи і обумовлюють утворення високореакційноздатної сполуки – пероксинітриду [27]. За умов надлишкового утворення монооксиду азоту спостерігаються порушення мітохондріального дихання та зупиняється ріст клітин. Прямі ефекти NO полягають у кардіотоксичній дії. До того ж, спостерігається стійка генералізована вазодилатація і падіння артеріального тиску.

Підвищення рівня монооксиду азоту в крові пов'язують також і з септичним шоком. Велика кількість мікробів, що циркулює в кровоносній системі, різко активують NO, який, в свою чергу, викликає довготривале та потужне розширення дрібних кровоносних судин і зниження артеріального тиску, що складно підлягає терапевтичному лікуванню. Такі ж прояви описані і при травматичному, геморрагічному, анафілактичному, тепловому та кардіогенному шоці [116].

Тому в наших експериментах по дослідженню впливу монооксиду азоту на кровообіг в печінці ми використовували попередника його синтезу L-аргінін у дозах близьких до фізіологічної його концентрації в крові.

3.2.1. Роль NO у регуляції печінкового кровообігу.
 Внутрішньопортальне введення L-аргініну у дозі 2,5 мг/кг призводить до зниження САТ і Твв на 16,9% ($p < 0,05$) та 27,8% ($p < 0,05$) відповідно та збільшення ЛК і КНП на 31,7% ($p < 0,01$) і 20% ($p < 0,01$) відповідно (рис.3.25; 3.27; 3.28). Тоді як вихідні значення показників у тварин досліджуваній групі становили: САТ – $82,9 \pm 18,9$ мм рт.ст, Твв – $7,8 \pm 2,2$ мм рт.ст., ЛК – $78,8 \pm 14,9$ мл/хв•100г, КНП – $22,5 \pm 1,4$ мл/100 г. Латентні періоди реакцій показників печінкового кровообігу дещо різнилися в часі. Так, зміни САТ і Твв розпочиналися через $12,4 \pm 5,7$ с та $10,8 \pm 4,2$ с відповідно, а КНП – через $31,0 \pm 3,7$ с з моменту введення L-аргініну. Максимального розвитку реакції САТ набували на $30,0 \pm 3,8$ хв, Твв на $29,3 \pm 8,4$ хв, а КНП на $40,2 \pm 5,4$ хв після введення цієї амінокислоти (табл.3.7).

Таблиця 3.7

Часові характеристики реакцій системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та кровонаповнення печінки (КНП) на внутрішньопортальне введення L-аргініну (2,5 мг/кг та 5 мг/кг);

N=47

Показники	Часові параметри	L-аргінін 2,5 мг/кг	L-арінін 5 мг/кг	Кількість дослідів
САТ мм рт.ст.	ЛП (сек)	$12,4 \pm 5,7$	$9,0 \pm 3,7$	n = 15
	t _{max} (хв)	$30,1 \pm 3,8$	$17,5 \pm 6,3$	
Твв мм рт.ст.	ЛП (сек)	$10,8 \pm 4,2$	$6,0 \pm 5,2$	n = 19
	t _{max} (хв)	$29,3 \pm 8,4$	$16,0 \pm 3,8$	
КНП мл/100 г	ЛП (сек)	$31,0 \pm 3,7$	$22,3 \pm 4,6$	n = 13
	t _{max} (хв)	$40,2 \pm 5,4$	$27,5 \pm 6,8$	

Часові так і у венозному руслах. Тоді як латентний період реакцій в кровоносних судинах печінки був дещо триваліший. Різницю тривалості латентних періодів реакцій в артеріальному та венозному руслах можна пояснити тим, що L-аргінін, введений внутрішньопортально, в першу чергу починає впливати на ворітні судини печінки, тоді як на системні артеріальні судини він діє, подолавши довший шлях.

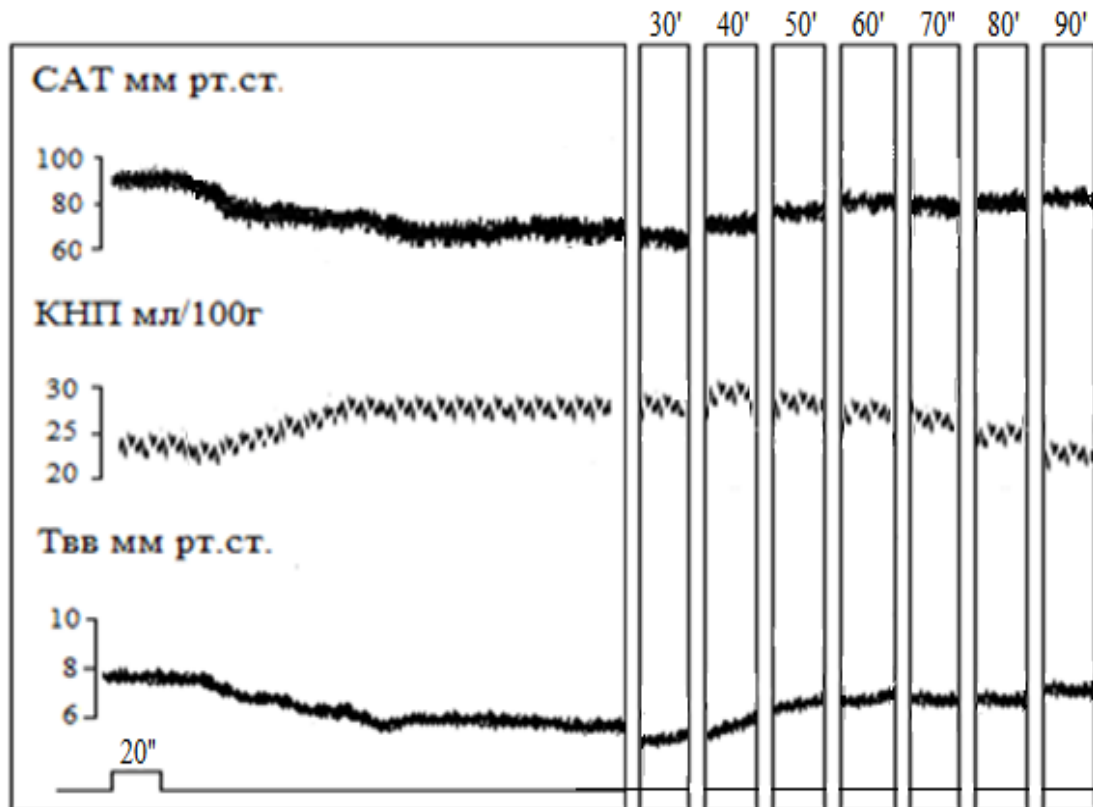


Рис. 3.25. Вплив внутрішньопортального введення L-аргініну (2,5 мг/кг) на артеріальний тиск (САТ), кровонаповнення печінки (КНП) та тиск у ворітній вені (Твв).

Примітки: внизу відмітка введення речовини

У наступній серії наших досліджень ми вирішили підвищити дозу L-аргініну вдвічі до 5 мг/кг і перевірити, як змінюватимуться при цьому показники кровообігу в печінці.

Так, вихідні значення досліджуваних показників гемодинаміки були на рівні: САТ – $91,1 \pm 12,4$ мм рт.ст., Твв – $8,3 \pm 1,4$ мм рт.ст., ЛК – $96,6 \pm 16,9$

мл/хв•100г, КНП – $21,8 \pm 1,2$ мл/100 г.

Внутрішньопортальне введення L-аргініну спричиняє аналогічні реакції у судинах: САТ і Твв знижувались на 10,5% і 20,5% відповідно, а ЛК і КНП підвищувались на 33% ($p < 0,05$) та 41,8% ($p < 0,01$) відповідно (табл.3.8, рис. 3.26).

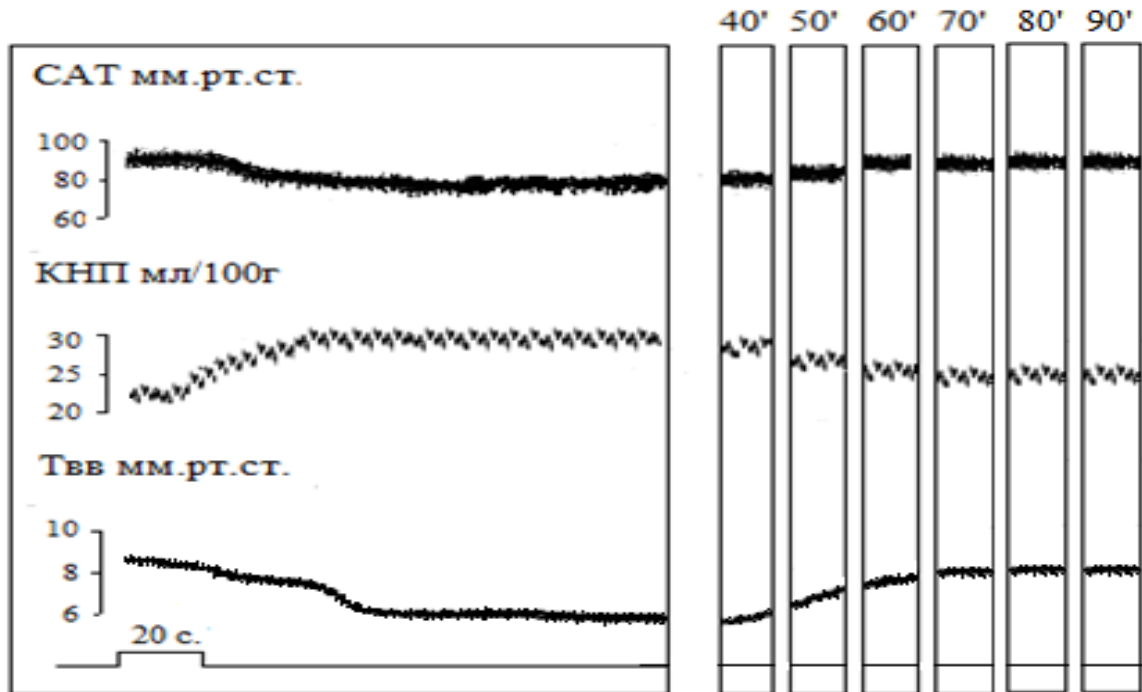


Рис. 3.26. Вплив внутрішньопортального введення L-аргініну (5 мг/кг) на артеріальний тиск (САТ), кровонаповнення печінки (КНП) та тиск у ворітній вені (Твв).

Примітки: внизу відмітка введення речовини

Відомо, що тонус судин підтримується багатьма регуляторними факторами, які здатні реалізувати свій ефект через системи внутрішньоклітинної сигналізації. Передача інформації від рецепторів плазматичної мембрани до виконавчих систем опосередковується сигнальними вторинними посередниками, основними з яких є іони кальцію та циклічні гуанінмонофосфат (цГМФ) і аденозинмонофосфат (цАМФ). NO є першим газотрансмітером, функції якого всебічно досліджено в різних системах організму і доведено, що він вільно проникаючи крізь

мембрану гладеньком'язових клітин, активує фермент гуанілатциклазу, під впливом якого утворюється цГМФ та знижується концентрація Ca^{2+} у цитоплазмі клітин, викликаючи розширення судинної стінки [137].

Результати проведених нами раніше досліджень [199] свідчать про те, що реакції мобілізації крові з печінки у відповідь на ацетилхолін

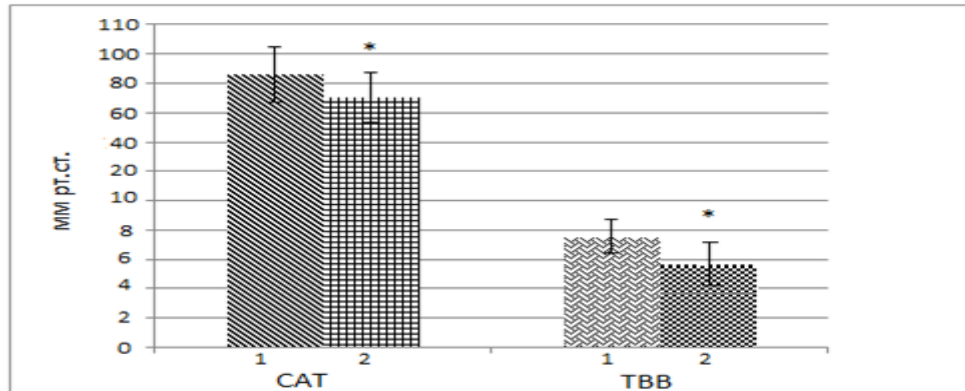


Рис.3.27. Зміни системного артеріального тиску (САТ) та тиску у ворітній вені (ТВВ) при внутрішньопортальному введенні L-аргініну (2,5 мг/кг); $M \pm SD$, $n=12$.

Примітки: 1 – вихідний рівень показника; 2 – максимум реакції;

* - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

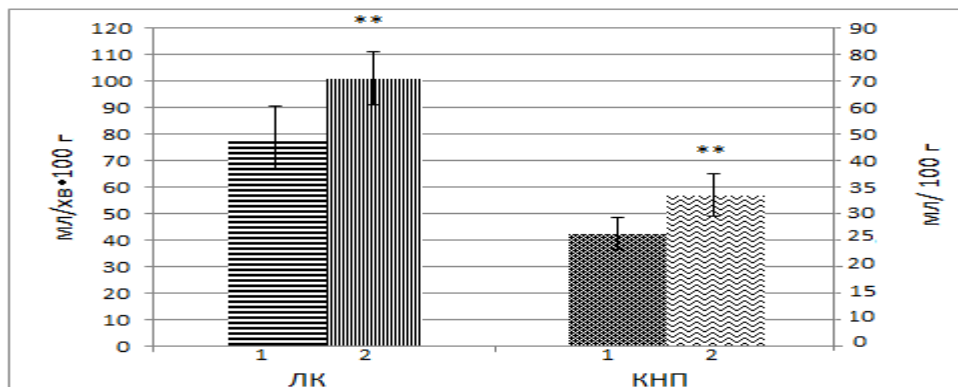


Рис.3.28. Зміни локального кровотоку (ЛК) та кровонаповнення печінки (КНП) при внутрішньопортальному введенні L-аргініну (2,5 мг/кг); $M \pm SD$, $n=17$.

Примітки: 1 – вихідний рівень показника; 2 – максимум реакції;

** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

відбуваються за участю печінкових вен і, ймовірно, синусоїдів, але, без залучення внутрішньопечінкових ворітних вен. Тому, збільшення кровонаповнення печінки під впливом NO здійснюється, на нашу думку, за участю саме ємнісних судин.

Варто зазначити, утворення монооксиду азоту з його донорів та попередників здійснюється за участю різних ізоформ NO-синтаз – ферментів, що виявляються в ендотелії та міоцитах судин, а також в гепатоцитах [31]. За характером дії, фізіологічними властивостями та локалізацією розрізняють 2 типи NOS. I тип – конститутивні (кальмодулінзалежні) синтази, до яких відносять нейрональну (nNOS) та ендотеліальну (eNOS) форми ферменту, II тип – індукцибельна (цитокінзалежна) NO-синтаза, до якої належить макрофагальна форма (iNOS).

Таблиця 3.8.

Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та кровонаповнення печінки (КНП) при внутрішньопортальному введенні L-аргініну в дозі 5 мг/кг (M±SD; n=25)

Показники	Доза L-аргініну	Вихідний рівень	Максимум реакції	Відсоток реакції
САТ мм рт.ст.	5 мг/кг	91,1 ± 12,4	81,6 ± 13,0	89,5
Твв мм рт.ст.	5 мг/кг	8,3 ± 1,4	6,6 ± 1,6	79,5
ЛК, мл/хв • 100г	5 мг/кг	96,6 ± 16,9	138,2 ± 27,3**	141,8
КНП, мл/100 г	5 мг/кг	21,8 ± 1,2	29,0 ± 2,2*	133

Примітка: * - p<0,05; ** - p<0,01

Отже, отримані нами результати свідчать про те, що попередник синтезу монооксиду азоту L-аргінін у дозах, близьких до його

фізіологічної концентрації в крові викликає зниження системного артеріального тиску, тиску у ворітній вені та збільшення локального кровотоку в печінці і її кровонаповнення, що свідчить про судинорозширювальний ефект цієї амінокислоти в печінці.

3.2.2. Ефекти L-аргініну на печінковий кровообіг в умовах блокади NO-синтаз. Як вже зазначалось, монооксид азоту в організмі людини і тварин утворюється з L-аргініну. А його каталіз здійснюється за допомогою різних ізоформ NO-синтаз [31, 111]. Так, більша частина монооксиду азоту синтезованого в печінці за нормальних умов здійснюється за участю eNOS, оскільки її мРНК було виявлено в зірчастих клітинах залози. А iNOS здатна генерувати NO в умовах стресу або при розвитку запальних процесів в організмі [27]. Вивільнений NO хімічно нестабільний і існує всього декілька секунд [257]. Тому, в просвіті судини ця молекула швидко інактивується розчиненим киснем, супероксидними аніонами та гемоглобіном. Це, в свою чергу, попереджує дію NO на відстані від місця його утворення. Синтез NO є регульованим процесом і може гальмуватися різними аналогами L-аргініну, які є конкурентними інгібіторами NOS. N-нітро-L-аргінінметиловий ефір (L-NAME) є неселективним блокатором усіх ізоформ NO-синтаз і тому був використаний, для перевірки залучення монооксиду азоту в досліджені ефекти амінокислоти [10, 14].

Вихідний рівень у цій серії досліджень становив: САТ – $80,7 \pm 2,85$ мм рт.ст, Твв – $5,8 \pm 1,7$ мм рт.ст., ЛК – $84,6 \pm 7,9$ мл/хв•100г, КНП – $23,1 \pm 1,5$ мл/100 г.

У відповідь на внутрішньопортальне введення L-NAME (20 мг/кг) спостерігалось підвищення САТ і Твв на 33,8% ($p < 0,01$) та 29,6% ($p < 0,01$) відповідно, а також зниження ЛК і КНП на 17% ($p < 0,05$) і 20% ($p < 0,001$) відповідно (табл.3.9).

Таблиця 3.9

Вплив внутрішньопортального введення L-NAME в дозі 20 мг/кг на системний артеріальний тиск (САТ), тиск у ворітній вені (Твв), локальний кровотік (ЛК) та кровонаповнення печінки (КНП) (N=17, M±SD)

Показники	Доза L- NAME	Вихідний рівень	Максимум реакції	Відсоток реакції
САТ мм рт.ст.	20 мг/кг	80,7± 2,8	108 ± 3,3 **	133,8
Твв мм рт.ст.	20 мг/кг	5,8±1,7	7,6 ± 2,8 **	129,6
ЛК мл/хв •100 г	20 мг/кг	84,6±7,9	70,2±5,4 *	83,0
КНП мл/100 г	20 мг/кг	23,1±1,5	18,5 ±2,1 ***	80,0

Примітка: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Ці результати свідчать про те, що L-NAME заблокував роботу NO-синтаз, завдяки чому відбулось пригнічення ендogenous синтезу монооксиду азоту. Внаслідок цього, внутрішньопечінкові судини звужились і як результат, тиск крові в них підвищився, а тканинний кровотік та об'єм депонованої в печінці крові зменшились (табл.3.9).

Подальші наші дослідження полягали у з'ясуванні судинорухових ефектів в печінці на фоні дії блокатора NO-синтаз L-NAME. Причиною такої схеми експерименту став відомий факт, що L-аргінін широко використовується в клінічній практиці як амінокислота яка має лікувальні властивості. Тому, можливо, ефекти судинного розширення викликані не монооксидом азоту, а самою амінокислотою. Для реалізації поставленої задачі ми блокували синтез NO за допомогою L-NAME (20 мг/кг) і

вводили L-аргінін.

Виявилось, що введення неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME (20 мг/кг) призводить до усунення судинорозширювальних ефектів в печінці викликаних L-аргініном в обох дозах. Спостерігались протилежні зміни досліджуваних показників.

Так, при введенні амінокислоти в дозі 2,5 мг/кг спостерігалось підвищення САТ на 14,8%, Твв на 35,8% ($p < 0,01$) та зменшення ЛК і КНП на 6,9% і 18,3% ($p < 0,05$) відповідно до вихідних рівнів, що становили: для САТ – $81,9 \pm 13,8$ мм рт.ст., Твв – $5,3 \pm 1,6$ мм рт.ст., ЛК – $92,5 \pm 12,6$ мл/хв•100г, КНП – $18,3 \pm 1,4$ мл/100 г (рис.3.29, рис.3.30, рис.3.31).Тоді як ВР у групі з введенням амінокислоти у дозі 5 мг/кг складала: САТ – $71,5 \pm 18,2$ мм рт.ст., Твв – $6,7 \pm 2,4$ мм рт.ст., ЛК – $94,7 \pm 22,4$ мл/хв•100г, КНП – $22,2 \pm 1,3$ мл/100 г.

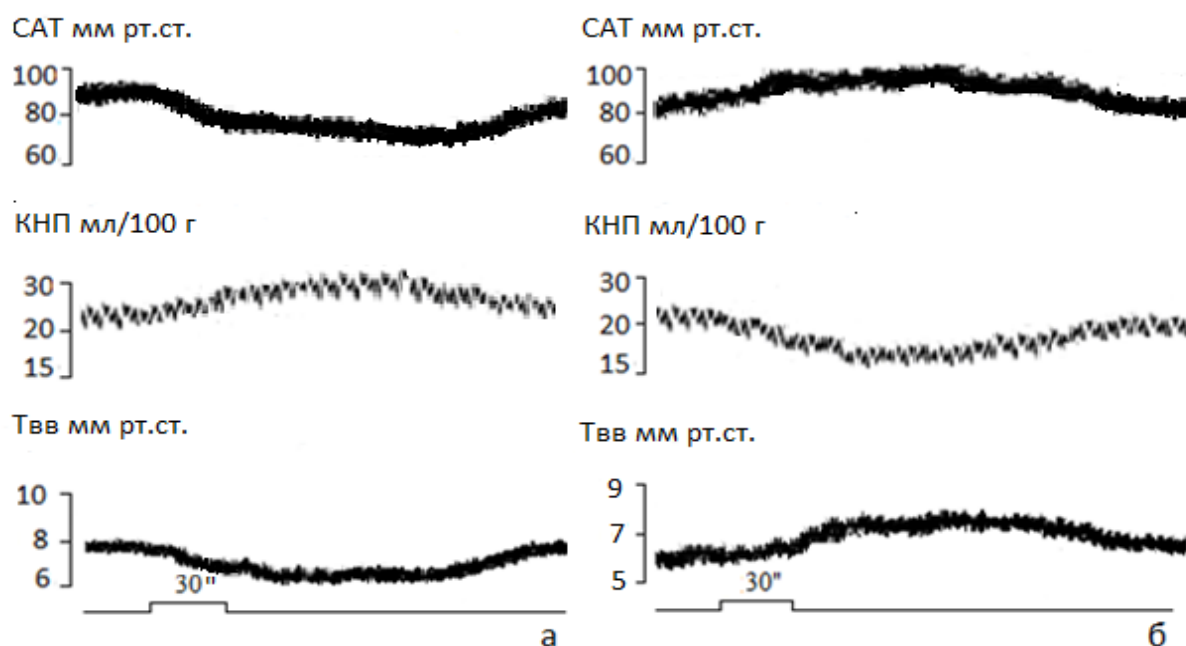


Рис. 3.29. Вплив внутрішньопортального введення L-аргініну (2,5 мг/кг) на системний артеріальний тиск (САТ), кровонаповнення печінки (КНП) та тиск у ворітній вені (Твв) щурів до (а) та після (б) введення L-NAME (20 мг/кг).

Примітка: внизу відмітка введення препарату

Зі збільшення дози L-аргініну до 5 мг/кг САТ та Твв підвищувались на 37,6% ($p < 0,01$) та 20,8% ($p < 0,05$) відповідно, а ЛК і КНП зменшувались на 13,3% та 20,3% ($p < 0,05$) порівняно з вихідними рівнями (табл. 3.10).

На сьогодні відомо ряд інгібіторів NOS. Їх дія полягає у селективній блокаді синтезу монооксиду азоту різними ізоформами NOS. Так, N-омега-циклопорил-L-аргінін є селективним інгібітором eNOS, а аміногуанідин – iNOS. Деякі інші аналоги L-аргініну, такі як N-монометил-L-аргінін, N-нітро-L-аргінінметиловий ефір, N-нітро-L-аргінін здатні гальмувати вироблення NO обома ферментами. Експресія NO може гальмуватися або припинятися під впливом гемопротейнів, метиленового блакитного, супероксид радикалів, етанолу, глюкокортикостероїдів, індометацину [212, 218].

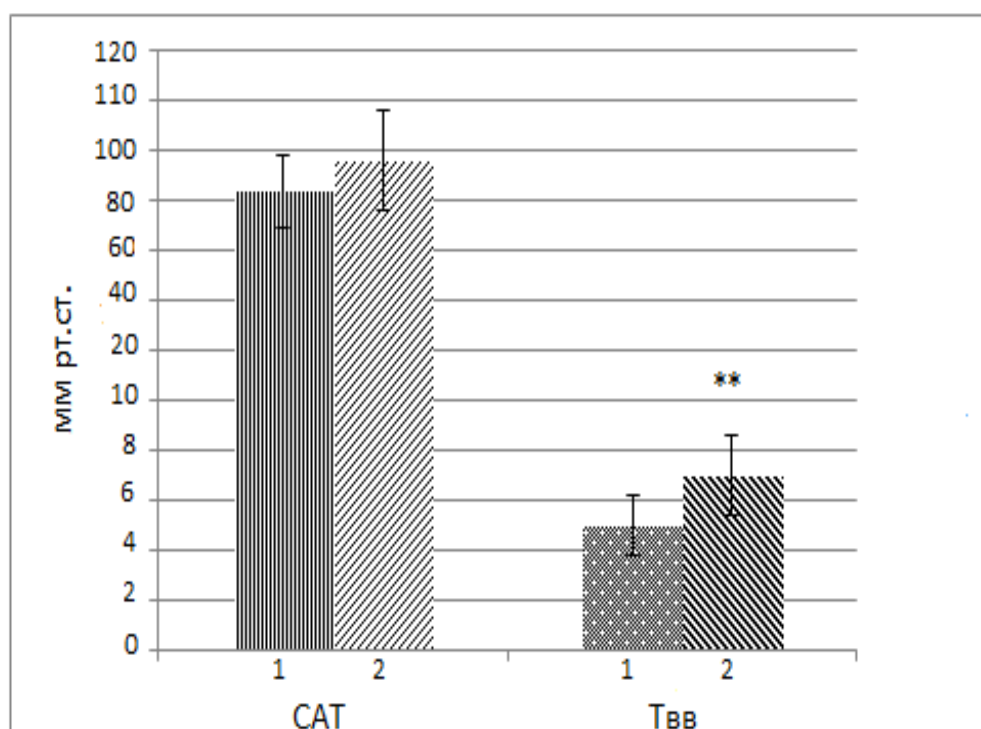


Рис.3.30. Зміни системного артеріального тиску (САТ) та тиску у ворітній вені (Твв) при внутрішньопортальному введенні L-аргініну (2,5 мг/кг) на фоні дії L-NAME (20 мг/кг); n=14.

Примітки: 1 – вихідний рівень показника; 2 – максимум реакції;

** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня.

Доведено, що в умовах блокади синтезу монооксиду азоту при використанні неселективного блокатора NOS L-NAME та селективного інгібітора iNOS AG при ішемічно-реперфузійному ураженні печінки відбувається до погіршення функціонального стану залози. Спостерігається активація цитолізу, ліпопероксидації та погіршення мітохондріального дихання клітинам печінки, що підтверджується морфологічними перебудовами у її тканині з появою дистрофічно-некротичного переродження та утворення вогнищ запалення в окремих ділянках тканини печінки [244].

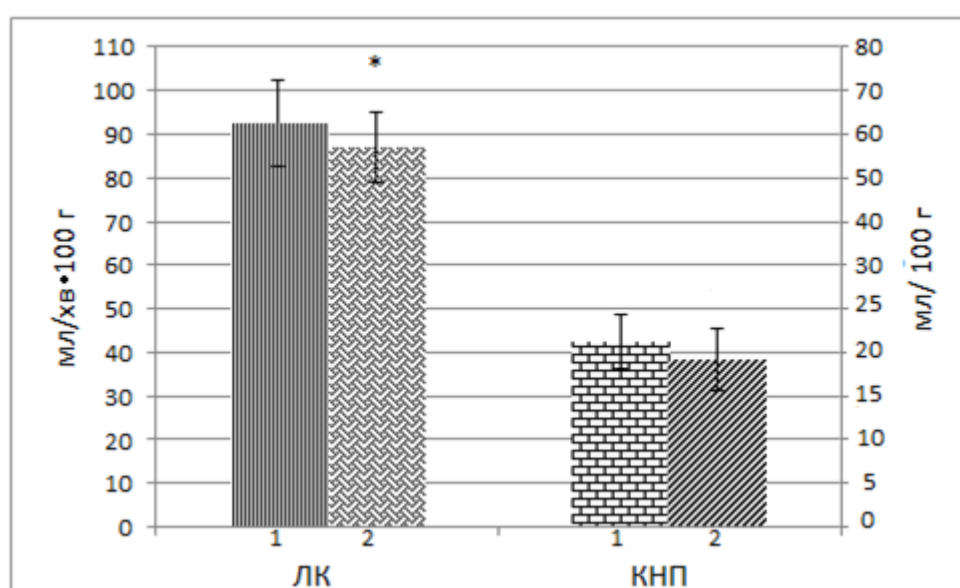


Рис.3.31. Зміни локального кровотоку (ЛК) та кровонаповнення (КНП) печінки щурів при внутрішньопортальному введенні L-аргініну (2,5 мг/кг) на фоні дії L-NAME (20 мг/кг); $M \pm SD$, $n=17$.

Примітки: 1 – вихідний рівень показника; 2 – максимум реакції;

* - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Також показано, що при використанні неселективних блокаторів NOS справляє більш негативний вплив на функціональний стан залози, на відміну від селективних [271]. Так, L-NNA призводить до порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу в період ішемії-реперфузії, в той час як аміногуанідин не викликав суттєвих негативних наслідків

[248]. Разом з тим показано, що використання інгібіторів NOS посилює ураження печінки при експериментальній ішемії-реперфузії, підвищуючи при цьому активність печінкових трансаміназ, порушуючи печінкову мікроциркуляцію та зменшуючи швидкість перфузії [244]. А селективні блокатори індуцибельної форми NOS, на відміну від неселективних інгібіторів NOS, усувають негативний вплив при ішемії-реперфузії [244]. Це може бути обумовлене тим, що монооксид азоту синтезований з eNOS справляє протекторну функцію, в той час як надмірна його кількість синтезована з iNOS справляє згубні наслідки через генерацію токсичних сполук (супероксид радикалу та пероксинітриду), що призводять до ліпопероксидації некрозу та апптозу гепатоцитів [244].

Таблиця 3.10.

Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та кровонаповнення печінки (КНП) при внутрішньопортальному введенні L-аргініну в дозі 5 мг/кг на фоні дії L-NAME в дозі 20 мг/кг (M±SD; N=35)

Показники	Доза L-аргініну	Вихідний рівень	Максимум реакції	Відсоток реакції
САТ мм рт.ст.	5 мг/кг	71,5 ± 9,4	98,4 ± 14,0**	137,6
Твв мм рт.ст.	5 мг/кг	6,7 ± 2,4	8,1 ± 2,7*	120,8
ЛК, мл/хв•100г	5 мг/кг	94,7±22,4	89,3±12,9*	86,7
КНП, мл/100 г	5 мг/кг	22,2± 1,3	17,7 ± 2,0*	79,7

Примітка: * - p<0,05, ** - p<0,01

Що ж стосується судинорухових ефектів, то використання L-NAME зумовлює звуження судин серця у кози та щурів [134,251]. Подібні дослідження були підтверджені і на скелетних м'язах. Показано,

що NO збільшуючи кровообіг в м'язовій тканині, забезпечує надходження необхідних поживних речовин та виведення з них продуктів розпаду і токсинів, а L-NMMA справляє судиннозвужуючий вплив з поступовим розширенням цих судин після введення L-аргініну [39].

Результати наших досліджень свідчать про те, що монооксид азоту відіграє важливу роль у регуляції кровообігу в печінці. Свідченням тому є розширення судин залози, зумовлене внутрішньопортальним введенням попередника синтезу NO L-аргініну, внаслідок чого об'єм депонованої в печінці крові і тканинний кровотік збільшуються. Блокада NO-синтаз за допомогою L-NAME не тільки повністю усуває ефекти L-аргініну, але й зумовлює пригнічення ендogenous синтезу NO, що призводить до звуження внутрішньопечінкових судин і, як наслідок, зменшення тканинного кровотоку в печінці та її кровонаповнення.

Отримані нами експериментальні дані в певній мірі узгоджуються з результатами досліджень інших авторів, які також вивчали участь NO у регуляції печінкової гемодинаміки [157, 204]. Але вони досліджували зміни тону судин печінкових судин, таких як печінкова артерія та ворітна вена, котрі є судинами опору. Іншими авторами було встановлено, що L-аргінін посилює проходження перфузату через печінку, викликаючи розширення її судин [31]. Ми поряд з тиском у ворітній вені, який характеризує опір портальних судин, реєстрували й реакції кровонаповнення печінки, що свідчать про зміни тону емнісних судин органа та безпосередньо реєстрували кровотік в паренхімі печінки щурів. Наші експерименти підтверджують той факт, що NO знижує тиск крові у внутрішньопечінкових ворітних судинах та зменшує тону емнісних кровеносних судин залози, збільшуючи тим самим депоновання нею крові, і мікроциркуляторних судин, збільшуючи тканинний кровотік в печінці.

Як відомо, NO є потужним судинорозширювальним фактором і може відігравати ключову роль у регуляції органного кровотоку [66]. Регулюючи

тонус гладеньких м'язів судин, проникність останніх та мікроциркуляцію може сприяти доставці кисню до міокарду, головному мозку, кінцівок та інших органів [225]. NO перешкоджає тромбоутворенню, знижує рівень холестерину в крові та запобігає розвитку атеросклерозу. Тому його цей газовий попередник амінокислота L-аргінін може бути використана в якості лікувального препарату [38, 191]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідити участь монооксиду у регуляції печінкового кровообігу при портальній гіпертензії щурів за умов введення L-аргініну.

3.2.3. Участь монооксиду азоту у регуляції кровообігу в печінці при портальній гіпертензії. У цій серії досліджень, як і у випадку з попередником синтезу сірководню, було створено п'ять груп щурів: тварини першої групи – це контроль; другої – тварини, яким трьохразово внутрішньоректально з інтервалом в три дні вводили воду для ін'єкцій; третьої – щурі, яким інтраректально вводили воду для ін'єкцій та протягом 20 діб в/оч вводили L-аргінін (20 мг/кг); четверта – тварини яким внутрішньоректально вводили NaJ випадку для моделювання ПГ; п'ята – щурі, яким після трьохразового ректального введення NaJ, вводили L-аргінін (20 мг/кг) впродовж 20 діб.

Як було вже нами зазначено, NaJ-модель ПГ призводить до підвищення САТ і Твв та зумовлює зниження ЛК у печінці, а також супроводжується морфологічними перебудовами її структури, що і було підтверджено у гістологічному аналізі тканини (рис. 3.18).

На сьогодні відомо, що утворившись в судинному ендотелії монооксид азоту зв'язується з трьохвалентним залізом гему цитохром-с-оксидази в мітохондріях та регулює деякі транскрипційні фактори, наприклад індукований гіпоксією фактор-1, після чого швидко дифундує в кров. В просвіті судин NO швидко поглинається еритроцитами та вступає в реакцію з двоховалентним залізом гему оксигемоглобіну з подальшим синтезом метгемоглобіну та NO^{3-} [261]. Також цей газ здатний дифундувати

до клітин гладеньких м'язів і за участю гемвмісної гуанілатциклази спричиняти судинне розширення, регулюючи таким чином діаметр судин згідно фізіологічної потреби. Проте, за умов розвитку портальної гіпертензії порушується метаболізм місцево діючих речовин (NO, ендотеліну-1), котрі здатні синтезуватися клітинами синусоїдів печінки, зумовлюючи дисфункцію судинного тону[3, 59]. Доведено, що екзогенно вивільнений NO в клітинах організму спричиняє аналогічні реакції, що і при ендогенній його продукції [108]. Тому з метою перевірки його лікувальних та судинорозширювальних властивостей ми використовували амінокислоту L-аргінін, яку протягом 20 днів внутрішньоочеревинно вводили портальногіпертензивним тваринам та щурам після 3-ох разового введення води для ін'єкцій.

Вихідні значення показників кровообігу у щурів контрольної групи були такі: САТ – $96,2 \pm 16,8$ мм рт.ст., Твв – $7,74 \pm 1,9$ мм рт.ст., ЛК – $93,8 \pm 14,0$ мл/хв•100г, а групі з ПГ – САТ $99,1 \pm 17,9$ мм рт.ст., Твв – $12,4 \pm 1,8$ мм рт.ст., ЛК – $76,1 \pm 10,4$ мл/хв•100г.

Після тривалого протягом 20-ти діб в/оч застосування L-аргініну в контрольній групі спостерігалось зменшення САТ на 22,6% ($p < 0,05$) і Твв – на 2,6%, а також збільшення швидкості ЛК в печінці щурів на 10,3% (рис.3.32). Тоді як у портальногіпертензивних щурів показники гемодинаміки дещо відрізнялись від контролю. Спостерігалось зниження САТ на 3%, Твв на 38% ($p < 0,05$) і підвищення ЛК на 44,5% ($p < 0,01$; рис.3.33).

Отримані результати свідчать про те, що введення амінокислоти сприяє зменшенню тиску у системному артеріальному та венозному руслах, а також призводить до збільшення швидкості тканинного кровотоку в залозі щурів контрольної та портальногіпертензивної груп.

Умовно незамінна амінокислота L- аргінін є головним субстратом для синтезу монооксиду азоту. Проте, вона може бути і попередником для багатьох біологічно важливих молекул, таких як орнітин, пролін, креатин,

агмантин та поліаміни. [14]. L- аргінін здатний надходити до організму разом з продуктами харчування і всмоктавшись в тонкому кишківнику потрапляти до печінки, де основна її кількість утилізується в орнітиновому циклі. Частина не метаболізованої амінокислоти йде на синтез NO. У фізіологічних умовах утворення монооксиду азоту з L-аргініну здійснюється за допомогою ферментів – NOS, який одночасно використовує

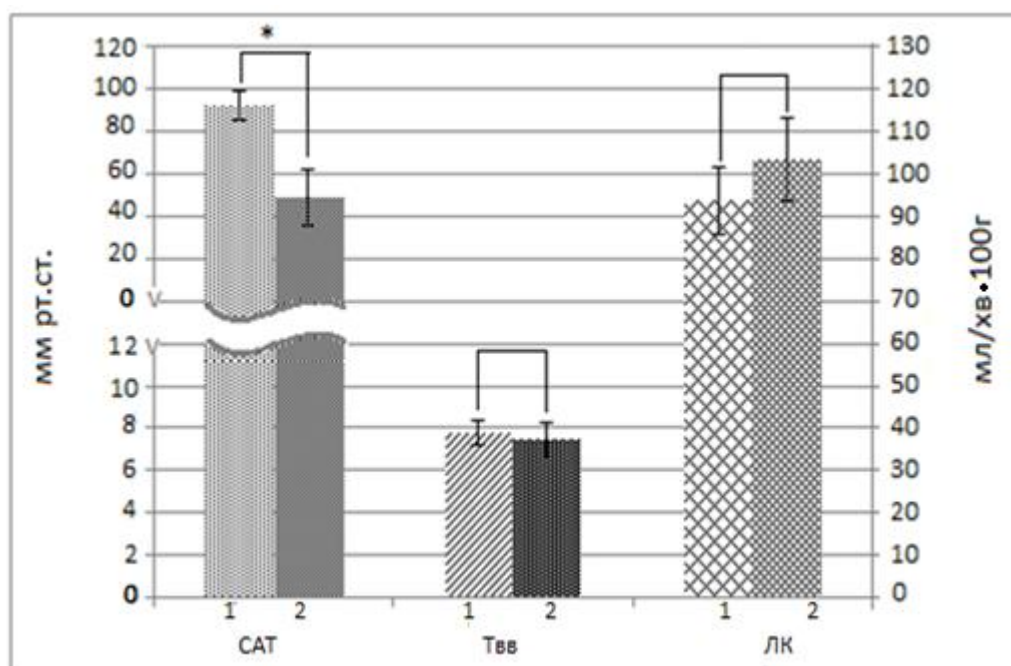


Рис.3.32. Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та локального кровотоку (ЛК) у печінці щурів при 20-ти денному внутрішньоочеревинному введенні L-аргініну; $M \pm SD$, $n=23$.

Примітки: 1 – тварини з 3-ох разовим введенням води для ін'єкції ; 2 – L-аргінін (20 мг/кг); ліворуч – шкала (у мм рт.ст.) для тиску крові в артеріальних і ворітних судинах; праворуч – шкала (у мл/хв•100г) для тканинного кровотоку в печінці; * - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

5 кофакторів (флавінаденіндинуклеотид, флавінмонунуклеотид, гем,

тетрагідробіоптерин, кальцій або кальмодулін) [15].

Індукований синтез NO відіграє важливу роль у функціонуванні гепатоцитів і захищає печінку від септичної та ішемічної реперфузії. Цей газ проявляє протекторну дію завдяки його здатності перешкоджати інтраваскулярним тромбозам шляхом інгібування адгезії тромбоцитів і нейтралізації токсичних радикалів. Також відзначено, що монооксид азоту виконує і протизапальну роль. Ці ефекти полягають в інгібуванні експресії молекул адгезії ICAM-1 (молекули міжклітинної адгезії 1-го типу) та VCAM-

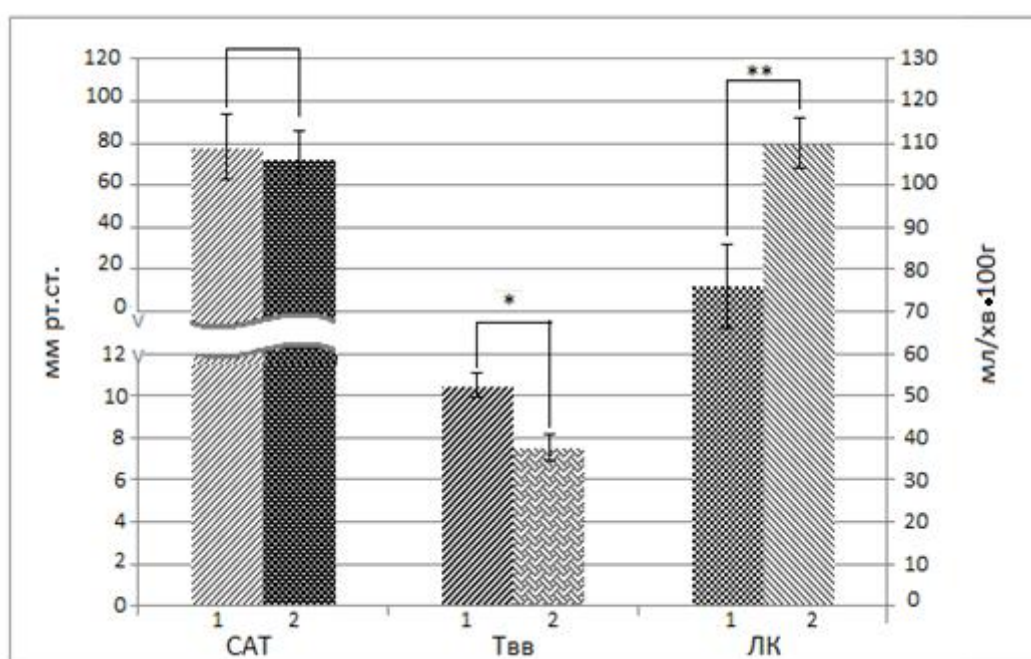


Рис.3.33. Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та локального кровотоку (ЛК) у печінці щурів при 20-ти денному внутрішньоочеревинному введенні L-аргініну; $M \pm SD$, $n=22$.

Примітки: 1 – портальногіпертензивні тварини; 2 – L-аргінін (20 мг/кг); ліворуч – шкала (у мм рт.ст.) для тиску крові в артеріальних і ворітних судинах; праворуч – шкала (у мл/хв•100г) для тканинного кровотоку в печінці; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

1 (молекули адгезії судинного ендотелію 1-го типу), тканинного фактору, хемокінів MCP-1 (моноцитарний хемотаксичний фактор-1), регуляції оксидантних процесів [263]. NO виявляє регуляторну дію *in vivo* та *in vitro* на процеси генетично запрограмованої смерті клітин, блокуючи TNF-а-індукований апоптоз, який запускає механізм клітинної загибелі [261]. Крім того, він здійснює стимулюючий вплив на ферменти макрофагів та забезпечує цитотоксичну дію по відношенню до чужорідних мікроорганізмів.

Тому після 20-ти денного застосування L-аргініну був проведений гістологічний аналіз печінки щурів з ПГ (рис.3.34).

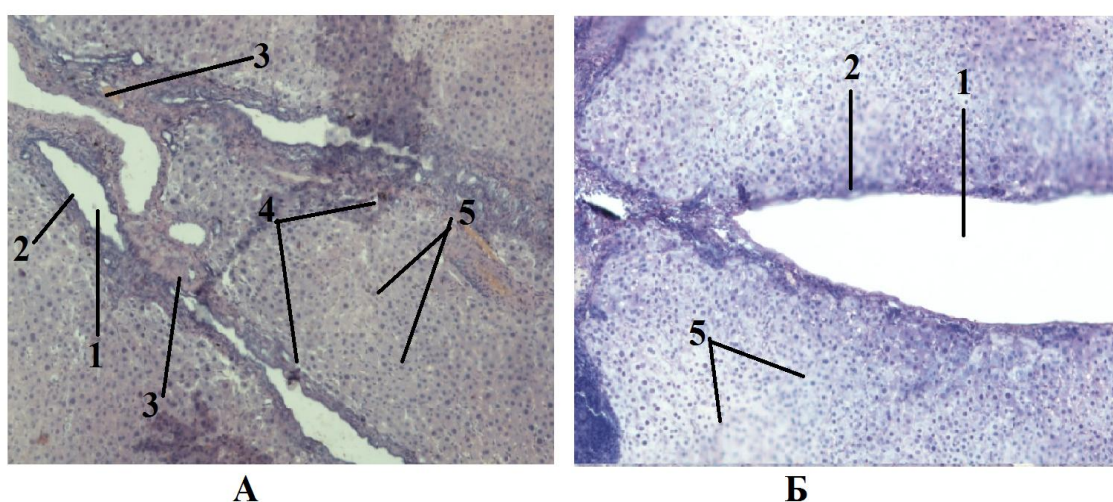


Рис. 3.34. Мікрофотографії зрізів печінки щурів з ПГ (А) та після 20-ти денного введення L-аргініну (20 мг/кг; Б). Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. х 100 .

Примітка: 1. – судина; 2. – ендотелій; 3. – фіброз; 4. – некротичні ділянки; 5. – гепатоцити

Виявилось, що амінокислота призводить до покращення морфологічної структури тканини залози. Спостерігалось більш чітке розташування гепатоцитів з рівномірним їх зафарбовуванням, зменшились дистрофічні перебудови цитоплазми та більшість ядер добре сприймають зафарбовування гематоксиліном. Проте, розширення центральної вени

зберігалояся, стінка її була потовщеною та повнокривною, міжтрабекулярний набряк повністю не утилізувався (рис.3.35).

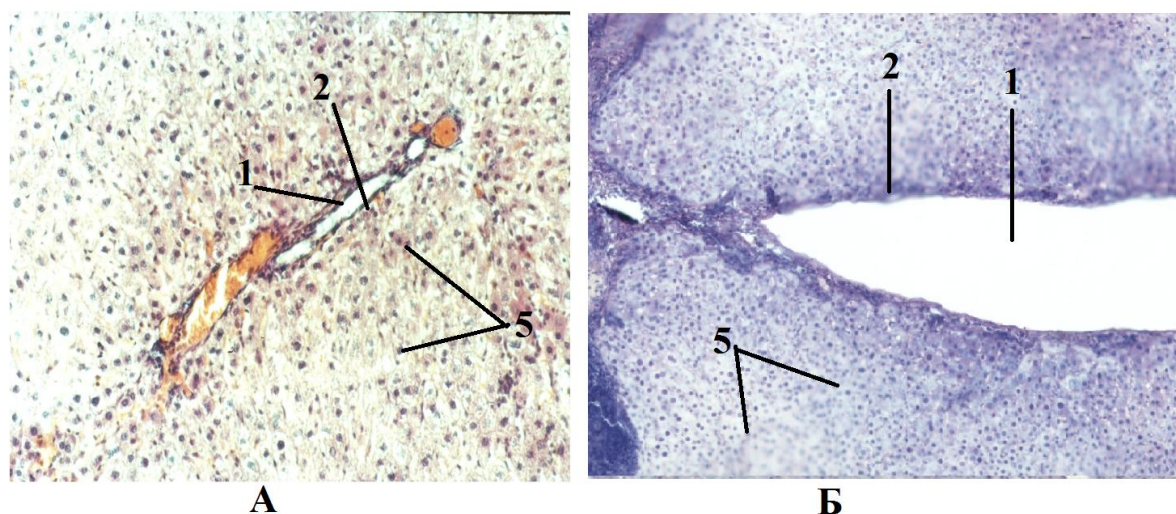


Рис. 3.35. Мікрофотографії зрізів печінки щурів контрольної групи (А) та після 20-ти денного введення тваринам з ПГ L-аргініну (20 мг/кг; Б). Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x 100 .

Примітка: 1. – судина; 2. – ендотелій; 5. – гепатоцити

Таке, не остаточне відновлення її тканини може бути обумовлене тим, що монооксид азоту, крім протекторної дії може спричиняти і формування патологічних процесів.

Доведено, що екзогенне введення аргініну може посилювати синтез NO в організмі. Цей феномен здійснюється за наявності в клітинах вільного асиметричного диметиларгініна (ADMA), який в умовах *in vivo* конкурує з аргініном на рівні NO-синтаз. Підвищена кількість ADMA інгібує eNOS, а введення L-аргініну відновлює її активність, нормалізуючи функцію ендотелію та тонус в судинах [224, 227]. Варто зазначити, що при гострих запаленнях розвивається оксидативний стрес, а введення аргініну може спричиняти погіршення стану за рахунок продукції пероксинітриду та інших токсичних сполук NO [224]. Перксинітрид є потужним окислювачем, що надає пряму цитотоксичну дію і призводить до інактивації глутатіону, каталази, антитрипсину та інших ферментів [220].

При надлишковому утворенні NO спостерігається інактивація залізовмісних білків таких як дихальні ферменти мітохондрій, пригнічується ріст і поділ клітин та спостерігається надлишкове утворення окислених ліпопротеїнів низької щільності [218]. Такі різнонаправлені ефекти цієї молекули визначаються як хімічними властивостями, так і її концентрацією, характером обмінних процесів у тканинах тощо [225]. Виходячи з цього, ми припускаємо, що повне відновлення функціонального стану печінки не спостерігалось оскільки патологія була серйозною і викликала значні ушкодження не тільки на рівні кровоносних судин, але і призводила до утворення некротичних ділянок у тканині. Але слід зазначити, що гістологічний аналіз продемонстрував все ж покращення функціонального стану печінки після 20-денного введення L-аргініну. В той час як показники кровообігу були наближені до норми, засвідчуючи регулюючий вплив монооксиду азоту не тільки на тонус судин печінки, але й на її морфологічний стан.

Такі зміни кровообігу у тварин з портальною гіпертензією можуть свідчити про те, що L-аргінін здатний не тільки розширювати судини печінки і посилювати кровотік в органі, але і сприяти покращенню морфофункціональним перебудовам в органі.

Відомо, що норадреналін при дії як на артеріальну, так і на венозну систему печінки викликає звуження її судин та підвищення судинного опору в обох руслах, що призводить до зменшення кровотоку в печінці [289]. Тому перевірку на реактивність судин ми здійснювали в умовах внутрішньопортального введення норадреналіну (5 мкг/кг).

Вихідні рівні у групі контролю після 20-денного введення L-аргініну становили: САТ – $74,5 \pm 3,6$ мм рт.ст., Твв – $7,5 \pm 1,0$ мм рт.ст., ЛК – $89,1 \pm 13,6$ мл/хв•100г, а введення норадреналіну призводило до підвищення САТ на 24,3% ($p < 0,05$), Твв на 50,6% ($p < 0,01$) та зменшення ЛК у печінці на 16,5% (рис.3. 36).

Тоді як у групі ПГ+ L-аргінін вихідні показники були на рівні: САТ –

106,0±0,1 мм рт.ст., Твв – 7,3±1,8 мм рт.ст., ЛК – 101,5±14,4 мл/хв•100г цей катехоламін сприяв підвищенню САТ на 7,7%, Твв на 35,6% ($p<0,05$) та зменшенню ЛК в печінці щурів на 14,4% відносно вихідного рівня (рис.3.37).

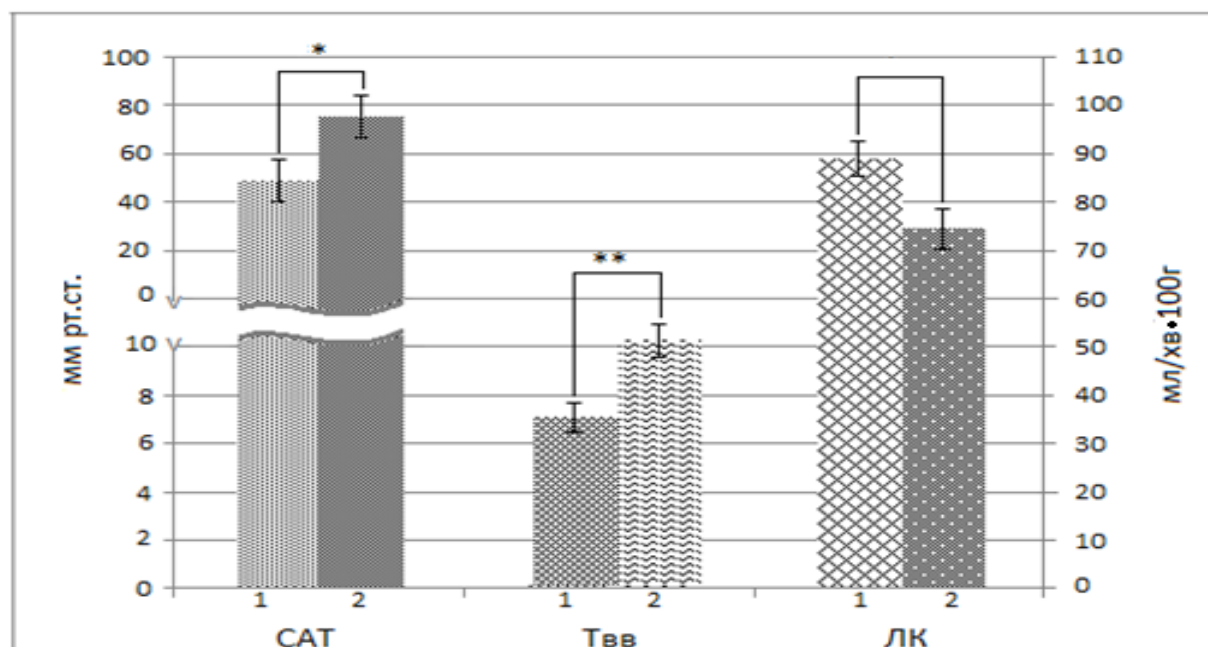


Рис.3.36. Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та локального кровотоку (ЛК) у печінці щурів при внутрішньопортальному введенні норадреналіну 5 мкг/кг; $M\pm SD$, $n=21$.

Примітки: 1 – вихідний рівень показників при введенні води для ін'єкції та 20-ти денним внутрішньоочеревинним введенням L-аргініну (20 мг/кг); 2 – максимум реакції при введенні норадреналіну; ліворуч – шкала (у мм рт.ст.) для тиску крові в артеріальних і ворітних судинах; праворуч – шкала (у мл/хв•100г) для тканинного кровотоку в печінці; * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Це свідчить про зменшення реактивності ворітних судин печінки у тварин з ПГ. У портальногіпертензивних щурів, яким впродовж 20 діб вводили L-аргінін, реакції САТ і Твв на норадреналін вірогідно не відрізнялись від контролю. Що вказує на відновлення реактивності судин у

ПГ-тварин при тривалому введенні їм попередника NO.

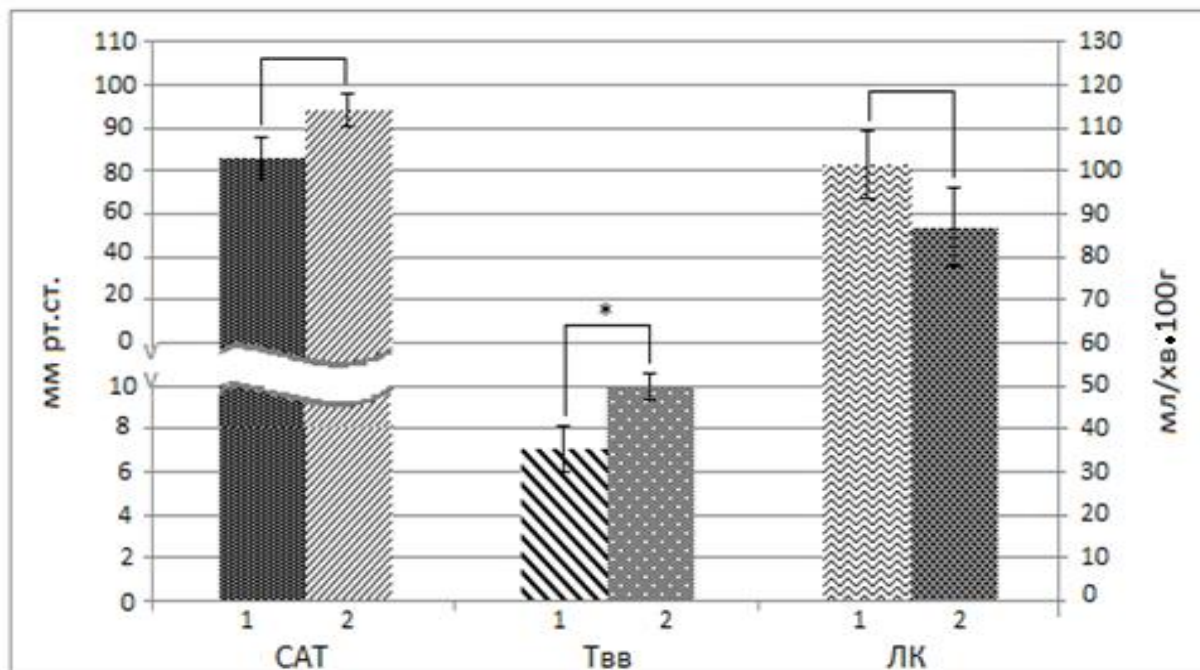


Рис.3.37. Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та локального кровотоку (ЛК) у печінці щурів при внутрішньопортальному введенні норадреналіну 5 мкг/кг; ($M \pm SD$; $n=25$).

Примітки: 1 – вихідний рівень показників ПГ та 20-ти денним внутрішньоочеревинним введенням L-аргініну (20 мг/кг); 2 – максимум реакції при введенні норадреналіну; ліворуч – шкала (у мм рт.ст.) для тиску крові в артеріальних і ворітних судинах; праворуч – шкала (у мл/хв•100г) для тканинного кровотоку в печінці; * - $p < 0,05$ – вірогідність змін відносно вихідного рівня

Як вже зазначалось, в організмі людини NO може брати участь у процесах коагуляції крові, а його синтез здійснюється за участю ферментів NO-синтаз. Домінуючим ферментом у синтезі NO в кровоносному руслі є ендотеліальна NO-синтаза, яка експресується на ендотелії судин [37]. У нормі нейрональна та індукційна NO-синтази в малих кількостях присутні у гладеньком'язових судинних клітинах. А при розвитку

системної ревматичної патології під впливом різних імуногенних стимулів відбувається експресія гена, відповідального за синтез індукцибельної NO-синтази у макрофагах, фібробластах та інших клітинах, внаслідок чого можливе суттєве зростання концентрації NO у крові, що сприяє імунному захисту [252, 253, 276]. При дослідженнях тканин печінки, було встановлено, що в гепатоцитах ендотеліальних та синусоїдальних клітинах експресуються ендотеліальна NO-синтаза та Ca^{2+} - незалежна індукцибельна NO-синтаза [119, 125]. Варто відмітити, що молекула NO – нестабільна (середня тривалість життя в організмі людини становить <5 с), тому основна маса NO, залученого у велике коло кровообігу, припадає на продукти його стабільних метаболітів (нітритів та нітратів), які утворюють депо вільного NO в організмі [159].

Адекватність визначення їх рівня для оцінки NO-продукованого синтезу ендотелієм підтверджені результатами досліджень на тваринах та людях. Доведено, що рівень похідних абсолютно точно відображає ступінь активності продукованого окису азоту з NOS [9]. Встановлено, що співвідношення NO_2^- / NO_3^- в плазмі крові становить 1:10, тоді як в культуральних середовищах їх рівень знижується до 1: 4 [268]. У здорових людей кількість NO_3^- коливається від 0 до 4,2 ммоль/л, а NO_2^- - $19,7 \pm 4,4$ ммоль/л, що свідчить про перевагу в концентрації нітратів над нітритами [180]. Солі нітритів і нітратів не депонуються в клітинах і добре розчинні у воді, тому коливання їх кількості в сечовій екскреції чітко відображають швидкість біосинтезу NO [249]. Не менш важливим є факт, з практичної точки зору, що метаболіти NO протягом року при температурі $-20^{\circ}C$ залишаються стабільними і визначати їх рівень можна в замороженому стані в сироватці крові [9]. Виходячи з цього, ми проводили визначення вмісту стабільного метаболіту NO_2^- у плазмі крові щурів (табл. 3.11).

Подані результати свідчать про те, що найвищі значення NO_2^- спостерігаються у групі портальногіпертензивних тварин. Зростання тиску у судинному руслі печінки портальногіпертензивних тварин, ймовірноше

всього, обумовлює підвищення тиску і на стінку синусоїдів, що може призвести до додаткової активації eNOS та збільшення синтезу метаболітів NO. В той час як високі концентрації монооксиду азоту в клітинах печінки та її судинному руслі, за механізмом зворотнього зв'язку пригнічують активність eNOS і синтез NO в синусоїдах печінки. При цьому ступінь

Таблиця 3.11.

Середні значення вмісту NO₂ в плазмі крові щурів (ммоль/мг білка; M±m, n=22)

№ проби	Інтактні (I)	NaI-модель (II)	NaI-модель +L-аргінін (III)
1	5,2±0,1	32,4±2,7##	13,2±1,6*
Внутрішньопортальне введення норадреналіну 5 мкг/кг			
2	4,7±1,1	16,8±4,0	5,7±1,0*
Внутрішньопортальне введення норадреналіну 5 мкг/кг			
3	5,3±0,3	39,2±2,7##	12,7±4,8*

Примітка: # - вірогідність змін відносно контрольної групи; * - вірогідність змін відносно групи з NaI-моделлю; ## - p<0,01; * - p<0,05

дисфункції ендотелію різко підвищується. Фізіологічна значимість цього процесу полягає у зменшенні популяції синусоїдів при цирозах печінки та їх переродженні у фіброзну тканину, а також у значному підвищенні об'ємного кровотоку та судинного стресу, який впливає на синусоїди. Крім того, при циротичному переродженні клітин печінки синтез ET-1 значно зростає, а монооксид азоту, в свою чергу, протидіє цьому констрикторному впливу. Іншим поясненням збільшення концентрації NO₂ в крові може слугувати і те, що патологічний стан залози та тривале (протягом 20 діб) введення амінокислоти призводять до надмірного синтезу NO індукованою

iNOS. Внаслідок чого збільшується активність пероксидантних ферментів та пригнічується активність антиоксидантних, порушуються процеси міграції та рециркуляції лімфоцитів, змінюється субпопуляційний склад цитокінів, що кінцевому рахунку призводить до кількісного та якісного дисбалансу в імунній системі та утворенні некротичних ділянок на тканині печінки щурів [249-252]. В той час, як екзогенне введення L-аргініну портальногіпертензивним тваринам призводить до поступового статистично достовірного зниження концентрації ендogenous NO. Що, можливо, зумовлено активацією ендотеліальної ізоформи NOS та обмеженим синтезом цього газу. В той час, як норадреналін пригнічував синтез NO та зменшував концентрацію його похідних в плазмі крові щурів. Така реакція на введення цього катехоламіна може бути пов'язана з синергічними властивостями останнього щодо монооксиду азоту [211]. Тим не менш, після 10 хвилинного інтервалу повторне введення норадреналіну призводило до відновлення рівня NO_2 . Це може бути обумовлене короткочасною активністю норадреналіну та локальним його введенням.

Отже, NaJ-модель портальної гіпертензії призводить до підвищення тиску у кровоносних судинах печінки та зумовлює перебудову функціонального стану її морфології. Було виявлено збільшення тиску у ворітній вені та зменшення тканинного кровотоку, а реакції на норадреналін були менші від щурів контрольної групи. В той час як 20-ти денне введення попередника синтезу монооксиду азоту L-аргініну, призводить до зниження тиску у ворітній вені та підвищення тканинного кровотоку в печінці посилюючи регенераційні процеси в залозі та зменшуючи концентрацію нітритів в плазмі крові щурів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

В 1886 р. E. Schulze і E. Steiger вперше синтезували амінокислоту L-аргінін, а в 1897 р. було встановлено її структуру. Відкриття ендотеліального фактору розслаблення судин – монооксиду азоту, який здатний легко проникати через клітинні мембрани, впливати на функціонування внутрішньоклітинних ферментів та іонних каналів стали відносити до особливого класу сигнальних молекул – газоподібних посередників, що і призвело до перевероту традиційних уявлень про медіатори [4, 264]. На сьогодні ця група продовжує розширюватись і крім монооксиду азоту включає в себе монооксид вуглецю та сірководень. Варто зазначити, що ці газові медіатори є токсичними речовинами, а їх здатність синтезуватись майже у всіх клітинах організму обумовлюється фізіологічною значимістю.

H_2S є біологічним медіатором, який залучений до фізіологічних і патологічних процесів в організмі [59, 131]. Цей газовий посередник здатний синтезуватись ендогенно і може виявляти свої ефекти на серцево-судинну та нервову системи, а також впливати на роботу шлунково-кишкового тракту [21, 22, 112, 139].

Як вже було зазначено у роботі, субстратом для ферментативного синтезу сірководню є сірковмісна амінокислота L-цистеїн, яка здатна надходити до організму разом з продуктами харчування, утворюватись під час розпаду білків або синтезуватись з L-метіоніну шляхом транссульфування [80]. Існують два головних шляхи катаболізму L-цистеїну. Одним з них є окиснення SH-групи діоксигеназою цистеїну з утворенням цистеїн-сульфінату, який потім може за допомогою декарбоксілювання перетворитись на гіпотаурин або на піруват і сульфід. Другий шлях полягає у видаленні атома сірки з цієї амінокислоти та без її окиснення утворює молекулу сірководню. Каталіз цих процесів здійснюється за допомогою піридоксаль-5'-фосфат-залежних ферментів –

цистатіонін- β -синтази та цистатіонін- γ -ліази [2, 145, 185]. Експериментально підтверджено, що порушення синтезу цих ензимів у печінці викликає розвиток фіброзу, стеатозу, гіпергомоцистенемії та зміни у регуляції генів, які відповідають за синтез ліпідів залозою [148, 194]. І хоча відомо, що CSE експресується гепатоцитами та зірчастими клітинами печінки [45], все ж відомостей щодо ролі сірководню у регуляції тканинного кровотоку в печінці та її кровонаповнення на сьогодні нема. За більшістю джерел літератури H_2S розглядають як фактор розширення судин, проте роботи останніх років показали, що цей газ може зумовлювати і судинне звуження [128]. Так, в умовах перфузії печінки донор сірководню Na_2S ($2\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) призводить до констрикції синусоїдів залози, однак механізм, який зумовлює цей вазоконстрикторний ефект, і досі є не вивченим [128]. Також слід відмітити, що у високих концентраціях цей газовий трансмітер зумовлює гіперемію та може викликати некроз гепатоцитів [176]. Тому, на нашу думку, є актуальним дослідження впливу L-цистеїну, як попередника синтезу H_2S , на кровообіг в печінці щурів.

Представлені у роботі результати показали, що внутрішньопортальне введення L-цистеїну (15 мг/кг та 30 мг/кг) зумовлювало розширення кровоносних судин печінки, внаслідок чого тиск крові в артеріальному та венозному руслах знижувався, а тканинний кровотік в органі та його кровонаповнення збільшувались. Ми припускаємо, що такий ефект розширення кровоносних судин печінки зумовлений саме сірководнем оскільки відомо, що вазодилаторний вплив на судини організму він опосередковує за рахунок активації K_{ATP} -каналів локалізованих на гладенько-м'язових клітинах [83, 84, 145]. Відкривання цих каналів призводить до виходу іонів калію з клітин в міжклітинний простір, інактивує потенціал-чутливі кальцієві канали L-типу, котрі забезпечують надходження іонів Ca^{2+} всередину клітини. Висока внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} призводить до скорочення ГМК, а

закриття цих каналів спричиняє зменшення їх кількості, викликаючи розслаблення гладеньком'язових клітин кровоносних судин [145].

Ми не виключаємо, що в наших дослідженнях, проведених в умовах *in vivo* внутрішньопортальне введення L-цистеїну може призвести до активації синтезу не лише сірководню, але і низки додаткових біологічно активних речовин, які, в свою чергу, можуть справляти досить потужний вплив на кровоносну систему печінки. Також слід відзначити, що L-цистеїн, потрапивши спочатку до внутрішньопечінкових судин виявляє там свої ефекти, а далі частково надходить і до системного кровотоку, справляючи опосередкований вплив на залозу. Крім того, L-цистеїн при застосуванні у відповідних дозах може виявляти дію як амінокислота, не підлягаючи метаболічним перетворенням із синтезом сірководню. З цього випливає, що введення L-цистеїну в гострому досліді може викликати складну системну відповідь організму.

Ми також вводили донор синтезу сірководню NaHS. Гідросульфід натрію, у розчині частково дисоціює з утворенням Na^+ і HS^- , з подальшим утворенням H_2S . Виявилось, що як і при введенні його попередника, кровоносні судини печінки реагували розширенням зумовлюючи збільшення тканинного кровотоку та депонуванням крові залозою. Отримані нами результати свідчать про те, що як попередник ендогенного синтезу сірководню L-цистеїн, так і його донор NaHS при внутрішньопортальному введенні викликають розширення кровоносних судин печінки, внаслідок чого тиск крові в них знижується, а тканинний кровотік в органі та його кровонаповнення збільшуються.

Аналіз літературних даних свідчать про те, що утворення H_2S в печінці відбувається внаслідок деградації L-цистеїну та за участю цистатіонін- γ -ліази (цистеїн + H_2O \rightarrow піруват + H_2S + NH_3) [107, 126, 203]. Оскільки мРНК CSE виявлено в ендотелії судин та зірчастих клітинах залози, не можна виключити, що судиннорозширювальна дія амінокислоти практично повністю реалізується за рахунок продукції сульфїду водню.

Однак, не виключається, як вже було зазначено, і безпосередній вплив L-цистеїну на тонус ГМК ворітних судин печінки, без перетворення на H_2S [43, 44, 260]. Тому ми вирішили дослідити дію цієї амінокислоти на печінкову гемодинаміку за умов дії селективного інгібітора цистатіонін- γ -ліази DL-пропаргілгліцину. Так, у відповідь на внутрішньопортальне введення DL-пропаргілгліцину спостерігалось підвищення артеріального та ворітного тисків крові, а також зменшення тканинного кровотоку в печінці та її кровонаповнення. Така реакція судин печінки свідчить про те, що DL-пропаргілгліцин заблокував дію ферменту CSE, завдяки чому пригнічувався ендогенний синтез сірководню з його попередників, що знаходяться в крові. Внаслідок цього внутрішньопечінкові судини звужились, що і призвело до підвищення в них тиску, зменшення тканинного кровотоку в печінці та об'єму депонованої в ній крові.

Введення DL-пропаргілгліцину усувало реакції на L-цистеїн в обох дозах і не гальмувало судинного розширення на NaHS. Така реакція може бути обумовлена тим, що синтез сірководню з L-цистеїну здійснюється за обов'язкової участі CSE і CBS, тоді як гідросульфід натрію частково дисоціює з утворенням Na^+ і HS^- та здатний вивільняти H_2S без залучення ферментів. Усунення у судинному руслі печінки реакцій на L-цистеїн за умов попереднього введення DL-пропаргілгліцину вказує на те, що ці вазодилаторні ефекти ініціюються сірководнем, який синтезується кровоносними судинами як із введеного ззовні екзогенного L-цистеїну, так і з попередників H_2S , що циркулюють у кровоносному руслі. Таким чином, сірководень відіграє важливу роль у регуляції як печінкового кровообігу, що показано нашими дослідженнями, так і в регуляції гемодинаміки інших судинних регіонів організму, про що свідчать результати ряду інших дослідників [84]. Порушення рівноваги синтезу цього газового трансмітера може викликати виникнення та розвиток патологічних процесів у серцево-судинній системі, зокрема такого важкого захворювання як портальна гіпертензія [101]. Завдяки своїм фізіологічним властивостям сірководень

може бути застосований для корекції зрушень функціонування кардіоваскулярної системи та її захисту від пошкоджень при різних захворюваннях.

Монооксид азоту, як уже зазначалось, є типовим і добре дослідженим EDRF. Його фізіологічну значимість пов'язують зі здатністю діяти як аутокринно, так і паракринно [252]. Здатність впливати на біохімічні та фізіологічні процеси в клітині, де був синтезований NO, та на сусідні клітини пояснюється його регуляторними механізмами. Так, монооксид азоту, як і сірководень, може впливати на роботу серцево-судинної, дихальної, нервової, ендокринної, імунної та гепатобіліанної систем [70, 153, 232]. З джерел літератури відомо, що NO є потужним судинорозширювальним фактором і введення попередника його синтезу L-аргініну посилює проходження перфузату через печінку, викликаючи дилатацію її судин [31]. Дію NO також пов'язують із посиленням антиоксидантних властивостей, запобіганням ішемічного ураження залози, підвищенням ферментативної активності печінки [104, 229, 244, 263]. Однак, всупереч цим відомостям, існують дані у яких показано, що NO не відіграє істотної ролі у депонуванні крові залозою [54]. А при дослідженні кровотоку в печінці, застосовуючи метод доплерографії було показано, що NO не справляє судинорозширювальної дії та не покращує загальний функціональний стан печінки при ішемії реперфузії [56]. Суперечливі дані існують і щодо дози у використанні попередника синтезу NO L-аргініну. Так, доведено, що у високих дозах (100-200 мг/кг) L-аргінін може викликати патологічні стани печінки та інших органів шлунково-кишкового тракту [11, 172]. На противагу цьому є відомості про те, що дози від 50 до 500 мг/кг сприяють зростанню печінкового кровообігу, посилюють надходження кисню до залози та виявляють лікувальні властивості [1, 64]. Такі неоднозначні результати, що існують на сьогодні і обумовлюють актуальність нашої роботи.

Тому для дослідження ролі NO у регуляції кровообігу в печінці ми використали попередник його синтезу L-аргінін у дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг. Внутрішньопортальне введення L-аргініну (2,5 мг/кг) призводить до зниження артеріального та ворітного тисків, а також викликає збільшення локального кровотоку в печінці та її кровонаповнення. Застосування вдвічі більшої дози L-аргініну (5 мг/ кг) зумовлює аналогічні реакції у судинах: САТ і Твв знижуються, а ЛК і КНП зростають.

Отже, попередник синтезу монооксиду азоту L-аргінін у дозах, близьких до його фізіологічної концентрації в крові, при внутрішньопортальному введенні викликає зниження системного артеріального тиску, тиску у ворітній вені та збільшення локального кровотоку в печінці і її кровонаповнення, що свідчить про судинорозширювальний ефект цієї амінокислоти в печінці, зокрема на судини мікроциркуляторного русла та ємнісні кровоносні судини.

Як відомо, монооксид азоту в організмі людини і тварин утворюється з L-аргініну, а його каталіз здійснюється за допомогою різних ізоформ NO-синтаз [31, 111]. Синтез NO є регульованим процесом і може гальмуватися різними аналогами L-аргініну, які є конкурентними інгібіторами NOS. L-NAME є неселективним блокатором усіх ізоформ NO-синтаз [10] і тому був використаний для перевірки залучення монооксиду азоту до реалізації досліджуваних ефектів амінокислоти. Так, у відповідь на внутрішньопортальне введення блокатора, спостерігалось підвищення системного артеріального тиску і тиску у ворітній вені, а також зменшення локального кровотоку в печінці та її кровонаповнення. Ці результати свідчать про те, що L-NAME заблокував активність NO-синтаз, завдяки чому відбулось пригнічення синтезу монооксиду азоту з ендогенних його попередників. Внаслідок цього, внутрішньопечінкові судини звужились, що і призвело до підвищення в них тиску та зменшення об'єму депонованої в печінці крові та її тканинного кровотоку.

Подальші наші дослідження полягали у з'ясуванні судинорухових ефектів L-аргініну в печінці на фоні дії блокатора NO-синтаз L-NAME. Виявилось, що введення L-аргініну в обох дозах на фоні дії L-NAME призводить не тільки до усунення судинорозширювальних ефектів амінокислоти в печінці, але й до протилежних змін досліджуваних показників. Так, при введенні амінокислоти в дозі 2,5 мг/кг та 5 мг/кг спостерігалось підвищення системного артеріального тиску та тиску у ворітній вені, а також зменшення локального кровотоку в печінці і його кровонаповнення. Така реакція печінкових судин свідчить про те, що L-NAME заблокував синтез NO не тільки з ендогенних його попередників але й з L-аргініну введеного внутрішньопортально під час гострого досліджу.

Отримані нами експериментальні дані в певній мірі узгоджуються з результатами досліджень інших авторів, які також вивчали участь NO у регуляції печінкової гемодинаміки [81, 157, 204]. Але вони досліджували зміни тонуусу магістральних печінкових судин, таких як печінкова артерія та ворітна вена, котрі є судинами опору. Іншими авторами було встановлено, що L-аргінін посилює проходження перфузату через печінку, викликаючи розширення її судин [31]. Ми поряд з тиском у ворітній вені, який характеризує опір портальних судин, реєстрували й реакції кровонаповнення печінки, що свідчать про депонуючу функцію печінки та реєстрували кровотік безпосередньо в паренхімі залози щурів. Під депонуючою функцією будь-якого органу, в тому числі й печінки, вважають здатність накопичувати їхніми ємнісними кровоносними судинами та зберігати в них великі об'єми крові, тоді як зворотною функцією є мобілізація крові – викид її із депо до системного кровоносного русла. До відносно недавнього часу не було остаточно з'ясовано, які саме судини печінки і в якій мірі беруть участь у депонуванні крові органом під впливом різних чинників. Більшість дослідників вважали, що до реалізації цієї функції залучені ворітні вени,

синусоїди та печінкові вени. Особлива увага зверталась на останні судини, які чинять малий опір току крові та в невеликій мірі фіксуються оточуючими тканинами, що полегшує їхнє пасивно-еластичне розширення і накопичення в них значних об'ємів крові. Деякі автори відводять істотну роль у реалізації депонуючої функції печінки синусоїдам [65, 130, 155]. Однак, на перший погляд, важко уявити, яким чином печінкові синусоїди змінюють свій просвіт, адже у їхніх стінках відсутні м'язові волокна. Вважається, що такі судинорухові реакції відбуваються завдяки скоротливій активності зірчастих клітин. Як відомо, крім ендотеліальних клітин до складу синусоїдної стінки входять зірчасті ретикулоендотеліоцити, клітини Купфера та ямочні клітини. До зірчастих ретикулоендотеліоцитів відносять клітини Іто, перицити та ліпоцити печінки [118]. Саме клітини Іто відіграють основну роль у регуляції діаметру синусоїдів. Вони розташовані навколо синусоїдів та містять у своєму складі скоротливий білок десмін та α -актин гладеньких м'язів. Тому вплив на ці клітини вазоактивних речовин призводить до їхнього скорочення або розслаблення. Завдяки особливостям свого розташування клітини Іто, скорочуючись, стискають синусоїди і навпаки, розслаблюючись, збільшують їх просвіт [65, 118, 120]. Крім того, просвіт синусоїдів регулюється також сфінктерами та клітинами Купфера. Але роль останніх, ймовірно, опосередкована. Роль пресинусоїдних сфінктерів можуть виконувати також ворітні венули, які здатні змінювати свій діаметр, тим самим регулюючи надходження крові у синусоїди. Результати проведених нами раніше досліджень [199, 200] свідчать про те, що реакції мобілізації крові із печінки у відповідь на ацетилхолін здійснюються за участю печінкових вен і, ймовірно, синусоїдів, але, без залучення внутрішньопечінкових ворітних вен. Тому у реакціях збільшення кровонаповнення печінки під впливом NO та H₂S, як ми вважаємо, беруть участь істинно ємнісні судини органа – печінкові вени та синусоїди.

Припускається, що судинорозширювальні ефекти сірководню значною мірою опосередковуються NO [46]. Так, монооксид азоту та пероксинітрит здатні взаємодіяти з сульфідом водню, утворюючи нітрозотіол, який регулює фізіологічну дію NO та H₂S. Важливо зазначити, що на відміну від інших нітрозотіолів (R-S-NO), котрі є джерелом NO та часто повторюють його дію, нітрозотіоли, які утворюються при взаємодії H₂S і NO є неактивними. У зв'язку з цим, було висунуто припущення, що сірководень здатний утилізувати надлишок NO, синтезованого в умовах запалення, зменшуючи його фізіологічну концентрацію в крові [107, 204]. Також авторами показано, що за рахунок дії протизапальних медіаторів синтез обох газотрансмітерів підвищується в умовах геморагічного шоку та за наявності бактеріальних ліпополісахаридів. Цікавим є також той факт, що в залежності від концентрації H₂S може посилювати або послаблювати розширювальну дію NO в аорті щурів. Тоді як монооксид азоту, в свою чергу, активуючи циклічний гуаозинмонофосфат може посилювати синтез H₂S цистатіонін-γ-ліазою в гладеньком'язових клітинах [98, 100]. При довготривалому інгібуванні NOS спостерігається зниження експресії та ферментативної активності CSE в серцево-судинній системі щурів. У свою чергу NaHS здатний дозозалежно пригнічувати утворення NO індучибельною формою NOS [188]. Механізм за яким здійснюється блокада експресії iNOS поки що невідомий, але припускається, що цей процес включає в себе утворення гемоксигенази та CO, або через інгібування перетворення аргініну – на цитрулін [90].

Отже, з огляду на вищевказане можна припустити, що ці газові трансмітери, ефекти яких тісно пов'язані між собою, здатні гальмувати синтез один одного або, у разі необхідності, діяти кооперативно [107, 201, 203]. І хоча механізм їх дії різний, все ж функції та властивості, якими вони володіють, мають подібний характер, що і дає підставу розглядати не кожен окрему молекулу, а досліджувати їх як сукупність молекул (включно з CO), що здатні проявляти свої ефекти сумісно регулюючи

клітинні процеси за фізіологічних умов та при патології [264]. Виходячи з описаних вище результатів сірководень та монооксид азоту відіграють важливу роль у контролі як печінкового кровообігу, що показано нашими дослідженнями, так і в регуляції гемодинаміки інших судинних регіонів організму, про що свідчать дані інших дослідників [28, 210, 134, 153, 217, 260]. Порушення рівноваги синтезу цих газових медіаторів може викликати виникнення та розвиток патологічних процесів у серцево-судинній системі, зокрема такого тяжкого захворювання, як портальна гіпертензія [152, 176, 234]. Тому, на нашу думку, завдяки своїм фізіологічним властивостям H_2S та NO можуть бути застосовані з метою корекції порушень функціонування судинної системи печінки при різних її захворюваннях, у тому числі й при портальній гіпертензії.

ПГ є одним із тяжких захворювань печінки, що супроводжується не тільки порушенням роботи залози, але і зумовлює зміни у метаболізмі місцево діючих речовин (NO , ендотеліну-1), котрі синтезуються клітинами синусоїдів печінки [3, 59, 144, 205]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідити участь сірководню та монооксиду азоту у регуляції печінкового кровообігу при портальній гіпертензії у щурів за умов введення L-цистеїну або L-аргініну.

Для цього відтворена модель портальної гіпертензії у щурів, яка за своїми проявами є близькою до ідіоматичної форми у людей [288]. Так, гістологічний аналіз печінки показав, що трьохразове з інтервалом в три дні внутрішньоректальне введення NaJ щурам призводить до вираженої дистрофії та некрозу невеликих ділянок залози. Просвіт венул та артеріол при цьому різко звужений, синусоїди розширені, особливо в місцях розташування центральних вен. Спостерігається інтенсивна проліферація клітин Купфера, а в синусоїдах з'являються капіляризовані колагенові волокна. Такі зміни морфоструктури печінки свідчать про те, що трьохразове з інтервалом в три дні в/р введення NaJ викликає переродження тканини залози.

Щоб перевірити здатність H_2S впливати на кровообіг в печінці у тварин з ПГ, ми використовували попередник його синтезу L-цистеїн (40 мг/кг), який вводили в/оч протягом 20 днів.

Виявилось, що у портальногіпертензивних тварин L-цистеїн знижує системний артеріальний тиск та тиск у ворітній вені, а також підвищує локальний кровотік в печінці, що наблизило значення показників до таких, як у щурів групи контролю.

В іншій групі тварин (контроль), яким в/р вводили воду та в/оч L-цистеїн (40 мг/кг), артеріальний тиск невірогідно зростав, ворітний тиск знизився, а тканинний кровотік в печінці збільшився. Отримані результати свідчать про те, що L-цистеїн чинить односпрямовану дію у вибірках портальногіпертензивних та нормотензивних тварин. При цьому спостерігалось розширення кровоносних судин в залозі, в результаті чого тканинний кровотік в ній зростав, а тиск крові в артеріальних і ворітних судинах знижувався.

Після тривалого протягом 20-ти діб в/оч застосування L-аргініну в контрольній групі спостерігались аналогічні реакції тим, що спостерігались при введенні L-цистеїну: зниження артеріального і ворітного тисків, а також збільшення тканинного кровотоку в печінці щурів, тоді як у портальногіпертензивних тварин відсоток реакцій показників гемодинаміки був значно вищим. Так, спостерігалось зниження САТ на 3%, Твв на 38% і підвищення ЛК на 44,5% відносно групи контролю. Тобто L-аргінін викликає у ПГ-тварин суттєве зниження опору внутрішньопечінкових судин завдяки їх розширенню, що призводить до нормалізації тиску крові у ворітних судинах та тканинного кровотоку в печінці.

Отже, отримані результати свідчать про те, що введення цих амінокислот сприяє зменшенню тиску у системному артеріальному та венозному руслах, а також призводить до збільшення швидкості тканинного кровотоку в залозі щурів як контрольної, так і

портальногіпертензивної груп. Більш інтенсивне розширення кровоносних судин печінки на введення L-цистеїну і L-аргініну у ПГ-тварин порівняно з контрольними можна пояснити значно вищим вихідним рівнем тону судин у щурів з ПГ.

Досліджуючи реактивність судин ворітної системи на внутрішньопортальне введення норадреналіну ми виявили, що у тварин з ПГ тиск у портальній вені зростає менш суттєво ніж у контрольних щурів. Це свідчить про зниження чутливості адренорецепторів ворітних судин та зменшення резервних можливостей їх до звуження при ПГ. Після 20-ти добового введення L-цистеїну або L-аргініну, коли тиск у ворітній вені ПГ-тварин майже нормалізувався, реакції ворітних судин на НА також досягли таких параметрів як у контрольних тварин.

Після 20-ти денного застосування L-цистеїну або L-аргініну був проведений гістологічний аналіз печінки щурів з ПГ. Виявилось, що при цьому відбувається покращення морфоструктури печінки та прискорення регенераційних процесів в ній. Спостерігалось більш чітке розташування гепатоцитів з рівномірним їх зафарбовуванням, зменшились дистрофічні перебудови цитоплазми та більшість ядер добре сприймають зафарбовування гематоксиліном. Проте, розширення центральної вени зберігалось, стінка її була потовщеною та повнокровоною, міжтрабекулярний набряк повністю не утилізувався. Таке, не остаточне відновлення її тканини може бути обумовлене відносно не тривалим курсом введення монооксиду азоту та сірководню.

У подальшому ми вирішили перевірити, чи існує залежність синтезу монооксиду азоту у портальногіпертензивних щурів за умов 20-ти денного введення L-цистеїну або L-аргініну. Оцінку вмісту в крові NO робили виходячи з того, що молекула NO нестабільна (середній період існування в організмі людини становить <5 с), тому основна маса NO, залученого у велике коло кровообігу, припадає на продукти його стабільних метаболітів (нітритів та нітратів), які утворюють депо вільного NO в організмі [159].

Тому, ми проводили визначення вмісту стабільного метаболіту NO_2 у плазмі крові щурів з ПГ, ПГ+ L-цистеїн та ПГ+ L-аргінін. Його кількість в крові розглядали як маркер продукції NO. Виявилось, що при NaJ-моделі ПГ відбувається збільшення рівня NO_2 у плазмі крові (32,4 Ммоль/мг білка), тоді як у контрольній групі рівень NO_2 становив 5,2 Ммоль/мг білка. Таке суттєве підвищення NO_2 , ймовірно, може бути зумовлено, адаптивною реакцією судин спрямованою на подолання змін портального кровотоку [154]. Варто зазначити, що синусоїди печінки завдяки великій кількості та здатності чинити малий опір току крові вміщують в собі значні об'єми крові. Тому, вплив на ці судини вазоактивних речовин призводить до їхнього звуження або розширення. А підвищення тиску у кровоносному руслі печінки, ймовірніше всього, зумовлює зростання тиску і на стінку синусоїдів, що може призвести до додаткової активації eNOS та збільшення синтезу метаболітів NO. Судиннорозширювальні властивості монооксиду азоту допомагають зберегти внутрішньопечінкову мікроциркуляцію на рівні, який необхідний для повноцінного функціонування гепатоцитів. Зменшення ж рівня NO та NO_2 в стінках кровоносних судин призводить до порушення регуляції тонуусу останніх [152]. Тому, додаткова активація eNOS, сприяючи збільшенню утворення монооксиду азоту, намагається подолати внутрішньопечінковий опір та справити розширювальний ефект на внутрішньопечінкові судини, а разом з тим і нормалізувати мікроциркуляцію в її кровоносному руслі. Крім того, не варто виключати і те, що при розвитку портальної гіпертензії пошкодження виникають і на рівні клітин. Як відомо, різні стресові стани, в тому числі і травмування клітин, можуть впливати на кальцій-залежні каналні структури, викликаючи експресію NO індукцйбельною NOS [228, 264]. Однак, відомо, що високі концентрації монооксиду азоту в клітинах печінки та її судинному руслі, за механізмом зворотнього зв'язку здатні пригнічувати активність eNOS і синтез NO в синусоїдах печінки. При цьому ступінь дисфункції ендотелію різко підвищується. Фізіологічна

значимість цього процесу полягає у зменшенні популяції синусоїдів при цирозі печінки та їх переродженні у фіброзну тканину, а також у значному підвищенні об'ємного кровотоку, який впливає на синусоїди. Крім того, при циротичному переродженні клітин печінки синтез ET-1 значно зростає, а монооксид азоту, в свою чергу, протидіє цьому констрикторному впливу. Як вже було зазначено, сірководень в організмі виконує досить багато різних функцій. Тому не можна виключати, що каскад реакцій, через які H_2S реалізує свої ефекти в клітинах, не впливатиме на загальний функціональний стан васкулярної системи. Відомо, що сірководень здатний відігравати роль потужного антиоксиданта поряд з N-ацетилцистеїном, глутатіоном і супероксид дисмутазою [189]. Оскільки підвищення рівня глутатіону в клітині може відбуватись шляхом активації глутаматцистеїнлігази, то H_2S слугує і цитопротектором [82]. Крім того сірководень інгібує адгезію лейкоцитів до ендотелію судин та посилює їх міграцію до ділянок запалення [99]. А пригнічення синтезу цього трансмітера супроводжується втратою цілісності ендотелію та розвитком запальних процесів в органах [25, 211]. Тоді як високі, мілімолярні, концентрації H_2S призводять до накопичення кальцію, зменшення глутатіону і заліза, а також загибелі мітохондрій. Однак, не варто забувати, що поряд з позитивними ефектами сірководню він є токсичним газом і може викликати порушення на рівні цілого організму. Тому, щоб використовувати H_2S з лікувальною метою необхідно детально вивчити механізм дії та можливі наслідки при застосуванні різних його концентрацій.

У подальших наших дослідженнях ми виявили, що 20-денне введення L-цистеїну портальногіпертензивним тваринам не призводило до зниження рівня NO_2 в плазмі, а навіть вірогідно його підвищувало. Виходячи з отриманих результатів стає зрозуміло, що L-цистеїн впливає на активність NOS, а його дія супроводжується не лише місцевими ефектами в умовах внутрішньопортального введення. Тоді як L-аргінін у тварин

портальногіпертензивної групи спричиняв зниження кількості NO_2 поряд з пригніченням екзогенного синтезу монооксиду азоту eNOS та iNOS.

Отже, при NaJ-моделі портальної гіпертензії спостерігається підвищення тиску в кровоносних судинах печінки та відбувається перебудова її морфологічної структури. Введення норадреналіну контрольній та портальногіпертензивній групам щурів призводить до зростання тиску у ворітній вені, однак відсоток реакції останніх нижчий від групи контролю, що свідчить про зниження чутливості адренорецепторів ворітних судин та зменшення резервних можливостей їх до звуження при ПГ. 20-добове введення L-цистеїну або L-аргініну призводить до нормалізації тиску у ворітній вені та наближує значення $T_{\text{вв}}$ до такого як у тварин контрольної групи.

Після 20-добового введення попередника синтезу сірководню L-цистеїну ПГ-щурам спостерігається зниження тиску у ворітній вені та підвищення локального кровотоку в печінці, що свідчить про судиннорозширювальні властивості амінокислоти. L-цистеїн здатний впливати на активність NOS оскільки сприяє підвищенню рівня NO_2 в плазмі крові щурів, а також здатний покращувати морфоструктуру печінки та прискорювати регенераційні процеси в ній.

Двадцятиденне введення L-аргініну портальногіпертензивним тваринам призводить до розширення судин печінки, зменшення концентрації нітритів в плазмі крові щурів та посилення регенераційних процесів в залозі.

Отримані у дисертаційній роботі результати свідчать про те, що сірководень та монооксид азоту здатні не тільки регулювати кровообіг в печінці щурів як в нормі, так і за умов портальної гіпертензії, але й відновлювати морфологічну структуру залози при ПГ та регулювати рівень NO_2 в плазмі крові.

ВИСНОВКИ

1. Сірководень бере активну участь у регуляції кровообігу в печінці, свідченням чому є розширення внутрішньопечінкових судин, зумовлене внутрішньопортальним введенням попередника його синтезу L-цистеїну або його донора NaHS.

2. Блокада цистатіонін- γ -ліази за допомогою DL-пропаргілгліцину зумовлює пригнічення синтезу H_2S як з ендогенних його попередників, так і з екзогенного L-цистеїну, викликаючи звуження кровоносних судин печінки, внаслідок чого тиск крові в них зростає, а тканинний кровотік і об'єм депонованої в органі крові зменшуються.

3. Монооксид азоту бере дієву участь у регуляції депонування крові печінкою та мікроциркуляції в ній крові, про що свідчить збільшення кровонаповнення залози та інтенсивності тканинного кровотоку в ній при введенні попередника синтезу NO L-аргініну.

4. Блокада NO-синтаз за допомогою L-NAME повністю усуває ефекти L-аргініну, в результаті чого відбувається звуження внутрішньопечінкових судин і, як наслідок, зменшення тканинного кровотоку в органі та його кровонаповнення.

5. Тривале (впродовж 20 діб) внутрішньоочеревинне введення щурам з натрій-йодною моделлю портальної гіпертензії L-цистеїну або L-аргініну призводить до нормалізації тиску в судинах печінки і тканинного кровотоку в ній та відновлення реактивності її кровоносних судин. При цьому спостерігається часткова регенерація тканини залози.

6. В умовах портальної гіпертензії в плазмі крові ворітної вени зростає концентрація NO_2 . Двадцятиденне введення L-аргініну призводить до зниження концентрації NO_2 , тоді як L-цистеїн підвищує вміст метаболіту монооксиду азоту в крові ворітної вени.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Abu-Amara M. The nitric oxide pathway-evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury / M. Abu-Amara, S. Y. Yang, A. Seifalian, B. Davidson, B. Fuller // *Liver Int.* – 2012. – Vol. 32, № 4. – P. 531-543.
2. Adrienne L. Cytoprotective actions of hydrogen sulfide in ischaemia-reperfusion injury / L. Adrienne, A. L. King, D. J. Lefer // *Exp Physiol.* – 2011. – Vol. 96, № 9. – P.840-846.
3. Albrades J. G. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and longterm prognosis of cirrhosis / Albrades J. G., Tarantino I., Turnes J. [et al.] // *Hepatology.* – 2003. – Vol. 37, № 4. – P. 902-908.
4. Ali M. Y. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide / M. Y. Ali, C. Y. Ping, Y. Y. Mok, L. Ling [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2006. – Vol. 149, № 6. – P. 625-634.
5. Aukland K. Hydrogen polarography for measurment of blood flow / K. Aukland // *Circulat Res.* – 1967. – №2. – P. 125-130.
6. Aukland K. Hydrogen polarography in measurment of lokal blood flow: theoretical and empirical basis / K. Aukland // *Acta Neurol Scand.* – 1965. – Vol. 14. – P. 42-45.
7. Aukland K. Measurment for local blood flow measured by hydrogen gas / K. Aukland, B. Bower, B. Berliner // *Circulat Res.* – 1964. – Vol. 15. – P. 164-187.
8. Auklend K. Local miokardial blood flow measured by hydrogen polarography: distibution and cilects of hypoxia / K. Auklend, F. Kiil [et al.] // *Acta Physiol Scand.* – 1967. – № 1. – P. 99-111.

9. Bachetti T. ACE-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats / T. Bachetti, L. Comini, E. Pasini [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2001. – Vol. 33, № 3. – P.395-403.
10. Bai Y. Increase in fasting vascular endothelial function after short termoral L-arginine is effective when baseline flow-mediated dilation is low: a meta-analysis of randomized controlled trials / Y. Bai, L. Sun, T. Yang [et al.] // *Am J Clin Nutr.* – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 77-84.
11. Belkina L. M. Effect of NO-synthesis blockade on the free-radical processes in rats of different genetic strains with acute alloxan diabetes / L. M. Belkina, O. L. Terekhina, T. A. Antipova. [et al.] // *Russ Fiziol Zh Im I. M. Sechenova.* – 2013. – Vol. 99, № 11. – P.1273 -1284.
12. Beltowski J. Hydrogen sulfide as a biologically active mediatorin the cardiovascular system / J. Beltowski // *Postepy Hig Med Dosw.* – 2004. – Vol. 58, № 19. – P. 285-291.
13. Bhatia M. Hydrogen sulfide as a vasodilator / M. Bhatia // *IUBMB Life.* – 2005. – Vol. 57, № 9. – P. 603-606.
14. Boger G. I. Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: effect of combination with oral L-arginine / G. I. Boger, T. K. Rudolph, R. Maas [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2007. – Vol. 49, № 23. – P. 2274-2282.
15. Bryan N. S. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development / N. S. Bryan, K. Bian, F. Murad // *Frontiers in Bioscience.* – 2009. – Vol. 14, № 1. – P.1-18.
16. Burroughs A. K. Pharmacological treatment of acute variceal bleeding / A. K. Burroughs // *Digestion.* – 1998. – Vol. 59. – P. 2-5.
17. Cao K. Molecular basis of ATP-sensitive K^+ channels in rat vascular smooth muscles / K. Cao, G. H. Tang, D. H. Hu, R. Wang // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – Vol. 296, № 2. – P. 463-469.

18. Carsten A. W. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator / A. W. Carsten // *J Nephrol.* – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 173-176.
19. Castele M. Low NO bioavailability in CCl₄ cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: A comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls / M. Castele, J. F. Pelt, F. Nevens [et al.] // *Comp Hepatol.* – 2003. – Vol. 2, № 1. – P. 1-8.
20. Cheanga W. S. 4-Aminopyridine-sensitive K⁺channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery/ W. S. Cheanga, W. T. Wonga, B. Shen [et al.] // *Vascular Pharmacology.* – 2010. – Vol. 53, № 3. – P. 94-98.
21. Chen A. F. Free radical biology of the cardiovascular system / A. F.Chen, D. D.Chen, A. Daiber [et al.] // *Clin Sci (Lond).* – 2012. – Vol. 123, № 2. – P.73-91.
22. Chen X. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine / X.Chen, K. H. Jhee, W. D. Kruger // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 50. – P. 52082-52086.
23. Costa D. L-arginine attenuates acute pulmonary embolisminduced increases in lung matrix metalloproteinase / D. Costa, T. Zerbini, A. Palei, R. Gerlach // *Chest.* – 2005. –Vol. 128, № 5. – P. 3705-3710.
24. Csaba S. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential / S.Csaba // *Nature Rev Drug Discov.* – 2007. – Vol.6, № 11. – P. 917-935.
25. Cunha T. M. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hyper nociception / T. M. Cunha, D. Dal-Secco, W. A. Verri [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2008. – Vol. 590, №1. – P. 127-135.
26. Dandel M. Advances in the medical treatment of pulmonary hypertension / M. Dandel, H. Lehmkuhl, R. Hetzer // *Kidney Blood Press Res.* – 2005. – Vol. 28, №3. – 29 p.

27. Davis K. L. Novel effects of nitric oxide / K. L. Davis, E. Martin, I. V. Turko, F. Murad // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2001. – Vol. 41. – P. 203-236.
28. Dawe G. S. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats / G. S. Dawe, S. P. Han, J. S. Bian, P. K. Moore // *Neuroscience.* – 2008. – Vol. 152, № 1. – P. 169-177.
29. Deka D. K. L-arginine-induced dilatation of goat coronary artery involves activation of K(ATP) channels / D. K. Deka, S. K. Mishra, V. K. Raviprakash // *Eur J Pharmacol.* – 2009. – Vol. 609, №3. – P.113-117.
30. Denninger M. H. Liver diseases and hemostasis / M. H. Denninger // *Pathol Biol (Paris).* – 2004. – Vol. 47, № 9. – P. 1006-1015.
31. Diesen D. L. Nitric oxide and redox regulation in the liver: part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention / D. L. Diesen // *J Surg Res.* – 2011. – Vol. 167, № 1. – P. 96-112.
32. Diresta B. Hybrid blood flow probe for simultaneous H₂ clearance and laser-Doppler velocimetry / B. Diresta, J. Kiel, G. Riedel, P. Kaplan, A. Sheperd // *Amer J Physiol.* – 1987. – Vol. 253, № 1. – P. 573-581.
33. Distrutti E. The methionine connection: homocysteine and hydrogen sulfide exert opposite effects on hepatic microcirculation in rats / Distrutti E., Mencarelli A, Santucci L. [et al.] // *Hepatology.* – 2008. – Vol. 47, № 2. – P. 659-667.
34. Domenicali M. Effect of cannabinoid CBI receptor antagonism on ascitic decompen sation of rats with preascitic cirrhosis / M. Domenicali, P. Caraceni, A. M. Pertosa [et al.] // *J Hepatol.* – 2008. – Vol. 48, № 3. – 88 p.
35. Dranoff J. A. Portal fibroblasts: underappreciated mediators of biliary fibrosis / J. A. Dranoff, R. G. Wells // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 51, № 4. – P. 1438-1444.
36. Drapeau P. Effects of lowering extracelllnlar and cytosolic pH on calcium fluxes, cytosolic calcium levels and transmitter release in presynaptic nerve

- terminals soloted from rat brain / P. Drapeau, D. A. Nuchshed // *J Gen Physional.* – 2000. – Vol. 91, № 2. – P. 305-315.
37. Dudzinski D. M. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase / D. M. Dudzinski, J. Igarashi, D. Greif [et al.] // *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* – 2006. – Vol. 46. – P. 232-276.
38. Duong H. T. The use of nanoparticles to deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension / H. T. Duong, Z. Dong, L. Su // *Small.* – 2015. – Vol. 11, № 19. – P. 2291-304.
39. Ekelund U. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of tonus in large-bore arterial resistance vessels, arterioles and veins in cat skeletal muscle / U. Ekelund, S. Mellander // *Acta Physiol Scand.* – 1999. – Vol. 140, № 3. – P. 301-309.
40. Erkkila K. N-acetyl-L-cysteine apoptosis in human male germ cell in vitro / K. Erkkila, V. Hirvonen, E. Wuokko // *J Clin Endocr Metab.* – 1998. – Vol. 83, № 7. – P. 2523-2531.
41. Eto K. A novel enhancing mechanism for hydrogen sulfide-producing activity of cystathionine β -synthase / K. Eto, M. Ogasawara, K. Umemura [et al.] // *J Neurosci.* – 2002. – Vol. 22, № 9. – P. 3386-3391.
42. Eto K. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease / K. Eto, T. Asada, K. Arima [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 239, № 5. – P. 1485-1488.
43. Fiorucci S. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs / S. Fiorucci, E. Antonelli, E. Distrutti [et al.] // *Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 129, № 4. – P. 1210-1224.
44. Fiorucci S. NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver / S. Fiorucci, E. Antonelli, V. Brancaleone [et al.] // *J Hepatol.* – 2003. – Vol. 39, № 6. – P. 932-939.

45. Fiorucci S. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver / S. Fiorucci, E. Distrutti, G. Cirino // *J Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 131, № 4. – P. 259-271.
46. Fiorucci S. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis / S. Fiorucci, E. Antonelli, A. Mencarelli [et al.] // *J Hepatol.* – 2005. – Vol. 42, № 3. – P. 539-548.
47. Friedman M. I. Hepatic Nerve Function / M. I. Friedman, I. M. Arias, W. B. Jakoby [et al.] // *The liver: Biology and Pathology.* – 1998. – P. 949-959.
48. Fujii K. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver / K. Fujii, T. Sakuragawa, Kashiba M. [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2005. – Vol. 7. – P.788-794.
49. Fujita A. Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers / A. Fujita, Y. Kurachi // *Pharmacol Ther.* – 2000. – Vol. 85, № 1. – P.39-53.
50. Furne J. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa / J. Furne, J. Springfield, T. Koenig [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2001. – Vol. 62, № 2. – P. 255-259.
51. Garcia-Tevijano E. R. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis / E. R. Garcia-Tevijano, C. Berasain, J. A. Rodriguez [et al.] // *Hypertension.* – 2001. – Vol. 38, № 5. – P. 1217-1221.
52. Gardemann A. Nervous control of liver metabolism and hemodynamics / A. Gardemann, G. P. Püschel, K. Jungermann // *Eur J Biochem.* – 1992. – Vol. 207, № 2. – P. 399-411.
53. Gong J. Protective effects of L-arginine against ischemia-reperfusion injury in non-heart beating rat liver graft / J. Gong, X.-J. Lao, S.-J. Zhang, S. Chen // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* – 2008. – Vol 7, No 5. – P.481-484.

54. Grund F. L. Importance of nitric oxide in hepatic arterial blood flow and total hepatic blood volume regulation in pigs / F. L. Grund, H. T. Sommerschild, A. Winecoff [et al] // *Acta Physiol Scand.* – 1997. – Vol. 161, № 3. – P. 303-309.
55. Guettler C. Hydrogen sulfide, another simple gas with complex biology / C Guettler , P. Kubes // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2013. – Vol. 204, № 12. – P.1066-1069.
56. Gustafsson B. I. Nitric oxide-mediated effects on liver blood flow / B. I. Gustafsson, M. Wallin, D.S. Delbro, S. Friman // *Transplantation Proceedings.* – 2005. – Vol. 37. – P. 3338-3339.
57. Han Y. Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats / Y. Han, J. Qin, X.Chang, Z. Yang [et al.] // *Neurosci Res.* – 2005. – Vol. 53, № 2. – P. 216-219.
58. Hansen A. M. Glutamate joins the ranks of immunomodulators / A. M. Hansen, R. R. Caspi // *Nat. Med.* – 2010. – Vol. 16, № 8. – P. 856-858.
59. Hernandez G. M. Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension / G. M. Hernandez, J. C. Garcia Pagan, J. Turnes // *Hepatology.* – 2006. – Vol. 43, № 3. – P. 485-491.
60. Hismiogullari A. A. Biliary lipid secretio turk / A. A. Hismiogullari, A. M. Bozdayi, K. Rahman // *Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 18, №2. – P. 65-70.
61. Hosoki R. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide / R. Hosoki, N. Matsuki, H. Kimura // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. – Vol. 237, № 3. – P. 527-531.
62. Hynynen M. The vascular endothelin system in hypertension – recent patents and discoveries / M. Hynynen, R. Khalil // *Recent Pat Cardiovas Drug Discov.* – 2006. – Vol. 1, № 1. – P. 95-108.

63. Ignarro L. J. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical / L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga, K. S. Wood // *Circulation research*. – 1987.- Vol. – 1987. – P.866-879.
64. Ijaz S. The effect of consecutively larger doses of L-arginine on hepatic microcirculation and tissue oxygenation in hepatic steatosis // S. Ijaz, M. C. Winslet, A. M. Seifalian/ *Microvasc Res*. – 2009 – Vol.78, №2. – P. 206-211.
65. Ishikawa Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids / Ishikawa, Sperelakis, R. S. McCuskey // *Liver*. – 2000. – Vol. 20, № 1. – P. 13-17.
66. Iwakiri Y. Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension / Yasuko Iwakiri // *Liver International*. – 2012. – Vol. 1478, № 2. – P.199-213.
67. Iwakiri Y. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis / Iwakiri Y., Groszmann R. J. // *J Hepatol*. – 2007. – Vol. 46, № 5. – P. 927-934.
68. Jain S. K. Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? / S. K. Jain, R. Bull, J. L. Rains, P.F. Bass // *Antioxid Redox Signal*. – 2010. – Vol. 12, № 11. – P.1333-1337.
69. Jang G. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells / G. Jang, L. Wu, W. Liang, R.Wang // *Mol. Pharmacol*. – 2005. – Vol. 68, № 6. – P. 1757-1764.
70. Jansson E. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis / E. Jansson, L. Huang, R. Malkey [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2008. – Vol. 4, № 7. – P. 411-417.
71. Jha S. Hydrogensulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling / S. Jha, J. W. Calvert, M. R.

- Duranski, A. Ramachandran, D. J. Lefer // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 295, № 2. – P. 801-806.
72. Jungermann K. Regulation of liver metabolism and hemodynamic by the hepatic nerves / K. Jungermann // *XX-th International Congress of Neurovegetative research.* – Tokyo (Japan). – 1990. – 27 p.
73. Kajimura M. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology / M. Kajimura, R. Fukuda, R. M. Bateman [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – Vol. 13, № 2. – P. 157-192.
74. Kane G. C. Cardiac K_{ATP} channels in health and disease / G.C. Kane, X.K. Liu, S. Yamada, T. M. Olson, A Terzic // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2005. – Vol. 38, № 6. – P.937-943.
75. Kang K. Role of hydrogen sulfide in hepatic ischemia-reperfusion-induced injury in rats / K. Kang, M. Zhao, H. Jiang, G. Tan, S. Pan, X. Sun // *Liver Transplant.* – 2009. – Vol. 15, № 10. – P. 1306-1314.
76. Karlsson H. Ringde N-acetyl-L-cysteine increases acute graft-versus-host disease and promotes T-cell-mediated immunity in vitro / Helen Karlsson, Silvia Nava, Mats Remberger [et.al.] // *Eur J Immunol.* – 2011. – Vol. 41, № 4. – P. 1143-1153.
77. Kim M. Y. Pathophysiology of portal hypertension, what's new? / M. Y. Kim, S. K. Baik, J. Korean // *Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 56, № 3. – P.129-134.
78. Kim Y. M. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms / Y. M. Kim, R. V. Talanian, T. R. Billiar // *J Biol Chem.* –1997. – Vol. 272, № 49.– P. 31138-31148.
79. Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator / H. Kimura // *Mol Neurobiol.* – 2002. – 26, № 1. – P. 13-19.
80. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production and functions / H. Kimura // *Exp Physiol.* – 2011. – Vol. 96, № 9. – P.833-835.

81. Kimura S. L-arginine-induced current in portal venous smooth muscle cells / S. Kimura, A. Ohashi, N. Tohse, K. Kitamura // *J Smooth Muscle Res.* – 2007. – Vol. 43, №3. – P. 109-116.
82. Kimura Y. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress / Y. Kimura, H Kimura // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18, № 10. – P. 1165-1167.
83. King A. L. Cytoprotective actions of hydrogen sulfide in ischaemia–reperfusion injury / A. L. King, D. J. Lefer // *Exp Physiol.* – 2011. – Vol. 96, № 9 – P. 840-846.
84. King S.B. Potential biological chemistry of hydroge sulfide (H₂S) with the nitrogen oxides / S.B. King // *Free Radic Biol Med.* – 2013. – Vol. 55. – P. 1-7.
85. Kirichuk V. F. Nitric oxide and microcirculatory hemostasis / V. F. Kirichuk, E. A. Andronov, A. N. Ivanov, N. V. Mammoth // *Fiziol Success Sciences.* – 2008 – Vol. 32, № 4. – P.83-91.
86. Klentz R. D. Hydrogen sulfide: effects on avian respiratory control and intrapulmonary CO₂ receptors / R. D. Klentz, M. R. Fedde // *Respir Physiol.* – 1978. – Vol. 32, № 3. – P. 355-367.
87. Konno R. Nephrotoxicity of D-proparglyglycine in mice / R. Konno, M. Ikeda, K. Yamaguchi, Y. Ueda, A. Niwa // *Arch Toxicol.* – 2000. – Vol. 74, № 8 – P. 473-479.
88. Koshu K. Measurements of regional blood flow using hydrogen gas generetid by electrolysis / Koshu K., Kamiyama K., Oka N., Endo S., Takaku A., Baito T. // *Stroke.* – 1982. – Vol. 13, № 4. – P. 483-487.
89. Koti R. S. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications / R. S. Koti, A. M. Seifalian, B. R. Davidson // *Dig Surg.* – 2003. – Vol. 20, № 5. – P. 383-396.
90. Kubo S. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: Contribution to dual modulation of vascular tension / S. Kubo, I. Doe, Y. Kurokawa, H. Nishikawa, A. Kawabata // *Toxicology.* – 2007. – Vol. 232, № 1. – P. 138-146.

91. Lee F. Administration of N omega-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal-hypertensive rats / F. Lee, L. Colombato, R. Groszmann // *Gastroenterology*. – 1993. – Vol.105, № 5. – P.1464-1470.
92. Lee F. N-omega-nitro-L-arginine administration corrects peripheral vasodilation and systemic capillary hypotension and ameliorates plasma volume expansion and sodium retention in portal hypertensive rats / F. Lee, L. Colombato, R. Groszmann // *Hepatology*. – 1993. – P.84-90.
93. Lee S. W. Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells / S. W. Lee, Y. Cheng, P. K. Moore, J. S. Bian // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2007. – Vol. 358, № 4. – P. 1142-1147.
94. Leffler C. W. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation / C. W. Leffler, H. Parfenova, J. H. Jaggar // *J Appl Physiol*. – 2006. – Vol. 100, № 3 – P. 1065-1076.
95. Lekakis J. P. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension / J. P. Lekakis, S. Papathanassiou, T. G. Papaioannou [et al.] // *Int J Cardiol*. – 2002. – Vol. 86, № 2-3. – P. 317-323.
96. Leschelle X. Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide / X. Leschelle, M. Gubern, M. Andriamihaja. [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2005. – Vol. 1725, № 2. – P. 201-212.
97. Levitt M. D. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue / M. D. Levitt, M. S. Abdel-Rehim, J. Furne // *Antioxid Redox Signal*. – 2011. – Vol. 15, №2. – P. 373-378.
98. Li L. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules / L. Li, P. K. Moore // *Biochem Soc Trans*. – 2007. – Vol. 35, № 3. – P. 138-141.
99. Li L. Hydrogen sulphide – a novel mediator of inflammation? / L. Li, M. Bhatia, P. K. Moore // *Curr Opin Pharmacol*. – 2006. – Vol. 6, № 2. – P. 125-129.

100. Li. L. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation—a tale of three gases/ L. Li, A. Hsu, P. K. Moore // *Pharmacol Ther.* – 2009. – Vol. 123, № 2. – P. 386-400.
101. Licks F. Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats / C. Marques, C. Zetler, M. I. Martins et al. // *Ann Hepatol.* – 2014. – Vol. 13, № 3 – P. 370-377.
102. Lim J. J. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells / Lim J. J., Liu Y. H., E. S. Win, J. Khin // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2008. – Vol. 295, № 5. – P. 1261-1270.
103. Liu H. Effect of endogenous hydrogen sulfide on apoptosis of cirrhosis rat liver cells / H. Liu, Y. Zheng, W. Chen [et al.] // *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi.* – 2012. – Vol. 20. – P. 670-674.
104. Liu H. Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury / H Liu, J. Li, F. Zhao, H. Wang, Y. Qu, D. Mu // *Rev Neurosci.* – 2015. – Vol. 26, № 1. – P. 105-117.
105. Liu Y. H. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the vascular system / Y. H. Liu, C. D. Yan, J. S. Bian // *J Cardiovasc Pharmacol* – 2011. – Vol. 58, № 6. – P. 560-569.
106. Lloyd D. Hydrogen sulfide: clandestine microbial messenger? / D. Lloyd // *Trends Microbiol.* – 2006. – Vol. 14, № 10. – P. 456-462.
107. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. / E.Lowicka, J. Beltowski // *Pharmacol Rep.* – 2007. – Vol. 59, № 1. – P.4-24.
108. Lubos E. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis / E. Lubos, D. E. Handy, J. Loscalzo // *Front Biosci.* – 2009. – Vol. 13, № 1. – P. 5323-5344.

109. Luhachack L. Bacterial gasotransmitters: an innate defense against antibiotics / L. Luhachack, E. Nudler // *Curr Opin Microbiol.* – 2014. – Vol. 28, № 21. – P. 13-17.
110. Lundberg J. O. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics / J. O. Lundberg, M. T. Gladwin, A. Ahluwalia // *Nat Chem Biol.* – 2009. – Vol. 5, № 12. – P. 865-869.
111. Lundberg J. O. The biological role of nitrate and nitrite: the times they are a-changin / J.O. Lundberg, E. Weitzberg // *Nitric Oxide.* – 2010. – Vol. 22, № 2 – P. 61-63.
112. Magableh M. R. Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta / M. R. Magableh, J. L. Hart // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 383, № 4. – P. 403-413.
113. Magierowski M. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal Integrity, Protection and Ulcer Healing / M. Magierowski, K. Magierowska, S. Kwiecien, T. Brzozowski // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20, № 5. – P. 9099-9123.
114. Malarkey D. New insights into functional aspects of liver morphology / D. Malarkey, K. Johnson, L. Ryan [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2005. – Vol. 59, № 1. – P. 27-34.
115. Mani S. Hydrogen sulfide and the liver / S. Mani, W. Cao, L. Wu, R. Wang // *Nitric Oxide.* – 2014. – Vol.15, № 41. – P. 62-71.
116. Manukhina E. B. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia / E. B. Manukhina, I. Y. Malyshev, B. V. Smitin [et al.] // *Nitric Oxide: Biol and Chem.* – 1999. – Vol. 3, № 5. – P. 393-401.
117. Markovich S. E. International conference of bioelectrical impedance // S. E. Markovich, N. Y. Ann / *Acad Sci.* – 1970. – Vol. 170, № 2. – P. 416-419.
118. McCuskey R. S. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids / R. S. McCuskey // *Liver.* – 2000. – Vol. 20, № 1. – P.13-17.

119. McNaughton L. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver / L. McNaughton, L. Puttagunta, M. A. Martinez-Cuesta // PNAS. –2002. –Vol. 99, № 26. – P. 17161-17166.
120. Melnyk A. B. The role of hydrogen sulphide and amino acids sulfur-containing in regulation tone of vascular smooth muscle wall the rats / Melnyk A. B., N. O.Voloschuk, N. O. Pentyuk, K. O. Zaichko // Neurophysiology. – 2010. – Vol. 42, № 2. – P. 126-131 [Ukrainian].
121. Michielsen P. The role of increased nitric oxide in the vascular hyporeactivity to noradrenaline in long-term portal vein ligated rats / P. Michielsen, G. Boeckxstaens, S. Sys, A. Herman // J Hepatol. – 1995. – Vol.23, № 3. – P. 341-347.
122. Miller T. W. Molecular regulation of tumor angiogenesis and perfusion via redox signaling / T. W. Miller, J. S. Isenberg, D. D. Roberts // Chem Rev. – 2009. – Vol. 109, № 7. – P. 3099-3124.
123. Mitchell J. A. Effects of nitric oxide-modulating amino acids on coronary vessels: relevance to sepsis / J. A. Mitchell, P. D. Anning, T. D. Warner, T. W. Evans // Eur J Pharmacol. – 2001. – Vol. 389, № 2. – P.209-215.
124. Moataz M. G. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter / M. G. Moataz, S. H. Snyder // J Neurochem. – 2010. – Vol. 113, № 1. – P. 14-26.
125. Mohammed Nasser A. Expression of nitric oxide synthase isoforms in human liver cirrhosis / Mohammed Nasser A., El-Aleem Seham Abd, Appleton Ian [et al.] // J Pathol. – 2003. – Vol. 200, № 5. – P. 647-655.
126. Morel A. Antioxidative properties of hydrogen sulfide may involve in its antiadhesive action on blood platelets / A. Morel, J. Malinowska, B. Olas // Clin Biochem. – 2012. – Vol. 45, № 18. – P. 1678-1682.
127. Morris C. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease / C. Morris, G.Kato, M. Poljakovic [et al.] // JAMA. – 2005. – Vol.13, № 1. – P.315-316.
128. Norris E. J. Hydrogen sulfide modulates sinusoidal constriction and contributes to hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia / E.

- J. Norris, N. Feilen, N. H. Nguyen [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2013. – Vol. 304. – P. 1070-1078.
129. Oh S. I. Lifespan extension and increased resistance to environmental stressors by N-Acetyl-L-Cysteine in *Caenorhabditis elegans* / S. I. Oh, J.K. Park, S. K. Park // *Clinics (Sao Paulo).* – 2015. – Vol. 70, № 5. – P. 380-386.
130. Oda M. Regulatori mechanism of hepatic microcirculation / M. Oda, Yokomori H., Han J. Y. // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2003. – Vol. 29, № 3-4. – P. 167 – 182.
131. Olas B. Hydrogen sulfide in hemostasis: friend or foe? / B. Olas // *Chem Biol Interact.* – 2014. – Vol. 217. – P.49-56.
132. Olson K. R. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation / K. R. Olson, R. A. Dombkowski, M. J. Russell [et al.] // *J Exp Biol.* – 2006. – Vol. 209, № 20. – P. 4011-4023.
133. Olson K. R. Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood? / Olson K. R. // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – Vol. 1787, № 7. – P.856-863.
134. Orozco-Gutiérrez J. J. Effect of L-arginine or L-citrulline oral supplementation on blood pressure and right ventricular function in heart failure patients with preserved ejection fraction / J. J. Orozco-Gutiérrez, L. Castillo-Martínez, A. Orea-Tejeda // *Cardiology Journal.* – 2010. – Vol. 17, №6. – P. 612-618.
135. Patacchini R. Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H₂S) contractile activity in rat detrusor muscle / R. Patacchini, P. Santicioli, S. Giuliani, C.A. Maggi // *Eur J Pharmacol.* – 2005. – Vol. 509, № 2-3. – P.171-177.
136. Pearson R. J. Endogenous hydrogen sulfide and the cardiovascular system-what’s the smell all about? / R. J. Pearson, T. Wilson, R. Wang // *Clin Invest Med.* – 2006. – Vol. 29, №3. – P. 146-150.
137. Pechanova O. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive

- balance / O. Pechanova, F. Simko // *Physiol Res.* – 2007. – Vol. 56, № 2. – P. 7-16.
138. Pereira C. The redox interplay between nitrite and nitric oxide: From the gut to the brain / C. Pereira, N. R. Ferreira, B. S. Rocha [et al.] // *Redox Biol.* – 2013. – Vol. 9, №1. – P. 276-284.
139. Polhemus D. J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease / D. J. Polhemus, D. J. Lefer // *Circ Res.* – 2014. – Vol. 14, № 114 (4). – P. 730-737.
140. Poliakova V. S. Structural-biochemical reorganization of rat liver caused by hydrogen sulfide-containing gas mixture / V. S. Poliakova, V. A. Shakhlamov, A. A. Stadnikov, T. G. Solnyshkova // *Morfologiya.* – 2003. – Vol. 124, № 4. – P. 84-87.
141. Prabha M. Mechanisms responsible for pulmonary hypertension / M. Prabha, H. F. Jin, Y. Tian // *Chin Med J.* – 2008. – Vol. 121, № 24. – P. 2604-2609.
142. Raimura M. Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide is involved in gastric mucosal hyperemic response to capsaicin in rats / M. Raimura, K. Tashima, K. Matsumoto [et al.] // *Pharmacology.* – 2013. – Vol. 92, № 1-2. – P. 60-70.
143. Reiffenstein R. J. Toxicology of hydrogen sulfide / R. J. Reiffenstein, W.C. Hulbert, S. H. Roth // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 1992. – Vol. 32. – P. 109 – 134.
144. Reilly F. D. Hepatic microvascular regulatory mechanisms. II. Cholinergic mechanisms / F. D. Reilly, R. V. Dimlich, E. V. Cilento, R. S. McCuskey // *Hepatology.* – 1982. – Vol. 2, №2. – P. 230-235.
145. Renga B. Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine-beta- synthase (CBS) and cystathionine-gamma-lyase (CSE) / B. Renga // *Inflamm Allergy Drug Targets.* – 2011. – Vol. 10, № 2. – P.85-91.

146. Richasrdson P. I. Liver blood flow. I . Intrinsic and nervous control of liver blood flow / P. I. Richasrdson, P. G. Withrington // *Gastroenterology*. – 1981. – Vol. 81, № 1. – P. 159-173.
147. Richasrdson P. I. Physiological regulation of the hepatic circulation / P. I. Richasrdson, P. G. Withrington // *Ann. Rev. Physiol.* – 1982. – Vol. 44. – P. 57-69.
148. Robert K. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver / K. Robert, J. Nehme, E. Bourdon [et al.] // *Gastroenterology*. – 2005. – Vol. 128, № 5. – P. 1405-1415.
149. Rockey D. C. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension / D. C. Rockey // *Clin Liver Dis*. – 2006. – Vol. 10, № 3. – P. 459-79.
150. Rossoni G. The hydrogen sulphide-releasing derivative of diclofenac protects against ischaemia-reperfusion injury in the isolated rabbit heart / G. Rossoni, A. Sparatore, V. Tazzari // *Br J Pharmacol.* – 2008.– Vol. 153, № 1. – P.100-109.
151. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and home aspects of its neurotoxicity / Y. Salyha // *Visnyk of Lviv University. Biology series*. – 2010. – № 54. – P. 3-14.
152. Sarathi Mania Hydrogen sulfide and the liver / Sarathi Mania, C. Wei [et al.] // *Nitric Oxide*. – 2014. – Vol. 10. – P. 1006-1016.
153. Schwedhelm E. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism / E. Schwedhelm, R. Maas, R. Freese [et al.] // *Br J Clin Pharmacol.* – 2008. – Vol. 65, №1. – P. 51-59.
154. Serna E. Basal release of nitric oxide in the mesenteric artery in portal hypertension and cirrhosis: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase / E. Serna, M. D. Mauricio, P. Lluch [et al.] // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2013. – Vol. 28, №5. – P. 880-886.
155. Shibamoto T. Different hepatic vascular response to noradrenaline and histamine between uinea pig and rats / T. Shibamoto, M. Narushima, Y.O.

- Ling, T. Shimo, H. Tsuchida, Y. Kurata // *Acta Physiol Scand.* – 2004. – Vol. 180, № 3. – P.255–263.
156. Shibuya N. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide / N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, N. Nagahara, H. Kimura // *J Biochem.* – 2009. – Vol. 146, № 5. – P. 623-626.
157. Shimamura K. Effects of L-arginine on spontaneous contraction of the rat portal vein / K. Shimamura, M. Zhou, M. Toba, S. Kimura // *Pflugers Arch.* – 2003. – Vol. 446, №1. – P. 30-35.
158. Siebert N. L. H₂S contributes to the hepatic arterial buffer response and mediates vasorelaxation of the hepatic artery via activation of K(ATP) channels / N. L. Siebert, D. Cantre, C. Eipel, B. Vollmar // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* – 2008. – Vol. 295, № 6. – P.1266-1273.
159. Singel D. J. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells / D. J. Singel, J. S. Stamler // *Ann Rev Physiol.* – 2005. – Vol. 67 – P.99-145.
160. Skovgaard N. The role of endogenous H₂S in cardiovascular physiology / N. Skovgaard, A. Goulliaev, M. Aalling, U. Simonsen // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2011. – Vol. 12, №9. – P.1385-1393.
161. Streeter E. An investigation of the mechanisms of hydrogen sulfide-induced vasorelaxation in rat middle cerebral arteries / E. Streeter, J. Hart, E. Badoer // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2012. – Vol. 385, № 10. – P. 991-1002.
162. Streeter E. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor / E. Streeter, H. H. Ng // *Medical Gas Research.* – 2013. – Vol. 29, №1. – P. 3-9.
163. Such J. Tumor-necrosis factor-alpha, interleukin-6, and nitric oxide in sterile ascitic fluid and serum from patients with cirrhosis who subsequently develop ascitic fluid infection / J. Such, D. J. Hillebrand, C. Guarner [et al.] // *Dig Dis Sci.* – 2001. – Vol. 46, № 10. – C.2360-2366.
164. Sun Y. The vasorelaxing effect of hydrogen sulfide on isolated rat aortic

- rings versus pulmonary artery rings / Y. Sun, C.S. Tang, H. F. Jin, J. B. Du // *Acta Pharmacol Sin.* – 2011. – Vol. 32, № 4. – P.456-464.
165. Sun Yan Hydrogen sulfide and vascular relaxation / Sun Yan, Tang Chao-shu, Du Jun-bao and JIN Hong-fang // *Chin Med J.* – 2011. – Vol. 124, №22. – P.3816-3819.
166. Svegliati-Baroni G. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition / G. Svegliati-Baroni, S. De Minicis, M. Marzoni // *Liver Int.* – 2008. – Vol. 28 (8). – 1052 – 1064.
167. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential / C. Szabo // *Nat Rev Drug Discov.* – 2007. – Vol. 6, № 11.– P. 917-935.
168. Takır S. NaHS induces relaxation response in prostaglandin F(2 α) precontracted bovine retinal arteries partially via K(v) and K(ir) channels / S. Takır, G. Z. Ortakoylu, A. Toprak, B. S. Uydeş-Dogan // *Exp Eye Res.* – 2015. – Vol. 132, № 2. – P. 190-197.
169. Tan G. Hydrogen Sulfide Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity, Liver Cirrhosis and Portal Hypertension in Rats / G. Tan, S. Pan, J. Li, X. Dong [et al.] // *PLoS One.* –2011. – Vol. 6, № 10. –25943p.
170. Tang C. Hydrogen sulfide as a new endogenous gaseous transmitter in the cardiovascular system / C. Tang, X. Li, J. Du // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2006. – Vol. 4, № 1. – P. 17-22.
171. Tang G. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells / G. Tang, L. Wu, W. Liang, R. Wang // *Mol Pharmacol.* – 2005. – Vol. 68, № 6. – P. 1757-1764.
172. Tashiro M. L. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells // M. L. Tashiro, C. Schäfer, H. Yao [et al.] / *Gut.* – 2001. – Vol. 49, №2. – P. 241-50.

173. Theodorakis N. Murine study of portal hypertension associated endothelin-1 hypo-response / N. Theodorakis, M. Maluccio, N Skill // *World J Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 21, №16. – P. 4817-4828.
174. Timoshenko A. V. Presentation of NO-metabolites (nitrate/nitrite) in blood serum and pleural effusions from cancer patients with pleurisy / A. V. Timoshenko, O. V. Maslakova, B. Werle [et al.] // *Cancer Lett.* – 2002. – Vol. 182, №1. – P.93-99.
175. Tripatara P. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction / P. Tripatara, N. S. Patel, M. Collino [et al.] // *Lab Invest.* – 2008. – Vol. 88, № 10. – P. 1038-1048.
176. Truong D. H. Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity / D. H. Truong, M. A. Eghbal, W. Hindmarsh, S. H. Roth, P. J. O'Brien // *Drug Metab Rev.* – 2006. – Vol. 38, № 4. – P. 733-744.
177. Tsugawa M. Role of nitric oxide and endothelin-1 in a portal hypertensive rat model / M. Tsugawa, S. Hashizume, F. Migou [et al.] // *Am J Physiol.* – 2000. – Vol. 33, №. 10 – P. 1097-1105.
178. Tsybenko V. A. Selective Pharmacological Blocking of Synaptic Transmission Through the Parasympathetic Ganglia: Effects on the Cardiovascular System / V. A. Tsybenko, P. I. Yanchuk, L. S. Egorova, V. E. Gmiro // In.: *Neurophysiology.* – 1996. – Vol.28. – P.119-125.
179. Uhlmann D. L. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury / D. L. Uhlmann, S. Scottomotau, H. Witzigmann, H. U. Spiegel // *Eur Surg Res.* – 1998. – Vol. 30, № 3. – P. 175-184.
180. Viinikka L. Nitric oxide as a challenge of laboratory-clinical chemistry / L. Viinikka // *Scand J Clin Lab Invest.* – 1996. – Vol. 56, № 7. – P.577-581.
181. Vollmar B. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair / B. Vollmar, M. D. Menger // *Physiol Rev.* – 2009. – Vol. 89, № 4. – P. 1269-1339.

182. Wagner C. A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator / C. A. Wagner // *J Nephrol.* – 2009. – Vol. 22, №2. – P. 173-176.
183. Wang C. Role of hydrogen sulfide in portal hypertension and esophagogastric junction vascular disease / C. Wang, J. Han, L. Xiao // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol.28, № 20(4). – P. 1079-1087.
184. Wang K. Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia / K. Wang, S. Ahmad, M. Cai [et al.] // *Circulation.* – 2013. – Vol. 127, №25. – P. 2514-2522.
185. Wang R. Hydrogen sulfide: the third gasotransmitter in biology and medicine / R. Wang // *Antioxidants and redox signaling.* – 2010. – Vol. 12, № 9. – P. 1061-1067.
186. Wang R. Signal transduction and the gasotransmitters: NO,CO and H₂S inbiology and medicine / R. Wang // *Humana Press.* – 2004. – 392 p.
187. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // *FASEB J.* – 2002. –Vol. 16, № 13. – P. 1792-1798.
188. Whiteman M. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability/ M. Whiteman, P. K. Moore // *J Cell Mol Med.* – 2009. – Vol. 13, № 2. – P. 488-507.
189. Whiteman M. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? / M. Whiteman, J. S. Armstrong, S. H. Chu [et al.] // *J Neurochem.* – 2004. – 90, № 3. – P. 765-768.
190. Whitfield N. L. Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling / N. L. Whitfield, E. L. Kreimier, F. C. Verdial [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2008. – Vol. 294, № 6. – P. 1930-1937.

191. Wiest R. Endoscopic ligation compared with combined treatment with nadolol and isosorbide mononitrate to prevent recurrent variceal bleeding / R. Wiest, G. Lock, H. Messmann // *Z. Gastroenterol.* – 2002. – Vol. 40, № 7. – 547-549.
192. Wolfe M. M. Hepatic clearance of somatostatin and gastrin-releasing peptide / M. M. Wolfe, J. W. Doyle, J. E. Me Guigan // *Life Sci.* – 1987. – Vol. 40, № 4. – P. 335-342.
193. Won Ki Hong Relationship between tetrahydrobiopterin and portal hypertension in Patients with Chronic Liver Disease / Won Ki Hong, Kwang Yong Shim, Soon Koo Baik [et al.] // *J Korean Med Sci.* – 2014. – Vol. 29, № 3. – P.392-399.
194. Wu D. Exogenous hydrogen sulfide mitigates the fatty liver in obese mice through improving lipid metabolism and antioxidant potential / D. Wu , N. Zheng , K. Qi [at el.] // *Med Gas Res.* – 2015. – Vol. 10, №5 (1) – 1p.
195. Xia M. Production and actions of hydrogen sulfide, a novel gaseous bioactive substance, in the kidneys / M. Xia, L. Chen, R. W. Muh, P. L. Li // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2009. – Vol. 329, №3 – P. 1056-1062.
196. Xiao Yu Tiana NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of l-type voltage-sensitive Ca²⁺channel / Xiao Yu Tiana,WingTak Wonga, Nazish Sayed // *Pharmacological Research.* – 2012. – Vol. 65, № 2. – P.239-246.
197. Yan H.The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats / H. Yan, J. Du, C. Tang // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – Vol. 313, № 1. – P.22-27.
198. Yan S. K. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells / S. K. Yan, T. Chang, H. Wang [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 361. – P. 485-491.
199. Yanchuk P. Mechanisms of contractile action of acetylcholine on hepatic vein / P. Yanchuk, T. Prihodko, O. Pasichnichenko // *Intern J Physiology and Pathophysiology* – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 379-387.

200. Yanchuk P. I. Effect of L-arginine on the oxygen balance of the liver and its bile secretion function / P. I. Yanchuk, O.V. Bondzyk, E.M. Resetnik, S. P. Veselsky // *Fiziol Zh.* – 2013. – Vol. 59, № 2. – P. 31-38.
201. Yang G. Cystathionine γ -lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H_2S -dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation and p21Cip/WAK-1 / G. Yang, K. Cao, L. Wu, R. Wang // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 47. – P. 49199-49205.
202. Yang G. H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase / G. Yang, L. Wu, B Jiang [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 322, № 5901. – P.587-590.
203. Yang G. Increased neointimal formation in cystathionine gamma-lyase deficient mice: role of hydrogen sulfide in alpha5beta1-integrin and matrix metalloproteinase-2 expression in smooth muscle cells / G. Yang, H. Li, G. Tang, L.Wu, K. Zhao, Q.Cao, C. Xu, R. Wang // *J Mol Cell Cardiol.* – 2012. – Vol. 52, № 3. – P.677-688.
204. Yang W. Nitric oxide modulates acetylcholine-induced vasodilatation in the hepatic arterial vasculature of the dual-perfused rat liver / W. Yang, I. S. Benjamin, B. Alexander // *Acta Physiol Scand.* – 2001. – Vol. 171, № 4. – 413p.
205. Yasuko Iwakiri Pathophysiology of Portal Hypertension / Yasuko Iwakiri // *Clin Liver Dis.* – 2014. – Vol. 18, № 2. – P. 281- 291.
206. Yeager M. E. Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension / M. E. Yeager, G. R. Halley, H. A. Golpon, N. F. Voelkel, R. M. Tuder // *Circ Res.* – 2001. – Vol. 88, № 1. – P. 2-11.
207. Yuan L. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity / Yuan L., Kaplowitz N. // *Mol Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30, № 1–2. – P. 29-41.
208. Zhao W. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu // *EMBO J.* – 2001 – Vol. 20, №21. – P. 6008-6016.

209. Zhu P. Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling / P. Zhu, L. Huang, X. Ge, F. Yan, R. Wu // *Int J Exp Pathol.* – 2006. – Vol. 87, № 6. – P.463-474.
210. Zhu Y. Z. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats / Y. Z. Zhu, Z. J. Wang, P. Ho [et al.] // *J Appl Physiol.* – 2007. – Vol. 102, № 1. – P. 261-268.
211. Zinyama R. B. Adrenaline suppression of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 / R. B. Zinyama, G. J. Bancroft, L. B. Sigola // *Immunology.* – 2001. – Vol. 104, № 4. – P. 439-446.
212. Алмакаева Л. Г. Аргинин и его применение в медицине и фармации / Л. Г. Алмакаева, Е. В. Литвинова // *Ліки України.* – 2011. – № 1 (5). – С. 23 – 26.
213. Апихтіна О. Л. Продукція оксиду азоту в печінці за умов впливу ацетату свинцю в експерименті / О. Л. Апихтіна, А. В. Коцюруба, І. М. Андрусишина [та ін.] // *Соврем пробл токсикол.* – 2007. – № 2. – С. 22-26.
214. Баскаков М. Б. Ионные механизмы действия монооксида углерода на сократительные свойства гладких мышц артериальных сосудов / М. Б. Баскаков, А. С. Желудева, С. В. Гусакова, Л. В. Смаглий // *Фізіол. журн.* – 2013. – Т. 59, № 3. – С.18-24.
215. Бахишев Г. Н. К поиску зависимости лечебной активности цистеина и его производных при интоксикации животных хлор- и бромсодержащими соединениями от их электронного строения / Г. Н. Бахишев, Ю. А. Кругляк, В. М. Пинчук // *Институт теоретической физики АН УССР.* – 1978. – 7 с.
216. Бернштейн В. А. К методике определения кровенаполнения тканей // *Физиологический журнал СССР.* – 1964. – Т.50, № 5. – С. 640-642.

217. Бондзик О. В. Вплив L-аргініну на спектр холатів у жовчі щурів / О. В. Бондзик, Є. М. Решетнік, С. П. Весельський, П. І. Янчук // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского – 2012. – Т. 25 (64), № 2. – С. 37- 43.
218. Воробьева Е. Н. Роль свободно радикального окисления в патогенезе болезней системы кровообращения / Е. Н. Воробьева, Р. И. Воробьев // Бюл. СО РАМН. – 2005. – № 4. – С. 24-30.
219. Голиков П. П. Метод определения нитрита/нитрата (NOx) в сыворотке крови / П. П. Голиков, Н.Ю . Николаева // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, № 1. – С. 79-88.
220. Голиков П. П. Характер взаимосвязи оксида азота с ангиотензипревращающим ферментом и малоновым диальдегидом у больных с атерогенным стенозом внутренней сонной артерии / П.П. Голиков, В.Л. Леманев, В.В. Ахметов // Клинич. медицина. – 2004. – № 7. – С. 15- 19.
221. Гошовська Ю.В. Кардіопротекторні ефекти донору сірководню / Ю. В. Гошовська, Т. В. Шиманська, О. М. Семенихіна, В.Ф. Сагач // Фізіологічний журнал. – 2012. – №6. – С. 3-15.
222. Гуревич М. И., Соловьев А. И., Литовченко Л. П., Долман Л. Б. Импедансная реоплетизмография. – К.: Наукова думка, 1982. – С. 175.
223. Гусев М. В. Устойчивость культур цианобактерии *Anacystis nidulans* и микроводоросли *Dunaliella maritima* к токсическому действию ванадия: влияние фосфата, железа и цистеина / М. В. Гусев, А. Ф. Лебедева, Я. В. Саванина // Вестник МГУ Сер Биология. – 1997. – № 3. – С. 12-17.
224. Дмитренко Н. П. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота / Н. П. Дмитренко, Т. О. Кишко, С. Г. Шандренко // Український хіміотерапевтичний журнал – 2008. – Т. 22, № 1-2. – С.137-140.

225. Дмитренко Н. П. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. Токсическое действие оксида азота / Н. П. Дмитренко, А. Холиан // Укр біохім журн. – 2005. – Т. 77, № 5. – С. 5-23.
226. Евсеев А. В. Комплексные соединения N-ацетил-L-цистеина с биометаллами как факторы самозащиты биологических систем / А. В. Евсеев, В. Л. Ковалёва, И. А. Крылов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142, № 7. – С. 26-30.
227. Ельский В. Н. Роль дисфункции эндотелия в генезе сердечно-сосудистых заболеваний / В. Н. Ельский, Н. Т. Ватутин, Н. В. Калинкина, А. М. Салахова // Журн. АМН України. – 2008. – Т.14, № 1. – С. 51-62.
228. Зефирова А. Л. Влияние эндогенного оксида азота на функцию нервно-мышечного синапса / А. Л. Зефирова, Р. Р. Халиуллина, А. А. Анучин, А. В. Яковлев // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2001. – № 4. – С. 499-506
229. Ивашкин В.Т. Болезни печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей / В.Т. Ивашкин // – Изд. II-е М.: ООО Издат. Дом "М – Вести" – 2005. – 536 с.
230. Конради Г. Физические методы измерения кровотока / Г. Конради // В кн. Методы исследования кровообращения. – 1976. – Л.: Наука. – С. 18-32.
231. Коржов В. И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты / В. И. Коржов, В. Н. Жадан, М. В. Коржов // Журнал АМН України. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 3-20.
232. Кравченко Н. А. Биохимические и молекулярно-генетические механизмы развития синтеза оксида азота эндотелиальной NO-синтетазой в норме и при сердечно-сосудистой патологии / Н. А. Кравченко, Н. В. Ярмаш // Укр. терапевт. журн. – 2007. – № 1. – С.82-83.

233. Кульчицкий О. К. Система оксиду азоту та вік / О. К. Кульчицкий // Буков. мед. вісн. – 2005. – Т. 2, № 9. – С.143-144.
234. Кульчицький О. К. Рівень стабільних метаболітів оксиду азоту в плазмі крові та судинній стінці у щурів при старінні / О. К. Кульчицький, Р. І. Потапенко, О. В. Ніжанковська // Мед хім. – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 95-97.
235. Курилина Е. И. Оценка уровней метаболитов оксида азота в слезной жидкости у здоровых лиц разных возрастных групп / Е. И. Курилина // Таврич. медико-биол. весник. – 2012. – Т. 15, №3, ч. 3 (59). – С. 78-81.
236. Лапшина Л. А. Уровень S-нитрозотиола и нитритов-нитратов в сыворотке крови при хронической сердечной недостаточности у больных пожилого и старческого возраста / Л. А. Лапшина, А. Ю.Титова, Т. В. Горбач // Эксперим. і клін. медицина. – 2005. – №2. – С.61-64.
237. Максимович Н. Е. Аминокислота L–аргинин и перспективы её использования в клинике / Н. Е. Максимович, Д. А. Маслаков // Здравоохранение. – 2003. – № 5. – С. 35-37.
238. Мансуров Х. Х. Важнейшие итоги многолетнего изучения клинических аспектов портальной гипертензии / Х. Х. Мансуров // Актуальные вопросы патологии печени. Душанбе. – 1981. – Вып.8. - С. 7-22.
239. Мельник А. В. Роль сульфідну водню та сірковмісних амінокислот у регуляції тонуусу гладеньких м'язів судинної стінки у щурів / А. В. Мельник, Н. І. Волощук, Н. О. Пентюк, К. О. Заїчко // Нейрофізіологія. – 2010. – Т. 42, № 2. – С. 126-131.
240. Москаленко Ю. Е. Количественная регистрация локального (мозгового) кровотока с помощью электрохимической генерации водорода / Ю. Е. Москаленко, И. Т. Демченко, С. В. Буров, В. Ф. Митрофанов // Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова. – 1974. - № 4. – С. 650-653.

241. Мурашук К. Вплив L-аргініну на вікові зміни процесів пероксидного окислення ліпідів та активність системи антиоксидантного захисту у тканинах щурів / К. Мурашук, О. Іккерт, М. Гальків і С. Гордій // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 3. – С. 38-44.
242. Науменко А. И., Скотников В. В. Основы электроплетизмографии. – М.: Медицина, 1975. – С. 215.
243. Нечипуренко Н. И. Состояние процессов перекисного окисления липидов и церебральной оксигенации при локальной ишемии головного мозга в условиях модуляции L –аргинин– NO–системы / Н. И. Нечипуренко, И. П. Антонов, А. Р. Гаврилова и Н. Ю. Щербина // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.–біял. наук. – 2001. – № 2. – С. 5-9.
244. Олещук О. М. Блокатори синтезу оксиду азоту при ішемії-реперфузії печінки / О. М. Олещук // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2010. – №2 – С. 70-73.
245. Омелянчик Л. О. Пошук біорегуляторів з антиоксидантною дією серед S-похідних 4-меркаптохінолінів / Л. О. Омелянчик, Д. М. Федоряк, О. А. Бражко // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2007. – № 2. – С. 17-24.
246. Осипов А. Н. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / А. Н. Осипов, Г. Г. Борисенко, Ю. А. Владимиров // Успехи биол. Химии. – 2007. – №47. – С. 259-292.
247. Пархоменко Л. К. Молекулярные механизмы желчеобразования / Л. К. Пархоменко, А. В. Ещенко // Сучасна гастроентерологія. – 2011.– Т.15, № 1. – С. 90 – 94.
248. Плосканич Л. Й. Влияние блокаторов синтеза оксида азота на состояние печени при ее ишемически-реперфузионном повреждении в эксперименте / Л. Й. Плосканич // Мед. хім. (Украина). – 2006. – Т. 8., № 2. – С.31-35.

249. Покровский В. И. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства / В. И. Покровский, Н. А. Виноградов // Тер архив. – 2005. – №. 1. – С. 82-87.
250. Праворотов Г. В. Сравнительная гистофизиология органных макрофагов / Г.В. Праворотов // Российские морфологические ведомости – 1999. – № 1-2. – 160 с.
251. Присяжна О. Д. Система оксиду азоту та експариментальний цукровий діабет / О. Д. Присяжна, М. М. Ткаченко, А. В Коцюруба // Клінічна та експериментальна паталогія. – 2004. – Т.50, № 2, ч.1. – С. 175-176.
252. Раваева М. Ю. Изменение активности системы синтеза оксида азота под воздействием низкоинтенсивного миллиметрового / М. Ю. Раваева, Е. Н. Чуян // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия «Биология, химия» –2011. – Т. 24 (63), № 4. – С. 201-210.
253. Раваева М. Ю. Роль оксида азота в реализации микроваскулярных эффектов низкоинтенсивного миллимитрового излучения / М. Ю. Раваева // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. ВернадскогоСерия «Биология, химия». – 2012. – Том. 25 (64), № 3. – С. 165-170.
254. Реброва О. Ю. Описание процедуры и результатов статистического анализа медицинских данных в научных публикациях. Часть I. Описание статистического анализа в разделе «Материалы и методы». Представление данных в разделе «Результаты» / О. Ю. Реброва // Международный журнал медицинской практики.– 2000. – № 4.– С. 43-45.
255. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва // М.: Медиа Сфера, 2002.– 312 с.

256. Резник Н. Л. Третий газ / Н. Л. Резник // Химия и жизнь. – 2009. – № 10 – С. 40-46.
257. Романов Г. А. Перспективы медикаментозного лечения эндотелиальной дисфункции / Г. А. Романов, Е. В. Акимов, Г. Н. Гороховская [и др.] // Фарматека. – 2005. - Том 26 , № 9. – С. 31-37.
258. Романюк Т.В., Ендотеліальна дисфункція як пре диктор на етапах формування синдрому портальної гіпертензії / Т. В. Романюк, І.Я Дзюбановський / Украинский журнал хирургии – 2013. – Т. 21, № 2. – С. 68-70.
259. Сагач В. Ф. Зміни вазодилататорних реакцій судинних гладеньких м'язів та систем оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету / В. Ф. Сагач, М. М.Ткаченко, О. Д. Присяжна, А. В. Коцюруба // Фізіологічний журнал. – 2003. – Т. 49, № 4. – С. 24-32.
260. Семенихіна О. М. Роль та механізми впливу сірководню на скоротливу активність гладеньких м'язів різних судин щурів / О. М Семенихіна., О. В. Базілюк, Ю. П. Коркач, В. Ф. Сагач // Фізіологічний журнал. – 2011. – Vol. 57, №4. – Р.3-12.
261. Сибірна Н. О. Климшишин Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах / Н. О. Сибірна, М. Я. Люта, Н. І. Климшишин // Біологічні Студії. – 2010. – Том 4, №1. – С. 143-160.
262. Сидоренко Г. И. Реография: импедансная плетизмография. – Минск: Беларусь, 1978. – 160 с.
263. Синяченко О. В. Оксид азота в терапевтической практике / О. В. Синяченко, Т. В.Звягина – Донецк, 2001. – 250 с.
264. Ситдикова Г. Ф. Сероводород от канализации Парижа к сигнальной молекуле / Г.Ф. Ситдикова, Зефиоров А. Л. // Природа. – 2010. – № 9. – С. 29-38.
265. Смаглий Л. В. Роль Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта в механизмах вазоконстрикторного действия сероводорода / Л. В. Смаглий // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №2. – С. 543-

- 549.
266. Соловьева М. Е. Прооксидантное и цитотоксическое действие N-ацетилцистеина и глутатиона в сочетании с витамином B12b / М. Е. Соловьева, В. В. Соловьев, А. А. Фасхутдинова // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 1. – С. 71-78.
267. Траверсе Г. М. Особенности функциональной активности печени / Г. М. Траверсе // Врачебная практика. – 2005. – №3 – С. 9-12.
268. Топчий И. И. Взаимосвязь изменений антиоксидантной системы и метаболизма оксида азота у больных прогрессирующими нефропатиями с артериальной гипертензией / И. И. Топчий, Т. В. Горбач, Т.Н. Бондарь // Мистецтво лікування. – 2005. – Т. 8, № 24. – С. 52-55.
269. Філімонова Н. Б. Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обґрунтованої медицини. Первинний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту / Н. Б. Філімонова, І. О. Філь, Т. С. Михайлова // Медицина залізничного транспорту України.– 2004.– № 4.– С. 85-93.
270. Філімонова Н. Б. Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обґрунтованої медицини. Порівняння груп за кількісними показниками / Н. Б. Філімонова, І. О. Філь // Медицина транспорту України. – 2005. – № 4. – С. 86-93.
271. Ходосовский М. Н. К механизму протекторного влияния L-аргинина на печень при ишемии-реперфузии / М. Н. Ходосовский // Эксперим. и клин. фармакол. – 2006. – Т. 69, № 3. – С. 40-42.
272. Цыбенко В. Применение импедансной плетизмографии для изучения депонирующей функции печени в остром опыте / В. Цыбенко, П. И. Янчук // Физиологический журнал. – 1984. – Т. 30, № 6. – С. 756-758.
273. Цыбенко А. В. Участие гипоталамуса в регуляции печеночного кровообращения / В. А. Цыбенко, П. И. Янчук // Журн.: Бюллетень эксперим. биол. и медицины. – 1985. – №11. – С.521-524.

274. Цыбенко В. А. Влияние гормонов нейрогипофиза на печеночное кровообращение/ В. А. Цыбенко, П. И. Янчук, О. В. Ткачук // Физиол журн АН УССР. – 1988. – Т.34, №6. – С.70-75.
275. Цыбенко В. А. Применение импедансной плетизмографии для изучения депонирующей функции печени в остром опыте / Цыбенко В. А., Янчук П. И., Симоненко П. Н. // Физиол журн АН УССР. – 1984. – Т. 30, № 6. – С. 756-758.
276. Чорна І. В. Вміст метаболітів оксиду азоту в лімфоцитах щурів за дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення / І. В. Чорна, І. Ю. Висоцький // Вісник СумДУ. Серія медицина – 2010. – №1. – С.42-46.
277. Шаповалова І. О. Показники функціональної активності системи фагоцитуючих макрофагів у хворих на хронічний токсичний гепатит при введенні нуклеїнату / І. О. Шаповалова // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. наук. праць. – Київ-Луганськ-Харків – 2007. – Вип. 3-4 (78-79). – С. 126-134.
278. Шершнев В. Г. Клиническая реография. – К.: Здоровье, 1977. – 168с.
279. Янчук П. И. Влияние катехоламинов на кровообращение в печени / П. И. Янчук, Т. А. Дубилей, В. А. Цыбенко // Журн : Биологические науки. – 1990. – №10. – С.97-104.
280. Янчук П. И. Изменения печеночного кровообращения при раздражении продолговатого мозга / П. И. Янчук, В. А. Цыбенко // Физиол. журн. АН УССР.-1986. – Т. 32, № 4. – С.449-455.
281. Янчук П. И. Изменения секреторной и экскреторной функции печени под влиянием вазопресина / П. И. Янчук, С. П. Весельский С. Парчами Газае и соавт.// Уч. записки Таврического нац. ун-та. Серия "Биология, химия" – 2006. – Т. 19, № 4. – С.228-234.
282. Янчук П. И. Изучение гипоталамической регуляции депонирующей функции печени / П. И. Янчук // Физиол Журн АН УССР. – 1983. – Т.29, №5. – С.631-633.

283. Янчук П. И. Нейрогуморальные механизмы гипоталамической регуляции кровообращения и тканевого дыхания в печени / П. И. Янчук, В. А. Цыбенко // Журн.: Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2000. – Т. 9, № 1. – С. 135-137.
284. Янчук П. И. Нервная регуляция кровенаполнения печени / П. И. Янчук, В. А. Цыбенко // В кн.: Пробл. физиол. гипоталамуса.-Киев-1987. – Вып.21. – С.122-128.
285. Янчук П. І. З'ясування механізмів звужувальної дії ацетилхоліну на ворітну вену та її внутрішньопечінкові гілки / П. І. Янчук, О. М. Пасічніченко, В. І. Комаренко [та ін.] // Фізіологічний журнал. – 2006 – Т. 52, №3. – С. 28-33.
286. Янчук П. І. Механізми скоротливої дії ацетилхоліну на печінкові вени / П. І. Янчук, Т. П. Приходько., О. М. Пасічніченко, А. А. Терехов, В. О. Цыбенко // Фізіологічний журнал. – 2011. – Т. 57, №1. – С. 21-26.
287. Янчук П. І. Модификационный электрод для регистрации локального кровотока в слизистой оболочке желудка методом водородного клиренса / П. І. Янчук, Т. П. Палатный, Я. И. Русинчук // Рос.Физиол.Журн. – 2005. – Т.91, № 9. – С.1108-1110.
288. Янчук П. І. Нейрогуморальна регуляція кровообігу і тканинного дихання печінки. - 2014. - К.: Вікпринт. – 302 с.
289. Янчук П. І. Участь α -адренорецепторів у констрикторних реакціях венозних судин печінки на серотонін і ендотелін-1/ П. І. Янчук, В. І. Комаренко // Ученые записи Таврического національного университета им. В.И. Вернадського. Серия «Биология, химия» – 2012. – Т. 25 (64), №2. – С.209-214.
290. Янчук П. І. Участь ендотеліну-1 у регуляції кровообігу, кисневого балансу та жовчосекреторної функції печінки / П. І. Янчук, В. І. Комаренко, О. М. Пасічніченко та ін. // Вісн. Київського нац. ун-ту ім. Т. Шевченка; Пробл. регул. фізіол. функцій – 2006. – Вип.11-С. – 16-18.