ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.27.06.2017.Tib.30.03 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ

САЙФУЛЛАЕВА САИДА АКРАМЖОНОВНА

ЖИГАР ЯЛЛИҒЛАНИШИ ПАТОГЕНЕЗИДА НИТРЕРГИК ВА МОНООКСИГЕНАЗА СИСТЕМАСИНИ ЎЗАРО ФУНКЦИОНАЛ БОҒЛИҚЛИГИ

14.00.16 – Нормал ва патологик физиология

ТИББИЁТ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc) ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2019

УДК:618.14-006.36-618.17:616.381-072.1-089-085

Докторлик (DSc) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата докторской (DSc) диссертации

Contents of the abstract of doctoral (DSc) dissertation

Сайфуллаева Саида Акрамжоновна
Жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа системасини ўзаро функционал боғлиқлиги 3

Сайфуллаева Саида Акрамжоновна
Функциональная зависимость между нитрергической и монооксигеназной системами в патогенезе воспаления печени .....

Sayfullaeva Saida Akramjonovna
Functional dependence between nitroergic and monooxygenase systemin pathogenesis of the liver inflammation …… 57

Эълон қилинган ишлар рўйхати
Список опубликованных работ
List of published works …… 61

ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.27.06.2017.Tib.30.03 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ

САЙФУЛЛАЕВА САИДА АКРАМЖОНОВНА

ЖИГАР ЯЛЛИҒЛАНИШИ ПАТОГЕНЕЗИДА НИТРЕРГИК ВА МОНООКСИГЕНАЗА СИСТЕМАСИНИ ЎЗАРО ФУНКЦИОНАЛ БОҒЛИҚЛИГИ

14.00.16 – Нормал ва патологик физиология

ТИББИЁТ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc) ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2019

Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2018.2.DSc/Tib311 рақами билан рўйхатга олинган.

Диссертация Тошкент тиббиёт академиясида бажарилган.

Диссертация автореферати икки тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.tma.uz) ҳамда «Ziyonet» ахборот-таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи:	**Каримов Хамид Якубович** тиббиёт фанлари доктори, профессор
Расмий оппонентлар:	**Зокиров Ёркин Узуевич** тиббиёт фанлари доктори, профессор
	Саидов Алонур Бахтинурович тиббиёт фанлари доктори
	Алейник Владимир Андреевич тиббиёт фанлари доктори
Етакчи ташкилот:	**И.М.Сеченов номидаги Биринчи Москва Давлат Тиббиёт Университети**

Диссертация ҳимояси Тошкент тиббиёт академияси ҳузуридаги DSc.27.06.2017.Tib.30.03 рақамли илмий кенгашнинг 2019 йил «____» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100109 Тошкент, Олмазор тумани, Фаробий кўчаси 2-уй. Тел/факс: (+99871) 150-78-25, e-mail: tta2005@mail.ru)

Диссертация билан Тошкент тиббиёт академиясининг Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (_____ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100109, Тошкент ш., Олмазор тумани, Фаробий кўчаси, 2. Тел/факс: (+99871) 150-78-14.

Диссертация автореферати 2019 йил «____»_____куни тарқатилди.

(2019 йил «____» _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).

Г.И.Шайхова
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси, тиббиёт фанлари доктори, профессор

Н.Ж.Эрматов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш илмий котиби, тиббиёт фанлари доктори, доцент

Б.У.Ирискулов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги илмий семинар раиси, тиббиёт фанлари доктори, профессор

КИРИШ (докторлик диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зурурати. Дунёда ҳозирги кунда жигар патологияси ривожланишининг асосида ётувчи молекуляр механизмлар замонавий патофизиологиянинг ҳал этилмаган муаммолардан бири бўлиб қолмоқда. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилотининг (ЖССТ) берган маълумотларига кўра «....2015 йилда бутун дунёда вирусли гепатит 1,34 миллион инсонларнинг ўлимига сабаб бўлди. Вирусли гепатитнинг асоратлари натижасида юзага келадиган ўлим даражаси йилдан-йилга кун сайин ортиб бормоқда...»[1]. Гепатитлар патогенезида эндотелий дисфункцияси ва синусоидларнинг эндотелиал қатламининг шикастланиши билан боғлиқ жигар ичи гемодинамикаси бузилиши катта аҳамиятга эга. Эндотелиал дисфункциянинг бир қатор кенг тарқалган касалликлар ва патологик ҳолатларда патогенетик ўрни исботланган, лекин жигар касалликларида кам ўрганилган. Сўнгги ўн йилликда мазкур «.... азот оксиди (NO) иштирокидаги паракрин – ноадренергик нохолинэргик бошқарув тизими мухим ахамиятга эга...»[2] қатор ишларда қайт этилган. Қатор муаллифларнинг маълумотларида «....азот монооксиди интакт эндотелийда метаболик вазодилятацияга олиб келиб, у қон томирларни кенгайтирувчи эндотелиал омил бўлиб ҳисобланиши...»[3] исботланган. Сўнгги йилларда азот монооксиди метаболик тизимлар бошқарувида, жумладан: иммун, цитокин, эндокрин, асаб, шунингдек, оқсил, липид ва углеводлар алмашинувида катта ўрин тутиши аниқланган. Бугунги кунда ўткир ва сурункали гепатитларнинг патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимларини (МОТ) ўзаро функционал боғликлигини асослаш хал қилиниши зарур долзарб муаммолардан биридир.

Жаҳонда жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимларини ўзаро функционал боғликлигини асослашга қаратилган қатор илмий тадқиқотлар амалга оширилмоқда. Бу борада in vitro ва in vivo тажрибаларида интакт, ҳамда жигар циррози ва тетрахлорметан билан захарланган ҳайвонлар гепатоцитлари нитрергик ва монооксигеназ тизимлари кўрсаткичларига уларнинг индуктор ва ингибиторларини концентрацион боғлиқлигини, бу тизимлар орасида боғланишларни ва ўзаро бошқариш имкониятларини асослаш илмий-тадқиқотларнинг устувор йўналиши бўлиб қолмоқда.

Мамлакатимиз тиббиёт соҳасини ривожлантириш тиббий тизимни жаҳон андозалари талабларига мослаштириш, жигар касалликларини камайтириш мақсадида Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 7 декабрдаги 5590-сон «Соғлиқни сақлаш тизимини тубдан

---

[1]ЖССТ йиллик ҳисоботлари, 2017

[2]Манухина Е.Б., Дауни Г.Ф., Малышев И.Ю. и др. Влияние адаптации к гипоксии на экспрессию изоформ NO-синтазы в миокарде// Патологическая физиология и экспериментальная терапия. -2015. -№4. –С. 73-77

[3]Ванин А.Ф., Перетягин С.П., Мартусевич А.К. Молекулярно-клеточные механизмы трансформации гомеостаза биосистем активными формами кислорода и азота //Медицинский альманах . -2013. – №3. – С. 80-81.

такомиллаштириш бўйича комплекс чора-тадбирлар тўғрисида»[4]ги Фармонида мамлакатимизда аҳолига кўрсатилаётган тиббий ёрдамнинг самарадорлиги, сифати ва оммабоплигини ошириш, шунингдек, тиббий стандартлаштириш тизимини шакллантириш, ташхис қўйиш ва даволашнинг юқори технологик усулларни жорий қилиш, патронаж хизмати ва диспасеризациянинг самарали моделларини яратиш орқали, соғлом турмуш тарзини қўллаб-қувватлаш ва касалликларни профилактика қилиш каби вазифалари белгиланган. Ушбу вазифалар аҳоли орасида жигарнинг сурункали касалликлар асоратларини ташхислаш ва даволашда замонавий тиббий хизмат кўрсатиш даражасини янги босқичга кўтариш ва сифатли тиббий хизмат кўрсатишда замонавий технологияларни қўллашни такомиллаштириш орқали турли даражадаги жигар хасталиклари натижасидаги ўлим кўрсаткичларини камайтириш имконини беради.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ–4947–сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги, 2017 йил 16 мартидаги ПФ-4985-сон «Шошилинч тиббий ёрдамни келгусида такомиллаштириш бўйича чора-тадбирлар тўғрисида»ги, 2018 йил 7 декабрдаги ПФ-5590-сон «Ўзбекистон Республикаси соғлиқни сақлаш тизимини тубдан такомиллаштириш бўйича комплекс чора-тадбирлари тўғрисида»ги Фармонлари, 2017 йил 20 июндаги ПҚ–3071-сон «Ўзбекистон Республикаси аҳолисига 2017–2021 йилларда ихтисослаштирилган тиббий ёрдам кўрсатишни янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги Қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга мазкур диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича халқаро илмий-тадқиқотлар шарҳи[5]. Жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимларини ўзаро функционал боғликлигини асослаш борасида илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасаларида, жумладан, University of Colorado Denver, Mayo Clinic Coleege of Medicine and Science (АҚШ), China Pharmaceutical University, Chongqing Medical University (Хитой), Instituto de Biomedicina de Sevilla (Испания), University of Genoa, Universita del Piemonte Orientale (Италия), University of Saskatchewan (Канада), Turku University (Финляндия), University Otago (Янги Зеландия), Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences (Ҳиндистон), Isfahan University of Medical Sciences (Эрон), National Taiwan University (Taiwan),

[4] Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 7 декабрдаги 5590-сонли «Соғлиқни сақлаш тизимини тубдан такомиллаштириш бўйича комплекс чора-тадбирлар тўғрисида»ги Фармони.

[5]Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи www.college.mayo.edu, www.cpu.edu.cn, www.cqmu.edu.cn, www.ibis-sevilla.es, www.unige.it, www.uniupo.it, www.usask.ca, www.utu.fi, www.otago.ac.nz, www.sgpgi.ac.in, www.mui.ac.ir, www.ntu.edu.tw, www.eimb.ru, www.knmu.kharkov.ua, www.tma.uz ва бошқа манбалари асосида амалга оширилган.

Молекуляр биология институти (Россия), Харківський національний медичний університет (Украина), Тошкент тиббиёт академияси (Ўзбекистон) да олиб борилмоқда.

Жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимиларини ўзаро функционал боғлиқлигини асослашнинг самарали усулларини амалиётга тадбиқ қилиш натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: аутоиммун гепатитлар ривожланишида азот оксиди тизимлари ва оксидловчи стресс механизмлари асосланган (Mayo Clinic Colege of Medicine, АҚШ); кимёвий бирикмаларнинг гепатотоксик хусусиятлари патогенезида оксидатив стресснинг хусусиятлари исботланган (China Pharmaceutical University, Хитой), стеатогепатоз ривожланишида цитохром Р-450 (цит.Р450) гени экспрессияси аҳамияти исботланган (Chongqing Medical University, Хитой); кимёвий моддаларни жигарга салбий таъсирида цитохром Р-450 индукция ва экспрессиясининг ўрни ва аҳамияти исботланган (Chongqing Medical University, Хитой), жигарни турли шикастланишида CYP2E1га аутоантитаначаларни ҳосил бўлиши исботланган (Universita del Piemonte Orientale, Италия); жигарнинг вирусли зарарланишида НАДФН-оксидазани ва цитохром Р450 2Е1 изошакли билан боғлиқлиги (В.А. Энгельгардт номидаги молекуляр биология институти, Россия Федрацияси), инфекцион гепатитларда лимфоцитлар фаоллигини бошқаришда азот оксиди тизими аҳамияти асосланган (Харківський національний медичний університет, Украина), жигар касалликлари патогенезида МОТ генлари полиморфизми, жигарнинг токсик шикастланиш патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимларнинг аҳамияти исботланган (Тошкент тиббиёт академияси, Ўзбекистон).

Жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимларини ўзаро функционал боғлиқлигини илмий асослаш бўйича муаммолар тўлиқ ўрганилмаган. Бу боғланишларни меъёрда ва жигар патологияларида тўлиқ исботлаш, уларни проапоптотик жараёнлари билан бирга кечишини ёритиш, ҳамда монооксигеназа ва нитрергик тизим ферментлари фаоллигини бошқарилиш имкониятларини ишлаб чиқиш турли жигар касалликларини мақсадли фармакотерапияси ўтказиш йўлларини очиб беради.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Яллиғланиш патогенезини ўрганиш тиббиётда муҳим аҳамиятга эга бўлиб, тиббиётнинг неча асрлик тарихига қарамасдан ҳозирги вақтда ҳам ўз аҳамиятини йўқотмаган ҳамда тиббиётнинг ҳамма соҳаларида ўрганилади (Адо А.Д., 2002; Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2005). Яллиғланиш ривожланишида қон айланишини бузилиши муҳим ўрин тутади. Яллиғланиш жараёнида маҳаллий омиллар билан бирга бутун организм, унинг ҳамма структур-функционал тизимлари, яъни иммун, эндокрин ва асаб тизимлари иштирок этади. NO бошқа медиатрларнинг қон томирни кенгайтирувчи хусусиятига ҳам таъсир қилади (кининлар, ацетилхолин, серотонин ва катехоламин, апудоцитар келиб чиқишга эга бўлган полипептид гормонлар) (Малышев И.Ю., Манухина Е.Б., 2009). Охирги йилларда азот монооксиди метаболик тизимлар бошқарувида

(иммун, цитокин, эндокрин, асаб) ҳамда углевод, оқсил ва ёғлар алмашинувида (Северина И.С., 2000; 2006; Wang J. et al., 2010), апоптоз жараёнида (Рязанцева Н.В., ва ҳаммуал. 2010; Chae J.A. et al., 2004) катта ўрин тутиши аниқланган. Ўткир ва сурункали гепатитларда нитрергик тизим фаоллигини ўзгариши тўғрисида маълумотлар берилмоқда (Даминов Т.А., 2006; 2010). Нитрергик тизим ўзгаришлари билан бирга монооксигеназ тизим ферментлари фаоллиги бузилишлари аниқланган. Маълумотлардан келиб чиқиб, жигарда яллиғланиш жараёни келиб чиқишида ушбу икки тизим орасида функционал боғлиқлик бўлиши мумкинлиги тўғрисидаги гипотезани олдинга суриш мумкин. Нитрергик ва монооксигеназ тизимлар каталитик жараёнлар учун бир хил кофакторлардан фойдаланишади, ҳамда НАДФН-цитохром Р-450-редуктазага (НАДФН цит.–С–ред.) ўхшаш СООН-терминал охирларида НАДФН, ФАД ва ФМНлар билан боғланиш локуслари борлиги улар орасидаги функционал боғлиқлик борлигини кўрсатади (Реутов В.П., 2006; Schmidt H.H. et al., 2010). Бу иккала тизим ҳужайрада кислород ва НАДФНдан фойдаланиш учун рақобатлашиши мумкин (Скулачев В.П., 2000; 2008; Арчаков А.И., 2010; Реутов В.П. ва хаммуал., 1998; Зенков Н.К., 2008).

Ўзбекистонда сўнгги йигирма йилликда профессорлар Х.Я.Каримов, Т.О.Даминов, И.Р.Мавляновлар бошчилигида атроф-муҳит омиллари таъсирида гепатоцитларнинг мослашувчанлигини шаклланишида цитохром Р450 изошакллари ўрнини ўрганиш билан бир қаторда, организмнинг турли патологик ҳолатларида гепатоцитлар, меъда ва ичаклар шиллиқ қавати ва ўпкада нитрергик тизим ҳолатни баҳолаш бўйича фаолият олиб борилмоқда. Ўткир ва сурункали гепатитларда жигарнинг нитрергик тизимлари фаоллик даражасининг ўзгариши ўрганилган.

Олинган натижалар янги масалаларни ҳал этишни ва тадқиқотларни давом эттиришни талаб этади. Ҳозирги кунда жигар патологияларида ва меъёрий ҳолатларда гепатоцитларнинг монооксигеназ ва нитрергик тизимларининг ўзаро боғлиқлиги ҳамда фаоллигини бошқариш имкониятлари диққат марказида қолмоқда, бу эса жигарнинг турли шикастланишларида фармакотерапияни мақсадли олиб боришга имкон беради. Бундан келиб чиқадики, жигар патологияларида эндотелий дисфункцияси патофизиологиси гепатологиянинг долзарб вазифаларидан бири бўлиб ҳисобланади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Тошкент тиббиёт академиясининг илмий ишлари режасига мувофиқ ФДСС 12-15 «Жигар яллиғланиш патогенезида нитрергик ва монооксигеназа системасини ўзаро функционал боғлиқлиги» (2012-2016 йй.) мавзусидаги фундаментал грант лойиҳаси доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади жигарнинг шикастланиш патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимларнинг индукция ва ингибиция йўли билан ўзаро функционал боғлиқлигини баҳолашни такомиллаштиришдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

жигар ишемияси шароитида гепатоцитларнинг монооксигеназа ва нитрергик тизимидаги ўзгаришларининг ўзига хосликлари ва улар орасидаги корреляцион боғлиқликни баҳолаш;

жигар ишемия ва реперфузия шароитида моноксигеназа ва нитрергик тизимлар индуктор ва ингибиторларини мазкур тизимларнинг ферментлари фаоллигига таъсирини ўзига хосликларини баҳолаш;

жигардаги проапоптик жараёнларни кечишига нитрергик ва монооксигеназа тизимлар боғлиқлик феноменининг патогенетик аҳамиятини баҳолаш.

интакт каламушлар микросомаларини ажратиб олиш билан ўтказилган in vitro тажрибаларида гепатоцитларнинг нитрергик тизим индукторлари ва ингибиторлари концентрацион боғлиқлигини баҳолаш;

жигар циррози ва тетрахлорметан билан шикастланган ҳайвонлар ва интакт каламушлар гепатоцитлари нитрергик ва монооксигеназа тизимлари фаоллигини бошқаришда МОТ индуктор ва ингибитори самарадорлигини in vivo шароитларда баҳолаш;

жигар циррози ва тетрахлорметан билан шикастланган ҳайвонлар ва интакт каламушлар гепатоцитлари нитрергик тизим индукторлари ва ингибиторлари бошқариш имкониятини in vivo шароитларда баҳолаш;

меъёрда ва патологияда гепатоцитларнинг монооксигеназа ва нитрергик тизимлари ўзаро боғлиқлигини бошқаришда НАДФН–оксидаза ўрнини исботлаш.

Тадқиқотнинг объекти. Тошкент Тиббиёт Академияси виварийи шароитида сақланган, якуний тана оғирлиги 180-210 грамм бўлган 640 дона зотсиз оқ каламушлар олинган.

Тадқиқотнинг предмети сифатида жигар микросомаларидаги нитрергик ва монооксигеназа тизимлари, унинг гомогенатлари ва цитозол суюқлик, плазма ва қон зардоби материаллари олинган.

Тадқиқот усуллари. Қўйилган вазифаларни ҳал этиш ва тадқиқот мақсадига эришиш учун тажриба, лаборатор, иммунофермент, биокимёвий ва статистик тадқиқот усулларидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

жигарнинг турли ўткир шикастланишларида бензонал каламушлар жигари монооксигеназ тизимини фаоллаштириши, азот оксиди маҳсулотлари тизимида дисбаланс ҳолатини бироз пасайтириши, циметидин эса ушбу тизимларда аниқланган бузилишларни чуқурлаштириши асосланган;

юқори ва паст миқдорларда L-аргинин микросомалар инкубацион муҳитига қўшилиши билан боғлиқ ҳолда монооксигеназ тизим ва NOS функционал фаоллигининг турли йўналишли ўзгаришларининг муҳим омиллиги, монооксигеназ тизим цитохром Р-450 С-якунли домени ва eNOS - НАДФН қўллашга нисбатан рақобатбардошлиги исботланган;

NO-тизим носелектив индуктори молсидаминнинг жигар МОТ фаоллигига таъсири миқдорга боғлиқлиги, iNOS селектив ингибитори S-МТ монооксигеназ ва азот оксиди эндотелиал тизимини индуцирлаши,

пероксинитрит даражасининг ортишига қаршилиги, носелектив ингибитори L-NAME эса МОТ ва eNOS фаоллигини пасайтириши ва iNOSни фаоллаштириши асосланган;

гепатоцитлар МОТига азот оксиди тизимининг индуктори ва ингибиторлари таъсири патологик жараённинг оғирлигига боғлиқлиги, йўналишининг бир хиллиги, таъсир даражаси бўйича фарқи; носелектив ингибиторлар учун катта бўлмаган ўзгаришлар хослиги исботланган;

жигарнинг ўткир ишемияси шароитида NO-тизим ва МОТ орасида яқин функционал алоқа, жигар ишемиясида НАДФН цитохром С редуктаза фаоллиги ва МОТнинг барча ферментлари пасайиши ва iNOS гиперэкспрессиясига олиб келиши исботланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

бензонал (75 мг/кг), циметидин (10 мг/кг), L-аргинин (1,56 мкг/мл), молсидамин (0,075 мкг/мл), S-МТ (1,56 мкг/мл), L-NAME (0,1 мкг/мл) ларнинг оптимал концентрацияси аниқланган;

меъёрда ва жигарнинг турли патологияларида гепатоцитларнинг монооксигеназа ва нитрергик тизимлари ўзаро таъсир механизмларини янги қонуниятлари белгиланган; улар орасидаги боғлиқлик НАДФН учун НАДФН цит.–С–ред. ва нитритредуктазалар рақобатига асосланган;

гепатоцитларнинг МОТ ва нитрергик тизимлар ингибиторлари ва индукторлари таъсирининг миқдорга боғлиқлиги асосланган;

жигар патологияси шароитида МОТ ва нитрергик тизимлар индукторларини қўллаш мумкинлиги, ушбу тизим ингибиторлари эса кузатиладиган бузилишларни янада чуқурлаштириб, ҳайвонлардаги ўлим кўрсаткичларини ошириши исботланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги тадқиқот ўтказишда МОТ ва нитрергик тизимлар ингибитор ва индукторлари қўлланилган усул ва ёндошувни тўғри танлаб олинганлиги, назарий маълумотларни олинган натижалар билан мослиги, тадқиқотнинг тўғри ташкил этилганлиги, тажриба хайвонлари сонининг етарлилиги, тажриба, лаборатор, инструментал, биокимёвий ва статистик таҳлил усуллари бўйича қайта ишланганлиги, шунингдек, натижаларини ҳалқаро ҳамда маҳаллий тажрибаларда таққосланган, олинган натижаларни ваколатли тузилмалар томонидан тасдиқлангани билан асосланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти жигарнинг турли патологияларида ва меъёрда гепатоцитларнинг монооксигеназа ва нитрергик тизимларининг ўзаро боғлиқлиги бўйича билимларини маълум даражада тўлдиради. Тажриба натижасида олинган маълумотлар жигарнинг цитохром Р-450 изоферментлари тизимига модуляторларни индуктив ёки ингибирловчи самарасини ривожланиши қайси омиллар ҳисобига юзага келишини тушунтириш ва танланган органдаги махсус функционал-морфологик бузилишларни ривожланишида организмга нохуш таъсир этувчи турли ташқи муҳит омилларини таъсирини ўрганиш учун назарий асос сифатида қўллаш имконини бериши билан изоҳланади.

Тадқиқотнинг амалий аҳамияти организмдаги МОТ ва нитрергик тизимлар ўртасидаги ўзаро яқин алоқа, жигар ишемия/реперфузиясида апоптознинг ривожланишини ўзига хосликлари, гепатоцитларга нитрергик тизимнинг ингибиторлари ва индукторларини ўзаро таъсири аниқланди. Аниқланган механизмлар турли генезли жигар шикастланишларида фармакотерапиянинг асосий принципларини ишлаб чиқишда қўлланиши мумкинлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа системасининг ўзаро функционал боғлиқлигини асослаш бўйича олинган натижалар асосида:

«Қон плазмасида ҳаракатланувчи эндотелиал ҳужайраларни популяцион баҳолаш» услубий қўлланмаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2019 йил 14 январдаги 8н-д/6-сон маълумотномаси). Мазкур услубий қўлланма жигарнинг гепатитнинг юзага келишида қон плазмасидаги эндотелиал хужайраларнинг функционал-морфологик бузилишлари ривожланишининг олдини олиш имконини берган;

«Ўткир заҳарли гепатитда антиоксидант ва нитрергик тизимлар фаоллиги» услубий қўлланмаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2019 йил 1 апрелдаги 8н-д/62-сон маълумотномаси). Мазкур услубий қўлланма гепатитнинг юзага келиши мумкин бўлган асоратларини ва ташхислашнинг янги усулларини ишлаб чиқиш, NOS индуктори ва iNOS селектив ингибитори нитрергик тизимлар кўрсаткичларига ижобий таъсири, бунда азот оксиди нейронал синтазларининг селектив ва носелектив ингибиторлари азот оксиди тизимидаги мавжуд бўлган ўзгаришларнинг янада кўпроқ ёмонлашишига таъсир қиладиган омилларни асослаш механизмларининг олдини олиш имконини берган;

жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа системасининг ўзаро функционал боғлиқлигини асослашни такомиллаштиришга қаратилган тадқиқот натижалари соғлиқни сақлаш амалиётига, жумладан, Тошкент тиббиёт академияси ҳузуридаги олий ўқув юртлариаро марказий илмий-тадқиқот лабораторияси, Фармацевтика институтининг координацион бирикмалар ва фармакотоксик тадқиқотлар лабораторияси ва Тошкент давлат стоматология институтининг стоматология ва юз-жағ жарроҳлиги илмий-амалий марказининг фундаментал тадқиқотлар соҳасига татбиқ этилган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2019 йил 30 апрелдаги 8н-з/44-сон маълумотномаси). Олинган натижаларнинг амалиётга жорий қилиниши жигар патологияларида азот оксиди тизим индуктор ва ингибиторларининг гепатоцитлар монооксигеназа тизимга таъсири патологиянинг оғирлик даражаси ва юбориладиган дори воситаларига боғлиқ натижасида NOS индуктори ва iNOS селектив ингибитори нитрергик тизимлар кўрсаткичларига ижобий таъсири, нитрергик тизим селектив ва носелектив ингибиторлари азот оксиди тизимидаги мавжуд бўлган ўзгаришларни янада кўпроқ ёмонлашишига ҳамда ушбу дори воситаларнинг таъсирини намоён бўлиши гепатоцитлар шикастланишининг оғирлик даражасига боғлиқлигини асослаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 6 илмий-амалий анжуманларда, жумладан 3 та халқаро ва 3 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 31 та илмий иш, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг фан доктори диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 10 та мақола, жумладан, 7 таси республика ва 3 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса ва фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан ташкил топган. Диссертациянинг ҳажми 156 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва аҳамияти асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, тадқиқот объекти ва предмети тавсифланган, республика фан ва технологияларининг устувор йўналишларига мос келиши кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва унинг амалий натижалари ўз ифодасини топган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларининг амалиётга жорий қилиниши, чоп этилган ишлар ва диссертациянинг таркибий тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Жигар яллиғланиши патогенезида монооксигеназа ва нитрергик тизимларини ўзаро функционал боғликлигини асослашнинг замонавий тассавурлари»** деб номланган биринчи бобида мавзу бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижалари, хорижий ва маҳаллий адабиётлар таҳлили батафсил ёритилган. Тадқиқот мақсадидан келиб чиққан ҳолда жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимларини ўзаро функционал боғликлиги таҳлил қилинган, шунингдек, мазкур муаммонинг ўз ечими топилиши лозим бўлган аспектлари белгиланган.

Диссертациянинг **«Жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа тизимларни ўзаро функционал боғликлигини асослаш материал ва усуллари»** деб номланган иккинчи бобида тадқиқот усуллари ва материаллари баён этилган. Тадқиқотлар ТТА МИТЛ базасида тана вазни 180-210 грамм бўлган 640 дона зотсиз оқ эркак каламушларда ўтказилди, улар виварийнинг стандарт шароитларида сақланди. Тажрибалар «Тажриба ва бошқа илмий мақсадлар учун қўлланилувчи умуртқали ҳайвонларни ҳимоя қилиш тўғрисидаги Европа Конвенцияси»га мос холда ўтказилди (Страсбург, 1985). Жами бўлиб тажрибалар бешта серияда ўтказилди:

Тажрибанинг биринчи сериясида тана оғирлиги 180-210 г бўлган 360 та зотсиз эркак оқ каламушларда жигарнинг чап ёнбош ва ўрта бўлимлари қон томир оёқчаларида 180 дақиқа давомида окклюзия йўли билан ишемия/гипоксия ҳосил қилинди. Тадқиқотлар икки кичик қисмларга бўлиб

ўтказилди. Ҳайвонларни тажриба шароитига боғлиқ холда гуруҳларга бўлинди. Барча гуруҳлар учун назорат қилиб интакт ҳайвонлар олинди (ҳар бир гуруҳда 8 донадан ҳайвон ташкил этди).

1-кичик гуруҳ. Тажриба гуруҳида ишемия/гипоксияни жигарнинг чап ёнбош ва ўрта бўлмалари қон томир оёқчаларини ипак ип билан боғлаш йўли орқали ҳосил қилинди. 30, 60, 120, 180 дақиқали жигар ишемия/гипоксиясидан сўнг ҳайвонларни бир зумлик декапитация усули билан сўйилди. Назорат сифатида қон айланиши сақланиб қолган жигар бўлмалари микросомалари (назорат№1) ва интакт ҳайвонлар жигари хизмат қилди (2-назорат).

2-кичик гуруҳ. 180 дақиқали ишемия/реперфузиядан сўнг жигарида қон айланиши тикланган ҳайвонлар, юборилган дори воситасига боғлиқ ҳолда 8 гуруҳга тақсимланди: 1-гуруҳ - бензонални самарали 50 мг/кг; 2-гуруҳ - циметидинни 10 мг/кг; 3-гуруҳ - eNOS носелектив ингибитори Nω-nitro-L-Arginine MethylEgter (L-NAME)ни 10 мг/кг; 4–гуруҳ - 7-nitro-indarole (7-NI) ни 10 мг/кг; 5-гуруҳ - iNOS селектив ингибитори S-MethylEgter (S-MT)ни 3 мг/кг; 6-гуруҳ - L-аргининни 50 мг/кг; 7–гуруҳ - молсидаминни 50 мг/кг миқдорда қабул қилди ва 8-гуруҳни ишемия/реперфузияли ҳайвонлар ташкил этиб, улар оддий сувни қабул қилди.

Тажрибанинг иккинчи сериясида in vivo шароитда МОТ ва нитрергик тизимлар ингибиторлари ва индукторларини интакт каламушлар гепатоцитлари ушбу тизимлари фаоллигига таъсири ўрганилди. Ҳайвонлар тажрибада 6-8 тадан тақсимланган 6 та гуруҳга бўлинди, бунда жами бўлиб ёши ва тана оғирлиги бир хил бўлган 70 дона тажриба ҳайвони иштирок этди. Дори воситалари 6 кун давомида ҳар куни оғиз орқали юборилди. 1-гуруҳ: МОТ индуктори бензонал 10; 25; 75 ва 100 мг/кг; 2-гуруҳ: МОТ ингибитори циметидин 10; 25; 75 ва 100 мг/кг; 3-гуруҳ: NO синтези субстрати L-аргинин 50 мг/кг; 4-гуруҳ: eNOS носелектив ингибитори L-NAME 10 мг/кг; 5-гуруҳ: nNOS селектив ингибиторлари 7-NI 10 мг/кг ва 6-гуруҳ: iNOS селектив ингибитори S-MT 1 мг/кг миқдорда.

Учинчи серияда нитрергик тизим индуктор ва ингибиторлари таъсирининг баъзи патокимёвий механизмларини очиб бериш учун, шунингдек дори воситалар миқдорини танлаб олиш учун бизлар томонимиздан in vitro шароитда тана оғирлиги 180-210 грамм бўлган 70 дона оқ зотсиз эркак каламушларда тадқиқотлар ўтказилди. Хар бир тажриба нуқтасида 6-8 та текширишлар ўтказилди. Бунинг учун бизлар инкубацион муҳитга турли миқдорда дори воситаларини юбордик: NO-тизим субстрати L-аргининни камайиб борувчи концентрацияларда 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,39; 0,195 ва 0,1 мкг/мл (1-кичик гуруҳ); ушбу тизим индуктори молсидаминни камайиб бориш концентрацияларида 2,0; 1,0; 0,075; 0,054 0,025 ва 0,0125 мкг/мл (2-кичик гуруҳ); eNOS носелектив ингибитори L-NAME камайиб бориш концентрациясида 50,0; 25,0; 12,5; 6.25; 3,125; 1,56; 0,78 ва 0,1 мкг/мл (3 кичик гуруҳ); iNOS селектив ингибитори S-MTни камайиб бориш концентрацияларида 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,36 ва 0,78 мкг/мг (4 кичик гуруҳ).

Тўртинчи серияда 60 дона оқ зотсиз эркак каламушларда тери остига CCl_4 (50% ёғли эритма) ни Х.Я.Каримов ва Н.Х.Абдуллаев тавсиясига мос ҳолда ҳайвонларнинг тана оғирлигига 0,4 мл/100г миқдорда тўрт марта юбориш билан жигарда заҳарли шикастланиш юзага келтирилди (1986). Жигарда ўткир заҳарли шикастланишни ривожланганлиги тўғрисида цитолиз, холестаз, мезенхимал яллиғланиш ва жигар - ҳужайра етишмовчилиги кўрсаткичлари асосида хулоса қилинди. АлАТ, γ-глутаминтрансферазалар, ишқорий фосфатазалар, умумий, тўғри ва тескари билирубин миқдори, альбуминлар фаоллиги, тимол синамаларини Mindray BA-88A (Хитой) биокимёвий анализаторида аниқланди. Юборилган дори воситаларига боғлиқ холда ҳайвонлар 7 гуруҳга бўлинди: 1-гуруҳ - бензонални самарали 75 мг/кг; 2-гуруҳ - циметидинни 10 мг/кг; 3-гуруҳ - L-NAMEни 10 мг/кг; 4-гуруҳ - 7-NIни 10 мг/кг; 5-гуруҳ - S-MTни 3 мг/кг; 6-гуруҳ - L-аргинининни 50 мг/кг миқдорда қабул қилди; 7–гуруҳни CCl_4 ҳайвонлар ташкил этиб, улар оддий сувни қабул қилдилар. Дори воситаларни 6 кун давомида меъда ичига юборилди. Назорат гуруҳи сифатида интакт ҳайвонлардан фойдаланилди.

Тажрибанинг бешинчи сериясида 80 дона оқ зотсиз эркак каламушларда 40 кун давомида ҳафтада икки марта тери орасига гелиотриннинг 50 мг/кг миқдорда юбориш йўли билан жигар циррози ҳосил қилинди. 90 кунда жигар - ҳужайравий етишмовчилик кўрсаткичлари, холестатик ва энцефалопатик синдромлар аниқланди. Адабиёт маълумотларига мос холда тажрибанинг 90-120 кунидан жигарда цирротик ўзгаришларнинг морфологик ва биокимёвий белгилари ривожланди (Абдуллаев Н.Х., Каримов Х.Ё.,1986). Юборилган дори воситасига боғлиқ ҳолда ҳайвонлар 7 гуруҳга бўлинди: 1-гуруҳ - бензонални самарали 75 мг/кг; 2-гуруҳ - циметидинни 10 мг/кг; 3-гуруҳ - L-NAMEни 10 мг/кг; 4-гуруҳ - 7-NIни 10 мг/кг; 5-гуруҳ - S-MTни 3 мг/кг; 6-гуруҳ - L-аргинининни 50 мг/кг миқдорда; 7–гуруҳни жигар циррози билан оғриган ҳайвонлар ташкил этиб, улар оддий сувни қабул қилдилар. Дори воситаларни 6 кун давомида меъда ичига юборилди. Назорат гуруҳи сифатида интакт ҳайвонлар гуруҳидан фойдаланилди.

Жигарнинг микросомал фракциясини VAC - 601 (Германия) вакуумли центрифугада дифференциал центрифугалаш йўли билан ажратиб олинди. Тўқималар микросомасидаги NO тизимлар фаоллигининг ҳолати NO_x даражаси бўйича баҳоланди. Нитритлар ва нитратлар (NO_2^- ва NO_3^-) асосий турғун метаболитлар йиғиндиси П.П.Голиков ва ҳаммуаллифлар (2000) томонидан баён этилган усул бўйича аниқланди; NO-синтазаларнинг фаоллиги (NOS) - В.В.Сумбаева, И.М.Ясинский бўйича ўрганилди (2000); пероксинитрит даражаси (ONO_2^-) N.W. Kooy ва ҳаммуаллифлар бўйича (1994), Р.К.Азимов, А.С.Комарин модификацияси асосида (2005) ўрганилди.

Микросомал цитрохомлар Р-450, Р-420 ва b_5 миқдорини T.Omura, R.Sato (1964) усули бўйича аниқланди ва Specord UV-VIS M-40 (Германия) икки нурли спектрофотометрда идентификация қилинди. НАДФН–цит.С-ред. фаоллиги СФ-46 да C.H.Williams, H.Kamin (1961) бўйича, бенз(а)пиренгидроксилаза (Б(а)ПГ) – C.H.Yang, L.P.Kicha (1978) бўйича,

анилингидроксилаза (АГ) - А.И.Арчаков ва ҳаммуал. (1975), N-амидопирин диметилаза (N-АП) - A.Bast, J.Nordhoscк (1981) бўйича, глюкозо-6-фосфатаза (Г-6-Фаза) - N.S Gnosh, N.C. Kar (1983) бўйича, Цитохром С (Цит.С) - Н.А.Гватуа ва ҳаммуал. (1990) бўйича аниқланди. Апоптознинг фаоллиги тўғрисида Р-53 оқсили ва α-ҳавфли ўсмаси некроз омили (ФНО-α) бўйича хулоса қилинди, улар «ELIZA» фирмасининг эритмаларини қўллаган ҳолда иммунофермент усул билан аниқланди.

Олинган натижаларни статистик қайта ишлаш Pentium–IV персонал комьпютерида Microsoft Office Excel–2012 дастур пакети ёрдамида статистик қайта ишлаш функцияларини қўллаган ҳолда амалга оширилди.

Диссертациянинг «**Жигар ишемияси моделида монооксиненаза ва нитрергик тизимларининг ўзаро боғлиқлик механизмлари**» деб номланган учинчи бобида ишемияланган жигардаги монооксигеназа ва нитрергик тизимларни тадқиқ қилиш, хамда ушбу тизимларга индуктор ва ингибиторларнинг таъсири натижалари баён этилган. Жигар ишемияси чақирилган каламушларда Р-450 ва b_5 цитохромлар миқдори патологик ҳолат ривожланиб бориш даражасида камайди, цит.Р420 даражаси эса ишемиянинг давомийлигига боғлиқ холда ишончли равишда ошди. НАДФН–цит.С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП ва Г-6-Фаза ферментлари фаоллиги ишемия ривожланиб бориш даражасида ингибирланди. Ишемия муддатини узайишига мос равишда eNOS фаоллиги камайди, iNOS фаоллиги эса ортди. Ушбу ҳолат ишемиянинг 30, 60, 120 ва 180 дақиқаларида ONO_2^-ни 1,70; 2,46; 2,50 ва 1,35 марта ортишига олиб келди. Шуни таъкидлаш зарурки, қон айланиши сақланиб қолган жигар бўлмалари микросомаларида eNOS фаоллигининг ортиши, ҳамда шунинг оқибатида NOнинг базал даражасининг кўпайиши МОТ ферментлари фаоллигини жадаллиги билан мос тушган, айниқса 30 ва 120 дақиқадан сўнг. Ушбу ҳолатни жигарнинг чап ёнбош ва ўрта бўлмалари қон томир оёқчаларига қўйилган лигатуралар оқибатида ривожланадиган ишемия/реперфузия натижасида юзага келадиган, стрессларга жавоб реакцияси деб, тахмин қилиш мумкин. Бунда 30 дақиқадан сўнг цит.Р-450 миқдори ва eNOS кўрсаткичлари ўртасида кучли тўғри корреляцион боғлиқлик аниқланди - r=0,83 (P<0,01) ва 120 дақиқада - r=0,80 (P<0,01), НАДФН–цит.С-ред. билан ўртача боғлиқлик - r=0,77 ва 0,73 (P<0,05), Б(а)ПГ - r=0,73 ва 0,68 (P<0,05), АГ - r=0,75 ва 0,77 (P<0,01), N-АП - r=0,72 ва 0,70 (P<0,01), Г-6-Фаза- r=0,69 ва 0,67 (P<0,01).

Бундан келиб чиқадики, қон айланиши сақланиб қолган жигар бўлмаларида МОТ ферментлар функционал-метаболик фаоллигини компенсатор ошиш омилларидан бири бўлиб, eNOSнинг интенсификацияси натижасида микросомаларда NO базал даражасининг ортиши ҳисобланади. Микросомалардаги NO даражаси eNOS ферментлар фаоллигига мос холда ошди. Қон айланиши сақланиб қолган жигар бўлмаларидан ажратиб олинган микросомаларда МОТ ферментлари кўрсаткичларига NO параметрларини корреляцион боғлиқликни амалий яқин белгилари қайд этилди, улар r=0,81 ва r=0,85 (P<0,01) чегарасида бўлди.

Шуни таъкидлаш жоизки, қон айланиши сақланиб қолган жигар бўлмаларидан ажратиб олинган гепатоцитлар микросомаларида iNOS ферментларининг спектрал тавсифи ва ONO_2^- концентрацияси интакт ҳайвонларда қайд этилган кўрсаткичлар чегарасида бўлди.

МОТ ва нитрооксигеназа фаоллигини бошқариш механизмларида НАДФН–оксидазанинг муҳимлигини тасдиқлаш мақсадида in vitro тажрибалар ўтказилди. Аниқландики, жигарнинг ишемияланган бўлмаларидан ажратиб олинган микросомаларга 5 мкмоль/мл НАДФНни қўшиш НАДФН–цит.С-ред. фаоллигини 1,35 марта (P<0,01) оширди, iNOS реакция тезлигини 1,6 марта (P<0,001), NO концентрациясини 2,3 марта (P<0,001) ва ONO_2^- миқдорини 1,8 марта (P<0,001)га оширди, eNOS фаоллигини эса 1,4 мартага (P<0,001) камайтирди. НАДФНнинг худди шу миқдорини фаоллаштирилган бўлмаларидан олинган микросомларга қўшиш (№1 назорат) eNOS фаоллигини 1,22 мартага (P<0,01) инициирлади, НАДФН–цит.С-ред.нинг фаоллашиши - 1,4 марта (P<0,001), Г-6-Фаза - 1,27 марта (P<0,01), NO нинг миқдори 1,15 мартага (P<0,05) ортиши кузатилди, iNOS ферменти реакция тезлигини 1,3 марта (P<0,01) пасайиши ва ONO_2^- концентрациясининг даражасини 1,25 марта (P<0,01) пасайиши қайд этилди. Худди шунга ўхшаш тенденция интакт ҳайвонлар жигаридан ажратиб олинган микросомалар билан олиб борилган тажрибаларда кузатилди. НАДФНни қўшиш НАДФН–цит.С-ред.нинг фаоллигини 1,35 мартага (P<0,001) оширди. Бир вақтнинг ўзида iNOSни 1,22 мартага (P<0,05) камайиши фонида, eNOSнинг фаоллиги 1,26 мартага (P<0,01) ортиши ва ONO_2^- концентрациясини 1,31 мартага камайиши кузатилди (P<0,001).

Бизнинг тадқиқотларимиздаги НАДФН–цит.С-ред. реакция тезлигига боғлиқ холдаги МОТ ва нитрооксиредуктаза фаоллигини ўзгаришидаги аниқланган фарқлар, патологик холатларда, жумладан ўткир жигар ишемиясида уларнинг бошқариш механизмларида муҳим боғловчи бўлиб НАДФН хизмат қилишини тасдиқлайди.

Ишемия/гипоксияда микросомаларнинг оқсил структурасини шикастланиши мавжуд эмаслигини мухим кўрсаткичи бўлиб, ишемиянинг барча муддатларида микросомал оқсил миқдорини интакт ҳайвонлар кўрсаткичлари даражасида сақланиши ҳисобланади. Шундан таҳмин қилиш мумкинки, МОТ микросомал ферментлари миқдорини пасайишининг сабабларидан бири бўлиб, бизнинг фикримизча, iNOS инициацияси билан боғлиқ холда NO ва ONO_2^- гиперэкспрессияси ҳисобланади. NO, iNOS ва ONO_2^- ортишини цит.Р-420 билан тўғри боғлиқлиги (r=0,86-0,91) ва цит.Р-450, b_5, НАДФН–цит.С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП ва Г-6-Фаза фаоллиги билан тескари корреляцияси, хамда eNOS фаоллигини пасайиши ушбу ферментлар билан тўғри боғлиқлиги (r=0,87-0,96), шунингдек цит.Р-420 билан тескари алоқаси ушбу гипотезани тасдиқлайди.

180 дақиқали жигар ишемиясидан сўнг каламушларда тадқиқотнинг биринчи кунида жигар микросомларида гепатоцитлар МОТ фаоллигини кескин пасайишини кузатдик (1-жадвал). Кейинги муддатларда эса бизлар микросомаларда ферментларни фаоллашишини ва миқдорини аста секин

ортишини кузатдик, бу айниқса тажрибанинг 10 кунида яққол намоён бўлди, бу тажриба ҳайвонлари организмида компенсатор механизмларни маълум даражада фаоллашиши билан боғлиқдир. Бироқ, шундай ижобий силжишларга қарамасдан, уларнинг тўлиқ тикланиши кузатилмади, чунки барча ўрганилган кўрсаткичлар интакт каламушлар кўрсаткичларидан ишончли фарқ қилди.

1-жадвал

Гипоксия/ишемиядан сўнг бензонал ва циметидинни киритишнинг (кун) турли муддатларида гепатоцитлар монооксигеназа тизими кўрсакичлари, M±m

Гуруҳлар ва тажриба муддатлари	P-450, нм/мг	НАДФН-цит.С-ред., нм/мин/мг	АГ, нм/мин/мг	Г-6-Фаза, нм/мин/мг
Назорат	0,97±0,03	106,9±3,95	0,88±0,023	79,8±3,06
Ишемия: 1 кун	0,30±0,02***	8,4±0,29***	0,30±0,017***	24,7±1,03***
3 кун	0,37±0,02***^	13,7±0,44***^^^	0,37±0,015***^^	39,5±1,65***^^^
10 кун	0,45±0,02***^^^	21,1±0,87***^^^	0,41±0,018***^^^	43,3±1,17***^^^
Ишемия+Б: 1 кун	0,35±0,02***	8,9±0,36***	0,35±0,019***	25,3±1,23***
3 кун	0,68±0,02***^^^	68,1±2,48***^^^	0,51±0,022***^^^	45,9±1,34***^^^
10 кун	1,55±0,06***^^^	120,4±6,35^^^	1,46±0,061***^^^	82,7±3,56^^^
Ишемия+Ц: 1 кун	0,29±0,02***	8,5±0,33***	0,32±0,018***	23,9±1,16***
3 кун	0,31±0,01***	13,1±0,59***^^^	0,34±0,015***	37,2±1,48***^^^
10 кун	0,28±0,01***	17,5±0,58***^^^	0,29±0,016***	28,6±0,89***^^

Изоҳ: * - фарқлар назорат гуруҳи кўрсаткичларига нисбатан аҳамиятли (** - P<0,01, *** - P<0,001); * - фарқлар гипоксия гуруҳи кўрсаткичларига нисбатан аҳамиятли (^ - P<0,05, ^^ - P<0,01, ^^^ - P<0,001).

Бензонал 1 кун давомида киритилгандан сўнг, дори воситаси киритилмаган ҳайвон гуруҳи билан таққосланганда, ишемиядан кейинги жигар микросомаларида ўрганилаётган МОТ ва NOS фаоллигини тавсифловчи кўрсаткичларга сезиларли таъсир кўрсатмади. Кейинги муддатларда эса (3 кундан сўнг) бензонал цит.P-450 ва b_5 нинг паст миқдорини ишончли равишда оширди, цит.P-420нинг ортган даражасини камайтирди, МОТ ферментларини фаоллаштирди ва микросомал оқсил миқдорини оширди. Бензонални янада узоқроқ киритиш МОТни кўпроқ фаоллашишига олиб келди ва интакт каламушлар кўрсаткичлари даражасига етди. Шу билан бир вақтда МОТ ингибитори бўлган циметидин ишемияланган жигар гепатоцитларидаги МОТ кўрсаткичларида мавжуд бўлган бузилишларни янада чуқурлаштирди, бу айниқса тажрибанинг 10 кунида яққол намоён бўлди.

Тажриба ҳайвонлари жигаридаги ишемияланган майдондан ажратилган микросомаларда нитрергик тизимини фаоллиги ишемия бошланишининг биринчи кунидан кейин (2-жадвал) eNOS фаоллиги сусайиши (2,2 марта) ва iNOS фаоллашиши (3,5 марта) билан тавсифланди. NO синтези ферментлари фаоллигидаги бундай ўзгаришлар NO ва айниқса ONO_2^- миқдорини ортишига олиб келди. Бизнинг натижаларимизда, гепатоцитларнинг МОТ ва нитрергик тизимларидаги бундай ўзгаришлар гепатоцитларнинг ишемияланган бўлимларида деструктив жараёнларни ривожланиши билан боғлиқ бўлади, чунки микросомал оқсил миқдори ишончли даражада пасайди.

2-жадвал

Ўткир ишемия/гипоксиядан сўнг бензонал ва циметидинни киритишнинг (кун) турли муддатларида жигар микросомаларида NO-тизим фаоллик кўрсаткичлар динамикаси, M±m

Гурух ва муддат	NO, мкМ/мг	eNOS, мкМ/дақ/мг	iNOS, мкМ/дақ/мг	ONO_2^-, мкМ/мг	оқсил мс, мг/мл
Назорат	5,5±0,16	17,4±0,62	0,10±0,002	0,080±0,016	36,8±1,22
Ишемия: 1 кун	8,6±0,33***	7,9±0,29***	0,35±0,017***	0,23±0,010***	29,5±1,13***
3 кун	8,1±0,27***	8,5±0,35***	0,23±0,009***^^^	0,19±0,009***^	30,8±1,09**
10 кун	7,6±0,28***^	9,7±0,42***^^	0,17±0,006***^^^	0,14±0,007**^^^	31,2±1,18**
Ишемия+Б 1 кун	8,7±0,29***	8,3±0,21***	0,32±0,019***	0,22±0,011***	29,1±1,26***
3 кун	6,3±0,26*^^^	12,5±0,43***^^^	0,17±0,005***^^^	0,16±0,006***^^^	31,7±1,31*^^^
10 кун	5,8±0,22^^^	18,4±0,59^^^	0,11±0,004*^^^	0,07±0,005*^^^	37,5±1,42
Ишемия+Ц: 1 кун	8,9±0,39***	8,1±0,28***	0,36±0,019***	0,25±0,013***	28,7±1,26***
3 кун	10,6±0,37***	8,4±0,15***	0,33±0,012***	0,21±0,011***^	28,3±1,33**
10 кун	13,5±0,52***	7,2±0,18***^	0,46±0,021***^^	0,35±0,014***^^^	32,6±1,40*

Изоҳ: * - фарқлар назорат гуруҳи кўрсаткичларига нисбатан аҳамиятли (** - P<0,01, *** - P<0,001); * - фарқлар гипоксия гуруҳи кўрсаткичларига нисбатан аҳамиятли (^ - P<0,05, ^^ - P<0,01, ^^^ - P<0,001).

Бензонал киритишнинг биринчи кунида бизлар NO тизимида сезиларли ўзгаришларни кузатмадик. Тажрибанинг кейинги муддатларида бизлар eNOS фаоллигини аста секин ортишини, iNOS фаоллигини пасайишини кузатдик, булар NO ва ONO_2^- даражаларини статистик аҳамиятли пасайишига олиб келди. NO тизим кўрсаткичлари меъёрий катталикларга яқинлашди. Тажрибанинг биринчи кунида циметидин NO тизими кўрсаткичларига сезиларли таъсир кўрсатмади, дори воситасини киритишни яна давом эттирилиши NO тизимида мавжуд бўлган дисбалансни янада кўпроқ ёмонлаштирди.

Корреляцион таҳлил кўрсатдики, ишемия/гипоксия гуруҳида eNOS параметрлари NO билан r=-0,62; iNOS билан эса - r=-0,67 ва ONO_2^- билан - r=-0,64 тескари корреляцион боғликликка эга бўлди, шанслар нисбати (ШН) -

0,78; 1,84 ва 1,86 ни ташкил этди, яъни микросома фракцияларида eNOS фаоллигини пасайиши ONO_2^-, iNOS ва NO миқдорини ортиши ўртасида алоқа мавжудлигини юқори эҳтимоли қайд этилди. Шуни таъкидлаш зарурки, ушбу муносабат 1 га қанча яқин бўлса, назорат ва тажриба гуруҳлари орасидаги фарқ шунча кам бўлади. 1 га тенг бўлган ШН-қиёсий омиллар ўртасида алоқанинг мавжуд эмаслигидан гувоҳлик беради, ШН<1 - тескари алоқанинг мавжудлигидан ва ШН>1 - белгиларнинг тўғри алоқасидан дарак беради. Бундан келиб чиқадики, ишемия/гипоксияли ҳайвонларда NO ва eNOS ШН кўрсаткичлари бўйича тескари боғлиқликка эга (<1), iNOS ва ONO_2^- эса – тўғри боғлиқликка эга (>1).

Худди шу каби натижалар, олдинги тажрибалар билан солиштирилганда, МОТ ингибитори циметидин киритилганда бизлар томонимиздан eNOS билан NO, iNOS ва ONO_2^-ни ўзаро алоқаси ўрганилганда олинди. Бунда ШН кўрсаткичи NO билан eNOS алоқасининг таҳлилида 0,13ни ташкил этди, яъни у ишемия/гипоксия «тоза» гуруҳига нисбатан солиштирилганда 83,3% га пасайди, бу эса ушбу кўрсаткичлар боғлиқлиги эҳтимоли 83,3%га ошганлигини кўрсатади. eNOS билан iNOS ва ONO_2^- боғлиқликни баҳолашда аниқландики, улар мос холда 7,7 ва 6,1ни ташкил этди, яъни ШН кўрсаткичи «тоза» ишемия/гипоксия гуруҳига нисбатан 418,5% ва 328,0% га ошди ($P<0,001$). Олинган маълумотлар асосида шундай хулоса қилиш мумкинки, 10 кун МОТ ингибитори циметидин киритилгандан сўнг ишемияланган жигар микросомаларида eNOS билан iNOS, ONO_2^- ва NO орасидаги боғлиқ ШН ортади, бу билан уларнинг ксенобиотиклар биотрансформацияси тизими ферментларига кўрсатадиган зарарловчи таъсир имкониятлари ортади. Дори воситалари метаболизми индуктори бензонал фармакологик таъсирини баҳолашда аниқландики, NO ни eNOS билан алоқасининг таҳлилида ШН кўрсаткичлари, назорат гуруҳи билан амалий жиҳатдан тенглашди ва 1,1ни ташкил этди, iNOS ва ONO_2^- билан -0,9 ва 0,86ни ташкил этди, яъни бензонал NOнинг микросомалардаги даражасини ўзгаришига, iNOS фаоллигини пасайишига ва ONO_2^-нинг цитотоксик миқдорига ижобий таъсир кўрсатади. Таҳминча, ҳайвонларга бензонални киритишда айнан iNOS фаоллиги ва ONO_2^- даражасини пасайиши билан eNOS фаоллигининг сезиларли бўлмаган даражада ортиши, микросомларда NO концентрациясини назорат кўрсаткичигача тикланишига боғлиқ. Жигари ишемия/реперфузияли ҳайвонларга L-аргининни киритилиши цит.P-450, b_5 паст миқдорини аста-секин ортишига, цит.P-420нинг юқори даражасини пасайишига сабаб бўлди (3-жадвал).

Дори воситаси киритилишининг барча муддатларида МОТ ферментларининг фаоллиги ишончли равишда ортиб борди. Бироқ, шундай ижобий силжишларга қарамасдан ўрганилаётган кўрсаткичларни тўлиқ тикланишини кузатилмади. Айниқса НАДФН–цит.С-ред. ферменти фаоллиги ишончли равишда 2,07 марта пастлигича сақланиши яққол намоён бўлди. Молсидаминнинг ишемияланган жигардаги МОТ компонентлари фаоллигига таъсири L-аргининни қўллашга нисбатан сустроқ равишда намоён бўлди.

3-жадвал

Жигарнинг гипоксия/ишемиясидан 180 дақиқадан сўнг ҳайвонларга NO-тизим индукторларини киритишнинг турли муддатларида гепатоцитлар микросомаларида монооксигеназ фаоллик даражасининг динамикаси, M±m

Гуруҳ	Р-450, нм/мг	НАДФН-цит.С-ред, нм/мин/мг	АГ, нм/мин/мг	Г-6-Фаза, нм/мин/мг
Назорат	0,97±0,031	106,9±3,95	0,88±0,023	79,8±3,06
Гипоксия: 1 кун	0,30±0,018***	8,4±0,29***	0,30±0,017***	24,7±1,03***
3 кун	0,37±0,015***^	13,7±0,44***^^^	0,37±0,015***^^	39,5±1,65***^^^
10 кун	0,45±0,018***^^^	21,1±0,87***^^^	0,41±0,018***^^^	43,3±1,17***^^^
Гипоксия+ L-АР: 1 кун	0,46±0,022***	13,3±0,39***	0,45±0,026***	36,8±1,37***
3 кун	0,54±0,024***^	39,7±1,87***^^^	0,58±0,033***^^	40,9±1,25***^
10 кун	0,70±0,028***^^^	64,8±2,51***^^^	0,79±0,035^^^	61,9±2,73***^^^
Гипоксия+ М:1 кун	0,40±0,016***	10,7±0,59***	0,43±0,019***	30,2±1,12***
3 кун	0,45±0,019***^	31,3±1,16***^^^	0,51±0,023***^	41,7±1,31***^^^
10 кун	0,59±0,026***^^^	54,6±1,82***^^^	0,63±0,025***^^^	52,5±2,14***^^^

Изоҳ: * - фарқлар назорат гуруҳи кўрсаткичларига нисбатан аҳамиятли (** - P<0,01, *** - P<0,001); * - фарқлар гипоксия гуруҳи кўрсаткичларига нисбатан аҳамиятли (^ - P<0,05, ^^ - P<0,01, ^^^ - P<0,001).

Ишемия/реперфузияси бўлган каламушлар жигаридаги микросомал фракцияларнинг нитрергик тизими фаоллигиниинг таҳлили ишемиянинг биринчи кунида интакт гурух кўрсаткичларига нисбатан eNOS фаоллигини кескин пасайишини, iNOSнинг фаоллашишини кўрсатди, бу эса азот оксиди ва унинг заҳарли шакли – ONO_2^-нинг ортишига олиб келди. Кейинчалик юқорида келтирилган кўрсаткичлар меъёрлашиш тенденциясига эга бўлди, бироқ, хаттоки тажрибанинг 10 кунида ҳам улар интакт каламушлар кўрсаткичларидан ишончли фарқ қилди.

Азот оксиди синтези субстрати L-аргининни киритилиши тажрибанинг биринчи кунидан сўнг ишемияланган жигарнинг микросомал фракцияларида eNOSнинг паст фаоллигини ортишига, iNOSнинг юқори фаоллигини пасайишига, ONO_2^- ва NO даражасини пасайишига олиб келди. Кейинчалик юқорида келтирилган кўрсаткичлар ортиш тенденциясига эга бўлди, айниқса тажрибанинг 10 кунида улар интакт каламушлар кўрсаткичларидан фарқ қилмади. Жигар ишемияси чақирилган каламушларга молсидаминни киритилиши ҳам eNOSнинг фаоллашишига, iNOS фаоллигини пасайишига, NO ва ONO_2^- даражасини пасайишига олиб келди. Дори воситасини киритилиш давомийлигини ортиши давомида унинг ижобий таъсири ўсиб борди ва якуний

муддатларда бизлар юқорида санаб ўтилган кўрсаткичларни интакт каламушлар кўрсаткичларига яқинлашганлигини кузатдик. Бироқ шуни таъкидлаш зарурки, молсидаминнинг таъсири L-аргининга нисбатан таққосланганда бир неча бор кучсиз бўлди. Жигар ишемия/реперфузиясида гепатоцитлар МОТ фаоллигига азот оксиди тизими ингибиторлари таъсирини таҳлили шуни кўрсатдики, 1 кундан 10 кунгача eNOS ва nNOSни носелектив ингибитори L-NAME билан блокада қилиниши янада кўпроқ салбий оқибатларга олиб келди (4-жадвал). nNOS - селектив ингибитори 7-NIни қўллашда худди юқоридагига ўхшаш, аммо камрок даражадаги ўзгаришлар аниқланди. Шу билан бир вақтда iNOS селектив ингибитори S-MTни киритилишида гепатоцитлар МОТ функционал фаоллигини динамик ортиши кузатилди. Бироқ бизлар ўрганилаётган кўрсаткичларни тўлиқ тикланишини кузатмадик, чунки ўрганилаётган кўрсаткичлар интакт каламуш кўрсаткичларидан ишончли фарқ қилади.

4-жадвал

Жигарнинг гипоксия/ишемияси 180 дақиқадан сўнг нитрооксигеназ тизими ингибиторларининг киритишнинг турли муддатларида гепатоцитлар микросомасини монооксигеназа фаоллиги даражасининг динамикаси, M±m

Гуруҳ	P-450, нм/мг	НАДФН-цит.С-ред, нм/мин/мг	АГ, нм/мин/мг	Г-6-Фаза, нм/мин/мг
Назорат	0,97±0,031	106,9±3,95	0,88±0,023	79,8±3,06
Гипоксия: 1 кун	0,30±0,018***	8,4±0,29***	0,30±0,017***	24,7±1,03***
3 кун	0,37±0,015***^	13,7±0,44***^^^	0,37±0,015***^^	39,5±1,65***^^^
10 кун	0,45±0,018***^^^	21,1±0,87***^^^	0,41±0,018***^^^	43,3±1,17**^^^
Гипоксия+L-NAME: 1 кун	0,27±0,016***	8,8±0,34***	0,28±0,009***	21,2±0,89***
3 кун	0,29±0,015***	10,9±0,49***^^	0,29±0,011***	28,6±0,94***^^^
10 кун	0,25±0,011***	16,2±0,58***^^^	0,26±0,008***	21,9±0,83***
Гипоксия+7-NI:1 кун	0,31±0,020***	9,3±0,42***	0,31±0,013***	22,5±0,81***
3 кун	0,34±0,022***	13,5±0,51***^^^	0,34±0,011***	33,7±1,17***^^^
10 кун	0,40±0,019***^^	23,6±1,04***^^^	0,26±0,009***^^	41,5±1,03***^^^
Гипоксия+S-MT:1 кун	0,33±0,017***	8,7±0,33***	0,33±0,009***	27,3±0,99***
3 кун	0,49±0,022***^^^	20,8±0,69***^^^	0,51±0,021***^^^	50,7±1,98***^^^
10 кун	0,81±0,031***^^^	79,2±3,09***^^^	0,70±0,027***^^^	64,1±1,86***^^^

Изоҳ: * - фарқлар назорат гуруҳи кўрсаткичларига нисбатан аҳамиятли (** - P<0,01, *** - P<0,001); * - фарқлар гипоксия гуруҳи кўрсаткичларига нисбатан аҳамиятли (^ - P<0,05, ^^ - P<0,01, ^^^ - P<0,001)

Жигар ишемия/реперфузияли каламушларга нитрергик тизимининг номахсус ингибитори L-NAME киритилиши eNOS фаоллигини янада кўпроқ пасайишига, iNOSнинг кескин ортишига, NO ва ONO_2^- миқдорини ортишига олиб келди. Бунда юқорида санаб ўтилган кўрсаткичлар интакт каламуш кўрсаткичларидан статистик аҳамиятли кескинфарқ қилди.

Юқорида санаб ўтилган ўзгаришлар тажриба ҳайвонлари жигарининг оқсил синтезловчи фаолиятини кескин пасайиши билан боғлиқ бўлиб, бу мазкур каламушлар микросомал фракцияларида умумий оқсил даражасини пасайиши билан тасдиқланади. eNOSнинг селектив ингибитори – 7-NI қўлланилиши L-NAMEга ўхшаш таъсир кўрсатди, бироқ унинг таъсири нисбатан сезиларли даражада кучсиз бўлди ва кам даражада намоён бўлди. iNOSнинг селектив ингибитори S-MT, 7-NI дан фарқли равишда кўпроқ намоён бўлган ижобий таъсир кўрсатди. Бунда юқорида санаб ўтилган белгилар якуний муддатларда интакт каламушлар кўрсаткичларидан сезиларли фарқ қилмади. Юқорида санаб ўтилган ўзгаришлар тажриба ҳайвонлари жигарининг оқсил синтезловчи функциясини фаоллашиши билан боғлиқ бўлиб, бу мазкур каламушлар микросомал фракцияларида умумий оқсил даражасини ортиши билан тасдиқланади.

Шундай қилиб, ўтказилган тадқиқотлар таҳлили кўрсатдики, NOS ингибиторлари ишемияланган жигардаги МОТ ферментлари фаоллигига ҳар хил йўналишли таъсир кўрсатади - носелектив ингибитори L-NAME ва селектив ингибитори 7-NI янада кўпроқ даражада пасайтиради, селектив ингибитори S-MT эса аксинча фаоллаштирувчи таъсир кўрсатади. Бу балки, цит.Р-450нинг фаол марказига NO ортиқча миқдорини ва юқори заҳарли бўлган ONO_2^-нинг тўғри таъсири билан боғлиқдир. Мазкур хулосани тасдиқлаш мақсадида биз НАДФНга боғлиқ электротранспорт тизими бўлган жигар микросомалари МОТ асосий ферменти цит.Р-450 билан NO миқдори, шунингдек ONO_2^- ўртасида корреляцион таҳлил ўтказилди. Гипоксиядан сўнг цит.Р-450 ва NO ҳамда ONO_2^- ўртасидаги ушбу корреляцион алоқа статистик аҳамиятли бўлди ва 1, 3 ва 10 кундан сўнг r=0,81-0,89; r=0,83-0,93 ва r=0,90-0,95 (P<0,001)ни мос холда ташкил этди. Тажрибанинг 10 кунида 7-NI ва L-NAME киритилгандан сўнг ушбу алоқа ҳар икки холатларда ҳам r=-0,95-0,98 (P<0,001) ни ташкил этди, S-MT киритилгандан сўнг кузатишнинг ушбу муддатларида корреляцион алоқа назорат гуруҳ кўрсаткичларидан фарқ қилмади ҳамда цит.Р-450 миқдорини NO билан баҳолашда у r=0,3 (P>0,1), ONO_2^- билан баҳолашда эса r=-0,5 (P>0,05) ни ташкил этди. Олинган натижалар МОТ фаоллигини пасайишини микросомалардаги NO ва ONO_2^-миқдор даражасига тўлиқ боғлиқлигини аниқлади.

Шуни таъкидлаш лозимки, жигар ишемия/реперфузияли ҳайвонларда гепатоцитлар апоптози индукциясини акс эттирувчи кўрсаткичларни ишончли даражада ортишини кузатдик. Демак, тажриба ҳайвонлари қон зардобида Р53 оқсили, ФНО-α цитокини ва цит.С миқдори мос ҳолда 1,39; 1,42 ва 1,34 марта меъёрий кўрсаткичларга нисбатан статистик аҳамиятли даражада ортди. Олинган натижалар шундан гувоҳлик берадики, азот

оксиди синтазалари индуцибел шаклларининг кескин фаоллашуви ва гепатоцитларда NOнинг заҳарли метаболитларининг тўпланиши, шикастланган гепатоцитларни йўқотишга йўналтирилган проапоптотик оқсилларни фаоллаштиради.

Шуни таъкидлаш зарурки, бензонал таъсири остида каламушлар қон зардобида P53, ФНО-α ва цит.С нинг кўрсаткичлари, жигарида ишемия/реперфузияли гуруҳ кўрсаткичларига нисбатан 1,28; 1,32 ва 1,25 марта ишончли даражада камайди. Бироқ, барча ўрганилаётган кўрсаткичлар тўлиқ тикланмади. Жигарида ишемия/реперфузияли каламушларга МОТ ингибитори циметидинни киритилиши мазкур гуруҳ ҳайвонларида мавжуд бўлган бузилишларни янада оғирлаштирди. Жумладан, қон зардобида P53, ФНО-α ва цит.С миқдори 1,17; 1,21 ва 1,22 мартага ишемия/реперфузияли каламушларнинг кўрсаткичларига нисбатан статистик аҳамиятли даражада ошди, интакт каламушлар кўрсаткичларига нисбатан эса мос холда 1,64; 1,73 ва 1,65 мартага ошди. Ишемия/реперфузия фонида L-аргинин қабул қилган тажриба ҳайвонларининг қон зардобида P53, ФНО-α ва цит.С миқдори 1,30; 1,26 ва 1,39 марта ишончли равишда пасайди, улар интакт каламуш кўрсаткичларига яқинлашди. Жигар ишемия/реперфузияли ҳайвонларга L-NAMEни киритилишида P-53, ФНО-α ва цит.С 1,31; 1,63 ва 1,41 марта даволанмаган гуруҳ кўрсаткичларига нисбатан ишончли равишда ошди, интакт каламушлар кўрсаткичларига солиштирилганда мос холда 1,83; 2,33 ва 1,90 марта ошди.

NO тизимини цит.P-450 билан алоқасини баҳолашда шуни таъкидлаш зарурки, ушбу тизимларнинг ўз вазифасини мувозанатли бажаришини тавсифи ҳужайранинг нобуд бўлиш дастурини бошқаришда, ҳужайра цикли блокадасида иштирок этувчи генлар экспрессиясида, Bcl-2 модуляцияси ва ДНК фрагментациясида муҳим аҳамиятга эга бўлади.

Диссертациянинг«**Меъёрда ва патологияларда дори метаболизмининг индуктори ва ингибиторлари таъсирида монооксиненаза ва нитрергик тизимлари метаболик фаоллиги**» деб номланган тўртинчи бобида жигар циррозида ва CCl_4 томонидан ҳосил қилинган ўткир заҳарли гепатитда (ЎЗГ) ҳайвонларнинг гепатоцитлар микросомасида NO-тизими ва монооксигеназа фаоллигини ўрганиш натижалари тақдим этилган. Интакт ҳайвонларда бензоналнинг таъсири гепатоцитлар МОТ ферментларининг фаоллашуви, цит.P-450, b_5 миқдорини ортиши ва цит.P-420 нинг пасайишини миқдорга боғлиқлиги билан тавсифланди. Кам миқдорларда дори воситаси eNOS фаоллигини ва NO даражасини оширди, ферментнинг индуцибел шаклини ва унинг маҳсулотлари миқдорини бир неча бор пасайтирди. Янада юқори миқдорларда эса у eNOSни ҳам iNOSни ҳам фаоллаштирди, хамда улар метаболизм маҳсулотларини хосил бўлишини оширди. Дори метаболизми ингибитори циметидин МОТ фаоллигини миқдорга боғлиқ холда пасайтирди. Дори воситаси миқдорга боғлиқ холда ҳам eNOSни, ҳам iNOSни фаоллаштириш орқали NO ва ONO_2^- даражасини оширди.

Жигар патологияси сифатида бизлар CCl_4 киритиш билан хосил қилинган ЎЗГ моделини, шуингдек жигар циррози моделини қўлладик. Барча қўлланилган моделларда бизлар МОТ ферментлар фаоллигини пасайиши ва миқдорини камайишини кузатдик, бироқ уларнинг намоён бўлиш даражаси қўлланилган жигар шикастланиш моделига боғлиқ бўлди. Гепатоцитлар МОТнинг энг юқори ингибирланиши жигар циррози билан оғриган каламушлар учун хос бўлди. CCl_4 билан жигарни шикастлантириш ва жигар циррози моделини қўллашда гепатоцитлар микросомасининг нитрергик фаолияти кўрсаткичлари eNOSни кескин ингибирланиши билан (дастлабки кўрсаткичларга нисбатан 48,7% ва 20,3% пасайиши) ва iNOS индукцияси (дастлабки кўрсаткичларга нисбатан 214,3% ва 272,6% гача ортиши) билан тавсифланди. Бу айниқса жигар циррозида ONO_2^- ва NO миқдорини ортишига олиб келди.

Бензонални олти кун давомида 75 мг/кг миқдорда киритиш цит.Р-450 ва b_5нинг паст даражасини оширди, цит.Р-420нинг юқори миқдорини пасайтирди. CCl_4 билан жигарнинг ўткир шикастланишида НАДФН–цит.С-ред., АГ, N-АП ва Г-6-Фаза ферментлар фаоллиги ишончли даражада ошди, жигар циррози моделида эса ижобий самара оз даражада намоён бўлди.

Бензонал патология шароитларида CCl_4 билан жигарида ўткир шикастланиши бўлган каламушлар микросомаларида eNOSни бир оз оширди, NO ва ONO_2^- миқдорини камайтирди. Жигар циррози чақирилган каламушларда бензонал таъсири суст бўлди. Бундан келиб чиқадики, бензонал жигарда шикастланиши бўлган каламушларда МОТни фаоллаштиради, азот оксиди маҳсулотлари тизимида дисбалансни бир оз пасайтиради.

Циметидин ингибитори 10 мг/кг миқдорда CCl_4 билан чақирилган ЎЗГда ва айниқса жигар циррози билан оғриган ҳайвонларда МОТ ферментлар фаоллигини янада кўпроқ пасайтирди. Жигарда шикастланиши бўлган каламушларда жигар микросомаси нитрергик тизимлари бузилишларини коррекция қилишда циметидинни қўллаш самарадорлигини баҳолаш, мавжуд бўлган бузилишларни янада чуқурлаштирганлигини кўрсатди. Дори воситасининг салбий таъсири гепатоцитларнинг нитрергик тизим кўрсаткичларида ҳам қайд этилди, бу эса eNOSни янада кўпроқ ингибирланиши ва iNOSни кескин фаоллаштириши билан намоён бўлди. Бунда NO ва ONO_2^- миқдорини ортишини кузатдик.

Келтирилган маълумотлардан кўриниб турибдики, МОТ классик индуктори бензонал гепатоцитлар микросомасининг МОТ ва нитрергик тизимга ижобий таъсир кўрсатди, дори метаболизми ингибитори циметидин эса МОТ фаоллигини пасайтирди, азот оксидининг заҳарли радикалларини ҳосил бўлишини кучайтирда, бу эса жигар хасталиклари билан оғриган беморлар холатини янада ёмонлашишига олиб келиши мумкин.

Диссертациянинг **«Меъёрда ва патологияда азот оксиди тизимлари индукторлари ва ингибиторларини таъсирида монооксиназа ва нитрергик тизимлар метаболик фаоллиги»** деб номланган бешинчи бобида in vivo ва in vitro тажрибаларида тажриба ҳайвонлари жигар микросомаларидаги монооксиназа ва нитрергик тизим кўрсаткичларига азот оксиди тизимининг индуктор ва ингибиторлариниг таъсирини баҳолаш натижалари келтирилган. In vitro тажрибада азот оксиди тизимининг индуктори L–аргинин 0,100 дан 25 мкг/мл гача миқдорда МОТ кўрсаткичларига фаоллаштирувчи, юқори миқдорда эса салбий таъсир кўрсатди. Инкубацион муҳитга азот оксиди синтези субстратини қўшилиши интакт каламушлар жигар микросомаларида eNOS фаоллигини статистик ишончли даражада ортиши билан боғлиқ холда, NO даражасини бир оз ортишига олиб келди. Шу билан бир вақтда фақат паст концентрацияларда iNOS фаоллиги пасайди ва ONO_2^- миқдори камайди. Бундан кўринадики, L-аргининнинг субнормал концентрациялари NOS ва МОТда цит.Р-450нинг С-доменлари стимуляцияси, NOнинг ортиқча миқдорини зарарсизлантириш ва унинг самарали утилизацияси бўйича ўзаро функционал боғлиқликни оптималлаштириш учун етарли субстрат бўлиб ҳисобланади. Бу холат охир оқибат цит.Р-420, NO ва ONO_2^-, iNOS фаоллиги миқдорий даражасини назорат кўрсаткичларигача тиклашга, яъни МОТ ва eNOSни фаолият юритиши учун ижобий шароит яратиб синергистлардек таъсир этди. Микросомалар инкубацион муҳитига L-аргинин юқори концентрациялари (25мкг/л) қўшилганда НАДФН–цит.С-ред. ва eNOS фаоллиги орасида тўғри корреляцион боғлиқлик (r=0,83,P<0,01), iNOS ва НАДФН–цит.С-ред. ўртасида кучли тескари боғлиқлик (r=-0,95 P<0,001) кузатилиши буни кўрсатади.

НАДФН–цит.С-ред.ни НАДФН-оксидаза инициация механизмларидаги муҳимлигини асослашда биз in vitro тажрибаларининг алоҳида серияларида L-аргининнинг катта миқдори (25 мкг/мл) қўшилган микросома инкубациясига НАДФН-оксидазасининг махсус ингибитори бўлган апоцинин воситасини 3мл инкубацион муҳитга 1 ва 3 мМ миқдорда қўшиш орқали ўтказдик. Аниқландики, 1 ва 3 мМ миқдорда апоцинин қўшилганда фақат L-аргининнинг 25 мкг/мл миқдорини сақлаган намуналари билан солиштирилганда, eNOS фаоллигининг ортиши, iNOS фаоллигини, NO ва ONO_2^- даражаси пасайиши фонида НАДФН–цит.С-ред.фаоллиги ортади. Бундан келиб чиқадики, юқори ва паст миқдорларда L-аргининни микросомалар инкубацион муҳитида мавжуд бўлишига боғлиқ холда, МОТ ва NOS функционал фаоллигини турли йўналишларда ўзгаришининг муҳим омили бўлиб, eNOS ва МОТда цит.Р-450нинг С - доменида НАДФНни қўллаш учун рақобатли муносабати ҳисобланади.

In vitro тадқиқотларда аниқландики, интакт ҳайвонлар жигаридан ажратиб олинган микросомалар инкубацион муҳитига NO-тизим носелектив индуктори молсидаминни ҳамма қўшилган миқдорларида НАДФН–цит.С-ред. фаоллигига сезиларли таъсир кўрсатмади. Дори воситаси eNOS фаоллигига миқдорга боғлиқ холда индуктив таъсир

кўрсатди, бунда iNOS фаоллиги ва ONO_2^- даражаси барча қўлланилган миқдорларида сезиларли ўзгаришларга учрамади. Нитрергик тизим ингибитори S-MTни киритиш 3,125 мкг/мл концентрациядан бошлаб, интакт каламушлар жигар микросомасида НАДФН–цит.С-ред. миқдорини оширди. Шу билан бир қаторда дори воситаси мазкур миқдорда eNOS фаоллигини ва NO даражасини ортишига олиб келди. iNOS фаоллиги ва ONO_2^- даражаси ривожланиб бориш даражасида камайди. Азот оксиди тизими носелектив ингибитори L-NAME барча тадқиқ қилинган концентрацияларда гепатоцитлар МОТ фаолиятини ва eNOS фаоллигини камайтирди, бир вақтнинг ўзида iNOSни фаоллаштириш билан бирга, NO билан кислородни фаол радикаллар ҳосил қилишини тезлаштирди.

Юқорида келтирилган маълумотларга асосланиб, тадқиқотларнинг кейинги вазифалари бўлиб, тажриба ҳайвонлари жигар микросомларида NOS таркибининг изоферментлар фаоллиги билан функционал ўзаро боғлиқлиги имкониятини аниқлаш, монооксигеназа ферментлар фаоллигига NO синтези ингибиторлари ва индукторларини таъсирини ўрганиш ҳисобланади. Олиб борилган тадқиқотлар шуни кўрсатдики, интакт каламушларга 6 маротаба 50 мг/кг миқдорда азот оксиди синтези субстрати L-аргинин киритиш цитохромлар миқдорини статистик аҳамиятли даражада оширди, НАДФН–цит.С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП ва Г-6-Фаза ферментларини фаоллашишига олиб келди. L-NAMEни 6 кун давомида 10 мг/кг миқдорда киритиш МОТ фаолиятини статистик аҳамиятли сусайтирди.

Интакт каламушларга 6 кун давомида 10 мг/кг миқдорда nNOS ингибитори - 7-NI киритилганда, худди L-NAME каби таъсир кўрсатди, фақат унинг намоён бўлиш даражаси сустроқ бўлди. iNOS селектив ингибитори - S-MT 1 мг/кг миқдордада гепатоцитларнинг цит.Р-450га боғлиқ тизимини фаоллаштирди.

Шуни таъкидлаш жоизки, жигар микросомларида L-аргинин eNOSни фаоллаштирди ва NOни ажралиб чиқишини кўпайтирди, бир вақтнинг ўзида эса ONO_2^- даражаси ва iNOS фаоллиги пасайтирди. L-NAME eNOSни ингибирлади, iNOSни фаоллаштирди. Бироқ, 7-NI eNOS фаоллигига сезиларли таъсир кўрсатмади, аммо iNOSни фаоллаштирди. S-MT eNOS фаоллигини оширди ва iNOS фаоллигини пасайтирди. Бизнинг қарашларимизча NOS селектив ва носелектив ингибиторлари ва NO индуктори L-аргининнинг таъсирида жигар детоксикация фермент тизимлари модуляцияловчи самарасининг асосида, нафақат NOS ферментлар фаоллиги ва L-аргинин даражасининг ўзгариши, балки уларда ONO_2^- миқдорини ўзгаришига сабаб бўлувчи жараёнлар ҳам ётади.

Ушбу маълумотни асослаш мақсадида биз томонимиздан S-MT ва L-NAME киритилган ҳайвонлар гуруҳлари жигар микросомларида NOS кўрсаткичлари ва детоксикация фермент тизимлари кўрсаткичлари ўртасидаги корреляцион боғлиқлик бўйича тадқиқотлар олиб борилди. Аниқландики, L-NAMEни киритилиши цит.Р-420ни ва iNOS фаоллиги ортиши ўртасида ишончли тўғри корреляцион алоқа мавжудлиги билан

(r=0,89-0,96, P<0,001) ва цит.Р-450, b_5, НАДФН–цит.С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП ва Г-6-Фазалар миқдорини камайиши ўртасида (r=0,87-0,93, P<0,001) тескари корреляция мавжудлиги билан тавсифланади. Бир вақтнинг ўзида жигар микросом детоксикация ферментларининг тадқиқ қилинаётган кўрсаткичларининг пасайиши билан L-аргинин ва eNOS кўрсаткичларини пасайиши орасида аниқ, тўғри боғлиқлик аниқланди. S-МТ препаратларини киритилиши, iNOSнинг ингибицияси, ONO_2^- кўрсаткичларини пасайиши Р450, b_5 цитохромларини ошиб боришини микросомал оксидланиш ферментлари - НАДФН–цит.С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП ва Г-6-Фаза фаоллиги корреляция кўрсаткичларини ортиши билан – кучли тескари боғлиқликда кузатилади. Жигар детоксикация тизимининг барча параметрлари билан L-аргинин миқдори ўртасида, eNOS кўрсаткичлари билан кучли тўғри боғлиқлик аниқланди (r=0,90-0,95, P<0,001) (цит.Р-420 бунга кирмайди, чунки у тескари, кучли корреляцияга эга r=0,92-0,97, P<0,001). Шу билан бирга, ушбу органдаги микросомал оксидланиш ўрганилаётган ферментлари фаоллик кўрсаткичлари билан жигар микросомаларидаги NO параметри ўзгариши ўртасида ҳайвонларга S-МТ ҳамда L-NAMEни киритишда корреляцион боғлиқлик аниқланмади.

Тетрахлорметан билан жигарни ўткир шикастланиши чақирилган каламушларга 6 кун давомида L-аргининни киритиш, цит.Р-450нинг паст даражасини оширди ва цит.Р-420нинг юқори кўрсаткичларини пасайтирди. Микросомал ферментлар фаоллиги ошди. NO ингибиторлари L-NAME ва 7-NI тизимларидаги МОТ фаоллигини янада кўпроқ пасайтирди, бу айниқса носелектив ингибиторларда юқори даражада номоён бўлди, бунда ҳайвонларнинг умумий ҳолатини ёмонлашиши ва ушбу гуруҳ ҳайвонлари ўртасида ўлимни юқори даражада бўлиши кузатилди.

Юқорида санаб ўтилган NO-тизими ингибиторларидан фарқли равишда iNOS селектив ингибитори S-МТ қарама-қарши таъсир кўрсатди, бу ҳайвонларнинг умумий холатини яхшиланиши билан намоён бўлди. Жигар циррози билан оғриган каламушлар гепатоцитлари МОТнинг функционал-метаболик параметрларига нитрергик тизимларнинг индуктор ва ингибиторлари таъсирини ўрганиш маълум даражадаги ўзига хос фарқларни кўрсатди. МОТ фаоллигини кескин пасайиш фонида L-аргинин индукторларини киритилиши, микросомал ферментлар фаоллиги ва цитохромлар миқдорига ўзининг сезиларли таъсирини кўрсатмади.

Шуни таъкидлаш жоизки, L-NAME ва S-МТ жигар циррози билан оғриган каламушлар микросома фаолиятига янада кўпроқ, кескин пасайтирувчи таъсир кўрсатди, 7-NI ни қўллаш эса камроқ намоён бўлган таъсирни кўрсатди.

Бизнинг тадқиқотларимизнинг кейинги босқичида юқорида келтириб ўтилган дори воситаларни жигар патологиясида NO тизим кўрсаткичларига таъсири баҳоланди. Ўтказилган тадқиқотлар кўрсатдики, CCl_4 ўткир гепатит ёки жигар циррози билан оғриган каламушларга 6 кун давомида NO тизим индуктори L-аргининни юбориш iNOSни пасайиши ва eNOSнинг бир қадар фаоллашишига олиб келди. Балки, кислороднинг

эркин радикалларини жадал суратда хосил бўлиши гепатоцитлар деструкциясини янада кўпроқ тезлаштирди, бу эса ҳайвонларнинг умумий холатини кескин ёмонлашиши билан намоён бўлди. Шу билан бир вақтда iNOSни ингибитори S-MTни киритилиши қарама қарши таъсир кўрсатди: у iNOS ишини блоклади, аммо eNOSни фаоллаштирди, бу билан NO ва ONO_2^-ни хосил бўлишини пасайишига олиб келди.

Шуни таъкидлаш жоизки, NOS индуктори ва iNOS селектив ингибитори нитрергик тизимлар кўрсаткичларига ижобий таъсир кўрсатади, NO нейронал синтазаларининг селектив ва носелектив ингибиторлари эса NO тизимидаги мавжуд бўлган бузилишларни янада кўпроқ мураккаблаштиради. Ушбу дори воситалари таъсирини намоён бўлиши гепатоцитлар шикастланишини оғирлик даражасига боғлиқ бўлди.

ХУЛОСАЛАР

«Жигар яллиғланиши патогенезида нитрергик ва монооксигеназа системасини ўзаро функционал боғликлиги» мавзусидаги докторлик диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Жигарнинг ўткир ишемия/гипоксияси чақирилганда тажрибанинг 10 кунигача eNOS ва МОТ ферментлари фаоллигини пасайиши, iNOSнинг фаоллашуви сақланиб қолди. Бензонал МОТ ва NO тизимида мувозанатни тиклади, циметидин эса постишемия/гипоксия оқибатларини янада кўпроқ чуқурлаштирди. NOS ингибиторлари (носелектив L-NAME ва селектив 7-NI ҳамда S-MT) ишемиядан кейинги жигар микросомаларида МОТ фаоллигига ҳар хил йўналишда таъсир кўрсатдилар. L-NAME ва 7-NI ишемиядан кейинги жигардаги ўзгаришларни чуқурлаштирди, S-MT eNOS фаоллигини оширди, микросомаларда NO ва ONO_2^- миқдорини, ҳамда iNOS фаоллигини камайтирди.

2. Микросомаларнинг инкубацион муҳитига НАДФН-оксидаза махсус ингибитори - апоцининни L-аргинин билан бирга қўшиш, eNOS фаоллигини ортиши ва iNOS фаоллигини, NO ва ONO_2^- миқдорини пасайиши мухитида НАДФН–цит.С-ред.фаолллиги ошишига олиб келди, бу eNOS ва МОТда цит.Р-450 С-доменида НАДФН қўлланилиши учун рақобатли муносабатни исботлайди.

3. ЎЗГ ва жигарида ишемия/гипоксияли ҳайвонларда Р53 ва ФНО-α даражасини ортиши, митохондроиялардан цит.Сни ажралиб чиқишини кўпайиши қайд этилди. ЎЗГ (CCl_4)ли ва жигар ишемия/гипоксияли ҳайвонларга дори метаболизми индуктори бензонални 50 мг/кг миқдорда киритиш апоптоз белгиларини сезиларли даражада пасайтирди, циметидинни 10 мг/кг миқдорда қўллаш эса гепатоцитлар апоптозини кучайтирди, Р53 миқдорини кескин оширди, биологик суюқликларда цит.С ва ФНО-α миқдорини оширди.

4. ЎЗГ ва жигар ишемия/гипоксияли ҳайвонларда NO индуктори L-аргинин проапоптик кўрсаткичлар даражасини пасайтирди. NOSнинг

носелектив ингибитори L-NAME P53 оқсил даражаси, ФНО-α ва гепатоцитлар митохондриясидан цит.Сни ажралиб чиқишини жигар ишемия/гипоксия ва ЎЗГ гуруҳига нисбатан солиштирилганда оширди.

5. Ишемияланган жигар бўлагидан ажратиб олинган микросомаларга НАДФН қўшилганда НАДФН–цит.С-ред.ва iNOS фаоллигини оширди; фаол бўлагидан ажратиб олинган микросомаларда - eNOS фаоллигини ошириб, НАДФН–цит.С-ред.ва iNOS фаоллигини сусайтирди, бу эса НАДФН ва кислород жигар МОТ ва NO тизимида мухим ўрин тутиши гипотезасини тасдиқлайди.

6. Интакт ҳайвонларда дори метаболизми индуктори бўлган бензонал ўсиб бориш миқдорда, жигар микросомаларида МОТ ферментлар фаоллигини оширади, eNOS фаоллигини стимуллайди, iNOSни пасайтиради, умумий азот оксиди микдорини динамик ўсиб бориш фонида ONO_2^- ни ҳосил бўлиш даражасини пасайтиради. Дори метаболизмининг ингибитори бўлган циметидин миқдориги боғлиқ ҳолда МОТ фаоллигини пасайтиради, eNOSни ҳам, iNOSни ҳам фаоллаштирилиши натижасида NO ва ONO_2^- даражалари ошади. Бензоналнинг самарали миқдори 75 мг/кг, циметидиники эса - 10 мг/кгни ташкил этади.

7. Бензонал жигарнинг ўткир шикастланиши бўлган каламушларда гепатоцитлар микросомасининг монооксигеназа ва нитрергик тизимларига ижобий таъсир кўрсатади, жигар циррози билан оғриган ҳайвонларга кам даражада таъсир кўрсатади, циметидин эса МОТ фаоллигини янада кўпроқ пасайтирди, NO заҳарли радикалларини хосил бўлишини кучайтирди, бу билан ҳайвонлар холатини янада кўпроқ ёмонлашишига олиб келди.

8. Азот оксиди тизимлари индуктори L-аргинин кичик дозаларда МОТ кўрсаткичларига индуцирловчи таъсир кўрсатди, янада юқори концентрацияларда эса – салбий таъсир кўрсатди. Дори воситаси eNOS фаоллигини оширди ва iNOSни ишончли даражада пасайтирди. NO-тизимлари индуктори молсидамин ҳаддан ташқари юқори дозаларда, eNOSни фаоллашиши ва NO нинг ортиши ҳисобига МОТга ингибирловчи таъсир кўрсатди. iNOS селектив ингибитори S-МТ МОТга фаоллаштирувчи таъсир кўрсатади, eNOS фаоллаштиради ва ONO_2^- даражасини ортишига қаршилик қилади, носелектив ингибитори L-NAME эса МОТ ва eNOS фаоллигини пасайтиради, iNOS ферментини фаоллаштиради, булар эса юқори заҳарли бирикма ONO_2^- ни ажралиб чиқишини кучайишига олиб келади.

9.Жигар патологияларида NO тизими индуктор ва ингибиторларининг гепатоцитлар МОТга таъсири патологиянинг оғирлик даражаси ва юбориладиган дори воситаларига боғлиқ бўлади. Барча ўрганилган патологияларда уларнинг йўналиши бир хилда бўлди, аммо таъсир даражаси бўйича фарқ қилди, носелектив ингибиторни киритишда кучлироқ намоён бўлган ўзгаришлар қайд этилди. NOS индуктори ва iNOS селектив ингибитори нитрергик тизимлар кўрсаткичларига ижобий таъсир кўрсатади, азот оксиди нейронал синтазаларининг селектив ва носелектив

ингибиторлари эса NO тизимидаги мавжуд бўлган ўзгаришларни янада кўпроқ ёмонлашишига олиб келди. Ушбу дори воситаларининг таъсирини намоён бўлиши гепатоцитлар шикастланишининг оғирлик даражасига боғлиқ бўлди.

НАУЧНЫЙ СОВЕТ Dsc.27.06.2017.Tib.30.03
ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ
ТАШКЕНТСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

САЙФУЛЛАЕВА САИДА АКРАМЖОНОВНА

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ НИТРЕРГИЧЕСКОЙ И МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМАМИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВОСПАЛЕНИЯ ПЕЧЕНИ

14.00.16 – Нормальная и патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ (DSc) ДИССЕРТАЦИИ
ПО МЕДИЦИНСКИМ НАУКАМ

ТАШКЕНТ – 2019

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинета Министров Республики Узбекистан за № B2018.2.DSc/Tib311.

Диссертация выполнена в Ташкентской медицинской академии

Автореферат диссертации на двух языках (русский, узбекский, английский (резюме)) размещен на веб-странице по адресу (www.tma.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet»по адресу (www.ziyonet.uz).

Научный консультант:	**Каримов Хамид Якубович** доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки
Официальные оппоненты:	**Зокиров Ёркин Узуевич** доктор медицинских наук, профессор
	Саидов Алонур Бахтинурович доктор медицинских наук
	Алейник Владимир Андреевич доктор медицинских наук
Ведущая организации:	**Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова**

Защита состоится «_____»_____2019 г. в_____часов на заседании Научного совета Dsc.27.06.2017.Tib.30.03 при Ташкентской Медицинской Академии (Адрес: 100109. г. Ташкент, Алмазарский район, ул. Фароби, 2. Тел/факс: (+99871) 150-78-25, e-mail: tta2005@mail.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Ташкентской медицинской академии (зарегистрировано за №_____).Адрес: 100109, г.Ташкент, Алмазарский район, ул.Фароби, 2. Тел/факс: (+99871) 150-78-14, e.mail.tta2005@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан «____»_____2019 г.

(реестр протокола рассылки №_____ от «___»_____2019 г.)

Г. И. Шайхова
Председатель Научного совета по присуждению ученых степеней, доктор медицинских наук, профессор

Н. Ж. Эрматов
Ученый секретарь Научного совета по присуждению ученых степеней, доктор медицинскихнаук, доцент

Б.У. Ирискулов
Председатель научного семинара при Научном совете по присуждению учёных степеней, доктор медицинских наук, профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация докторской диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. Как показывает анализ доступной нам литературы по патофизиологии, молекулярные механизмы, лежащие в основе развития патологии печени, до конца не изучены. По данным ВОЗ, «…в 2015 году вирусный гепатит был причиной 1,34 миллиона смертей во всем мире. Число смертей, вызванных вирусным гепатитом, увеличивается год за годом»[6]. В патогенезе гепатитов большое значение имеет нарушение внутрипеченочной гемодинамики, что может быть связано с повреждением эндотелиальной выстилки синусоидов и дисфункцией эндотелия. Патогенетическая роль эндотелиальной дисфункции доказана при ряде распространенных заболеваний и патологических состояний, но мало изучена при заболеваниях печени. В последние десятилетия внимание исследователей привлекает паракринная – неадренергическая нехолинергическая регуляция с участием оксида азота (NO)[7]. Монооксид азота при интактном эндотелии оказывает метаболическую вазодилатацию, является эндотелиальным сосудорасширяющим фактором[8]. NO опосредует сосудорасширяющий эффект многих других медиаторов (кининов, ацетилхолина, серотонина и катехоламинов, полипептидных гормонов апудоцитарного происхождения). Монооксиду азота отводится большая роль в регуляции метаболических систем: иммунной, цитокиновой, эндокринной, нервной, а также в углеводном, белковом и липидном обмене. В настоящее время изучение функциональной взаимосвязи нитрергической и монооксигеназной систем (МОС) в патогенезе острых и хронических гепатитов является одной из важных актуальных проблем.

В мире проводятся научные исследования по изучению роли функциональной взаимосвязи нитрергической и монооксигеназной систем в патогенезе воспаления печени. В этих работах ключевым направлением является изучение эффективности индукторов и ингибиторов нитрергической и монооксигеназной систем в регуляции активности этих систем в гепатоцитах интактных крыс и животных с тетрахлорметановым поражением и циррозом печени в условиях in vitro и in vivo.

На сегодняшний день в нашей стране для развития медицинской сферы по мировым стандартам, снижения заболеваний печени в соответствии с Указом Президента Республики Узбекистан № УП-5590 «О комплексных мерах по коренному совершенствованию системы здравоохранения Республики Узбекистан» от 7 декабря 2018 года определены следующие задачи: «… повышение эффективности, качества и доступности медицинской помощи населению, а также внедрение высокотехнологичных методов диагностики и лечения, создание системы медицинской стандартизации,

[6]Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017.-68p.

[7] Манухина Е.Б., Дауни Г.Ф., Малышев И.Ю. и др. Влияние адаптации к гипоксии на экспрессию изоформ NO-синтазы в миокарде//Патологическая физиология и экспериментальная терапия.-2015.-№4.-С.73-77.

[8]Ванин А.Ф, Перетягин С.П., Мартусевич А.К. Молекулярно-клеточные механизмы трансформации гомеостаза биосистем активными формами кислорода и азота//Медицинский альманах.-2013.-№3.-С.80-81.

пропаганды здорового образа жизни и профилактики заболеваний за счет создания эффективных моделей патронажа …»[9]. Приведенные задачи способствуют уменьшению показателей осложненния хронических заболеваний печени путем совершенствования использования современных технологий при оказании качественной медицинской помощи, а также поднятию на новый уровень оказания медицинских услуг при диагностике и лечении осложнения заболеваний печени среди различных слоев населения.

Данное диссертационное исследование в определенной степени соответствует задачам, обозначенным в Указах Президента Республики Узбекистан № УП-4947 «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан» от 7 февраля 2017 года, № УП-4985 «О мерах по дальнейшему совершенствованию системы экстренной медицинской помощи» от 16 марта 2017 года, № УП-5590 «О комплексных мерах по коренному совершенствованию системы здравоохранения Республики Узбекистан» от 7 декабря 2018 года, в Постановлении Президента Республики Узбекистан № ПП-3071 «О мерах по дальнейшему развитию специализированной медицинской помощи населению Республики Узбекистан на 2017–2021 годы» от 20 июня 2017 года, а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данном направлении.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Работа выполнена в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий Республики Узбекистан VI. «Медицина и фармакология».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации[10]. Научные исследования, посвященные изучению взаимосвязи нитрергической и монооксигеназной систем гепатоцитов в норме и при патологиях, их регуляции, действия индукторов и ингибиторов этих систем проводятся в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе в University of Colorado Denver, Mayo Clinic Coleege of Medicine and Science (США), China Pharmaceutical University, Chongqing Medical University (Китай), Instituto de Biomedicina de Sevilla (Испания), University of Genoa, Universita del Piemonte Orientale (Италия),University of Saskatchewan (Канада), Turku University (Финляндия), University Otago (Новая Зеландия), Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences (Индия), Isfahan University of Medical Sciences (Иран), National Taiwan University (Тайван), Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (Россия), Харківський національний медичний університет (Украина), Ташкентская медицинская академия (Узбекистан).

Благодаря изучению функциональной взаимосвязи нитрергической и монооксигеназной систем в патогенезе воспаления печени были получены

[9]Указ Президента Республикаси Узбекистан № УП-5590 «О комплексных мерах по коренному совершенствованию системы здравоохранения Республики Узбекистан» от 7 декабря 2018 года.

[10]Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации www .ucdenver .edu, www.college.mayo.edu, www.cpu.edu.cn, www.cqmu.edu.cn, www.ibis-sevilla.es, www.unige.it, www.uniupo.it, www.usask.ca, www.utu.fi, www.otago.ac.nz, www.sgpgi.ac.in, www.mui.ac.ir, www.ntu.edu.tw, www.eimb.ru, www.knmu.kharkov.ua, www.tma.uz и других источников.

следующие научные результаты: выявление механизмов окислительного стресса и системы оксида азота в развитии аутоиммунных гепатитов (Mayo Clinic College of Medicine, США), оксидативного стресса в развитии гепатотоксических эффектов химических соединений (China Pharmaceutical University), в развитии неалкогольного стеатогепатоза, значения индукции и ингибиции цит.Р450 в гепатотоксичности химических соединений (Chongqing Medical University, Китай), образования аутоантител к CYP2E1 при различных заболеваниях печени (Universita del Piemonte Orientale, Italy), выявлению взаимосвязи НАДФН-оксидазы и изоформы цитохрома Р450 2Е1 при вирусных поражениях печени (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Россия), определению роли экспрессии гена цитохрома Р450, оценке роли системы оксида азота в регуляции активности лимфоцитов при инфекционных поражениях печени (Харківський національний медичний університет, Украина), определению роли нитрергических и монооксигеназных систем, а также полиморфизма генов МОС в патогенезе токсического повреждения печени (Ташкентская медицинская академия, Узбекистан).

До сих пор не дано научное обоснование функционального взаимодействия нитрергической и монооксигеназной систем в патогенезе воспаления печени. Не представлены доказательства взаимосвязи этих систем в норме и при печеночных патологиях, объясняющие процессы апоптоза. В то же время способность контролировать активность ферментов монооксигеназной и нитрергической систем позволит осуществлять целевую фармакотерапию различных заболеваний печени.

Степень изученности проблемы. Изучение патогенеза воспаления, несмотря на многовековую историю, не утратило своего значения и по сей день остается важной проблемой и предметом изучения во всех отраслях медицины (Адо А.Д., 2002; Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2005). Нарушение кровообращения является одной из важных составляющих в развитии воспаления. В процесс воспаления, наряду с местными факторами, вовлекается весь организм, все его структурно-функциональные системы, в частности, – иммунная, эндокринная и нервная. NO опосредует и сосудорасширяющий эффект многих других медиаторов (кининов, ацетилхолина, серотонина и катехоламинов, полипептидных гормонов апудоцитарного происхождения) (Малышев И.Ю., Манухина Е.Б., 2009). В последние годы монооксиду азота отводится большое значение в регуляции метаболических систем: в иммунной, цитокиновой, эндокринной, нервной, а также в углеводном, белковом и липидном обменах (Северина И.С., 2000; 2006; Wang J. et al., 2010), процессе апоптоза (Рязанцева Н.В. и соавт., 2010; Chae J.A. et al., 2004). Появились отдельные сообщения (Даминов Т.А., 2006-2010) об изменении уровня активности нитрергической системы печени при остром и хроническом гепатитах. Наряду с изменением нитрергической системы выявлены нарушения в активности ферментов монооксигеназной системы, что позволяет выдвинуть гипотезу о возможной функциональной зависимости между собой этих двух систем при развитии воспалительного

процесса в печени. На возможность функциональной зависимости между нитрергической и монооксигеназной систем косвенно указывают и данные заключающиеся в том, что они для активности каталитических процессов используют одни и те же кофакторы, и на СООН-терминальных концах содержат локусы для связывания НАДФН, FAД и FMN, идентичные таковым НАДФН-цитохром Р-450-редуктазе (НАДФН-цит.-С-ред.) (Реутов В.П., 2006; Schmidt H.H. et al., 2010). Уникальность выдвигаемой концепции заключается в том, что нитрергическая и монооксигеназная системы могут конкурировать в рамках использования кислорода и НАДФН в клетке, так как они кислородзависимые системы (Скулачев В.П., 2000; 2008; Арчаков А.И., 2010; Реутов В.П. и соавт., 1998; Зенков Н.К., 2008).

В последние два десятилетия, наряду с изучением роли изоформ цитохрома Р450 (цит.Р450) в формировании адаптации гепатоцитов к действию факторов среды (Каримов Х.Я., Даминов Т.О., Мавлянов И.Р.) проводится исследование нитрергической системы в гепатоцитах, слизистой желудка, кишечника, легких при различных патологических состояниях организма. Учеными Узбекистана изучена активность нитрергической системы печени при остром и хроническом гепатитах.

Полученные результаты ставят новые вопросы и требуют продолжения исследований. По-прежнему в центре внимания остаются вопросы взаимосвязи монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов в норме и при патологии печени, возможность регуляции их активности, что позволит целенаправленно проводить фармакотерапию различных поражений печени. Следовательно, изучение дисфункции эндотелия и ее генетических особенностей при патологии печени представляется актуальной задачей патофизиологии и гастроэнтерологии.

Связь диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ высшего образовательного учреждения, где выполнена диссертация. Данное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Ташкентской медицинской академии в рамках Государственной научно-технической программы по фундаментальному гранту ФДСС12-15 «Функциональная зависимость между нитрергической и монооксигеназной системами в патогенезе воспаления печени» (2012-2016 гг.).

Целью исследования является выяснение функциональной взаимосвязи между нитрергической и монооксигеназной системами в патогенезе поражений печени путем индукции и ингибиции этих систем.

Задачи исследования:

выявить особенности изменений монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов в условиях ишемии печени, а также корреляционные связи между этими системами;

оценить особенности влияния индукторов и ингибиторов монооксигеназной и нитрергической систем на активность ферментов этих систем в условиях ишемии/реперфузии печени;

выяснить патогенетическую значимость феномена зависимости нитрергической и монооксигеназной систем в реализации проапоптотических процессов в печени.

в опытах in vitro с выделенными микросомами от интактных крыс выявить концентрационную зависимость ингибиторов и индукторов нитрергической системы гепатоцитов;

в условиях in vivo оценить эффективность индукторов и ингибиторов монооксигеназной системы в регуляции активности МОС и нитрергической системы гепатоцитов интактных крыс и животных с тетрахлорметановым поражением и циррозом печени;

в условиях in vivo оценить регуляторные возможности индукторов и ингибиторов нитрергической системы гепатоцитов у интактных крыс и животных с тетрахлорметановым поражением и циррозом печени;

доказать роль НАДФН-оксидазы в регуляции взаимосвязи монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов в норме и при патологии.

Объектом исследования были 640 белых беспородных крыс-самцов с исходной массой 180-210 г, содержавшиеся в условиях вивария Ташкентской медицинской академии.

Предмет исследования: нитрергическая и монооксигеназная системы в микросомах печени, её гомогенаты и цитозольная жидкость, плазма и сыворотка крови.

Методы исследований. Для решения поставленных задач использованы экспериментальные, лабораторные, биохимические, иммуноферментные и статистические методы исследований.

Научная новизна исследования заключаются в следующем:

доказано, что при различных поражениях печени бензонал активизирует МОС печени крыс, несколько снижает дисбаланс в системе продукции оксида азота, тогда как циметидин усугубляет имеющиеся в этих системах нарушения;

доказано, что важным фактором разнонаправленных изменений функциональной активности МОС и NOS в зависимости от наличия в инкубационной среде микросом L-аргинина в высоких и низких дозах является их конкурентное отношение за использование в С-концевом домене цит.Р450 в МОС и eNOS-НАДФН;

установлено, что действие неселективного индуктора NO-системы молсидамина на МОС печени зависит от дозы, селективный ингибитор iNOS S-MT индуцируют монооксигеназную и эндотелиальную систему оксида азота и препятствует повышению уровня пероксинитрита, неселективный ингибитор L-NAME подавляет активность МОС и eNOS, активизирует iNOS;

доказана зависимость действия индуктора и ингибиторов системы оксида азота на МОС гепатоцитов от тяжести патологии, направленность их совпадала, однако отличались по степени действия; наибольшие изменения характерны для неселективного ингибитора, что указывает на

нецелесообразность применение ингибиторов нитрергической системы гепатоцитов при патологиях печени;

в условиях острой ишемии печени установлено, что между NO-системой и МОС имеется тесная функциональная взаимосвязь, а снижение активности НАДФН-цит.-С-ред. в микросомах при ишемии печени может приводить к угнетению всех ферментов МОС и гиперэкспрессии iNOS.

Практические результаты исследования заключается в следующем:

установлены оптимальные концентрации бензонала (75 мг/кг), циметидина (10 мг/кг), L-аргинина (1,56 мкг/мл), молсидамина (0,075 мкг/мл), S-MT (1,56 мкг/мл), L-NAME (0,1 мкг/мл), что позволяет использовать их в экспериментах;

выявлены новые закономерности механизма взаимодействия монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов как в норме, так и при различных патологиях печени; механизм их взаимодействия основан на конкуренции за НАДФН для НАДФН-цит.-С-ред. и нитритредуктазы;

выявлено дозозависимое действие индукторов и ингибиторов монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов;

показано, что в условиях патологии печени можно использовать индукторы монооксигеназной и нитрергической систем, тогда как ингибиторы этих систем усугубляют имеющиеся нарушения, увеличивают летальность животных.

Достоверность результатов исследования доказана использованными подходами и методами, соответствием теоретических данных полученным результатам, правильностью исследований с точки зрения методологии их ведения, достаточным количеством животных, обработкой результатов исследования методом статистического анализа, а также сопоставлением полученных результатов с данными зарубежных и отечественных ученых, подтверждением выводов и полученных результатов полномочными структурами.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования заключается в том, что положения, выводы и предложения соискателя существенно дополняют знания о взаимосвязи монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов в норме и при различных патологиях печени. Полученные экспериментальные данные позволяют использовать их в качестве теоретической основы для объяснения факторов, за счет которых может развиваться индуктивный и/или ингибирующий эффект модуляторов системы изоферментов цит.Р450 печени и специфические функционально-морфологические нарушения в этом органе при действии различных по природе неблагоприятных факторов среды на организм.

Практическая значимость исследования заключается в установлении тесной взаимосвязи между монооксигеназной и нитрергической системами организма, особенностями развития апоптоза при ишемии/реперфузии печени, при воздействии ингибиторов и индукторов нитрергической систем

гепатоцитов. Выясненные механизмы могут использоваться при разработке основных принципов фармакотерапии поражений печени различного генеза.

Внедрение результатов исследования. На основе результатов исследования по обоснованию функциональной зависимости между нитрергической и монооксигеназной системами в патогенезе воспаления печени:

утверждены методические рекомендации «Популяционная оценка циркулирующих эндотелиальных клеток в плазме крови» (Заключение Министерства здравоохранения №8н-д/6 от 14.01.2019 года). Методические рекомендации посвящены профилактике развития функционально-морфологических нарушений эндотелиальных клеток в плазме крови при развитии гепатита печени;

утверждены методические рекомендации «Активность антиоксидантной и нитрергической систем при остром токсическом гепатите» (Заключение Министерства здравоохранения №8н-д/62 от 01.04.2019 года). Результаты данной методической рекомендации служат предпосылкой к разработке новых методов диагностики и профилактики возможных осложнений гепатитов, а также показывают, за счет каких факторов могут регулироваться процессы апоптоза гепатоцитов и развиваться специфические функционально-морфологические нарушения в печени при действии различных по своей природе неблагоприятных факторов среды на организм.

Полученные результаты изучения функциональной взаимосвязи нитрергических и монооксигеназных систем в патогенезе воспаления печени внедрены в практику здравоохранения, в частности используются при проведении фундаментальных исследований в Центральной научно-исследовательской межвузовской лаборатории при Ташкентской медицинской академии, в лаборатории синтеза координационных соединений и фармакотоксических исследований Ташкентского фармацевтического института и Научно-практическом центре стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Ташкентского государственного стоматологического института (Заключение Министерства здравоохранения №8н-з/44 от 30.04.2019 года). Полученные данные позволили обосновать влияние индукторов и ингибиторов системы окиси азота на степень тяжести патологии печени и объяснить положительное действие вводимых лекарственных показатели нитрергической системы. Показано также, что изменения в системе окиси азота усугубляются под влиянием селективных и неселективных ингибиторов нитрергической системы, а эффективность препаратов зависит от степени тяжести поражения гепатоцитов.

Апробация научных результатов. Результаты исследования были обсуждены на 3-х международных и 3-х республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликована 31 научная работа, из них 10 журнальных статей, в том числе 7 в республиканских и 3 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей

аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 156 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновываются актуальность и востребованность темы диссертационной работы, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предметы. Показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагается научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение их в практику. Приводятся сведения об опубликованных работах и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Современные представления о взаимосвязи монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов в патогенезе воспаления печени»** проведен подробный анализ зарубежной и отечественной литературы по теме диссертации. Исходя из цели исследования, было проанализировано состояние нитрергической и монооксигеназной систем печени при ее воспалении, а также освещены нерешенные аспекты изучаемой проблемы.

Во второй главе диссертации **«Материал и методы исследования для обоснования функциональной взаимосвязи монооксигеназной и нитрергической систем в патогенезе воспаления печени»** описаны материал и методы исследования. Исследования проводились на базе ЦНИЛ ТМА в 2012-2016 гг. на 640 белых беспородных крысах-самцах массой 180-210 г, которых содержали в стандартных условиях вивария. Эксперименты выполнялись в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страсбург,1985). Всего проведено 5 серий опытов.

В первой серии на 360 белых беспородных крысах-самцах массой 180-210 г вызывали ишемию/гипоксию печени путем окклюзии сосудов в ней в течение 180 мин сосудистой ножки левой боковой и средней ее доли. Проведены 2 подсерии исследований. Животных делили на группы (по 7-8 особей в каждой) в зависимости от условий опыта. Контроль для всех групп – интактные животные (по 8 особей в каждой группе).

1-я подсерия. Ишемию/гипоксию в опытных группах вызывали путем лигирования шёлковой нитью сосудистой ножки левой боковой и средней доли печени. После 30, 60, 120, 180 мин ишемии/гипоксии печени животных забивали методом мгновенной декапитации. В качестве контроля использовали микросомы долей печени с сохраненным кровообращением (контроль 1) и из печени интактных животных (контроль 2).

2-я подсерия. Животных с 180-минутной ишемией/реперфузией после восстановления кровотока печени в зависимости от вводимых препаратов

разделили на 8 групп: 1-я группа получала бензонал в эффективной дозе 50 мг/кг; 2-я группа – циметидин в дозе 10 мг/кг; 3-я группа – неселективный ингибитор eNOS Nω-nitro-L-Arginine Methyl Egter (L-NAME) в дозе 10 мг/кг; 4-я группа – селективный ингибитор nNOS 7-nitro-indarole (7-NI) в дозе 10 мг/кг; 5-я группа – селективный ингибитор iNOS S-Methyliisothiourea (S-MT) в дозе 3 мг/кг; 6-я группа – L-аргинин 50 мг/кг; 7-я группа – молсидамин 50 мг/кг. 8-ю группу составили животные с ишемией/реперфузией, получавшие воду.

Во второй серии изучали влияние индукторов и ингибиторов монооксигеназной и нитрергической систем на активность этих систем гепатоцитов интактных крыс в условиях in vivo. 70 животных такого же возраста и массы, что и интактные крысы, были разделены на 6 групп по 6-8 особей в каждой. Препараты вводили перорально в течение 6 дней ежедневно. 1-я группа – индуктор МОС бензонал в дозах 25; 50; 75 и 100 мг/кг; 2-я группа – ингибитор МОС циметидин в дозах 10; 25; 75 и 100 мг/кг; 3-я группа – субстрат синтеза оксида азота L-аргинин в дозе 50 мг/кг; 5-я группа – селективный ингибитор nNOS 7-NI в дозе 10 мг/кг; 6-я группа – селективный ингибитор iNOS S-MT в дозе 1 мг/кг.

В 3-й серии для раскрытия некоторых патобиохимических механизмов действия индукторов и ингибиторов нитрергической системы, а также подбора дозы препаратов в условиях in vitro исследования проводились на 70 белых беспородных крысах-самцах массой 180-210 г. В каждой экспериментальной точке выполнено 6-8 исследований. Для этого в инкубационную среду добавляли различные дозы препаратов: субстрат NO-системы L-аргинин в убывающих концентрациях 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,39; 0,195 и 0,1 мкг/мл (1-я подгруппа); индуктор этой системы молсидомин в убывающих концентрациях 2,0; 1,0; 0,075; 0,05; 0,025 и 0,0125 мкг/мл (2-я подгруппа); неселективный ингибитор eNOS - L-NAME в убывающих концентрациях 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 и 0,1 мкг/мл (3-я подгруппа); селективный ингибитор iNOS S-MT в концентрациях 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,36 и 0,78 мкг/мл (4-я подгруппа).

В 4-й серии на 60 белых беспородных крысах-самцах воспроизводили токсическое поражение печени подкожным четырехкратным введением CCl_4 (50% масляный раствор) в дозе 0,4 мл/100 г массы согласно рекомендациям Н.Х. Абдуллаева, Х.Я. Каримова (1986). О развитии острого токсического поражения печени судили по показателям цитолиза, холестаза, мезенхимального воспаления и печеночно-клеточной недостаточности. Определение активности АЛТ, γ-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы, содержание общего, прямого и непрямого билирубина, альбуминов, тимоловой пробы проводили на биохимическом анализаторе Mindray BA-88A (Китай). В зависимости от вводимых препаратов животные были разделены на 7 групп: 1-я группа получала бензонал в эффективной дозе 75 мг/кг; 2-я группа – циметидин в дозе 10 мг/кг; 3-я группа – L-NAME в дозе 10 мг/кг; 4-я группа – 7-NI в дозе 10 мг/кг; 5-я группа – S-MT в дозе 3 мг/кг; 6-я группа – L-аргинин 50 мг/кг; 7-ю группу составили животные с

CCl_4, получавшие воду. Препараты вводили внутрижелудочно в течение 6 дней. В качестве контроля использовали интактных животных.

В 5-й серии на 80 белых беспородных крысах-самцах воспроизводили цирроз печени путем подкожного введения гелиотрина в дозе 50 мг/кг 2 раза в неделю в течение 40 дней. На 90-е сутки определяли показатели печеночно-клеточной недостаточности, холестатического и энцефалопатического синдромов. Согласно данным литературы, на 90-120-е сутки опыта в печени развиваются морфологические и биохимические признаки цирротических изменений (Абдуллаев Н.Х., Каримов Х.Я., 1986). В зависимости от вводимых препаратов животные были разделены на 7 групп: 1-я группа получала бензонал в эффективной дозе 75 мг/кг; 2-я группа – циметидин в дозе 10 мг/кг; 3-я группа – L-NAME в дозе 10 мг/кг; 4-я группа – 7-NI в дозе 10 мг/кг; 5-я группа – S-MT в дозе 3 мг/кг; 6-я группа – L-аргинин 50 мг/кг; 7-ю группу составили животные с циррозом печени, получавшие воду. Препараты вводили внутрижелудочно в течение 6 дней. Контрольной группой служили интактные животные.

Микросомальную фракцию печени выделяли методом дифференциального центрифугирования на вакуумной центрифуге VAC-601 (Германия). Активность NO-системы в микросомах ткани печени оценивали по уровню NO_x. Сумму основных стабильных метаболитов нитратов и нитритов (NO_2^- и NO_3^-) определяли по методике, описанной П.П. Голиковым и соавт. (2000); активность NO-синтазы (NOS) – по В.В. Сумбаевой, И.М. Ясинской (2000); уровень пероксинитрита (ONO_2^-) – по N.W. Kooy и соавт. (1994) в модификации Р.К. Азимова, А.С. Комарина (2005).

Содержание микросомальных цит.Р450, 420 и b_5 определяли по методу T. Omura, R. Sato (1964) и идентифицировали на двухлучевом спектрофотометре типа Specord UV-VIS M-40 (Германия). Активность НАДФН-цит.-С-ред. определяли на СФ-46 по C.H. Williams, H. Kamin (1961), бенз(а)пиренгидроксилазы (Б(а)ПГ) – по C.H.Yang, L.P.Kicha (1978), анилингидроксилазы (АГ) – по А.И. Арчакову и соавт. (1975), N-деметилазы амидопирина (N-АП) – по A. Bast, J. Nordhosck (1981), глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фаза) – по N.S. Gnosh, N.C. Kar (1983), Цитохром С (Цит. С) – по Н.А. Гватуа и соавт. (1990). Об активации апоптоза судили по содержанию белка Р-53 и фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), которые определяли иммуноферментным методом с использованием реактивов фирмы «Eliza».

Статистическая обработка результатов проводилась на персональном компьютере Pentium-IV с помощью программного пакета Microsoft Office Excel-2012, включая использование встроенных функций статистической обработки.

В третьей главе **«Механизм взаимосвязи монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов на модели ишемии печени»** представлены результаты исследования монооксигеназной и нитрергической систем ишемизированной печени, а также данные о влиянии индукторов и ингибиторов этих систем. У крыс с моделью ишемии печени содержание цит.Р450 и b_5 прогрессивно снижалось, а уровень цит.Р420 достоверно

возрастал в зависимости от длительности ишемии. Прогрессивно ингибировалась и активность ферментов НАДФН-цит.-С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП и Г-6-Ф-азы. Активность eNOS прогрессивно снижалась, а iNOS прогрессивно возрастала по мере удлинения срока ишемии, что приводило к увеличению выработки пероксинитрита на 30-й, 60-й, 120-й и 180-й минутах ишемии соответственно в 1,70; 2,46; 2,50 и 1,35 раза. Необходимо подчеркнуть, что повышение активности eNOS и, как следствие, базального уровня NO, совпадает с интенсификацией активности ферментов МОС, особенно через 30 и 120 мин, в микросомах долей печени с сохраненным кровообращением, что, по-видимому, является ответной реакцией на стресс, вызванной развитием ишемии/реперфузии при наложении на сосудистую ножку левой боковой и средней долей печени лигатуры. При этом выявлена сильная прямая корреляционная зависимость между показателем eNOS и содержанием цит.Р450 через 30 мин – r=0,83 ($p<0,01$) и 120 мин – r=0,80 ($p<0,01$), умеренная зависимость с НАДФН-цит.-С-ред. – r=0,77 и 0,73 ($p<0,05$), Б(а)ПГ – r=0,73 и 0,68 ($p<0,05$), АГ – r=0,75 и 0,77 ($p<0,05$), N-АП –r=0,72 и 0,70 ($p<0,05$), Г-6-Фазы – r=0,69 и 0,67 ($p<0,05$).

Следовательно, одним из факторов компенсаторного повышения функционально-метаболической активности ферментов МОС в долях печени с сохраненным кровообращением является интенсификация eNOS как следствие повышение базального уровня NO в микросомах. Уровень NO в микросомах возрастал адекватно активности фермента eNOS. В микросомах, выделенных из долей печени с сохраненным кровообращением, регистрировались практически близкие значения корреляционной связи параметра NO с показателями ферментов МОС, которые были в пределах r=0,81 и r=0,85 ($p<0,01$). Следует подчеркнуть, что в микросомах гепатоцитов, выделенных из печени с сохраненным кровообращением, спектральные характеристики ферментов iNOS и концентрация ONO_2^- были в пределах значений интактных животных.

Чтобы подтвердить важность НАДФН-оксидазы в механизмах регуляции активности нитроксигеназной системы и МОС, нами проведены опыты in vitro. Установлено, что добавление НАДФН 5 мкмоль/мл в микросомы, выделенные из ишемизированной доли печени, не влияло на изменение высоты пика цит.Р450 и Р420. Однако в 1,35 раза ($p<0,01$) возрастала НАДФН-цит.-С-ред. активность, в 1,6 раза ($p<0,001$) увеличивалась скорость реакции iNOS, в 2,3 раза – концентрация NO ($p<0,001$) и в 1,8 раза – ONO_2^- ($p<0,001$), при этом активность eNOS угнеталась в 1,4 раза ($p<0,001$).

Добавление этой же дозы НАДФН в микросомы активированной доли (контроль 1) инициировало активность eNOS в 1,22 раза ($p<0,01$), возрастание пика цит. Р450 в 1,3 раза ($p<0,01$), активность НАДФН-цит.-С-ред. возрастала в 1,4 раза ($p<0,001$), Г-6-Ф-аза – в 1,27 раза ($p<0,01$), отмечалось полное исчезновение пика Р420, увеличение NO - в 1,15 раза ($p<0,05$), угнетение скорости реакции фермента iNOS – в 1,3 раза ($p<0,01$) и концентрация ONO_2^- – в 1,25 раза ($p<0,01$). Аналогичная тенденция сохранялась и в опытах с микросомами, выделенных из печени интактных животных. Добавление в генерирующую систему НАДФН увеличивало пик цитохрома Р450 в 1,22 раза

($p<0,05$), активность НАДФН-цит.-С-ред. в 1,35 раза ($p<0,001$). Одновременно возрастала активность eNOS в 1,26 раза ($p<0,01$) на фоне угнетения iNOS в 1,22 раза ($p<0,05$) и уменьшения концентрации ONO_2^- в 1,31 раза ($p<0,001$).

Наблюдаемое в наших исследованиях различие в изменении активности нитрооксидредуктаз и МОС в зависимости от скорости реакции НАДФН-цит.-С-ред. подтверждает важность челночного действия НАДФН-оксидазы в механизмах их регуляции при патологических состояниях, в частности при острой ишемии печени.

Важным показателем отсутствия повреждения белковой структуры микросом при ишемии/гипоксии служит сохранение на уровне значений интактных животных содержание микросомального белка во все сроки ишемии. Можно полагать, что одной из причин снижения содержания микросомальных ферментов МОС является гиперэкспрессия NO и ONO_2^-, обусловленная инициацией iNOS. Эту гипотезу подтверждает четкая взаимосвязь ($r=0,86$-$0,91$) увеличения NO, iNOS и ONO_2^- с цит.Р420 и обратная их корреляция ($r=-0,9$-$0,98$) с цит.Р450, b_5, активностью НАДФН-цит.-С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП и Г-6-Ф-азы и прямая связь угнетения активности eNOS ($r=0,87$-$0,96$) с этими ферментами, а также обратная связь с цитохромом Р420.

У крыс после 180-минутной ишемии печени уже в 1-е сутки исследования в микросомах печени мы наблюдали резкое угнетение активности МОС гепатоцитов (табл. 1). В последующие сроки, особенно на 10-е сутки опыта, регистрировалось постепенное повышение содержания и активности ферментов в микросомах, что связано с некоторой активизацией компенсаторных механизмов в организме экспериментальных животных. Однако, несмотря на такие положительные сдвиги, полного их восстановления не произошло, так как все изученные параметры достоверно отличались от значений интактных крыс.

Бензонал через одни сутки после его введения не оказывал существенного влияния на изучаемые показатели, характеризующие активность МОС и NOS в микросомах постишемизированной печени по сравнению с животными, которым препарат не вводили. В последующие сроки (через 3 сут) бензонал достоверно повышал низкое содержание цит.Р450 и b_5, снижал высокий уровень цит.Р420, активизировал ферменты МОС и увеличивал содержание микросомального белка. Более продолжительное введение бензонала приводило в еще большей активизации МОС, параметры которой достигали значений интактных крыс.

В то же время ингибитор МОС циметидин еще больше усугублял имеющиеся нарушения в показателях МОС гепатоцитов ишемизированной печени, особенно на 10-е сутки опыта.

Активность нитрергической системы микросом из ишемизированного участка печени экспериментальных животных характеризовалась достоверным ингибированием эндотелиальной (в 2,2 раза) и активизацией индуцибельной формы синтазы оксида азота(в 3,5 раза) уже через сутки от начала ишемии (табл. 2). Такие изменения в активности ферментов синтеза оксида азота приводили к увеличению продукции оксида азота и особенно пероксинитрита.

На наш взгляд, такие изменения в активности монооксигеназной и нитрергической систем гепатоцитов были обусловлены развитием деструктивных процессов в ишемизированной доле гепатоцитов, так как содержание микросомального белка достоверно снижалось.

В 1-е сутки введения бензонала существенных сдвигов в системе оксида азота не наблюдалось. В последующие сроки опыта активность eNOS постепенно повышалась, а iNOS снижалась, что приводило к статистически значимому уменьшению уровня NO и ONO_2^-. Показатели системы оксида азота приближались к нормативным величинам. Циметидин в 1-е сутки опыта не оказывал существенного влияния на показатели системы оксида азота, а последующее введение препарата еще больше усугубляло дисбаланс в этой системе. Корреляционный анализ показал, что у животных с ишемией/гипоксией показатель eNOS был связан с NO обратной корреляционной связью r=-0,62; с iNOS – r=-0,67 и ONO_2^- – r=-0,64, а отношение шансов – (ОШ) составило 0,78; 1,84 и 1,86 (p<0,001), т.е. отмечается высокая вероятность связи между снижением активности eNOS и повышением в постишемический период в микросомальной фракции NO, iNOS и ONO_2^-. Следует отметить, что чем ближе это соотношение к 1, тем меньше различие между показателями контрольной и опытной групп.

Таблица 1

Показатели монооксигеназной системы гепатоцитов после гипоксии/ишемии печени и введения в различные сроки (сут) бензонала и циметидина, M±m

Группа, срок опыта	Р450, нм/мг	НАДФН-цит.с-ред, нм/мин/мг	АГ, нм/мин/мг	Г-6-Фаза, нм/мин/мг
Контрольная	0,97±0,03	106,9±3,95	0,88±0,023	79,8±3,06
Ишемия: 1 сут	0,30±0,02***	8,4±0,29***	0,30±0,017***	24,7±1,03***
3 сут	0,37±0,02***^	13,7±0,44***^^^	0,37±0,015***^^	39,5±1,65***^^^
10 сут	0,45±0,02***^^^	21,1±0,87***^^^	0,41±0,018***^^^	43,3±1,17***^^^
Ишемия+Б: 1 сут	0,35±0,02***	8,9±0,36***	0,35±0,09***	25,3±1,23***
3 сут	0,68±0,02***^^^	68,1±2,48***^^^	0,51±0,022***	45,9±1,34***^^^
10 сут	1,55±0,06***^^^	120,4±6,35^^^	1,46±0,061***^^^	82,7±3,56^^^
Ишемия+Ц: 1 сут	0,29±0,02***	8,5±0,33***	0,32±0,018***	23,9±1,16***
3 сут	0,31±0,01***	13,1±0,59***^^^	0,34±0,015***	37,2±1,48***^^^
10 сут	0,28±0,01***	17,5±0,58***^^^	0,29±0,016***	28,6±0,89***^^

Примечание. * –различия относительно данных контрольной группы значимы (** - P<0,01, *** - P<0,001); ^–различия относительно данных группы ишемии значимы (^^ - P<0,01, ^^^ - P<0,001).

При этом ОШ=1 свидетельствует об отсутствии связи между сравниваемыми факторами, ОШ<1 – об отрицательной связи и ОШ>1 – о положительной связи признаков. Следовательно, у животных с ишемией/гипоксией eNOS с NO по показателю ОШ имеет отрицательную связь <1, а с iNOS и ONO_2^- – положительную – >1. Аналогичные результаты

по сравнению с предыдущим опытом получены при изучении связи eNOS с NO, iNOS и ONO_2^- при изучении влияния на активность NOS в микросомах ишемизированной печени при введении ингибитора МОС циметидина. При этом показатель ОШ при анализе связи eNOS с NO составил 0,13, т.е. снизился на 83,3% ($p<0,001$) по сравнению с группой с «чистой» ишемией/гипоксией, что указывает на возрастание вероятности связи этих показателей на 83,3%. При оценке связи eNOS с iNOS и ONO_2^- установлено, что она составила соответственно 7,7 и 6,1, т.е. показатель ОШ превышал данные группы с «чистой» ишемией/гипоксией соответственно на 418,5 и 328,0% ($p<0,001$).

Исходя из полученных данных, следует, что ОШ связи eNOS с iNOS, ONO_2^- и NO в микросомах ишемизированной печени после 10 суток введения ингибитора МОС циметидина повышается, тем самым возрастает шанс их повреждающего действия на ферменты системы биотрансформации ксенобиотиков. При оценке фармакологического действия индуктора лекарственного метаболизма бензонала установлено, что показатель ОШ при анализе связи eNOS с NO практически сравнялся с контролем, составив 1,1 ($P>0,05$), с iNOS и ONO_2^- – 0,9 и 0,86 ($p>0,05$), т.е. бензонал позитивно влиял на изменения уровня в микросомах NO, снижение активности iNOS и содержание цитотоксического ONO_2^-. Можно полагать, что при введении животным бензонала, снижение активности iNOS и уровня ONO_2^- было связано, повышением активности eNOS, восстановлением до контрольных значений концентрации NO в микросомах ишемизированной печени.

Таблица 2

Показатели активности NO-системы в микросомах печени после острой ишемии/гипоксии и введения в различные сроки (сутки) бензонала и циметидина, M±m

Группа, срок наблюдения	NO, мкМ/мг	eNOS, мкМ/мин/мг	iNOS, мкМ/мин/мг	ONO_2^-, мкМ/мг	Белок мс, мг/мл
Контрольная	5,5±0,16	17,4±0,62	0,10±0,002	0,080±0,016	36,8±1,22
Ишемия: 1 сут	8,6±0,33***	7,9±0,29***	0,35±0,017***	0,23±0,010***	29,5±1,13***
3 сут	8,1±0,27***	8,5±0,35***	0,23±0,009***^^^	0,19±0,009***^	30,8±1,09**
10 сут	7,6±0,28***^	9,7±0,42***^^	0,17±0,006***^^^	0,14±0,007*^^^	31,2±1,18**
Ишемия+Б: 1 сут	8,7±0,29***	8,3±0,21***	0,32±0,019***	0,22±0,011***	29,1±1,26***
3 сут	6,3±0,26*^^^	12,5±0,43***^^^	0,17±0,005***^^^	0,16±0,006***^^^	31,7±1,31*^^^
10 сут	5,8±0,22^^^	18,4±0,59^^^	0,11±0,004*^^^	0,07±0,005*^^^	37,5±1,42
Ишемия+Ц: 1 сут	8,9±0,39***	8,1±0,28***	0,36±0,019***	0,25±0,013***	28,7±1,26***
3 сут	10,6±0,37***^	8,4±0,15***	0,33±0,012***	0,21±0,011***^	28,3±1,33**
10 сут	13,5±0,52***^^^	7,2±0,18***^	0,46±0,021***^^	0,35±0,014***^^^	32,6±1,40*

Примечание. * –различия относительно данных контрольной группы значимы (** - P<0,01, *** - P<0,001); ^–различия относительно данных группы ишемии значимы (^^ - P<0,01, ^^^ - P<0,001).

Введение животным с ишемией/реперфузией печени L-аргинина способствовало постепенному повышению низкого содержания цит.Р450 и b_5, снижению высокого уровня цит.Р420 (табл. 3). Активность ферментов МОС также достоверно возрастала во все сроки введения препарата. Однако, несмотря на такие положительные сдвиги, полного восстановления изучаемых показателей не наблюдалось. Особенно ярко это проявлялось в активности фермента НАДФН-цит.-С-ред., активность которой оставалась достоверно ниже в 2,07 раза. Действие молсидамина на активность компонентов МОС ишемизированной печени проявлялось менее выражено, чем при применении L-аргинина.

Анализ активности нитрергической системы микросомальной фракции печени крыс с ишемией/реперфузией печени крыс выявил резкое снижение активности eNOS, активизацию iNOS, что приводило к увеличению выработки NO и его токсической формы ONO_2^- в 1-е сутки ишемии опыта. В дальнейшем эти показатели имели тенденцию к нормализации, однако даже на 10-е сутки эксперимента они достоверно отличались от значений интактных крыс.

Введение субстрата синтеза NO L-аргинина приводило к повышению низкой активности eNOS, снижению высокой активности iNOS, уровня NO и ONO_2^- в микросомальной фракции ишемизированной печени крыс уже через сутки. В дальнейшем эти показатели имели тенденцию к увеличению, особенно через 10 суток, и не отличались от значений интактных крыс.

Таблица 3

Показатели монооксигеназной системы в микросомах гепатоцитов в различные сроки после введения индукторов NO-системы животным после 180 мин гипоксии/ишемии печени, M±m

Группа, срок наблюдения	Р450, нм/мг	НАДФН-цит.с-ред, нм/мин/мг	АГ, нм/мин/мг	Г-6-Фаза, нм/мин/мг
Контрольная	0,97±0,031	106,9±3,95	0,88±0,023	79,8±3,06
Гипоксия: 1 сут	0,30±0,018***	8,4±0,29***	0,30±0,017***	24,7±1,03***
3 сут	0,37±0,015***^	13,7±0,44***^^^	0,37±0,015***^^	39,5±1,65***^^
10 сут	0,45±0,018***^^^	21,1±0,87***^^^	0,41±0,018***^^^	43,3±1,17***^^^
Гипоксия+L-АР: 1 сут	0,46±0,022***	13,3±0,39***	0,45±0,026***	36,8±1,37***
3 сут	0,54±0,024***^	39,7±1,87***^^^	0,58±0,033***^^	40,9±1,25***^
10 сут	0,70±0,028***^^^	64,8±2,51***^^^	0,79±0,035^^^	61,9±2,73***^^^
Гипоксия+М: 1 сут	0,40±0,016***	10,7±0,59***	0,43±0,019***	30,2±1,12***
3 сут	0,45±0,019***^	31,3±1,16***^^^	0,51±0,023***^	41,7±1,31***^^^
10 сут	0,59±0,026***^^^	54,6±1,82***^^^	0,63±0,025***^^^	52,5±2,14***^^^

Примечание. * –различия относительно данных контрольной группы значимы (** - P<0,01, *** - P<0,001); ^–различия относительно данных группы ишемии значимы (^^ - P<0,01, ^^^ - P<0,001).

Введение молсидамина крысам с ишемией печени также способствовало активизации eNOS, снижению активности iNOS, уровня NO и ONO_2^-. По мере удлинения сроков введения препарата положительное его влияние возрастало, и к заключительному сроку наблюдалось приближение изучаемых показателей к значениям интактных крыс. Однако следует отметить, что действие молсидамина было несколько слабее, чем L-аргинина.

Анализ действия ингибиторов системы NO на активность МОС гепатоцитов при ишемии/реперфузии печени показал, что начиная с 1-х по 10-е сутки блокада eNOS и nNOS неселективным ингибитором L-NAME оказывала еще большее негативное действие (табл. 4). Аналогичный, но менее выраженный эффект наблюдался и при применении селективного ингибитора nNOS 7-NI. Вместе с тем при введении селективного ингибитора iNOS S-MT наблюдалось динамичное повышение функциональной активности МОС гепатоцитов. Однако полного восстановления изучаемых показателей не зарегистрировано, так как они достоверно отличались от значений интактных крыс.

Таблица 4

Показатели монооксигеназной системы в микросомах гепатоцитов в различные сроки после введения ингибиторов нитрооксигеназной системы после 180 мин гипоксии/ишемии печени, M±m

Группа, срок наблюдения	Р450, нм/мг	НАДФН-цит.с-ред, нм/мин/мг	АГ, нм/мин/мг	Г-6-Фаза, нм/мин/мг
Контрольная	0,97±0,031	106,9±3,95	0,88±0,023	79,8±3,06
Гипоксия: 1 сут	0,30±0,018***	8,4±0,29***	0,30±0,017***^^	24,7±1,03***
3 сут	0,37±0,015***^	13,7±0,44***^^^	0,37±0,015***^^^	39,5±1,65***^^^
10 сут	0,45±0,018***^^^	21,1±0,87***^^^	0,41±0,018***	43,3±1,17***^^^
Гипоксия+L-NAME:1 сут	0,27±0,016***	8,8±0,34***	0,28±0,009***	21,2±0,89***
3 сут	0,29±0,015***	10,9±0,49***^^^	0,29±0,011***	28,6±0,94***^^^
10 сут	0,25±0,011***	16,2±0,58***^^^	0,26±0,008***	21,9±0,83***
Гипоксия+7-NI:1 сут	0,31±0,020***	9,3±0,42***	0,31±0,013***	22,5±0,81***
3 сут	0,34±0,022***	13,5±0,51***^^^	0,34±0,011***	33,7±1,17***^^^
10 сут	0,40±0,019***^^	23,6±1,04***^^^	0,26±0,009***^^	41,5±1,03***^^^
Гипоксия+S-MT:1 сут	0,33±0,017***	8,7±0,33***	0,33±0,009***	27,3±0,99***
3 сут	0,49±0,022***^^^	20,8±0,69***^^^	0,51±0,021***^^^	50,7±1,98***^^^
10 сут	0,81±0,031***^^^	79,2±3,09***^^^	0,70±0,027***^^^	64,1±1,86***^^^

Примечание. * –различия относительно данных контрольной группы значимы (** - P<0,01, *** - P<0,001); ^–различия относительно данных группы ишемии значимы (^^ - P<0,01, ^^^ - P<0,001).

Введение крысам с ишемией/реперфузией печени неспецифического ингибитора нитрергической системы L-NAME приводило к еще большему ингибированию активности eNOS, резкой активации iNOS, повышению содержания NO и ONO_2^- Причем, вышеперечисленные значения статистически значимо отличались от показателей интактных крыс. Наблюдаемые изменения были обусловлены резким подавлением белоксинтезирующей функции печени экспериментальных животных, что подтверждалось снижением уровня общего белка в микросомальной фракции этих крыс. Селективный ингибитор эндотелиальной синтазы оксида азота 7-NI оказывал такое же действие, но значительно более слабое, чем L-NAME. Селективный ингибитор индуцибельной синтазы оксида азота S-MT, в отличие от 7-NI, обладал более выраженным положительным действием. Причем, изучаемые показатели к заключительному сроку существенно не отличались от таковых у интактных крыс. Вышеперечисленные изменения были обусловлены активизацией белоксинтезирующей функции печени экспериментальных животных, что подтверждалось увеличением уровня общего белка в микросомальной фракции животных.

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что ингибиторы NOS оказывают разнонаправленное действие на активность ферментов МОС в ишемизированной печени: неселективный ингибитор L-NAME и селективный ингибитор 7-NI еще в большей степени угнетают, а селективный ингибитор S-MT обладает индуцирующим эффектом. Видимо, это было связано с прямым действием на активный центр цит.Р450 как избыточного количества NO, так и высокоцитоксического ONO_2^-.

Чтобы подтвердить данную версию, нами проведен корреляционный анализ между содержанием цит.Р450 – главного фермента НАДФН-зависимой электронтранспортной системы МОС микросом печени и содержанием NO, а также ONO_2^-. При гипоксии эта корреляционная связь между цит.Р450, NO и ONO_2^- была статистически значимой и после 1-х, 3-х и 10-х суток составляла соответственно r=0,81-0,89; r=0,83-0,93 и r=0,90-0,95 ($p<0,001$). На 10-е сутки опыта после введения L-NAME и 7-NI эта связь составила в обоих случаях r=-0,95-0,98 ($P<0,001$), а после введения S-MT на этот срок наблюдения корреляционная связь не отличалась от контроля и при оценке содержания цит.Р450 с NO составляла r=0,3 ($P>0,1$), а с ONO_2^- – r=-0,5 ($p>0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о полной зависимости угнетения активности МОС от содержания в микросомах NO и ONO_2^-.

Следует отметить, что при этом у животных с ишемией/реперфузией печени отмечалось достоверное повышение показателей, отражающих индукцию апоптоза гепатоцитов. Так, содержание белка Р53, цитокина ФНО-α и цит.С в сыворотке крови экспериментальных животных по сравнению с нормативными значениями статистически значимо возрастало соответственно в 1,39; 1,42 и 1,34 раза. Полученные результаты свидетельствуют о том, что резкая индукция индуцибельной формы синтазы оксида азота и накопление в гепатоцитах токсичных метаболитов оксида

азота активизирует проапоптотические белки, адаптивно направленные на ликвидацию поврежденных гепатоцитов.

Следует отметить, что высокие значения Р53, ФНО-α и цит.С в сыворотке крови крыс при действии бензонала по сравнению с группой с ишемией/реперфузией печени достоверно уменьшились соответственно в 1,28; 1,32 и 1,25 раза. Однако все изучаемые показатели полностью не восстанавливались. Введение крысам с ишемией/реперфузией печени ингибитора МОС циметидина усугубляло имеющиеся у них нарушения. В частности, содержание Р53, ФНО-α и цит.С в сыворотке крови в группе животных, получавших циметидин, по сравнению с крысами с ишемией/реперфузией, статистически значимо возросло соответственно в 1,17; 1,21 и 1,22 раза, превысив показатели интактных крыс соответственно в 1,64; 1,73 и 1,65 раза. Содержание Р53, ФНО-α и цит.С в сыворотке крови экспериментальных животных, получавших L-аргинин на фоне ишемии/реперфузии, достоверно снизилось соответственно в 1,30; 1,26 и 1,39 раза, приблизившись к значениям интактных крыс. При введении L-NAME животным с ишемией/реперфузией печени содержание Р53, ФНО-α и цит.С по сравнению с нелеченными животными достоверно возрастало соответственно в 1,31; 1,63 и 1,41 раза, а по сравнению с интактными крысами – в 1,83; 2,33 и 1,90 раза.

Оценивая связь NO системы с цит.Р450, необходимо подчеркнуть, что сбалансированный характер функционирования этих систем играет важную роль в регуляции программированной клеточной гибели, экспрессии генов, участвующих в блокаде клеточного цикла, модуляции Bcl-2, фрагментации ДНК.

В четвертой главе диссертации «**Метаболическая активность монооксигеназной и нитрергической систем при действии индуктора и ингибитора лекарственного метаболизма в норме и при патологиях**» представлены результаты изучения активности монооксигеназной и NO-систем в микросомах гепатоцитов у животных с острым токсическим гепатитом (ОТГ), вызванным CCl_4, и при циррозе печени. Действие бензонала у интактных животных характеризовалось дозозависимым повышением содержания цит.Р450, b_5 и снижением уровня цит.Р420, активацией ферментов МОС гепатоцитов. Препарат в малых дозах повышал активность eNOS и уровень NO , несколько подавляя индуцибельную форму фермента и его продукта. В более высоких дозах он активизировал как эндотелиальную, так и индуцибельную формы синтазы NO и продукты их метаболизма. Ингибитор лекарственного метаболизма циметидин дозозависимо угнетал активность МОС. Препарат дозозависимо повышал уровень NO и ONO_2^- вследствие активизации как eNOS, так и iNOS.

В качестве патологии печени мы использовали модель ОТГ, вызванного введением CCl_4, а также модель цирроза печени, индуцированного введением гелиотрина. При всех использованных моделях наблюдалось уменьшение содержания и подавление активности ферментов МОС, однако выраженность этих нарушений зависела от использованной

модели поражения печени. Наибольшее ингибирование МОС гепатоцитов было характерно для крыс с циррозом печени. Показатели нитрергической функции микросом гепатоцитов при использовании моделей поражения печени CCl_4 и при циррозе печени характеризовались резким ингибированием eNOS (снижение до 48,7 и 20,3% относительно исходных показателей) и индукцией индуцибельной формы синтазы оксида азота (повышение до 214,3 и 272,6% от исходного уровня). Это приводило к повышению уровня NO и ONO_2^-, особенно при циррозе печени.

Шестидневное введение бензонала в дозе 75 мг/кг повышало низкий уровень цит.Р450 и b_5, снижало высокое содержание цит.Р420. Активность ферментов НАДФН-цит.-С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП и Г-6-Ф-азы достоверно возрастала при остром поражении печени тетрахлорметаном, тогда как на модели цирроза печени положительный эффект проявлялся в меньшей степени. Бензонал в условиях патологии несколько повышал уровень iNOS, уменьшал содержание NO и ONO_2^- в микросомах крыс с острым поражением печени тетрахлорметаном. Слабый эффект бензонала наблюдался у крыс с циррозом печени. Следовательно, бензонал активизирует МОС печени крыс при ее поражениях, несколько снижает дисбаланс в системе продукции NO. Восстановление нитрергической системе не наблюдалось.

Ингибитор циметидин в дозе 10 мг/кг еще больше угнетал активность ферментов МОС у животных с ОТГ, вызванным CCl_4, и особенно при циррозе печени. При оценке эффективности циметидина у крыс с поражением печени в коррекции нарушений нитрергической системы микросом печени выявлено еще большее усугубление имеющихся нарушений. Отрицательное действие препарата проявлялось и в показателях нитрергической системы гепатоцитов, о чем свидетельствовали еще большее ингибирование эндотелиальной и резкая активизация iNOS. При этом зарегистрировано увеличение содержания NO и ONO_2^-.

Как видно из полученных данных, классический индуктор МОС бензонал оказывал благоприятное действие на монооксигеназную и нитрергическую системы микросом гепатоцитов, тогда как ингибитор лекарственного метаболизма циметидин угнетал активность МОС, усиливал образование токсичных радикалов NO, что может привести к еще большему усугублению состояния больных с заболеваниями печени.

В пятой главе диссертации **«Метаболическая активность монооксигеназной и нитрергической систем при действии индуктора и ингибиторов системы оксида азота в норме и при патологиях»** приведены результаты оценки влияния индукторов и ингибиторов системы оксида азота на показатели монооксигеназной и нитрергической системы в микросомах печени животных в опытах in vitro и in vivo. Индуктор системы оксида азота L-аргинин в дозах от 0,100 до 25 мкг/мл оказывал индуцирующее действие на показатели МОС, а в более высоких концентрациях – отрицательное. Содержание в инкубационной среде субстрата синтеза NO приводило к статистически достоверному увеличению активности eNOS, обуславливая некоторое увеличение уровня NO в микросомах печени интактных крыс. В то

же время активность iNOS подавлялась, снижался и уровень ONO_2^-, лишь в более низких концентрациях. По-видимому, субнормальные концентрации L-аргинина являются достаточным субстратом для стимуляции С-концевых доменов в цит.Р450 в МОС и NOS, оптимизации их функциональной взаимосвязи по обезвреживанию избыточного количества NO, его эффективной утилизации, что в конечном итоге сопровождалось восстановлением до контрольных значений уровня цит.Р420, содержания NO, ONO_2^-, активности iNOS, т.е. создаются взаимно благоприятные условия для функционирования МОС, eNOS, которые взаимодействуют, по-видимому, как синергисты, потенцируя действие друг друга. Об этом свидетельствует наличие прямой корреляционной зависимости между активностью НАДФН-цит.-С-ред. и eNOS ($r=0,83$, $p<0,01$), сильной обратной связи iNOS с НАДФН-цит.-С-ред. ($r=-0,95$; $p<0,001$) при высоких концентрациях L-аргинина (25 мкг/мл).

Для обоснования важности НАДФН-цит.-С-ред. в механизмах инициации НАДФН-оксидазы в отдельной серии опытов in vitro инкубацию микросом с большой дозой L-аргинина (25 мкг/мл) проводили одновременно с добавлением в инкубационную среду препарата апоцинина в дозах 1 и 3 мМ на 3 мл, являющегося специфическим ингибитором НАДФН-оксидазы. Установлено, что при действии апоцинина в дозах 1 и 3 мМ по сравнению с исходным уровнем – образцами, в которых содержатся 25 мкг/мл L-аргинина, активность НАДФН-цит.-С-ред. повышается на фоне увеличения активности eNOS, снижения активности iNOS, уровня NO и ONO_2^-. Следовательно, важным фактором разнонаправленных изменений функциональной активности МОС и NOS в зависимости от наличия в инкубационной среде микросом L-аргинина в высоких и низких дозах является их конкурентное отношение за использование в С-концевом домене цит.Р450 в МОС и eNOS - НАДФН.

В исследованиях in vitro установлено, что добавление в инкубационную среду микросом, выделенных из печени интактных животных, неселективного индуктора NO-системы молсидамина во всех использованных дозах не оказывал существенного влияния на активность НАДФН-цит.-С-ред. микросом печени интактных крыс. Препарат оказывал дозозависимое индуктивное действие на активность eNOS, тогда как активность iNOS и уровень пероксинитрита во всех использованных дозах существенно не изменялись. Ингибитор нитрергической системы S-MT повышал активность НАДФН-цит.-С-ред. в микросомах печени интактных крыс, начиная с концентрации 3,125 мкг/мл. Наряду с этим препарат в этих дозах увеличивал активность eNOS и уровень оксида азота. Активность iNOS и уровень пероксинитрита достоверно прогрессивно снижалась. Неселективный ингибитор системы оксида азота L-NAME во всех исследованных концентрациях прогрессивно подавлял работу МОС гепатоцитов, активность eNOS с одновременной активизацией индуцибельной формы оксида азота, ускоряя образование активных радикалов кислорода с оксидом азота.

Учитывая полученные данные, следующей задачей нашего исследования явилось изучение влияния индукторов и ингибиторов синтеза оксида азота на активность монооксигеназных ферментов, выяснение их возможной функциональной взаимосвязи с активностью изоферментов в составе NOS в микросомах печени и сыворотке крови экспериментальных животных. Проведенные исследования показали, что 6-кратное введение субстрата синтеза оксида азота L-аргинина интактным крысам в дозе 50 мг/кг статистически значимо повышало содержание цитохромов, приводило к активизации ферментов НАДФН-цит.-С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП и Г-6-Ф-азы. Введение L-NAME в дозе 10 мг/кг в течение 6 дней статистически значимо подавляло работу МОС. Ингибитор nNOS 7-NI, который интактным крысам вводили в дозе 10 мг/кг в течение 6 дней, оказывал такое же действие, что и L-NAME, однако степень выраженности его была ниже. Селективный ингибитор iNOS S-MT в дозе 1 мг/кг активизировал цит.Р450-зависимую систему гепатоцитов.

Следует отметить, что L-аргинин в микросомах печени активизировал eNOS и увеличивал выработку оксида азота, одновременно подавляя активность iNOS и уровень пероксинитрита. L-NAME ингибировал eNOS, активизировал iNOS. Однако 7-NI не оказывал существенного влияния на активность eNOS, но активизировал iNOS. S-MT повышал активность eNOS и снижал активность iNOS. На наш взгляд, в основе модулирующего эффекта ферментной системы детоксикации печени при действии неселективных, селективных ингибиторов NOS и индуктора NO L-аргинина лежат процессы не только изменения активности ферментов NOS и уровня L-аргинина, но и колебания содержания в них ONO_2^-.

Для обоснования этой версии нами проведено изучение корреляционной зависимости между показателями ферментной системы детоксикации и параметрами NOS в микросомах печени у животных, которым вводили L-NAME и S-MT. Установлено, что введение L-NAME характеризовалось наличием достоверной прямой корреляционной связи ($r=0.89-0.96$, $p<0,001$) между повышением уровня цит.Р420 и активностью iNOS, содержанием ONO_2^- и обратной корреляцией ($r=0.87-0.93$, $p<0,001$) между снижением содержания цитохромов Р450, b_5, ферментов НАДФН-цит.-С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП и Г-6-Ф-азы. Одновременно выявлена четкая прямая зависимость угнетения показателей eNOS и L-аргинина от снижения уровня изучаемых ферментов детоксикации микросом печени. При введении препарата S-MT ингибиция iNOS, снижение параметра ONO_2^- сопровождались сильной обратной зависимостью – увеличением показателя корреляции с возрастанием уровня цитохромов Р450, b_5, активности ферментов микросомального окисления – НАДФН-цит.-С-ред., Б(а)ПГ, АГ, N-АП и Г-6-Ф-азы. Выявлена сильная прямая зависимость ($r=0.90-0.95$, $p<0,001$) показателей eNOS, содержания L-аргинина со всеми параметрами системы детоксикации печени (кроме цит.Р420, с которым они имели сильную обратную корреляцию $r=0.92-0.97$, $p<0,001$). Вместе с тем не выявлена корреляционная зависимость при введении животным L-NAME и

S-MT изменения параметра NO в микросомах печени с показателями активности изучаемых ферментов микросомального окисления в этом органе.

L-аргинин, который вводили в течение 6 дней крысам с острым поражением печени тетрахлорметаном, повышал низкий уровень цит.Р450 и снижал высокие показатели цит.Р420. Активность микросомальных ферментов возрастала. Ингибиторы NO-системы L-NAME и 7-NI еще больше угнетали активность МОС, причем в большей степени это проявлялось у неселективного ингибитора, на что указывало ухудшение общего состояния животных и высокая летальность их в этой группе. В отличие от вышеперечисленных ингибиторов NO-системы, селективный ингибитор iNOS S-MT оказывал противоположенное действие, которое проявлялось улучшением общего состояния животных.

Изучение влияния индуктора и ингибиторов нитрергической системы на функционально-метаболические параметры МОС гепатоцитов крыс с циррозом печени выявило некоторые особенности. Введение индуктора L-аргинина на фоне резкого подавления активности МОС не оказывало заметного влияния на содержание цитохромов и активность микросомальных ферментов. Следует отметить, что L-NAME и S-MT еще больше подавляли деятельность микросом крыс с циррозом печени, 7-NI оказывал менее выраженное действие.

Следующим этапом наших исследований была оценка влияния вышеперечисленных препаратов на показатели системы оксида азота при патологии печени. Проведенные исследования показали, что введение индуктора системы оксида азота L-аргинин в течение 6 дней крысам с острым тетрахлорметановым гепатитом или циррозом печени приводило к некоторой активации eNOS и угнетению iNOS. L-NAME и 7-NI снижали активность eNOS и повышали iNOS. Возможно, интенсивное образование свободных радикалов кислорода еще больше ускоряло деструкцию гепатоцитов, что проявлялось резким ухудшением состояния животных. В то же время введение ингибитора iNOS оказывало противоположенное действие: он блокировал работу iNOS, но активизировал eNOS, способствуя снижению образования оксида азота и пероксинитрита.

Следовательно, индуктор NOS и селективный ингибитор iNOS оказывают положительное действие на показатели нитрергической системы, тогда как неселективный и селективный ингибиторы нейрональной синтазы оксида азота еще больше усугубляли имеющиеся в системе оксида азота нарушения. Выраженность действия этих препаратов зависела от тяжести поражения гепатоцитов.

ВЫВОДЫ

На основе проведенных исследований по докторской диссертации на тему: «**Функциональная зависимость между нитрергической и монооксигеназной системами в патогенезе воспаления печени**» сделаны следующие выводы:

1. Острая ишемия/гипоксия печени приводит к угнетению активности ферментов МОС и eNOS, стимуляции iNOS, которые сохраняются до 10-х суток опыта. Бензонал восстанавливал баланс в системе МОС и оксида азота, тогда как циметидин больше потенцировал эффекты постишемии/гипоксии. Ингибиторы NOS (неселективный L-NAME и селективные 7-NI и S-MT) разнонаправлено влияют на активность МОС в микросомах постишемизированной печени. L-NAME и 7-NI потенцируют эффекты постишемизированной печени, S-MT повышает активность eNOS, снижает активность iNOS и содержание NO и ONO_2^- в микросомах.

2. Добавление в инкубационную среду микросом специфического ингибитора НАДФН-оксидазы апоцинина с L-аргинином увеличивало активность НАДФН-цит.-С-ред. на фоне роста активности eNOS и снижения активности iNOS, содержания NO и ONO_2^-, что доказывает конкурентное отношение за использование в С-концевом домене цит.Р450 в МОС и eNOS-НАДФН.

3. У животных с ОТГ и ишемией/гипоксией печени наблюдалось увеличение уровня Р53 и ФНО-α, выход цит.С из митохондрий. Введение индуктора лекарственного метаболизма бензонала в дозе 50 мг/кг животным с ОТГ (CCl_4) и ишемией/гипоксией печени существенно уменьшало выраженность явлений апоптоза, а циметидин в дозе 10 мг/кг потенцировал апоптоз гепатоцитов, резко увеличивая содержание Р53, ФНО-α и цит.С в биологических жидкостях.

4. Индуктор NO L-аргинин, у животных с ОТГ и ишемией/гипоксией печени снижал уровень проапоптотических показателей. Неселективный ингибитор NOS L-NAME повышал уровень белка Р53, ФНО-α и выход цит.С из митохондрий гепатоцитов по сравнению с группой животных с ОТГ и ишемией/гипоксией печени.

5. Добавление НАДФН в микросомы, выделенные из ишемизированной доли печени, увеличивало НАДФН-цит.-С-ред. активность, скорость реакции iNOS; в микросомах активированной доли инициировало активность eNOS, угнетение скорости реакции фермента iNOS, активность НАДФН-цит.-С-ред., Г-6-Ф-азы, что подтверждает гипотезу о ключевой роли НАДФН и кислорода в работе монооксигеназной и нитрергической систем печени.

6. Индуктор лекарственного метаболизма бензонал у интактных животных в возрастающих дозах дозозависимо повышает активность ферментов МОС в микросомах печени, стимулирует активность eNOS, подавляет iNOS, снижает образование уровня ONO_2^- на фоне динамического возрастания общего NO. Ингибитор лекарственного метаболизма циметидин дозозависимо угнетает активность МОС, повышает уровень NO и ONO_2^- вследствие активизации как eNOS, так и iNOS. Эффективная доза бензонала 75 мг/кг, циметидина – 10 мг/кг.

7. Бензонал оказывал благоприятное действие на монооксигеназную и нитрергическую системы микросом гепатоцитов крыс с острым поражением печени и в меньшей степени с циррозом печени, тогда как циметидин еще больше угнетал активность МОС, усиливал образование токсичных

радикалов NO, приводя к еще большему усугублению тяжести состояния животных.

8. Индуктор системы оксида азота L-аргинин в низких дозах оказывал индуцирующее действие на показатели МОС, а в более высоких концентрациях проявлял отрицательный эффект. Препарат достоверно повышал активность eNOS и подавлял iNOS. Индуктор NO-системы молсидамин в чрезмерно высоких дозах вследствие активации eNOS и увеличения NO, оказывает ингибирующее влияние на МОС. Селективный ингибитор iNOS S-MT оказывает индуцирующее действие на МОС, активизирует эндотелиальную систему оксида азота и препятствует повышению уровня пероксинитрита, тогда как неселективный ингибитор L-NAME подавлял активность МОС и eNOS, активизировал фермент iNOS, что приводило к усиленной выработке высокотоксичного соединения ONO_2^-.

9. При патологии печени действие индуктора и ингибиторов системы оксида азота на МОС гепатоцитов зависит от тяжести патологии и вводимого препарата. При всех изученных патологиях направленность их совпадала, однако отличались по степени действия, более выраженные изменения отмечались при введении неселективного ингибитора. Индуктор NOS и селективный ингибитор iNOS оказывают положительное действие на показатели нитрергической системы, тогда как неселективный и селективный ингибитор нейрональной синтазы оксида азота еще больше усугубляли имеющиеся нарушения в системе NO. Выраженность действия этих препаратов зависела от тяжести поражения гепатоцитов.

SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING THE SCIENTIFIC DEGREES DSc.27.06.2017.Tib.30.03 AT THE TASHKENT MEDICAL ACADEMY

TASHKENT MEDICAL ACADEMY

SAYFULLAEVA SAIDA AKRAMJONOVNA

FUNCTIONAL DEPENDENCE BETWEEN NITROERGIC AND MONOOXYGENASE SYSTEM IN PATHOGENESIS OF THE LIVER INFLAMMATION

14.00.16 –Normal and pathological physiology

DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR OF (DSc) MEDICAL SCIENCES

TASHKENT – 2019

The theme of doctoral dissertation is registered at Higher Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan in number B2018.2.DSc/Tib311.

The doctoral dissertation is carried out at Tashkent medical academy.

The abstract of the dissertation is posted in two (Uzbek, Russian and English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (www.tma.uz) and on the website of «Ziyonet» information and education portal at (www.ziyonet.uz).

Scientific consultant:	**Karimov Hamid Yakubovich** Doctor of Medicine, professor
Official opponents:	**Zokirov Yorkin Uzuyevich** Doctor of Medicine, professor
	Saidov Alonur Bakhtinurovich Doctor of Medicine
	Aleinik Vladimir Andreevich Doctor of Medicine
The leading organization:	**First Moscow State Medical University named after IM Sechenov**

The defence will take on «_____» _____ 2019 at _____ at the meeting of Scientific Council No DSc.27.06.2017.Tib.30.03 at the Tashkent medical academy (Address: 100109, Tashkent city, Farobi str., 2. Phone/fax: (+99871) 150-78-25, e-mail: tta2005@mail.ru)

The dissertation can be reviewed at the Information Resourse Center of the Tashkent medical academy (is registered under No._____). (Address: 100109, Tashkent city, Farobi str., 2. Phone/fax: (+99871) 150-78-14)

Abstract of dissertation sent out on «_____» _____ 2019 y.

(mailing report №: ____ on «_____» _____2019 y.)

G.I.Shaykhova
Chairman of the Scientific council awarding of scientific degrees, Doctor of sciences, professor

N.J.Ermatov
Secretary Scientific council awarding scientific degrees, Doctor of sciences

B.U. Iriskulov
Chairman Scientific seminar under the Scientific council awarding scientific degrees, Doctor of sciences, professor

INTRODUCTION (abstract of DSc thesis)

The aim of the research work: it is the elucidation of the phenomenon of functional relationship between nitrergic and monooxygenase systems in the pathogenesis of liver lesions by induction and inhibition of these systems.

The object of the research work there were 640 white mongrel male rats with initial body weight of 180-250 g, kept in vivarium conditions of Tashkent medical academy.

The scientific novelty of the research work is as follows:

optimal concentrations of benzonal (75 mg/kg), cimetidine (10 mg/kg), L-arginine (1.56 μg/ml), molsidamine (0.075 μg/ml), S-MT (1.56 μg/ml), L-NAME (0.1 μg/ml) were established, which allows their use in experiments;

it is proved that in various acute liver lesions benzonal activates MOS rat liver, slightly reduces the imbalance in the production of nitric oxide, while cimetidine exacerbates the existing violations in these systems; the studied drugs did not affect the nitrergic system of damaged hepatocytes;

it is proved that an important factor of multidirectional changes in the functional activity of MOS and NOS depending on the presence in the incubation medium of L-arginine microsomes in high and low doses is their competitive relationship for the use in the C-terminal domain of cytochrome P-450 in MOS and eNOS– NADPH;

it is established that the effect of nonselective inducer of NO-system molsidomine on the activity of MOS liver is dose-dependent, selective iNOS inhibitor S-MT induce monooksigenazna system and endothelial nitric oxide prevents the increase in the level of peroxynitrite, a non-selective inhibitor L-NAME inhibits the activity of MOS and eNOS, activates iNOS;

the dependence of the action of the inducer and inhibitors of nitric oxide system on the MOS of hepatocytes on the severity of the pathology was proved, their orientation coincided, but differed from the degree of action; the greatest changes are characteristic of the non-selective inhibitor, which proves the inexpediency of the use of inhibitors of the nitrergic system of hepatocytes in liver pathologies;

in conditions of acute liver ischemia, a close functional relationship between the NO-system and MOS, a decrease in the activity of NADPH-cytochrome-C-reductase microsomes in liver ischemia lead to inhibition of all mos enzymes and hyperexpression of iNOS;

it is proved that inducers and inhibitors of monooxygenase and nitrergic systems in ischemia of the liver act differently; benzonal stimulates eNOS, the cimetidine – even more activates Nicaraguan system; L-NAME and 7-NI are even more oppressed, a selective inhibitor of S-MT has inducing effect.

for the first time it is proved that inhibition of MOS and inhibition of nitrergic system is associated with suppression of eNOS, hyperexpression of iNOS and enhancement of proapoptic processes; induction of MOS and NOS leads to suppression of apoptosis.

Implementation of the research results. Based on the results of substantiation of functional connections between nitrergic and monooxygenase systems in the pathogenesis of liver inflammation:

Methodical manual "Assessment of mobile endothelial cells population in blood plasma" (approved by the Ministry of Health on January 14, 2019, 8h-d / 6). This guide led to the development of functional-morphological degeneration of endothelial cells in blood plasma in hepatitis;

Methodical manual "Activity of antioxidant and nitrogenous systems in acute poisonous hepatitis" (approved by the Ministry of Health of Russia April 1, 2019, 8h-d / 62). This guide is based on the possible effects of hepatitis and new diagnostic methods, the positive effect of the inducer NOS and selective inhibitor iNOS on the performance of nitrogenous systems, which affects the further deterioration of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide system of neural synthases of nitric oxide, preventing mechanisms.

The results of studies aimed at improving the functional links between the nitrergic and monooxygenase systems in inflammatory liver pathogenesis are included in health practice, including the Central laboratory of the interdepartmental research laboratory at the Tashkent medical academy, the laboratory of Coordination of compounds and pharmacokinetics of the Institute of pharmaceutical medicine and dentistry and the Research center Face-Jag surgery Memorials appealed to the Ministry of Health (April 30, 2019 № 8N-44 g / reference). On the practical implementation of the obtained results influence the effectiveness of inhibitors, inducers of nitric oxide and inhibitors of GT on the hepatocytes of the MOS, the severity of disease and dependence on the drug, the effectiveness, the positive effect of the inductor NOS and selective iNOS inhibitor on the parameters of the nitrous system, as well as selective and inactive inhibitors in the system of nitric oxide. further deterioration of the effects of these drugs on the severity of hepatocyte injury is the cause for communication.

Structure and volume of the dissertation. The structure of the thesis consists of an introduction, five chapters, conclusions, practical recommendations, list of references. The volume of the thesis is 156 pages.

ЭЪЛОНҚИЛИНГАНИШЛАРРЎЙХАТИ

СПИСОКОПУБЛИКОВАННЫХРАБОТ

LIST OF PUBLISHED WORKS

I қисм (I часть, part I)

1. Сайфуллаева С.А., Гуриев С.Б., Комарин А.С., Жуманова Н.А.Влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность монооксигеназных ферментов печени у экспериментальных животных // Медицинский журнал Узбекистана. -2012. -№5. –С. 76-81 (14.00.00; №8).
2. Сайфуллаева С.А., Комарин А.С. К механизму функционально-метаболической взаимосвязи нитрергической и монооксигеназной систем в микросомах гепатоцитов крыс при ишемии печени// Медицинский журнал Узбекистана. -2013. -№4. –С. 101-105 (14.00.00; №8).
3. Комарин А.С., Даминова Л.Т., Сайфуллаева С.А. Влияние ингибиторов нитрооксигеназной системы на активность монооксигеназ и нитрооксигеназ в микросомах печени после развития в ней продолжительной гипоксии // Мед.журн. Узбекистана. - 2013. - №6.- С. 108-112(14.00.00; №8).
4. Сайфуллаева С.А., Даминова Л.Т., Комарин А.С. Влияние индукторов NO-синтазного метаболизма на активность монооксигеназной и нитрооксигеназной систем микросом печени в динамике после развития в ней острой ишемии – реперфузии //Инфекция, иммунитет и фармакология. -2013. -№5-6. -С. 159-164(14.00.00; №15).
5. Сайфуллаева С.А., Даминова Л.Т., Комарин А.С. Влияние L-аргинина на содержание цитохрома Р-450 и активность системы оксида азота (NOS) в микросомах печени животных в опытах invitro //Медицинский журнал Узбекистана.- 2014.- №4.- С.104-107 (14.00.00; №8).
6. Sayfullaeva S. Influence modulators of nitric oxide synthesis on the activity of liver enzymes monooxygenase in animals with acute toxic hepatits // European science review. -2016. –Vol.9-10. –P.361-366(14.00.00; №19).
7. Сайфуллаева С.А., Жуманова Н.А.Влияние индукторов и ингибиторов монооксигеназ на активность нитрергической системы в микросомах в ишемизированной печени// Вестник ТМА. -2016. -№2. –С. 49-51 (14.00.00; №13).
8. Сайфуллаева С.А., Жуманова Н.А. Влияние индукторов и ингибиторов нитрооксигеназной системы на показатели апоптоза гепатоцитов у экспериментальных животных // Медицинский журнал Узбекистана. -2016. -№1. –С. 119-121 (14.00.00; №8).
9. Sayfullaeva A., Karimov H. Y. The effect of inducers and inhibitors of monooxygenase on the activity nitroergic system in the microsomes in the

ischemic liver // British journal of medicine and medical research. -2018.- Vol.27, №10. -P. 34-39.

10. Сайфуллаева С. А. Функционально-метаболическая взаимосвязь нитрергической и монооксигеназной систем в микросомах гепатоцитов при экспериментальной ишемии печени // Медицинские новости. - 2019. - № 5 (296). – С. 82-86 (14.00.00; №82).

II қисм (II часть, Part II)

11. Комарин А.С., Сайфуллаева С.А., Ташкентбаева Э.Н. Активность ферментов монооксигеназной системы печени при действии селективных ингибиторов синтеза оксида азота у экспериментальных животных// Вестник врача. -2012. -№3. –С. 84-89.

12. Сайфуллаева С.А., Комарин А.С., Пулатов Х.Х., Хожиев Ш.Т.Метаболическая активность монооксигеназной и нитрергической систем при действии ингибиторов лекарственного метаболизма у экспериментальных животных//Проблемы оптической физики и биофотоники.– SFM, 2012. -С.10-13.

13. Сайфуллаева С.А., Комарин А.С., Саттаров И.С. Активность монооксигеназной и нитрергической систем в микросомах печени при действии на организм индукторов и ингибиторов лекарственного метаболизма //Врач-аспирант.-2013. -№2. -С.73-79.

14. Сайфуллаева С.А., Ташкентбаева Э.Н., Комарин А.С. Состояние активности ферментов микросомального окисления и нитрооксидергической системы в микросомах гепатоцитов при действии индукторов NO-системы у животных перенесших острую гипоксию печени// Вестник врача. -2013. -№3. –С. 166-170.

15. Комарин А.С., Сайфуллаева С.А., Ташкентбаева Э.Н. Роль нитрооксигеназной системы в механизмах регуляции монооксигеназных ферментов при острой ишемии печени// Вестник врача. -2013. -№3. –С. 98-101.

16. Сайфуллаева С.А., Комарин А.С., Гуриев С.Б. Состояние активности НАДФ-цитохром Р-450 редуктазы в микросомах гепатоцитов при действии индукторов и ингибиторов монооксигеназной и NO-систем // Материалы научно-практической конференции «Дни молодых ученных». – Ташкент, 2012. – С. 13-15.

17. Сайфуллаева С.А. Функциональная связь эндотелиальной и монооксигеназной систем при патологии печени //Материалы научно-практической конференции «Дни молодых ученных».–Ташкент, 2012. – С. 15-16.

18. Spectral analysis of P-450 cytochrom isoforms under IR radiation of microsoms, extracted from animals liver with toxic hepatitis. Sh.Khojiev, S.

Guriev, A. Komarin, S. Sayfullaeva, Kh. Pulatov// XVI International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics. - Saratov, 2012.

19. Сайфуллаева С. А. Спектрофотометрическое определение маркеров эндотелиальной функции у животных с острым токсическим гепатитом // Международная конференция актуальные проблемы физической электроники. Ташкент, 28 ноября. -2012. –С.174-175.

20. Комарин А.С., Сайфуллаева С.А., Гуриев С.Б.Система цитохрома Р-450 и его изоферменты при спектрофотометрическом их определении// Международная конференция актуальной проблемы физической электроники. Ташкент,28 ноября. - 2012. С.172-173.

21. Комарин А.С., Сайфуллаева С.А., Жуманова Н.А. К механизмам регуляции детоксикационной активности печени индукторами NO–системы //Профилактик тиббиёт: бугун ва эртага. Республика илмий анжумани тезислар туплами.- Андижон, 2014.- С.41-43.

22. Sayfullaeva S.A. The effects of inducer and inhibitor of NO-system proapoption indicators// Young scientist day topical issues in medicine. - Tashkent, 2016. - P.200-201.

23. Комарин А.С., Сайфуллаева С.А., Гуриев С.Б., Ташкентбаева Э.Н. Популяционная оценка циркулирующих эндотелиальных клеток в плазме крови: Методические рекомендации, –Ташкент, 2012.– 21с.

24. Сайфуллаева С.А., Жуманова Н.А., Адилханова Н.А.Влияние индуктора лекарственного метаболизма бензонала на активность монооксигеназной и нитрергической систем у экспериментальных животных // Конф. молод.уч. «Актуальные вопросы медицины».– Баку, 2017.- С.66-67.

25. Сайфуллаева С.А., Жуманова Н.А., Махкамова Д.Б.Активность нитрергической системы в микросомах при действии индукторов и ингибиторов монооксигеназ в ишемизированной печени // Конф. молод.уч. «Актуальные вопросы медицины». – Баку, 2017.- С.29-30.

26. Охунов А.О., Сайфуллаева С.А. Роль оксида азота в регуляции функций желудка. - LAP: Латвия. -2018.- 109с.

27. Сайфуллаева С.А., Жуманова Н.А. Метаболическая активность нитрергической системы у животных с острым токсическим гепатитом //Сборник науч. тр.научно-практ. конф. с участием международных специалистов «Современные методы диагностики, профилактики и лечения ВИЧ-инфекции»13-14 апреля 2018.–Андижан, 2018. - С. 122-123.

28. Сайфуллаева С.А., Охунов А.О., Жуманова Н.А., Маърупов И.О. Новая теория о механизме взаимосвязи нитрергической и

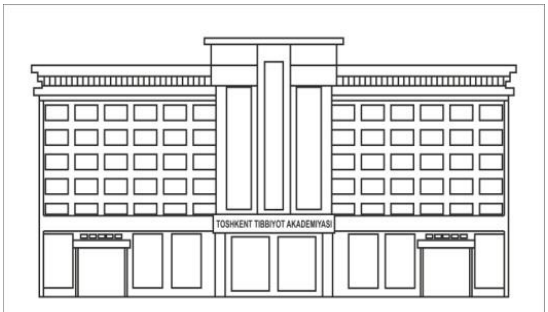
монооксигеназной систем в реализации проапоптических процессов в печени // Электронный депозитарий «Interoco» (International online copyright offiice), - 2018. - № EC-01-001985.

29. Сайфуллаева С.А., Охунов А.О., Жуманова Н.А., Маърупов И.О. Способ оценки активности антиоксидантной и нитрергической систем при остром токсическом гепатите // Электронный депозитарий «Interoco» (International online copyright offiice), - 2018. - № EC-01-001986.

30. Охунов А.О., Сайфуллаева С.А. Жуманова Н.А. Активность нитрергической системы при остром токсическом гепатите. - LAP: Латвия, 2018.– 69с.

31. Сайфуллаева С.А. Жуманова Н.А.,Охунов А.О. Активность антиоксидантной и нитрергической систем при остром токсическом гепатите: Методические рекомендации, –Ташкент, 2019, -60с.

Автореферат «Тошкент тиббиёт академияси ахборотномаси»
Журнали таҳририятида тахрирдан ўтказилди
(16 май 2019 йил)



M U H A R R I R I Y A T V A N A S H R I Y O T B O ’ L I M I

Разрешено к печати:3 июня 2019 года
Объем – 3.8 уч. изд. л. Тираж –100. Формат 60x84. 1/16. Гарнитура «TimesNewRoman»
Заказ № 0306 -2019. Отпечатано РИО ТМА
100109. Ул. Фароби 2, тел: (998 71)214-90-64, e-mail: rio-tma@mail.ru