

MODIFICĂRI STRUCTURALE HEPATICE CAUZATE DE STRESUL NITRO-OXIDATIV ÎN HIPERTENSIUNEA PORTALĂ EXPERIMENTALĂ

TUDOR HÂRȘOVESCU¹, GABI-VALERIU DINCĂ¹, MIHAI CĂLIN TANASI¹, SORIN IOAN TUDORACHE¹, IOAN BOGDAN BALMEȘ¹, CIPRIAN ISTODE¹

1Disciplina de Anatomie și Embriologie, Facultatea de Medicină și Medicină Dentară, Universitatea Titu Maiorescu București

Rezumat

Scopul studiului nostru constă în evidențierea modificărilor histologice la nivelul ficatului în hipertensiunea portală experimentală, demonstrând apariția de leziuni specifice stress-ului nitro-oxidativ generat de prezența speciilor reactive ale oxigenului, anionul peroxinitrit rezultat având grave efecte citotoxice.

Materiale și metodă: am creat un model experimental de tipul SupraHepatic – Inferior Vena Cava Ligation - SH-IVCL la șobolani adulți de rasă Wistar cu greutatea de 180 +/- 20 g. La 30 zile de la intervenția operatorie are loc sacrificarea animalelor de experiență. S-au recoltat fragmente de ficat care au fost prelucrate pentru examinarea și fotografierea la microscopul optic și microscopul electronic de transmisie.

Rezultate: la cea de-a doua laparatomie se constată hepatomegalie, ascită moderată în cavitatea peritoneală, edem la nivelul tubului digestiv infradiafragmatic. La microscopul optic se remarcă stază vasculară pericentrolobular și infiltrat limfoplasmocitar în jurul venelor hepatice. Microscopia electronică pune în evidență incluziuni lipidice și mitocondrii modificate structural, omogene, cu ștergerea întregii structuri.

Discuții: degradarea structurală a mitocondriilor este sugestivă pentru existența stress-ului nitro-oxidativ. În condiții de stress oxidativ accentuat, oxidul nitric nu are doar efecte benefice ci și efecte nocive semnificative, interacționând rapid cu anionul superoxid O₂⁻ rezultând anionul peroxinitrit ce determină moartea celulară prin inducerea necrozei și apoptozei.

Concluzii: terapia hipertensiunii portale trebuie să urmărească creșterea biodisponibilității hepatice a oxidului nitric în strânsă corelație cu scăderea stress-ului oxidativ, prin administrarea de antioxidanți. Datorită apariției precoce a leziunilor hepatocitare care generează fibroză, aceste metode terapeutice trebuie folosite cât mai rapid.

Cuvinte cheie: hipertensiune portală experimentală, stres nitro-oxidativ, oxid nitric, peroxinitrit, apoptoză.

STRUCTURAL CHANGES OF LIVER CAUSED BY NITRO-OXIDATIVE STRESS IN EXPERIMENTAL PORTAL HYPERTENSION

Abstract

The aim of our study is to highlight histological changes of the liver in experimental portal hypertension, demonstrating the emergence of specific nitro-oxidative stress injuries. These lesions are generated by reactive oxygen species, the peroxynitrite anion having severe cytotoxic effects.

Materials and methods: an experimental model of portal hypertension by suprahepatic - inferior vena cava ligation was created in adult Wistar rats. The animals were sacrificed 30 days after vascular clamping and liver samples were processed for optic and electronic microscopy.

Results: at the second laparotomy, the liver was increased in volume, with a little amount of ascites in peritoneal cavity and edema of the digestive organs walls. In liver it stands out pericentrolobular vascular stasis and inflammatory lymphoplasmocystic infiltrate around the end of hepatic vein. The electronic microscopy study shows hepatocytes with lipid inclusions and mitochondria with homogenous astructural aspect and absence of cristae.

Discussions: Structural degradation of mitochondria is an indicative for the existence of nitro-oxidative stress. Under conditions of increased oxidative stress, nitric oxide has not only beneficial effects but also significant adverse effects, quickly interacting superoxide, the resulting peroxynitrite anion promoting cell death by inducing necrosis and apoptosis.

Conclusions: Portal hypertension therapy should aim to increase the bioavailability of nitric oxide in liver correlated with decreasing the oxidative stress by administration of antioxidants. Due to the early appearance of fibrosis resulting from hepatocyte injury, these therapeutic methods must be used as soon as possible.

Keywords: experimental portal hypertension, nitro-oxidative stress, nitric oxide, peroxynitrite, apoptosis.

Introducere:

În condiții fiziologice, aproximativ 20% din fluxul sanguin de repaus perfuzează ficatul, 1/3 fiind adus de artera hepatică proprie iar 2/3 de vena portă, presiunea portală fiind joasă, de aproximativ 10 – 15 cm coloană de H₂O [1]. În final, sângele ajunge într-un pat capilar unic – capilarele sinusoide; acestea sunt extrem de permeabile datorită prezenței fenestrațiilor și au contact amplu cu suprafața hepatocitelor prin intermediul spațiilor perisinusoidale descrise de Disse. Sistemului venos port îi lipsesc valvulele, deci orice obstacol între atriul drept și venele splanhnice determină transmiterea retrogradă a unei presiuni crescute.

Presiunea portală (Pp) depinde de fluxul sanguin hepatic (F) în proporție de aproximativ 40% și de

rezistența patului vascular (R) 60% și poate fi exprimată prin următoarea formulă:

$$\Delta Pp = F \times R$$

Clasic, apariția hipertensiunii portale în ciroza hepatică a fost atribuită creșterii pasive a rezistenței de înaintare a sângelui la nivelul patului vascular hepatic datorită modificărilor morfologice induse de fibroză în spațiile portale. Studii recente au demonstrat însă existența a încă două mecanisme fiziopatologice:

- creșterea fluxului sanguin prin vasodilație splanhnică;
 - vasoconstricția activă, dinamică și reversibilă la nivel hepatic, responsabilă în proporție de 30 – 40% pentru creșterea rezistenței vasculare intrahepatice [2].
- Elementele contractile la nivelul patului vascular hepatic sunt celule miofibroblastice [3] ce conțin

actină α specifică fibrelor musculare netede, localizate atât la nivel sinusoidal cât și extrasinusoidal:

- celulele hepatice stelate (celulele Ito) activate – pericitele din spațiile perisinusoidale ale căror prelungiri înconjură capilarul sinusoid;
- celulele musculare netede din pereții ramificațiilor interlobulare ale venei porte;
- miofibroblaștii din septurile conjunctive neo-formate ce comprimă vasele din nodulii de regenerare.

Deși majoritatea acestor celule miofibroblastice au origine locală, preponderent din celulele hepatice stelate, o parte pot proveni și din celule stem mezenchimale ale măduvei hematogene [4].

În condiții normale endoteliul vascular compensează creșterea fluxului sanguin și vasoconstricția activă prin producerea oxidului nitric (NO). NO este o substanță hidrofobă care, din cauza masei moleculare mici, poate traversa membranele celulare fără a avea nevoie de canale sau receptori specifici. Intracelular activează guanilat ciclaza solubilă și crește concentrația guanozin 3-5 monofosfatului ciclic (cGMP), producând în final vasodilatație prin expulzarea Ca^{2+} de la nivelul citosolului. NO este produs prin oxigenarea unui aminoacid, L-arginina, până la N-hidroxit-arginină care, ulterior, tot prin oxidare va fi transformată în citrulină, eliberându-se o moleculă de NO. Reacția este catalizată de enzima NO sintetază (NOS) care prezintă trei izoforme:

- tipul I sau NOS activă la nivel neuronal (nNOS), citosolubilă;
- tipul II sau NOS inductibilă (iNOS), de asemenea citosolubilă, a fost identificată inițial la nivelul macrofagelor dar este prezentă și în hepatocite; este activată de prezența citokinelor proinflamatorii (cum ar fi factorul de necroză tumorală α - $\text{TNF}\alpha$) dar generează cantități mai reduse de NO comparativ cu celelalte forme;
- tipul III sau NOS activă la nivel endotelial (eNOS), fixată membranar, stimulată de pătrunderea intracelulară a Ca^{2+} .

În ciroza hepatică hipoxemia precum și creșterea inflamației și a fibrozei (prin stress-ul hepatocitelor la deformare – shear-stress) duc la scăderea producției endoteliale de NO [5]. Concomitent cresc concentrațiile prostanoizilor cu acțiune vasoconstrictoare – metaboliți ai acidului arahidonic rezultați sub acțiunea ciclooxigenazei – cum ar fi tromboxanul A_2 și prostaglandina H_2 [6]. Acest dezechilibru între factorii endogeni vasodilatatori și

vasoconstrictori este cunoscut sub numele de „disfuncție endotelială” și a fost intens studiat în fiziopatologia hipertensiunii arteriale și a insuficienței cardiace. De aceea tratamentul de ultimă oră în hipertensiunea portală urmărește creșterea biodisponibilității hepatice a NO utilizând medicație specifică corectării disfuncției endoteliale, cum ar fi statinele [7].

Scopul studiului nostru constă în evidențierea modificărilor histologice precoce la nivelul ficatului în hipertensiunea portală experimentală demonstrând apariția de leziuni specifice stress-ului nitro-oxidativ generat de prezența speciilor reactive ale oxigenului (ROS – reactive oxygen species). În condiții de stress oxidativ accentuat, NO nu are doar efecte benefice controlând tonusul și permeabilitatea vasculară, adeziunea celulară și aderența plachetară [8, 9] ci și efecte nocive semnificative, interacționând rapid cu ROS și în special cu anionul superoxid O_2^- rezultând anionul peroxinitrit [10] ce determină moartea celulară prin inducerea necrozei și apoptozei.

Materiale și metodă.

Am creat un model experimental de tipul SupraHepatic – Inferior Vena Cava Ligation - SH-IVCL la șobolani adulți de rasă Wistar cu greutatea de 180 ± 20 g.

Șobolanii au fost anesteziați prin inhalare de eter, efectul fiind potențat de injectarea intramusculară de ketamină, pentru analgezie folosindu-se algocalmin administrat tot intramuscular.

După celiotomia mediană am evidențiat venele suprahepatice și vena cavă inferioară la nivelul căroră am aplicat un clip metallic strâns moderat. Închiderea peretelui abdominal s-a făcut printr-un surjet iar la piele am folosit fire separate.

La 30 zile de la intervenția operatorie se reface celiotomia sub anestezie cu ketamină și se sacrifică animalele de experiență. Intraoperator se constată ficat cu lobi măriți de volum, ascită moderată în cavitatea peritoneală, edem la nivelul tubului digestiv infradiafragmatic. S-au recoltat fragmente de ficat care au fost prelucrate pentru examinarea și fotografierea la microscopul optic prin colorarea cu hematoxilină-eozină. Pentru examenul de microscopie electronică, după prelevare, ficatul animalelor de experiență a fost fixat inițial în soluție tamponată de glutaraldehidă 1,5%; ulterior fragmente de 1 mm^3 au fost spălate în soluție tampon fosfat 0,1 molar cu pH 7,4 și apoi au fost postfixate timp de 90 de minute în soluție

tamponată de tetraoxid de osmiu 1%. Fragmentele incluse în rășină sintetică și contrastate cu citrat de plumb și acetat de uranil au fost examinate la un microscop electronic de transmisie Philips.

Rezultate:

Studiul de microscopie optică a pus în evidență prezența unui discret infiltrat inflamator în jurul venei centrolobulare asociat cu accentuat proces distrofic pericentrolobular.

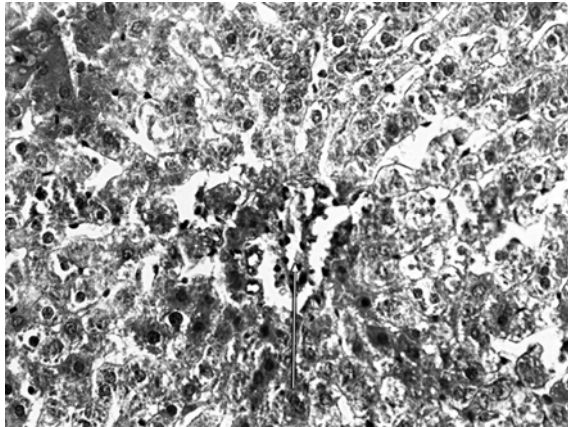


Fig. 1 Venă centrolobulară cu discret infiltrat inflamator. Accentuat proces distrofic pericentrolobular.

Infiltratul inflamator este prezent și la nivelul spațiului porto-biliar, hepatocitele din vecinătate având accentuată distrofie granulo-vacuolară

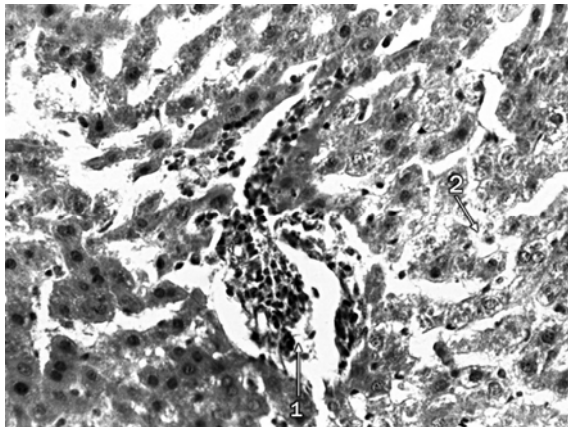


Fig. 2

- 1 - Spațiu porto-biliar cu infiltrat inflamator.
- 2- Hepatocite cu distrofie accentuată granulo-vacuolară.

Venele hepatice și capilarele sinusoide sunt dilatate, procesele degenerative granulo-vacuolar fiind ubicuitare la nivelul lobulului hepatic

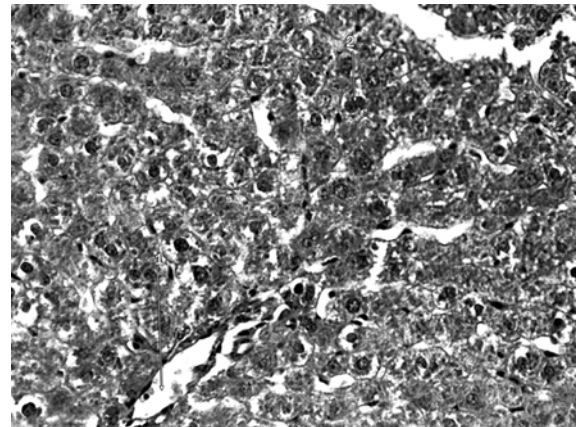


Fig. 3

- 1 - Venă hepatică dilatată.
- 2 - Infiltrat granulo-vacuolar.

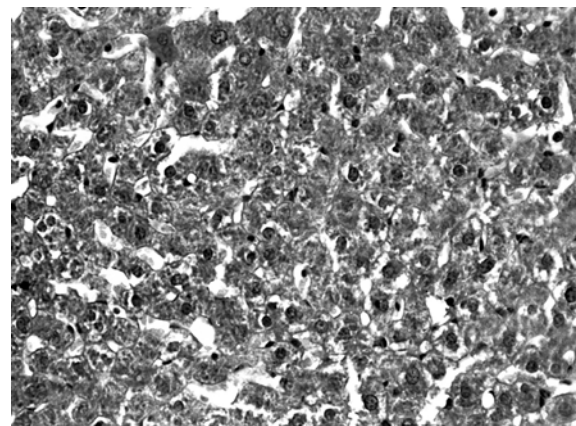


Fig. 4 Intens proces degenerativ granulo-vacuolar la nivelul lobulului hepatic.

Studiul de microscopie electronică a evidențiat detalii ale stazei capilare interhepatocitare

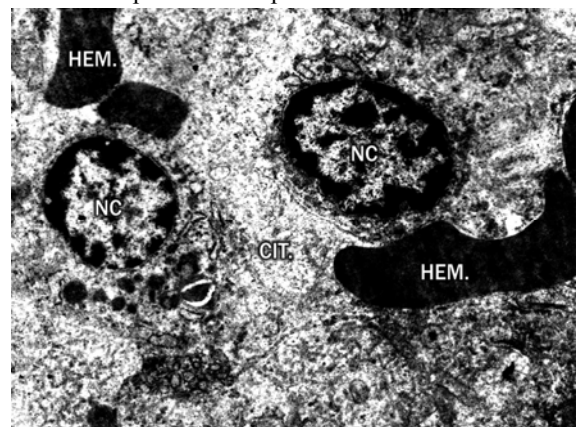


Fig. 5 Hepatocite cu stază capilară interhepatocitară.

Modificări discrete în citoplasmă.

cu intens proces degenerativ vacuolar în citoplasmă,
incluziuni lipidice

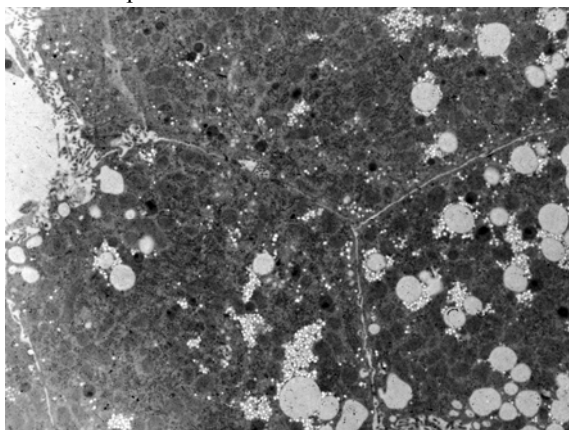


Fig. 6 Incluziuni lipidice multiple și distrofie

vacuolară.

fragmentarea reticulului endoplasmatic și mitocondrii
modificate structural, omogene, cu ștergerea întregii
structuri

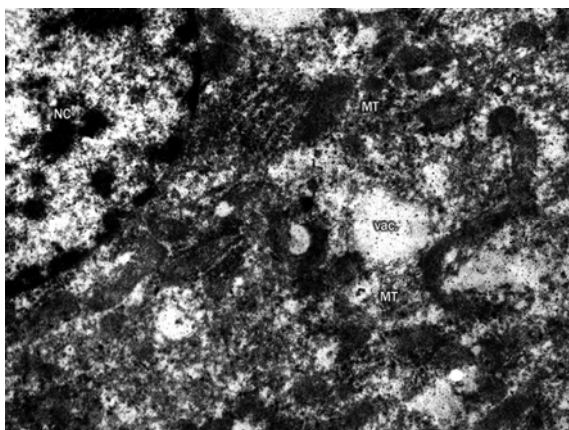


Fig. 7

Intens proces degenerativ vacuolar în citoplasmă.

Reticul endoplasmatic rugos fragmentat.

Mitocondrii omogene cu ștergerea întregii structuri

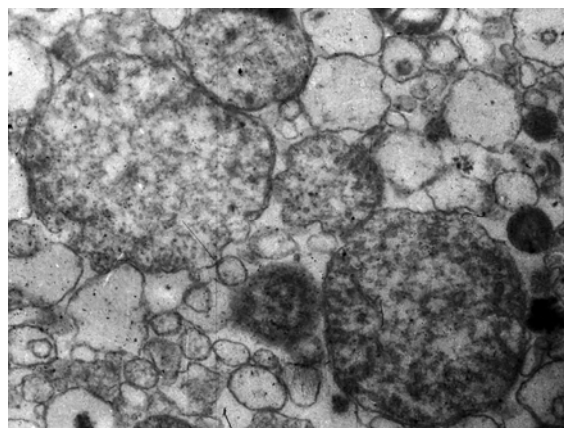


Fig. 8 Distrugerea membranelor și cristelor

mitocondriale.

Discuții:

Modificările constatate în diminuarea fluxului venos posthepatic de la nivelul ficatului sunt dominate de stază sinusoidală capilară care duce la infiltrat inflamator pericentrolobular cu apariția de hepatocite cu un grad accentuat de distrofie granulo-vacuolară și procese degenerative [11].

Degradarea structurală a mitocondriilor este sugestivă pentru existența stress-ului nitro-oxidativ. În condiții fiziologice nici O_2^- și nici NO nu sunt citotoxice, superoxidul fiind rapid înlăturat de superoxid dismutază, glutatión peroxidază și catalază iar oxidul nitric difuzând rapid la nivel tisular. În condițiile stress-ului nitro-oxidativ din hipertensiunea portală, combinarea NO cu anionul superoxid O_2^- dă naștere anionului peroxinitrit care are o durată de viață mai lungă comparativ cu ROS , acționând mai selectiv. Pătrunde în hepatocite prin canalele de anioni și formează legături cu lipide, tioli, resturi de aminoacizi, baze azotate și antioxidanții cu moleculă mică, rezultând peroxidarea lipidelor, oxidarea proteinelor și inactivarea enzimelor. Peroxinitritul reacționează direct cu proteinele ce conțin metale și în special fier, oxidându-l de la forma redusă, bivalentă Fe^{2+} , activă biologic, la forma trivalentă Fe^{3+} și astfel modifică proteine esențiale cum ar fi hemoglobina sau citocromul c.

Acțiunea sinergică a peroxinitritului și ROS scade diferența de potențial transmembranar intern la nivel mitocondrial prin distrugerea complexelor I și II ale sistemelor de transport a electronilor din lanțul respirator, cu oprirea sintezei de acid adenozintrifosforic (ATP) și permeabilizarea membranei externe, ceea ce duce la eliberarea de

citocrom c din mitocondrii și activarea caspazelor, mediatorii principali în declanșarea apoptozei [12].

Concluzii:

Modificările morfologice hepatice constatate în modelul experimental SH-IVCL de hipertensiune portală sunt în concordanță cu datele din literatură. Se remarcă la nivelul ficatului aspecte de distrofie hepatocelulară granulo-vacuolară și discretă încărcare grasă, în special pericentrolobular, infiltrat inflamator în jurul venelor suprahepatice și importante leziuni mitocondriale.

Mitocondriile sunt atât sursa cât și ținta stresului oxidativ în hipertensiunea portală și determină moartea hepatocitelor prin declanșarea apoptozei și necrozei, ceea ce reprezintă un stimul pentru activarea celulelor miofibroblastice.

Celulele miofibroblastice activate exercită o importantă rezistență vasculară dinamică și reversibilă la nivel hepatic.

Terapia hipertensiunii portale trebuie să urmărească creșterea biodisponibilității hepatice a NO în strânsă corelație cu scăderea stress-ului oxidativ prin administrarea de antioxidanți generali - carotenoizii, N-acetil-cisteina, tocoferolul sau care ținesc specific mitocondria - MitoQ – ubiquinonă (coenzimă Q10) conjugată cu tetrafenilfosfoniu (TPP+). Datorită apariției precoce a leziunilor hepatocitare care generează fibroză, aceste metode terapeutice trebuie folosite cât mai rapid.

Bibliografie

1. El Atti EA, Nevens F, Bogaerts K, Verbeke G, Fevery J. Variceal pressure is a strong predictor of variceal haemorrhage in patients with cirrhosis as well as in patients with non-cirrhotic portal hypertension. *Gut* 1999;45: 618–621.
2. Nevens F, Bustami R, Scheys I, Lesaffre E, Fevery J. Variceal pressure is a factor predicting the risk of a

first variceal bleeding: A prospective cohort study in cirrhotic patients. *Hepatology* 1998;27:15–19.

3. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-172.

4. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cells / myofibroblast subpopulation in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002;36:200-209.

5. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478–491.

6. Moreau R, Lebrec D. Endogenous factors involved in the control of arterial tone in cirrhosis. *J Hepatol* 1995;22: 370–376.

7. Bosch J, Abraldes JG, Fernández M, García-Pagán JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:558-567

8. Schrier RW, Gurevich AK, Cadnapaphornchai MA. Pathogenesis and management of sodium and water retention in cardiac failure and cirrhosis. *Semin Nephrol* 2001;21:157–172.

9. Mesh CL, Joh T, Korthuis RJ, Granger DN, Benoit JN. Intestinal vascular sensitivity to vasopressin in portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1991;100:916–921.

10. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999;30:1-5.

11. Atucha NM, Shah V, Garcia-Cardena G, Sessa WE, Groszmann RJ. Role of endothelium in the abnormal response of mesenteric vessels in rats with portal hypertension and liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1996;111:1627–1632.

12. Novo E, Marra F, Zamara E, et al. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut* 2006;55:1174-1182