



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ L-НОРВАЛИНА И АДЕМЕТИОНИНА ПРИ ИШЕМИЧЕСКИХ И РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ПЕЧЕНИ

Д.В. ЛОПАТИН¹
С.А. АЛЕХИН¹
М.В. ПОКРОВСКИЙ²
П.М. НАЗАРЕНКО¹
В.П. ТРОШИН³
Д.И. КОЛМЫКОВ¹
Л.В. ИВАНОВА¹
В.Д. ЛУЦЕНКО²
С.Л. СПЕРАНСКИЙ²

¹⁾ Курский государственный
медицинский университет

²⁾ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

³⁾ Брянский патологоанатомический
институт

e-mail: s_alehin@mail.ru

В ходе исследования было установлено, что L-норвалин в дозе 10 мг/кг обладает выраженным гепатопротекторным действием, в сравнении с адеметионином в дозе 400 мг/кг, что выражается в снижении активности аминотрансфераз, уменьшении экспрессии антиапоптотического маркера Bcl-2, а также площадей некроза и нейтрофильной инфильтрации в печени.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, печень, ингибитор аргиназ, L-норвалин, адеметионин.

Заболевания печени занимают, по данным ВОЗ, четвертое место в общей заболеваемости. От 10 до 40% всего взрослого населения страдают неалкогольной жировой болезнью печени, которая является, по мнению ряда авторов, причиной цирроза печени и гепатоцеллюлярного рака, что, как правило, диктует необходимость хирургического лечения. Хирургическая травма приводит к ишемическому повреждению ткани печени, добавляя к нему еще и реперфузионную травму, как следствие восстановления кровотока в сосудах органа [1, 9]. В связи с чем немаловажным является фармакологическая коррекция ишемических и реперфузионных повреждений, однако до настоящего момента данный вопрос остается открытым в связи с недостаточной изученностью одних агентов и умеренной либо малой эффективностью других.

Как при прекращении кровотока, так и при его восстановлении одной из основных мишеней является митохондрия [1, 4, 15, 18]. Образование активных форм кислорода, провоспалительных цитокинов, факторов активации апоптоза усиливает развивающееся митохондриальное повреждение, при этом во многом регуляция ишемического и реперфузионного повреждения зависит от уровня универсального мессенджера – оксида азота (NO), образующегося под действием индуцибельной и конституциональной NO-синтаз [5, 6, 7, 13, 17].

В исследованиях было показано, что метаболизм L-аргинина протекает двумя путями: с участием NO-синтаз до цитрулина и участием аргиназ до орнитина и мочевины, при этом активность аргиназ значительно выше таковой NO-синтаз, что проявляется в субстратном ингибировании синтеза NO [5, 6]. Таким образом, становится понятно, что изменение уровня NO – ключевой точки фармакологической коррекции, сказывается на выраженности как ишемического, так и реперфузионного поражения тканей.

Подавление активности аргиназ приводит к повышению уровня NO, таковой активностью обладает большое количество различных веществ [14], однако наименее изученным и при этом одним из самых активных является L-норвалин (2-аминопентановая кислота) – неметаболизирующийся аналог L-валина, что объясняется его структурным подобием орнитину по механизму обратной связи, угнетающему активность фермента [5, 4]. Ранее в нашей лаборатории изучалась активность L-норвалина в отношении коррекции L-NAME индуцированного дефицита азота, а также его эдотелио- и кардиопротективные эффекты [0, 3, 12].



В связи с вышеизложенным особый интерес приобретает исследование гепатопротекторной активности в сравнении с известными гепатопротекторами, в частности с адеметионином.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 48 самцах крыс линии Wistar массой 180-220 г. Животные были распределены на группы следующим образом: группа интактных животных – А (n=12), группа с реперфузионным поражением печени после эпизода 15-минутной ишемии – В (n=12), группа с применением L-норвалина в дозировке 10 мг/кг внутривентриально при ишемии-реперфузии – С (n=12), группа с применением адеметионина в дозе 400 мг/кг внутривентриально при ишемии-реперфузии – D (n=12).

Ишемию печени воспроизводили путем наложения латексного турникета на аналог печеночно-двенадцатиперстной связки у крыс на 15 минут. L-норвалин и адеметионин вводили животным за 30 мин. до моделирования ишемии и повторно по возобновлении кровотока. Манипуляции выполнялись под общим обезболиванием (хлоралгидрат в дозе 300 мг/кг внутривентриально). Забор крови производился через 24 часа после проведения эксперимента. Для оценки выраженности гепатоцеллюлярного повреждения определялась активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) кинетическим фотоколориметрическим способом на автоматическом биохимическом анализаторе «Виталаб Флексор Е» (Нидерланды) с использованием реагентов фирмы «Bioscop» и «Human» (Германия). Для проведения гистологического исследования печени забирали участки размером 1 x 1 x 0,5 см в стандартных местах с последующим приготовлением гистологических микропрепаратов и окраской их гематоксилином и эозином по Ван Гизону, Мак Манусу и Паппенгейму.

На гистологических препаратах определяли большой и малый диаметр гепатоцитов и их ядер при помощи специальной установки «μVizo-103», вычисляли площадь поперечного сечения гепатоцитов, их ядер, цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическое отношение гепатоцитов.

Результаты. Для определения сравнительной эффективности L-норвалина и адеметиона при влиянии на ишемический и реперфузионный синдром нами определена активность цитолитического синдрома. Активность АСТ у животных, перенесших ишемию-реперфузию печени, превышала показатели контрольной группы в 1,93 раза и составила 100,0±1,8 Ед/л в группе А и 193,0±27,1 (p≤0,005) Ед/л в группе В. В то же время активность АЛТ у животных, перенесших ишемию-реперфузию печени, превышала показатели интактной группы в 3,2 раза – соответственно 62,1±3,8 Ед/л у интактных и 196,8±26,9 Ед/л (p≤0,05), что свидетельствует о выраженном повреждении печени. При применении L-норвалина в дозировке 10 мг/кг внутривентриально нами было отмечено снижение уровня активности АСТ в 1,6 раза и АЛТ в 3,33 раза, применение же адеметионина в дозировке 400 мг/кг приводило к снижению активности АСТ лишь в 1,1 раза, в то время как активность АЛТ падала в 2,7 раза по сравнению с группой В, что наглядно отображено в таблице.

Уменьшение активности трансаминаз, по нашему мнению, обусловлено уменьшением реперфузионного повреждения за счет нормализации кровотока в микроциркуляторном русле и регуляции сосудистого тонуса, к которому приводит угнетение аргиназы II, с последующим увеличением доступности L-аргинина и повышением концентрации NO, что благоприятно сказывается на функциональном статусе гепатоцита, в то время как адеметионин не оказывает существенного влияния на микроциркуляцию, исходя из механизма его действия.

Таблица

Результаты изучения влияния L-норвалина в дозировке 10 мг/кг и адеметионина в дозировке 400 мг/кг на активность печеночных трансаминаз при ишемии-реперфузии печени

Группы животных	Уровень АСТ (Ед/л)	Уровень АЛТ (Ед/л)
Интактные (группа А, n=12)	100,0±1,8	62,1±3,8
Ишемия/реперфузия (группа В, n=12)	193,0±27,1*	196,8±26,9*
L-норвалин в дозе 10 мг/кг (группа С, n=12)	120,0±2,9**	59,3±2,5**
Адеметионин в дозе 400 мг/кг (группа D, n=12)	174,9±6,5*	72,8±4,3**

Примечание: * – p<0,05 в сравнении с интактными, ** – p<0,05 в сравнении с ишемией-реперфузией.

Стандартное морфологическое исследование выявило в группе В без фармакокоррекции выраженные изменения ядер, проявляющиеся вакуолизацией, фрагментацией хроматина до полного исчезновения, с остатками хроматина по периферии ядра, с кариолизисом и кариопикнозом, резкий отек цитоплазмы с резко выраженной зернистой и жировой дистрофией, отек и резкое расширение пространств Диссе.

Отличительной чертой данной группы являются выраженные очаги субкапсулярных и перипортальных некрозов с регенераторными гипертрофическими гепатоцитами по периферии, средней площадью до $0,215 \pm 0,014 \text{ мм}^2$. По ходу портальных трактов отмечается диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация с участками ступенчатых некрозов. Гликоген в гепатоцитах расположен диффузно, имеется не во всех клетках. При иммуногистохимическом исследовании в гепатоцитах выявлена сниженная по сравнению с контрольной группой локальная экспрессия Vcl-2.

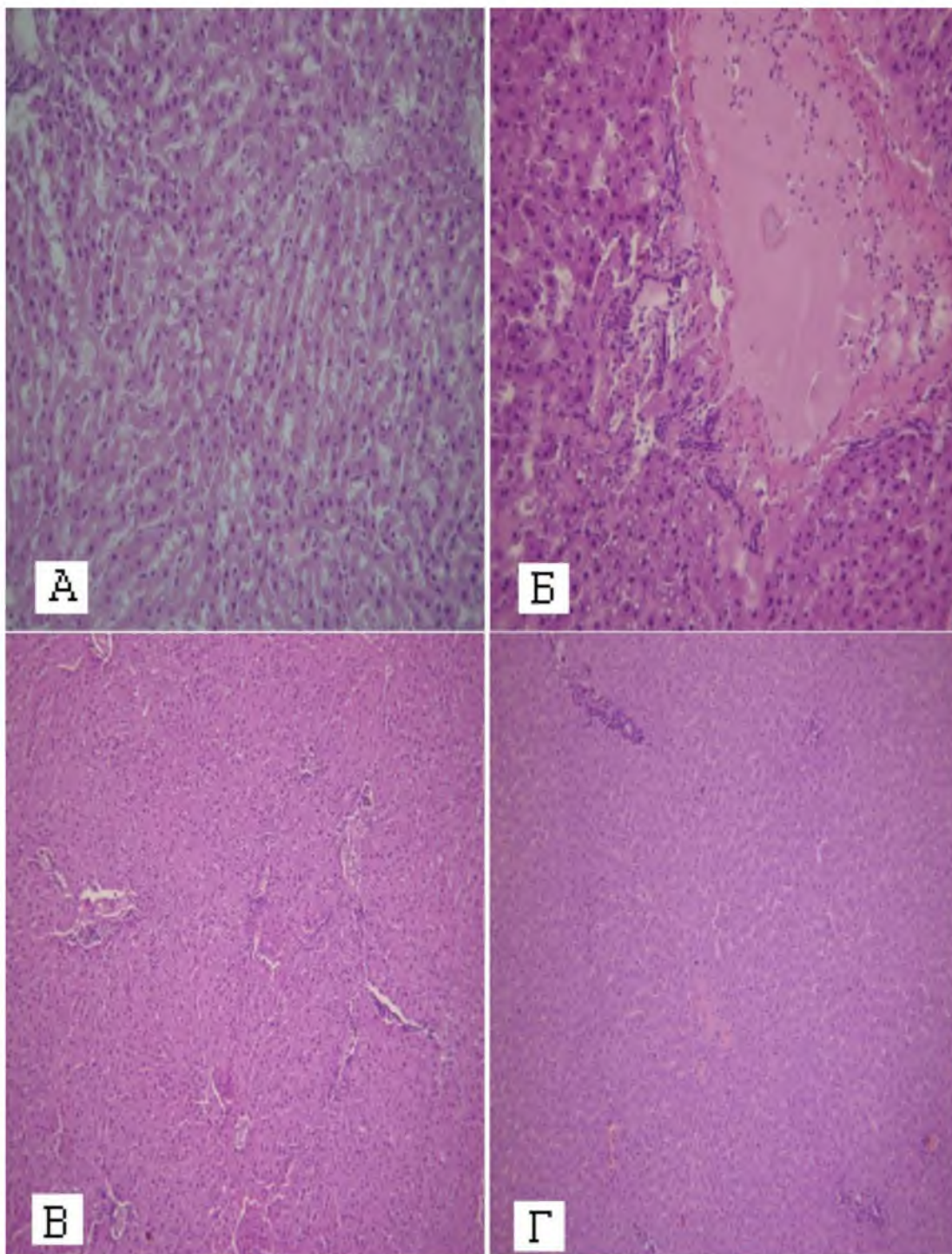


Рис. 1. Морфологические изменения в печени различных групп: группа А интактная - структура ткани печени сохранена, дольки и портальные тракты четкие (А), группа Б - структура нарушена, видны очаги некрозов, жировой инфильтрации гепатоцитов (Б), группа С - умеренные очаги некрозов, отек пространств Диссе (В), группа D - отек пространств Диссе, круглоклеточная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото. X 100.



Морфологические изменения в группе С, получавшей 10 мг/кг L-норвалина, в целом значительно менее выражены, чем в группе В. Так, отмечается умеренный отек и расширение пространства Диссе, лейкоцитарная инфильтрация портальных трактов, что заметно на рисунке. Острые некрозы с лимфоцитарной инфильтрацией имели меньшую площадь, в среднем составлявшую $0,186 \pm 0,011$ мм². При иммуногистохимическом исследовании в гепатоцитах выявлена локальная экспрессия Vcl-2 от средней до умеренной степени выраженности.

Изменения в группе D хоть и носили менее выраженный характер, чем в контрольной группе, все же не достигали таковых в группе с применением L-норвалина в дозировке 10 мг/кг. Площадь некрозов была больше и составила $0,196 \pm 0,011$ мм². Отек как самих гепатоцитов, так и пространств Диссе также выражен в большей степени, чем в группе С. При иммуногистохимическом исследовании в гепатоцитах выявлена сниженная локальная экспрессия Vcl-2.

Результаты морфологического исследования в сочетании с данными иммуногистохимического исследования фактора апоптоза Vcl-2 свидетельствуют о явной гепатопротекторной активности L-норвалина 10 мг/кг в отношении уменьшения повреждающего действия ишемии-реперфузии, причем активность L-норвалина выражена в большей степени, чем у адеметионина.

Морфометрические исследования больших и малых диаметров ядер гепатоцитов, ядерно-цитоплазматических взаимоотношений не выявили статистических различий между изучаемыми группами, что позволило сделать вывод о том, что данные изменения, на исследуемом сроке, не носят специфический характер.

Заключение. Полученные данные говорят о выраженной гепатопротекторной активности L-норвалина в дозе 10 мг/кг при ишемической и реперфузионной травме печени, реализующейся, с одной стороны, через изменение энергетического и функционального состояния гепатоцитов и через уменьшение повреждения и повышение экспрессии факторов антиапоптоза – с другой, причем протекторное действие L-норвалина имеет большую выраженность, чем у адеметионина в дозе 400 мг/кг. Таким образом, подавление активности аргиназ при реперфузии печени оказывает положительное защитное действие, приводя к активации синтеза NO, который, в свою очередь, улучшает переносимость и ишемического и реперфузионного повреждения.

Литература

1. Вишневский, В.А. Операции на печени / В.А.Вишневский, В.А. Кубышкин, А.В. Чжао, Р.З. Икрамов. – М., 2003. – 155 с.
2. Цепелева, С.А., Эндотелио- и кардиотропные эффекты L-норвалина в эксперименте / С.А. Цепелева, А.С. Белоус, О.С. Гудырев и др. // Материалы 76-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность». – Курск, 2011. – Ч.3. – С. 299.
3. Цепелева, С.А. Роль L-норвалина в коррекции L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота / С.А. Цепелева, М.В. Покровский, М.В. Корокин и др. // Материалы V конгресса «Рациональная фармакотерапия и клиническая фармакология». – СПб. – Т. 1. – С. 294.
4. Bommarius, A.S. Drauz Bommarius K. An enzymatic route to L-ornithine from arginine – activation, selectivity, and stabilization of L-arginase / A.S. Bommarius, K. Drauz Bommarius // *Bioorganical and Medical Chemistry*. – 1994. – Vol .2. – P. 617-626.
5. Chang, C.I. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages / C.I. Chang, J.C. Liao, L. Kuo // *Am J Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 1998. – Vol. 274. – P. 342-348.
6. Chicoine, L.G. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells / L.G. Chicoine, M.L. Paffet, T.L. Young et al. // *Am J Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* – 2004. – Vol.287. – P. 60-68.
7. Jaeschke, H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning / H. Jaeschke // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2003. – P. G15-G26.
8. Jassem, W. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury / W. Jassem, S.V. Fuggle, M. Rela et al. // *Transplantation*. – 2002. – Vol. 73. – P. 493-499.
9. Jia, C. Advances in the regulation of liver regeneration. *Expert Rev / C. Jia // Gastroenterol Hepatol.* – 2011. – Vol. 5(1). – P. 105-121.
10. Kin, H. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release / H. Kin, N.P. Wang, J. Mykytenko et al. // *Shock*. – 2008. – Vol. 29(6). – P. 761-768.
11. Lauzier, B. Beneficial effects of myocardial postconditioning are associated with reduced oxidative stress in a senescent mouse model / B. Lauzier, S. Delemasure, R. Debin et al. // *Transplantation*. – 2008. – Vol. 85(12). – P. 1802-1808.



12. Pokrovsky, M.V. Arginase Inhibitor in the Pharmacological Correction of Endothelial Dysfunction / M.V. Pokrovsky, M.V. Korokin, S.A. Tsepeleva et al. // International Journal of Hypertension. – 2011. – PMID:PMC3124670.
13. Raat, N.J. Effects of nitrite on modulating ROS generation following ischemia and reperfusion / N.J. Raat, S. Shiva, M.T. Gladwin // Adv Drug Deliv Rev. – 2009. – Vol. 61(4). – P. 339-350.
14. Reid, K. Liver I/R injury is improved by the arginase inhibitor, N-omega-hydroxy-nor-l-arginine (nor-NOHA) / K. Reid et al. // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2006. – Vol. 292. – P. G512-G517.
15. Sinay, L. Ischemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model / L. Sinay, M. Kürthy, S. Horváth et al. // Clin Hemorheol Microcirc. – 2008. – Vol. 40(2). – P. 133-142.
16. Yuan, G.J. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats / G.J. Yuan, J.C. Ma, Z.J. Gong et al. // World J Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11. – P. 1825-1828.
17. Zaouali, M.A. Hypoxia inducible factor-1alpha accumulation in steatotic liver preservation: role of nitric oxide / M.A. Zaouali, I. Ben Mosbah, E. Boncompagni et al. // World J Gastroenterol. – 2010. – Vol. 16(28). – P. 3499-3509.
18. Zhou, G. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1 / G. Zhou, L.A. Dada, M. Wu et al. // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2009. – Vol. 297(6). – P. 1120-1130.

COMPARATIVE ANALYSIS OF L-NORVALINE AND ADEMETHIONINE HEPATOPROTECTIVE ACTION EFFICACY IN ISCHEMIC AND REPERFUSION INJURY OF LIVER

D.V. LOPATIN¹, S.A. ALEHIN¹
M.V. POKROVSKIY²
P.M. NAZARENKO¹
V.P. TROSHIN³, D.I. KOLMIKOV¹
L.V. IVANOVA¹, V.D. LUTSENKO²
S.L. SPERANSKIY²

¹⁾ Kursk state medical university

²⁾ Belgorod state national research university

³⁾ Bryansk pathologic anatomy institute

e-mail: s_alehin@mail.ru

During the research it was determined that L-norvaline at 10 mg/kg has a hepatoprotective effect in comparison with ademethionine at 400 mg/kg showing an aminotransferase action lowering, antiapoptotic marker Bcl-2 expression diminishing and liver necrotic areas and neutrophilic infiltration reduction.

Keywords: ischemia, reperfusion, liver, arginase inhibitor, L-norvaline, ademethionine.