

© Коллектив авторов, 2013
УДК 615.244:616-005.4

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ РЕАЛИЗАЦИИ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ L-НОРВАЛИНА И ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

*М.В. Покровский¹, С.А. Алехин², Д.В. Лопатин², Д.И. Колмыков², Л.В. Иванова²,
В.Д. Луценко¹, С.Л. Сперанский¹, И.В. Сухотерин¹*

Институт последипломного медицинского образования НИУ «БелГУ», г. Белгород (1)
Курский государственный медицинский университет, г. Курск (2)

В статье проведен фармакологический анализ механизмов действия и эффективности ишемического прекондиционирования и L-норвалина при ишемии/реперфузии печени в эксперименте. В ходе исследования была показана высокая эффективность ишемического прекондиционирования, которое полностью блокировалось применением глибенкламида. L-норвалин также оказывал выраженный гепатопротекторный эффект отменяемый глибенкланкламидом лишь частично.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, ишемическое прекондиционирование, печень, L-норвалин.

Ишемическое прекондиционирование (ИПК) показало себя как мощнейший протекторный механизм при таких патологических состояниях, как инфаркт миокарда, инсульт и многое другие [6, 8]. Изучение механизмов реализации данного защитного феномена привело к его разделению на раннее и позднее (или первое и второе окно) с несколько различными механизмами действия, а соответственно, и активаторами или триггерами [4, 5, 7]. Открытие триггеров стало первым этапом в направлении фармакологического моделирования действия ИПК. Так, триггером раннего прекондиционирования является аденозин, однако наиболее перспективным в отношении фармакологического моделирования является основной триггер второго окна – оксид азота (NO) [2, 3]. В настоящее время известен большой спектр различных веществ, действующих по механизмам данного триггера, наименее изученными из них являются ингибиторы аргиназ. Особый интерес приобретают исследования возможности использования ингибиторов аргиназ при абдо-

минальной хирургической патологии, в частности заболеваниях печени, где ишемическая травма, обусловленная самой патологией, усугубляется повреждающим действием ишемической и реперфузионной травмы, связанной с хирургическим вмешательством.

В связи, с чем целью настоящего исследования явился анализ механизмов реализации гепатопротекторного действия L-норвалина и ишемического прекондиционирования при ишемии/реперфузии печени.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 72 самцах крыс линии Wistar массой 180-220 г. Все животные содержались в стандартных условиях вивария Курского государственного медицинского университета. Группу А (n=12) составили интактные животные, в группу В (n=12) вошли животные с реперфузионным поражением печени после эпизода 15-минутной ишемии, группу С (n=12) составили животные, которым с целью защиты тканей печени было применено прямое ишемическое прекондиционирование, в группе D (n=12) прово-

дилось исследование влияния прямого ишемического прекондиционирования на течение 30-минутной ишемии тонкого кишечника с последующей 30-минутной реперфузией на фоне введения блокатора K^+ -АТФазы глибенкламида в дозировке 5 мг/кг, в группе Е (n=12) вводили L-норвалин в дозе 100 мг/кг, животным группы F (n=12) с целью анализа действия за 30 минут до L-норвалина вводился глибенкламид внутрибрюшинно в дозировке 5 мг/кг. Ишемическое прекондиционирование производили путем пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки у крыс на 10 минут с последующей 30-минутной реперфузией до эпизода более глубокой (15-минутной) ишемии [1]. L-норвалин в дозе 10 мг/кг вводился животным внутрибрюшинно за 30 мин до моделирования ишемии и повторно в такой же дозировке по возобновлении кровотока.

Манипуляции выполнялись под общим обезболиванием (хлоралгидрат в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно). Забор крови производился через 24 часа после проведения эксперимента. Для оценки выраженности гепатоцеллюлярного повреждения определялась активность аспаратами-

нотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) кинетическим фотокolorиметрическим способом на автоматическом биохимическом анализаторе «Виталлаб Флексор Е» (Нидерланды) с использованием реагентов фирмы «Bioson» и «Human» (Германия). Для проведения гистологического исследования печени забирали участки размером 1x1x0,5 см в стандартных местах с последующим приготовлением гистологических микропрепаратов и окраской их гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, Мак-Манусу и Паппенгейму.

Результаты и их обсуждение

Исследования влияния ишемического прекондиционирования на функциональное состояние печени, а именно активность ферментов цитолиза (АСТ и АЛТ), выявили значительное повышение после эпизода ишемии/реперфузии уровня АСТ в 1,93 раза, а АЛТ в 3,16 раза. Применение прямого ишемического прекондиционирования приводило к падению активности АСТ в 1,74 раза, а АЛТ в 3,14 раза. Эффект защитного действия ИПК полностью отменялся введением блокатора K^+ -АТФазы глибенкламида в дозе 5 мг/кг (табл. 1).

Таблица 1

Влияние ишемического прекондиционирования (ИПК) и L-норвалина на активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ)

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*
Прямое ИПК (группа С, n=12)	110,45±2,9**	62,5±5,3**
Прямое ИПК+глибенкламид (группа D, n=12)	203,6±14,7**	189,4±26,9**
L-норвалин 100 мг/кг (группа Е, n=12)	113,9±9,4**	31,2±5,3**
L-норвалин + глибенкламид (группа F, n=12)	164,4±16,4**	119,7±23,8**

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

Введение L-норвалина в дозе 100 мг/кг приводило к снижению активности АСТ в 1,69 раза, а АЛТ в 6,3 раза. Применение же блокатора K^+ -АТФазы глибенкламида не приводило к полной отмене влияния L-норвалина, что отражалось на активности АСТ, которая была в 1,17 раза

меньше, чем при ишемии/реперфузии, и активности АЛТ, которая была ниже в 1,64 раза.

Ишемия/реперфузия в группе В приводила к выраженным морфологическим изменениям в печени, которые проявлялись изменениями ядер, характеризующимися

вакуолизацией, фрагментацией хроматина до полного исчезновения, с кариолизисом и кариопикнозом, резко выраженной зернистой и жировой дистрофией цитоплазмы, значительным отёком с резким расширением пространства Диссе. Характерной морфологической чертой данной группы являлись выраженные очаги субкапсулярных и перипортальных некрозов с регенераторными гипертрофическими гепатоцитами по периферии и очагами лимфо-лейкоцитарной инфильтрации. Площадь некрозов в среднем составила $0,215 \pm 0,014 \text{ мм}^2$.

Отличительной морфологической чертой в группе с ишемическим преколондированием стало значительное уменьшение как количества, так и площадей некрозов, а соответственно, и практически полное отсутствие отека и лимфо-лейкоцитарной инфильтрации. Так, суммарная площадь некрозов в группе С составила $0,082 \pm 0,014 \text{ мм}^2$, что наглядно отображено в таблице 2. Большинство морфологических проявлений хоть и имели значительно меньшую выраженность, однако не достигали таковой в группе А.

Таблица 2

Влияние ишемического преколондирования (ИПК) и L-норвалина на размеры очагов некроза печени крыс при ишемии/реперфузии

Группы животных	Площадь (мм^2)
Ишемия/реперфузия (группа В, n=12)	$0,215 \pm 0,014^*$
Прямое ИПК (группа С, n=12)	$0,082 \pm 0,014^{**}$
Прямое ИПК+глибенкламид (группа D, n=12)	$0,207 \pm 0,021^{**}$
L-норвалин 100 мг/кг (группа E, n=12)	$0,161 \pm 0,017^{**}$
L-норвалин + глибенкламид (группа F, n=12)	$0,191 \pm 0,018^{**}$

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

Применение блокатора K^+ -АТФазы глибенкламида за 30 минут до ИПК практически полностью снимало его защитный эффект, наиболее ярким показателем чего является суммарная площадь некрозов, которая в данной группе составила $0,207 \pm 0,021 \text{ мм}^2$.

Морфологическая картина в группе с L-норвалином 100 мг/кг напоминают таковую в группе ИПК, с несколько меньшей выраженностью протекторного эффекта. Отмечаются микронекрозы суммарной площадью $0,161 \pm 0,017 \text{ мм}^2$. Средне- и мелкокапельный характер дистрофии, явления кариолизиса. Отёк не выражен.

В группе глибенкламид + L-норвалин отмечается частичная отмена защитного эффекта, обусловленного введением L-норвалина в дозе 100 мг/кг. Очаги некроза площадью до $0,191 \pm 0,018 \text{ мм}^2$ чередуются с зонами выраженной лимфо-лейкоцитарной инфильтрации с отёком стромы и пространств Диссе.

Выводы

Ишемическое и реперфузионное повреждение обладает выраженным патологическим влиянием на морфофункциональное состояние печени, вызывая гибель паренхиматозных элементов и активацию ферментов цитолиза. Ишемическое преколондирование в значительной степени уменьшает выраженность печеночного повреждения, причем, протекторный эффект обусловлен активацией митохондриальных K^+ АТФаз. Применение L-норвалина в дозе 100 мг/кг позволяет фармакологически смоделировать эффект ишемического преколондирования, однако выраженность защитного действия несколько ниже и до конца не может быть объяснена активацией митохондриальных K^+ АТФаз.

Литература

1. Преколондирование при ишемических и реперфузионных повреждениях

- печени / Н.И. Жернакова [и др.] // Научные Ведомости БелГУ. – 2012. – №4(123). – С. 157-162.
2. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research / R. Bolli // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2001. – Vol. 33. – P. 1897-1918.
 3. Cohen, M.V. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection / M.V. Cohen, J.M. Downey // Basic. Res. Cardiol. – 2008. – Vol. 103, № 3. – P. 203-215.
 4. Downey J.M. Signaling pathways in ischemic preconditioning / J.M. Downey, A.M. Davis, M.V. Cohen // Heart. Fail. Rev. – 2007. – Vol. 12. – P. 181-188.
 5. Kirino T. Ischemic tolerance / T. Kirino // J. Cerebr. Blood. Flow. Metabol. – 2002. – Vol. 22. – P. 1283-1296.
 6. Murry C.E. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium / C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer // Circulation. – 1986. – Vol. 14. – P. 1124-1136.
 7. Rezkalla S.H. Preconditioning in humans / S.H. Rezkalla, R.A. Kloner // Heart. Fail. Rev. – 2007. – Vol. 12. – P. 201-206.
 8. Upper limb ischemic preconditioning prevents recurrent stroke in intracranial arterial stenosis / Ran Meng [et al.] // Neurology. – 2012. – Vol. 79. – P. 1853-1861.

L-NORVALIN AND ISCHEMICAL PRECONDITIONING ACTION MECHANISMS ANALYSIS AT LIVER ISCHEMIA/REPERFUSION

*M.V. Pokrovsky, D.V. Lopatin, S.A. Alehin, D.I. Kolmykov,
L.V. Ivanova, V.D. Lucenko, S.L. Speransky, I.V. Suhoterin*

In this article ischemic preconditioning and L-norvalin efficacy and mechanisms of action pharmacological analysis at liver experimental ischemia/reperfusion were made. During investigation ischemic preconditioning high effectiveness totally wasn't blocked by glibenclamide showed. L-norvaline also showed marked hepatoprotective effect abolished by glibenclamide just partly.

Key words: *ischemia, reperfusion, ischemic preconditioning, liver, L-norvalin.*

Покровский М.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии и фармацевтических дисциплин Института последипломного медицинского образования НИУ «БелГУ», г. Белгород.
E-mail: mpokrovsky@yandex.ru.

Алехин С.А. – к.м.н., докторант кафедры хирургических болезней №2 ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, г. Курск.

Лопатин Д.В. – аспирант кафедры фармакологии ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, г. Курск.

Колмыков Д.И. – аспирант кафедры хирургических болезней №2 ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, г. Курск.

Иванова Л.В. – аспирант кафедры хирургических болезней №2 ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, г. Курск.

Луценко В.Д. – зав. кафедрой общей хирургии НИУ «БелГУ», г. Белгород.

Сперанский С.Л. – проф. кафедры общей хирургии НИУ «БелГУ» Минздравсоцразвития, г. Белгород.

Сухотерин И.В. – проф. кафедры общей хирургии НИУ «БелГУ», г. Белгород.