



Д.В. Мамчур<sup>1</sup>, Н.В. Бухтиярова<sup>2</sup>

## СОСТОЯНИЕ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОГО РАВНОВЕСИЯ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС С МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ В УСЛОВИЯХ ТЕРАПИИ L-ЛИЗИНА ЭСЦИНАТОМ И ГЛУТАРГИНОМ

<sup>1</sup>Днепропетровская государственная медицинская академия,

<sup>2</sup>Запорожский государственный медицинский университет,

НВО «Фарматрон», г. Запорожье

**Ключові слова:** механічна жовтяниця, тиол-дисульфідна рівновага, L-лізину есцинат, глутаргін.

**Ключевые слова:** механическая желтуха, тиол-дисульфидное равновесие, L-лизина эсцинат, глутаргин.

**Key words:** obstructive jaundice, thiol-disulfide balance, L-lysine aescinat, glutargine.

В експериментальних дослідженнях на щурах з механічною жовтяницею встановлено, що застосування L-лізину есцинату та глутаргіну протягом 4 днів сприяє зниженню явищ оксидативного стресу в тканині печінки. В основі цих механізмів лежить відновлення тиол-дисульфідної рівноваги. Суттєвіший ефект у цих умовах має L-лізину есцинат.

В експериментальних дослідженнях на крысах с механической желтухой установлено, что применение L-лизина эсцината и глутаргина на протяжении 4 дней способствует снижению явлений оксидативного стресса в ткани печени. В основе этих механизмов лежит восстановление тиол-дисульфидного равновесия. Более выраженный эффект в данных условиях проявляет L-лизина эсцинат.

It has been established in experimental researches on rats with obstructive jaundice that administration of L-lysine aescinat and glutargine for a period of 4 days promotes reduction of oxidative stress in liver tissues. Recovery of thiol-disulfide balance is the basis of these mechanisms. L-lysine aescinat shows the most expressed effect in present conditions.

Механическая желтуха (МЖ) – тяжелый симптомокомплекс, развивающийся как осложнение ряда заболеваний. МЖ может развиваться либо остро в результате обтурации желчевыводящих путей за счет смещения конкрементов, находящихся в общем желчном протоке, либо нарастает постепенно за счет отека и стенозирования общего печеночного или общего желчного протоков. При этом отток желчи в кишечник значительно затрудняется или становится полностью невозможным [1]. В результате механической обструкции магистральных протоков повышается давление в желчных протоках, а развившаяся гипертензия подавляет секрецию желчи. Накопление желчных кислот с поверхностно-активными свойствами вызывает повреждение гепатоцитов и усиление холестаза [2,3]. Быстрое прогрессирование МЖ имеет прямую коррелятивную связь с тяжестью состояния пациента, степенью эндогенной интоксикации и прогнозом исхода заболевания [1]. Ранее проведенными исследованиями установлено, что основными причинами механической желтухи являются желчнокаменная болезнь и рак головки поджелудочной железы [6].

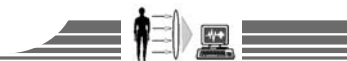
Трудность лечения больных с механической желтухой, как правило, обусловлена тяжестью их исходного состояния. Развивающиеся холестаз, желчная гипертензия, ахолия вызывают серьезные функциональные и морфологические изменения печени, которые приводят к сравнительно быстрому развитию печеночной недостаточности [7,8]. Несмотря на развитие эндоскопических технологий, совершенствование оперативной техники и многообразие лекарственных препаратов, летальность при механической желтухе остается высокой, достигая 20–60% при тяжелых формах заболевания [3].

В основе нарушения морфофункционального состояния печени при механической желтухе доброкачественного генеза лежат 2 взаимосвязанных звена патогенетических

реакций: воздействие компонентов застойной желчи и гемодинамические нарушения, обуславливающие гипоксию клеток и нарушение энергетического метаболизма гепатоцитов [3]. В свою очередь, ключевым звеном в развитии некрозов гепатоцитов считают повреждение под влиянием желчных кислот (хенодезоксихолевой, хенохолевой и литохолевой) мембран митохондрий, уменьшение синтеза АТФ в клетке, повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , стимуляцию кальцийзависимых гидролаз [4,5]. Развившийся энергетический дефицит и митохондриальная дисфункция приводят к нарушению баланса между прооксидантными и антиоксидантными системами клетки и, тем самым, провоцируют развитие оксидативного стресса [2,3]. Эти явления, спровоцированные желчными кислотами, индуцируют апоптоз гепатоцитов [2,3,5].

Токсическое действие продуктов свободнорадикального окисления приводит к поражению паренхимы печени и проявляется снижением функциональных возможностей гепатоцитов. В результате, развивающаяся функциональная дестабилизация печени усугубляет эндогенную интоксикацию при механической желтухе, что приводит к глубоким расстройствам деятельности органов и систем организма и является одной из основных причин высокой летальности [3].

Доказано, что наиболее важную в биологическом плане защитную роль играют окислительно-восстановительные реакции, в ходе которых тиоловые группы легко окисляются с образованием, как правило, дисульфидных группировок, и вновь регенерируют при их восстановительном расщеплении:  $2R-SH \rightarrow R-S-S-R + 2H$ . Возникающая на основе этих превращений обратимая тиолдисульфидная система (ТДС) имеет очень большое значение в регуляции окислительно-восстановительного равновесия в клетках и тканях организма [9].



Влияние L-лизина эсцината и глутаргина на состояние тиол-дисульфидного равновесия в тканях печени крыс с механической желтухой

Группы животных	SH мм/г/белка	SS мм/г/белка	Глут. в. мм/г/ткани	Глут.о. мм/г/ткани	ГР усл.ед./мг/ мин/г/ткнаи	ГПР усл.ед./мг/мин/г/ткнаи
Интактные (n = 6)	18,8 ± 0,52	3,5 ± 0,16	6,4 ± 0,22	0,23 ± 0,012	28,9 ± 0,64	83,3 ± 1,11
Контроль (АД) (n = 6)	10,5 ± 0,31**	5,6 ± 0,2**	3,6 ± 0,12**	0,47 ± 0,019**	21,6 ± 0,75**	63,3 ± 1,0**
L-лизина эсцинат (n = 6)	17,0 ± 0,15***#	3,75 ± 0,09**	5,4 ± 0,1***	0,3 ± 0,007***	27,1 ± 0,46***	79,3 ± 1,55**
Глутаргин (n = 6)	13,8 ± 0,22**	4,1 ± 0,18**	4,8 ± 0,22**	0,35 ± 0,019**	25,0 ± 0,65*	73,7 ± 2,69**

Примечания: Глут. в – глутатион восстановленный; Глут. о. – глутатион окисленный; ГР – глутатионредуктаза; ГПР – глутатионпероксидаза; \* – p<0,05 по отношению к контролю; \*\* – p<0,01 по отношению к контролю; # – p<0,05 по отношению к группе глутаргина; \*\*\* – p<0,01 по отношению к группе глутаргина.

Одной из ведущих антиоксидантных систем в организме, играющей ключевую роль в толерантности клеток организма к ишемии, является система глутатиона, представленная восстановленным глутатионом (GSH) и ферментами его метаболизма – глутатионпероксидазой (ГПР), глутатионтрансферазой и глутатионредуктазой (ГР) [10]. В частности, глутатион непосредственно либо посредством ферментативных реакций эффективно защищает клетки от свободных радикалов и других реактивных разновидностей кислорода (гидроксильного радикала, липид-пероксильного радикала, пероксинитрита и перекиси водорода и т. д.). Помимо этого, глутатион принимает участие в функционировании глутаредоксин-зависимой системы, играющей важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза [11].

В свою очередь, недостаточность глутатиона снижает устойчивость печени к повреждающему действию свободных радикалов и других гепатотоксических воздействий. Повреждение печени обычно происходит тогда, когда количество новообразованных свободных радикалов достигнет уровня, превышающего нейтрализующую способность глутатиона [12].

В последние годы активно изучается роль оксидативно-го стресса в поражении печени. Накоплен значительный фактический материал взаимосвязи оксидативного стресса, продукции цитокинов и фиброгенеза, однотипных для всех заболеваний печени [13].

#### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение влияния L-лизина эсцината и глутаргина на состояние тиол-дисульфидного равновесия в тканях печени крыс с механической желтухой, усложненной печеночной недостаточностью.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 24 белых крысах линии Вистар массой 180–230 г, содержащихся в стандартных условиях вивария (температура воздуха – 22±2°C, светлый/темный цикл 12/12 часов) и распределенных на 5 групп: I – интактные, n=6; II – животные с экспериментальной механической желтухой (МЖ, контроль), n=6; III – МЖ + глутаргин в дозе 40 мг/кг, n=6; IV – МЖ + L-лизина эсцинат в дозе 0,5 мг/кг, n=6. Повреждение печени с нарушением оттока желчи (подпеченочный холестаз) в условиях кетамин-ксилазинового (50/10 мг/кг) общего обезболивания вызывали путем наложения лигатуры на общий желчный проток [5,14,15].

Проведение хирургического вмешательства осуществляли после предварительной 24-часовой депривации пищи, при сохраненном доступе к воде.

Для биохимических исследований фрагменты печени гомогенизировали в жидком азоте. Цитозольную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования (15000 g) при температуре +4°C на 0,15 М фосфатном буфере pH 7,8. Безбелковый экстракт получали путем добавления точного количества гомогената в хлорную кислоту (0,6 М) с последующей нейтрализацией 5,0 М калия карбонатом.

Уровень SS и SH определяли спектрофотометрически, впоследствии по данным показателям рассчитывали тиол-дисульфидный коэффициент – ТДК=SH/SS [16].

Содержание окисленного и восстановленного глутатиона определяли флюорометрически [17].

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы определяли спектрофотометрически [18].

Препараты вводили внутрибрюшинно в виде растворов в одинаковых объемах, указанными дозами 1 раз в сутки на протяжении 4 дней, начиная с момента перевязки d.choledochus. Животным I и II групп на протяжении исследования в соответствующем объеме внутрибрюшинно вводили 0,9% раствор натрия хлорида.

Все исследования проведены при комнатном освещении в часовом интервале от 12 до 17 часов.

Полученный цифровой материал обрабатывали стандартными методами с помощью программы статистического анализа StatPlus, AnalystSoft. Версия 2006. на персональном компьютере «Intel Pentium-IV». Достоверность отличий средних арифметических (p) определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Все исследования проведены согласно Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях от 18.03.1986 г.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования указывают на то, что формирование механической желтухи у крыс приводит к смещению тиол-дисульфидной системы в сторону уменьшения пула ее восстановленных форм (табл. 1). В данных условиях отмечено выраженное, на 65% (p<0,01), по сравнению с группой интактных животных, снижение значений ТДК, а также увеличение в 2 раза (p<0,01) уровня окисленного



глутатиона. Характерно, что на этом фоне у крыс с МЖ в ткани печени отмечено синхронное снижение концентрации восстановленной формы глутатиона на 44% ( $p < 0,01$ ).

В функционировании глутатион-зависимой ферментативной системы в тканях печени у крыс с МЖ, по сравнению с группой интактных животных, зарегистрировано сопоставимое снижение активности ГПР и ГР на 24% ( $p < 0,01$ ) и 25,3% ( $p < 0,001$ ) соответственно (табл. 1).

В условиях проведения экспериментальной терапии получены следующие результаты влияния этих средств на тиол-дисульфидное равновесие (табл. 1). Так, на фоне курсового введения глутаргина в ткани печени отмечалось достоверное уменьшение содержания окисленного глутатиона на 26,8% ( $p < 0,01$ ), а также повышение количества восстановленной формы этого вещества на 33,3% ( $p < 0,01$ ) на фоне роста в 1,8 раза значений ТДК и роста активности ГР на 15,7% ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что при использовании L-лизина эсцинат отмечены более выраженные изменения, характеризующиеся значимым, в 2,4 раза, увеличением ТДК, по сравнению с контролем, а также повышением на 50% ( $p < 0,01$ ) уровня восстановленного глутатиона, при снижении на 25,5% ( $p < 0,01$ ) содержания его окисленной формы на фоне роста активности ГР на 25,5% ( $p < 0,01$ ). Примечательно, что по влиянию на уровень окисленного и восстановленного глутатиона и активность ГР, L-лизина эсцинат достоверно превышал по своим параметрам показатели, отмеченные в группе животных, которым вводили глутаргин. По воздействию на ферментативное звено антиоксидантной системы L-лизина эсцинат и глутаргин оказывали однонаправленный эффект, который проявлялся активацией ГПР на 25,3% ( $p < 0,01$ ) и 16,4% ( $p < 0,01$ ) соответственно.

Таким образом, установлено, что моделирование в эксперименте механической желтухи у крыс сопровождается активизацией процессов свободнорадикального окисления и последующего развития окислительного напряжения, играющего ключевую патогенетическую роль в процессах повреждения гепатоцитов и дальнейшего развития печеночной недостаточности вследствие холестаза. Известно, что именно изменения со стороны тиольного неферментативного и ферментативного звена антиоксидантной системы, проявляющиеся в снижении восстановленной и повышении окисленной форм, являются одним из ранних признаков нарушения защиты клеток. Полученные результаты сопоставимы с данными, полученными в ходе других исследований, которые подтверждают развитие выраженного оксидативного стресса в клетках печени при механической желтухе [18–20].

Обнаруженное снижение уровня восстановленного глутатиона в тканях печени крыс с механической желтухой, возможно, может быть следствием нарушения его синтеза или угнетения активности глутатионредуктазы, необходимой для его восстановления.

Увеличение функционирования системы антиоксидантной системы в целом, а также, в частности, глутатиона и связанных с его обменом антиоксидантных ферментов (ГПР,

ГТ и ГР), защищает печень от активных форм кислорода и продуктов перекисидации, что в определенной степени позволяет восстановить равновесие и улучшить редокс-регуляцию, а также предотвращать явления апоптоза в гепатоцитах [21].

Таким образом, проведение экспериментальной терапии механической желтухи у крыс способствует снижению интенсивности хронического оксидативного стресса в тканях клеток печени. Однако степень выраженности изменений, в зависимости от использованного лекарственного средства, в каждой группе была разной. Наиболее существенные результаты получены при использовании L-лизина эсцината. При введении этого вещества устанавливается наиболее оптимальное соотношение между уровнями восстановленных и окисленных тиолов, что свидетельствует об активной мобилизации тиол-дисульфидной системы в нейтрализации продуктов свободнорадикального окисления.

### ВЫВОДЫ

Формирование механической желтухи проявляется смещением равновесия тиол-дисульфидной системы в сторону ее окисленных представителей, угнетением активности глутатион-зависимых ферментов в ткани печени крыс.

Применение L-лизина эсцината и глутаргина в разной степени способствует снижению выраженности явлений оксидативного стресса в ткани печени.

L-лизина эсцинат по выраженности влияния на восстановление тиол-дисульфидного равновесия, а также течение реакций свободнорадикального окисления в гепатоцитах оказывает более значимый эффект, по сравнению с глутаргином.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Пьянкова О.Б. Клинико-эпидемиологическая характеристика больных с синдромом механической желтухи доброкачественного генеза / Пьянкова О.Б., Бусырев Ю.Б., Карпунина Т.И. // Медицинский альманах. – 2009. – №2 (7). – С. 173–176.
2. Рязанов Д.Ю. Лечение холедохолитиаза, осложненного механической желтухой, с использованием препарата эспа-липон / Рязанов Д.Ю., Михеев Ю.А. // Международный медицинский журнал. – 2006. – №2. – С. 115–117.
3. Лаптев В.В. Применение препарата Гепа-Мерц при механической желтухе неопухолевого генеза / Лаптев В.В., Румянцова С.А., Цкаев А.Ю. и др. // Ліки України. – 2010. – №139. – С. 87–91.
4. Губергиц Н.Б. Синдром желтухи в клинической практике / Губергиц Н.Б., Кабанец Н.С., Фоменко П.Г. // Здоров'я України. – 2009. – №9. – С. 13–15.
5. Давыдов В.Г. Количественная оценка гибели гепатоцитов и динамика некоторых биохимических параметров крови и желчи при экспериментальной механической желтухе / Давыдов В.Г., Бойчук С.В., Шаймарданов Р.Ш. и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 18, №1. – С. 25–31.
6. Кутовой А.Б. Диагностика и хирургическое лечение механической желтухи разного генеза / Кутовой А.Б., Пелех В.А., Самаре Э.Ф. и др. // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2010. – №14 (1). – С. 122–125.
7. Визгалов С.А. Экспериментальная модель желтухи и профилактика возникающих нарушений в печеночной ткани [Электронный ресурс] / Визгалов С.А., Юрченко В.П., Левкович М.П. // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2004. – Т. 3, №2. – Режим доступа: [http://www.morphology.dp.ua/\\_pub/](http://www.morphology.dp.ua/_pub/)



- CAS-2004-03-02/CAS-2004-03-02-30.pdf
8. *Заруцкая Н.В.* Малоинвазивные вмешательства в лечении желчнокаменной болезни, осложненной механической желтухой / *Заруцкая Н.В., Бедин В.В., Подолужный В.И.* // Медицина в Кузбассе. – 2006. – №2. – С. 3–7.
  9. *Горбачева С.М.* Биохимические механизмы адаптации при геморрагическом шоке / *С.М. Горбачева, М.П. Козиев* // Сибирский медицинский журнал. – 2006. – №7. – С. 5–10.
  10. Глутатион и ферменты его метаболизма у больных сахарным диабетом 2 типа / *Л.С. Колесниченко, Т.П. Бардымова, Е.С. Сергеева, М.П. Сергеева* // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – №2. – С. 56–58.
  11. *Калинина Е.В.* Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах // *Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, А.Н. Сапριν* // Успехи биологической химии. – 2008. – №48. – С. 319–358.
  12. *Горбаков В.В.* Опыт применения гептрала в лечении диффузных заболеваний печени / *Горбаков В.В., Галик В.П., Кириллов С.М.* // Украинский терапевтический журнал. – 2004. – №1. – С. 87–92.
  13. *Мороз Е.Ф.* Оксидативный стресс у больных хроническим гепатитом С / *Мороз Е.Ф., Шкондина, Дудник В.М., Куляс С.М.* // Международный медицинский журнал. – 2008. – №4. – С. 84–87.
  14. *Копылова Т.Н.* Характеристика интенсивности процессов перекисного окисления липидов и состояния антиперекисной системы защиты в печени крыс при лапаротомии и нарушении оттока желчи [Электронный ресурс] / *Копылова Т.Н.* // Вестник новгородского государственного университета. – 1999. – №11. – Режим доступа: [http://www.admin.novsu.ac.ru/uni/vestnik.nsf/all/0F95A7AE7A96679C3256ABE002E0CD8/\\$file/KopilovaPDF.pdf](http://www.admin.novsu.ac.ru/uni/vestnik.nsf/all/0F95A7AE7A96679C3256ABE002E0CD8/$file/KopilovaPDF.pdf).
  15. *Платонова Л.В.* Энергетический статус ткани печени при механической желтухе (экспериментальное исследование) / *Платонова Л.В., Шоно Н.И., Ахаладзе Г.Г., Гальперин Э.И.* // Анналы хирургической гепатологии. – 2002. – Т. 7, №2. – С. 45–50.
  16. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика / *В.С. Камышников.* – Минск, 2003. – 345 с.
  17. *Кулинский В.И.* Изучение глутатиона и ферментов его метаболизма у больных старших возрастных групп с хронической церебральной ишемией / *В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко, В.В. Шпрах [и др.]* // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – Т. 1, №39. – С. 63–65.
  18. *Assimakopoulos S.F.* Effect of antioxidant treatments on the gut-liver axis oxidative status and function in bile duct-ligated rats / *Assimakopoulos S.F., Maroulis I., Patsoukis N., Vagenas K et al.* // World J. Surg. – 2007. – Vol. 31, №10. – P. 2023–2032.
  19. *Kucuk C.* The effects of dimethylsulfoxide in experimental obstructive jaundice / *Kucuk C., Ok E., Yilmaz Z. Et al.* // Acta Chir. Belg. – 2003. – Vol. 103, №4. – P. 392–395.
  20. *Padillo F.J.* Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis / *Padillo F.J., Cruz A., Navarrete C. et al.* // Free Radic. Res. – 2004. – Vol. 38, №7. – P. 697–704.
  21. *Dirlik M.* The monitoring of progress in apoptosis of liver cells in bile duct-ligated rats / *Dirlik M., Canbaz H., Düşmez Apa D. et al.* // Turk. J. Gastroenterol. – 2009. – Vol. 20, №4. – P. 247–256.

---

**Сведения об авторах:**

Мамчур Д.В., заочный аспирант каф. хирургии, травматологии и ортопедии ФПО ДГМА.

Бухтиярова Н.В., к. мед. н., доцент каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.

**Адрес для переписки:**

Бухтиярова Нина Викторовна. 69035, г. Запорожье, пр-т Маяковского, 26, каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.  
Тел.: (0612) 34 27 41.

---