

УДК 615.015.6:571.1

©Коллектив авторов

ГЕПАТОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ УГЛЕВОДОРОДНОЙ ЦЕПЬЮ И ТАУРИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СУБХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ОТМЕНЕ ЭТАНОЛА

*Ю.Е.Разводовский¹, Е.М.Дорошенко², Н.И.Прокончик¹, В.Ю.Смирнов²,
С.Ю.Островский²*

¹Институт биохимии НАН Белоруси, Гродно

²Гродненский государственный медицинский университет
230015 г. Гродно, ул Горького, д. 80

Принудительная алкоголизация крыс по Majchrowicz приводит к развитию жирового гепатоза, а при последующей отмене этанола развивается аминокислотный дисбаланс, проявляющийся в основном сдвигами уровней свободных серосодержащих и гликогенных аминокислот в печени и плазме крови. Сходные изменения наблюдались после субхронической алкогольной интоксикации. Обнаружено, что аминокислоты с разветвленной углеводородной цепью при совместном внутрижелудочном введении с таурином способны предотвращать развитие аминокислотного дисбаланса и снижать выраженность стеатоза печени в исследованных ситуациях.

Ключевые слова: аминокислоты, таурин, АРУЦ, алкоголь, печень.

ВВЕДЕНИЕ. Согласно современным представлениям о поражении печени при хронической алкогольной интоксикации, выделяют нарастающие по степени тяжести формы патологии: адаптивная алкогольная гепатомегалия, жировая дистрофия печени с фиброзом и без него, периваскулярный и перицеллюлярный фиброз, хронический алкогольный гепатит и цирроз [1,2]. Алкогольный стеатоз или жировая дистрофия является начальным этапом структурных изменений печени, вызываемых алкогольной интоксикацией [3]. Существуют данные, что при воздержании от алкоголя и адекватной диете жир может исчезать из печени через несколько недель [4]. Однако, другие исследования показывают, что стеатоз может сопровождаться явлениями фиброза и прогрессировать в цирроз [5]. У пациентов с жировой дистрофией печени выявлена активация звездчатых ретикулоэндотелиоцитов, играющих ключевую роль в фиброгенезе [4]. Кроме того, доказана ассоциация между стеатозом и активацией перекисного окисления липидов [6]. В эксперименте было показано, что хроническое введение этанола животным стимулирует перекисное окисление липидов в печени, а также вызывает развитие стеатоза печени. Добавление таурина к корму в количестве 3% в течение 2 дней после прекращения поступления алкоголя вызывало снижение в печени содержания малонового диальдегида и уменьшение проявления стеатоза, индуцированного алкоголем [7]. Таким образом, экспериментальные и клинические данные свидетельствуют, что сам по себе стеатоз требует проведения специфического лечения.

ГЕПАТОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТ

Роль несбалансированного питания в патогенезе алкогольного поражения печени хорошо установлена [8]. В эксперименте было показано, что хроническая интоксикация с использованием диеты, содержащей этанол в количестве 36% от общей калорийности, ведет к развитию жировой дистрофии печени [9]. При этом развивается дефицит белка, микроэлементов, витаминов. Снижение содержания алкоголя в диете до 26% или 20% сопровождается увеличением потребления ее без снижения нагрузки этанолом. В этой экспериментальной ситуации каких-либо изменений в печени животных не наблюдалось. Таким образом, несбалансированность питания, обычно сопутствующая алкоголизму, является решающим фактором развития алкогольного поражения печени.

Для подтверждения важной роли протеиновой недостаточности в патогенезе алкогольного поражения печени был проведен эксперимент на животных, получавших жидкий корм с разным содержанием жира и белка [5]. В рационе крыс опытных групп содержание жира составляло 25, 35 и 32%, белка - соответственно 25, 25 и 10% от общей калорийности. Содержание этанола во всех рационах составляло 46% по калорийности. Через 1 месяц опыта показатель выраженности ожирения печени крыс 1-й, 2-й и 3-й групп составил 1,7, 2,7 и 3,8 соответственно. Через 6 месяцев опыта в печени крыс были обнаружены очаги некроза, воспаления и фиброза. Установлена прямая коррелятивная связь между выраженностью патологических изменений в печени и выраженностью ее жировой инфильтрации на начальной стадии интоксикации. Таким образом, наиболее выраженные поражения печени развиваются у животных получавших низкобелковую и, в то же время, высокожировую диету. Клинические испытания показали, что коррекция белковой недостаточности у лиц с алкогольным гепатитом путем назначения гидролизата казеина нормализовала азотистый баланс и печеночные тесты, редуцировала явления печеночной энцефалопатии [10].

Сопутствующие хроническому алкоголизму поражения печени существенно осложняют терапевтический процесс, так как большинство противоалкогольных препаратов метаболизируются в печени и обладают собственной гепатотоксичностью. Так, например, широко используемый в клинике препарат дисульфирам может вызывать гепатит [11]. В связи с этим в схему комплексного лечения алкоголизма целесообразно включать гепатопротективные препараты.

Одним из актуальных направлений в области разработки новых лекарственных препаратов гепатопротективного действия является поиск таких веществ среди субстанций природного происхождения, которые обладают минимальными побочными эффектами и высоким терапевтическим индексом. Перспективными в этом смысле являются аминокислоты и их производные. Применение полных аминокислотных композиций, предназначенных для парентерального питания, часто не устраняет метаболического дисбаланса. В связи с этим оправданной представляется разработка аминокислотных смесей, предназначенных для устранения метаболического дисбаланса при определенной патологии т.е. аминокислот с направленным действием.

Терапевтическое действие аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ) - L-изолейцина, L-валина и L-лейцина при хронических заболеваниях печени и осложняющей их печеночной энцефалопатии основано на незаменимости АРУЦ для организма человека и органоспецифичности метаболических превращений разветвленных аминокислот в печени и мышечной ткани, которая определяет ключевое значение L-изолейцина, L-валина и L-лейцина в реакциях глюконеогенеза и энергопродукции в ситуациях сочетанного поражения печени и ЦНС. Кроме того, особенности промежуточного обмена этих аминокислот позволяют активизировать процессы детоксикации на фоне печеночной недостаточности и энцефалопатии [12].

На основании данных литературы и собственных результатов о выраженном биологическом действии L-лейцина (активация синтеза белка и ДНК, транспорта тРНК, ингибирование протеолиза, гипогликемическое и иммунокорректирующее

действия) нами обоснована целесообразность увеличения содержания L-лейцина в смеси АРУЦ по отношению к обычно применяемым в клинике аминокислотным препаратам для энтерального и парентерального питания. На основании данных о гепатопротективных, радиозащитных и антиоксидантных свойствах таурина, нами обоснована целесообразность включения его в состав комплексного аминокислотного препарата, что позволит реализовать свойственные таурину эффекты, а также активировать процессы транспорта АРУЦ из крови в ткани [13,14].

Целью настоящей работы было исследование влияния АРУЦ и таурина при их одновременном применении на морфологические показатели, характеризующие поражение печени алкогольной этиологии, а также на формирование аминокислотного фонда в печени и плазме крови в этой ситуации.

МЕТОДИКА. В эксперименте с субхронической алкогольной интоксикацией использовано 18 (по 6 в каждой группе) белых крыс-самцов Wistar массой 180-200 г, содержащихся на стандартной диете вивария со свободным доступом к пище. Растворы этанола служили единственным источником питья: 8 дней - 5% (объем/вес) раствор этанола; затем три недели - 15% р-р (12 животных). Из них крысы опытной группы (6) на протяжении всего срока алкоголизации получали 1 раз в сутки в/ж смесь аминокислот с разветвленной углеводородной цепью и таурина (Leu:Ile:Val:Tau 1:0,25:0,25:1) в виде водного раствора в дозе 500 мг/кг (20 мл смеси/кг), 6 крыс контрольной группы получали в/ж эквивалентное количество воды.

В качестве интактного контроля использовано 6 животных, получавших в этот же промежуток времени воду. Через 24 часа после месячного контакта с этанолом и аминокислотами животных декапитировали, печень быстро извлекали и замораживали в жидком азоте или забирали для гистологического исследования.

Синдром отмены этанола моделировали на 12 крысах-самцах Wistar после принудительной алкоголизации по Majchrowicz [15] внутрижелудочным введением 25% раствора этанола утром и вечером в дозе 3,5 г/кг в течение 8 суток. Срок отмены этанола - 12 ч. Препарат вводили опытной группе (6 животных) два раза в сутки через 2 ч после введения этанола на протяжении всего срока алкоголизации в дозе, аналогичной предыдущей модели, контрольная группа животных в течение всего срока алкоголизации получала аналогичным образом эквивалентное количество воды. Группа интактного контроля состояла из 6 животных.

Всего в экспериментах использовано 36 животных.

Содержание свободных аминокислот и их производных определяли в хлорнокислых экстрактах ткани печени и плазмы крови методом ионообменной хроматографии [13]. Регистрацию и обработку хроматограмм осуществляли с помощью программно-аппаратного комплекса Мультихром-1. В работе использовали реактивы квалификации не ниже хч.

Средние значения показателей в группах сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента. Информативность отдельных показателей в общем массиве данных определяли по данным линейно-дискриминантного анализа. Статистическая обработка данных реализована с помощью программ 3d и 7m из пакета BMDPC (BMDP Statistical Software).

Для морфологического исследования кусочки печени фиксировали в 10% нейтральном формалине, промывали в проточной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, хлороформе, ксилоле и заливали в парафин. Срезы печени толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические препараты изучали с помощью микроскопа "Ампливал" (Германия). В гистологических препаратах печени оценивали выраженность типичных микроскопических признаков нарушения структуры печени: гепатит (очаговая и диффузная лейкоцитарная и гистиоцитарная инфильтрация), гепатоз (вакуолярная и зернистая дистрофия гепатоцитов), деструкция (повреждение клеток) и гибель гепатоцитов (сильные, не совместимые с жизнью клетки, повреждения цитоплазмы и ядра).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. В гепатоцитах крыс при отмене этанола отмечалась мелкокапельная жировая дистрофия, сильнее выраженная в центральных и промежуточных отделах долек (рис.1). Жировая дистрофия имела место во всех наблюдениях. Наряду с этим в 2 наблюдениях в портальных трактах имела слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация, а в 1 наблюдении - резко выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Таким образом, основным результатом воздействия этанола при алкоголизации по Majchrowicz является жировой гепатоз. В этой же ситуации в печени животных, получавших на фоне алкоголизации смесь АРУЦ и таурина признаки жирового гепатоза не выявлены (рис.2). Следовательно, смесь АРУЦ и таурина обладает способностью препятствовать развитию жировой инфильтрации в печени в экспериментальной модели алкоголизма.

Отмена этанола после принудительной алкоголизации сопровождалась снижением содержания в печени таурина, цистина, а также глицина и лизина; концентрации фосфоэтаноламина, аланина, аспартата, глутамата, глутамина и гистидина повышались (рис. 3). Под воздействием композиции аминокислот изменения в фонде серосодержащих аминокислот исчезали. Эффект нормализации был замечен также в отношении концентрации большинства гликогенных аминокислот, кроме глутамата. Это может объясняться усилением синтеза данных аминокислот в печени: так, например, об усилении синтеза глицина из греонина свидетельствует появление отрицательной корреляции Gly-Thr.

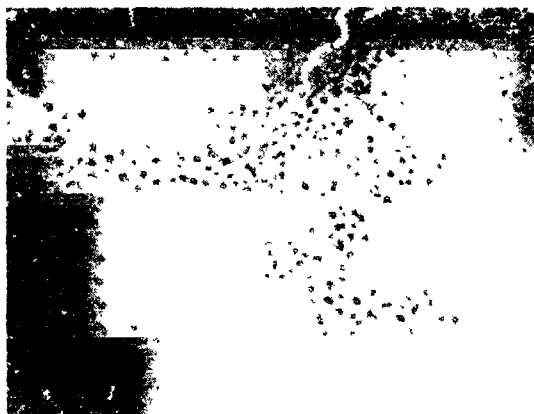


Рисунок 1.

Микроскопическая картина печени крыс при синдроме отмены алкоголя

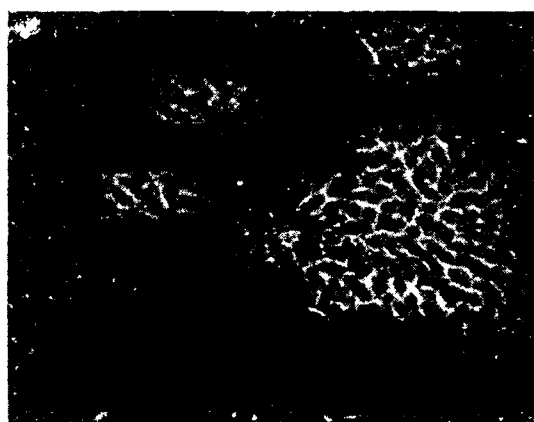


Рисунок 2.

Микроскопическая картина печени крыс, получавших смесь АРУЦ и таурина на фоне синдрома отмены алкоголя

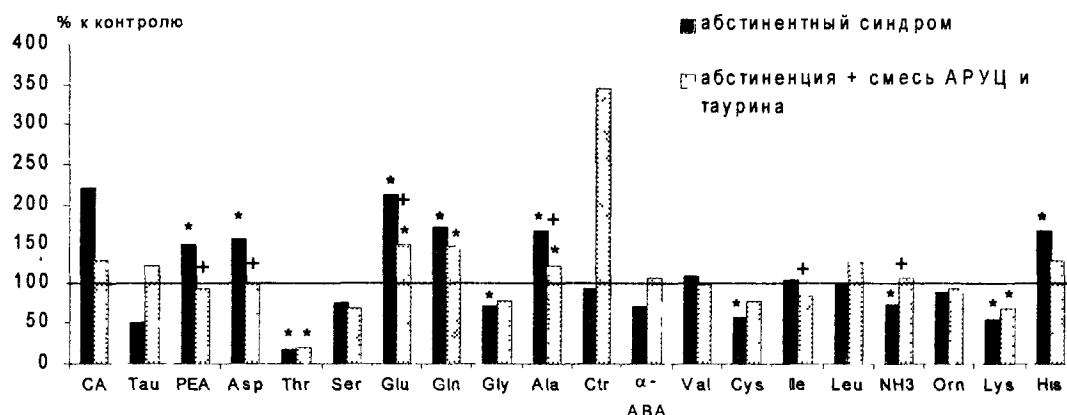


Рисунок 3.

Влияние смеси АРУЦ и таурина на фонд свободных аминокислот и их производных в печени крыс при синдроме отмены алкоголя (количество наблюдений в каждой группе - 6) * - $p < 0,05$ по отношению к контролю; + - $p < 0,05$ по отношению к группе с абстинентным синдромом

Таким образом, отмена этанола сопровождается выраженным дисбалансом фонда свободных аминокислот печени, в том числе серосодержащих и гликогенных. Исследуемая композиция оказалась способной нормализовать аминокислотный пул печени.

Следует отметить снижение уровней большинства определяемых аминокислот в плазме крови при отмене этанола. Так происходило снижение концентраций аспартата, треонина, серина, глутамата, глицина, α-аминобутирата, лизина, а также АРУЦ и таурина. Возможно, это объясняется активацией процессов транспорта свободных аминокислот из кровяного русла, в том числе и в печень, что подтверждается повышением уровней Asp, Glu и His в печени.

Введение смеси АРУЦ и таурина на фоне отмены этанола нормализовало в плазме крови уровни таурина, валина и лейцина, и снизило уровень метионина (возможно, вследствие активации синтеза таурина). На концентрации остальных аминокислот, уровни которых снизились при отмене алкоголя, исследуемая композиция не оказывала заметного влияния. Отмена этанола сопровождалась повышением концентрации тирозина и аланина в плазме крови (рис. 4). Смесь

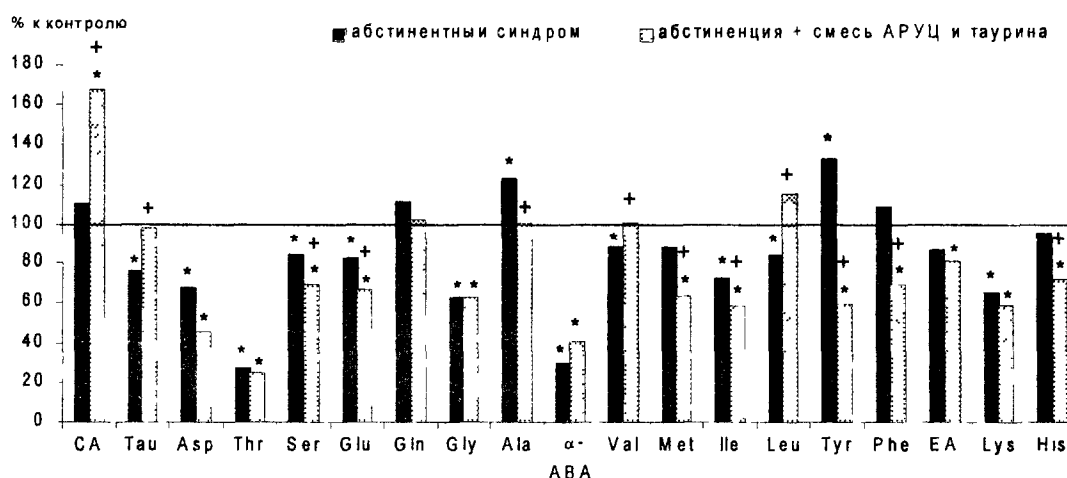


Рисунок 4.

Влияние смеси АРУЦ и таурина на фонд свободных аминокислот и их производных в плазме крови крыс при синдроме отмены алкоголя (количество наблюдений в каждой группе - 6); * - $p < 0,05$ по отношению к контролю; + - $p < 0,05$ по отношению к группе с абстинентным синдромом

ГЕПАТОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТ

АРУЦ с таурином после отмены алкоголя снижала уровни ароматических аминокислот в плазме крови.

Одним из наиболее показательных эффектов смеси АРУЦ и таурина в отношении фона свободных аминокислот плазмы крови является, на наш взгляд, существенное повышение показателя соотношения концентрации суммы АРУЦ к сумме ароматических аминокислот (тирозина и фенилаланина): оно составило 5.1 против 3.4 в контроле и 2.3 при отмене этанола. Это само по себе может расцениваться, как косвенное свидетельство гепатопротективных свойств исследуемой композиции аминокислот [2].

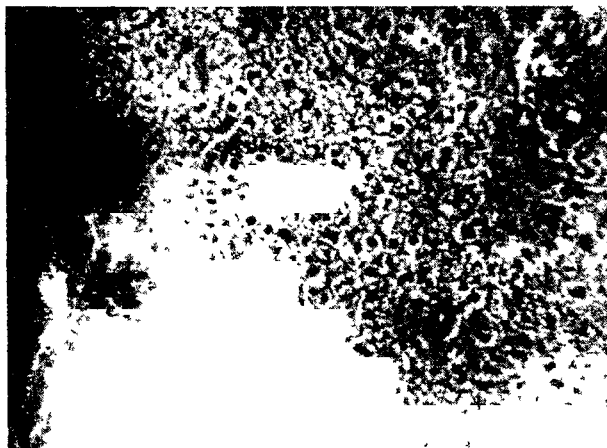


Рисунок 5.

Микроскопическая картина печени при субхронической алкогольной интоксикации.

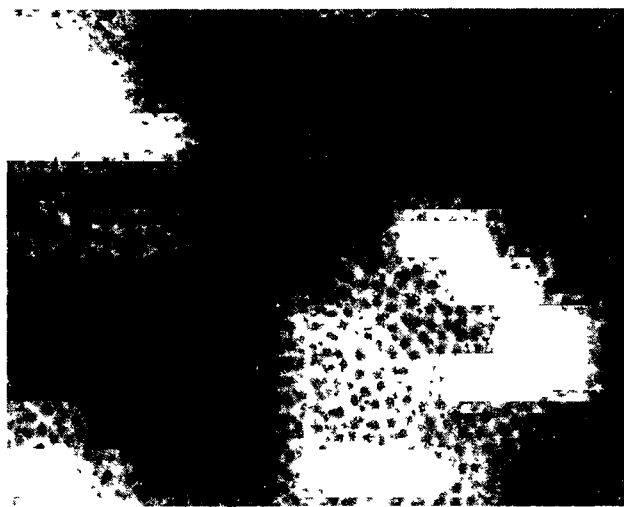


Рисунок 6.

Микроскопическая картина печени крыс, получавших смесь АРУЦ и таурина на фоне субхронической алкогольной интоксикации

В эксперименте с субхронической алкогольной интоксикацией установлено, что в препаратах печени определяются изменения, характерные для алкогольного стеатоза печени (рис.5). В гепатоцитах отмечается пылевидное и мелкокапельное накопление жиров. В одних дольках оказались пораженными единичные гепатоциты, в других - группы гепатоцитов. Наблюдался также некробиоз отдельных гепатоцитов, а также белковая дистрофия гепатоцитов. Липиды локализовались преимущественно в центральных и промежуточных отделах

долек. В синусоидах отмечалась гиперплазия звездчатых ретикулоэндотелиоцитов и эндотелия, а в портальных трактах - скудная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Введение смеси таурина и АРУЦ приводило к исчезновению главного проявления алкогольного стеатоза печени - накопления жира в гепатоцитах. Изменения со стороны портальных трактов сохранялись. Реактивные изменения со стороны синусоидов были выражены слабее (рис.6). Таким образом, налицо гепатопротективное влияние препарата в ситуации субхронической алкогольной интоксикации. Одним из механизмов этого влияния может быть антиоксидантные и антирадикальное действие таурина [7,14], в том числе при экспериментальном токсическом поражении печени [16].

Субхроническая алкогольная интоксикация сопровождалась увеличением уровней таурина и его предшественников (цистина и метионина) в плазме крови (рис. 7). Кроме того, повышались уровни аспартата и лизина. Уровни АРУЦ и ароматических аминокислот, а также их соотношение достоверно не изменялись.

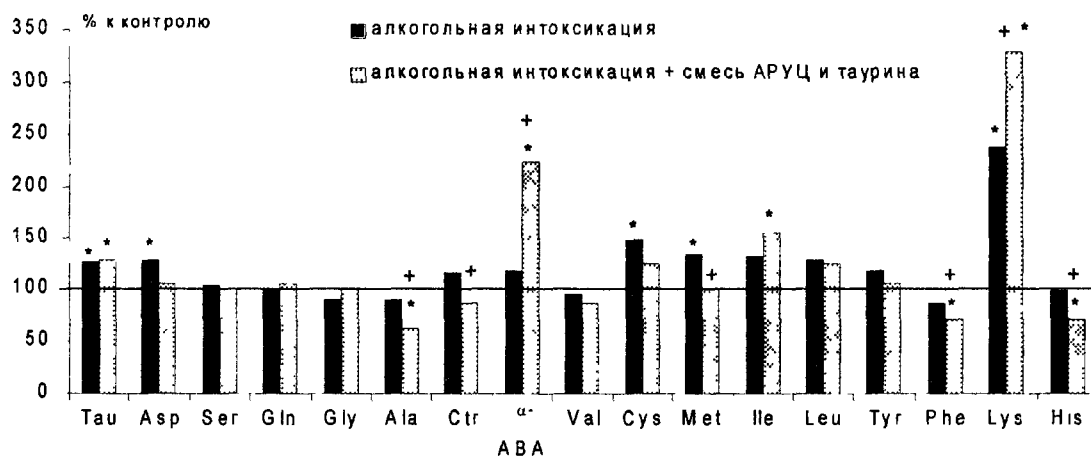


Рисунок 7.

Сдвиги концентрации свободных аминокислот и их производных в плазме крови крыс, получавших смесь АРУЦ и таурина на фоне субхронической алкогольной интоксикации (количество наблюдений в каждой группе - 6); * - $p < 0,05$ по отношению к контролю; + - $p < 0,05$ по отношению к группе с субхронической алкогольной интоксикацией

Смесь АРУЦ и таурина обладала способностью нормализовать концентрации аспартата, цистина и метионина в плазме крови, повышать уровни изолейцина, лизина и α -аминобутирата (α -АВА) и понижать - цитруллина, фенилаланина и гистидина (рис. 7). Содержание аланина снижалось как в печени, так и в плазме крови, что может свидетельствовать об усилении глюконеогенеза.

Изменения в формировании аминокислотного фонда печени (рис. 8) при субхронической алкогольной интоксикации были по направленности аналогичны таковым при синдроме отмены этанола, однако выражены в меньшей степени: не наблюдалось явного дефицита серосодержащих аминокислот, снижались концентрации как глицина, так и аланина. После введения смеси таурина и АРУЦ одновременно с повышением уровня глицина и таурина снижались уровни аланина и аспартата, нормализовался уровень треонина, глутамата и орнитина. Наряду с этим повышались уровни фосфоэтаноламина, α -аминобутирата и метионина.

Наиболее информативными в оценке изменений пула свободных аминокислот печени в трех описываемых группах животных (контроль, отмена алкоголя, композиция аминокислот на фоне отмены алкоголя), по данным дискриминантного анализа, были концентрации глутамата, фосфоэтаноламина, таурина и

ГЕПАТОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТ

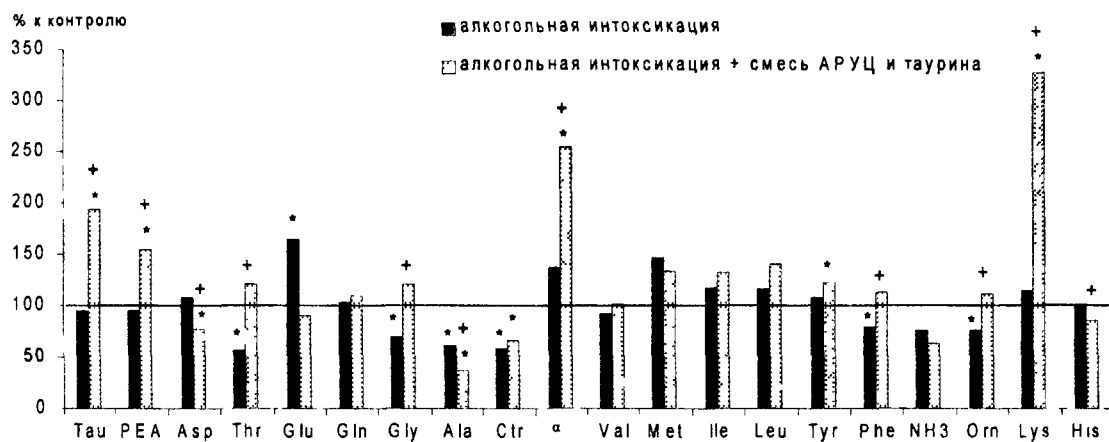


Рисунок 8

Сдвиги концентрации свободных аминокислот и их производных в печени крыс, получавших смесь АРУЦ и таурина на фоне субхронической алкогольной интоксикации (количество наблюдений в каждой группе - 6); * - $p < 0,05$ по отношению к контролю; + - $p < 0,05$ по отношению к группе с субхронической алкогольной интоксикацией

α -аминобутирата: F-константы Фишера выше 6 (см. табл.). В плазме крови этими показателями являлись уровни тирозина, изолейцина, лейцина и α -АВА. Можно считать, таким образом, что основные изменения в аминокислотном фонде при синдроме отмены этанола и коррекции метаболических сдвигов с помощью АРУЦ и таурина связаны с соотношением АРУЦ и ароматических аминокислот, а также соотношением концентраций таурина и фосфоэтаноламина (как правило, при стрессогенных воздействиях направленность изменений последних двух показателей противоположна [14]). В отличие от этой ситуации, субхроническая алкогольная интоксикация не связана с таким мощным стрессогенным воздействием, и, вероятно, этим объясняется низкие значения F-констант Фишера (ниже 2) для таурина и фосфоэтаноламина как в печени, так и в плазме крови. Не

Таблица Величины F-констант Фишера для концентрации свободных аминокислот при синдроме отмены алкоголя и введении на этом фоне смеси АРУЦ и таурина (с учетом трех групп животных), а также на фоне субхронической алкогольной интоксикации (количество наблюдений в каждой группе 6)

Синдром отмены алкоголя				Субхроническая алкогольная интоксикация			
Печень		Плазма крови		Печень		Плазма крови	
Glu	15,5706	Tyr	48,2902	Ala	30,3759	Lys	22,4160
PEA	7,8237	Ile	42,8016	α -ABA	18,5244	Met	10,1024
Phe	5,5784	α -ABA	12,8271	Ser	9,9802	α -ABA	9,1530
Gln	2,0425	Leu	12,1814	His	9,7828	Phe	7,0158
Ser	4,7418	Lys	8,0765	Orn	7,7265	His	5,1278
α -ABA	6,9534	Tau	2,3785	Tyr	2,7376	CA	12,7943
CA	4,6985	Val	2,6730			Gln	8,7362
Tau	6,0321					Glu	6,2644

являлись информативными в оценке изменений в фонде свободных аминокислот при субхронической алкогольной интоксикации также и концентрации АРУЦ. Наиболее информативными, с другой стороны, являлись уровни лизина, а также метионина и цистеата в плазме крови, аланина, серина и орнитина в печени. Как в печени, так и в плазме крови, высокоинформативным было содержание α -аминобутирата, что может указывать на наличие в условиях данного эксперимента выраженного нарушения метаболизма серосодержащих аминокислот, побочным продуктом превращений которых является это соединение,

а также на эффективность применения таурина в данной ситуации. Об этом же свидетельствуют высокие значения F-констант Фишера для уровней метионина и цистеата в плазме крови. При дискриминантном анализе нами была получена полностью корректная классификация групп (средние значения) и отдельных реализаций с использованием только показателей, приведенных в таблице.

ВЫВОДЫ. Применение смеси АРУЦ и таурина препятствует развитию жирового гепатоза при алкоголизации по Majchrowicz и субхронической алкогольной интоксикации. Кроме того, данная аминокислотная композиция способна корректировать аминокислотный дисбаланс в печени и плазме крови, который развивается в экспериментальных моделях алкоголизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Подымова С.А. (1998) Болезни печени. - М.: Медицина.
2. Liber C. S. (2000) Mount Sinai J. Med., №1, 84-94.
3. Liber C. S. (1985) In: Acta Medica Scandinavica symposium Series No.1 Stockholm: Almquist and Wiksell International, pp. 11-56.
4. Caballeria J. (1999) Alcohol and Alcoholism. 34., №3. 435.
5. Nanji Amin A., Tsukamoto Hidekazu, French Samuel W. (1989) Exp. Mol. Pathol., 51, 141-148.
6. Yuki T., Yoshitoko K., Nakagawa Y. (1988) Med. Biochem. and Chem. Aspects Free Radicals: Proc. 4th Gen. Meet. Soc. Free Radical Res., Kyoto, 2. pp. 967-970.
7. Kerai M.D., Waterfield C.J., Kenyon S.H., Asker D.S., Tirmbell J.A. (1999) Alcohol and Alcoholism. №4, 529-541.
8. Derr Robert F. (1989) J. Nutr., 8 1228-1230.
9. Rao G. Ananda, Lankin Edward C., Derr Robert F. (1989) Biochem. Arch., №3. 289-296.
10. Mezey E. (1999) Alcohol Alcoholism, 34, 436.
11. Mason Nancy A. (1989) DICP, №11, 872-875.
12. Lubec C., Rosental J.A. (eds.) (1990) Amino Acids (Chemistry, Biology, Medicine) N.Y.: Escom, 1196.
13. Смирнов В.Ю., Дорошенко Е. М., Нефёдов Л. И. (1997) Вести АН Беларуси. №2, 83-92.
14. Нефёдов Л.И. (1992) Вестн. АН Беларуси, №3-4, 99 -106.
15. Majchrowicz E., Hunt W.A. (1980) Animal Models in Alcohol Research (Eriksson K., Sinclair J.D., Kiianmaa K., eds.). Acad.Press., N.Y, pp. 419-424.
16. Дорошенко Е.М., Климович И.И., Смирнов В.Ю., Караедова Л.М., Горенштейн Б.И., Абакумов Г.З., Селевич М.И. (1999) Ученые записки. № 2, 66-71.

Поступила 22.05.2001

HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF BRANCHED CHAIN AMINO ACIDS AND TAURINE IN RATS UNDERGOING SUBCHRONIC ALCOHOL INTOXICATION AND WITHDRAWAL

Yu.-Ye.Razvodovsky¹, Ye.M.Doroshenko², N.I.Prokopchik¹, V.Yu.Smirnov², S.Yu.Ostrovsky²

¹ Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Grodno, Belarus

² State Medical University, Gorky str. 80, Grodno, 230015 Belarus

Forced alcoholization of rats according to Majchrowicz led to the development of fatty liver. The subsequent ethanol withdrawal was accompanied by amino acid imbalance in the pool of free sulfur-containing and glycogenic amino acids in liver and blood plasma. Similar changes were observed after prolonged alcohol intoxication. Intragastric administration of the amino acid composition containing branched-chain amino acids and taurine corrected the amino acid imbalance and reduced the development of the steatosis of the liver.

Key words: amino acids, branched-chain amino acids, taurine, alcohol, liver.