

УДК 616.36:5-47.466.6622

© Коллектив авторов

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ γ -L-ГЛУТАМИЛГИСТАМИНА

*Г.А. Желтухина, В.Е. Небольсин, В.В.Кржечковская,
Р.П. Евстигнеева*

Московская академия тонкой хим. технологии им.М.В.Ломоносова
Кафедра ХТТОС изучения механизмов; 117571, Москва, пр. Вернадского, 86.
тел.:778-5256, эл.почта:vostoktpp@mtu-net.ru

Исследовано влияние γ -L-глутамилгистамина и глутарилгистамина, синтезированных на кафедре химии и технологии тонких органических соединений МИТХТ им. М.В. Ломоносова, на изменение перекисного окисления липидов (ПОЛ), холестерина, фосфолипидов и активности печеночных трансфераз на модели субтоксического поражения печени. Введение животным четыреххлористого углерода приводило к изменению ряда биохимических показателей - повышению активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови, ПОЛ в печени и сыворотке крови, изменению липидного состава в сыворотке крови и печени. Введение животным γ -L-глутамилгистамина и глутарилгистамина предотвращало некроз печеночной ткани, что сопровождалось уменьшением активности АЛТ и АСТ, нормализацией количества липопротеинов низкой плотности, липопротеинов очень низкой плотности и липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови, а также снижением содержания свободного холестерина и триглицеридов в печени.

Ключевые слова: γ -L-глутамилгистамин, глутарилгистамин, крысы, печень, ферменты, перекисное окисление липидов, холестерин, фосфолипиды.

ВВЕДЕНИЕ. В спектре различных заболеваний значительное место занимают поражения печени. Острые и хронические гепатиты и циррозы печени развиваются под влиянием различных факторов: химических соединений, радиации, дефицита белков и витаминов, инфекционных заболеваний, гемодинамических расстройств. Биотрансформация большого количества эндогенных (холестерин, стероидные гормоны, полиненасыщенные жирные кислоты) и экзогенных соединений (лекарственных средств, промышленных ядов, пищевых добавок) происходит в печени. В настоящее время известно около 300 лекарственных препаратов, применение которых может привести к нарушению функции печени (например, средства для наркоза, психотропные, пероральные гипогликемические препараты, ненаркотические анальгетики, антибиотики и другие [1]).

Известно, что введение четыреххлористого углерода (CCl₄) животным приводит к характерным изменениям печени с признаками порт biliарного цирроза и является общепризнанной моделью токсического поражения печени [2].

Метаболизм CCl₄ происходит в основном в микросомальной фракции гепатоцитов и коры надпочечников с образованием его биологически активных

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ γ -L-ГЛУТАМИЛГИСТАМИНА

радикалов при участии различных изоформ цитохрома P450 [3, 4, 5]. Биоактивация низких доз CCl_4 осуществляется цитохромом P450E1, тогда как при введении высоких доз метаболизм происходит в основном при участии изоформ цитохрома подсемейства P4503A и в меньшей степени другими изоформами [6]. Следует отметить, что в более ранних исследованиях большую роль в биоактивации соединения отводят цитохрому P448, что в современной номенклатуре соответствует цитохромам P4501A1 и P4501A2, которые индуцируются полихлорированными бифенилами, в том числе 3-метилхолантреном (3-MX) [7]. Выявлено, что при легкой степени выраженности цирротических изменений печени при введении CCl_4 повышается активность цитохрома P450E1. В то же время при тяжелых признаках цирроза активность данного фермента не отличается от контрольных значений на фоне значительного снижения содержания многих других изоформ [8]. Увеличение активности цитохрома P450E1 вносит значительный вклад в повышение перекисного окисления липидов, так как именно с его активностью связано изменение образования свободных радикалов кислорода в печени [9]. При поражении печени CCl_4 подавляются механизмы утилизации супероксидных радикалов и гидроперекисей, что способствует накоплению активных форм кислорода (в том числе гидроксильных радикалов) и проявлению их токсического действия на мембранные структуры гепатоцитов [10, 11]. В результате происходит изменение фосфолипидного состава микросомальной мембраны, увеличение содержания холестерина и уменьшение соотношения содержания фосфолипидов к холестерину (Ф/ХС). Такие изменения липидного состава микросомальной мембраны приводят к снижению ее текучести и, как следствие, понижению функциональной активности микросомальных ферментов (в частности системы цитохрома P450). Это подтверждается тем, что изменение соотношения Ф/ХС в мембранных структурах клетки достоверно коррелирует с изменением аминопирин-N-деметиلاзной активности системы цитохрома P450 печени [12, 13].

Ранее нами было показано, что γ -L-глутамилгистамин модулирует систему цитохрома P450 печени, повышает количество кортизола и его предшественников в сыворотке крови [14]. Эти результаты позволяют предположить наличие гепатопротекторной активности у данного соединения.

В настоящей работе исследовано влияние введения экспериментальным животным γ -L-глутамилгистамина и его структурного аналога N-глутарилгистамина на изменение перекисного окисления липидов, холестерина, фосфолипидов и активности печеночных трансфераз на модели субтоксического поражения печени.

МЕТОДИКА. Соединения γ -L-глутамилгистамин (γ -L-Glu-HA) и N-глутарилгистамин (соединение VG) синтезированы методами пептидной химии на кафедре химии и технологии тонких органических соединений МИТХТ им. М.В. Ломоносова [15, 16].

Исследование гепатопротекторных свойств соединений проводили на модели субхронического поражения печени (гепатита) четыреххлористым углеродом (CCl_4).

В эксперименте использовано 70 беспородных крыс-самок с исходной массой 190-200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария.

CCl_4 животным вводили в течение четырех дней подкожно из расчета 0,1 мл 50%-ного раствора CCl_4 в вазелиновом масле на 100 г массы тела. Легалон и исследуемые соединения животным вводили перорально в течение восьми дней (четыре дня одновременно с CCl_4 и четыре последующих дня). Животные были разделены на 7 групп (по 10 в каждой): 1 группа - контрольная (животным в течение первых четырех дней эксперимента вводили 0,2 мл вазелинового масла подкожно); 2 группа - животные получали CCl_4 ; 3 группа - CCl_4 + Легалон в крахмальном геле перорально в дозе 30 мг/кг; 4 и 5 группы - CCl_4 + соединение VG в дозах 50 и 500 мкг/кг соответственно; 6 и 7 группы - CCl_4 + γ -L-Glu-HA в дозах 50 и 500 мкг/кг соответственно.

Гепатопротекторную активность исследуемых соединений оценивали по

следующим показателям:

1) в сыворотке крови: активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаргатаминотрансферазы (АСТ); холестерин общий (ХС-общий); холестерин в составе липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП); холестерин в составе липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП соответственно), триглицериды (ТГ); малоновый диальдегид (МДА);

2) в печени: фосфолипиды (ФЛ), свободный холестерин (СХС), триглицериды (ТГ), МДА.

Активность трансаминаз (АЛТ и АСТ) в сыворотке крови оценивали общепринятым методом Френкеля-Райтмана [17].

Содержание ХС-общего в сыворотке крови определяли по методу Илька [18]. Количество ХС-ЛПВП измеряли в супернатанте после гепарин-марганцевой преципитации [19] методом Илька [18]. Содержание ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП рассчитывали по формуле [20]: ХС-ЛПНП = ХС-общий - (ХС-ЛПВП + ТГ/5).

Для оценки количества ТГ в сыворотке крови использовали метод [21].

Содержание конечных продуктов ПОЛ - МДА в сыворотке крови определяли методом [22]. Концентрацию ТБК-активных продуктов рассчитывали с помощью уравнения регрессии: $S = 0,21 + 0,26 D$, где S - концентрация ТБК-активных продуктов (в нмоль МДА на 1 мл сыворотки), D - показатель D535- D580 (в единицах оптической плотности).

Суммарные липиды из ткани печени экстрагировали модифицированным методом Фолча [23]. Количественное содержание липидных фракций оценивали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя систему растворителей гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота в соотношении 80:20:2. Зоны индивидуальных липидных фракций определяли с помощью 10%-го спиртового раствора фосфорномолибденовой кислоты, которые после элюирования анализировали спектрофотометрически при 600 нм.

Содержание МДА в печени определяли общепринятым методом [24]. Количество МДА рассчитывали, используя величину молярного коэффициента экстинкции окрашенного триметинового комплекса, образованного МДА с двумя молекулами ТБК: $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$.

Результаты исследований обрабатывали статистически [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что у животных, которым вводили CCl_4 , отмечалось достоверное повышение активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови (табл. 1). Введение Легалона и исследуемых соединений сопровождалось нормализацией активности ферментов. Эффект был наиболее выражен при применении $\gamma\text{-L-Glu-NA}$.

Таблица 1. Влияние соединений на изменение активности трансаминаз в сыворотке крови у животных с экспериментальным гепатитом.

Группы животных	Доза, мг/кг	АЛТ, нмоль/с.л.	АСТ, нмоль/с.л.
Контроль, интактные	-	674±35	554±27
CCl_4	-	789±30*	620±11*
Легалон + CCl_4	30,0	622±36**	531±22**
Соединение VG + CCl_4	0,50	609±42**	522±33**
Соединение VG + CCl_4	0,05	624±31*	478±26***
$\gamma\text{-L-Glu-NA}$ + CCl_4	0,50	551±28**	475±19***
$\gamma\text{-L-Glu-NA}$ + CCl_4	0,05	599±18***	470±17***

Примечания: * - достоверность различий с данными контрольной группы, * - $p < 0,05$. ** - достоверность различий с данными группы животных с экспериментальным гепатитом (CCl_4). ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Анализ показателей липидного состава сыворотки крови экспериментальных животных показал (табл. 2), что введение крысам CCl_4 сопровождалось

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ γ -L-ГЛУТАМИЛГИСТАМИНА

повышением содержания триглицеридов в 1,7 раза. В распределении холестерина по фракциям липопротеинов при воздействии CCl_4 отмечались некоторые особенности: наряду с повышением содержания общего холестерина и ХС-ЛПОНП на 21% и 74% соответственно возросло количество ХС-ЛПВП. Следует отметить, что соотношение ХС-ЛПВП к ХС-ЛПОНП по сравнению с контрольной величиной уменьшилось на 25%. На фоне введения Легалона и исследуемых соединений наблюдалась тенденция к снижению содержания общего холестерина, нормализация количества ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП и ХС-ЛПВП. Соотношение ХС-ЛПВП к ХС-ЛПОНП нормализовалось только у животных, получавших γ -L-Glu-NA в дозе 500 мкг/кг.

Как следует из результатов, представленных в табл. 3, введение животным CCl_4 приводило к увеличению на 70% содержания ТГ и снижению на 26% количества свободного холестерина в печени. При введении крысам Легалона отмечалась тенденция к повышению количества ТГ. Не выявлено изменения содержания фосфолипидов, а количество свободного холестерина в печени достоверно уменьшилось по сравнению с животными, получавшими только CCl_4 . Введение исследуемых соединений в целом нормализовало содержание СХС, снизило количество ТГ и повышало содержание фракции фосфолипидов. Достоверное повышение всех исследованных показателей (СХС, ТГ, фосфолипиды) наблюдалось при применении γ -L-Glu-NA в дозе 500 мкг/кг.

В табл. 4 приведены данные изменения содержания конечного продукта ПОЛ - МДА - в сыворотке крови и в печени. Токсическое поражение печени CCl_4 сопровождалось повышением содержания МДА в сыворотке крови и печени на 26% и 71% соответственно по сравнению с контрольными.

Таблица 2. Влияние соединений на изменение содержания холестерина и триглицеридов в сыворотке крови у животных с экспериментальным гепатитом.

Группы животных	Содержание холестерина, мг/100 мл					Содержание ТГ, мг/100 мл
	ХС-общий	ХС-ЛПВП	ХС-ЛПНП	ХС-ЛПОНП	ХС-ЛПВП/ХС-ЛПОНП	
Контроль, интактный	77,6±2,9	47,3±2,1	18,4±0,7	11,7±0,4	4,04±0,23	59,5±2,5
CCl_4	93,5±6,0*	60,8±4,6*	12,1±1,1	20,4±1,6*	2,98±0,42*	102,9±8,1*
Легалон + CCl_4	90,9±3,4	54,8±2,5	20,1±1,1** p<0,01	15,7±1,1** p<0,05	3,49±0,64** p<0,05	78,0±6,2** p<0,05
Соед-е VG, 0,5 мг/кг + CCl_4	87,0±2,6	59,3±2,6	12,0±0,6	15,8±1,0** p<0,05	3,75±0,53** p<0,05	78,6±5,4** p<0,05
Соед-е VG, 0,05 мг/кг + CCl_4	89,5±3,8	52,3±2,9	19,6±1,4** p<0,01	17,7±2,0	2,95±0,81	88,0±10,2
γ -L-Glu-NA 0,5 мг/кг + CCl_4	87,2±6,5	57,5±5,1	17,1±1,0** p<0,01	12,4±0,7** p<0,001	4,63±0,39** p<0,01	62,4±3,9** p<0,001
γ -L-Glu-NA 0,05 мг/кг + CCl_4	85,3±3,9	49,6±2,5	21,9±1,1** p<0,001	13,9±1,1** p<0,01	3,57±0,44** p<0,05	68,3±5,7 p<0,001

Примечания: * - достоверность различий с данными контрольной группы; ** - достоверность различий с данными группы животных с экспериментальным гепатитом значениями. Введение животным Легалона и изучаемых соединений приводило к нормализации количества МДА в исследованных тканях.

Таблица 3. Влияние соединений на изменение липидного состава печени крыс с экспериментальным гепатитом.

Группы животных	Липидный состав (в % от общих липидов)		
	Фосфолипиды	СХС	Триглицериды
Контроль, интактный	21,3±0,9	23,6±1,2	23,9±1,2
CCl ₄	20,5±1,1	17,4±0,7* p<0,001	40,5±2,5* p<0,001
Легалон + CCl ₄	19,7±1,1	15,0±0,4** p<0,01	44,1±1,9
Соединение VG, 0,5 мг/кг + CCl ₄	23,8±1,0** p<0,05	18,9±0,7	35,3±0,7
Соединение VG, 0,05мг/кг+ CCl ₄	24,4±0,7** p<0,05	20,3±0,8** p<0,05	35,5±1,1
γ-L-Glu-NA, 0,5 мг/кг + CCl ₄	26,1±0,6** p<0,001	20,6±0,8** p<0,05	33,9±1,0** p<0,05
γ-L-Glu-NA, 0,05мг/кг+ CCl ₄	22,8±0,9	18,0±0,8	39,9±1,7

Примечания: * - достоверность различий по отношению к контрольной группе; ** - достоверность различий по отношению к группе животных с экспериментальным гепатитом (CCl₄).

Таблица 4. Влияние соединений на изменение содержания конечных продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови и в печени крыс с экспериментальным гепатитом.

Группы животных	Доза, мг/кг	Сыворотка, МДА, нмоль/л	Печень, МДА, нмоль/л
Контроль, Интактные	-	5,60±0,60	3,49±0,16
CCl ₄	-	7,03±0,38* p<0,05	5,98±0,29* p<0,001
Легалон + CCl ₄	30,0	5,58±0,15** p<0,01	4,17±0,31** p<0,001
Соединение VG + CCl ₄	0,50	5,77±0,15** p<0,05	4,60±0,52** p<0,05
Соединение VG+ CCl ₄	0,05	5,86±0,70	5,00±0,15** p<0,05
γ-L-Glu-NA + CCl ₄	0,50	4,72±0,57** p<0,01	3,51±0,30** p<0,001
γ-L-Glu-NA + CCl ₄	0,05	5,82±0,38** p<0,05	4,47±0,45** p<0,05

Примечания: * - достоверность различий с результатами контрольной группы; ** - достоверность различий с результатами группы животных с экспериментальным гепатитом (CCl₄).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что введение животным CCl₄ приводило к поражению печени, что выражалось в изменении ряда биохимических показателей: повышении активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови, ПОЛ в печени и сыворотке крови, изменении липидного состава в сыворотке крови и печени. Известно, что протективный эффект различных веществ оценивается по нормализации данных показателей. Введение животным γ-L-Glu-NA и соединения VG предотвращало некроз печеночной ткани. Это подтверждается уменьшением активности маркерных ферментов поражения печени - АЛТ и АСТ, нормализацией количества ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП и ХС-ЛПВП в сыворотке крови, а также снижением СХС и ТГ в печени. Кроме того,

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ γ -L-ГЛУТАМИЛГИСТАМИНА

выявлено снижение содержания конечного продукта ПОЛ - МДА до контрольных значений как в сыворотке крови, так и в печени. Выраженность действия γ -L-Glu-NA на соединение VG сравнима или превышает эффективность препарата сравнения - Легалона, однако его действующая доза на 2-3 порядка выше, чем у исследованных соединений.

CCl₄ обладает высокой липофильностью и взаимодействует с гидрофобными участками апофермента или с гемовой группой цитохрома P450. Полагают, что гемовая группа цитохрома P450 является как местом связывания и активации, так и мишенью при метаболизме CCl₄ [3]. Показано, что введение животным CCl₄ приводит к повышению содержания группы цитохромов P450L, активный центр которых имеет липофильное микроокружение. Это свидетельствует о быстрой деструкции цитохромов P450B, активный центр которых обращен в водную фазу, под влиянием CCl₄ и относительному увеличению группы цитохромов P450L [26]. Изоформы, входящие в состав группы цитохромов P450L, участвуют в активации CCl₄, что приводит к значительному нарушению гомеостаза организма.

При исследовании изменения системы цитохрома P450 под влиянием γ -L-Glu-NA показано, что содержание группы изоформ цитохрома P450L печени значительно уменьшается [14]. Снижение содержания группы цитохромов P450L может сопровождаться уменьшением образования биоактивных радикалов CCl₄ и, соответственно, понижением ПОЛ и нормализацией обмена липидов. Снижение ПОЛ под влиянием изученных соединений также можно объяснить их способностью повышать содержание кортизола и его предшественников в сыворотке крови экспериментальных животных [14, 27]. Как известно, стероидные гормоны ингибируют ПОЛ [28]. Таким образом, снижение ПОЛ может быть связано как с изменением состояния системы цитохрома P-450 печени, так и с нормализацией гормонального фона экспериментальных животных.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что введение животным γ -L-Glu-NA и соединения VG предотвращает некроз печеночной ткани, что связано с функциональной перестройкой многих ферментных систем организма, участвующих в поддержании гомеостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чекман И.С. (1980) Осложнения фармакотерапии, Здоровье, Киев.
2. Kapil A., Koul I.B., Suri O.P. (1995) *Phytother. Res.*, **9**, (3), 189-193.
3. Арчаков А.И., Карузина И.И. (1973) Успехи гепатологии, Рига вып. 4, 39-59.
4. Poli G., Chiarpeno B., Albano E. (1983) *Chem. Biol. Interact.*, **43**, (3), 253-261.
5. Colby H.D., Purcell H., Kominami S., Takemori S., Kossor D.C. (1994) *Toxicology*, **94**, (1-3), 31-40.
6. Zangar R.C., Benson J.M., Burnett V.L., Springer D.L. (2000) *Chem. Biol. Interact.*, **125**, (3), 233-243.
7. Губский Ю.И., Прадий Т.П. (1988) Укр. биохим. журн., **49**, (4), 26-30.
8. Bastien M.C., Leblond F., Pichette V., Villeneuve J.P. (2000) *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **78**, (11), 912-919.
9. Bestervelt L.L., Vaz A.D.N., Coon M.J. (1995) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 3764-3768.
10. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Шустова С.Г., Рослова Е.М. (1995) VI Симпозиум по биохимии липидов, Тез. докл., М. с. 64
11. Mansour M.A. (2000) *Life Sci.* 1966, (26), 2583-2591.
12. Buters J.T.M., Zysset T., Reichen J. (1993) *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 983-991.
13. Reichen J., Buters J.T.M., Sojicic Z., Roos F.J. (1992) *Experientia*, **48**, 482-486.
14. Небольсин В.Е., Кржечковская В.В., Желтухина Г.А., Евстигнеева Р.П., Ковалева В.Л. (1999) Вопросы мед. химии, **45**, 482-488

15. Евстигнеева Р.П., Желтухина Г.А., Огрель С.А., Небольсин В.Е. (1995), Докл. РАН, **345**, 493-495.
16. Небольсин В.Е., Желтухина Г.А., Евстигнеева Р.П. патент РФ №2141423 от 20.11.99, приоритет от 04.07.97.
17. Меньшиков В.В. (ред.) (1969) Лабораторные методы исследования в клинике Медицина, М.
18. Покровский А.А. (ред.) (1969) Биохимические исследования в клинике Медицина, М., 300-302.
19. Тутов В.Н., Бренер Е.Д., Халтаев Н.Г., Задоя А.А., Творогова М.Г. (1977) Лаб. дело, 36-41.
20. Friedwald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. (1972) Clin. Chem. **18**, 499-502.
21. Родионова Л.П. (1980) Лаб. дело №5, 297-299.
22. Коробейникова Э.Н. (1989) Лаб. дело №7, 8-10.
23. Кейтс М. (1975) Техника липидологии Мир, М.
24. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1977) В кн. Современные методы в биохимии. Медицина, М., с. 66-69.
25. Гублер Е. В. (1978) Вычислительные методы анализа и распознавание патологических процессов. Наука, М.
26. Izotov M.V., Shcherbakov V.M., Devichensky V.M., Spiridonova S.M., Lugovaya L.V., Benediktova S.A. (1988) Biotechnol. Appl. Biochem., **10**, 545-550
27. Небольсин В.Е., Желтухина Г.А., Кржечковская В.В., Ковалева В.Л., Евстигнеева Р.П. (2001) Вопросы мед. химии, **47**, 301-307
28. Teare J.P., Greenfield S.M., Marway J.S., Preedy V.R., Punched N.A., Peters T.J., Thompson R.P.H. (1993) Free Radical Biology and Medicine, **14**, (6), 655-660

Поступила 25.12.01.

HEPATOPROTECTIVE EFFECNS OF γ -L-GLUTAMYLHISTAMINE.

G.A. Zheltukhina, V.E. Nebolsin, V.V. Krzechkovskaya,
R.P. Evstigneeva.

M. V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology
117571, Moscow, Vernadskogo pr. 86, tel.: 778-5256
E-mail: vostoktpp@mtu-net.ru

The influence of γ -GluHA and glutarylhistamine on the lipid peroxidation, cholesterol, phospholipid and liver aminotransferase activity was investigated using carbon tetrachloride-induced model of subacute liver damage. Pretreatment of rats with γ -GluHA and glutarylhistamine prevented liver necrosis and normalized activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in blood plasma, lipid peroxidation in the liver and plasma, lipid profiles and cholesterol content in the liver and plasma.

Key words - γ -L-glutamylhistamine, glutarylhistamine, rat, liver, enzyme, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lipid peroxidation, cholesterol, phospholipid.