

Возможности использования комбинации аргинина и глутаминовой кислоты (глутаргина) при хроническом панкреатите в эксперименте

Н.Б. Губергриц¹, Е.А. Крылова², А.И. Руденко³, Ю.А. Гайдар³

The possibility for the use of arginine and glutamic acid in chronic pancreatitis in the experiment

N.B. Hubergits, Ye.A. Krylova, A.I. Rudenko, Y.A. Gaidar

¹ Донецкий Национальный Медицинский Университет, г. Лиман, Донецкая область, Украина, ² ООО «Эндотехномед», г. Днепр, Украина, ³ ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепр, Украина

Ключевые слова: хронический панкреатит, эксперимент, перекисное окисление липидов

Резюме

Возможности использования комбинации аргинина и глутаминовой кислоты (глутаргина) при хроническом панкреатите в эксперименте

Н.Б. Губергриц, Е.А. Крылова, А.И. Руденко, Ю.А. Гайдар

Актуальность. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в фармакотерапии панкреатитов, одним из самых сложных разделов панкреатологии остается лечение больных хроническим панкреатитом.

Цель. Изучить протективное действие глутаргина при хроническом панкреатите в эксперименте.

Материал и методы. Исследование проведено на 21 лабораторной белой крысе-самце линии Wistar весом 180-230 г, которые были случайным образом разделены на контрольную и две исследовательские группы. Крысам I группы (n = 7) вводили внутрибрюшинно NG-нитро-L-аргинин (L-NNA), блокатор NO-синтазы, в течение 12-ти суток в дозе 40 мг/кг, крысам II группы (n = 7) – перед 12-дневным введением L-NNA в дозе 40 мг/кг предварительно за 20 мин. внутрибрюшинно вводили препарат «глутаргин» 20 мг/кг. Контрольную группу (n = 7) составили крысы, которым внутрибрюшинно вводили 0,9% раствор NaCl.

Результаты. Показатели всех видов поведенческой активности животных с моделируемым хроническим панкреатитом оставались сниженными даже через 45 суток от начала исследования. Применение глутаргина перед введением L-NNA способствовало восстановлению общих поведенческих реакций крыс, что свидетельствует о его протективном действии. При морфологическом исследовании через 45 суток после вывода крыс из эксперимента разницы состояния поджелудочной железы животных I и II групп не выявлено. При биохимическом исследовании сыворотки крови крыс установлен протективный эффект глутаргина на фоне действия L-NNA, который проявлялся в стабильности показателей системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной

Губергриц Наталья Борисовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры внутренней медицины №2 Донецкого Национального Медицинского Университета. Контактная информация: e-mail: profnbg@mail.ru, 84404, ул. Привокзальная, 27, г. Лиман, Донецкая область, Украина

Крылова Елена Александровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, врач-эндоскопист ООО «Эндотехномед». Контактная информация: e-mail: lenkrylova@gmail.com, 49023, ул. Байкальская, 7, г. Днепр, Украина

Руденко Анатолий Иванович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского сектора патофизиологии ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины». Контактная информация: e-mail: arudenko2017@ukr.net, 49074, пр. Слобожанский, 96, г. Днепр, Украина

Гайдар Юрий Адольфович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией патоморфологии ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины». Контактная информация: e-mail: yuritgaidar14@gmail.com, 49074, пр. Слобожанский, 96, г. Днепр, Украина

защиты (малоновый диальдегид и церулоплазмин) и возвращении к границам физиологической нормы содержания маркеров метаболизма коллагена (оксипролин белковосвязанный и оксипролин свободный).

Заключение. Глутаргин может быть применен в комплексном лечении больных хроническим панкреатитом в качестве препарата, который способствует снижению уровня продуктов перекисного окисления липидов, улучшает состояние системы антиоксидантной защиты и способствует нормализации метаболизма коллагена.

Ключевые слова: хронический панкреатит, эксперимент, перекисное окисление липидов

Abstract

The possibility for the use of arginine and glutamic acid in chronic pancreatitis in the experiment

N.B. Hubergits, Ye.A. Krylova, A.I. Rudenko, YA. Gaidar

Background: Despite the significant progress achieved in the pharmacotherapy of pancreatitis, one of the most difficult sections of pancreatology remains the treatment of patients with chronic pancreatitis.

Aim: To study the protective effect of glutargin in chronic pancreatitis in the experiment.

Material and methods. The study was conducted on 21 laboratory white Wistar male rats weighing 180-230 g, which were randomly divided into control and two research groups. Rats of group I (n = 7) were injected intraperitoneally with NG-nitro-L-arginine (L-NNA), a blocker of NO synthase, for 12 days at a dose of 40 mg/kg, to rats of group II (n=7) – before a 12-day administration of L-NNA at a dose of 40 mg/kg in advance for 20 minutes. intraperitoneally was administered «glutargin» 20 mg / kg. The control group (n = 7) consisted of rats, which were intraperitoneally injected with 0.9% NaCl solution.

Results. Indicators of all types of behavioral activity of animals with simulated chronic pancreatitis remained reduced even after 45 days from the start of the study. The use of glutargin before the introduction of L-NNA contributed to the restoration of the overall behavioral reactions of rats, which indicates its protective effect. During the morphological study 45 days after the removal of rats from the experiment, no difference in the state of the pancreas of animals of groups I and II was revealed. In a biochemical study of rat blood serum, a protective effect of glutargin was established against the background of L-NNA action, which was manifested in the stability of lipid peroxidation and antioxidant protection (malonic dialdehyde and ceruloplasmin) and return to the physiological limits of collagen metabolism markers (hydroxyproline protein-bound and hydroxyproline free).

Conclusion. Glutargin can be used in complex treatment of patients with chronic pancreatitis as a drug that helps reduce the level of lipid peroxidation products, improves the state of the antioxidant defense system and contributes to the normalization of collagen metabolism.

Keywords: chronic pancreatitis, experiment, lipid peroxidation

Введение

Проблема хронического панкреатита (ХП) – одна из самых сложных и противоречивых в гастроэнтерологии. За последние 30 лет во всем мире уровень заболеваемости ХП увеличился более, чем вдвое [1, 2, 3, 4, 5]. ХП обычно страдают пациенты трудоспособного возраста, что делает проблему этой патологии не только медицинской, но и медико-социальной. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в фармакотерапии панкреатитов, одним из самых сложных разделов панкреатологии остается лечение больных ХП [1, 2, 6].

Важным патогенетическим звеном в развитии и прогрессировании ХП является неконтролируемое усиление процессов свободнорадикального окисления липидов (ПОЛ) на фоне истощения защитных антирадикальных систем [4, 7]. Свободные радикалы блокируют обмен веществ в ацинарных клетках, «расплавляют» лизосомальные гранулы, окисляют липиды клеточных мембран. В случае длительного

действия оксидативный стресс вызывает разрушение и гибель клеток, в дальнейшем приводит к прогрессированию фиброзных изменений, внешнесекреторной и внутрисекреторной недостаточности поджелудочной железы (ПЖ). Поэтому, продолжается поиск препаратов для коррекции ПОЛ у больных ХП [8, 9].

Цель исследования

Цель настоящего исследования – изучить протективное действие глутаргина при ХП в эксперименте.

Материал и методы

Исследование проведено на 21 лабораторных белых крысах-самцах линии Wistar весом 180-230 г, которые были случайным образом разделены на контрольную и две исследовательские группы, которым моделировали ХП [10]. Крысам I группы (n=7)

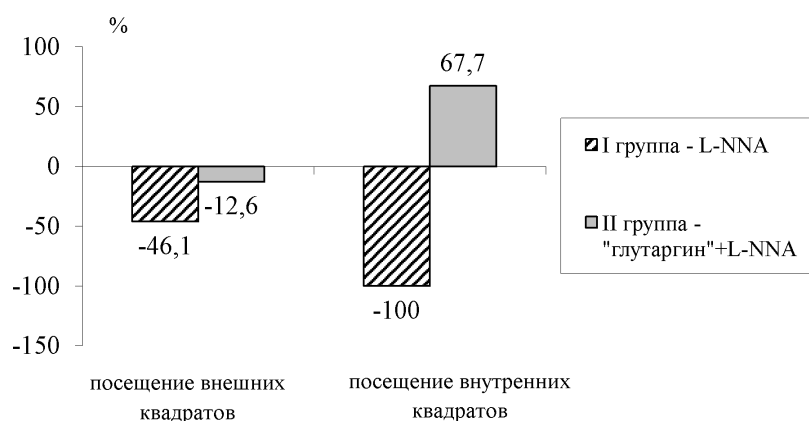


Рис. 1. Изменение количества посещений животными внешних квадратов при тестировании в «открытом поле» при исследовании крыс I и II

вводили внутрибрюшинно NG-нитро-L-аргинин (L-NNA), блокатор NO-синтазы (NOs), производства «Sigma-Aldrich» (USA) в течение 12-ти суток в дозе 40 мг/кг, крысам II группы (n = 7) – перед 12-дневным введением L-NNA в дозе 40 мг/кг предварительно за 20 мин. внутрибрюшинно вводили препарат «глутаргин» 20 мг/кг. Контрольную группу (n = 7) составили крысы, которым внутрибрюшинно вводили 0,9% раствор NaCl. Для изучения индивидуально-типологических особенностей поведения крыс, характеризующих индивидуальную устойчивость к эмоциональным стрессам, проводили тестирование в открытом поле по известной методике Буреш [11]. Крыс выводили из эксперимента на 45

сутки.

Вывод животных из эксперимента осуществляли посредством введения летальной дозы кетамина гидрохлорида. После вывода животных из эксперимента проводили забор крови для определения концентрации оксипролина белковосвязанного (ОПбсв), малонового диальдегида (МДА), глюкозы, нитритов/нитратов, активности α -амилазы, липазы и трипсина в сыворотке крови. Ткань ПЖ крыс использовали для гистологического исследования.

Исследования проводились, соблюдая нормы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005).

Таблица 1.

Сравнительная характеристика биохимических показателей сыворотки крови у крыс (M \pm m)

Показатели, ед. измерения	Контрольная группа (n=7)	I группа L-nna (n=7)	II группа «глутаргин»+L-NNA (n=7)	p1	p2	p3
МДА, нмоль/мл	4,50 \pm 0,23	4,15 \pm 0,53	4,81 \pm 0,15	p>0,05	p>0,05	p>0,05
ЦП, мг/мл	663,25 \pm 34,05	713,00 \pm 90,92	591,71 \pm 68,07	p>0,05	p>0,05	p>0,05
α -Амилаза, мг/с·л	56,82 \pm 1,87	58,66 \pm 1,74	57,52 \pm 2,47	p>0,05	p>0,05	p>0,05
трипсин, мкмоль/мл·хв	4,19 \pm 0,92	16,37 \pm 4,09*	6,95 \pm 1,10 α	p<0,05	p>0,05	p<0,05
липаза, нмоль/с·л	0,87 \pm 0,086	0,79 \pm 0,09	1,26 \pm 0,07# α	p>0,05	p<0,01	p<0,01
ОПбсв, мкмоль/л	179,28 \pm 9,19	159,54 \pm 6,55	183,62 \pm 5,98 α	p>0,05	p>0,05	p<0,05
ОПсв, мкмоль/л	9,96 \pm 0,71	5,81 \pm 0,64	9,44 \pm 1,13	p>0,05	p<0,001	p>0,05
нитриты/нитраты, мкмоль/л	32,61 \pm 1,63	36,46 \pm 3,87	33,59 \pm 5,84	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Примечания: 1. * – p < 0,05 – p1 – достоверность различий между группой контроля и I группой;

2. # – p < 0,01 – p2 – достоверность различий между группой контроля и II группой;

3. α – p < 0,05 – p3 – достоверность различий между I и II группами

α -Амилаза – альфа-амилаза, МДА – малоновый диальдегид, ОПбсв – оксипролин белковосвязанный, ОПсв – оксипролин свободный, ЦП – церулоплазмин

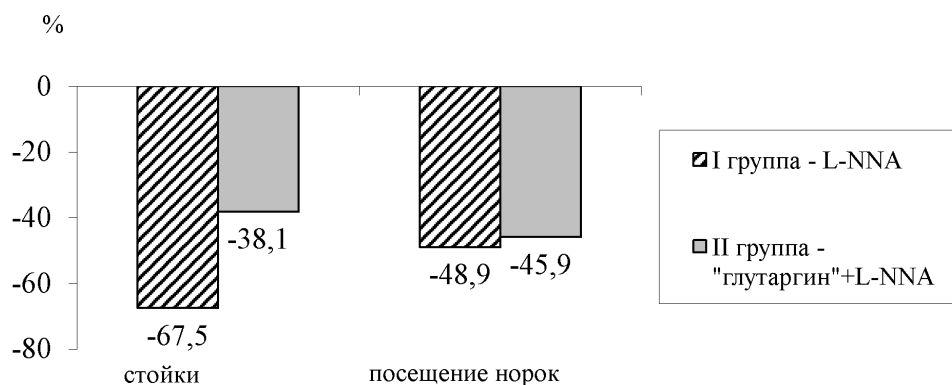


Рис. 2. Изменение исследовательской активности при тестировании в «открытом поле» при исследовании крыс I и II групп

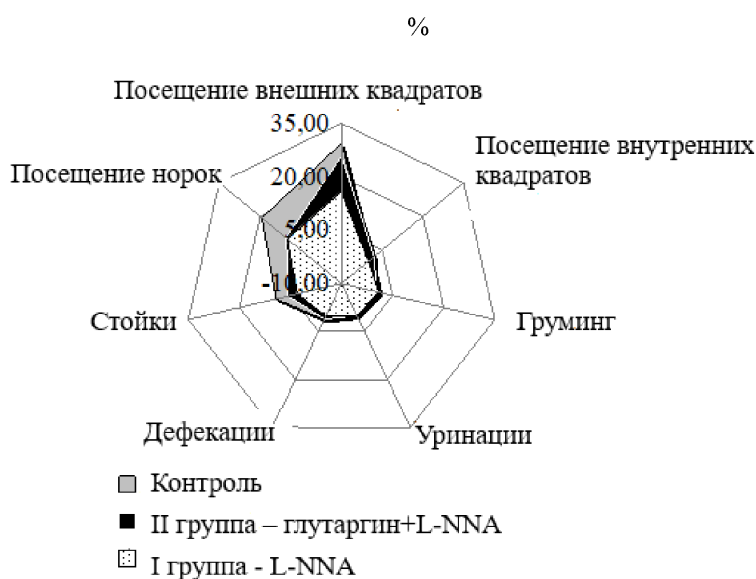


Рис. 3. Сопоставление профиля поведения групп крыс контрольной, I и II групп за 5 минут при тестировании в «открытом поле»

Для анализа полученных результатов использовали описательную и индуктивную статистику. В случае количественных данных и при условии их нормального распределения использовали среднее и стандартную ошибку среднего. Для определения достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. В случае отсутствия нормального распределения использовались медиана, минимум, максимум, верхние и нижние квартили, а достоверность различий определяли по U-критерию Манна-Уитни. Для описания качественных данных использовали частоту выявления признака (%). В этом случае для определения достоверности различий между группами пользовались χ -критерием. Показатель $p < 0,05$ считали статистически значимым. Все расчёты проводились в программе SPSS 9.0 for Windows (или Statistica 6) [12, 13].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были установлены изменения поведенческих реакций крыс. Так, у крыс I группы после 45 суток эксперимента (который включал 12-дневное введение L-NNA) общая двигательная активность снижалась по отношению к контрольным значениям на 46,1% ($p < 0,01$), тогда как при введении глутаргина в роли протектора, показатели общей двигательной активности крыс достоверно не отличались от контрольных значений (рис. 1).

Исследовательская деятельность у крыс I группы значительно снижалась, как по показателям стоек – на 67,5% ($p < 0,001$), так и по показателям посещения норок – на 48,9% ($p < 0,01$) по отношению к контрольным значениям. В отличие от общей двигательной активности, изменение исследовательской деятельности животных происходила и во II группе, снижение исследовательской деятельности, как по показателю стоек – на 38,1% ($p < 0,05$),

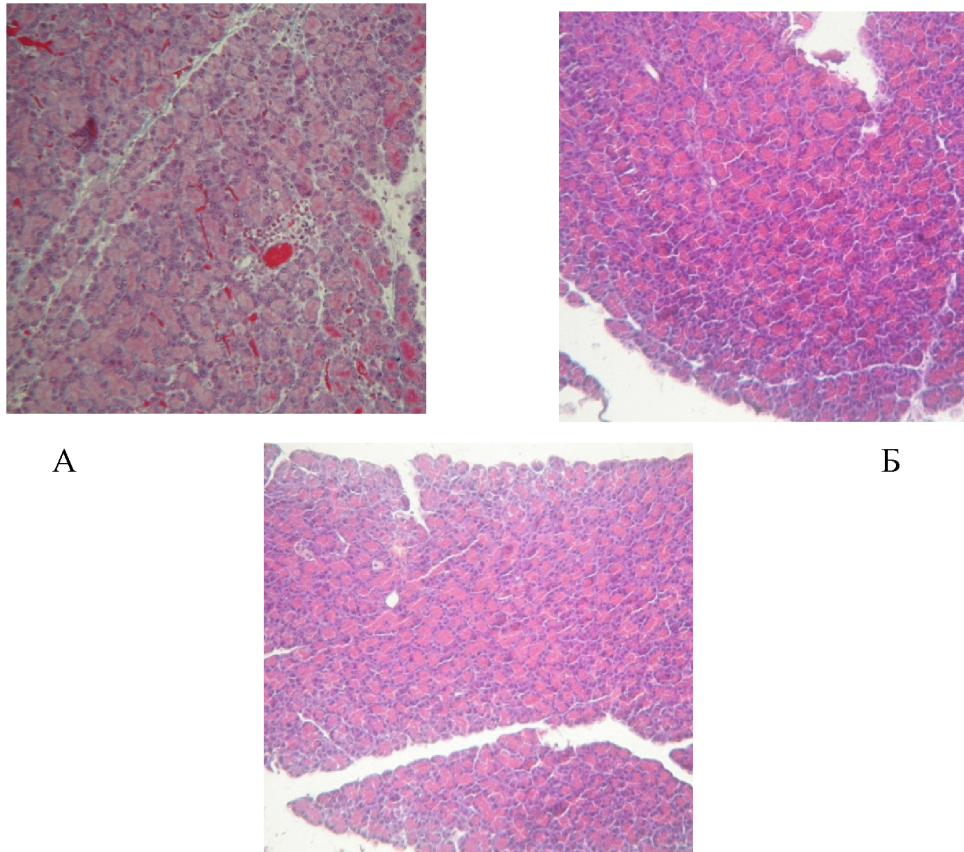


Рис. 4. Морфология ацинарной ткани ПЖ крысы (А - после введения L-NNA, Б - контрольная группа, В - после введения глутаргина и L-NNA). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100.

так и по показателю посещения норок – на 45,9% ($p < 0,01$) (рис. 2).

Таким образом, применение глутаргина перед введением L-NNA улучшает показатели общей двигательной активности, приводя их к уровню контрольной группы. Следует отметить тенденцию к повышению уровня исследовательской деятельности крыс по сравнению с I группой, которая, однако, не достигает исходных значений.

При сопоставлении профилей поведения животных исследуемых групп, можно сделать вывод, что даже через 45 суток после моделирования ХП сохраняется достоверное снижение показателей всех видов активности крыс (рис. 3), тогда как использование глутаргина при такой же модели ХП приводило к улучшению показателей всех видов активности крыс.

После изучения поведенческих реакций проводилось изучение морфологического и функционального состояния ПЖ крыс.

При морфологическом исследовании ПЖ крыс I и II группы установлено, что выраженных патологических структурных изменений в ПЖ не отмечалось (рис. 4 А, Б, В).

При отсутствии разницы в морфологии ацинарной ткани ПЖ на макроскопическом уровне у крыс

I и II групп определялись достоверные изменения функционального состояния ПЖ. Результаты биохимических показателей крови крыс представлены в таблице 1. Из представленной таблицы видно, что большинство показателей у животных II группы находилось в пределах физиологической нормы. Однако, во II группе была повышенной активность липазы (на 44,8%, $p < 0,01$ относительно контрольной группы), тогда как у животных I группы сохранялась высокая активность трипсина, которая превышала в 4 раза показатель контрольной группы ($p < 0,01$).

Таким образом, показатели всех видов поведенческой активности животных с моделируемым ХП оставались сниженными даже через 45 суток от начала исследования. Применение глутаргина перед введением L-NNA способствовало восстановлению общих поведенческих реакций крыс, что свидетельствует о его протективном действии. При морфологическом исследовании через 45 суток после вывода крыс из эксперимента разницы состояния ПЖ животных I и II групп не выявлено. При биохимическом исследовании сыворотки крови крыс установлен протективный эффект глутаргина на фоне действия L-NNA, который проявлялся в стабильности показателей системы ПОЛ-АОЗ (МДА и ЦП) и воз-

вращения к границам физиологической нормы содержания маркеров метаболизма коллагена (ОПбсв и ОПсв).

Заключение

На основании проведенных исследований можно сделать обобщение, что глутаргин, который хорошо зарекомендовал себя в лечении заболеваний печени, также может быть использован при повреждениях ПЖ. Глутаргин может быть применен в комплексном лечении больных ХП в качестве препарата, который способствует снижению уровня продуктов ПОЛ, улучшает состояние системы АОЗ и способствует нормализации метаболизма коллагена.

Литература

1. Губергриц Н.Б., Линева К.Ю., Беляева Н.В. Дифференциальная диагностика в гастроэнтерологии. От симптома и синдрома к диагнозу и лечению: практ. рук. Киев: Груш ЕН. [изд.]; 2018. 623с.
2. Пвашкин В.Т., Маев И.В., Охлбыстин А.В. и др. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению хронического панкреатита // Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. – 2014. – № 24 (4). – С. 70–97.
3. Белякова С.В., Белоусова Е.А. Качество жизни больных хроническим панкреатитом в Московской области // Альманах клинической медицины. – 2015. – № (40). – С. 64–71.
4. Machicado JD, Chari ST, Timmons L et al. A population-based evaluation of the natural history of chronic pancreatitis // *Pancreatology*. – 2018. – V. 18(1). – P. 39–45.
5. Majumder S., Chari S.T. Chronic pancreatitis // *Lancet*. – 2016. – V. 387(10031). – P. 1957–66.
6. Белоусова Е.А., Никитина Н.В., Цодиков Г.В. Оптимизация схем лечения хронического панкреатита ферментными препаратами // *Фарматека*. – 2008. – № 13. – С. 103–108.
7. Sirivardena A.K. Reappraisal of xenobiotic-induced, oxidative stress-mediated cellular injury in chronic pancreatitis: A systematic review // *World J Gastroenterol*. – 2014. – V. 20(11). – P. 3033–3043.
8. Ahmed Ali U, Jens S, Busch OR et al. Antioxidants for pain in chronic pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Aug 21; (8):CD008945.
9. Маев ИВ, Бидеева ТВ, Кучерявый ЮА и др. Фармакотерапия хронического панкреатита с позиций современных клинических рекомендаций // *Терапевтический архив*. – 2018. – № 08. – С. 81–85
10. Крылова Е.А., Руденко А.П., Гайдар Ю.А. и др. Пат. 61631 Украина, МПК G09В № 23/00 Способ моделирования панкреатита в эксперименте; Заявитель и патентообладатель ГУ «ЛП НАМН Украины». № 201015739; заявл. 27.12.2010; опубл.25.07.11, *Бюл.* № 14. – 3 с. [Интернет]. Доступно на: <http://base.njpr.org/search/INV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=161907&chapter=description>
11. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П.. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения // М.: Высшая школа; 1991. – 399 с.
12. Енюков ПС. Методы, алгоритмы, программы многомерного статистического анализа // М.: Финансы и статистика; 1986. – 232с.
13. Петри А, Сэбин К. Наглядная статистика в медицине // М.: ГЕОТАР-МЕД; 2003. – 143 с.