

УДК 577.25

ОТБОР КОМПЛЕКСНЫХ КОМПОЗИЦИЙ ПРОТЕКТОРОВ ГИПЕРАММОНЕМИИ И ОСТРОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Гришина Е.В.¹, Кравченко И.Н.², Лобанов А.В.², Сергеев А.И.³, Садовникова Е.С.²,
Дынник В.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, РФ, Институтская, 3

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Филиал Института биоорганической химии РАН. имени акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 6

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, РФ, Институтская, 3

e-mail: Dynn timer@rambler.ru ; Тел: 8-9251506655, 8-(4967)739477

Резюме

Цель исследований: отбор и тестирование на моделях животных с гипераммонемией композиций природных веществ, способных обеспечить эффективное снижение концентрации иона аммония (NH_4^+) в крови и предотвратить или замедлить развитие острой печеночной энцефалопатии (дисфункции мозга) и гибель животных при гипераммонемии. В экспериментах использована модель острой аммонийной интоксикации, основанная на интраперитонеальном введении животным (мыши и крысы) летальных доз NH_4Cl (LD100), без или в сочетании с другими печеночными токсинами (пропионовая кислота, CCl_4 и др.). Проведен скрининг эффективности индивидуальных веществ, взятых из классов аминокислот и карбоновых кислот, метиламинов и др., а также их различных сочетаний. В качестве препарата сравнения использована распространенная в медицинской практике композиция, включающая L- орнитин и L-аспартат (LoLa, препарат «Гепамерц»). Показано, что только композиции, включающие: (1) L- глутамат, сукцинат, L- аргинин, L- карнитин, L- Ацетилкарнитин и бетаин (введение в дозе 1.25

г/кг), (2) L- орнитин и L-аспартат (1.25 г/кг) и (3) L- аргинин, L- карнитин и бетаин (3г/кг) обеспечивают 100% выживание мышей при их введении за 15 мин до введения NH₄Cl (LD100 =16.0-16.5 ммол/кг). В отличие о мышей, выживаемость крыс при введении композиции (3), составляет 60%, ввиду плохой переносимости животными высоких доз этого состава. При комбинированном действии NH₄Cl и других токсинов композиция (1) является наиболее эффективной.

Ключевые слова: гипераммонемия, печеночная энцефалопатия, отбор гепатопротекторов и проекторов энцефалопатии

SELECTION OF COMPLEX COMPOSITIONS OF PROTECTORS OF HYPERAMMONEMIA AND ACUTE HEPATIC ENCEPHALOPATHY.

Grishina E.V.¹, Kravtchenko I.N.², Lobanov A.V.², Sergeev A.I.³, Sadovnikova E.S.², Dynnik V.V.¹

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya Street 3, Pushchino, Moscow Oblast, 142290 Russia*

²*Pushchino Branch of the Institute of bioorganic chemistry, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya Street 6, Pushchino, Moscow Oblast, 142290 Russia*

³*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya Street 3, Pushchino,
Moscow Oblast, 142290 Russia*

*E-mail: Dynnik@rambler.ru ; Tel: 8-9251506655, 8-(4967)739477

Summary

The purpose : selection, and testing on animal models of hyperammonemia of various compositions of natural substances, that can effectively reduce critical concentrations of ammonium ion (NH₄⁺) in the blood and tissues and prevent the development of acute hepatic encephalopathy (brain dysfunction) and death of the animals. The model of acute hyperammonia

was used. This model is based on intraperitoneal administration of lethal doses NH_4Cl (LD100) to rats and mice, without or in combination with other hepatotoxins (propionate Na, CCl_4 , etc.).

Results: Screening of the efficiency of individual substances, as well as of their pairs or triple combinations, etc was performed. These substances were taken from the classes of amino and carboxylic acids, methylamines, etc. The composition comprising L- ornithine + L-aspartate (LoLa, Pharmaceutical preparation «HepaMerz») was used as reference embodiment. It was shown that only the compositions comprising: (1) L- glutamate, succinate, L- arginine, L- carnitine, L- acetylcarnitine and betaine (administered dose of 1.25 g / kg), (2) L- ornithine L- aspartate (1.25 g / kg) and (3) L- arginine, L- carnitine and betaine (3 g / kg) may provide 100% survival of mice, being injected 15 min before the administration of NH_4Cl (LD100 = 16.0-16.5 mmol / kg). In contrast to mice, the survival of rats upon administration of the composition (3) was 60%, due to poor tolerance of animals to such doses of preparation. At combined action of NH_4Cl and other toxins, the composition (1) was the most effective.

Keywords: hyperammonemia, hepatic encephalopathy, screening of hepatoprotectors and protectors of hepatic encephalopathy

Введение

Острая или хроническая печеночная энцефалопатия (ПЭ)- дисфункция мозга, вызываемая острой или хронической дисфункцией печени [1]. В основе острой дисфункции печени могут быть острые токсические и лекарственные отравления или возвратная острая ПЭ, возникающая при хронической ПЭ, вследствие инфекции, воспалительных процессов, желудочно-кишечных кровотечений и др. В основе этиологии хронической ПЭ- цирроз печени или, реже, шунтирование печеночного кровотока (врожденное или введенное хирургическим путем) или врожденные ферментопатии. При всех формах хронических и ряде форм острых ПЭ ключевым токсином является ион аммония NH_4^+ , а провоспалительные цитокины, жирные кислоты, меркаптаны и др. могут быть отнесены к токсинам второго эшелона [1].

Впервые токсическое действие аммония ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) на мозг было установлено И.П. Павловым, М. Ненски и их соавторами 120 лет назад [2]. В этих исследованиях, проведенных на собаках, было использовано шунтирование, направлявшее весь кровоток органов брюшной полости в портальную вену (обратный шунт по отношению к шунту, предложенному в 1877 году Н. Экком [3]). Следствием такого шунтирования было возникновение адаптивного коллатерального кровообращения, при котором токсины из желудочно-кишечного тракта поступали в основной кровоток, минуя печень. У прооперированных таким образом животных при приеме мясной пищи наблюдалось неадекватное агрессивное поведение, сменявшееся летаргией, судорогами, комой и гибелью животных. В этих масштабных и для настоящего времени исследованиях, впервые была показана также важная роль желудочно-кишечного тракта, мышц, почек и др. органов в метаболизме аммония.

В основе современных методов лечения ПЭ, разработанных В. Мак Дермоттом [4], Ш. Шерлок [5] и др. исследователями более 60 лет назад и востребованными до сих пор [1, 6], - снижение концентрации иона аммония в крови («аммоний-снижающая стратегия или терапия» [6]), основанное на:

- 1) подавлении продукции иона аммония кишечными бактериями с использованием антибиотиков, а также про и пребиотиков;
- 2) активации превращения аммония- в мочевины в цикле мочевины (в больной печени) и в L-глутамин (в различных органах и тканях) с использованием различных сочетаний аминокислот и карбоновых кислот, витаминов и др.

Наибольшее распространение в клинической практике ряда стран, включая РФ, получил двухкомпонентный состав L-орнитин-L-аспартат (LoLa; Препарат «Гепамерц»; Германия) [1, 6, 7]. Эффективность «Гепамерц» ставится под сомнение в ряде клинических исследований [8]. Отмена его приема приводит к возврату симптомов заболевания [9], что означает необходимость постоянного, а не курсового приема.

Наряду этим также предлагаются методы лечения ПЭ, основанные на использовании ингибиторов глутаминсинтазы или лактатдегидрогеназы, блокаторов НМДА или ГАМК_A – рецепторов или различных каналов и транспортеров в мозге, - получившие название «нейро-протекторные стратегии» [10]. Негативные системные

эффекты применения таких ингибиторов или блокаторов, ограничивают их использование в клинической практике.

Поэтому основной задачей данной работы является сравнительное исследование, в качестве протекторов гипераммонемии, различных естественных метаболитов (не относящихся к числу ингибиторов или блокаторов) и их сочетаний и выявление комбинаций, обладающих наибольшей эффективностью при гипераммонемии. Были протестированы на эффективность не только достаточно сложные композиции, но также отдельные вещества и парные соединения, предлагавшиеся в течение последних 60 лет в качестве протекторов ПЭ.

Материалы ***и*** ***методы.***

Все исследования на животных были одобрены Комитетами по этике исследований на животных трех институтов. В экспериментах были использованы самцы белых беспородных и черных (линия С57В46) мышей и крыс линии Спрэг Долли (CD) в возрасте 8-12 недель. Животные находились в стандартных лабораторных условиях поддержания температуры, влажности и освещения.

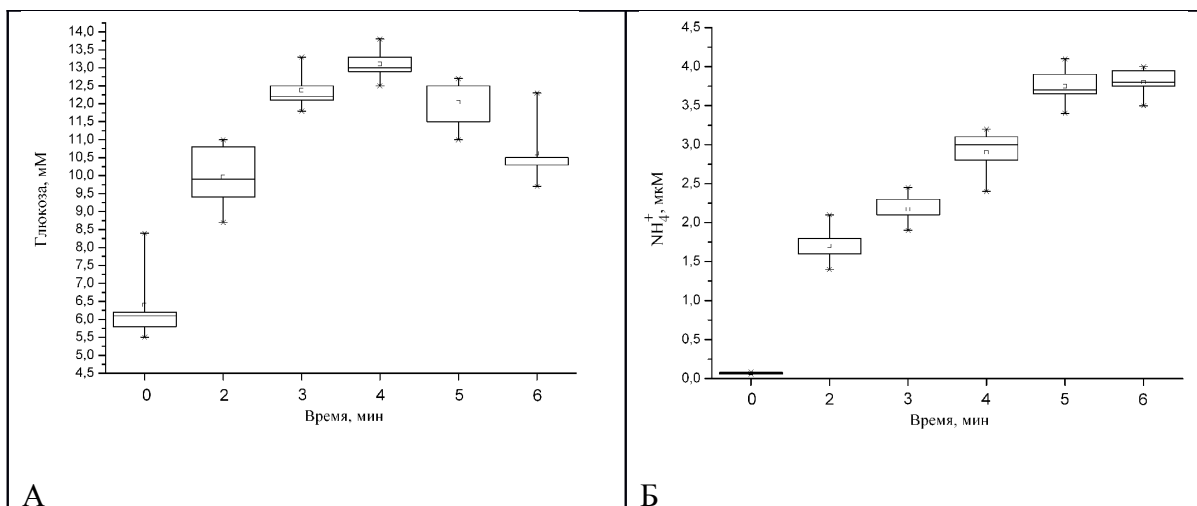
Определение метаболитов и параметров крови животных. Эксперименты проводились после периода голодания 12-14 часов. Забор крови у мышей осуществлялся после декапитации животных. Забор крови у крыс проводили с использованием катетера сонной артерии. Хирургическая операция по имплантации катетера проводилась за 2-4 дня до экспериментов на наркотизированных животных. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки, центрифугировали и отбирали плазму. Концентрации иона аммония, мочевины и лактата были измерены спектрофотометрически с использованием ферментативных методов. Определение глюкозы в крови, гематокрита, pH, pO₂, pCO₂ и HCO₃⁻ у крыс проводили с использованием картридж-анализатора (Rapid Point, Германия). Были использованы образцы гепаринизированной (плюс Li⁺) крови (250 мкл), взятые из сонной артерии. Аминокислоты были определены методом ВЭЖХ (Sykam, S7130 (430), Германия). При заборе крови из сонной артерии крыс (по 100мкл), компенсация объема плазмы осуществлялась введением 100 мкл NaCl.

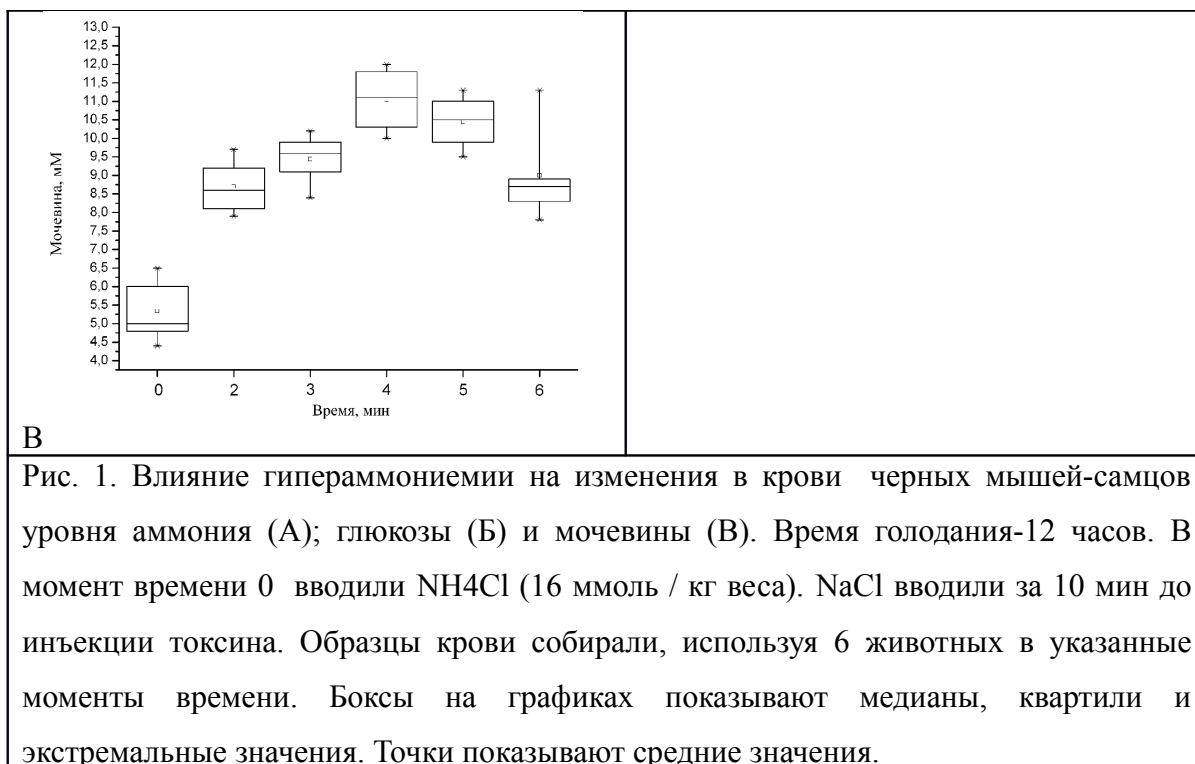
Выбор моделей острой ПЭ. Для скрининга эффективности протекторов гипераммонемии в большинстве опытов была использована простая, воспроизводимая и распространенная модель гипераммонемии [11]. Эта модель основана на внутрибрюшинных (i.p.) инъекциях

NH_4Cl (рН 7,4 , NaOH ; раствор 25мл/кг). Модель подострой гипераммониемии и печеночной недостаточности создавали путем i.p. введения CCl_4 за 24 часа до введения тестируемых протекторов и NH_4Cl . В модели химической полиорганной недостаточности [12], за 20 мин до введения NH_4Cl вводили i.p. пропионат натрия (25 ммоль / кг). В экспериментах на эффективность тестируемые вещества и их комбинации вводили i.p. (из расчета 25мл/кг) либо сразу же после введения аммония, либо за 15 минут до его инъекций. LD100 для NH_4Cl определяли в каждом эксперименте, используя до 20% (не менее 10 особей) животных из исследуемой группы. Общее число животных в группе в одном эксперименте составляло от 80 до 100 особей (мыши) и от 20 до 30 животных (крысы). Общее число животных, использованных за все годы исследований, составило: мышей –более 11 тысяч, а крыс –боле 450 особей. В разные периоды и в зависимости от линии животных, величина LD100 для мышей составляла от 15.5-16.5 до 17.0-18.0 ммол/кг, а для крыс - от 14.5 до 16.0 ммол/кг. Для исключения ошибок при определении веса и вводимой дозы, в большинстве опытов вводили дозы $\text{LD100}^* = \text{LD100} + 10\%$. Статистический анализ проводили с помощью теста Стьюдента для сравнения групп с использованием стандартного пакета программ (ANOVA). Результаты представлены в виде среднего \pm SD или SEM, или как медианы , квантили и экстремальные значения.

Результаты и их обсуждение.

Динамика показателей крови мышей и крыс при введении летальных доз NH_4Cl .





На Рис. 1А, Б и В представлены данные об изменениях концентраций аммония ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$), глюкозы и мочевины в крови мышей (тотальный забор крови при декапитации), начиная с момента, предшествующего введению летальных доз LD_{100}^* NH_4Cl , до момента гибели животных. Момент введения NH_4Cl на рисунках отмечен стрелкой. В опытах каждая точка забора крови представлена 6 животными. Характерен большой разброс измеряемых величин концентраций аммония, глюкозы и мочевины в крови мышей в каждый момент времени.

У мышей, начиная с 3-4 мин, проявляются эпизодические клонические судороги, затем возникает кома, которая на 7-8 мин завершается гибелью животных. У части животных (30-40%) в момент предшествующий гибели наблюдаются тонические судороги. При введении мышам доз LD_{100} гибель животных наступает в течение 10-15 мин.

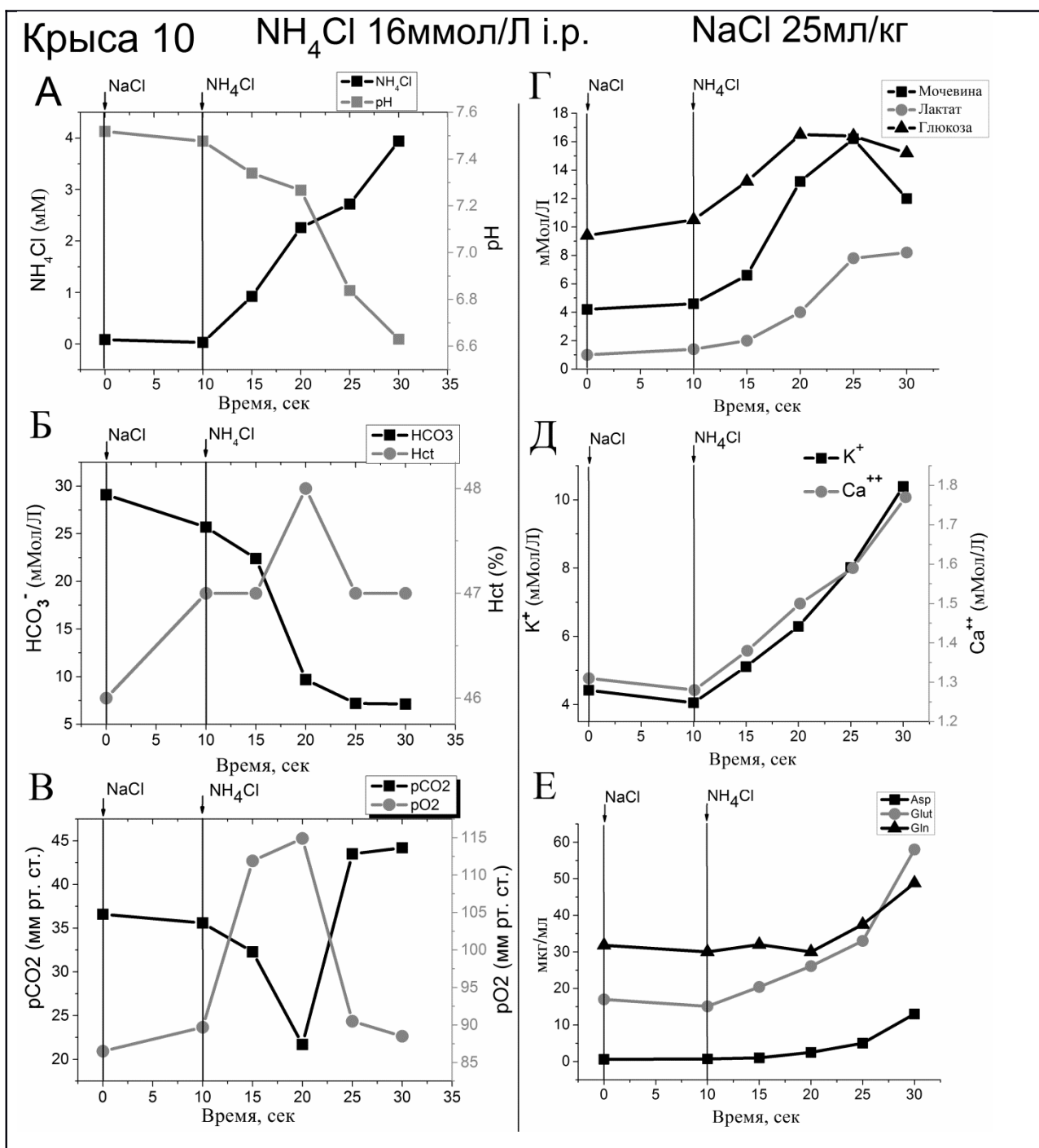


Рис. 2. Влияние гипераммониемии на изменения в крови самца крысы (CD) концентраций: аммония и pH (А); глюкозы, мочевины и лактата (Б); HCO_3^- и гематокрита (HCT) (В); калия - K^+ и кальция- Ca^{++} (Г); pCO_2 и pO_2 (Д); L аспаргата, L-глутамата и L-глутамина (Е). Голодание 12 часов. В момент времени 0 вводили 0,9% NaCl (внутрибрюшинно(i.p.)- 25 мл / кг). Через 10 минут вводили NH_4Cl (i.p. 16 ммоль / кг веса). Образцы крови отбирали в указанные моменты времени (темные квадраты, круги и треугольники) из сонной артерии. Тонические конвульсии и кома (IV стадия ПЭ, 14-15 и 17 мин) предшествовали гибели животного, которая произошла через 20 мин (после инъекции NH_4Cl).

На Рис. 2 показана динамика изменений: концентраций аммония (А); глюкозы, мочевины и лактата (Б); K^+ и Ca^{++} (Г); основных аминокислот (Е), HCO_3^- (В) и рН (А) в артериальной крови крысы при введении дозы NH_4Cl равной LD100. У крыс (представлены данные для 1 из 10 животных) эпизодические клонические судороги начинаются с 8-12 мин после инъекции NH_4Cl и совпадают с моментом резкого падения рН крови. Кома и возможные последующие тонические судороги возникают за 2-3 мин и 1 мин до гибели, соответственно. Период жизни животных от момента инъекции NH_4Cl до смерти составляет от 15 до 25 мин. Динамика регистрируемых показателей у разных животных качественно одинакова. Однако проводить усреднение различных показателей, суммируя данные полученные на группе животных в каждый момент времени, не представляется целесообразным, поскольку при этом могут нивелироваться наблюдаемые существенные сдвиги, например в падении рН, концентрации мочевины, накопления аммония, лактата, K^+ и др.

Влияние аммония на метаболизм печени.

Из данных представленных на Рис.1 следует, что гибель животных происходит при достижении критических величин концентрации NH_4^+ , превышающих 3 мМ (Рис.1А, 2А). При этом имеет место критическое падение рН (ниже 7.0, Рис. 2А) и концентрации бикарбоната HCO_3^- (до 3-5 мМ, Рис. 2В), вследствие стимуляции Цикла мочевины избытком иона аммония. Видно также (Рис.1А и Б, 2 Б), что продукция мочевины тесно сопряжена с активацией продукции глюкозы (глюконеогенеза) в печени. Наблюдаемая активация глюконеогенеза происходит благодаря избыточной продукции Циклом мочевины фумарата (предшественника глюкозы) из ко субстрата Цикла L-аспартата. Поскольку оба процесса – синтез мочевины и синтез глюкозы являются энергозатратными процессами, - для их активного функционирования необходима также стимуляция энергопродукции митохондриями, сопряженная с образованием CO_2 (HCO_3^-). Накопление лактата (Рис. 2Б), резкий рост концентрации K^+ (Рис. 2Г) в крови и уменьшение продукции мочевины (Рис. 1В и 2Б) в период времени, предшествующий гибели животных, указывают на подавление энергопродукции в этих условиях. В пользу этого вывода свидетельствуют также ранние данные различных авторов о сильном падении АТФ в мозге и печени [13, 14] и накоплении K^+ в крови в условиях гипераммонемии [13]. Следует отметить, что в этих экспериментах измерения метаболитов проводились до

момента падения рН ниже величин 7.2-7.3. Рост концентраций глюкозы, мочевины, лактата и K^+ в крови сопряжен с увеличением концентраций различных аминокислот: L-глутамата, L-глутамина, L-аланина (Рис. 2Е), а также осмолитов таурина и лизина (не показано) и др. Этот процесс может быть обусловлен, как стимуляцией их синтеза при гипераммонемии, так и увеличением их выхода в кровь из различных органов и тканей.

Токсическое действие аммония на клетки мозга.

Астроциты и отек мозга при гипераммонемии. Основной мишенью токсического действия избытка аммония на клетки мозга принято считать астроциты [1, 6, 15, 16]. Падение АТФ, развитие отека мозга и возникновение комы обычно связывают: с активацией Na^+/K^+ -АТФ азы [14]; с активацией возбуждающих НМДА-рецепторов, с накоплением Ca^{++} и избыточной активацией Ca^{++} -зависимого синтеза NO из L-аргинина (дисрегуляция $Ca^{++}/NO/cGMP/киназа G(PKG)$ -сигнальной цепочки) в астроцитах и развитием окислительно-нитрозативного стресса [15, 16]; с последующей компрессией мозга, вследствие адаптивного накопления L-глутамина и набухания астроцитов (токсический отек) [17] и/или дисфункции эндотелия и нарушения гематоэнцефалического барьера (вазогенный отек) [18].

Нейронные сети, судороги и кома. Химические механизмы, приводящие к развитию судорог и комы, остаются мало изученными. Ранее возникновение клонических и тонических судорог связывали: с дисингибированием нейронных сетей аммонием, вследствие блокады ГАМКа-рецепторов, ингибирования и последующей реверсии хлорных токов [19]; с дисфункцией (активацией) нейронных сетей спинного мозга, вследствие деполяризации нейронов [20]. Согласно последним данным возникновение судорог и деэнергизацию клеток мозга связывают с выходом K^+ из астроцитов и с последующей деполяризацией и активацией нейронов центральных отделов мозга [21].

Однако очевидно, что сильный рост K^+ в крови носит системный характер (Рис.1Г), что указывает на дисрегуляцию ионного гомеостаза в клетках разных типов (вследствие их деэнергизации) и может быть в первую очередь вызван выходом K^+ из эритроцитов. Более того, согласно нашим данным [22], полученным на нейроглиальных культурах гиппокампа крыс, токсическое действие избытка аммония вызывает гиперактивацию нейронных сетей, следствием чего может быть деэнергизация и дисрегуляция ионного

гомеостаза клеток мозга разных типов. Импульсная активность нейронов трансформируется в пачечную активность с деполяризацией мембраны нейронов в фазе плато протенциала действия (на 20-30 mV). Этому состоянию соответствуют : генерация высокоамплитудных Ca^{++} -колебаний в каждом нейроне сети; рост Ca^{++} в астороцитах или хаотические Ca^{++} -колебания малой амплитуды [22]. Активность различных ионо и метаботропных тормозных рецепторов, включая глициновые и ГАМКа-рецепторы сохраняется, что исключает предполагаемый эффект дисингибирования нейронных сетей аммонием [19, 20]. Поэтому возникновение судорожной активности может быть в первую очередь обусловлено трансформацией активности нейронных сетей, вызываемой активацией аммонием группы катионных каналов, а дисфункция астроцитов (приводящая к росту K^{+} в межклеточном пространстве) может рассматриваться , как процесс второго эшелона.

Возможная роль $Ca^{++}/NO/cGMP/PKG/cADP-ribose/Ca^{++}$ -сигнальной цепочки. Эта сигнальная система рассматривается, как простая линейная цепочка, приводящая с накоплению Ca^{++} , NO и cGMP [16], с последующим развитием окислительно-нитрозативного стресса, способствующего отеку мозга. При этом не учитывается, что система представляет многопетлевой генератор колебаний [23], элементы которого: Ca^{++} , NO, cGMP и PKG,- участвуют в регуляции различных ионных каналов и транспортеров в нейронах , астроцитах, сосудистом эндотелии и др. и, тем самым, обеспечивают регуляцию мембранного потенциала и межимпульсных интервалов нейронов, а также объема клеток разных типов.

Выводы, следующие из модели гипераммонемии.

Очевидно, что для предотвращения токсических эффектов аммония и летального исхода, помимо прямой активации Цикла мочевины и синтеза L- глутамина (Препарат «Гепамерц»), необходимы: активация энергопродукции (в цикле Кребса) в клетках разных типов; подавление гиперактивности нейронных сетей; устранение: дисрегуляции $Ca^{++}/NO/cGMP/PKG/cADP-ribose/Ca^{++}$ -сигнальной системы, ионного гомеостаза и систем регуляции объема клеток (астроциты, эндотелий, эпителий и др.).

Сравнительная эффективность различных веществ и их комбинаций, как протекторов острой гипераммонемии.

В Таб. 1 и 2 представлены сводные сравнительные данные об эффективности ряда веществ и их различных их сочетаний, а также композиции сравнения LoLa, как протекторов острой гипераммонемии у самцов белых мышей. Количество каждого из вводимых веществ в растворе указано в мг/25 мл. В Таб.2 знаками + и ++ отмечено наличие 1 или 2 доз этих веществ во вводимых растворах. В нижней части Таб.1и 2 показан % выживания животных в 2 группах по 10 особей (для каждой тестируемой композиции) после i.p. введения испытуемых препаратов и последующего (через 15 мин) введения LD100* NH₄Cl.

Представленные в Таб.1 данные показывают низкий % выживания животных при монотерапии (M1-M5), т.е. при введении предельных доз L- аргинина, L- глутамата, L- карнитина, L- Ацетилкарнитина, N-ацетилцистеина, этанола и др. веществ испытывавшихся ранее при лечении пациентов с клиническими стадиями ПЭ или в экспериментах на животных [4, 5, 24, 25]. Сходные результаты были получены ранее для сукцината, бетаина, таурина, креатина и др. [4, 6] , что свидетельствует о неэффективности монотерапии. Этот же вывод относится и к большинству парных соединений (D1-D3), включая пару L- глутамат+ L- аргинин(D2), зарегистрированную на Украине, как препарат «Глутаргин» [26]. Эта пара аминокислот обеспечивает 40-50% выживание животных (Таб.1, D2). Такую же эффективность обеспечивает введение пары L- аргинин + L- карнитин (Таб.1, D3). Дополнительное введение в состав комбинации D2 сукцината (интермедиат Цикла Кребса) увеличивает % выживания животных до 60-80% (Таб.1, T3).

Комбинация больших доз L- аргинина, L- карнитина и бетаина (Таб.1, T1) обеспечивает 100% выживание мышей. Замена осмолита бетаина на осмолит таурин снижает выживаемость животных до 70% (Таб.1, T2). В отличие от мышей, высокие дозы комбинации T1 (до 3 г/кг) плохо переносятся крысами (вызывают атаксию) и обеспечивают только 60% выживание крыс (не показано).

Композиция сравнения LoLa (Таб.1, D4) обеспечивает 100% выживание мышей (и крыс и более быстрое восстановление функциональной активности животных в течение 30-40 мин (Стадия 2 ПЭ- снижение моторной активности и болевого рефлекса), в сравнении с комбинацией T1, при введении которой в этот период времени до 30% мышей может находиться в коме (Стадия 4 ПЭ-кома), а остальные животные -в Стадии 3 ПЭ (сильно выраженная атаксия, отсутствие болевых рефлексов).

Вещество	M1	M2	M3	M4	M5	M6	D1	D2	D3	D4 (LoLa)	T1	T2	T3	T4
L-аргинин		4000						1000	1000		1000	100	1000	
L-карнитин	5000						2000		1000		1000	1000		1000
L-глутамат				1000				500					500	
Сукцинат					3000								200	
Бетаин											1000			
α-кетоглутарат														
Таурин												1000		
Этанол							1000							1000
N-ацетилцистеин			2000											1000
L-орнитин										750				
L-аспартат										750				
Аргинин-пироглутамат						2000								
% выживания животных	30, 40	20, 30	10, 20	10, 20	20, 40	20, 30	30, 30	40, 50	40, 60	100, 100	100, 100	70,7	60, 80	40, 60

Таблица 1. Влияние отдельных веществ (M1-M5), парных сочетаний (D1- D3) и тройных сочетаний (T1-T4) различных веществ на выживание самцов белых крыс при их предварительном i.p. введении за 15 мин до введения NH₄Cl (LD100*). Дозы вводимых веществ приведены в мг/25 мл. В каждом эксперименте использовано 2 группы по 10 самцов. Для каждой группы % выживания приведен внизу таблицы

Вещество	$\Sigma 1$	$\Sigma 2$	$\Sigma 3$	$\Sigma 4$	$\Sigma 5$	$\Sigma 6$	$\Sigma 7$	$\Sigma 8$	$\Sigma 9$
L-аргинин	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-карнитин	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Ацетил-L-карнитин	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-глутамат	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Сукцинат	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Бетаин	+	+	++	+	+	-	-	+	+
α -кетоглутарат	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Таурин	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Этанол	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Креатинфосфат	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N-ацетилцистеин								+	-
% выживания	100 - 100	100 - 100	80 - 90	100 - 100	80 - 80	70 - 70	80 - 70	50 - 60	80 - 70

Таблица 2. Сравнительное исследование эффективности различных комплексных составов $\Sigma 1$ - $\Sigma 9$ и LoLa на выживание самцов белых крыс при их предварительном i.p. введении за 15 мин до введения NH_4Cl (LD100*). Дозы вводимых веществ приведены в мг/25 мл. В каждом эксперименте использовано 2 группы по 10 самцов. Для каждой группы % выживания приведен внизу таблицы.

100% выживаемость и быстрое восстановление функциональной активности мышей (Таб.2, Σ_1) и крыс обеспечивает также сложная композиция Σ_1 , включающая: L- глутамат, сукцинат, L- аргинин, L- карнитин, L- Ацетилкарнитин и бетаин. В этой композиции L- Ацетилкарнитин может быть заменен двойной дозой L- карнитина (Таб.2, Σ_2), а дополнительное введение в состав этанола и креатинфосфата (Таб.2, Σ_3) увеличивает % выживания животных, при введении доз токсина превышающих LD100*, и уменьшает или вовсе устраняет количество клонических судорог в сравнении с композициями Σ_1 и LoLa. Учитывая известное противоположное действие спиртов на ГАМКа-рецепторы (активация) и НМДА-рецепторы (ингибирование), такой эффект этанола очевиден. Однако при этом животные в течение длительного времени остаются в состоянии соответствующем стадии 3 ПЭ. Учитывая также прямые токсические эффекты этанола на клетки разных типов,- его включение в состав композиций гепатопротекторов и протекторов ПЭ не оправдано. Замена бетаина на таурин (Таб.2, Σ_7) или сукцината на а-кетоглутарат (Таб.2, Σ_5) или отсутствие L- глутамата (Таб.2, Σ_3) в композиции Σ_1 , уменьшает ее эффективность.

Сравнительная эффективность композиций Σ и LoLa, в модели полиорганной недостаточности.

В Таб.3 представлены данные о сравнительной эффективности композиций Σ_1 и LoLa в модели полиорганной недостаточности, основанной на предварительном введении мышам токсических доз пропионат Na^+ (25 ммоль/ кг веса), с последующим введением через 15 мин токсина NH_4Cl и NaCl или тестируемых протекторов. Полиорганная недостаточность, вызываемая пропионатом, основана на его превращении в клетках разных типов в пропионил-КоА, который является сильным ингибитором белков различных транспортных и метаболических систем [13]. Видно, что в присутствии пропионата Na^+ , даже не летальные дозы NH_4Cl (LD30=14ммоль/кг) вызывают быструю гибель животных (строка 1). При введении NH_4Cl в летальной дозе LD100 (15.5ммоль/кг) гибель животных наступает быстрее (строка 2). При таких условиях при введении композиции Σ_1 выживает более 50% животных. Защитный эффект состава LoLa выражен слабее, а эффективность L- карнитина не превышает 10% (строки 3-5).

№	Ињекции* пропионата Na ⁺ за 15 мин до NH ₄ Cl	Токсин NH ₄ Cl и дозы:	NaCl или составы ** и дозы:	Количество животных в группе	Время до смерти (мин)	% Выживания через 1 час
	ПропионатNa (25 ммоль/ кг веса)	LD30 (14ммоль/кг)	NaCl	10, 10	15-20	0, 0
	- -	LD100 (15.5ммоль/кг)	NaCl	10, 10	8-12	0, 0
	- -	LD100	Σ ₁ (2.5 г/кг)	10, 10	20-40	50, 60
	- -	LD100	LoLa (2.5 г/кг)	10, 10	20-30	30, 40
	- -	LD100	Lкарнитин (25 ммоль/кг)	10, 10	10-15	10. 10

*. ** интраперитонеальные ињекции (i.p.); ** ињекции через 30 сек после NH₄Cl

Таблица 3. Влияние составов Σ₁, LoLa and L-карнитина на выживание самцов белых крыс при комбинированном предварительном введении пропионата Na⁺ и последующем введении с интервалом 30 сек NH₄Cl, NaCl или протекторов.

Сравнительная эффективность композиций Σ₁ и LoLa на модели окислительного стресса и гипераммониемии.

CCl₄, наряду с другими гепатотоксинами, часто используется для создания моделей острой дисфункции печени, вызываемой развитием окислительного стресса с

последующим развитием вторичной гипераммонемии. В зависимости от дозы и времени введения этого токсина может иметь место активация антиоксидантных и различных метаболических систем в организме животного. Из результатов, представленных в Таб.4 (строки 1-3) следует, что CCl_4 , вводимый в дозах 2 -3мл/кг веса, вызывает через 24 часа эффект прекондиционирования, обеспечивая выживание большей части животных при введении им летальных доз NH_4Cl ($\text{LD}_{100}^+ = 16.5$ ммоль/кг). При введении CCl_4 в дозе 4 мл/кг веса, погибают все животные при введении им, как летальных (LD_{100}^+), так и нелетальных (10.0 ммоль/кг) доз NH_4Cl (строки 3 и 4). В этих условиях композиции LoLa и Σ_1 обеспечивают частичный защитный эффект (строки 5 и 6), уменьшая гипераммонемию, но не обеспечивая быструю активацию антиоксидантных систем. Эффективность композиции Σ_1 оказывается несколько выше, чем композиции LoLa.

Композиция Σ_1 , была использована в предварительных клинических исследованиях (информированное согласие пациентов) на пациентах с циррозом печени вирусной этиологии и клиническими стадиями ПЭ [27]. Было установлено, что выраженный терапевтический эффект данной композиции сохраняется в течение 1 месяца наблюдений, что означает возможность его курсового, а не пожизненного приема.

№	Введение* CCl_4 за 24 часа до NH_4Cl	Токсин NH_4Cl и дозы:	Протекторы** и дозы:	Самцы (количество в группе)	Время до гибели	% выживания через 150 часов
	CCl_4 (2 мл/кг веса)	LD_{100}^+ (16,5 ммоль/кг веса)	NaCl	10, 10	10-12 (мин)	80, 70
	CCl_4 (3 мл/кг веса)	LD_{100}^+	NaCl	10, 10	15-30 (мин)	50, 60
	CCl_4 (3 мл/кг	LD_{100}^+	NaCl	10, 10	7-12 (мин)	0, 0

	веса)					
	CCl ₄ (4 мл/кг веса)	NH ₄ Cl (10 ммоль/кг веса)	NaCl	10, 10	72-96 (час)	0, 0
	CCl ₄ (4 мл/кг веса)	NH ₄ Cl (10 ммоль/кг веса)	LOLA (2.0 г/кг)	10,10	72-120 (час)	30, 40
	CCl ₄ (4 мл/кг веса)	NH ₄ Cl (10 ммоль/кг веса)	Σ ₁ (2.0 г/кг)	10,10	72-120 (час)	40, 50
*, ** интраперитонеальные инъекции (i.p.); ** инъекции через 30 сек после NH ₄ Cl						
Таблица 4. Сравнительная эффективность влияние протекторов (Σ ₁ и LOLA) на выживание самцов белых мышей при комбинированном действии CCl ₄ и NH ₄ Cl						

Выводы

Поиск эффективных композиций протекторов гипераммонемии был основан на анализе существующих данных о предлагаемых методах коррекции таких состояний, на известных мишенях и механизмах действия NH₄⁺ на метаболические и сигнальные системы клеток печени, сосудов и мозга при ПЭ, на анализ математических моделей, а также на предварительных экспериментах по тестированию эффективности протекторов разных типов. Также проводилась проверка тестируемых веществ, на клеточных моделях [22]. Были сформулированы требования, которым должна удовлетворять композиция, обладающая свойствами гепатопротектора и протектора ПЭ. На основании этих исследований был отобран комплексный состав Σ₁, который в сравнительных исследованиях на модели гипераммонемии показал 100% эффективность (Таб.1 и 2), сравнимую с аммоний снижающим эффектом препарата сравнения LoLa (препарат «Гепамерц»). Состав Σ₁ также показал более высокий процент выживания животных в

сравнении с парой аминокислот LoLa, в экспериментах на моделях полиорганной недостаточности и сочетания окислительного стресса и гипераммонемии (Таб.3 и 4).

Более того, в отличие от состава LoLa [9], и других составов гепатопротекторов и протекторов ПЭ существующих на фармацевтическом рынке, данный состав не имеет «возвратного эффекта» при лечении пациентов с циррозом печени и ПЭ [27], что по-видимому связано с действием его компонент на геном. Отсутствие «возвратного эффекта» может позволить вместо пожизненного приема использовать курсовое лечение пациентов с ПЭ. В отличие от LoLa и др. предлагаемых составов, компоненты композиции Σ_1 способны эффективно подавлять гиперактивацию нейронных сетей (без применения различных типов ингибиторов или блокаторов) [22] и уменьшать возможность образования митохондриальной поры в клетках печени (и гибели клеток) при циррозе печени и ПЭ, при синергичном действии группы токсинов [28].

Таким образом, комплексный состав Σ_1 может быть использован в качестве базовой композиции для дальнейших исследований и создания линейки протекторов ПЭ.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (Грант №[14-04-01597](#)).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Bajaj S. *Review article: the modern management of hepatic encephalopathy.*//Aliment Pharmacol. Ther.2010. vol. 31(5). pp. 537-547.
- 2.Nencki M., Pawlow J.P., Zaleski J. Ueber den Ammoniakgehalt des Blutes und der Organe. Die Harnstoffbildung bei den Säugetieren.// Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1896. vol.37. pp.26-51.1896.
3. Eck N.V. К вопросу о превращении воротной вены. Предварительное сообщение. // Воен. Мед. Ж (Rus). 1877. vol.130. № 2. .p1.
4. McDermott W.V. Jr. The role of ammonia intoxication in hepatic coma.// Bull. N. Y. Acad. Med. 1958. vol. 34(6). pp.357-65.
5. Sherlock S. Hepatic coma. //Gastroenterology. Official publication of the American Gastroenterological Association. 1961. vol.07. pp. 1–8.
6. Rose C.F. Ammonia-lowering strategies for the treatment of hepatic encephalopathy.// Clin Pharmacol Ther. 2012. vol.92. pp.321–31.

7. Kircheis G., Wettstein M., Dahl S.V., Haussinger D. Clinical efficacy of L-ornithine-L-aspartate in the management of hepatic encephalopathy. [Review].// *Metab. Brain Dis.* 2002 vol.17. pp. 453–62.
8. Acharya S.K., Bhatia V., Sreenivas V. et al. Efficacy of L-ornithine L-aspartate in acute liver failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled study.//*Gastroenterology.* 2009 vol.136(7). pp.2159-68.
9. Jalan R., Jalan K. N. Compositions Comprising Ornithine And Phenylacetate Or Phenylbutyrate For Treating Hepatic Encephalopathy.// Patent: US 20080119554 A1. 2008.
10. [Braissant O](#), [McLin V.A.](#), [Cudalbu C.](#) Ammonia toxicity to the brain. //*J Inherit Metab Dis.* 2013. vol.36. pp. 595–612.
11. [O'Connor J.E.](#), [Costell M.](#), [Grisolia S.](#) Protective effect of L-carnitine on hyperammonemia.// [FEBS Lett.](#) 1984. vol.166(2). pp. 331-4.
12. Coude F.X., Sweetman L., Nyhan W.L. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia.// *J Clin. Invest.* 1979. vol. 64(6). pp.1544-51.
13. Hindfelt B., Siesjö B.K. [Cerebral effects of acute ammonia intoxication. II. The effect upon energy metabolism.](#) //*Scand J Clin Lab Invest.* 1971. vol. 28(3). pp.365-74.
14. Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E. et al. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. //*J Neurochem.* 1994. vol. 63(6). pp. 2172-8.
15. Häussinger D., Görg B. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. //*Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2010. vol.13. pp.87– 92.
16. [Montoliu C.](#), [Llansola M.](#), [Monfort P.](#) et al. Role of nitric oxide and cyclic GMP in glutamate-induced neuronal death. //[Neurotox Res.](#) 2001 . vol.3(2). pp.179-88.
17. [Brusilow S.W.](#), [Koehler R.C.](#), [Traystman R.J.](#), [Cooper A.J.](#) Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy.// *Neurotherapeutics.* 2010. vol.7. pp.452–70.
18. [Shawcross DL](#), [Davies NA](#), [Williams R](#), [Jalan R.](#) Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis.// [J Hepatol.](#) 2004. vol.40(2). pp.247-54.

19. Lux HD. Ammonium and chloride extrusion: hyperpolarizing synaptic inhibition in spinal motoneurons. //Science. 1971. vol.73. pp. 555–7.
20. Raabe W, Gumnit RJ. Disinhibition in cat motor cortex by ammonia. // J Neurophysiol. 1975. vol.38. pp. 347–55.
21. Rangroo Thrane V, Thrane AS, Wang F, Cotrina ML, Smith NA, Chen M, et al. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering.// Nat Med. 2013. vol.19. pp.1643–8.
22. 6. Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.I, Zinchenko V.P. To break or to brake neuronal network accelerated by ammonium ions? //PLoS ONE, 2015, vol. 28, N10(7), pp. 1-30. e0134145, DOI: 10.1371/journal.pone.0134145. PMID:26217943
23. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Dolgacheva L.P, et al. Acetylcholine promotes Ca²⁺ and NO-oscillations in adipocytes implicating Ca²⁺→NO→cGMP→cADP-ribose→Ca²⁺ positive feedback loop--modulatory effects of norepinephrine and atrial natriuretic peptide. // PLoS One. 2013. vol.8(5). pp. 1-18.e63483. doi: 10.1371/journal.pone.0063483. PMID: 23696827
24. Kloiber O., Banjac B., Drewes L.R. Protection against acute hyperammonemia: the role of quaternary amines.// Toxicology. 1988. vol.49(1). pp.83-90.
25. Malaguarnera M., Pistone G., Astuto M. et al. L-Carnitine in the treatment of mild or moderate hepatic encephalopathy. //Dig Dis. 2003 . vol.21(3). pp.271-5.
26. Бабак О.Я., Фролов В.М., Харченко Н.В. «ГЛУТАРГИН-фармакологическое действие и клиническое применение». Харьков. Изд.«Элтон-2». 2005.455 с.
27. Богомолов П.О., Мациевич М.В., Уварова О.В. и др. Исследования на эффективность и безопасность использования многокомпонентного состава «Хелпер-1» у пациентов с печеночной энцефалопатией на фоне цирроза печени вирусной этиологии. // Сб. статей «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Отв. Ред. Зинченко В.П. и Бережнов А.В. Москва. Изд. ООО «ИДВ. Ема». 2013. т.2. стр.417-421.
28. Grishina E.V., Galimova M.H., Djafarov R.H. et al. Induction of cyclosporine-sensitive mitochondrial permeability transition pore by substrates forming acetyl-CoA under normal conditions and in type 2 diabetes. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.2016. vol 10(1). pp.11-18.