

## **ЭНДОГЕННЫЕ БЕНЗОДИАЗЕПИНЫ У БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ**

*Белорусский государственный медицинский университет  
Международный Институт биоорганической химии Национальной академии  
наук  
Республики Беларусь государственный экологический университет им. А.Д.  
Сахарова*

Эндогенные бензодиазепины исследованы в плазме крови 35 больных циррозом печени методами спектрофотометрии и высоко эффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Бензодиазепины были обнаружены у 29 обследованных. Уровень бензодиазепинов коррелировал со степенью портосистемной энцефалопатии ( $r_s=0,753$ ,  $P<0,001$ ). Корреляция содержания бензодиазепинов и аммиака отсутствовала.

**Ключевые слова:** цирроз печени; портосистемная энцефалопатия; эндогенные бензодиазепины.

Presence of endogenous benzodiazepines was studied in 35 cirrhotic patients by spectrophotometry and high resolution liquid chromatography. Benzodiazepines were found in 29 examined patients. The level of benzodiazepines correlated to the rate of portosystemic encephalopathy ( $r_s=0,753$ ,  $P<0,001$ ). Correlation of benzodiazepines to ammonia level was not revealed. Key words: hepatic cirrhosis; portal-systemic encephalopathy; endogenous benzodiazepines

Портосистемная энцефалопатия (ПСЭ) – большое специфическое осложнение с плохим прогнозом и основной причиной смерти больных циррозом печени. В качестве одной из главных гипотез механизмов ПСЭ рассматривается роль эндогенных бензодиазепинов [9]. Цель работы – исследование присутствия эндогенных бензодиазепинов и их взаимосвязи с ПСЭ у больных циррозом печени.

### Материал и методы

Обследовано 35 больных циррозом печени. Контрольную группу составили 30 доноров, группу сравнения – 10 больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, 5 из которых в течение не менее 5 дней принимали препарат бензодиазепинов диазепам (диазепекс, Teva Pharmaceutical Industries) (5 человек). В качестве стандартов использовались коммерческие препараты диазепам (диазепекс, Teva Pharmaceutical Industries) и мидазолам (дормикум, F.Hoffmann-La Roche). Тяжесть цирроза оценивалась с помощью общепринятой шкалы тяжести по Child-Pugh. ПСЭ диагностировалась и была градирована на основании критериев West Haven [1]. Аммиак определялся в венозной крови ферментативным методом. Анализ содержания бензодиазепинов в плазме больных циррозом печени осуществлялся спектрофотометрически и хроматографически (высокоэффективная жидкостная хроматография – HPLC). Хлороформенные вытяжки бензодиазепинов в 96-градусном этиловом спирте исследовались на спектрофотометре Specord M400 (Germany) на длине волн в диапазоне  $\lambda = 200 - 500$  нм. Хроматографический анализ осуществлялся на высокоэффективных жидкостных хроматографах Waters (USA) и Shimadzu LC 10 (Japan).

Хроматографическое разделение проводилось на обращенно-фазной колонке Nucleosil 10 C18 со скоростью тока подвижной фазы, равной 1,0 мл/мин. Подвижная фаза содержала 60% 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 2,5 и 40% ацетонитрила. Регистрация пиков осуществлялась при 254 нм. Расчет концентраций анализируемых соединений проводился с помощью программного обеспечения LC Software Shimadzu. Содержание бензодиазепинов пересчитывалось на эквивалент диазепама (ЭД). Циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ) в плазме крови определялись радиоиммунологическим методом (тест-системы РИА 125I-цАМФ и РИА 125I-цГМФ, разработанные и произведенные Институтом биоорганической химии Национальной академии наук Республики Беларусь). Статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 5 на основании непараметрических критериев – множественного сравнения Крускала-Уоллиса (H), коэффициента ранговой корреляции Спирмена (rs).

#### Результаты

Исследования выполнены у 35 больных циррозом печени (21 мужчина и 14 женщин, средний возраст которых  $51,21 \pm 18,45$  лет). Класс тяжести у 6 определялся как А, 14 – В, 15 – С. 6 больных не имели признаков ПСЭ, у остальных 29 отмечалась ПСЭ различной степени тяжести: 6 – латентная, 11 – I, 8 – II, 4-х – III ст. При спектрофотометрическом исследовании препарата диазепама стабильно определялся пик поглощения на длине волны 208,85 – 222,30 нм, при исследовании мидазолама – на длине волны 220,00 нм (рис. 1).

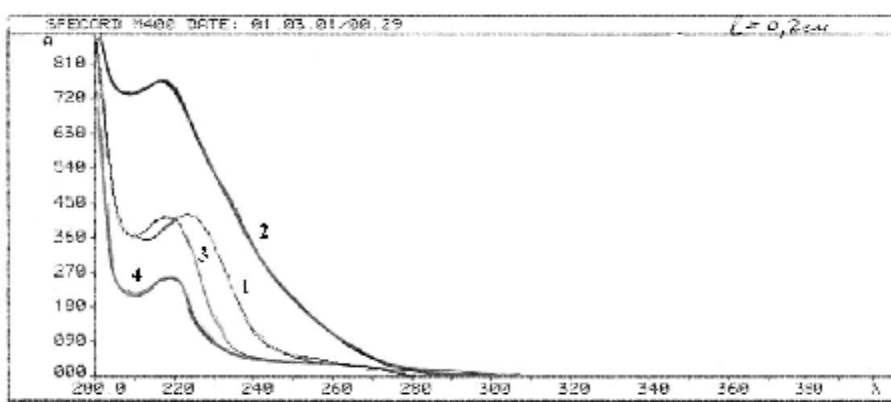


Рис. 1. Спектры поглощения коммерческих препаратов бензодиазепинов (1 - диазепам, 2 - мидазолам), сыворотки крови больного без признаков заболевания печени, получавшего диазепам (3), больного циррозом печени с признаками присутствия бензодиазепинов (4) и больного циррозом печени без признаков присутствия бензодиазепинов (5)

У лиц контрольной группы, получавших коммерческий препарат диазепам, определялся один пик поглощения в диапазоне 221,45 – 223,95 нм; ни у одного из больных, не принимавших бензодиазепины, таких изменений выявлено не было. Из 35 больных циррозом у 19 обнаружены пики поглощения на длине волны 208,00 – 224,45 нм, из них 17 имели ПСЭ I или II ст., 1 – III ст. Таким образом, с помощью спектроскопии были получены предварительные данные, указывающие на возможное наличие эндогенных бензодиазепинов в сыворотке крови больных циррозом печени.

При хроматографии раствора диазепама с помощью системы Waters выявлялось 5 пиков с временами удерживания 0,220, 2,536, 3,080, 4,111 и 7,127 мин. (рис. 2).

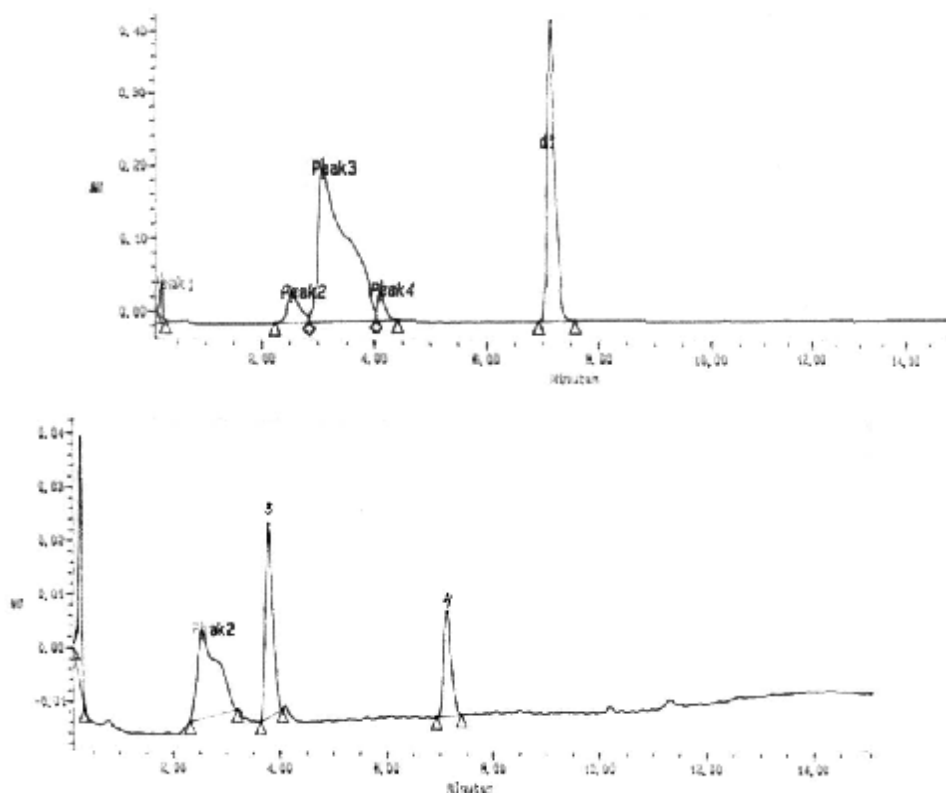


Рис. 2. Хроматограммы коммерческого препарата бензодиазепинов (диазепам) (а) и сыворотки крови больного циррозом печени с портосистемной энцефалопатией (б)

Два основных пика имели длину волны 222,8 и 228,6 нм. В сыворотке крови лиц контрольной группы, не принимавших препараты бензодиазепинов, признаков их присутствия в крови не было. В сыворотке крови лиц контрольной группы, принимавших диазепам, определялось 4 пика с временами удерживания 0,253, 2,533, 3,796 и 7,121 мин. Из 35 обследованных больных циррозом печени бензодиазепины обнаружены у 29: определялось от 3 до 5 пиков – один из них основной (площадью 59-60%) в диапазоне длины волн 222,8 – 267,4 нм (рис. 2). У 21 больного циррозом исследованы количественные характеристики обнаруженных бензодиазепинов (табл.).

Концентрация эндогенных бензодиазепинов в плазме крови больных циррозом Таблица

№№	Степень ПСЭ	Концентрация бензодиазепинов (ЭД), пмоль/мл	цАМФ, пмоль/мл	цГМФ, пмоль/мл	Аминок, моль/л
1	I	1,26	16,05	5,64	320
2	III	2,79	9,12	3,90	178
3	II	3,08	19,52	6,06	125
4	I	2,21	24,60	4,24	45
5	I	0,97	13,40	7,07	74
6	0	2,23	12,36	0,94	23
7	III	3,05	19,36	5,72	160
8	II	9,22	16,24	4,40	45
9	I	2,94	2,60	0,72	282
10	лПСЭ	2,08	14,84	1,91	180
11	лПСЭ	0	9,56	1,95	36
12	0	2,30	7,80	2,58	112
13	II	3,28	2,08	10,50	341
14	I	2,35	3,36	11,40	210
15	0	0	3,76	9,06	56
16	II	3,12	9,10	3,11	210
17	II	4,20	11,20	2,91	65
18	I	2,89	13,32	5,64	101
19	лПСЭ	2,22	2,16	7,56	193
20	лПСЭ	0	2,60	0,72	56
21	III	4,69	9,12	3,90	160

Сравнение концентрации бензодиазепинов в группах с различной степенью ПСЭ с помощью критерия Крускала-Уоллиса выявило достоверные различия ( $N = 8,716, P = 0,043$ ). Корреляционный анализ показал высокую степень сопряженности концентрации бензодиазепинов и степени ПСЭ ( $r_s = 0,756, P < 0,001$ ).

Корреляционный анализ между уровнем бензодиазепинов и аммиака не выявил взаимосвязи между ними ( $r_s = 0,259, P = 0,256$ ). Не установлено достоверной взаимосвязи и между классом тяжести цирроза и уровнем бензодиазепинов ( $r_s = 0,338, P = 0,113$ ).

Содержание циклических нуклеотидов в плазме крови у больных циррозом отличался от такового доноров. Так, уровень цАМФ ( $X + s$ ) у больных составил  $10,96 + 6,40$  пмоль/л (у доноров  $17,50 + 2,70, P < 0,001$ ), цГМФ –  $4,93 + 4,72$  пмоль/л (у доноров  $2,25 + 0,47, P = 0,003$ ). Корреляционный анализ не обнаружил взаимосвязи бензодиазепинов с циклическими нуклеотидами – ни цАМФ ( $r_s = 0,086, P = 0,707$ ), ни цГМФ ( $r_s = 0,086, P = 0,899$ ).

#### Обсуждение

Относительно содержания и роли эндогенных бензодиазепинов при ПСЭ в эксперименте и клинике получены противоречивые данные. Так, с помощью HPLC и масс-спектропии выделено и идентифицировано от 4 до 12 фракций эндогенных бензодиазепинов (от 1 до 4 у каждого из пациентов, и их количество зависело от степени ПСЭ) [8, 9]. Вместе с тем в других исследованиях не получило подтверждение наличие повышенной концентрации в крови эндогенных бензодиазепинов при ПСЭ и специфических мест их связывания в головном мозге [6], показано увеличенное содержание эндогенных бензодиазепинов в крови и нормальное в спинномозговой жидкости и сделан вывод, что эндогенные бензодиазепины не играют существенной роли в патогенезе ПСЭ [7]. Высказано предположение, что эндогенные бензодиазепины, возможно, играют роль в патогенезе ПСЭ, но не полностью объясняют нейропсихические симптомы. Venturini I. и соавт. [3] показали, что уровень эндогенных бензодиазепинов в крови достоверно выше при ПСЭ III-IV ст. по сравнению с ПСЭ 0 (между ПСЭ III-IV и I-II ст. достоверных различий не было), корреляция между уровнем аммиака и бензодиазепинов отсутствовала. При этом авторы установили, что концентрация бензодиазепинов была выше у больных циррозом печени класса C, и эти агенты коррелировали со степенью печеночной дисфункции, но не ПСЭ. Авторы сделали вывод, что аммиак и эндогенные бензодиазепины не коррелируют со степенью ПСЭ. По нашим данным, у большинства больных циррозом с ПСЭ присутствовали эндогенные бензодиазепины, и их концентрация тесно коррелировала со степенью ПСЭ.

Литературные данные относительно взаимосвязи бензодиазепинов и циклических нуклеотидов немногочисленны и касаются преимущественно экспериментального изучения взаимного влияния экзогенных бензодиазепинов (и антагонистов бензодиазепиновых рецепторов) и циклических нуклеотидов и связанной с этим трансформацией регуляции функции нейронов и астроцитов ЦНС. В частности установлено, что мидазолам ингибирует в головном мозге образование цГМФ, что может иметь значение при взаимодействии моноаминов с рецепторами, а повышение уровня цГМФ, индуцированное различными стимулами, способно менять функции бензодиазепиновых рецепторов астроцитов [10]. Существуют доказательства взаимосвязи гипераммониемии и активизации гуанилатциклазной системы ЦНС, а также лимфоцитов периферической крови. Известно, что хроническая

гипераммониемия повреждает глутамат-НО-цГМФ-путь в ЦНС [4]. Показано, что гипераммониемия влияет на растворимую гуанилатциклазу: это рассматривается в качестве периферического маркера нарушения нейронального глутамат-НО-цГМФ-пути в головном мозге [2, 4]. Результатом этого может быть повреждение межклеточных взаимодействий в ЦНС, а клиническим проявлением – нарушения ритма сна и бодрствования, навыков, памяти. По нашим данным, циклические нуклеотиды не коррелировали с уровнем аммиака, однако колебания его концентрации с возможным эпизодическим повышением не позволяют исключить такие взаимодействия.

Таким образом, полученные нами данные с учетом литературных позволяют предположить роль эндогенных бензодиазепинов в генезе ПСЭ, а отсутствие корреляции их с уровнем аммиака расценивать их как независимый фактор ПСЭ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Конн Г.О., Либертал М.М. Синдромы печеночной комы и лактулоза: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1983. – 516 с.
2. Altered content and modulation of soluble guanylat cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis / P. Monfort, R. Corbalan, L. Martinez et al // *Neuroscience*. – 2001. – Vol. 104. – P. 1119-1125.
3. Ammonia and endogenous benzodiazepine-like compounds in the pathogenesis of hepatic encephalopathy / I. Venturini, L. Corsi, R. Avallone et al // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 36. – P. 423-425.
4. Chronic hyperammonemia in rats impairs activation of soluble guanylate cyclase in neurons and in lymphocytes: a putative peripheral marker for neurological alterations / M.D. Minana, R. Corbalan, C. Montoliu et al // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 257. – P. 405-409.
5. Endogenous benzodiazepine-like compounds and diazepam binding inhibitor in serum of patients with liver cirrhosis with and without overt encephalopathy / R. Avallone, M.L. Zeneroli, I. Venturini et al // *Gut*. – 1998. – Vol. 42. – P. 861-867.
6. Kretz F.J., Loscher W., Dillinger U. Der Serumspiegel der Gamma-Aminobuttersaure bei Patienten mit Leberzirrhose und portocavaler Anastomose // *Anaesthesiol. Reanim.* – 1991. – Vol. 16. – P. 169-174.
7. Plasma and CSF benzodiazepine receptor ligand concentrations in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy: relationship to severity of encaphalopathy and pharmaceutical benzodiazepine intake / P. Perney, R.F. Butterworth, D.D. Mousseau et al // *Metab. Brain Dis.* – 1998. – Vol. 13. – P. 201-210.
8. Relationship between plasma benzodiazepine receptor ligand concentrations and severity of hepatic encephalopathy / A.S. Basile, P.M. Harrison, R.D. Hughes et al // *Hepatology*. – 1994. – Vol. 19. – P. 112-121.
9. Schafer D.F., Jones E.A. Hepatic encephalopathy and the gamma-amino-butyric acid neurotransmitter system // *Lancet*. – 1982. – Vol. ii. – P.18-20.
10. Supression of cyclic guanosine monophosphate formation in rat cerebeller slices by propofol, ketamine and midazolam / I. Miyawaki, K. Nakamura, B. Yokubol et al // *Can. J. Anaesth.* - 1997. – Vol. 44. – P. 1301-1307.