

# ФАРМАКОЛОГИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

## ВЛИЯНИЕ 1-МЕТИЛНИКОТИНАМИДА НА ПАРАМЕТРЫ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА У КРЫС ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

М. Н. Ходосовский<sup>1</sup>, В. В. Зинчук<sup>1</sup>, С. Хлопицкий<sup>2</sup>

Исследовали влияние 1-метилникотинамида на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс при ишемии-реперфузии печени. В крови и гомогенате печени измеряли содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, основания Шиффа), факторов антиоксидантной системы ( $\alpha$ -токоферол, активность каталазы), в плазме крови оценивали активность аланин-, аспаргатамино-трансфераз. Установлено, что инфузия 1-метилникотинамида перед началом ишемии-реперфузии приводит к значительному снижению активности процессов перекисного окисления липидов, улучшению показателей антиоксидантной системы, а также к уменьшению активности трансаминаз крови в конце реперфузионного периода. Таким образом, 1-метилникотинамид оказывает протекторное влияние на печень при ишемии-реперфузии у крыс.

**Ключевые слова:** 1-метилникотинамид, перекисное окисление липидов,  $\alpha$ -токоферол, реперфузия, печень, крысы

### ВВЕДЕНИЕ

Постишемические повреждения печени часто встречаются в клинике при резекциях, трансплантации органа, а также при геморрагическом шоке с последующим возмещением кровопотери [2, 7, 11]. Патогенетическими звеньями данных повреждений являются окислительный стресс, воспалительная реакция с иммиграцией лейкоцитов в паренхиму органа, нарушения микроциркуляции, что суммарно приводит к гибели гепатоцитов от некроза или апоптоза [2, 12, 13]. Установлено, что активация свободнорадикальных процессов, таких как перекисное окисление липидов (ПОЛ), и истощение факторов антиоксидантной защиты способствуют повреждению гепатоцитов в постишемическом периоде [2, 12].

1-Метилникотинамид является одним из главных метаболитов никотинамида в печени. До недавнего времени данное вещество считалось биологически неактивным. Однако в работе [10] показано, что соединение обладает противовоспалительными свойствами при дерматологических заболеваниях. Поскольку воспаление является неотъемлемым компонентом постишемических расстройств, исследовали эффект 1-метилникотинамида на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и тяжесть повреждений печени в постишемическом периоде.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на взрослых крысах-самцах Вистар массой 360 – 440 г, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Под комбинированным наркозом (тиопентал-натрий, 30 мг/кг, калипсол, 100 мг/кг) ишемии печени вызывали наложением сосудистого зажима на *a. hepatica* и *v. portae* (маневр Прингла) в течение 30 мин. После снятия зажима реперфузионный период длился 120 мин. Силиконовый катетер вводили в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Забор образцов крови для оценки продуктов ПОЛ и факторов антиоксидантной системы осуществляли до ишемии, в ее конце и через 120 мин после прекращения ишемии. Ткани печени для оценки показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния брали в конце реперфузии. В качестве контроля использовали образцы печени, взятые у животных до ишемии ( $n = 6$ ). Степень повреждения печени оценивали по активности в плазме крови аланин- и аспаргатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ соответственно) по С. А. Burtis и соавт. (1999), используя стандартный набор реактивов фирмы “Cormay” (Польша) [6]. Все опыты проведены в соответствии с этическими стандартами по проведению исследований на экспериментальных животных Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 2 группы: в 1-й — моделировали ишемию-реперфузию печени ( $n = 8$ ), во 2-й — за 10 мин до ишемии-реперфузии печени интраперитонеально вводили 1-метилникотинамид хлорид в дозе 100 мг/кг ( $n = 8$ ). 1-Метилникотинамида хлорид был синтезирован Дж. Генбицким из Института прикладной радиационной химии при Техническом университете г.

<sup>1</sup> Кафедра патологической физиологии (зав. – Н. Е. Максимович) Гродненского медицинского университета, Беларусь, Гродно, 230015, ул. Горького, 80.  
E-mail: hodosowsky@grsmu.by

<sup>2</sup> Отдел экспериментальной фармакологии Медицинского колледжа при Ягелонском университете г. Кракова (ul. Grzegorzeczka 16, 31 – 531 Krakow, Poland).

Лодзи (Польша) и предоставлен для данного исследования.

Изучали следующие показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния: диеновые конъюгаты (ДК), основания Шиффа (ОШ),  $\alpha$ -токоферол, ретинол, активность каталазы. Содержание ДК в биологическом материале определяли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм, типичной для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [1]. Уровень ОШ определяли по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 и 440 нм соответственно, [9] на спектрофлюориметре F-4010 фирмы "Hitachi". Содержание  $\alpha$ -токоферола и ретинола изучали методом флюориметрического определения по интенсивности флюоресценции гексанового экстракта [4] на спектрофлюориметре F-4010. В качестве стандарта использовали  $\alpha$ -токоферол и ретинол фирмы "Sigma". Каталазную активность в биологическом материале оценивали спектрофотометрическим методом, основанном на способности перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс, на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО [5]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента или U-теста, в зависимости от нормальности распределения выборки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что у животных 1-й группы на 120-й минуте реперфузии в смешанной венозной крови увеличивалось содержание продуктов ПОЛ (см. таблицу). Так, уровень ДК в плазме крови повысился по отношению к исходному на 264,4 % ( $p < 0,05$ ), а флюоресценция продуктов со свойствами ОШ возросла на 633,3 % ( $p < 0,05$ ). Те же параметры ПОЛ были исследованы в образцах печени, где их содержание к концу реперфузионного периода также возрастало. Одновременно выявлено, что на протяжении ишемии-реперфузии печени в крови и тканях печени крыс снижалось содержание ряда антиокси-

дантов. Так, уровень  $\alpha$ -токоферола в плазме смешанной венозной крови к концу реперфузионного периода понизился на 19 % ( $p < 0,05$ ), а ретинола — на 35,8 % ( $p < 0,05$ ). Активность каталазы эритроцитов и гомогената печени в конце реперфузии по отношению к исходным уровням падала на 45,8 % ( $p < 0,05$ ) и 42,7 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Содержание  $\alpha$ -токоферола и ретинола в тканях печени на 120-й минуте реперфузии также понижалось. Данные результаты указывают на интенсификацию процессов ПОЛ и на истощение механизмов антиоксидантной защиты у экспериментальных животных при ишемии-реперфузии печени, что может способствовать развитию постшемических повреждений органа. Действительно, активность АлАТ и АсАТ в плазме крови на 120-й минуте реперфузии возрастала по отношению к исходной в 8,5 ( $p < 0,001$ ) и в 8,3 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно, указывая на развитие тяжелых повреждений печени в конце постшемического периода у животных 1-й группы (см. таблицу).

Вместе с тем у крыс, которым назначали 1-метилникотинамид, наблюдались менее выраженные изменения активности процессов ПОЛ по отношению к животным, которые 1-метилникотинамид не получали (таблица). Так на 120-й минуте реперфузии в смешанной венозной крови содержание ДК повысилось по отношению к исходному только на 51,4 % ( $p < 0,05$ ), а флюоресценция продуктов со свойствами ОШ возросла на 130,3 % ( $p < 0,05$ ). Те же параметры ПОЛ были исследованы в образцах печени, где их содержание к концу реперфузионного периода также возрастало, однако оставалось ниже, чем у животных, которым не вводили перед ишемией-реперфузией 1-метилникотинамид. Выявлено также, что у крыс, которым вводили 1-метилникотинамид, на протяжении ишемии-реперфузии печени содержание ряда антиоксидантов в крови снижалось в меньшей степени, чем у животных без 1-метилникотинамида. Так, уровень  $\alpha$ -токоферола в плазме смешанной венозной крови к концу реперфузионного периода понизился на 11,3 % ( $p < 0,05$ ), а ретинола — на 20,7 % ( $p < 0,05$ ). Активность каталазы

### Влияние 1-метилникотинамида на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и активность трансаминаз крови при ишемии-реперфузии печени у крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа, $n = 8$ )			Ишемия-реперфузия + 1-метилникотинамид (2-я группа, $n = 8$ )		
	Исходный уровень	30 мин ишемии	120 мин реперфузии	Исходный уровень	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
Диеновые конъюгаты <sub>пл</sub> , $\Delta E_{233}/мл$	1,03 ± 0,06	1,8 ± 0,2*	3,76 ± 0,55*	1,0 ± 0,07	1,67 ± 0,14*	1,51 ± 0,09*#
Основания Шиффа <sub>пл</sub> , ЕД/мл	22,58 ± 3,2	58,42 ± 6,91*	165,56 ± 20,28*	20,04 ± 2,78	42,34 ± 5,24 *	46,15 ± 7,92*#
$\alpha$ -Токоферол <sub>пл</sub> , мкмоль/л	21,09 ± 0,33	19,93 ± 0,27*	17,09 ± 0,35*	21,12 ± 0,28	20,36 ± 0,27	18,73 ± 0,22*#
Ретинол <sub>пл</sub> , мкмоль/л	2,77 ± 0,12	2,64 ± 0,1	1,78 ± 0,04*	2,61 ± 0,14	2,35 ± 0,1	2,07 ± 0,07*#
Каталаза <sub>р</sub> , ммоль/л · гНв · сек	0,9 ± 0,09	2,22 ± 0,24*	0,49 ± 0,01*	0,98 ± 0,08	2,35 ± 0,16*	1,61 ± 0,15*#
АлАТ, ЕД/л	51,6 ± 8,0	-	437,2 ± 38,2*	48,4 ± 8,0	-	220,3 ± 40,9*#
АсАТ, ЕД/л	58,5 ± 7,4	-	484,8 ± 20,6*	61,0 ± 3,7	-	266,0 ± 28,7*#

**Примечание.** \* — Значимое отличие по отношению к исходному уровню в данной группе ( $p < 0,05$ ), # — значимое отличие по отношению к 1-й группе в соответствующий период ( $p < 0,05$ ).

эритроцитов в конце реперфузии по-отношению к исходным уровням, в отличие от животных без метилникотинамида, повышалась на 65 % ( $p < 0,05$ ). Содержание  $\alpha$ -токоферола и ретинола в тканях печени на 120-й минуте реперфузии было выше, чем у животных, которым 1-метилникотинамид не вводили. Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови на 120-й минуте реперфузии возросла по отношению к исходной в 4,6 ( $p < 0,01$ ) и в 4,4 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно, что было достоверно ниже, чем у животных 1-й группы (см. таблицу).

В целом, полученные данные свидетельствуют, что у крыс при ишемии-реперфузии печени наблюдаются тяжелые нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса, которые способствуют развитию постишемических поражений органа (судя по показателям активности АлАТ и АсАТ в крови в конце реперфузии). У крыс, получавших 1-метилникотинамид, при ишемии-реперфузии печени наблюдается улучшение параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса и биохимических маркеров повреждения печени по сравнению с животными, которые препарат не получали. Данный эффект на прооксидантно-антиоксидантное состояние у препарата был менее выражен, чем у L-агринина при ишемии-реперфузии печени [3], однако значительно выше, чем у никотинамида в наших экспериментах (данные не опубликованы). Возможно, 1-метилникотинамид способствовал активации синтеза простаглицина, который, обладая значительными вазодилаторными свойствами, оказывал положительное влияние на процессы микроциркуляции в постишемическом периоде [8]. Нельзя исключить, что 1-метилникотинамид мог стимулировать выработку окиси азота в печени, что может существенно улучшить состояние органа в постишемическом периоде [3]. Таким образом, 1-метилникотинамид уменьшает тяжесть постишемических повреждений печени. Механизм положительного влияния 1-метилникотинамида на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени нуждается в дальнейшем исследовании.

## ВЫВОДЫ

1. Моделирование ишемии-реперфузии печени у крыс приводит к активации процессов перекисного окисления липидов, истощению факторов антиоксидантной защиты,

повышению активности трансаминаз крови, что указывает на развитие тяжелых реперфузионных повреждений органа.

2. 1-Метилникотинамид улучшает некоторые показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния, а также снижает активность трансаминаз крови в реперфузионном периоде, что указывает на протективный эффект данного соединения при ишемии-реперфузии печени.

Работа выполнена благодаря поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор № Б07М-232).

Выражаем благодарность проф. Дж. Генбицкому из Института прикладной радиационной химии при Техническом университете г. Лодзь (Польша) за синтезированный им и предоставленный для наших исследований 1-метилникотинамид.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара, *Лаб. дело*, № 2, 60 – 64 (1988).
2. В. В. Зинчук, М. Н. Ходосовский, *Усп. физиол. наук*, № 4, 45 – 56 (2006).
3. М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук, *Экспер. и клин. фармакол.*, 69(3), 40 – 42 (2006).
4. Р. Ч. Черняускене, З. З. Варшкявичене, П. С. Грибаускас, *Лаб. дело*, № 6, 362 – 365 (1984).
5. O. I. Aruoma and S. L. Cuppett, *Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro Concepts*, AOCSPress (1997).
6. C. A. Burtis and E. R. Ashwood, *ed Tietz Textbook of Clinical chemistry*, 3<sup>rd</sup> edition, Philadelphia (1999).
7. H. Cerwenka, G. Khoschorur, H. Bacher, et al., *Free Radic. Res.*, 30(6), 463 – 469 (1999).
8. S. Chlopicki, J. Swies, A. Mogielnicki, et al., *Br. J. Pharmacol.*, 152(2), 230 – 239 (2007).
9. B. L. Fletcher, C. J. Dillard, and A. L. Tappel, *Analyt. Biochem.*, 52(1), 1 – 19 (1973).
10. J. Gebicki, A. Sysa-Jedrzejowska, J. Adamus, et al., *Pol. J. Pharmacol.*, 55(1), 109 – 112 (2003).
11. G. K. Glantzounis, H. J. Salacinski, W. Yang, et al., *Liver Transpl.*, 11(9), 1031 – 1047 (2005).
12. H. Jaeschke and J. J. Lemasters, *Gastroenterology*, 125(4), 1246 – 1257 (2003).
13. D. Uhlmann, S. Uhlmann, and H. U. Spiegel, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 36(5), S212 – S214 (2000).

Поступила 25.09.09

## EFFECT OF 1-METHYLNICOTINAMIDE ON PROOXIDANT – ANTIOXIDANT BALANCE PARAMETERS IN RATS DURING HEPATIC ISCHEMIA – REPERFUSION

M. N. Khodosovskii<sup>1</sup>, V. V. Zinchuk<sup>1</sup>, and S. Chlopicki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, Grodno, 230015, Belarus;

<sup>2</sup> Jagellon University of Cracow, ul. Grzegorzeczka 16, 31531, Krakow, Poland

\* e-mail: hodossowsky@grsmu.by

We have studied the effect of 1-methylnicotinamide (MNA) on prooxidant – antioxidant balance parameters by measuring the concentrations of lipid peroxidation products (conjugated dienes (CD) and Schiff bases (SB)) and antioxidant system factors ( $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -T), retinol (Ret) in the blood and liver homogenates and by evaluating the activity of catalase (Cat) and alanine and aspartate aminotransferases in the blood plasma in the course of hepatic ischemia – reperfusion in a group of 16 adult male Wistar rats (weighing 360 – 440 g). The animals were divided into two groups: (1) hepatic ischemia (30 min, m. Pringle) and reperfusion (120 min) (HIR,  $n = 8$ ); (2) HIR with MNA (100 mg/kg, i.p. 10 min before HIR,  $n = 8$ ). In the first group, the plasma level of CD raised to 264.4% ( $p < 0,05$ ), SB to 633.3% ( $p < 0,05$ ), the concentration of  $\alpha$ -T decreased by 19% ( $p < 0,05$ ), that of Ret by 35.8 % ( $p < 0,05$ ), and Cat by 45.8 % ( $p < 0,05$ ) at the end of reperfusion as compared to control values before ischemia. In the second group, at the end of reperfusion the level of CD increased only to 51.4% ( $p < 0,05$ ), SB to 130.3% ( $p < 0,05$ ), Cat to 65% ( $p < 0,05$ ), and the concentration of  $\alpha$ -T in the plasma decreased only to 11% ( $p < 0,05$ ), and Ret to 20.7% ( $p < 0,05$ ). It is concluded that MNA significantly improves the prooxidant – antioxidant balance parameters during hepatic ischemia – reperfusion in rats.

**Key words:** 1-Methylnicotinamide, lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, reperfusion, liver, rats