

УДК 616.36–002.7:578.891:611.36–018

ВЛИЯНИЕ РАЗДЕЛЬНОГО И КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ НИКОТИНАМИДА, МЕТИОНИНА И α -ТОКОФЕРОЛА НА АКТИВНОСТЬ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ, ГЛЮКУРО-, ГЛУТАТИОНКОНЪЮГИРУЮЩЕЙ СИСТЕМ ПЕЧЕНИ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ГЕПАТОЗОГЕПАТИТЕ У КРЫС

М.И. Бушма (профессор, д.м.н.), Л.Б. Заводник (доц., к.м.н.), Л.Ф.

Легонькова (к.б.н.), И.В. Зверинский (к.б.н.)

Гродненский государственный медицинский университет

Институт биохимии НАНБ, г. Гродно

Через 4 дня после однократного внутрижелудочного введения крысам CCl_4 (2,5 мл/кг в виде 50% масляного раствора) регистрируется увеличение интенсивности «быстрой вспышки» хемилуминесценции в микросомах печени и сыворотке крови, явления цитолиза гепатоцитов (увеличение активности АЛАТ в сыворотке крови), снижение скорости элиминации антипирина из крови. В микросомальной фракции печени при этом снижается содержание цитохромов P-450 и b_5 , активность NADH-цитохром b_5 -редуктазы и цитозольной глутатионтрансферазы. Введение крысам метионина (200 мг/кг), его комбинации с никотинамидом (60 мг/кг), без и, особенно, с дополнительным назначением витамина E (150 мг/кг) оказывало выраженное антиоксидантное и ферментномализирующее действие.

Ключевые слова: CCl_4 -гепатит, перекисное окисление липидов, микросомы, метионин, витамины E и PP.

Four days following the single intragastric administration of CCl_4 to rats (2,5 ml/kg as a 50% oil solution) increased intensity of the hemiluminescence «fast» in liver microsomes and blood serum as well as hepatocyte cytolysis (elevated ALAT activity) and decrease of rate of antipyrine elimination from blood were recorded. The liver microsomal fraction demonstrated decreased cytochrome P-450 and b_5 concentrations, and NADH-cytochrome b_5 reductase cytosolic glutathione transferase activities. The administration of methionine (200 mg/kg), its combination with nicotinamide (60 mg/kg) and vitamin E (150 mg/kg) exerted marked antioxidant and enzyme-normalising effects.

Key words: tetrachlorometane, lipid peroxide oxidation, microsomes, methionine, nicotinamide, vitamin E.

Введение. Четыреххлористый углерод, как представитель малых молекул, окисляется цитохромом P-450 ПЕ1 (преимущественно в печени) с образованием реакционноспособных соединений, инициирующих реакции перекисного окисления липидов [11]. Следствием этого является деструкция мембранных структур гепатоцитов с нарушением функции локализованных в них ферментных систем биотрансформации ксенобиотиков [5]. В последующем в зонах печени с наибольшей концентрацией радикальных продуктов окисления гепатотоксина (центры долек) развиваются участки ожирения, дистрофии и некроза [12].

Исходя из вышеуказанного, целью настоящей работы явилось изучение возможного корректирующего действия нарушенных CCl_4 активностей ферментных систем биотрансформации ксенобиотиков и перекисного окисления липидов с помо-

щью лекарственных средств, обладающих липотропным (метионин) и антиоксидантным (никотинамид, α -токоферол) действием при их раздельном и комбинированном применении.

Методы исследования. В первой серии (30 крыс-самцов массой 150-190 г.) животным вводили CCl_4 в желудок, однократно, в дозе 2,5 мл/кг (в виде 50% раствора в вазелиновом масле). Через 6 часов начинали вводить никотинамид (под кожу, 30 мг/кг, 2 раза в день, 4 дня), метионин (внутрь, 100 мг/кг, 2 раза в день, 4 дня) отдельно и в комбинации. Контрольным животным вводили равный объем вазелинового масла (в желудок) и 0,85% раствора NaCl (под кожу). Через 12 часов после последнего введения веществ животных наркотизировали диэтиловым эфиром и вводили в вену антипирин (50 мг/кг, однократно) и декапитировали через 90 минут. В сыворотке крови определяли

концентрацию антипирина [10] и активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) [6].

Во второй серии (45 крыс-самцов массой 160-180 г) животным вводили CCl_4 в желудок, однократно, в дозе 2,5 мл/кг (в виде 50% раствора в вазелиновом масле). Через 6 часов начинали вводить в течение 4-х дней метионин (в желудок, 100 мг/кг, 2 раза в день), отдельно и в комбинации с никотиномидом (под кожу, 30 мг/кг, 2 раза в день) и витамином Е (в мышцу, 150 мг/кг, 1 раз в день). Контрольным животным вводили равный объем вазелинового масла (в желудок) и 0.85% раствора NaCl (под кожу). Через 12 часов после последнего введения веществ животных декапитировали и в микросомальной фракции печени определяли содержание цитохромов P-450 (суммарно) и b_5 , активность NADPH-цитохром P-450 и NADH-цитохром b_5 редуктаз (акцептор электронов — феррицианид калия), скорость окисления NADPH и NADH, деметилирование амидопирина, этилморфина и гидроксирование анилина, активность УДФ-глюкуронил- (субстрат — п-нитрофенол) и глутатион-S-трансфераз [субстраты — 1-хлор-2,4-динитробензол (ХДНБ) и бромсульфалеин (СБФ)] и содержание белка по методам, описанным ранее [2]. Регистрировали также уровень гидроперекисей липидов [4] и антиокислительную активность [3].

Результаты и обсуждение. Установлено, что через 4 дня после однократного введения CCl_4 (в желудок, 2,5 мл/кг, в виде 50% раствора в вазелиновом масле) у крыс регистрируются явления цитолиза гепатоцитов, о чем свидетельствует увеличение активности АлАТ на 60% в сыворотке крови. Элиминация антипирина из крови в этих условиях снижена на 37% (табл. 1.).

Введение животным с CCl_4 -гепатозогепатитом никотиномидом (под кожу, 60 мг/кг/день) в течение 4-х дней оказывало нормализующее действие как на повышенную активность АлАТ, так и сниженную элиминацию антипирина у этих животных. Более выраженное ускорение элиминации из крови антипирина наблюдается после введения метионина (в желудок, 200 мг/кг/день, 4 дня) и, особенно, его комбинации с никотиномидом. Содержание анти-

пирина в группе крыс, получавших CCl_4 и витаминно-аминокислотный комплекс, не только нормализовалось, но и снизилось (на 45%) ниже значений интактных животных (табл. 1.).

Ингибирующее действие CCl_4 на элиминацию антипирина подтверждается и при изучении активности ферментных систем эндоплазматической сети гепатоцитов, участвующих в метаболической трансформации антипирина и других ксенобиотиков. Содержание цитохромов P-450 и b_5 , активность NADH-цитохром b_5 редуктазы, а также цитозольной ХДНБ глутатион-S-трансферазы под влиянием CCl_4 снижаются соответственно на 58, 50, 41 и 36% в сравнении с интактными животными. Скорость окисления NADPH и NADH, активность NADPH-цитохром P-450 редуктазы, N-деметилирования этилморфина и амидопирина, р-гидроксирования анилина, цитозольной БСЛ-, микросомальной ХДНБ-глутатион-S-трансфераз, а также УДФ-глюкуронилтрансферазы через 4 дня после однократного введения CCl_4 существенно не отличались от интактных животных (табл. 2).

Введение опытным животным метионина (в желудок, 200 мг/кг/день, 4 дня) оказывало активизирующее (хотя и в незначительной степени) действие на ингибированные CCl_4 ферментные системы микросомального окисления и глутатионконъюгации ксенобиотиков в печени. Так под влиянием аминокислоты нормализовалась активность цитозольной ХДНБ-глутатион-S-трансферазы, а содержание цитохрома b_5 и активность НАДФН-цитохром P-450 редуктазы превысили соответствующие значения нелеченных, получавших CCl_4 животных, на 28 и 31% (табл. 2).

Назначение опытным крысам комбинации метионина и никотиномидом (под кожу, 60 мг/кг/день, 4 дня) существенно не изменило характер и степень выраженности действия аминокислоты на монооксигеназную и глутатионконъюгирующую ферментные системы пораженной тетрахлорметаном печени.

При назначении крысам с интоксикацией четыреххлористым углеродом комбинации никотиномидом с метионином и витамином Е содержание ци-

Таблица 1. Влияние никотиномидом (НА; под кожу, 60мг/кг/день x 4) и метионина (М; в желудок, 200 мг/кг/день x 4) (отдельно и в комбинации) на активность аланинаминотрансферазы и содержание антипирина (внутривенно, 50 мг/кг x 1) в сыворотке крови крыс с гепатозо-гепатитом (CCl_4 ; в желудок, 2,5 мл/кг в виде 50% масляного раствора x 1).

Показатель	Интактные	CCl_4	CCl_4 +НА	CCl_4 +М	CCl_4 +НА+М
Аланинаминотрансфераза, ммоль/ч л	1,52±0,08	2,46±0,15*	2,14±0,11	-	-
Антипирин, мг/мл	22,8±1,25	31,4±2,8*	23,8±1,8#	21,1±1,3#	16,8±0,9*#

Примечание. * — $p < 0.05$ к интактным,
— $p < 0.05$ к получавшим CCl_4 крысам.

Таблица 2. Влияние метионина (М; в желудок, 200 мг/кг/день x 4), его комбинации с никотиномидом (НА; под кожу, 60 мг/кг/день x 4) и витамином Е (Е; в мышцу, 150 мг/кг/день x 4) на активность монооксигеназной, глюкуро- и глутатионконъюгирующей систем печени крыс с гепатозо-гепатитом (CCl₄; в желудок, 2,5 мл/кг, в виде 50% масляного раствора, однократно).

Показатель	Интактные	CCl ₄	CCl ₄ +М	CCl ₄ +М+НА	CCl ₄ +М+НА+Е
Цитохром Р-450, нмоль/мг	0,45±0,04	0,19±0,02*	0,25±0,05*	0,17±0,05*	0,29±0,04*#
Цитохром b ₅ , нмоль/мг	0,36±0,02	0,18±0,01*	0,23±0,02*#	0,21±0,02*	0,22±0,02*
Окисление NADPH, нмоль/мин/мг	1,95±0,23	1,41±0,18	1,65±0,17	2,13±0,40#	1,61±0,27
Окисление NADH, нмоль/мин/мг	2,99±0,37	2,25±0,24	2,66±0,21	2,11±0,21	1,96±0,08
NADPH-цитохром Р-450 редуктаза, мкмоль/мин/мг	0,15±0,01	0,13±0,01	0,17±0,01#	0,15±0,02	0,15±0,01
NADPH-цитохром v ₅ -редуктаза, мкмоль/мин/мг	8,35±0,51	4,91±0,77*	5,08±0,49*	3,86±0,42*	4,50±0,30*
N-деметилирование этилморфина, нмоль/мин/мг	7,11±0,26	5,83±0,44	6,50±0,44	6,19±0,57	5,66±0,63*
N-деметилирование амидопирина, нмоль/мин/мг	7,04±0,69	6,75±0,59	8,39±0,79	5,29±1,07	6,47±0,77
P-гидроксилирование анилина, нмоль/мин/мг	0,75±0,06	0,72±0,06	0,67±0,05	0,65±0,05	0,78±0,01
Глутатионтрансфераза					
1) цитозоль: мкмоль ХДНБ/мин/мг, мкмоль БСЛ/ мин/мг	1,07±0,09 12,22±0,92	0,69±0,06* 11,20±0,70	0,76±0,03 12,80±0,90	0,91±0,01 11,20±0,15	1,09±0,11# 10,60±0,82
2) микросомы мкмоль ХДНБ/ мин/мг	0,12±0,01	0,14±0,01	0,13±0,01	0,15±0,02	0,16±0,01*
УДФ-глюкуронил-трансфераза, нмоль/мин/мг	6,68±0,78	8,10±0,97	7,38±0,74	10,27±0,80	7,20±0,90

Примечание. * — $p < 0.05$ к интактным,
— $p < 0.05$ к получавшим CCl₄ крысам.

тохрому Р-450 и активность цитозольной ХДНБ-глутатион-S-трансферазы превысили соответствующие значения нелеченных опытных животных на 53 и 58%, а активность микросомальной ХДНБ-глутатион-S-трансферазы превысила таковую у интактных крыс на 33% (табл. 2).

Известно, что в механизме ингибирующего действия CCl₄ на гидроксилирующую и конъюгирующую системы печени, по-видимому, важную роль играет активация процессов перекисного окисления липидов [3]. Защитное действие изучаемых веществ, по-видимому, обусловлено их антиоксидантными свойствами [1, 8]. Это предположение подтверждается и нашими данными.

Установлено, что через 4 дня после однократного внутрижелудочного введения крысам тетрахлорметана (2,5 мг/кг) количество перекисных соединений (судя по значениям «быстрой вспышки» хемиллюминесценции) в микросомальной фракции печени и сыворотке крови повышено в 2,0 и 1,5 раза. Введение метионина способствовало нормализации этого показателя в микросомальной фракции, сыворотке крови, а также моче животных. Кроме этого, обнаружено снижение скорости окисления липидов (судя по значениям tg α) в микросомах печени и увеличение антиокислительной активности микросом, сыворотки крови и мочи леченных животных (табл. 3).

Антиокислительные свойства метионина у крыс с CCl₄-гепатозогепатитом в значительной степени усиливаются при его совместном применении с никотиномидом. При этом в микросомальной фракции печени регистрируется более выраженное снижение количества перекисей и уменьшается скорость окисления липидов. Величина соотношения антиоксиданты/прооксиданты (судя по значениям tu) и антиокислительная активность повышаются. В сыворотке крови и моче выявлена аналогичная закономерность: более выраженное снижение количества перекисей липидов и увеличение антиокислительной активности.

Еще более выраженным антиоксидантным действием у крыс с CCl₄-гепатозогепатитом обладает комбинация метионина с никотиномидом и витамином Е. Под их влиянием в микросомальной фракции печени значительно снижается количество перекисей, способность липидов к перекислению (судя по значениям «медленной вспышки» хемиллюминесценции) и скорость окисления липидов. Коэффициент соотношения антиоксиданты/прооксиданты и антиокислительная активность при этом повышаются. Антиоксидантное действие тройного витаминно-аминокислотного комплекса установлено также при исследовании сыворотки крови и мочи животных (уменьшение количества перекисей и увеличение антиокислительной активности) (табл. 3).

Таблица 3. Изменение показателей хемилюминесценции у крыс с гепатозогепатитом (CCl₄; внутрь, 2.5 мл/кг, в виде 50% масляного раствора х 1) под влиянием введения метионина (М; 200 мг/кг/день х 4) и его комбинации с никотиномидом (НА; под кожу, 60 мг/кг/день х 4) и витамином Е (Е; под кожу, 150 мг/кг/день х 4).

Показатель	Интактные	CCl ₄	CCl ₄ +М	CCl ₄ +М+НА	CCl ₄ +М+НА+Е
Микросомальная фракция печени					
"Быстрая вспышка" ХЛ, имп/с	98,2+6,5	194,0+27,2*	108,2+13,8#	75.2+11.1*#	86.2+12.1#
"Медленная вспышка", имп/с	228.3+42.3	303.9+31.8	239.9+38.6	192.8+50.9	160.1+25.5*#
tu, с	31.6+2.8	27.2+3.8	38.5+6.3	47.8+8.2#	55.0+5.0*#
tg α	8.97+0.72	12.2+0.68	9.35+1.1#	7.19+1.07#	4.93+0.81#
Антиокислительная активность, %	31.6+0.64	28.2+0.86	33.1+1.4#	34.9+0.91*#	36.2+0.86*#
Сыворотка крови					
"Быстрая вспышка", имп/с	94.5+14.7	138.9+19.7*	90.3+18.6#	86.2+13.6#	69.2+17.1#
Антиокислительная активность, %	30.8+2.3	26.0+1.1	31.7+0.73#	33.2+0.83#	34.9+1.1#
Моча					
"Быстрая вспышка", имп/с	277+40	322+41	186+36#	133+21*#	154+24*#
Антиокислительная активность, %	2.42+0.31	1.97+0.40	2.99+0.30#	5.11+0.84*#	5.04+0.37*#

Примечание. * — $p < 0.05$ к интактным,
— $p < 0.05$ к получавшим CCl₄ крысам.

Таким образом, доказано, что метионин, его комбинация с никотиномидом и, особенно, с дополнительным назначением витамина Е, в значительной степени нормализуют сниженную у крыс с CCl₄-гепатозогепатитом функцию монооксигеназной и глутатионконъюгирующей систем печени. При этом ингибируются активированные CCl₄ реакции перекисного окисления липидов и уменьшается степень цитолиза гепатоцитов.

В механизме лечебного действия веществ при тетрахлорметановой интоксикации, по-видимому, важную роль играет их антиокислительное, мембраностабилизирующее (витамин Е, никотиномид и метионин) и липотропное (метионин) действие; участие в репарации поврежденных мембран (стимуляция метионином биосинтеза белков и фосфолипидов) и транспорте электронов (никотиномид в форме NADPH и NADH) [7, 9, 13].

Выводы

1. CCl₄ (в желудок, 2,5 мл/кг в виде 50% раствора, однократно) через 4 дня вызывает у крыс повышение в сыворотке крови активности АлАТ и уровня перекисных соединений, снижение интенсивности окисления и конъюгации ксенобиотиков с глутатионом.

2. Никотиномид, метионин, их комбинация и, особенно, сочетание с витамином Е в значительной степени предотвращают гепатотоксическое действие CCl₄.

Литература

- Бунятян Н. Д., Герасимова О. А., Сахарова Т. С., Яковлева Л. В. Природные антиоксиданты как гепатопротекторы. // Эксперим. и клин. фармакол. - 1999 - Т. 62, № 2. - С. 64-67.
- Бушма М.И., Легонькова Л.Ф., Абакумов Г.В., Заводник Л.Б. Влияние длительного введения ундевита и его комбинации с кордамином на гидроксигирующую, глюкуро-, глутатионконъюгирующую системы и перекисное окисление липидов печени интактных крыс. // Вопр. питания. - 1994, - N 6. - С. 12-15.
- Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах. // Соросов. образов. журн. - 2000. - Т. 6, № 12. - С. 13-19.
- Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука. - 1980. - С. 74-92.
- Губский Ю.И. Коррекция химического поражения печени. - Киев: Здоров'я, 1989. - 167 с.
- Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. - Мн. - 2000. - Т. 1. - С. 109 - 111.
- Моругова Т. В., Лазарева Д. Н., Влияние лекарственных средств на свободно-радикальное окисление. // Эксперим. и клин. фармакол. - 2000. - Т. 63, № 1. - С. 71 - 75.
- Машковский М.Д. Лекарственные средства. — М.: Медицина. - 2000. - Т. 2. - С. 305 - 307.
- Мецлер Д. Биохимия. (Пер. с англ.) — М.: Мир. - 1980. - Т. 3.
- Brodie B.V., Axelrod J., Soberman R., Levy B.B. The estimation of antipyrine in biological materials. // J. Biol. Chem. - 1949. - Vol. 179, N 1. - P. 25 - 30.
- Liber C.S. Cytochrome P-450E1: Its physiological and pathological role. // Physiol. Rev. - 1997. - Vol. 77, No 2. - P. 517 - 544.
- Resknagel R.O., Glende E.A., James Jr., Dolak J.A. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. // Pharmac. Ther. - 1989. - Vol. 43. - P. 139 - 154.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. NAD(P)H - oxidation as donors of free radicals. // Am. J Physiol. - 2000. - Vol. 279. - P. 1005-1028.