

© Коллектив авторов., 2006  
УДК 615.356:577.161.11]. 015.42:616.36-002

## КОНЦЕНТРАЦИЯ ВИТАМИНА А, ПАРАМЕТРЫ ПОЛ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТОЗО-ГЕПАТИТЕ

*В.Г. Макарова, Е.Н. Якушева, С.К. Правкин*

Рязанский государственный медицинский университет  
имени акад. И.П.Павлова

**Природные витамины антиоксиданты в определенных условиях могут приобретать прооксидантные свойства. Проведенное исследование свидетельствует о концентрационной инверсии антиоксидантного действия витамина А в прооксидантное в ткани сердца. В условиях свободно-радикальной патологии прооксидантная инверсия не наблюдается.**

Интерес к изучению и широкому использованию антиоксидантов в современной фармакотерапии обусловлен выяснением патогенетических механизмов, лежащих в основе развития сердечно-сосудистых, воспалительных заболеваний, сахарного диабета и другой свободно-радикальной патологии. Показано, что витамины-антиоксиданты (каротиноиды, аскорбиновая кислота, альфа-токоферол) защищают ЛПНП от окисления, препятствуя инициации атеросклероза, и их назначение в больших дозах способствует снижению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [16]. Обнаружено, что параметры ПОЛ находятся в обратной зависимости от обеспеченности организма каротиноидами [15,9]. Однако, наряду с доказательствами антиоксидантного эффекта в литературе имеются примеры прооксидантного действия у ряда витаминов. Эти новые свойства проявляются при определенных условиях, таких как высокая концентрация препарата в ткани, повышение парциального давления кислорода, присутствие других химических веществ, например, компонентов табачного дыма [13,14,8].

Ретинол по своему химическому строению представляет полиеновое со-

единение, поэтому может проявлять как свойства антиоксиданта, так и прооксиданта [2]. Таким образом, представляется интересным проследить выраженность антиоксидантного эффекта ретинола в зависимости от его концентрации в ткани в условиях нормы и свободно-радикальной патологии.

В качестве экспериментальной патологии предлагается использовать модель четыреххлористого гепатозо-гепатита, т.к. механизм повреждения в данной модели связан с активацией процессов перекисного окисления липидов мембран гепатоцитов и других тканей [12,5].

**Цель работы:** оценить дозозависимый антиоксидантный эффект витамина А и выявить корреляцию между его концентрацией в ткани сердца, параметрами ПОЛ и системы антиоксидантной защиты в условиях нормы и при экспериментальном гепатозо-гепатите.

### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на половозрелых нелинейных крысах-самцах массой 150-220г. Витамин А вводили подопытным животным двух серий (n=7) внутривенно с помощью ме-

таллического зонда в виде раствора препарата «Ретинола ацетат» ООО «Полисинтез» в оливковом масле в суточных дозах 15 и 60 мг/кг массы тела [3]. Препарат применяли в одно и то же время суток, в течение 3-х, 7-и, и 10-и дней. По окончании сроков эксперимента из образцов миокарда готовили гомогенат на фосфатном буфере (1:10). В гомогенате миокарда спектрофотометрическим методом определяли показатели ПОЛ - фоновый уровень малонового диальдегида (МДА, нмоль/мг) [7], показатели системы антиоксидантной защиты - активность ферментов глутатионтрансферазы (ГТ, мкмоль/мин\*мг) [11] и глутатионпероксидазы (ГП, мкмоль/мин\*мг) [6]. Концентрацию ретинола в гомогенатах миокарда определяли оригинальной хроматографической методикой на высокоэффективном жидкостном хромато-

графе «Стайер». Животным двух экспериментальных серий моделировали токсический гепатозо-гепатит (ТГГ) трехкратным внутримышечным введением 50% -го масляного раствора четырехлористого углерода в суточной дозе 0,2 мл/100г массы тела [1]. После завершения введения яда животным назначали раствор ретинола ацетата по вышеописанной схеме. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием пакета «Microsoft Office XP». Проводили корреляционный анализ между фармакокинетическими и биохимическими показателями.

### Результаты и их обсуждение

Контрольные значения содержания МДА, активности ГТ и ГП и динамика данных показателей при назначении двух доз витамина А представлена в таблице 1.

Таблица 1

Параметры ПОЛ и антиоксидантной защиты сердца у интактных животных в норме и при курсовом назначении витамина А

|                    | МДА, нмоль/мг | ГТ, мкмоль/мин*мг | ГП, мкмоль/мин*мг |
|--------------------|---------------|-------------------|-------------------|
| Интактные животные | 85,49 ± 4,68  | 819,36 ± 41,51    | 118,04 ± 20,64    |
| МД 3 сут           | 18,68 ± 2,00  | 826,33 ± 33,76    | 125,47 ± 19,18    |
| МД 7 сут           | 108,79 ± 9,12 | 858,40 ± 37,66    | 221,49 ± 13,81    |
| МД 10 сут          | 58,02 ± 4,47  | 899,99 ± 73,54    | 322,32 ± 40,79    |
| ВД 3 сут           | 26,37 ± 4,06  | 881,10 ± 48,25    | 173,65 ± 39,64    |
| ВД 7 сут           | 43,08 ± 12,66 | 767,17 ± 52,02    | 235,87 ± 15,77    |
| ВД 10 сут          | 117,58 ± 5,98 | 631,20 ± 42,08    | 356,34 ± 63,2     |

Примечание: здесь и далее МД – доза 15 мг/кг массы  
ВД – доза 60 мг/кг массы

При введении малой и высокой дозы витамина А концентрация МДА в сердце изменялась разнонаправленно. Так, при использовании малой дозы концентрация МДА на 3 и 10 сут уменьшилась соответственно на 78,1% ( $p<0,001$ ) и 32,1% ( $p<0,01$ ) по сравнению с уровнем нормы. При использо-

вании высокой дозы препарата концентрация МДА в сердце уменьшилась на 3 сут на 69,1% ( $p<0,001$ ), на 7 сут - на 49,6% ( $p<0,05$ ), на 10 сут она увеличилась по отношению к контролю на 37,5% ( $p<0,01$ ).

При введении малой дозы витамина А в течение 3, 7 и 10 сут и высокой до-

зы в течение 3 и 7 сут изменения активности ГТ были недостоверными. На 10 сут введения высокой дозы наблюдалось достоверное уменьшение активности фермента на 23% от уровня контроля ( $p<0,05$ ).

При назначении малой дозы витамина А активность ГП увеличилась на

87,6% и 173,1% соответственно на 7 сут и 10 сут ( $p<0,01$ ), при использовании высокой дозы - на 47,1% ( $p>0,05$ ), 99,8% ( $p<0,01$ ) и 201,9% ( $p<0,05$ ) соответственно на 3, 7 и 10 сут опыта.

Динамика биохимических показателей при ТГГ и при введении витамина А на фоне ТГГ приведена в таб.2.

Таблица 2

Параметры ПОЛ и антиоксидантной защиты в сердце при курсовом назначении витамина А на фоне ТГГ

|                     | МДА, нмоль/мг  | ГТ, мкмоль/мин*мг | ГП, мкмоль/мин*мг |
|---------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| Контроль ТГГ 3 сут  | 173,63 ± 12,20 | 829,11 ± 80,24    | 829,11 ± 80,24    |
| Контроль ТГГ 7 сут  | 185,49 ± 11,44 | 597,99 ± 21,7     | 597,99 ± 21,7     |
| Контроль ТГГ 10 сут | 196,92 ± 14,03 | 524,47 ± 31,22    | 524,47 ± 31,22    |
| ТГГ МД 3 сут        | 104,40 ± 6,78  | 1071,88 ± 101,75  | 164,77 ± 32,79    |
| ТГГ МД 7 сут        | 118,90 ± 10,91 | 1027,7 ± 70,74    | 183,95 ± 32,86    |
| ТГГ МД 10 сут       | 106,37 ± 6,41  | 711,58 ± 30,02    | 246,68 ± 35,91    |
| ТГГ ВД 3 сут        | 91,65 ± 7,22   | 1052,51 ± 47,39   | 212,32 ± 43,24    |
| ТГГ ВД 7 сут        | 101,98 ± 14,33 | 1127,27 ± 92,1    | 296,29 ± 60,22    |
| ТГГ ВД 10 сут       | 103,30 ± 9,16  | 826 ± 38,69       | 324,65 ± 25,23    |

На фоне ТГГ концентрация МДА в сердце достоверно ( $p<0,001$ ) повысилась на 3, 7 и 10 сут соответственно на 103,1%, 117,0%, 130,3% по отношению к содержанию МДА у интактных животных. Достоверное уменьшение активности ГТ было отмечено на 7 и 10 сут – на 27,0% и 36,0% соответственно ( $p<0,01$ ). Активность ГП при ТГГ имела тенденцию к понижению.

При введении малой дозы витамина А на фоне ТГГ уровень МДА в сердце понизился относительно контроля ТГГ на 39,9%, 35,9% и 46,0% на 3, 7 и 10 сут соответственно ( $p<0,01$ ); при введении высокой дозы - на 47,2%, 45,0% и 47,5%

соответственно ( $p<0,01$ ). Причем, при назначении малой дозы в течение 3 сут и во все сроки использования высокой дозы витамина А полученные результаты статистически не отличались от значений нормы.

При введении малой дозы витамина А на фоне ТГГ активность ГТ повысилась относительно контроля ТГГ на 29,3% ( $p>0,05$ ), 71,9% ( $p<0,01$ ) и 35,7% ( $p<0,01$ ) соответственно на 3, 7 и 10 сут, при этом уровень активности на 7 сут превысил показатель у интактных животных на 25,4% ( $p<0,05$ ). При введении высокой дозы наблюдались более выраженные изменения: выявлено повы-

шение активности ГТ на 88,5% ( $p<0,01$ ) и 57,5% ( $p<0,001$ ) соответственно на 7 и 10 сут. Следует отметить, что при введении высокой дозы в течение 3 и 7 сут активность ГТ превышала уровень у интактных животных на 28,5% и 37,6% соответственно ( $p<0,05$ ), а на 10 сут показатель статистически не отличался от него.

Исследование активности ГП в сердце при ТГГ также выявило дозозависимый эффект витамина А. Так, повышение активности фермента при введении малой дозы препарата оказалось достоверным лишь на 10 сут введения. При этом увеличение показателя составило 123,0% относительно серии кон-

троля гепатита и 109,0% относительно уровня у интактных животных ( $p<0,05$ ). Повышение активности фермента в случае использования высокой дозы оказалось достоверным уже на 7 сут. назначения витамина; в этом случае превышение уровня контроля гепатита и показателей нормы составило 189,6% и 151,0% ( $p<0,05$ ) соответственно. На 10 сут активность ГП превысила соответствующие показатели на 193,4% 175,0% ( $p<0,001$ ).

Динамика содержания ретинола в сердце при назначении витамина А интактным животным и на фоне ТГГ показана в таб. 3.

Таблица 3

Содержание ретинола в сердце при курсовом назначении  
витамина А интактным крысам и на фоне ТГГ

|           | Назначение витамина А<br>интактным животным нг/мл | Назначение витамина А на<br>фоне ТГГ |
|-----------|---------------------------------------------------|--------------------------------------|
| МД 3 сут  | 95,32 ± 27,51                                     | 65,095 ± 7,81                        |
| МД 7 сут  | 664,59 ± 124,44                                   | 460,36 ± 51,826                      |
| МД 10 сут | 1175,67 ± 94,81                                   | 779,58 ± 69,20                       |
| ВД 3 сут  | 527,09 ± 76,87                                    | 356,25 ± 42,94                       |
| ВД 7 сут  | 1621,79 ± 196,93                                  | 1297,17 ± 131,86                     |
| ВД 10 сут | 2752,99 ± 325,30                                  | 1895,64 ± 174,13                     |

Назначение витамина А курсом 7 и 10 суток вызвало увеличение концентрации ретинола в сердце по сравнению с уровнем ретинола на 3 сутки введения препарата. Применение малой дозы повысило содержание ретинола в сердце на 597,2% ( $p<0,01$ ) и 1233,4% ( $p<0,001$ ), использование высокой дозы – на 207,7% ( $p<0,01$ ) и 422,3% ( $p<0,01$ ) соответственно.

Назначение витамина А в малой дозе на фоне ТГГ в течение 7 и 10 сут привело к повышению концентрации ретинола в сердце на 607,2% ( $p<0,001$ ) и 1197,6% ( $p<0,001$ ); использование высокой дозы повысило концентрацию

витамина А на 264,1% ( $p<0,01$ ) и 432,1% ( $p<0,001$ ) соответственно по сравнению с концентрацией, измеренной на 3 сут введения препарата.

Анализ абсолютных значений концентрации витамина А в сердце в норме и при патологии показал, что на фоне ТГГ кумуляция ретинола в ткани сердца снижается.

Корреляционный анализ экспериментальных данных выявил зависимость между уровнем ретинола и изученными биохимическими показателями в сердце. Значения коэффициентов корреляции между показателями приведены в таб.4.

Таблица 4

Корреляционная зависимость между концентрацией ретинола  
и биохимическими показателями в сердце

|                | МДА             | ГТ             | ГП             |
|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| МД 3 сут       | -0,66 (p<0,05)  | 0,50 (p>0,05)  | -0,23 (p>0,05) |
| МД 7 сут       | 0,11 (p>0,05)   | 0,11 (p>0,05)  | 0,70 (p<0,05)  |
| МД 10 сут      | -0,16 (p>0,05)  | 0,37 (p>0,05)  | 0,92 (p<0,001) |
| ВД 3 сут       | -0,64 (p<0,05)  | 0,37 (p>0,05)  | 0,23 (p>0,05)  |
| ВД 7 сут       | 0,00 (p>0,05)   | 0,32 (p>0,05)  | 0,69 (p<0,05)  |
| ВД 10 сут      | 0,05 (p>0,05)   | -0,64 (p<0,05) | 0,88 (p<0,001) |
| ТГГ, МД 3 сут  | -0,70 (p<0,05)  | 0,64 (p<0,05)  | -0,14 (p>0,05) |
| ТГГ, МД 7 сут  | -0,91 (p<0,001) | 0,45 (p>0,05)  | 0,33 (p>0,05)  |
| ТГГ, МД 10 сут | -0,72 (p<0,05)  | 0,41 (p>0,05)  | 0,85 (p<0,001) |
| ТГГ, ВД 3 сут  | -0,82 (p<0,01)  | 0,58 (p>0,05)  | 0,93 (p<0,001) |
| ТГГ, ВД 7 сут  | -0,87 (p<0,001) | 0,68 (p<0,05)  | 0,92 (p<0,001) |
| ТГГ, ВД 10 сут | -0,82 (p<0,01)  | 0,93 (p<0,001) | 0,87 (p<0,001) |

Так, выявлена достоверная обратная зависимость между концентрацией ретинола и уровнем МДА на 3 сут введения двух доз витамина А интактным животным (умеренная связь) и во все сроки эксперимента при введении двух доз витамина А на фоне ТГГ (сильная связь). Достоверная умеренная отрицательная зависимость обнаружена между концентрацией ретинола и активностью ГТ в сердце на 10 сут введения интактным животным высокой дозы препарата, выявлена достоверная прямая зависимость между обозначенными показателями на 3 сут введения малой дозы (умеренная связь) и на 7 и 10 сут введения высокой дозы препарата на фоне ТГГ (умеренная и сильная связь соответственно). Определена достоверная сильная положительная зависимость между концентрацией ретинола и активностью ГП в сердце на 7 и 10 сут введения двух доз препарата в условиях нормы, на 10 сут введения малой дозы на фоне ТГГ и во все сроки эксперимента при введении высокой дозы на фоне ТГГ.

Таким образом, курсовое назначение интактным животным малой дозы витамина А вызвало антиоксидантный эффект, о чем свидетельствовало снижение уровня МДА и повышение активности ГП. На малых сроках эксперимента (3 сут) при введении двух доз препарата показатель активности ПОЛ (МДА) находился в обратной зависимости от концентрации ретинола в сердце, что подтвердило антиоксидантное действие применяемых доз. Использование высокой дозы вызвало ослабление антиоксидантного эффекта на 3 сут и его инверсию в прооксидантное действие к 10 суткам, что подтверждается повышением количества МДА и снижением активности ГТ. Активность ГТ к концу эксперимента находилась в обратной зависимости от концентрации ретинола, что свидетельствует о его прооксидантных свойствах. Значительное повышение активности ГП при введении высокой дозы витамина А к 10 суткам, видимо, объясняется компенсаторной реакцией системы антиоксидантной защиты в

ответ на активацию ПОЛ, спровоцированную высокой концентрацией препарата в ткани.

Курсовое использование витамина А на фоне ТТГ как в малой, так и в высокой дозе вызывало антиоксидантный эффект, что подтвердилось снижением уровня МДА и повышением активности антиоксидантных ферментов. Содержание МДА при этом находилось в обратной зависимости от концентрации ретинола, активность ГТ и ГП – в прямой корреляции.

Причиной появления прооксидантных свойств ретинола может быть наличие в его молекуле длинной цепи с ненасыщенными двойными связями, из-за чего он как нестабильное соединение служит отличным субстратом для атаки свободными радикалами [10]. Одним из условий, провоцирующих прооксидантные свойства у витамина-антиоксиданта, является его высокая концентрация в среде [4].

Отсутствие прооксидантных свойств витамина А при его введении на фоне ТТГ может объясняться тем, что в данных условиях определяющим является не подверженность ретинола аутоокислению, а включение в реакции «захвата» свободных радикалов при значительной активации ПОЛ [2].

### Выводы

1. В условиях нормы малая доза витамина А (15 мг/кг массы) является антиоксидантной;
2. При использовании высокой дозы препарата (60 мг/кг массы) антиоксидантный эффект, выявленный при малом курсе назначения (3 сут), трансформируется в прооксидантный при увеличении курса до 10 суток;
3. В условиях четыреххлористого гепатозо-гепатита прооксидантная инверсия ретинола не проявляется;
4. Установлена корреляционная зависимость между концентрацией рети-

нола в сердце и уровнем МДА (обратная связь) и активностью системы антиоксидантной защиты (прямая связь).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние комбинированных апипрепаратов на течение тетрахлорметанового гепатита / В.Г.Макарова [и др.] // Росс. Жур. Гастроэнтерологии, Гепатологии, Колопроктологии. – 1995. – №3. – С.147.
2. Зайцев В. Г. Модельные системы перекисного окисления липидов и их применение для оценки антиоксидантного действия лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / В. Г. Зайцев.- Волгоград, 2001.- 16-19 с.
3. Иммуномоделирующее и антиоксидантное действие витаминов А и Е при воздушном и иммерсионном охлаждении / Б.С.Утешев [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология – 2001. - №1.- С.60-63.
4. Концентрационная инверсия антиоксидантного и прооксидантного действия БК в тканях in vivo / В.З.Ланкин [и др.] // Бюллет. эксперим биол. и медицины – 1999. - № 9.- С.314-316.
5. Костюк В.А. Роль ковалентного связывания и ПОЛ в повреждении печени четыреххлористым углеродом / В.А. Костюк // Биохимия. - 1991. - №10. - С. 1878 -1885.
6. Ланкин В.З., Гуревич С.М. //Докл. АН СССР. – 1976. - № 3. – С.392-395.
7. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М., 1977. – С. 66-68.
8. Alcohol, vitamin A, and  $\beta$ -carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity / A.Maria [et al.] // American Journal of Clinical Nutrition.- 1999.- № 6.- P. 1071-1085.
9. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam study / K. Klipstein-Grobusch [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. -1999.- № 69.- P. 261-266.
10. Edge R. Prooxidant and antioxidant reaction mechanisms of carotene and radical interactions with vitamins E and C / R.

- Edge, T.G. Truscott // Nutrition – 1997.- №13.- P. 992-994.
11. Habig W. Glutathione S-transferase / W. Habig, W. Jakoby // Methods in enzymol. - 1981. - Vol.77. – P.218-243.
12. Kaplowitz M.D. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury / M.D. Kaplowitz // Semin Liver Dis. - 2002. - N4. - P. 137-144.
13. Palozza P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems / P. Palozza // Nutr. Rev. - 1998.- Vol. 56.- P. 257-265.
14. Retinoid signaling and activator protein 1 expression in ferrets given  $\beta$ -carotene supplements and exposed to tobacco smoke / X.D.Wang [et al.] // J. Natl. Cancer Inst.- 1999.- № 91.- P. 60-66.
15. Safety evaluation of synthetic  $\beta$ -carotene / R.A. Woutersen [et al.] // Crit. Rev. Toxicol. - 1999. - № 29. – P. 515-542.
16. Steinmetz K.A. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review / K.A. Steinmetz, J.D. Potter // J. Am. Diet Assoc. - 1996. - № 96. - P.1027-1039.

#### VITAMIN A CONCENTRATION, LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS IN HEART

V.G. Makarova, E.N. Yakusheva, S.K.Pravkin

**Naturally occurring vitamin-antioxidants may obtain prooxidant behaviour. It was found that prooxidant effect in heart appears depending on vitamin A concentration. In the state of free-radical pathology prooxidant inversion was not to be observed.**