

# ФАРМАКОЛОГИЯ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

## РОЛЬ NO-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ В РЕАЛИЗАЦИИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ЭФФЕКТОВ МЕЛАТОНИНА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

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

Исследовано влияние мелатонина на показатели кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях ингибирования NO-синтазной функции. Оценивали сродство гемоглобина к кислороду (p50), Hb, MetHb, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, pH, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, TCO<sub>2</sub>, ABE, SBE, SBC, уровень продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, основания Шиффа), факторов антиоксидантной системы ( $\alpha$ -токоферол, ретинол, активность каталазы). Установлено, что однократное введение мелатонина в дозе 10 мг/кг (внутрибрюшинно, за 10 мин до ишемии) повышает сродство гемоглобина к кислороду, улучшает параметры кислотно-основного и прооксидантно-антиоксидантного состояния животных после ишемии-реперфузии печени, тогда как ингибирование NO-синтазы снижает его корректирующие эффекты. По-видимому, протекторный эффект мелатонина опосредован влиянием на синтез NO, изменение уровня которого модулирует аффинитет гемоглобина к кислороду и лимитирует участие последнего в свободнорадикальных процессах.

**Ключевые слова:** мелатонин; L-NAME; сродство гемоглобина к кислороду; прооксидантно-антиоксидантный баланс; ишемия-реперфузия; печень, крысы.

### ВВЕДЕНИЕ

Повреждения печени, вызванные синдромом ишемии-реперфузии, часто встречается в клинической практике при трансплантации, а также после выполнения оперативных вмешательств по поводу травм или опухолевых процессов этого органа. Важным патогенетическим звеном нарушений при данном синдроме считается развитие дисбаланса между активностью свободнорадикальных процессов и возможностями антиоксидантной системы по их контролю, т.е. окислительного стресса [3, 11]. Избыточная генерация свободных радикалов кислорода и повреждение клеточных и субклеточных мембран ведет к функциональным и морфологическим нарушениям гепатоцитов [10].

Значительный вклад в развитие реперфузионных расстройств могут вносить нарушения кислородтранспортной функции (КТФ) крови, процессов микроциркуляции, дисбаланс продукции вазодилататоров и вазоконстрикторов в постишемическом периоде [17]. Использование L-аргинина или донаторов оксида азота (NO) улучшало параметры КТФ крови и функциональное состояние печени после ишемии, тогда как ингибирование продукции NO усугубляло реперфузионные нарушения [3, 5]. Известно, что мелатонин обладает значительными прямыми и непрямыми антиок-

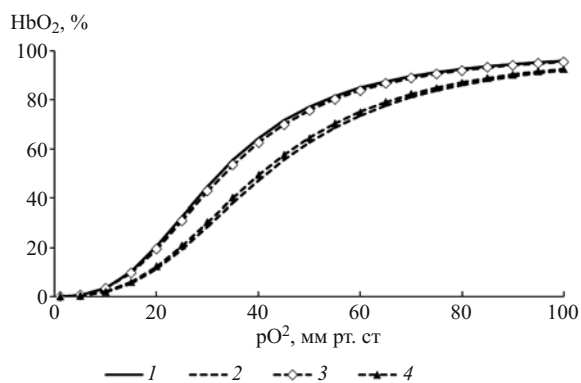
сидантными свойствами, способен влиять на сосудистый тонус, уменьшать зону некроза и инфильтрацию лейкоцитами паренхимы печени при различных видах ее повреждения, в т.ч. при ишемии-реперфузии [2, 13]. С учетом данных свойств мелатонина представляет интерес изучение роли NO в реализации его протективных эффектов на печень при моделировании синдрома ишемии-реперфузии у крыс.

Цель исследования — оценить влияние мелатонина на параметры кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантного баланса у крыс в условиях ингибирования NO-синтазы при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени (ИРП).

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 35 взрослых белых крысах-самцах массой 280 – 360 г, выдержанных в стандартных условиях вивария при 12 ч световом режиме. Под комбинированным наркозом (тиопентал натрия — 30 мг/кг, внутривенно (в/в), калипсол — 100 мг/кг, внутримышечно (в/м)) ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на *a. hepatica propria* и *v. portae* (маневр Прингла) в течение 30 мин, реперфузионный период длился 120 мин. В конце эксперимента осуществляли забор смешанной венозной крови и тканей печени для оценки параметров КТФ, прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени. Эвтаназию животных проводили внутривенным введением тиопентала натрия

<sup>1</sup> Гродненский медицинский университет, Гродно, Беларусь, 230009, ул. Горького, 80, e-mail: hodowsky@grsmu.by



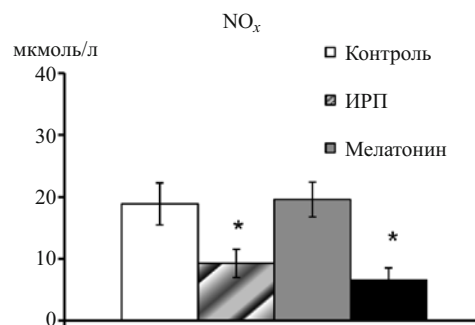
**Рис. 1.** Влияние мелатонина (10 мг/кг, внутривенно, однократно) на сродство гемоглобина к кислороду у крыс при ишемии-реперфузии печени: 1 – 1-я группа, 2 – 2-я группа, 3 – 3-я группа, 4 – 4-я группа.

(100 мг/кг). Все оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной анальгезии в соответствии с нормами, принятыми этической комиссией по гуманному обращению с животными Гродненского государственного медицинского университета.

Смешанную венозную кровь из правого предсердия забирали через полиэтиленовый катетер в предварительно охлажденные шприцы, смоченные гепарином (50 Ед/мл). Для стабилизации к взятым образцам крови добавляли этилендиаминтетраацетат в дозе 1 мг/мл. Для отделения плазмы от эритроцитов кровь центрифугировали в течение 10 мин (3000 об/мин). Полученные эритроциты отмывали в изотоническом фосфатном буфере, после чего проводили гемолиз дистиллированной водой (соотношение 1:5 по объему).

Ткань печени сразу после забора помещали в жидкий азот. Непосредственно перед определением исследуемых показателей гомогенат ткани (1:9) готовили на 0,01 М фосфатном буфере (рН = 7,4), используя гомогенизатор MPW-309 (Польша). Концентрацию белка в гомогенате определяли методом Лоури [12].

Животных разделили на 4 группы: 1-я ( $n = 9$ ) — контрольная; во 2-й ( $n = 8$ ) — моделировали ИРП; в 3-й ( $n = 9$ ) группе — за 10 мин перед ИРП вводили мелатонин (в/б, 10 мг/кг, Sigma), который предварительно растворяли в чистом этаноле, после чего разводили 0,9 % раствором NaCl (содержание этанола в конечном растворе составляло менее 1 % при объеме инъекции 0,5 мл); в 4-й группе ( $n = 9$ ) эксперименты проводили, как в 3-й группе, но за 5 мин до применения мелатонина крысам вводили метиловый эфир N<sub>ω</sub>-нитро-L-аргинина (L-NAME, 10 мг/кг, “Sigma”, в физиологическом растворе, в/б, 0,5 мл). Функциональное состояние печени оценивали по активности аланин- и аспаратаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) кинетическим методом с помощью стандартного набора реактивов фирмы “Сорма” (Польша). Определение суммарного количества нитритов и нитратов (NO<sub>x</sub>) в плазме крови для оценки общего синтеза NO в организме животных проводили спектрофотометрическим



**Рис. 2.** Влияние мелатонина 10 мг/кг (внутрибрюшинно, однократно) на суммарное содержание нитритов и нитратов (NO<sub>x</sub>) в плазме крови у крыс при ишемии-реперфузии печени, где контроль — 1-я группа, ИРП — 2-я группа, мелатонин — 3-я группа, L-NAME — 4-я группа; \* — достоверные различия по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

методом с помощью реактива Грисса. Для восстановления нитратов в нитриты использовали металлический кадмий [7].

На микрогазоанализаторе Synthesis-15 (США) оценивали показатели КТФ крови:  $p50_{\text{реал}}$ ,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , рН, бикарбонат плазмы ( $HCO_3^-$ ), общий  $CO_2$  плазмы ( $TCO_2$ ), действительный избыток оснований (АВЕ), стандартный избыток оснований (SBE), стандартный бикарбонат плазмы (SBC). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю  $p50$  ( $pO_2$  крови, соответствующее 50 % насыщению ее кислородом).  $p50_{\text{станд}}$  рассчитывали для стандартных условий (рН = 7,4;  $pCO_2 = 40$  мм рт. ст. и  $T = 37$  °С),  $p50_{\text{реал}}$  — рассчитывали для реальных значений этих факторов. На основании полученных значений  $p50$  по уравнению Хилла высчитывали положение кривой диссоциации гемоглобина (КДО).

Изучали следующие показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния: концентрацию диеновых конъюгатов (ДК), оснований Шиффа (ОШ),  $\alpha$ -токоферола, ретинола и активность каталазы. Содержание ДК в биологическом материале определяли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм [1]. Уровень ОШ определяли по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 и 440 нм, соответственно [8]. Содержание  $\alpha$ -токоферола и ретинола в биологическом материале оценивали по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта [6]. В качестве стандарта использовали  $\alpha$ -токоферол и ретинол (“Sigma”). Активность каталазы эритроцитов и печени оценивали спектрофотометрическим методом, основанном на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс [4].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента или U-теста, в зависимости от нормальности распре-

деления выборок. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения основных показателей КТФ крови у животных отражены в табл. 1. В конце реперфузии в крови крыс 2-й группы наблюдали уменьшение показателей рН, АВЕ и SBC на 1,7 % ( $p < 0,01$ ), 399,3 % ( $p < 0,05$ ) и 15,8 % ( $p < 0,05$ ), соответственно, отражающее развитие метаболического ацидоза. В конце постишемического периода у крыс 2-й экспериментальной группы в смешанной венозной крови наблюдалось увеличение  $p50_{\text{реал}}$  и  $p50_{\text{станд}}$  на 28,6 % ( $p < 0,001$ ) и 10,1 % ( $p < 0,05$ ), соответственно, что свидетельствует о сдвиге КДО вправо (см. рис. 1). Моделирование ИРП у крыс 2-й группы приводило к росту ДК и ОШ в плазме крови в конце реперфузии по отношению к контрольным в 4,2 ( $p < 0,001$ ) и в 8,7 ( $p < 0,001$ ) раза, соответственно (см. табл. 2). При этом у животных 2-й группы понижалась концентрация  $\alpha$ -токоферола и ретинола в крови на 14,4 % ( $p < 0,001$ ) и 30,4 % ( $p < 0,001$ ) соответственно. Активность каталазы эритроцитов в конце реперфузионного периода у крыс 2-й группы уменьшалась на 57,5 % ( $p < 0,001$ ). Сходные изменения исследуемых параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса наблюдали в печени в конце реперфузионного периода (табл. 2).

Мелатонин (10 мг/кг, в/б, однократно) у животных 3-й группы вызывал улучшение параметров КТФ крови в конце реперфузии (см. табл. 1). Так, по отношению к животным 1-й группы здесь не наблюдали изменения показателей рН,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{TCO}_2$ , АВЕ, SBE и SBC. Одновременно установлено смещение КДО влево по отношению к животным 2-й группы в конце реперфузии (судя по показателям  $p50_{\text{реал}}$  и  $p50_{\text{станд}}$ ). Вместе с тем, у крыс 3-й экспериментальной группы наблюдали повышение ДК и ОШ в плазме крови в конце реперфузии по отношению к контролю только в 2 ( $p < 0,01$ ) и в 4 ( $p < 0,01$ ) раза соответственно, что было существенно меньше, чем во 2-й группе (см. табл. 2). В печени в конце постишемического периода в 3-й группе содержание ДК и ОШ было выше по сравнению с контролем в 2,2 ( $p < 0,001$ ) и 2 ( $p < 0,001$ ) раза соответственно, однако ниже, чем во 2-й группе. Важно, что у животных 3-й группы в конце ИРП не наблюдалось понижения концентрации  $\alpha$ -токоферола и ретинола в крови и в гомогенате печени по сравнению с 1-й группой. Активность каталазы в конце реперфузионного периода у крыс 3-й группы повышалась в эритроцитах на 51,2 % ( $p < 0,05$ ), а в гепатоцитах — на 142,1 % ( $p < 0,001$ ).

Ингибирование NO-синтазы у животных 4-й группы в конце ИРП приводило к снижению рН, повышению  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{TCO}_2$  крови по отношению к 3-й экспериментальной группе. Одновременно наблюдалось увеличение показателя  $p50_{\text{реал}}$  по сравнению с 1-й

Таблица 1. Влияние мелатонина (10 мг/кг, внутривенно, однократно) на показатели кислородтранспортной функции крови при ишемии-реперфузии печени у крыс ( $M \pm m$ )

Показатель/единица измерения	Контроль 1-я группа ( $n = 9$ )	Ишемия-реперфузия печени			
		2-я группа ( $n = 8$ ),	+ мелатонин		
			3-я группа ( $n = 9$ ),	+ L-NAME 4-я группа ( $n = 9$ )	
$p50_{\text{реал}}$	мм рт. ст.	$32,37 \pm 0,53$	$41,62 \pm 0,58^*$	$33,29 \pm 1,61^\#$	$40,4 \pm 0,73^{*\$}$
$p50_{\text{станд}}$	мм рт. ст.	$30,91 \pm 0,91$	$34,04 \pm 0,89^*$	$29,27 \pm 1,78^\#$	$34,32 \pm 1,08^{*\$}$
Hb	г/л	$107,22 \pm 5,63$	$119,75 \pm 8,94$	$118,11 \pm 5,47$	$114,25 \pm 3,2$
MetHb	%	$0,63 \pm 0,18$	$0,41 \pm 0,13$	$0,41 \pm 0,17$	$0,25 \pm 0,07^*$
$pO_2$	мм рт. ст.	$27,78 \pm 2,71$	$35,25 \pm 1,98^*$	$28,78 \pm 4,23$	$34,0 \pm 2,9$
рН	ед.	$7,353 \pm 0,024$	$7,227 \pm 0,029^*$	$7,280 \pm 0,038$	$7,237 \pm 0,017^*$
$\text{pCO}_2$	мм рт. ст.	$48,31 \pm 4,59$	$56,68 \pm 3,24$	$56,4 \pm 4,84$	$81,46 \pm 2,32^{*\$}$
$\text{HCO}_3^-$	ммоль/л	$26,64 \pm 1,53$	$24,01 \pm 1,71$	$26,34 \pm 1,21$	$35,08 \pm 0,6^{*\$}$
$\text{TCO}_2$	ммоль/л	$28,14 \pm 1,65$	$25,75 \pm 1,77$	$28,07 \pm 1,25$	$37,56 \pm 0,57^{*\$}$
АВЕ	ммоль/л	$1,21 \pm 1,13$	$-3,63 \pm 1,77^*$	$-0,57 \pm 1,35$	$6,05 \pm 0,71^{*\$}$
SBE	ммоль/л	$0,89 \pm 1,41$	$-3,81 \pm 2,03^*$	$-0,6 \pm 1,46$	$7,45 \pm 0,84^{*\$}$
SBC	ммоль/л	$24,61 \pm 0,81$	$20,73 \pm 1,39^*$	$23,06 \pm 1,08$	$28,26 \pm 0,58^{*\$}$

Примечание: L-NAME — метилловый эфир N<sub>ω</sub>-нитро-L-аргинина (неселективный ингибитор NO-синтазы);  $p50_{\text{реал}}$  — реальные значения показателя  $p50$ ;  $p50_{\text{станд}}$  — значения показателя  $p50$  при стандартных условиях (37 °С,  $\text{pCO}_2 = 40$  мм рт. ст.); Hb — гемоглобин; MetHb — метгемоглобин;  $pO_2$  — парциальное напряжение кислорода в крови; рН — отрицательный десятичный логарифм концентрации  $\text{H}^+$ ;  $\text{pCO}_2$  — парциальное напряжение углекислого газа в крови;  $\text{HCO}_3^-$  — бикарбонат плазмы;  $\text{TCO}_2$  — общий  $\text{CO}_2$  плазмы; АВЕ — действительный избыток оснований; SBE — стандартный избыток оснований; SBC — стандартный бикарбонат плазмы.

\* — достоверное отличие по отношению к 1-й группе ( $p < 0,05$ ).

^\# — достоверное отличие по отношению ко 2-й группе ( $p < 0,05$ ).

^\\$ — достоверное отличие по отношению к 3-й группе ( $p < 0,05$ ).

и 3-й группами. Данные изменения КТФ крови сопровождались ростом содержания ДК и ОШ в крови по отношению к контрольным в 2,8 ( $p < 0,001$ ) и в 6,5 ( $p < 0,001$ ) раза, соответственно. В печени содержание ДК и ОШ увеличилось в 3,5 ( $p < 0,001$ ) и 2,7 раза ( $p < 0,001$ ), соответственно. Одновременно у крыс 4-й группы отмечено снижение концентрации  $\alpha$ -токоферола и ретинола в крови на 12,7 % ( $p < 0,001$ ) и 29,0 % ( $p < 0,001$ ), а в печени — на 13,5 % ( $p < 0,01$ ) и на 16,6 % ( $p < 0,001$ ) соответственно. Активность каталазы в эритроцитах у крыс 4-й группы в конце реперфузионного периода по отношению к контрольным не изменялась, а в печени возрастала на 53,5 % ( $p < 0,05$ ). Данные изменения параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния у животных 4-й группы были ниже, чем у крыс 3-й группы, но оставались выше, чем у 2-й группы (табл. 2). Следует отметить, что во 2-й и 4-й экспериментальных группах наблюдалось снижение суммарного содержания  $\text{NO}_x$  в крови, по сравнению с 1-й и 3-й группами (рис. 2). Во всех экспериментальных группах повышалась активность АлАТ и АсАТ в крови, которая была максимальной во 2-й и минимальной в 3-й группе (табл. 2).

Результаты исследования показывают, что у крыс при моделировании синдрома ИРП (2-я группа) развивается смешанный ацидоз, уменьшается СГК крови, резко повышается активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижается содержание  $\alpha$ -токоферола, ретинола, активность каталазы. Данные изменения свидетельствуют о сдвиге КДО крови вправо, увеличении потока кислорода в ткани в постише-

мическом периоде с последующим вовлечением  $\text{O}_2$  в свободнорадикальные процессы и нарушении прооксидантно-антиоксидантного состояния печени, т.е. о развитии окислительного стресса. Избыточная активация процессов ПОЛ может быть следствием изменения соотношения доноров и акцепторов электронов в тканях, возникающего при нарушении их кислородного обеспечения. Восстановление тока крови с низким СГК при реперфузии может усиливать данный дисбаланс и «утечку» электронов в митохондриях ишемизированных тканей с последующим свободнорадикальным повреждением клеточных мембран, нарушением функции и даже гибели гепатоцитов [3, 10]. Снижение  $\text{NO}_x$ , установленное у животных 2-й группы, могло быть следствием повреждения эндотелия активными формами кислорода, а также вовлечения  $\text{NO}$  в свободнорадикальные реакции, результатом которых может быть образование мощного окислителя — пероксинитрита. Известно, что последний играет важную роль в повреждении печени при ишемии-реперфузии [3, 13, 17].

Мелатонин (10 мг/кг, в/б, однократно) при моделировании ИРП (3-я группа) вызывал улучшение параметров КТФ крови, антиоксидантной системы, сдвиг КДО влево, снижение активности процессов ПОЛ по отношению к животным 2-й группы. Установлено, что применение мелатонина способствует повышению активности каталазы в эритроцитах и печени, что согласуется с другими исследованиями, установившими рост активности ферментов антиоксидантной системы под влиянием препарата при повреждении печени ток-

Таблица 2. Влияние мелатонина (10 мг/кг, внутривенно, однократно) на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и активность трансаминаз в крови и в печени при ишемии-реперфузии у крыс ( $M \pm m$ )

Показатель /ед.измерения	Контроль 1-я группа ( $n = 9$ )	Ишемия-реперфузия печени			
		2 группа ( $n = 8$ )	+ мелатонин		
			3 группа ( $n = 9$ )	+ L-NAME 4 группа ( $n = 9$ )	
ДК <sub>пл</sub>	$\Delta E_{233}/\text{мл}$	$0,94 \pm 0,12$	$3,96 \pm 0,4^*$	$1,86 \pm 0,13^{*\#}$	$2,63 \pm 0,24^{*\#S}$
ДК <sub>печ</sub>	$\Delta E_{233}/\text{г}$	$9,33 \pm 0,67$	$47,3 \pm 3,71^*$	$20,58 \pm 2,1^{*\#}$	$32,73 \pm 2,14^{*\#S}$
ОШ <sub>пл</sub>	ЕД/мл	$21,74 \pm 1,93$	$188,24 \pm 11,53^*$	$87,0 \pm 6,64^{*\#}$	$141,08 \pm 7,84^{*\#S}$
ОШ <sub>печ</sub>	ЕД/г	$129,4 \pm 11,2$	$500,8 \pm 58,7^*$	$256,5 \pm 24,4^{*\#}$	$344,6 \pm 23,6^{*\#S}$
$\alpha$ -Токоферол <sub>пл</sub>	мкмоль/л	$20,5 \pm 0,39$	$17,55 \pm 0,54^*$	$19,67 \pm 0,33^\#$	$18,35 \pm 0,34^{*\#S}$
$\alpha$ -Токоферол <sub>печ</sub>	мкмоль/г	$189,76 \pm 6,33$	$145,34 \pm 5,65^*$	$177,38 \pm 3,84^\#$	$164,14 \pm 2,48^{*\#S}$
Ретинол <sub>пл</sub>	мкмоль/л	$2,51 \pm 0,1$	$1,75 \pm 0,03^*$	$2,27 \pm 0,09^\#$	$1,87 \pm 0,02^{*\#S}$
Ретинол <sub>печ</sub>	мкмоль/г	$21,85 \pm 0,65$	$16,41 \pm 0,48^*$	$20,4 \pm 0,48^\#$	$18,22 \pm 0,4^{*\#S}$
Каталаза <sub>эр</sub>	ммоль/л · г Нб · с	$0,94 \pm 0,07$	$0,4 \pm 0,11^*$	$1,42 \pm 0,016^{*\#}$	$0,88 \pm 0,13^\#S$
Каталаза <sub>печ</sub>	ммоль/л · г белка · с	$3,14 \pm 0,31$	$1,1 \pm 0,3^*$	$7,61 \pm 0,5^{*\#}$	$4,83 \pm 0,53^{*\#S}$
АлАТ <sub>пл</sub>	ЕД/л	$30,38 \pm 4,48$	$314,93 \pm 35,64^*$	$76,28 \pm 12,23^{*\#}$	$189,62 \pm 18,64^{*\#S}$
АсАТ <sub>пл</sub>	ЕД/л	$38,84 \pm 5,16$	$328,68 \pm 25,85^*$	$80,76 \pm 12,27^{*\#}$	$196,06 \pm 17,77^{*\#S}$

Примечание: ДК — диеновые конъюгаты, ОШ — основания Шиффа; пл — плазма, эр — эритроциты, печ — гомогенат печени;

\* — достоверное отличие по отношению к 1-й группе ( $p < 0,05$ );

# — достоверное отличие по отношению ко 2-й группе ( $p < 0,05$ );

S — достоверное отличие по отношению к 3-й группе ( $p < 0,05$ ).

сического генеза [15]. Снижение активности процессов ПОЛ в 3-й экспериментальной группе могло быть связано с уменьшением потока  $O_2$  и образования его свободных радикалов в тканях печени после ишемии вследствие повышения СГК крови, а также с улучшением работы антиоксидантных ферментов под влиянием мелатонина. С другой стороны, мелатонин способен непосредственно устранять активные формы кислорода, что уменьшает активность свободнорадикальных процессов [9, 16]. Известно, что мелатонин может прямо взаимодействовать с гидроксильным радикалом, образуя 3-гидроксиломелатонин, который затем выводится с мочой [16]. Кроме того, мелатонин может взаимодействовать с перекисью водорода и другими активными формами кислорода, устраняя последние в так называемом “антиоксидантном каскаде мелатонина” [13]. Вместе с тем показана способность мелатонина улучшать процессы микроциркуляции при ИРП через изменение активности конституциональной и индуцируемой NO-синтаз [14].

Комбинированное использование мелатонина и L-NAME при ИРП (4-я группа) нарушало параметры КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния крови и печени, снижало содержание  $NO_x$  в крови, по сравнению с животными 1-й и 3-й групп. Однако параметры прооксидантно-антиоксидантного и отдельные показатели кислотно-основного состояния оставались здесь выше, чем во 2-й группе экспериментальных животных. Данные изменения указывают на снижение эффектов мелатонина в условиях ингибирования NO-синтазы в отношении КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс при ИРП. По-видимому, антиоксидантные эффекты мелатонина были частично опосредованы его влиянием на NO-синтазную функцию организма. Мелатонин может уменьшать экспрессию и повышать активность конституциональной NO-синтазы, тем самым увеличивая уровень в ткани оксида азота при ИРП [14]. Оптимизируя уровни NO, мелатонин может модифицировать кислородсвязывающие свойства крови, препятствует участию избытка оксида азота в формировании токсических продуктов, таких как пероксинитрит, и последующее усиление свободнорадикальных процессов в печени при реперфузии [2]. Возможно, совместное применение L-NAME и мелатонина снижает влияние последнего на баланс вазоконстрикторов и вазодилаторов при ИРП у животных 4-й группы, что приводит к снижению КТФ крови, условий микроциркуляции, ангиоспазму, усилению дисбаланса между донорами и акцепторами электронов в митохондриях и увеличению “утечки” электронов в дыхательной цепи в постшемическом периоде. Вместе с тем сохранение протекторных влияний мелатонина на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса при ингибировании данной функции с помощью L-NAME (судя по различиям с показателями 2-й группы), по-видимому,

обусловлено его прямыми антиокислительными свойствами.

Таким образом, антиокислительный эффект мелатонина при ишемии-реперфузии печени может быть связан с его способностью улучшать параметры КТФ крови, повышать активность антиоксидантных ферментов, а также прямым антиокислительным эффектом этого соединения. NO принимает важное участие в реализации протекторных влияний мелатонина на печень, применение которого оказывает корригирующее влияние на кислородсвязывающие свойства крови в постишемическом периоде.

## ВЫВОДЫ

1. Мелатонин в дозе 10 мг/кг (внутрибрюшинно, однократно) у крыс при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени способствует улучшению параметров кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени, а также NO-синтазной функции организма.

2. Ингибирование NO-синтазы снижает, но полностью не устраняет гепатопротекторные влияния мелатонина при ишемии-реперфузии, что свидетельствует об участии NO в механизмах защитного действия мелатонина при развитии реперфузионных повреждений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара, *Лаб. дело*, № 2, 60 – 64 (1988).
2. В. В. Зинчук, С. В. Глуткин, Е. В. Шульга, И. Э. Гуляй, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **76**(2), 32 – 36 (2013).
3. В. В. Зинчук, М. Н. Ходосовский, *Успехи физиол. наук*, **37**(4), 45 – 56 (2006).
4. М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев, *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
5. М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук, *Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова*, **98**(5), 610 – 617 (2012).
6. Р. Ч. Черняускене, З. З. Варшкявичене, П. С. Грибаускас, *Лаб. дело*, № 6, 362 – 365 (1984).
7. N. S. Bryan, M. B. Grisham, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**(5), 645 – 657 (2007).
8. B. L. Fletcher, C. J. Dillard, A. L. Tappel, *Analyt. Biochem.*, **52**(1), 1 – 19 (1973).
9. A. L. Guenther, S. I. Schmidt, H. Laatsch, et al., *J. Pineal. Res.*, **39**(3), 251 – 260 (2005).
10. H. Jaeschke, B. L. Woolbright, *Transplant. Rev (Orlando)*, **26**(2), 103 – 114 (2012).
11. S. Jegatheeswaran, A. K. Siriwardena, *HPB (Oxford)*, **13**(2), 71 – 78 (2011).
12. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 – 275 (1951).
13. A. M. Mathes, *World J. Gastroenterol.*, **16**(48), 6087 – 6097 (2010).
14. S. W. Park, S. M. Choi, S. M. Lee, *Arch. Pharm. Res.*, **30**(12), 1619 – 1624 (2007).
15. M. E. Shaker, M. E. Houssen, E. M. Abo-Hashem, et al., *J. Physiol. Biochem.*, **65**(3), 225 – 233 (2009).
16. D. X. Tan, L. C. Manchester, M. P. Terron, et al., *J. Pineal. Res.*, **42**(1), 28 – 42 (2007).

17. B. Vollmar, M. D. Menger, *Physiol. Rev.*, **89**(4), 1269 – 1339 (2009).

Поступила 21.04.14

## THE ROLE OF NO-DEPENDENT MECHANISMS IN MELATONIN ANTIOXIDANT ACTIVITY DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS

M. N. Khodosovskii\* and V. V. Zinchuk

Department of Pathophysiology, Grodno State Medical University, Gorki str., 80, Grodno, 230009 Belarus Republic

\* e-mail: hodosowsky@grsmu.by

The antioxidant effect of melatonin on the blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant balance during with hepatic ischemia-reperfusion (HIR) with inhibited NO synthase function has been studied in male Wistar rats. The animals were divided into 4 groups: (1) control; (2) hepatic ischemia (Pringle m., 30 min) and reperfusion for 120 min (HIR,  $n = 9$ ); (3) HIR with melatonin (10 mg/kg, i.p., 10 min before HIR,  $n = 9$ ); and (4) same with NO inhibitor (L-NAME, 10 mg/kg) added 5 min before melatonin administration. The indices of blood oxygen transport ( $p50_{act}$ ,  $pCO_2$ , pH,  $pO_2$ , etc.) and prooxidant-antioxidant balance (Schiff bases, conjugated dienes, catalase, retinol,  $\alpha$ -tocopherol) were measured in blood and liver. HIR in group 1 resulted in higher  $p50_{act}$  in mixed venous blood and sever oxidative disturbances: rise of CD and SB, decrease of  $\alpha$ -T, Ret, and Cat. Melatonin in group 3 significantly improved these changes in  $p50_{act}$  and prooxidant-antioxidant balance during HIR, but L-NAME in group 4 partly eliminated this effect. It is concluded that the antioxidant effect of melatonin during HIR is partly associated with NO-depended mechanisms, which can modify blood hemoglobin affinity to oxygen, thus limiting oxygen binding in free-radical processes.

**Keywords:** melatonin; L-NAME; hemoglobin affinity to oxygen; prooxidant-antioxidant balance; ischemia-reperfusion; liver; rats