

УДК 577.152.9:616.379-008.64

©Коллектив авторов

ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИНА НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У КРЫС

А.А. Агарков, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова*

Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет,
кафедра медицинской биохимии и микробиологии, 394006 Воронеж,
Университетская пл., 1; тел.: (0732) 20-82-78; факс: (0732) 20-87-55;
эл. почта: agalalek@mail.ru

Проведено исследование влияния мелатонина на интенсивность свободнорадикальных процессов, а также активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) и каталазы (КФ 1.11.1.6) в печени и сыворотке крови крыс при сахарном диабете 2 типа. Согласно полученным результатам, при патологии происходит возрастание параметров биохемилюминесценции и активности исследуемых ферментов. При введении мелатонина животным с сахарным диабетом 2 типа происходит изменение исследуемых показателей, в сторону значений, характерных для контрольной группы животных, что, вероятно, обусловлено реализацией антиоксидантного потенциала данного гормона.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, биохемилюминесценция, супероксиддисмутаза, каталаза, мелатонин.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что основная роль в развитии сосудистых осложнений сахарного диабета 2 типа (СД2), принадлежит неферментативному аутоокислительному гликированию биосубстратов, приводящему к окислительному стрессу [1, 2]. Окислительный стресс рассматривается, как важный патогенетический фактор развития СД2 [3-5], при котором нарушается баланс между генерацией и утилизацией активных форм кислорода (АФК) [6]. Механизм интенсификации свободнорадикального окисления (СО) высокими концентрациями глюкозы включает активацию липоксигеназного пути [7]. Развитию окислительного стресса также способствует повышение интенсивности полиольного пути метаболизма глюкозы с помощью фермента альдозоредуктазы, что сопровождается накоплением сорбитола в клетках. Повышение активности альдозоредуктазы при активации полиольного пути приводит к истощению NADPH и торможению синтеза глутатиона [8].

Повреждающему эффекту АФК противостоит система антиоксидантной защиты, способная уменьшать интенсивность свободнорадикального окисления (СО), путём нейтрализации свободных радикалов (СР) [9].

* - адресат для переписки

По современным представлениям, функция антиоксидантных ферментов в организме заключается в поддержании стационарной концентрации пероксидов и кислородных радикалов [10]. Ферментативное звено делится на две группы: во-первых, - ферменты, инактивирующие $O_2^{\cdot-}$, во-вторых, - ферменты разрушающие неорганические и органические пероксиды. К первой группе относят супероксиддисмутазу (СОД, КФ 1.15.1.1), ко второй – каталазу (КФ 1.11.1.6). СОД вместе с каталазой и другими антиоксидантными ферментами защищает организм от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов.

В настоящее время широкое распространение получили антиоксидантные препараты, которые, нормализуя интенсивность СО, способствуют снижению степени эндогенной интоксикации и, тем самым, повышают эффективность лечения [11].

В последнее время, особое внимание было сконцентрировано на мелатонине – одном из гормонов нейроэндокринной системы. Одним из наиболее изученных на данный момент аспектов его роли в организме является антиоксидантная защита. Этот гормон может ингибировать оксидативное повреждение тканей путём обезвреживания самого высокотоксичного АФК, гидроксильного радикала, а также нейтрализации оксида азота, синглетного кислорода и, в некоторой степени, пероксида водорода [12, 13].

В данной работе для мониторинга свободнорадикальных процессов (СРП) в печени и сыворотке крови крыс при СД2 и введении мелатонина использовали метод биохимилуминесценции (БХЛ), а также исследование активности антиоксидантных ферментов: СОД и каталазы.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали белых крыс-самцов (*Rattus rattus* L.) массой 150-200 г. СД2 индуцировали внутримышечным введением протамин-сульфата в течение 3-х недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объёме 0,5 мл 0,85% NaCl, 3 раза в сутки [14].

Животные были разделены на 3 экспериментальные группы: 1) контроль (n=12) составили животные, содержащиеся в условиях стандартного режима вивария; 2) животным 2 группы (n=10) индуцировали сахарный диабет 2-го типа при помощи протамин-сульфата; 3) животным 3 группы (n=10) с СД2 внутрибрюшинно вводили мелатонин в виде раствора в 1 мл 0,9% раствора NaCl в дозе 2 мг/кг веса на 15 сутки после начала индуцирования СД2, троекратно с интервалом в один день. На 21-е сутки после начала эксперимента осуществляли забор биоматериала для исследований.

Печень наркотизированных крыс извлекали после перфузии ледяным изотоническим раствором через портальную вену со скоростью 5 мл/мин в течение 5 мин. Навеску печени крысы гомогенизировали путём растирания ткани в фарфоровой ступке с кварцевым песком в 4-кратном объёме охлаждённой среды выделения. Среда имела следующий состав: 0,1 М трис-HCl буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 12 мин. Супернатант использовали для исследования.

Венозную кровь набирали в стеклянную пробирку без антикоагулянта и помещали на 0,5 ч в термостат при температуре 37°C, затем центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин. Полученную сыворотку использовали для дальнейшего исследования.

Для определения интенсивности СРП применяли метод биохимилуминесценции (БХЛ), индуцированной пероксидом водорода с сульфатом железа [15]. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали

в течение 30 с и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{\max}), характеризующие интенсивность СРП, и величину тангенса угла наклона кривой ($\text{tg}\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность.

Среда для определения интенсивности биохемилюминесценции имела следующий состав: 0,4 мл 0,02 М калий-фосфатный буфер (pH 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ FeSO_4 , 0,2 мл 2% раствора пероксида водорода (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый материал вносили в количестве 0,1 мл перед измерением.

Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата (ФМС) и NADH [16], которое определяли при длине волны 540 нм на спектрофотометре Hitachi U1900 с программным обеспечением. Среда спектрофотометрирования включала следующие компоненты: 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,8), 0,33 мМ ЭДТА, 0,41 мМ НСТ, 0,01 мМ ФМС, 0,8 мМ NADH. Исследуемый образец вносили в количестве 0,03 мл на 1 мл среды инкубации. Реакцию запускали добавлением NADH. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-ного ингибирования восстановления НСТ.

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм. Используемый метод определения активности каталазы основан на способности пероксида водорода образовывать стойкий окрашенный комплекс с молибдатом аммония [17].

Активность ферментов выражали в ферментативных единицах на 1 г сырой массы и на 1 мл сыворотки. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Общий белок определяли биуретовым методом.

Количество С-пептида в сыворотке крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора C-peptide (Rat) ELISA фирмы "ALPCO™".

Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. В работе использовали реактивы Трис, ЭДТА ("Reanal", Венгрия), остальные реактивы отечественного производства марки "хч" или "чда".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В сыворотке крови животных, которым вводили протамин-сульфат, обнаружено прогрессирующее увеличение содержания глюкозы (рис. 1). Содержание глюкозы в сыворотке крыс через три недели после начала введения протамин-сульфата превышало контрольный уровень в 2,6 раза. Введение мелатонина крысам с СД2 приводило к снижению уровня гликемии по сравнению с патологией (рис. 1). Так, при введении мелатонина концентрация глюкозы в крови на 19 сутки после начала эксперимента снижалась в 1,8 раза. Концентрация С-пептида в крови крыс, которым вводили протамин-сульфат, не претерпела достоверных изменений. Поскольку этот показатель отражает уровень синтеза инсулина, можно утверждать, что у экспериментальных животных с гипергликемией была сохранена функция островковых β -клеток поджелудочной железы, таким образом, у крыс развивался СД2. При введении мелатонина также не наблюдалось достоверных изменений в уровне С-пептида по сравнению с патологией. Развитие СД2 сопровождалось увеличением светосуммы БХЛ (S) в печени крыс в 2,6 раза, в сыворотке крови – в 2,4 раза по сравнению

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС КРЫС ПРИ ДИАБЕТЕ

со значениями, полученными для контрольных животных (рис. 2А). У животных с СД2 также наблюдалось возрастание интенсивности максимальной вспышки БХЛ (I_{\max}) в печени в 2,1 раза, а в сыворотке крови в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 2Б). Очевидно, значительное увеличение S и I_{\max} как в печени, так и в сыворотке крови крыс свидетельствует об интенсификации СО в условиях развития патологии. Активация полиольного шунта, в ходе которого потребляется большое количество NADPH, может выступать в качестве основной причины усиления СРП при СД2. Последующее превращение образовавшегося при этом сорбитола во фруктозу с участием сорбитолдегидрогеназы сопровождается увеличением соотношения $NADH/NAD^+$. Данное состояние характеризуется как “редуктивный стресс”, или “гипергликемическая псевдогипоксия”, поскольку аналогичные изменения возникают при развитии тканевой гипоксии [18]. Следствием данного состояния может быть изменение степени восстановленности компонентов электронтранспортной цепи, приводящее к повышению вероятности образования АФК. В условиях гипергликемии свободные радикалы также образуются в процессе аутоокисления глюкозы в ходе формирования конечных продуктов гликирования, которые, в свою очередь, также участвуют в патогенезе ангиопатий, способствуют нарастанию ишемии и интенсификации СРП в тканях при СД [19]. Усиление гликирования гемоглобина приводит к вторичной тканевой гипоксии [6].

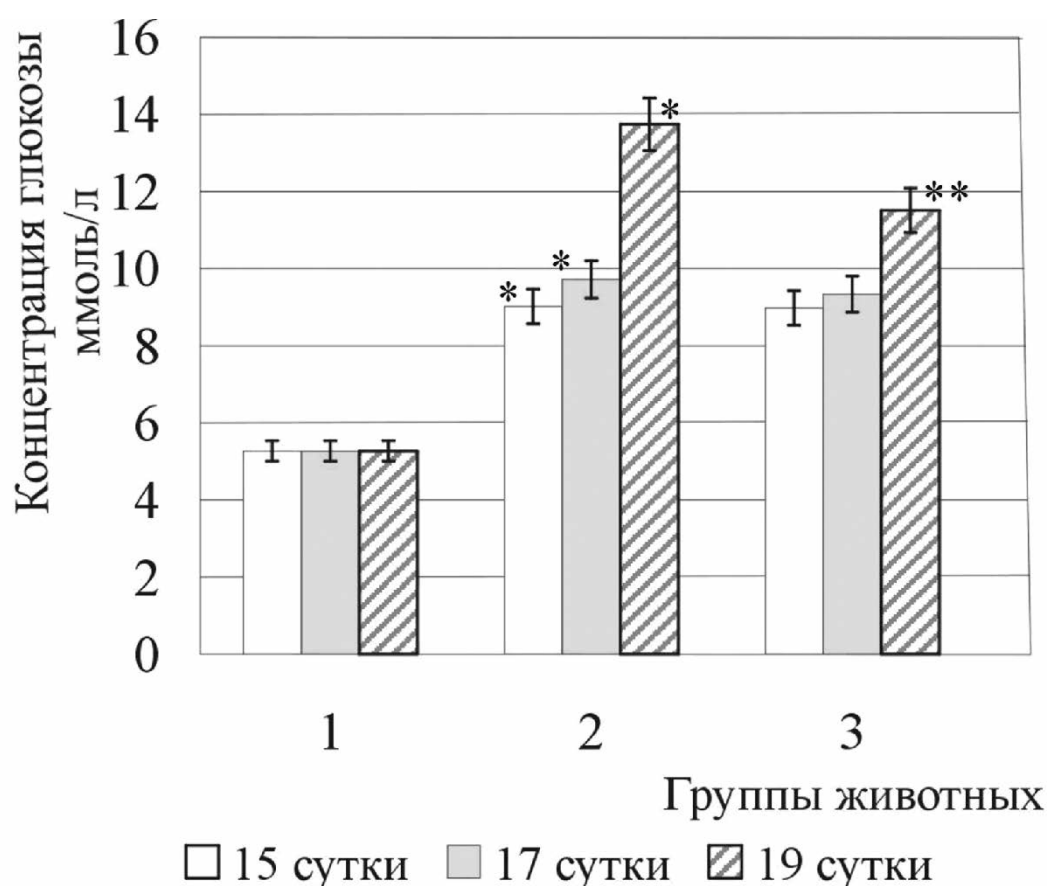


Рисунок 1.

Концентрация глюкозы в сыворотке крови крыс контрольной группы (1); при сахарном диабете 2-го типа (2) и при введении мелатонина животным с патологией (3). Здесь и в других рисунках достоверность значений $p \leq 0,05$;

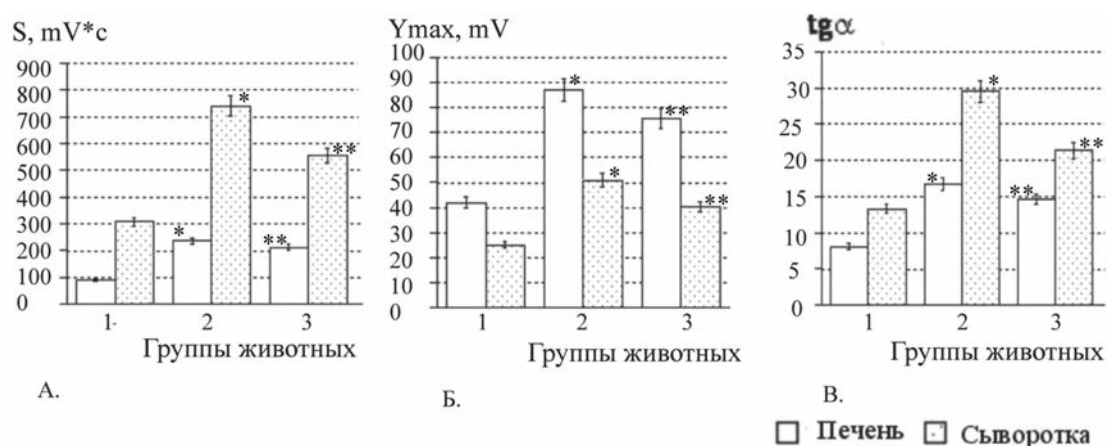


Рисунок 2.

Параметры биохемилюминесценции: А - светосумма вспышки (S); Б - интенсивность вспышки (I_{\max}); В - тангенс угла падения кинетической кривой в печени и сыворотке крови крыс контрольной группы (1); при сахарном диабете 2-го типа (2) и при введении мелатонина животным с патологией (3).

В результате проведенных исследований у животных с СД2 было выявлено увеличение значения такого параметра биохемилюминесценции, как $\text{tg}\alpha_2$: в печени в 2,1 раза, в сыворотке крови в 2,2 раза по сравнению с группой контрольных животных (рис. 2В). Так как значение $\text{tg}\alpha_2$ характеризует общую антиоксидантную активность организма, то можно предположить, что в условиях развития СД2 происходит мобилизация компенсаторных механизмов, направленных на снижение уровня СО в организме.

В частности, у животных с экспериментальным СД2 обнаружено увеличение удельной активности СОД в печени в 2,6 раза (рис. 3), в сыворотке крови – в 1,9 раза (рис. 4) по сравнению с контрольными животными. Кроме того, выявлено возрастание удельной активности каталазы в печени и сыворотке крови в 2,7 раза (рис. 5, 6). Известно, что уровень активности внутриклеточных ферментативных антиоксидантных систем, в частности, супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, генетически детерминирован. Избыточное накопление в клетках супероксидного анион-радикала или пероксида водорода сопровождается дерепрессией участков генома, ответственных за активность ферментов антирадикальной защиты клеток [20]. В связи с этим, очевидно, что обнаруженное увеличение активности СОД и каталазы на при СД2 носит адаптивно-компенсаторный характер в ответ на чрезмерное образование АФК. Полученные нами данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о повышении активности СОД в печени крыс при сахарном диабете, индуцированном стрептозоцином, а также в поджелудочной железе крыс при инкубации с глюкозой [21, 22]. По-видимому, СОД и каталаза действуют как звенья антиоксидантной системы, обеспечивая детоксикацию первичных АФК [23].

Введение мелатонина крысам с патологией способствовало снижению S в печени и сыворотке крови по сравнению со значением при СД2 (рис. 2А). Так, величина S при действии мелатонина снижалась в печени и сыворотке крови крыс соответственно в 1,5 и 1,6 раза. Введение гормона крысам с СД2 также приводило к снижению I_{\max} в печени в 1,3 раза, в сыворотке в 1,5 раза по сравнению с патологией (рис. 2Б). Полученные данные могут быть объяснены с точки зрения проявления антиоксидантных свойств мелатонина. Так, по литературным данным, мелатонин может взаимодействовать с рядом активных кислородных метаболитов [24, 25].

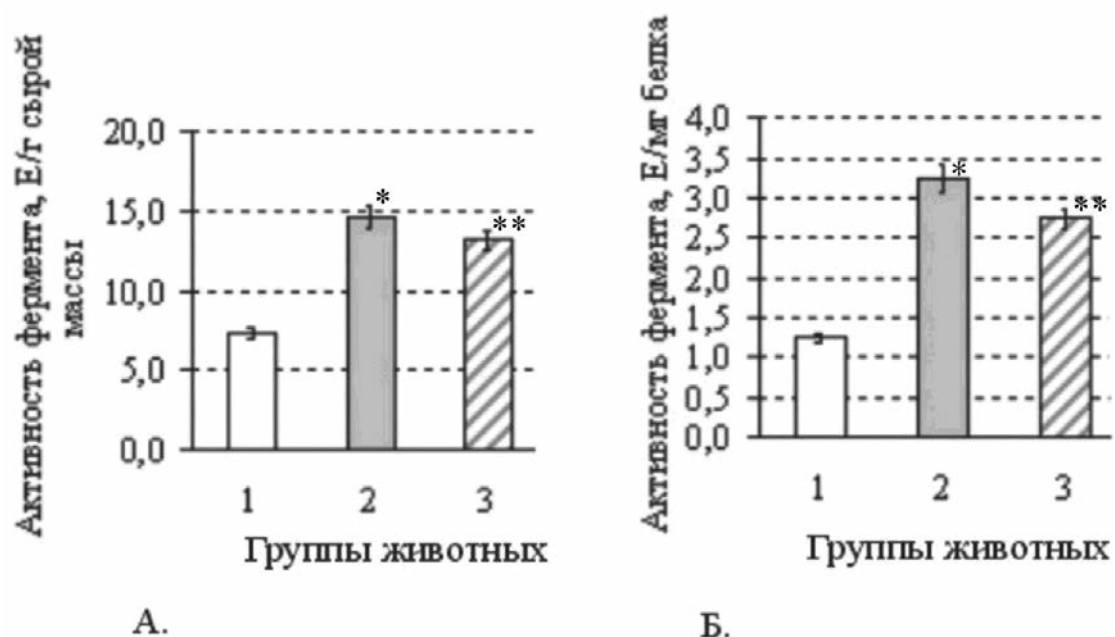


Рисунок 3.

Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/г сырой массы (А) и в Е/мг белка (Б), в печени крыс контрольной группы (1); при сахарном диабете 2-го типа (2) и при введении мелатонина животным с патологией (3).

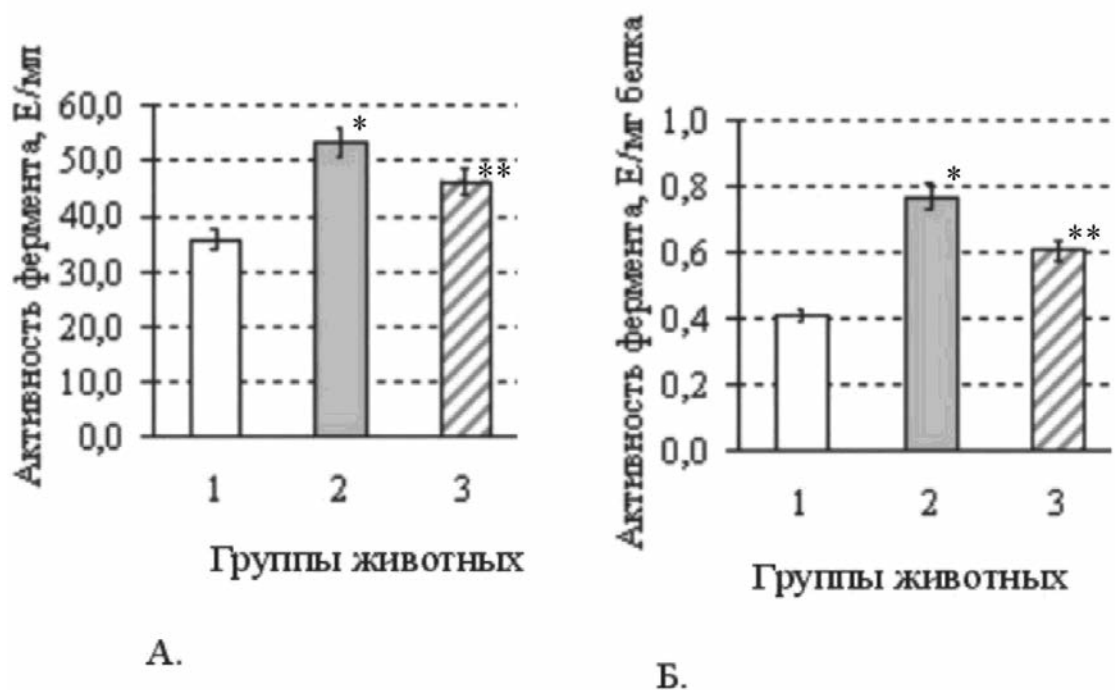


Рисунок 4.

Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/мл (А) и в Е/мг белка (Б), в сыворотке крови крыс контрольной группы (1); при сахарном диабете 2-го типа (2) и при введении мелатонина животным с патологией (3)

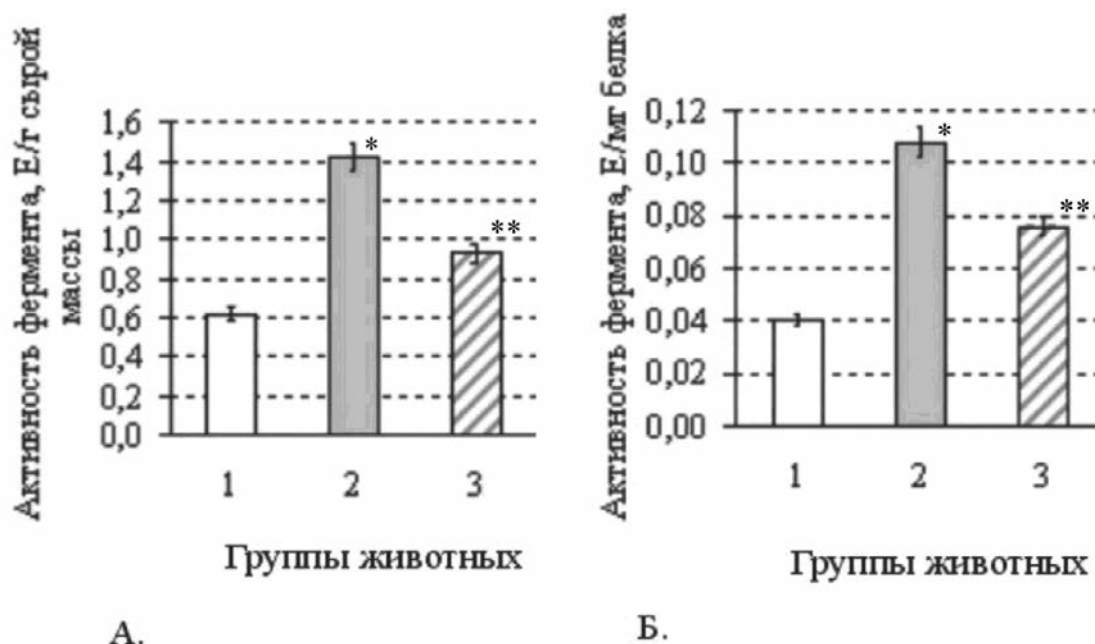


Рисунок 5.

Активность каталазы, выраженная в Е/г сырой массы (А) и в Е/мг белка (Б), в печени крыс контрольной группы (1); при сахарном диабете 2-го типа (2) и при введении мелатонина животным с патологией (3).

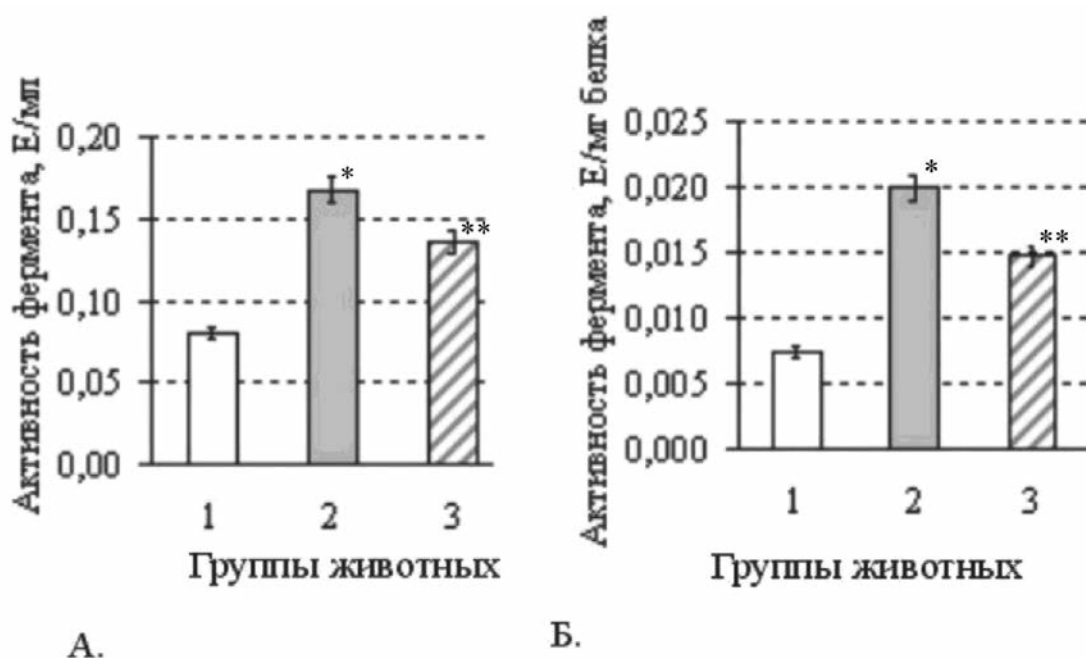


Рисунок 6.

Активность каталазы, выраженная в Е/мл (А) и в Е/мг белка (Б), в сыворотке крови крыс контрольной группы (1); при сахарном диабете 2-го типа (2) и при введении мелатонина животным с патологией (3).

В ходе эксперимента было зарегистрировано снижение $\text{tg}\alpha_2$ под воздействием мелатонина в печени и в сыворотке соответственно в 1,3 и 1,6 раза по сравнению с патологией (рис. 2В). Это, очевидно, связано с уменьшением степени мобилизации АОС в условиях торможения СРП.

Так, при введении мелатонина животным с СД2 отмечалось снижение активности СОД по сравнению с активностью в патологическом состоянии (рис. 3, 4). Показано, что удельная активность этого фермента при действии мелатонина снижалась в печени и сыворотке крови крыс соответственно в 1,5 и 1,6 раза.

Также при введении мелатонина было обнаружено снижение активности каталазы по сравнению с показателями при СД2. Удельная активность каталазы при действии мелатонина уменьшалась в печени и сыворотке крови крыс соответственно в 1,8 и 2,1 раза (рис. 5, 6).

Изменения активностей СОД и каталазы, выраженных в Е/грамм сырой массы печени и Е/мл сыворотки, демонстрировали ту же тенденцию, что и изменения удельной активности ферментов (рис. 3-6).

Таким образом, мелатонин способствует снижению уровня активности СОД и каталазы при СД2, вероятно, уменьшая интенсивность СО в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И., Креминская В.М., Клебанова Е.М. (2005) Роль дисфункции эндотелия и окислительного стресса в механизмах развития ангиопатий при сахарном диабете 2-го типа, Медиасфера, М.
2. Julien J. (1997) Diab. Compl., **11**, 123–130.
3. Ramakrishna V., Jailkhani R. (2008) Acta Diabetol., **45**(1), 41–46.
4. Soliman G.Z. (2008) Singapore Med. J., **49**(2), 129–136.
5. Goodarzi M.T., Varmaziar L., Navidi A.A., Parivar K. (2008) Saudi Med. J., **29**(4), 503–506.
6. Baynes J.W., Thorpe J.W. (1999) Diabetes, **48**, 1–9.
7. Rajeswari P., Natarajan R., Nadler J.L., Kumar D., Kalra V.K. (1991) J. Cell Physiol., **149**, 100–109.
8. Антонова К.В., Недосугова Л.В. (2008) Трудный пациент, **6**(10), 17–22
9. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горобец Н.И. (2004) Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия, Морион, К.
10. Кулинский В.И. (1999) Соросовский образовательный журнал, №1, 2–7.
11. Попова Т.Н., Пашков А.Н., Семенихина А.В., Попов С.С., Рахманова Т.И. (2008) Свободнорадикальные процессы в биосистемах: Учебное пособие, Старый Оскол: Кириллица.
12. Reyes-Toso C.F., Ricci C.R., De Mignone I.R., Reyes P., Linares L.M., Albornoz L.E., Cardinali D.P., Zaninovich A. (2003) Neuroendocrinol. Lett., **24**(5), 341–344.
13. Floyd R.A., West M.S., Eneff K.L., Schneider J.E. (1991) Arch. Biochem. Biophys., **273**, 106–111.
14. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. (2000) Вопросы мед. химии, **46**(2), 149–154.
15. Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А., Корниец Г.В., Холодова Ю.А. (1997), Биохимия, **62**(6), 712–715.
16. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д. (1991) Лаб. дело., №7, 16–19.
17. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. (1988) Лаб. дело., №1, 16–19.

18. Baynes J.W., Thorpe J.W. (1999) *Diabetes*, **48**, 1-9.
19. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. (2000) Проблемы эндокринологии, №6, 29–34.
20. Десянин Н.В., Герасимов А.М. (1993) Механизмы антиоксидантной защиты организма при изменении режима кислородного обеспечения, Материалы международной научной конференции, Гродно, с. 18-19.
21. Shaker M.E., Houssen M.E., Abo-Hashem E.M., Ibrahim T.M. (2009) *J. Physiol. Biochem.*, **65**(3), 225-234.
22. Oliveira H.R., Curi R., Carpinelli A.R. (1999) *Am. J. Physiol.*, **276**, 507-510.
23. Дубинина Е.Е. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 561-581.
24. Reiter R.J., Tan D.-X., Osuna C., Gitto E. (2000) *J. Biomed. Sci.*, **7**(6), 444-458.
25. Peschke E.J. (2008) *Pineal Res.*, **44**(1), 26-40.

Поступила: 04. 02. 2011.

EFFECT OF MELATONIN ON ANTIOXIDANT STATE UNDER TYPE II DIABETES AT RAT

A.A. Agarkov, T.N. Popova, L.V. Matasova

Voronezh State University, Biology and Soil Science Faculty, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394006 Russia; tel.: (0732) 20-82-78; fax: (0732) 20-87-55; e-mail: agalalek@mail.ru

The effect of melatonin on the intensity of free radical processes and activities of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1.) and catalase (EC 1.11.1.6) has been investigated in liver and blood serum of rats with diabetes mellitus type II. The development of diabetes was accompanied by the increase in biochemiluminescence parameters and the enzyme activities studied. Melatonin administration changed the parameters studied towards control values.

Key words: diabetes mellitus type II, biochemiluminescence, superoxide dismutase, catalase.