

УДК 577.152.3:615.214

©Коллектив авторов

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНОВОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕЛАКСЕНА И ВАЛЬДОКСАНА НА ФОНЕ ГИПЕРТИРЕОЗА У КРЫС

М.В. Горбенко^{1*}, Т.Н. Попова¹, К.К. Шульгин¹, С.С. Попов²

¹Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет,
кафедра медицинской биохимии и микробиологии,
394006, Воронеж, Университетская пл., 1; тел.: 8(473)2208278;
эл. почта: marinagorbenko87@mail.ru

²Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко,
394000, Воронеж, ул. Студенческая, 10

Проведено исследование активности глутатионовой антиоксидантной системы и содержания диеновых конъюгатов (ДК) в печени и сыворотке крови при введении мелаксена и вальдоксана крысам с экспериментальным гипертиреозом. Установлено, что активности глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионтрансферазы (ГТ), возрастающие у животных с гипертиреозом, изменялись в сторону контрольных значений, при введении данных препаратов. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) при действии мелаксена и вальдоксана увеличивалось по сравнению со значениями при исследуемой патологии, что, очевидно, могло быть связано со снижением его расходования на обезвреживание токсических продуктов свободнорадикального окисления (СО). Уровень ДК в печени и сыворотке крови крыс, возрастающий при экспериментальном гипертиреозе, при введении препаратов, корректирующих уровень мелатонина, также приближался к контрольным величинам. Результаты исследования указывают на позитивное влияние мелаксена и вальдоксана на свободнорадикальный гомеостаз, что, по-видимому, сопровождается уменьшением нагрузки на глутатионовую антиоксидантную систему по сравнению с патологией.

Ключевые слова: гипертиреоз, свободнорадикальное окисление, глутатионовая антиоксидантная система, мелаксен, вальдоксан.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Синдром гипертиреоза, обусловленный гиперпродукцией гормонов щитовидной железы, относится к одной из часто встречаемых эндокринопатий [1]. При данном заболевании из-за избытка тиреоидных гормонов (ТГ) происходят нарушения функционирования сердечно-сосудистой, пищеварительной, центральной нервной систем. В частности, в условиях длительно существующего тяжелого тиреотоксикоза могут развиваться дистрофические изменения в печени (тиреотоксический гепатоз).

Имеются данные, что высокие концентрации тиреоидных гормонов индуцируют окислительный стресс в печени, сердце и скелетной мускулатуре крыс [2], что приводит к увеличению образования активных форм кислорода (АФК) и интенсификации пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Первичные продукты ПОЛ – диеновые конъюгаты (ДК), относятся к токсическим метаболитам, оказывающим повреждающее действие на липопротеины, нуклеиновые кислоты и другие биомолекулы [3].

При чрезмерном образовании АФК активируется работа антиоксидантной системы (АОС), которая направлена на предупреждение неблагоприятных последствий оксидативного стресса. Одним из важнейших звеньев АОС является глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная (ГР/ГП) система, использующая в качестве субстрата глутатион. Антиоксидантные свойства GSH определяются его способностью взаимодействовать с АФК, кроме того, он играет роль восстановленного кофактора в глутатионпероксидазной реакции. ГП является ключевым ферментом, осуществляющим утилизацию АФК и продуктов пероксидации. Благодаря функционированию ГР обеспечивается повышение уровня GSH без усиления его синтеза [4]. ГТ является важным компонентом антиоксидантной защиты, осуществляющим детоксикацию продуктов ПОЛ, генерируемых в эндоплазматическом ретикулуме при метаболизме ксенобиотиков [5].

В настоящее время повышается интерес к исследованию биологически активных препаратов, способных активировать АОС и обладающих антиоксидантными свойствами. Следует отметить, что в последнее время появились исследования, направленные на изучение антиоксидантной активности мелаксена и вальдоксана [6, 7]. Мелаксен является препаратом, имеющим в своем составе мелатонин. Как известно, мелатонин – нейрогормон, продуцируемый у человека и других позвоночных эпифизом, а также клетками диффузной эндокринной системы, по структуре является дериватом аминокислот, принимает участие в синхронизации сезонных и суточных ритмов организма, в нейроэндокринной регуляции функций желудочно-кишечного тракта, репродуктивной, иммунной систем, тормозит некоторые функции гипоталамо-гипофизарной системы, обладает противоопухолевым, антистрессовым эффектами [8]. Вальдоксан является мощным лигандом мелатониновых рецепторов и антагонистом серотонин-2С и серотонин-2В рецепторов. Подобно другим мелатонинергическим препаратам вальдоксан способен имитировать эффекты мелатонина в синхронизации циркадных ритмов [9].

Целью настоящей работы явилась оценка уровня GSH, активностей ГР, ГП, ГТ, а также содержания ДК в печени и сыворотке крови крыс при действии мелаксена и вальдоксана на фоне экспериментального гипертиреоза у крыс.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus L.*) массой 150-200 г. Животные были разделены на следующие экспериментальные группы: 1-ая группа (контроль; n=16) содержалась на стандартном режиме вивария;

2-ая группа (n=19) – животные, которым для индуцирования экспериментального тиреотоксикоза вводили внутривентально трийодтиронин в дозе 100 мкг на 100 г массы тела в виде раствора в 0,9% NaCl, инъекции осуществляли трижды в течение 6 дней [8]; в 3-й и 4-й группах (n=18) животным после индуцирования экспериментального тиреотоксикоза вводили мелаксен внутривентально в дозе 5 и 10 мг/кг веса животного в виде раствора в 0,9% NaCl, ежедневно в течение 3-х дней; в 5-й и 6-й группах (n=18) крысам с экспериментальным гипертиреозом вводили вальдоксан внутривентально в дозах 5 и 10 мг/кг веса животного, в течение 3-х дней эксперимента в утренние часы. Образцы для анализа забирали на 7-е сутки после начала эксперимента.

При получении гомогената навеску печени крысы гомогенизировали в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения (0,1 М трис-HCl-буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол) и центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. Для получения сыворотки использовали венозную кровь.

Активность исследуемых ферментов определяли на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением. Измерение активности ГП проводили в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4) содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ H₂O₂, 1 ед/мл ГР. Контрольная проба не содержала восстановленный глутатион. Измерение активности ГР проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH и 0,8 мМ GSH. Измерение активности ГТ проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH. О скорости ферментативной реакции судили по изменению оптической плотности при 340 нм. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 микромоля продукта реакции за 1 мин при 25°C. Активность ферментов выражали в ферментативных единицах в расчёте на мл сыворотки и на грамм сырой массы.

Концентрацию восстановленного глутатиона определяли с помощью реакции с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой [11]. Содержание ДК определяли спектрофотометрически при 233 нм [12].

Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при p≤0,05 [13]. В работе использовали NADPH, ЭДТА, ГР (“Sigma”, США), глутатион окисленный и восстановленный (“INC”, США) остальные реактивы отечественного производства марки “хч” или “чда”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Согласно полученным результатам, при введении мелаксена и вальдоксана на фоне развития гипертиреоза в тканях животных отмечается увеличение содержания GSH по сравнению с данными при патологии. Так, было показано, что воздействие мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг приводит к возрастанию содержания GSH: в 1,2 и 1,3 раза в печени и в 1,3 раза в сыворотке крови крыс по сравнению с животными с патологией. При введении вальдоксана в соответствующих дозах происходило увеличение содержания GSH в печени в 1,4 и 1,5 раза, в сыворотке крови в 1,3 и 1,2 раза соответственно по сравнению с животными с экспериментальным гипертиреозом (рис. 1). В этой связи следует ответить, что согласно литературным данным мелатонин является мощным тушителем гидроксильного радикала, в результате чего снижается уровень ПОЛ при гипертиреозе и уменьшается расход глутатиона [14].

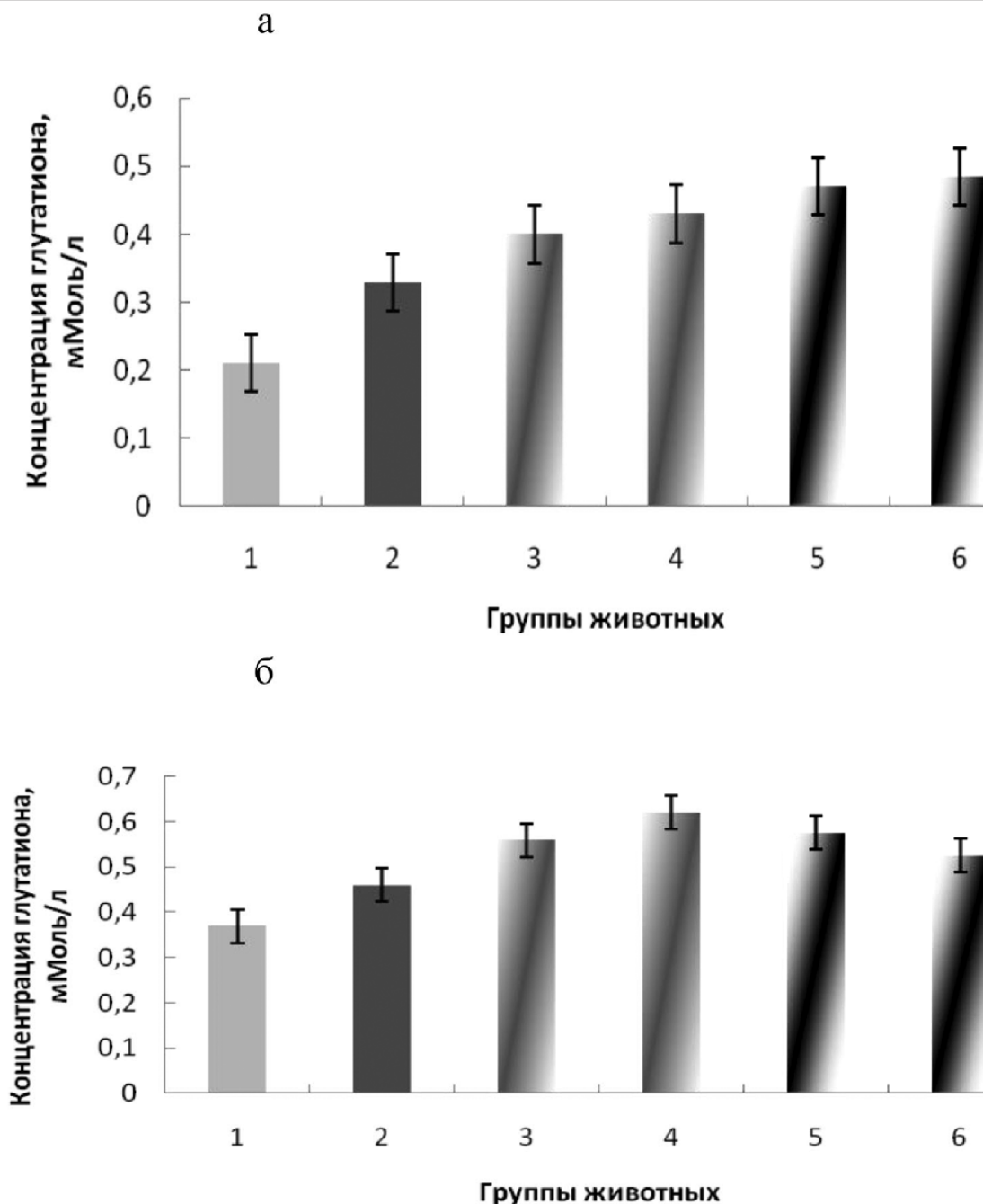


Рисунок 1.

Концентрация глутатиона в сыворотке крови (а) и печени (б) крыс в норме (1), при патологии (2), при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг на фоне гипертиреоза (3,4), при введении вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг при развитии патологии (5,6).

При введении на фоне развития гипертиреоза препаратов, корригирующих уровень мелатонина, отмечается снижение активностей ГП и ГР в печени и сыворотке крови крыс, значительно возрастающих при патологии (рис. 2).

Так, активность ГР в сыворотке крови, увеличивающаяся в патологическом состоянии в 1,4 раза, снижалась на 8 и 9% при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг (рис. 2б). Активность ГП в сыворотке,

также возрастающая при экспериментальном гипертиреозе в 1,4 раза, уменьшалась при воздействии мелаксена в указанных дозах в 1,3 раза (рис. 2б). В печени крыс активность ГР и ГП, выраженная в Е на грамм сырой массы, увеличивающаяся при патологии в 1,7 раза, в обоих случаях снижалась в 1,4 раза при введении мелаксена (рис. 2а,б соответственно).

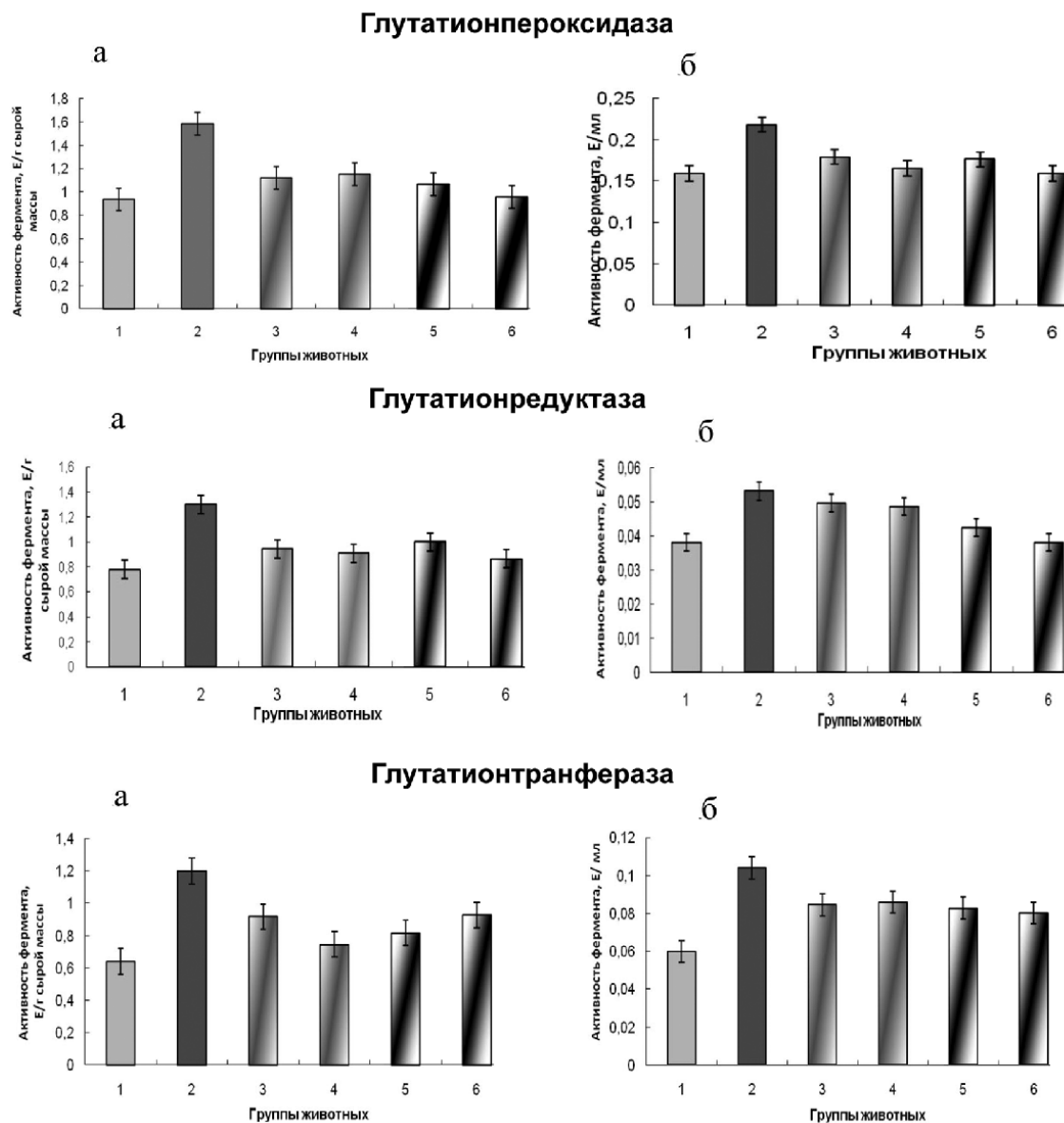


Рисунок 2.

Активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы, выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени (а) и Е на мл сыворотки крови (б) крыс в норме (1), при экспериментальном гипертиреозе (2), при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг (3,4), при введении вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг (5,6).

Очевидно, наблюдаемые изменения активности исследуемых ферментов при патологии являются защитной реакцией организма при развитии гипертиреоза и могут быть как результатом их активации, так и стимуляции синтеза. Кроме того, изменения активности ГП и ГР в сыворотке могут быть

результатом их выхода из клеток в кровь вследствие повреждения тканей при окислительном стрессе, индуцируемом избытком тиреоидных гормонов. В связи с этим следует отметить, что мелаксен, являясь синтетическим аналогом мелатонина, способен эффективно обезвреживать свободные радикалы (СР). Такой механизм его действия, приводит к снижению интенсивности процессов ПОЛ, и как следствие, уменьшению функциональной нагрузки на систему ГП/ГР [15].

Воздействие вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг на активность ГП, выраженной в Е/мл сыворотки, приводит к её снижению в 1,2 и 1,4 раза по сравнению со второй группой животных. При этом активность ГР снижается в 1,3 и 1,4 раза соответственно. При введении вальдоксана на фоне развития патологии, происходит снижение активности ГП, выраженной в Е на грамм сырой массы, в печени крыс в 1,5 и 1,7 раза соответственно, а активность ГР снижается в 1,3 и 1,5 раза по сравнению с животными с гипертиреозом (рис. 2а,б).

Влияние вальдоксана, вероятно, взаимосвязано с особенностями структуры этого соединения, в котором индольное кольцо мелатонина замещено на нафталиновую кольцевую систему. За счёт этого, он обладает высокой селективностью к мелатониновым рецепторам (MT1 и MT2), основная часть которых сконцентрирована на супрахиазматических ядрах. Это обуславливает его способность обеспечивать коррекцию уровня мелатонина, который может выступать в качестве перехватчика СР, что приводит к снижению интенсивности процессов ПОЛ, и как следствие уменьшению мобилизации системы ГП/ГР [16].

Развитие экспериментального гипертиреоза сопровождалось увеличением активности ГТ в печени в 1,9 раза, в сыворотке крови крыс в 1,7 раза по сравнению с контрольным уровнем. При введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг крысам с гипертиреозом было выявлено снижение активности ГТ в сыворотке крови в 1,2 раза, а при воздействии вальдоксана – в 1,3 раза, по сравнению с уровнем при патологии (рис. 2б). Активность ГТ в печени крыс, выраженная в Е на грамм сырой массы, при введении мелаксена крысам с патологией снижалась в 1,3 и 1,6 раза, а при воздействии вальдоксана в 1,5 и 1,3 раза по сравнению с животными с гипертиреозом (рис. 2а).

Это согласуется с результатами исследования уровня ДК. Так, содержание ДК, возрастающее при экспериментальном гипертиреозе в 1,5 раза в печени, снижалось при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг на 9% и 8%, а при введении вальдоксана в 1,2 и 1,4 раза соответственно, по сравнению с патологией (рис. 3а). Воздействие исследуемых препаратов в дозах 5 и 10 мг/кг приводило к уменьшению содержания ДК в сыворотке крови крыс в 1,2 раза, уровень которых возрастал в 1,7 раза при гипертиреозе (рис. 3б). Снижение уровня СО может быть обусловлено действием мелатонина как непосредственного перехватчика радикалов в различных органах и тканях. Известно, что в процессе формирования N'-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамина из мелатонина, нейтрализуется до четырёх различных типов свободных радикалов [17].

Таким образом, корректирующее действие мелаксена и вальдоксана на секрецию и содержание мелатонина способствовало уменьшению содержания первичных продуктов ПОЛ – ДК, что сопровождалось изменением активностей ГР, ГП и ГТ в сторону контрольных значений, а также возрастанием уровня глутатиона, связанным, очевидно, с уменьшением степени его расходования.

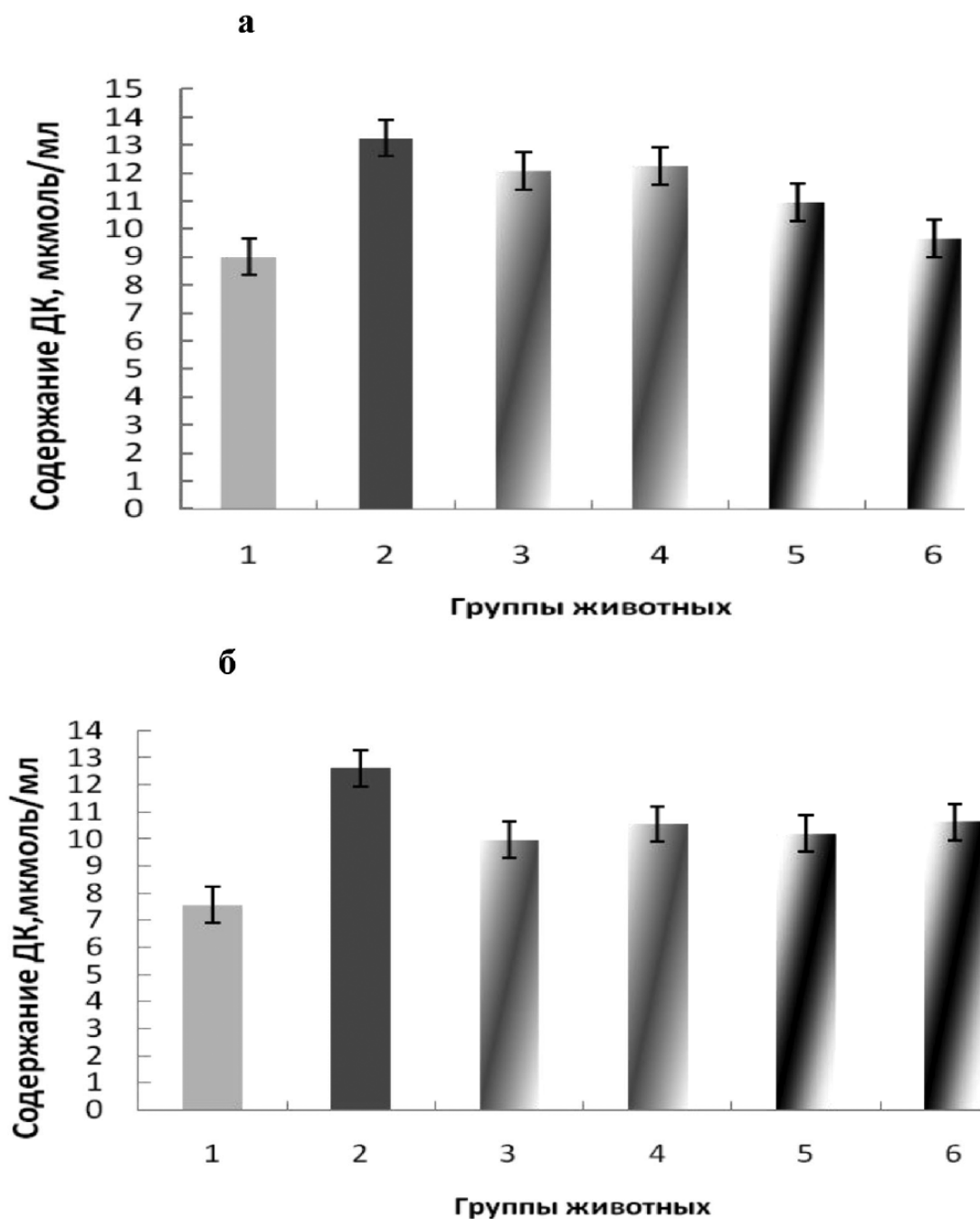


Рисунок 3.

Содержание ДК в сыворотке крови (а) и печени (б) крыс в норме (1), при экспериментальном гипертиреозе (2), при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг (3,4), при введении вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг (5,6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. При введении мелаксена и вальдоксана крысам с гипертиреозом происходит снижение активности ферментов глутатионовой антиоксидантной системы, а также уровня ДК по сравнению с этими показателями при патологии. По-видимому, в присутствии данных препаратов, оказывающих антиоксидантное действие, происходит торможение свободнорадикальных процессов, что приводит к снижению степени мобилизации глутатионowego звена АОС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин А.П., Лукьянчиков В.С., Кхань Вьей Нгуен (2000) Проблемы эндокринологии, №4, 23-26.
2. Asayama K., Dobashi K., Hayashibe H. (1987) Endocrinology, **121**, 2112-2118.
3. Тишенина Р.С., Филоненко Т.А., Древаль А.В. (2000) Проблемы эндокринологии, №6, 26-28.
4. Upton J.R., Edens F.W., Ferket P.R. (2009) J. Appl. Poult. Res., **18**, 193-202.
5. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) J. Biol. Chem., **22**, 7130-7139.
6. Левин Я.И. (2012) Consilium med., **2**, 111-115.
7. Fornaro M., Prestia D., Colicchio S., Perugi G. (2010) Curr. Neuropharmacol., **8**(3), 287-304.
8. Барабой В.А. (2000) Укр. биохим. ж., №3, 5-11.
9. Strat Y., Gorwood P. (2008) J. Psychopharmacol., **22**(7), 4-8.
10. Fernandez V., Simizu K., Barros S.B.M. (1991) Endocrinology, **129**, 85-91.
11. Бузлама В.С. (1997) Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты организма у животных, Воронеж.
12. Стальная И.Д. (1977) Современные методы в биохимии, Медицина, М., 63-64.
13. Ллойд Э., Ледерман У. (1990) Финансы и статистика, Москва, 493-513.
14. Reiter R.J. (2006) News Physiol. Sci., **15**(5), 246-250.
15. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.К., Анисимов В.Н. (2004) Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта, ИД Медпрактика, М.
16. Loo H., Hale A., Dhaenen H. (2002) Int. Clin. Phychopharmacol., **17**, 239-247.
17. Sanchez-Barcelo E.J., Martinez-Campa C.M., Mediavilla M.D., Gonzalez A., Alonso-Gonzalez C., Cos S. (2007) Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery, **1**(2), 142-151.

Поступила: 06. 12. 2011.

**THE ACTIVITY OF GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM AT MELAKSEN
AND VALDOXAN ACTION UNDER EXPERIMENTAL HYPERTHYROIDISM IN RATS**

M.V. Gorbenko¹, T.N. Popova¹, K.K. Shulgin¹, S.S. Popov²

¹Voronezh State University, Biology and Soil Science Faculty, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394006 Russia; tel.: 8(473)2208278;
e-mail: marinagorbenko87@mail.ru

²Voronezh State Medical Academy N. Burdenko, Studentcheskaya ul., 10, Voronezh, 394000 Russia

Investigation of glutathione antioxidant system activity and diene conjugates content in rats liver and blood serum at the influence of melaksen and valdoxan under experimental hyperthyroidism (EG) has been revealed. It has been established that the activities of glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GP) and glutathione transferase (GT), growing at pathological conditions, change to the side of control value at these substances introduction. Reduced glutathione content (GSH) at melaxen and valdoxan action increased compared with values under the pathology, that, obviously, could be associated with a reduction of its spending on the detoxication of free radical oxidation (FRO) toxic products. Diene conjugates level in rats liver and blood serum, increasing at experimental hyperthyroidism conditions, under introduction of melatonin level correcting drugs, also approached to the control meaning. Results of the study indicate on positive effect of melaxen and valdoxan on free radical homeostasis, that appears to be accompanied by decrease of load on the glutathione antioxidant system in comparison with the pathology.

Key words: hyperthyroidism, free-radical oxidation, glutathione antioxidant system, melaksen, valdoxan.