Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 4, с. 462-468.

УДК 576.32/.36:616.441
©Коллектив авторов

ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАКСЕНА И ВАЛЬДОКСАНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ, АКТИВНОСТЬ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТРАТА В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ГИПЕРТИРЕОЗЕ

М.В. Горбенко[1]*, Т.Н. Попова[1], К.К. Шульгин[1], С.С. Попов[2], А.А. Агарков[1]

[1]Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, 394006, Воронеж, Университетская пл. 1; тел.: 8(473)2208278; эл. почта: marinagorbenko87@mail.ru
[2]Воронежская государственная медицинская академия имени Н.Н. Бурденко, 394000, Воронеж, ул. Студенческая 10

Исследовано влияние мелаксена и вальдоксана на параметры биохемилюминесценции, активность аконитатгидратазы и уровень цитрата в сердце и печени крыс на фоне развития экспериментального гипертиреоза. При введении данных препаратов в тканях крыс происходило снижение параметров биохемилюминесценции, возрастающих в ответ на развитие оксидативного стресса при гипертиреозе. Активность аконитатгидратазы и концентрация цитрата, увеличивающиеся в условиях патологии в печени и сердце крыс, изменялись в сторону контрольных значений при введении препаратов, корригирующих уровень мелатонина. Полученные результаты указывают на позитивное действие мелаксена и вальдоксана на оксидативный статус организма при развитии экспериментального гипертиреоза, что, очевидно, сопряжено с антиоксидантным действием мелатонина, повышение уровня которго происходит под влиянием этих препаратов.

Ключевые слова: гипертиреоз, свободнорадикальное окисление, мелаксен, вальдоксан.

ВВЕДЕНИЕ

Гипертиреоз – синдром, наличие которого связано с повышенным содержанием тиреоидных гормонов (ТГ) в крови, что встречается при различных патологических состояниях. При данном заболевании наблюдаются нарушения функционирования различных систем организма, которые обусловлены действием избытка ТГ на различные виды обмена веществ, органы и ткани [1]. Среди многосистемных сдвигов, возникающих под действием ТГ в больших концентрациях, выделяют совокупность симптомов нарушений функционирования сердца, получивших название “тиреотоксическое сердце”, и печени – “тиреотоксический гепатоз”. При нарушениях подобного рода может иметь место усиление интенсивности свободнорадикальных процессов и образования активных форм кислорода (АФК) [2]. Многие жизненно важные метаболические и физиологические процессы протекают при участии свободных радикалов (СР). Однако избыток СР вызывает структурно-функциональные повреждения биомембран, нуклеиновых кислот и белков, то есть важнейших компонентов клетки. Защита клеток от эндогенных СР осуществляется многоуровневой антиоксидантной системой

* - адресат для переписки

организма (АОС), включающей два звена: ферментативное и неферментативное [3]. К неферментативному звену антиоксидантной защиты может быть отнесен цитрат, который способен элиминировать ионы Fe^{2+}, участвующие в образовании гидроксильного радикала [4]. Реакцию превращения цитрата в изоцитрат катализирует аконитатгидратаза (АГ; КФ 4.2.1.3), молекула которой легко разрушается АФК, что позволяет рассматривать данный фермент как чувствительную мишень действия СР.

В последнее время активно исследуются вещества, оказывающие положительное влияние на АОС организма. В связи с этим следует отметить, что одним из них является мелатонин, продуцируемый у человека и других позвоночных эпифизом, а также клетками диффузной эндокринной системы [5]. Этот гормон играет роль регулятора многих физиологических функций: участвует в формировании суточных биоритмов, торможении некоторых функций гипофиза, регуляции иммунных реакций, оказывает анальгезирующий и седативный эффекты [6]. Он является одним из самых мощных эндогенных антиоксидантов, который проявляет свою активность во всех клеточных структурах. Мелатонин можно рассматривать как наиболее универсальный из биологических антиоксидантов, реализующий свою активность путём многих механизмов: гормон обладает выраженной способностью связывать СР, а также стимулировать определенные компоненты АОС [7]. Мелаксен (“Unipharm”, США) – лекарственный препарат, содержащий в своем составе мелатонин. Он является адаптогенным препаратом, синтезированным из аминокислот растительного происхождения. Вальдоксан (“Laboratories Servier Industries”, Франция) является мощным лигандом мелатониновых рецепторов и антагонистом серотониновых рецепторов 2С и 2В [8]. Подобно другим мелатонинергическим препаратам вальдоксан способен имитировать эффекты мелатонина в синхронизации циркадных ритмов [9].

В связи с этим, целью настоящей работы явилась оценка параметров биохемилюминесценции (БХЛ), отражающих скорость протекания свободнорадикальных процессов, содержания цитрата и активности аконитатгидратазы в тканях печени и сердца крыс при экспериментальном гипертиреозе (ЭГ), а также при действии мелаксена и вальдоксана.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 150-200 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманитарного отношения к животным, отраженным в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). В ходе эксперимента животные были разделены на следующие экспериментальные группы: 1-я группа (контроль; n =16) крыс содержалась на стандартном режиме вивария; 2-ая группа (n = 19) – животные, которым для индуцирования ЭГ вводили внутрибрюшинно трийодтиронин в дозе 100 мкг на 100 г массы тела в виде раствора в 0,9% NaCl. Выбор сроков наблюдений и введения инъекций трийодтиронина (трижды в течение 6 дней) определялся используемой моделью развития гипертиреоза [10]; в 3-й и 4-й группах (n=18) животным после индуцирования ЭГ вводили мелаксен (“Unipharm”) внутрибрюшинно в виде раствора в 1 мл 0,9% NaCl в дозах 5 и 10 мг/кг веса животного на 4 сутки после начала индуцирования ЭГ, в течение 3-х дней.; в 5-й и 6-й группах (n=18) крысам с ЭГ вводили вальдоксан (“Laboratories Servier Industries”) в виде раствора в 1 мл 0,9% NaCl внутрибрюшинно 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 выборе доз и путей введения руководствовались соответствующими данными литературы [11, 12].

Для получения тканевых гомогенатов навески тканей печени и сердца гомогенизировали в 4-х кратном объёме охлаждённой 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.

Оценку интенсивности процессов свободнорадикального окисления (СО) и общей антиоксидантной активности осуществляли методом Fe^{2+}-индуцированной биохемилюминесценции. Принцип метода основан на каталитическом разложении пероксида ионами металла с переходной валентностью (Fe^{2+}) в соответствии с реакцией Фентона. Образующиеся

при этом СР вступают в процесс инициации СО в исследуемом биологическом субстрате. Рекомбинация радикалов $RO_2^{\bullet}$ приводит к образованию неустойчивого тетроксида, распадающегося с выделением кванта света. Интенсивность СРП определяли на БХЛ-07 с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течении 30 сек и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{max}), характеризующие интенсивность СРП, и величину тангенса угла наклона кривой ($tg\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность. Среда для определения интенсивности БХЛ имела следующий состав: 0,4 мл 0,02 М калий-фосфатного буфера (pH 7,5); 0,4 мл 0,01 М $FeSO_4$, 0,2 мл 2% раствора H_2O_2 (вносимого непосредственно перед измерением). Иследуемый материал вносили в количестве 0,1 мл перед измерением.

Активность АГ определяли на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением при 233 нм в среде, содержащей 0,05 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), 4 мМ цитрат. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мМ субстрата в 1 мин при 25°С. Количество цитрата определяли по методу Нательсона [13].

Опыты проводили как минимум в 8-кратной биологической и 2-кратной аналитической повторностях. Результаты опытов сравнивали с контролем. Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента с вычислением среднего значения, стандартного отклонения, различия считали достоверными при $p \le 0,05$ [14]. В ходе работы использовали цитрат (“Sigma”, США); трис-HCl-буфер, ЭДТА (“Reanal”, Венгрия); мелаксен (“Unipharm”); вальдоксан (“Laboratories Servier Industries”). Остальные реактивы были отечественного производства марки "хч" или "чда".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным результатам, при введении мелаксена и вальдоксана на фоне развития гипертиреоза в сердце и печени крыс наблюдалось снижение параметров БХЛ, возрастающих при ЭГ, в сторону контрольных значений.

Установлено, что светосумма БХЛ при воздействии мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг в обоих случаях уменьшалась в сердце крыс в 1,3 раза, в печени в 1,2 раза. Было показано, что при введении мелаксена в исследуемых дозах на фоне развития патологии происходило снижение I_{max} в печени в 1,2 и 1,3 раза и в сердце в 1,3 и 1,4 раза ($p<0,05$) по сравнению с животными с патологией. Воздействие данного препарата в дозах 5 и 10 мг/кг сопровождалось уменьшением $tg\alpha_2$, на 13% и 12% в печени крыс, на 7% и 5% ($p \le 0,05$) в сердце крыс на фоне развития ЭГ.

При введении вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг животным с патологией происходило снижение S в печени в 1,2 раза, в сердце – 1,3 раза. При этом наблюдалось снижение I_{max} хемилюминесценции в печени в 1,2 и 1,3 раза, в сердце в 1,3 и 1,4 раза ($p \le 0,05$) по сравнению с данными при ЭГ (таблица). Установлено, что воздействие вальдоксана в исследуемых дозах приводило к снижению значения $tg\alpha_2$ в печени на 15% и 14%, в сердце – на 7% и 6% ($p \le 0,05$) по сравнению с животными с патологией (рис. 1).

Таблица. Параметры биохемилюминесценции в печени и сердце крыс в контроле (1), при экспериментальном гипертиреозе (2), при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг на фоне развития ЭГ (3, 4) и при введении вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг при развитии патологии (5, 6).

Группа животных	S		Imax		$tg\alpha_2$	
	печень	сердце	печень	сердце	печень	сердце
1-я	23,7±1,105	14,54±0,637	4,3±0,189	2,43±0,115	1,5±0,075	1,8±0,087
2-я	30,79±1,445*	20,7±0,973*	6,13±0,279*	4,38±0,206*	1,82±0,085*	1,96±0,089*
3-я	25,917±0,967**	15,853±1,137**	5,236±0,262**	3,370±0,157**	1,610±0,078**	1,833±0,0406**
4-я	25,743±1,08**	15,847±0,970**	4,817±0,210**	3,153±0,290**	1,621±0,02**	1,864±0,05**
5-я	25,671±0,861**	15,34±0,645**	4,956±0,231**	3,070±0,135**	1,589±0,064**	1,84±0,0211**
6-я	25±0,594**	15,62±0,644**	4,685±0,341**	3,032±0,143**	1,602±0,0783**	1,853±0,0468**

Примечание. * - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости $p \le 0,05$); ** - отличия от значений при ЭГ достоверны (уровень значимости $p \le 0,05$).

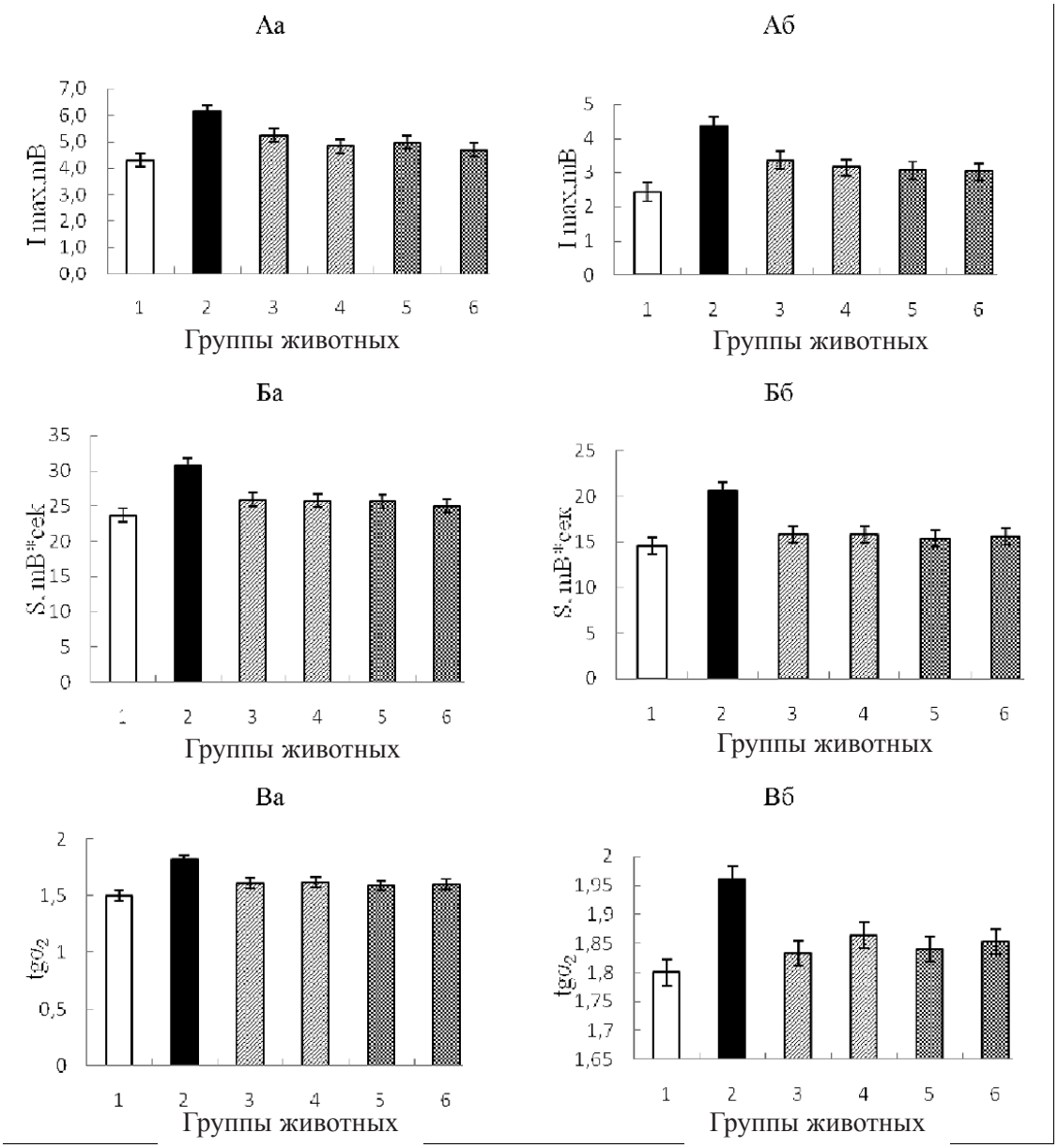

Рисунок 1. Параметры биохемилюминесценции: интенсивность максимальной вспышки (А), светосумма медленной вспышки (Б), тангенс угла наклона кинетической кривой ($tg\alpha_2$) (В) в печени (а) и сердце (б) крыс в норме (1), при патологии (2), при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг на фоне гипертиреоза (3,4), при введении вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг при развитии патологии (5,6).

Изменения параметров БХЛ в сторону контрольных значений свидетельствуют о способности данных препаратов оказывать влияние на содержание мелатонина, который может проявлять свое антиоксидантное действие, как через прямую нейтрализацию СР, так и через регуляцию экспрессии антиоксидантных ферментов [15].

При введении мелатонин-корригирующих препаратов, происходило возрастание активности АГ и снижение уровня цитрата по сравнению со значениями при патологии.

Так, активность АГ в печени, выраженная в виде Е на грамм сырой массы, уменьшающаяся в патологическом состоянии в 1,6 раза, возрастала в 1,4 и 1,5 раза при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг. В сердце крыс активность фермента, снижающаяся при развитии патологии в 2,1 раза, увеличивалась в 1,6 и 1,8 раза

($p \leq 0,05$) при введении мелаксена (рис. 2). Очевидно, наблюдаемые изменения активности фермента при ЭГ, связаны с тем, что ТГ в больших концентрациях могут индуцировать окислительный стресс, что приводит к интенсификации образования АФК. АГ является чувствительной мишенью к действию радикалов из-за присутствия в структуре активного центра несвязанного атома Fe^{2+}, что способствует нестабильности Fe–S кластера, нарушение которого переводит фермент в неактивную форму [16]. Положительное влияние мелаксена, вероятно, взаимосвязано с тем, что мелатонин, проявляя свое антиоксидантное действие, приводил к детоксикации СР, что способствовало уменьшению степени повреждения молекулы фермента и изменению активности АГ в сторону контроля.

При введении животным вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг активность АГ увеличивалась в печени в 1,5 раза, а в сердце крыс в 1,8 и 1,9 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. Таким образом, корригирующее действие вальдоксана способствовало снижению степени развития оксидативного стресса, и как следствие реконструкции железо-серного кластера данного фермента [17].

Согласно полученным результатам, при введении мелаксена и вальдоксана на фоне развития гипертиреоза в тканях животных отмечается снижение содержания цитрата по сравнению с данными при патологии. Установлено, что содержание цитрата в печени крыс, увеличивающееся при ЭГ в 1,5 раза, снижалось при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг

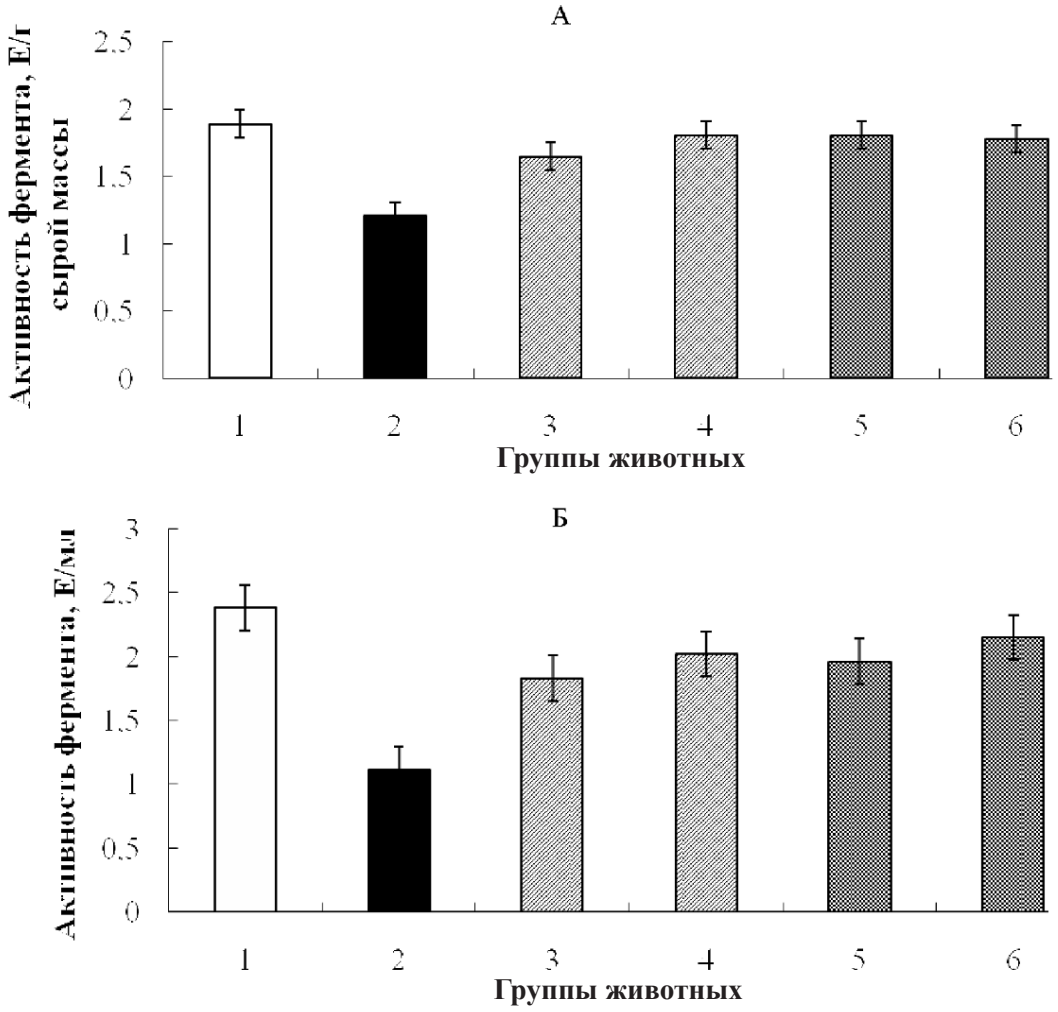

Рисунок 2. Активность аконитатгидратазы, выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени (А) и сердца (Б) крыс, в норме (1), при экспериментальном гипертиреозе (2), при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг (3,4), при введении вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг (5,6).

в 1,3 и 1,4 раза ($p \leq 0,05$), а при введении вальдоксана в 1,4 раза. Уменьшение данного параметра наблюдалось и в сердце крыс, которым вводили мелаксен в дозах 5 и 10 мг/кг в 1,4 и 1,5 раза ($p \leq 0,05$), уровень которого возрастал в 1,9 раза при ЭГ. При введении вальдоксана в указанных дозах животным с гипертиреозом наблюдалось снижение содержания цитрата в 1,5 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с уровнем при патологии (рис. 3).

По-видимому, при введении препаратов, корригирующих уровень мелатонина, происходило возрастание антиоксидантного потенциала и изменение уровня цитрата в сторону нормы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, введение мелаксена и вальдоксана на фоне развития ЭГ у крыс приводит к снижению параметров БХЛ, отражающих скорость свободнорадикальных процессов, изменению активности АГ-чувствительной мишени действия АФК, и концентрации цитрата в сторону нормы, что очевидно, связано с реализацией антиоксидантного эффекта мелатонина, коррекция уровня которого происходит по действием данных препаратов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2014-2016 годы. Проект №1090.

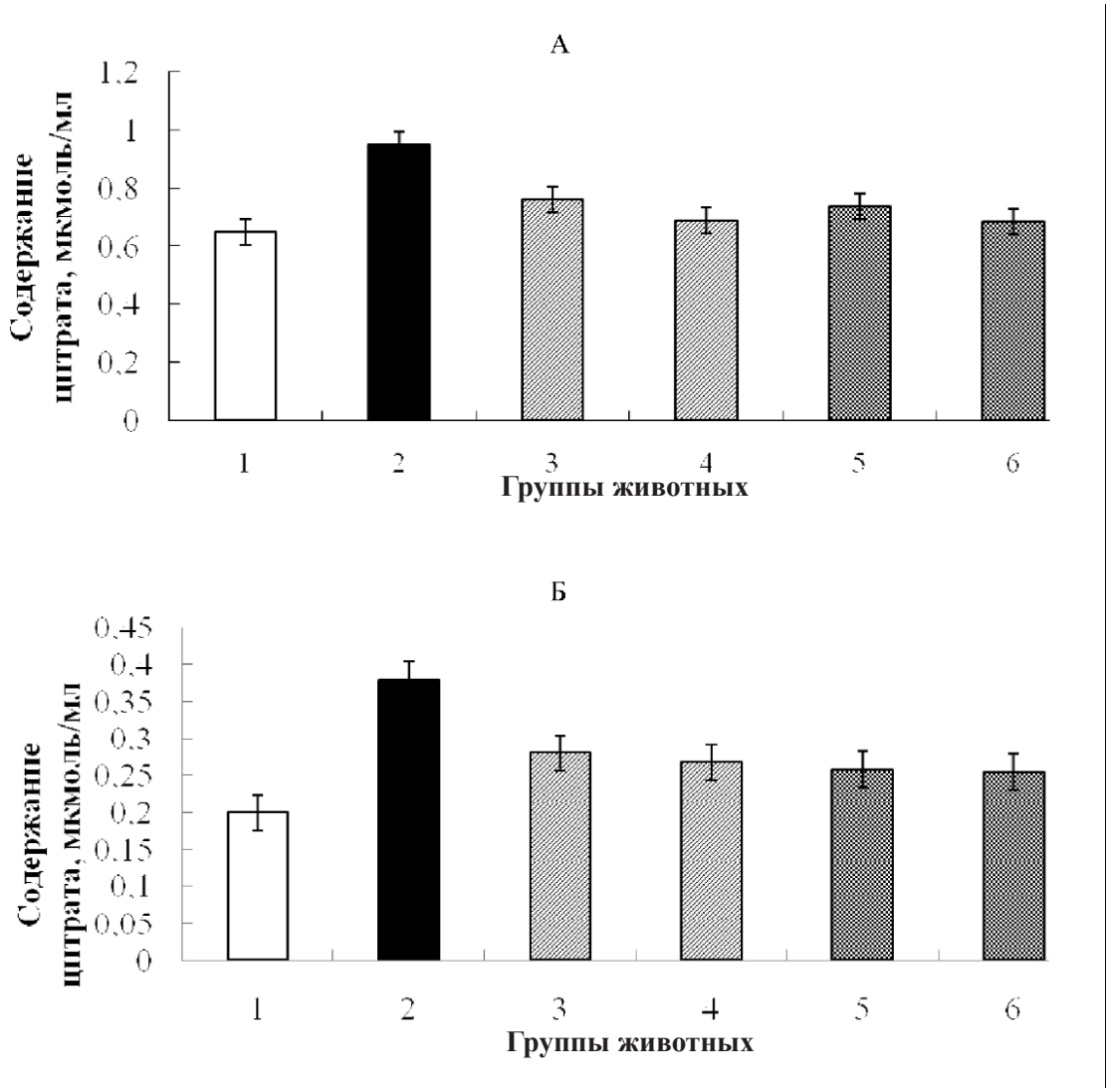

Рисунок 3. Содержание цитрата в печени (А), сердце (Б) крыс в норме (1), при экспериментальном гипертиреозе (2), при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг (3,4), при введении вальдоксана в дозах 5 и 10 мг/кг (5,6).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Venditti P., Balestrieri M., Meo S.D., Leo T.D.* (1997) J. Endocrinol., **155**, 151-157.
2. *Babu K., Jayaraaj I.A., Prabhakar J.* (2011) Int. J. Biol. Med .Res., **2**, 1122-1126.
3. *Bounous G., Molson J.H.* (2003) Anticancer Res., **23**, 1411-1416.
4. *Gnoni G.V., Priore P., Geelen M.J.H., Siculella L.* (2009) IUBMB Life, **61**, 987-994.
5. *Kvetnoy I.M.* (1999) Histichemical J., **31**, 1-12.
6. *Левин Я.И.* (2012) Consilium medicum, №2, 111-115.
7. *Reiter R.J., Tan D.X., Osuna C., Gitto E.* (2000) J. Biomed. Sci., **7**, 444-458.
8. *San L., Arrans B.* (2008) European Psychiatry, **23**, 396-402.
9. *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**, 142-151
10. *Fernandez V., Simizu K., Barros S.B.M.* (1991) Endocrinology, **129**, 85–91.
11. *Topal T., Oztas Y., Korkmaz A.* (2005) J. Pineal Res., **38**, 272–277.
12. *Tuma J., Strubbe J.N., Mocaër E.* (2005) Eur. Neuropsychopharmacol., **15**, 545-555.
13. *Афанасьев В.Г., Зайцев В.С., Вольфсон Т.И.* (1973) Лаб. Дело, №1, 115-116.
14. *Ллойд Э., Ледерман У.* (1990) Финансы и статистика, Москва.
15. *Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czamock Z.* (2003) Acta Biochimica Polonica, **50**, 1129-1146.
16. *Cantu D., Schaack J., Patel M.* (2009) Plos one, **4**, 1-9.
17. *Paulis L., Simko F.* (2007) Physiol. Res., **56**, 671-684.

Поступила: 29. 01. 2014.

EFFECT OF MELAXEN AND VALDOXAN ON FREE RADICAL PROCESSES INTENSITY, ACONITATE HYDRATASE ACTIVITY AND CITRATE CONTENT IN RATS TISSUES UNDER HYPERTHYROIDISM

M.V. Gorbenko[1], T.N. Popova[1], K.K. Shulgin[1], S.S. Popov[2], A.A. Agarkov[1]

[1]Voronezh 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

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

The influence of melaxen and valdoxan on the biochemiluminescence parameters, aconitate hydratase activity and citrate level in rats heart and liver during development of experimental hyperthyroidism has been investigated. Administration of these substances promoted a decrease of biochemiluminescence parameters, which had been increased in tissues of rats in response to the development of oxidative stress under hyperthyroidism. Aconitate hydratase activity and citrate concentration in rats liver and heart, growing at pathological conditions, changed towards control value after administration of the drugs correcting melatonin level. The results indicate the positive effect of valdoxan and melaxen on oxidative status of the organism under the development of experimental hyperthyroidism that is associated with antioxidant action of melatonin.

Key words: experimental hyperthyroidism, free-radical oxidation, melaksen, valdoxan.