

УДК 577.17:616.4

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ

С.С. Попов¹, А.Н. Паишков¹, Т.Н. Попова^{2}, В.И. Золотев¹,
А.В. Семенихина², Т.И. Рахманова²*

¹Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко;

²Воронежский государственный университет, 394006, г. Воронеж,

Университетская пл., 1; тел.: (4732)208278; факс (4732)208755;

эл. почта: tropova@bio.vsu.ru

При экспериментальном тиреотоксикозе у крыс наблюдается возрастание активностей аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), креатинкиназы – МВ (КК-МВ) в сыворотке крови и содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов (ДК), - в тканях печени, сердца и крови, что свидетельствует о нарушении функционирования данных органов, сопровождающемся интенсификацией свободнорадикальных процессов. Введение мелатонина приводило к снижению активности АлАТ, АсАТ, КК-МВ и уровня ДК, что указывает на его позитивный эффект при данной патологии. При тиреотоксикозе происходит также возрастание активности каталазы в печени, сердце и сыворотке крови крыс. Экзогенный мелатонин снижал удельную активность каталазы в сыворотке крови на 22%, в сердце – 43% по сравнению с животными, подвергнутыми гипертиреозу. При этом в печени наблюдалось незначительное увеличение удельной активности каталазы (на ~15%). Содержание α -токоферола, возрастающее в тканях крыс в условиях развития тиреотоксикоза, снижалось при введении мелатонина. Таким образом, экзогенный мелатонин способен снижать интенсивность перекисного окисления липидов при тиреотоксикозе и выступать в роли адаптогена, регулирующего свободнорадикальный гомеостаз в соответствии с воздействием патогенных факторов на организм, что сопровождается сопутствующим снижением степени мобилизации компонентов антиоксидантной системы организма.

Ключевые слова: тиреотоксикоз, мелатонин, свободнорадикальный гомеостаз, каталаза, α -токоферол.

ВВЕДЕНИЕ. Нарушение физиологического баланса между интенсивностью свободнорадикального окисления (СРО) и функциональной активностью антиоксидантной системы (АОС) организма является одним из главных патогенетических факторов в развитии многих заболеваний внутренних органов. Активные формы кислорода (АФК), выполняющие в организме ряд важных функций, при чрезмерном образовании в ходе интенсификации СРО способны приводить к нарушению клеточного метаболизма. АФК оказывают негативное воздействие на многие биологически важные соединения: аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты. Свободные радикалы могут инициировать перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот, играющих существенную роль во многих реакциях обмена, формировании структуры клетки и, в частности, мембран. Известно, что АОС защищает живой организм от губительного действия АФК [1]. К ферментативному звену антиоксидантной системы относится каталаза. Она предотвращает накопление в клетке пероксида водорода, который в присутствии двухвалентного железа может генерировать гидроксильный радикал, являющийся особо агрессивной и опасной АФК [2]. Важнейшее место в неферментативном звене АОС занимают токоферолы. Из токоферолов биологически наиболее активным является α -токоферол. Существует прямая связь

* - адресат для переписки

между содержанием α -токоферола и тканевым дыханием и обратная связь со степенью окисления липидов. Он содержится и обезвреживает АФК в липидном слое клеточных мембран путем прерывания цепных свободнорадикальных реакций в процессе перекисления ненасыщенных жирных кислот, предупреждая атерогенные изменения липидов [3].

В настоящее время в литературе встречаются лишь единичные указания на изменения антиоксидантного статуса организма при заболеваниях щитовидной железы. Имеющиеся данные о вовлечении тиреоидных гормонов в процессы регуляции СРО весьма противоречивы [4, 5]. Известно, что при избытке тиреоидных гормонов происходит нарушение функционирования большинства органов и систем организма. Наиболее выраженными и опасными проявлениями при тиреотоксикозе, являются поражения сердечно-сосудистой системы, в первую очередь синдром миокардиострофии (“тиреотоксическое” сердце) и нарушение деятельности системы пищеварения – дистрофическое изменение печени (тиреотоксический гепатоз) [6].

Большой интерес представляет изучение биологически активных веществ, обладающих антиоксидантным действием и способных активировать АОС организма. Одним из таких веществ является мелатонин – гормон, секретируемый шишковидной железой и нейроэндокринными клетками желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, поджелудочной железы, надпочечников, тимуса, мозжечка, мочеполовой системы и других органов. Мелатонин относится к производным аминокислот, принимает участие в синхронизации циркадных и сезонных биоритмов организма, участвует в регуляции репродуктивной и иммунной систем, тормозит некоторые функции гипоталамо-гипофизарной системы. В некоторых работах указывается, что мелатонин обладает антиопухолевым и седативным действием [7, 8].

В этой связи целью настоящей работы явилась оценка содержания диеновых конъюгатов (ДК), являющихся первичными продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ), активности каталазы и содержания α -токоферола в сыворотке крови, печени и сердце крыс при экспериментальном тиреотоксикозе и действии экзогенного мелатонина.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали самцов белых крыс (*Rattus rattus* L.) массой 150-200 г. Были сформированы три экспериментальные группы: в 1-й группе (контроль; $n = 8$) животных содержали на стандартном режиме вивария; во 2-й группе ($n = 9$) животным для индуцирования экспериментального тиреотоксикоза вводили внутрибрюшинно трийодтиронин в дозе 100 мкг на 100 г массы тела в виде раствора в 0,9% NaCl. Инъекции осуществляли трижды в течение 6 дней; в 3-й группе ($n = 8$) животным после индуцирования экспериментального тиреотоксикоза на следующий день вводили мелатонин внутрибрюшинно (2 мг/кг) в течение 3-х дней в утренние часы. Для получения сыворотки использовали венозную кровь. Для получения тканевых гомогенатов навески печени и сердца крысы гомогенизировали отдельно в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения (0,1 М трис-HCl-буфер (pH 7,8), содержащий 1 mM ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол) и центрифугировали при 10000 g в течение 12 мин. Для определения активностей АлАТ, АсАТ и КК-МВ использовали стандартные наборы “Bio-La-Test”. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, необходимое для превращения 1 мкмоль субстрата в минуту при 25°C. Активность каталазы определяли спектрофотометрически при 410 нм с помощью метода, основанного на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс [9]. Концентрацию α -токоферола определяли по методу, основанному на фотометрировании хромогенного комплексного соединения Fe^{2+} и ортофенантролина [10]. Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли спектрофотометрическим методом при 233 нм [11]. Общий белок определяли по методу Лоури [12]. Данные обрабатывали с использованием t -критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

В ходе исследований использовали мелатонин ("Sigma", США), трийодтиронин ("BioChemika", Швейцария), трис, ЭДТА ("Reanal", Венгрия), остальные реактивы отечественного производства марки "хч" или "чда".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Интенсивность патологического процесса в печени и сердце при тиреотоксикозе оценивали, определяя активности АлАТ, АсАТ и КК-МВ в сыворотке крови. Активности данных ферментов, повышающиеся при экспериментальном гипертиреозе, уменьшались на фоне действия экзогенного мелатонина (рис. 1). Так, например, активность КК-МВ, являющейся маркерным ферментом повреждения миокарда, возрастала при тиреотоксикозе в 7,2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При введении экзогенного мелатонина активность фермента уменьшалась в 1,3 раза по сравнению с животными с гипертиреозом ($p < 0,05$). Наблюдаемые изменения активностей ферментов, являющихся критериями выраженности процессов цитолиза в тканях печени (АсАТ, АлАТ) и сердца (АсАТ, КК-МВ), свидетельствуют о нарушении функционирования данных органов при гипертиреозе и о позитивном действии мелатонина при данной патологии.

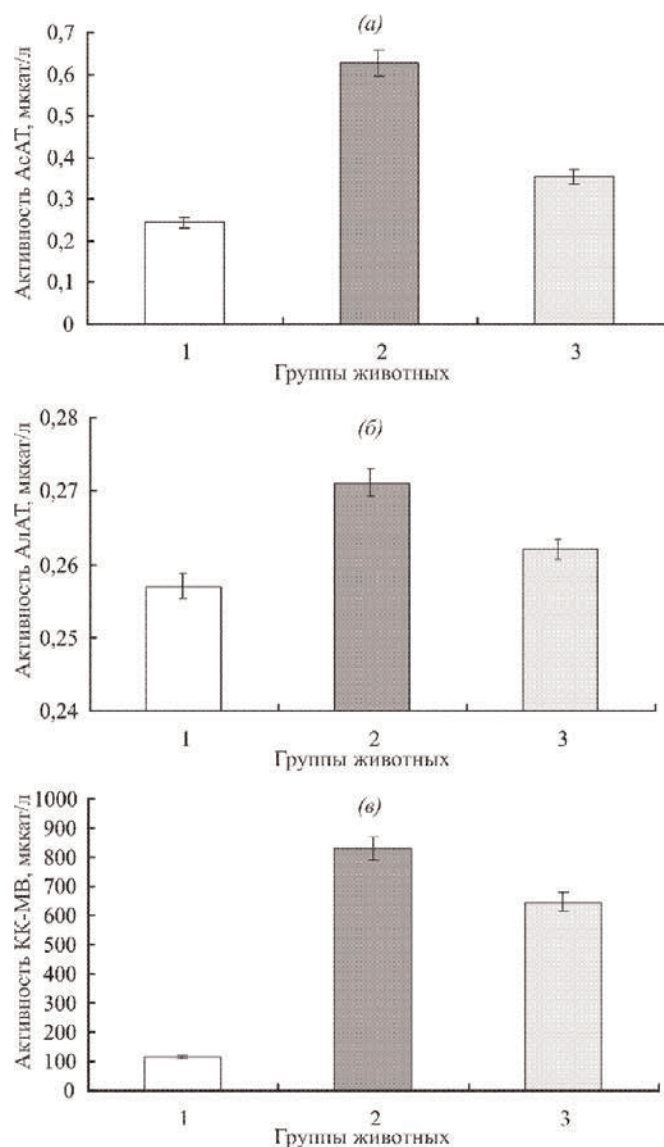


Рисунок 1.

Активность аспаратаминотрансферазы (а), аланинаминотрансферазы (б), креатинкиназы (фракция МВ) (в) в сыворотке крови крыс в норме (1), при гипертиреозе (2) и действии мелатонина при патологии (3).

При гипертиреозе наблюдалось накопление ДК: в сыворотке крови – в 1,7 раза ($p < 0,05$), в печени – в 1,5 раза ($p < 0,04$), в сердце – в 1,2 раза ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об интенсификации ПОЛ (рис. 2). Полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными о роли тиреоидных гормонов в развитии процессов СРО. Известно, что усиление клеточного дыхания под действием тиреоидных гормонов сопровождается образованием супероксид-радикала на уровне убихинона [13]. Введение экзогенного мелатонина при тиреотоксикозе приводит к снижению уровня ДК в сыворотке крови на 47%; в печени – 24,5%; в сердце – 20% по сравнению с их содержанием при патологии ($p < 0,05$ во всех случаях) (рис. 2). Результаты проведенного исследования свидетельствуют о возможности проявления гормоном антиоксидантных свойств, направленных на подавление чрезмерного образования АФК при патологии щитовидной железы.

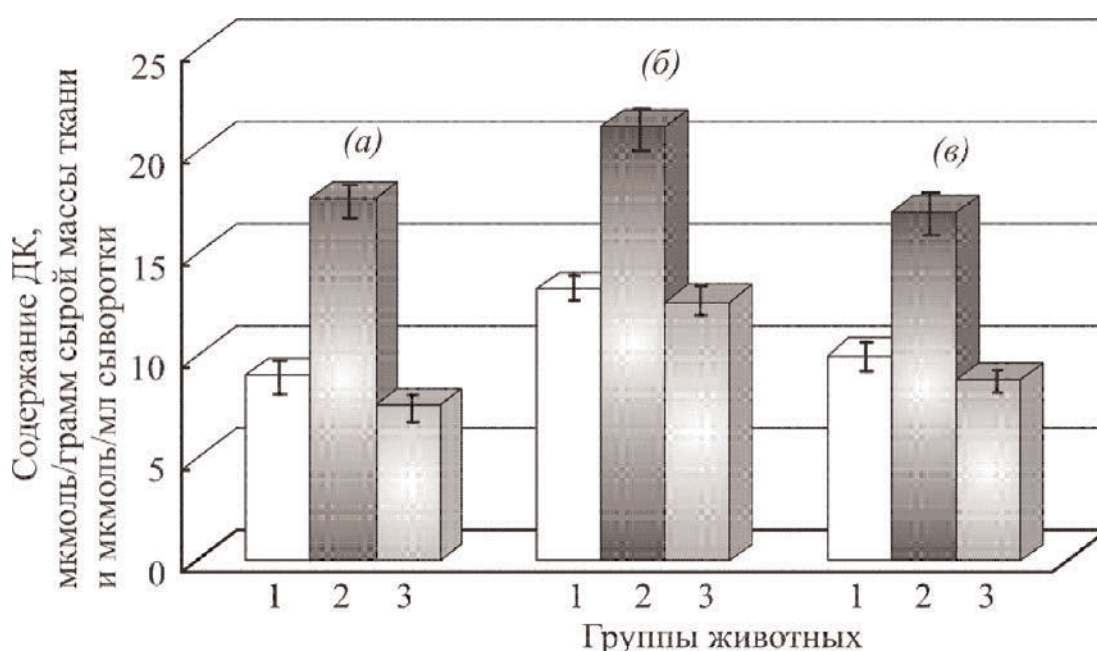


Рисунок 2.

Содержание диеновых конъюгатов в печени (а), сердце (б) и сыворотке крови (в) крыс в норме (1), при гипертиреозе (2) и действии мелатонина при патологии (3).

Установлено, что при экспериментальном гипертиреозе происходит возрастание активности каталазы. Так, активность фермента, выраженная в Е на 1 мл, увеличивалась в сыворотке крови в 2,1 раза ($p < 0,04$). Ферментативная активность, выраженная в Е на 1 грамм сырой массы, возрастала в печени в 1,9 раза, в сердце – 2,1 раза по сравнению с данными, полученными для интактных животных ($p < 0,05$) (рис. 3). При этом уровень удельной активности каталазы возрастал в тканях печени, сердца и крови в меньшей степени (примерно в 1,3 раза; $p < 0,05$), что связано с повышением содержания белка при гипертиреозе. В связи с этим интересно отметить, что имеются литературные данные, свидетельствующие об усилении в условиях окислительного стресса синтеза белков теплового шока – шаперонов, защищающих клетки от действия АФК [14]. В частности Городецкой и др., была показана индукция синтеза шаперона Hsp 70 в миокарде под действием тиреоидных гормонов [15]. Вероятно, наблюдаемые

изменения активности каталазы являются физико-химическим механизмом защитной реакции организма адаптационного характера на чрезмерное образование АФК в процессе развития окислительного стресса. Согласно литературным данным, при гипертиреозе в эритроцитах, происходит увеличение активности супероксиддисмутазы, которая превращает высокореакционноспособный супероксиданион-радикал в относительно менее активный пероксид водорода [16]. Таким образом, увеличение активности каталазы в крови, печени и сердце при тиреотоксикозе может быть направленно на расщепление пероксида водорода до воды и молекулярного кислорода, что снижает вероятность образования гидроксильного радикала. По-видимому, возрастание активности сопряженной ферментативной системы, включающей супероксиддисмутазу и каталазу, в условиях развития тиреотоксикоза может быть связано с активирующим действием субстратов этих ферментов. Следует также отметить, что SoxR-регулоны (супероксиддисмутазные регулоны) - система генов, распределённых по геному, но подчиняющихся одному белку-регулятору, могут обеспечивать дополнительный синтез ферментов АОС при интенсификации свободнорадикальных процессов [17]. Экзогенный мелатонин уменьшал удельную активность каталазы в сыворотке крови на 22% ($p < 0,04$), в сердце – 43% ($p < 0,05$) по сравнению с животными, подвергнутыми гипертиреозу. Мелатонин, обладая антирадикальным эффектом, способствует уменьшению степени протекания СРО, и, как следствие, снижению функциональной нагрузки на каталазу. Однако при этом в печени наблюдалось незначительное возрастание удельной активности каталазы (на 15%; $p < 0,05$). В литературе встречаются данные, показывающие, что экзогенный мелатонин способствует увеличению уровня мРНК СОД [18]. Нельзя исключить, что изменения уровня транскриптов антиоксидантных ферментов могут различаться в разных тканях.

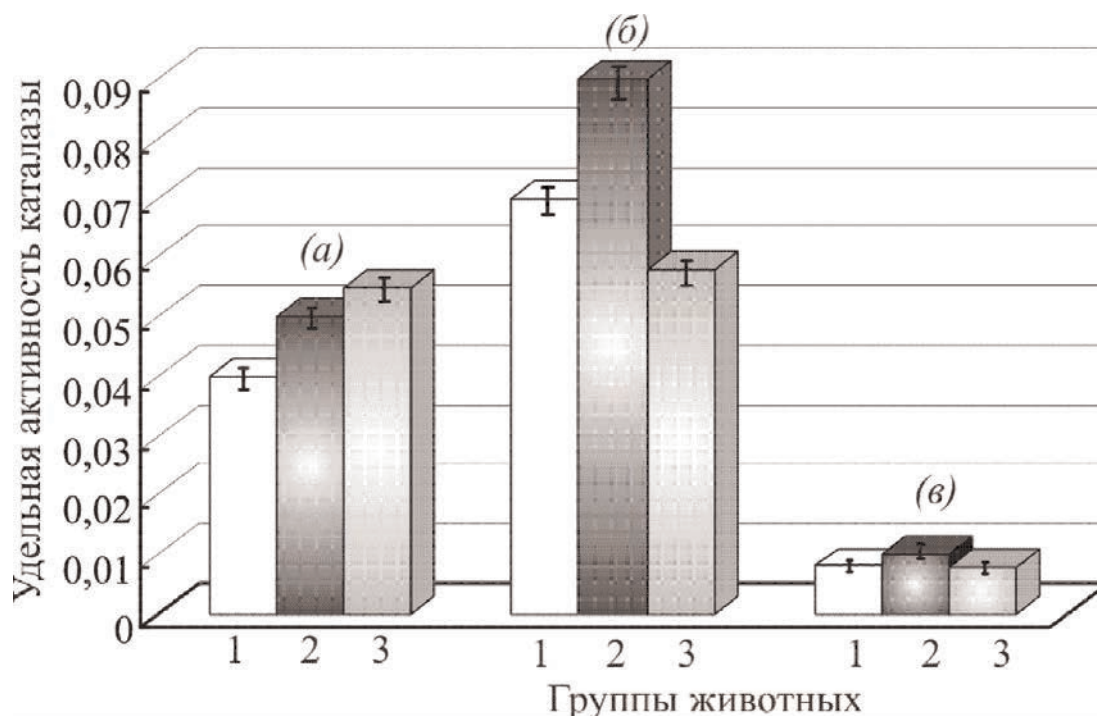


Рисунок 3.

Активность каталазы в печени (а), сердце (б) и сыворотке крови (в) крыс в норме (1), при гипертиреозе (2) и действии мелатонина при патологии (3).

При экспериментальном тиреотоксикозе происходило увеличение содержания α -токоферола в сыворотке крови – в 1,2 раза, в печени и сердце – в 1,8 раза по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$ во всех случаях) (рис. 4). Возрастание уровня α -токоферола может быть связано с восстановлением хинонной формы в фенольную, способную реагировать с пероксидными радикалами, при синергичном действии с цитратом, накопление которого наблюдается при данной патологии, а также при других заболеваниях, сопровождающихся развитием СРО [3, 19, 20]. Экзогенный мелатонин у животных с гипертиреозом уменьшал содержание α -токоферола в сыворотке крови – на 12%, в печени – на 10%, в сердце – на 40% по сравнению с уровнем у животных, подвергнутых тиреотоксикозу ($p < 0,05$ во всех случаях). Возможно, это связано со снижением уровня цитрата под действием мелатонина. Ранее нами было показано, что при токсическом гепатите при введении мелатонина экспериментальным животным наблюдалось уменьшение содержания цитрата и повышение активности аконитатгидратазы, катализирующей его превращение в изоцитрат [20]. Считают, что возрастание активности аконитатгидратазы при снижении темпов СРО связано с реконструкцией железо-серных кластеров в составе активного центра фермента [21, 22].

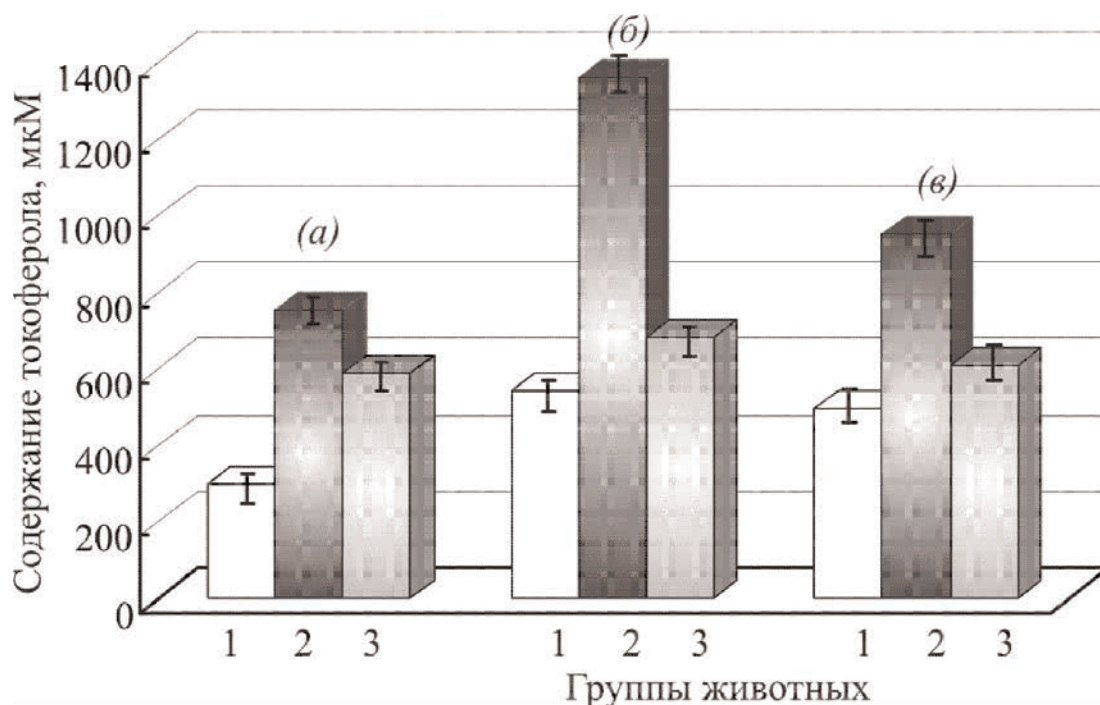


Рисунок 4.

Концентрация α -токоферола в печени (а), сердце (б) и сыворотке крови (в) крыс в норме (1), при гипертиреозе (2) и действии мелатонина при патологии (3).

Таким образом, экзогенный мелатонин способен снижать интенсивность СРО при экспериментальном тиреотоксикозе и выступать в роли адаптогена, регулирующего клеточный гомеостаз в соответствии с воздействием патогенных факторов на организм, что сопровождается сопутствующим снижением степени мобилизации АОС организма.

Работа поддержана финансированием по программе Министерства образования и науки РФ “Развитие научного потенциала высшей школы” РПН.2.1.1.4429.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Frei B.* (1993) Natural antioxidants in human health and disease, Orlando, FL: Academic Press.
2. *Stocker R., Frei B.* (1991) in: Oxidative stress: oxidants and antioxidants (H. Sies, ed.) London: Academic Press, pp. 213-243.
3. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* (1984) *Biochem. J.* **219**, 1-14.
4. *Fernandes V., Videla L.A.* (1989) in: Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine (J. Miquel, A.T. Quintanilha, H. Weber, eds) Boca Raton, FL: CRC Press Inc, pp. 105-115.
5. *Rodriguez-Gomez I., Wangenstein R., Moreno J.M.* (2005) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **288** (6), 1252-1257.
6. *Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.В.* Эндокринология: Учебник. М.: Медицина, 2000.
7. *Кветная Т.В., Князькин И.В., Кветной И.М.* (2005) Мелатонин – нейроиммуноэндокринный маркер возрастной патологии. – СПб: Издательство ДЕАН.
8. *Karihtala P.* (2003) *Clin. Canc. Res.*, **9**, 3418-3424.
9. *Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.* (1998) Лаб. дело, №1, 16-19.
10. *Desai I.D., Martinez F.E.* (1986) *Clin. Chim. Acta*, **154** (3), 247-250.
11. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* (1977) Современные методы в биохимии. М, с. 63-64.
12. *Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A., Randall R.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-271.
13. *Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L.* (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**(2), 408-414.
14. *Rogallu T., Ehrnsperger M., Reville H.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **277**, 947-956.
15. *Городецкая И.В., Божко А.П., Бахтина Л.Ю.* (2000) Бюлл. экспер. биол. мед., **130**, 617-619.
16. *Seymen O., Seven A., Candan G.* (1997) *Acta Med. Okayma*, **51**(3), 129-133.
17. *Меньшикова Е.Б.* (1993) Усп. совр. биол., **113**, 442-453.
18. *Барабой В.А.* (2000) Укр. биох. журнал, **72**(3), 5-11.
19. *Wijkhuisen A., Djouadi F., Vilar J.* (1995) *Am. J. Physiol.*, **268**(4-2), 634-642.
20. *Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В., Матасова Л.В., Попова Т.Н.* (2005) Пробл. эндокрин., **51**(6), 41-43.
21. *Skulachev V.P.* (1997) *Bioscience Reports*, **17**(3), 347-365.
22. *Gardner P.R., Raineri I., Epstein L.B., White C.W.* (1995) *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol., Inc*, **270**(22), 13399-13405.

Поступила: 13. 12. 2006.

MELATONIN INFLUENCE ON FREE RADICAL HOMEOSTASIS IN RAT TISSUES
AT THYROTOXICOSIS

S.S. Popov¹, A.N. Pashkov¹, T.N. Popova², V.I. Zolodov¹, A.V. Semenikhina², T.I. Rakhmanova²

¹Voronezh State Medical Academy of N.N. Burdenko

²Voronezh State University, 394006, Russia, Voronezh, Universitetskaya pl., 1; tel.: (4732)208278;
fax: (4732)208755; e-mail: tpopova@bio.vsu.ru

Experimental thyrotoxicosis in rats is accompanied by the increase of serum alanine aminotransferase (AlA), aspartate aminotransferase (AsA), creatine kinase-MB (CK-MB) activities and content of primary products of lipid peroxidation - conjugated dienes - in liver, heart and blood. This suggests impairments in these organs accompanying free radical processes intensification. Administration of melatonin decreased AlA, AsA and CK-MB activities and CD level decreased. Thyrotoxicosis increased catalase activity in liver, heart and blood. Exogenous melatonin decreased specific activity of catalase in blood and in heart in comparison with animals subjected to hyperthyroidism. However, some increase of catalase specific activity (~15%) was observed in liver. α -Tocopherol content, raising in rat tissues in thyrotoxicosis development conditions, decreased after melatonin treatment. Thus, exogenous melatonin is capable to reduce lipid peroxidation intensity at thyrotoxicosis and to act as an adoptogen, regulating free radical homeostasis.

Key words: thyrotoxicosis, melatonin, free radical homeostasis, catalase, α -tocopherol.