*Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 5, с. 640-645.*

УДК 577.15:616.379-008.64
©Коллектив авторов

# ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАКСЕНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

***А.Н. Веревкин*, Т.Н. Попова, А.А. Агарков, А.В. Семенихина***

Воронежский государственный университет,
394006, Воронеж, Университетская пл., 1; тел.: 8 (473) 228-11-60 (1110);
факс: 8 (473) 220-87-55; эл. почта: wer.all@mail.ru

Проведено исследование влияния мелаксена на интенсивность свободнорадикальных процессов и активность супероксиддисмутазы и каталазы у крыс с сахарным диабетом 2 типа. Установлено, что введение мелаксена при патологии приводило к снижению интенсивности свободнорадикальных процессов в тканях животных, о чем свидетельствует уменьшение содержания первичных продуктов пероксидного окисления липидов и параметров биохемилюминесценции по сравнению с группой крыс с сахарным диабетом 2 типа. При этом активность исследуемых антиоксидантных ферментов, возрастающая при патологии, изменялась в сторону контрольных значений. Наблюдаемые эффекты, вероятно, связаны со способностью мелаксена корригировать уровень мелатонина – гормона, являющегося эффективным антиоксидантом.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа, биохемилюминесценция, диеновые конъюгаты, супероксиддисмутаза, каталаза, мелаксен

**DOI:** 10.18097/PBMC20156104640

## ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний. Только за последнее десятилетие количество больных диабетом в России увеличилось более чем на 1 млн человек, причём преимущественно за счёт СД2 [1].

В развитии данного заболевания принимает участие большое число как генетических, так и средовых факторов, к которым можно отнести ожирение, малоподвижный образ жизни, беременность и нарушение гормонального обмена [2].

На ранней стадии развитие заболевания компенсируется гиперинсулинемией, что способствует поддержанию уровня глюкозы в норме. Со временем толерантность к глюкозе может снижаться, в результате усиления резистентности к инсулину, уменьшения ответной реакции на выработку инсулина или их сочетания. Имеются данные, что высокий уровень гликемии ведет к увеличению продукции активных форм кислорода (АФК) митохондриями [3], неферментативному гликированию белков [4, 5], а также аутоокислению глюкозы [6], что может быть сопряжено с нарушениями свободнорадикального гомеостаза.

Супероксиддисмутаза (СОД), являясь одним из ключевых ферментов антиоксидантной системы, обеспечивает дисмутацию $O_2^{\bullet -}$. В ходе реакции, катализируемой данным ферментом, образуется более стабильный и менее токсичный пероксид водорода ($H_2O_2$). Однако, в присутствии ионов металлов переменной валентности, таких как $Fe^{2+}$ или $Cu^{2+}$, $H_2O_2$ может быть преобразован в высоко реакционноспособный гидроксильный радикал $^{\bullet}OH$. Восстановление $H_2O_2$, до воды и молекулярного кислорода, осуществляет каталаза.

Часто, при прогрессировании патологических состояний, сопряжённых с оксидативным стрессом, наблюдается истощение собственного антиоксидантного потенциала. Поэтому использование экзогенных антиоксидантов может способствовать регуляции окислительно-восстановительных процессов в клетках и тканях. В связи с этим, представляет интерес использование препарата мелаксен – N-[2-(5-метокси-1Н-индол-3-ил)этил]ацетамид, являющегося синтетическим аналогом мелатонина. Как известно, данный гормон обладает антиоксидантной активностью в отношении снижения скорости процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и инактивирует свободные радикалы ($^{\bullet}OH$ и $ROO^{\bullet}$) [7].

* - адресат для переписки

Целью данной работы явилось исследование параметров биохемилюминесценции (БХЛ) и уровня диеновых конъюгатов (ДК), отражающих интенсивность свободнорадикального окисления (СО), а также активности антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы, в печени и сыворотке крови крыс с СД2, которым вводили мелаксен.

## МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали белых крыс-самцов (*Rattus rattus* L.) массой 150–200 г. Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными и в соответствии с санитарными правилами для вивария. СД2 индуцировали внутримышечным введением протамин-сульфата в течение трёх недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объёме 0,5 мл 0,9% NaCl, 3 раза в сутки [8].

В ходе эксперимента животные были разделены на три группы: 1 группа (n=16) контрольные животные; 2 группу (n=16) составляли животные с СД2; в 3 группе (n=12) животным с СД2 внутрибрюшинно вводили мелаксен в виде раствора в 1 мл 0,9% раствора NaCl утром в дозе 10 мг/кг на 15, 17 и 19 день эксперимента. Через три недели после начала индуцирования СД2 наркотизированных животных всех экспериментальных групп умерщвляли и использовали для дальнейших исследований. Печень перфузировали ледяным изотоническим раствором со скоростью 5 мл/мин в течение 5 мин. Навеску ткани гомогенизировали путем 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 и 1% β-меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 12 мин. Супернатант использовали для исследования.

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

Содержание глюкозы в сыворотке крови крыс определяли глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов “ГЛЮКОЗА-12-ВИТАЛ” (производитель ООО “Витал-Диагностикс”, Россия). Пробы крови брали из хвостовой вены на 15, 17 и 19 день эксперимента [9] в пробирки типа eppendorf без антикоагулянта, которые помещали на 10-15 мин в термостат при температуре 37°С. Сыворотку крови получали центрифугированием при 2500 g в течение 5 мин.

Для определения интенсивности свободно-радикальных процессов (СРП) применяли метод индуцированной пероксидом водорода с сульфатом железа биохемилюминесценции (БХЛ) [10].

Кинетическую кривую БХЛ регистрировали на биохемилюминометре БХЛ-07 с программным обеспечением в течение 30 с и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), соответствующую площади под кривой хемилюминесценции; интенсивность максимальной вспышки ($I_{max}$) – максимальное значение на кривой биохемилюминесценции, характеризующие интенсивность СРП, а также величину тангенса угла наклона касательной к кривой хода БХЛ ($tg\alpha_2$), характеризующую общую антиоксидантную активность.

Среда для определения интенсивности БХЛ имела следующий состав: 0,4 мл 0,02 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ $FeSO_4$ и 0,2 мл 2% раствора пероксида водорода (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый материал вносили в количестве 0,1 мл непосредственно перед измерением до внесения пероксида водорода.

Активность СОД определяли на спектрофотометре Hitachi U1900 с программным обеспечением при длине волны 540 нм по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата (ФМС) и NADH [11]. 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%-ого ингибирования восстановления НСТ.

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм. Используемый метод определения активности каталазы основан на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс [12].

Активность ферментов выражали в виде удельной активности, а также в ферментативных единицах на грамм сырой массы и на мл сыворотки. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°С.

Общий белок определяли биуретовым методом. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного исследования у крыс 2-ой экспериментальной группы выявлено прогрессирующее возрастание уровня гликемии (таблица). Так, на 19 сутки концентрация глюкозы в сыворотке крови животных увеличивалась в 2,7 раза по сравнению с контролем. Введение мелаксена крысам с СД2 приводило к снижению данного параметра в 2,6 раза. Вероятно, наблюдаемый эффект мелаксена объясняется повышением уровня мелатонина в организме. Известно, что мелатонин способен усиливать транспорт глюкозы в ткани путём усиления IRS-1/PI-3-киназного пути опосредовано, через MTNR1B рецептор [13].

*Таблица.* Концентрация глюкозы в сыворотке крови крыс экспериментальных групп животных. Различия достоверны при p≤0,05; * - по сравнению с контрольной группой, ** - по сравнению с группой с СД2.

| Группы животных | Концентрация глюкозы, мМ | | |
|---|---|---|---|
| | 15 день | 17 день | 19 день |
| 1 группа | 5,00±0,24 | 5,26±0,23 | 5,5±0,26 |
| 2 группа | 9,02±0,41* | 9,72±0,43* | 13,74±0,64* |
| 3 группа | 7,71±0,37** | 6,20±0,30** | 5,33±0,23** |

Известно, что при СД2 происходит интенсификация процессов ПОЛ [14], приводящая к возрастанию количества продуктов СО и пероксидов биомолекул, оказывающих токсическое влияние на клеточные структуры. Согласно полученным данным, при развитии патологии содержание ДК увеличилось в печени в 2,3 раза и в сыворотке в 1,6 раза (рис. 1). На усиление СРП в тканях экспериментальных животных при развитии СД2 указывают возрастающие значения параметров БХЛ (рис. 2, 3) по сравнению с контрольными значениями, что свидетельствует о возрастании интенсивности СО.

Введение мелаксена крысам с СД2 способствовало снижению уровня первичных продуктов ПОЛ в печени и в сыворотке крови (рис. 1).

При этом происходило снижение параметров БХЛ – S и $I_{max}$ в печени и сыворотке (рис. 2, 3) по сравнению с патологией.

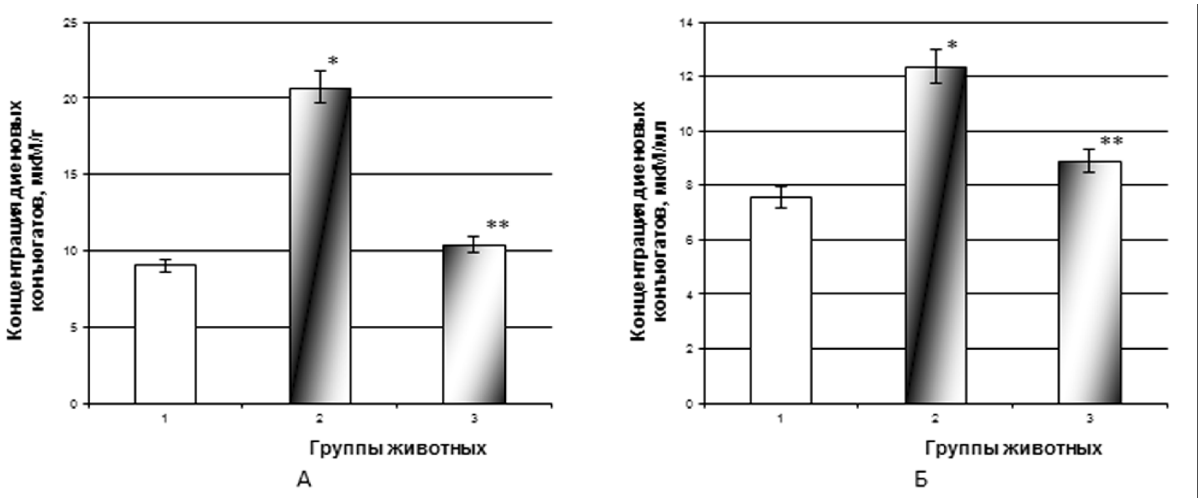


**Рисунок 1.** Содержание диеновых конъюгатов в печени (А) и сыворотке крови (Б) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении мелаксена животным с патологией (3). Здесь и на рисунках 2-7 различия достоверны при p≤0,05; * - по сравнению с контрольной группой, ** - по сравнению с группой с СД2.

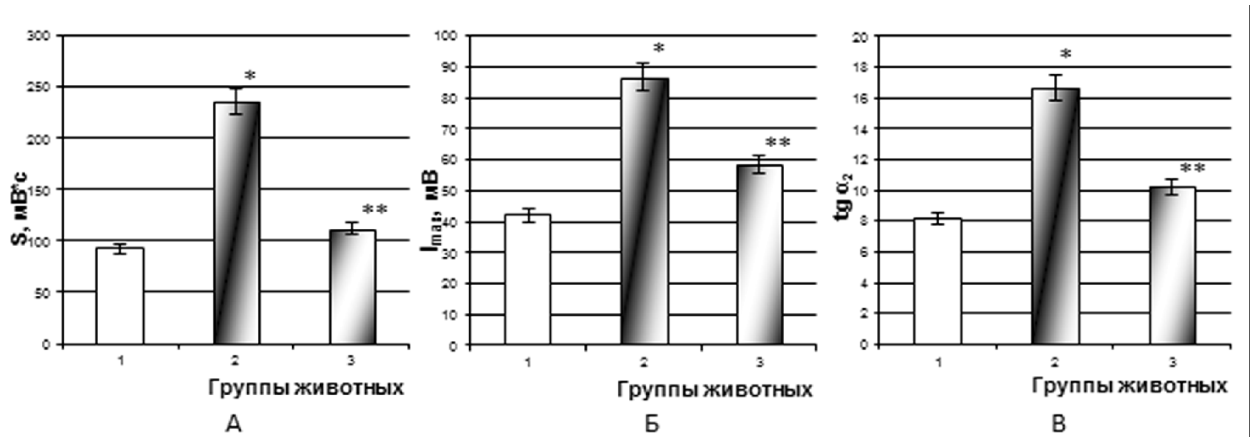


**Рисунок 2.** Параметры биохемилюминесценции: интенсивность максимальной вспышки ($I_{max}$) (А), светосумма медленной вспышки (S) (Б), тангенс угла падения кинетической кривой биохемилюминесценции ($tg\alpha_2$) (В) в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении мелаксена животным с патологией (3).

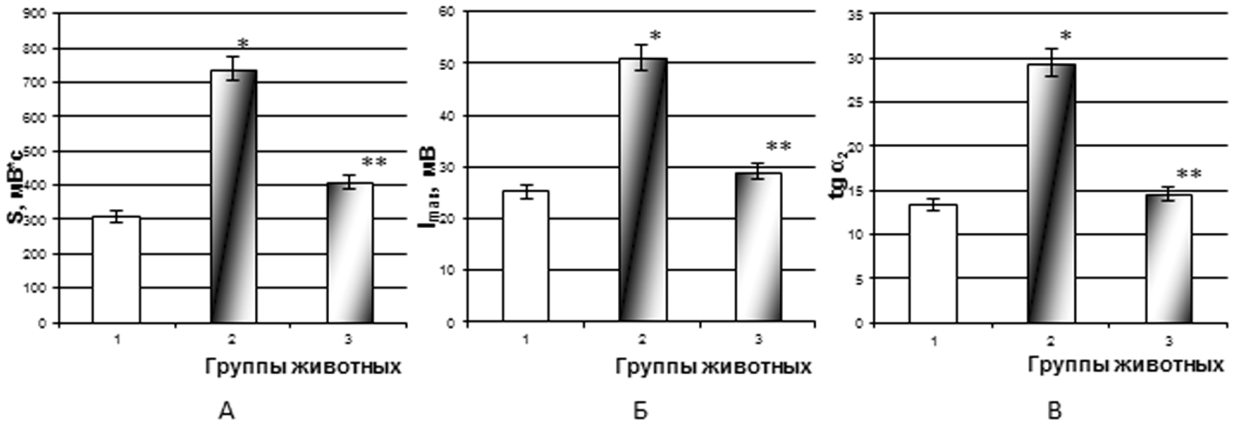


**Рисунок 3.** Параметры биохемилюминесценции: интенсивность максимальной вспышки ($I_{max}$) (А), светосумма медленной вспышки (S) (Б), тангенс угла падения кинетической кривой биохемилюминесценции ($tg\alpha_2$) (В) в сыворотке крови крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении мелаксена животным с патологией (3).

В условиях интенсификации СО, наблюдаемого при экспериментальном СД2, происходит увеличение удельной активности СОД в печени (рис. 4А) и в сыворотке (рис. 5А) по сравнению с контрольными животными. Значительное возрастание активности фермента выявлено при разных способах её выражения (Е/г сырой массы в печени (рис. 4Б), Е/мл сыворотки крови (рис. 5Б)). Аналогичные изменения – существенное повышение активности – обнаружены при исследовании каталазы печени и сыворотки (рис. 6, 7). Обнаруженное увеличение активности СОД и каталазы при СД2, очевидно, носит адаптивно–компенсаторный характер в ответ на чрезмерное образование АФК.

О мобилизации компенсаторных механизмов, направленных на снижение интенсивности СРП в исследуемых тканях животных в условиях СД2, свидетельствует существенное возрастание значения $tg\alpha_2$ – параметра БХЛ, характеризующего общую антиоксидантную активность (рис. 2, 3).

При введении мелаксена животным с СД2 отмечено снижение активности СОД в печени и сыворотке по сравнению с активностью при СД2 (рис. 4, 5). При этом снижение (1,9-2,0 раза в зависимости от способа представления активности) было более выражено для фермента печени. Аналогичные изменения обнаружены при иследовании активности каталазы печени и сыворотки (рис. 6, 7) при введении мелаксена животным с СД2. По-видимому, это может являться результатом проявления мелатонин-корригирующей способности мелаксена. Обладая антиоксидантной активностью, мелатонин нейтрализует большое число реактивных молекул, в том числе $O_2^{\bullet-}$ и $H_2O_2$ [24, 25]. В результате сокращения уровня активных кислородных метаболитов, вероятно, происходила нормализация окислительных процессов в тканях и, как следствие, снижение активности СОД и каталазы.

О снижении нагрузки на АОС при введении мелаксена, способного осуществлять регуляцию

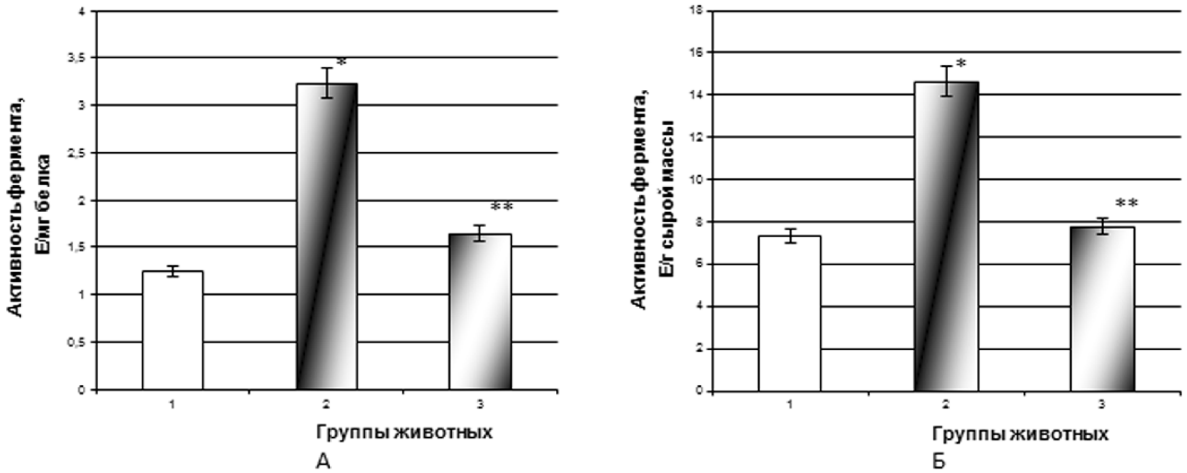


**Рисунок 4.** Активность супероксиддисмутазы, выраженная в виде Е/мг белка (А) и в Е/г сырой массы печени (Б) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении мелаксена животным с патологией (3).

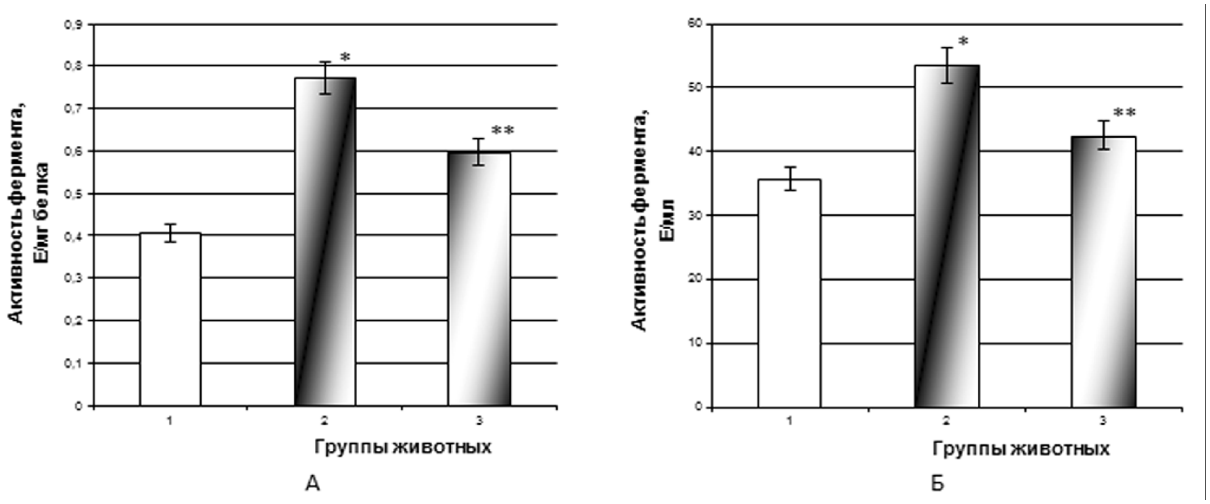


**Рисунок 5.** Активность супероксиддисмутазы, выраженная в виде Е/мг белка (А) и в Е/мл сыворотки крови (Б) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении мелаксена животным с патологией (3).

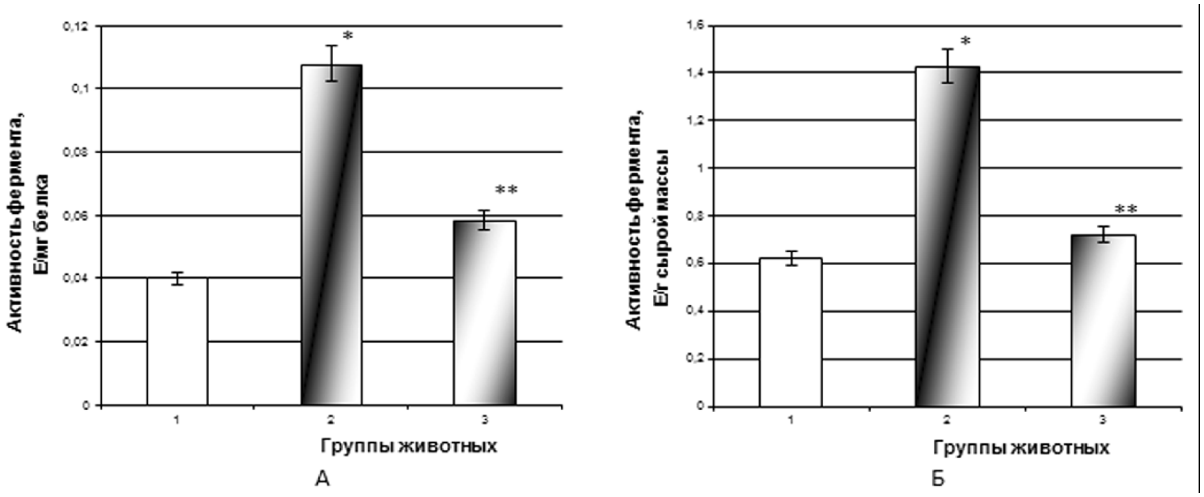


**Рисунок 6.** Активность каталазы, выраженная в виде Е/мг белка (А) и в Е/г сырой массы печени (Б) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении мелаксена животным с патологией (3).

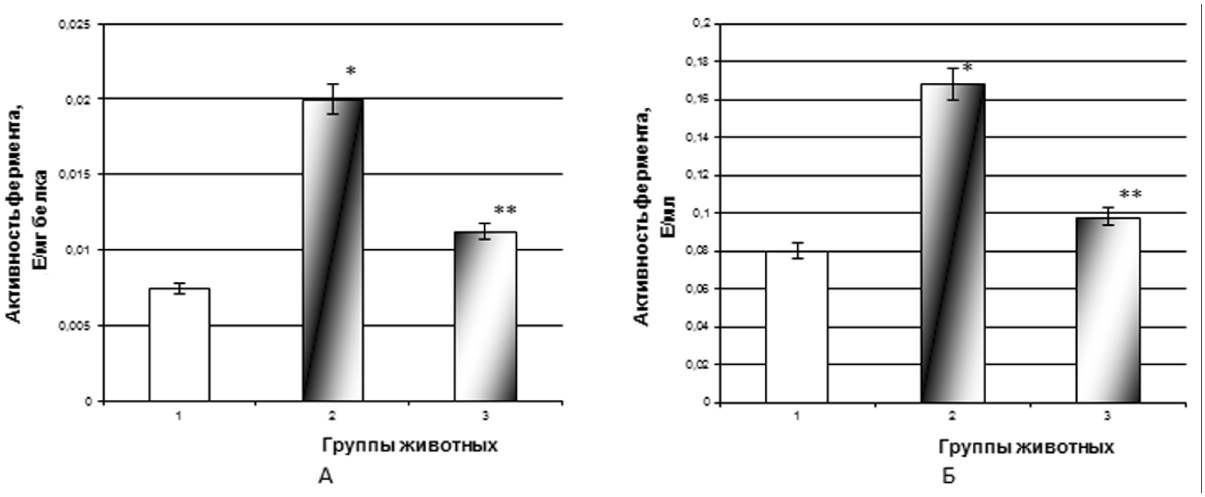


**Рисунок 7.** Активность каталазы, выраженная в виде Е/мг белка (А) и в Е/мл сыворотки крови (Б) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении мелаксена животным с патологией (3).

концентрации гормона мелатонина, проявляющего антиоксидантные свойства, говорит и снижение $tg\alpha_2$ в печени – в 1,6 раза (рис. 2В), в сыворотке – в 2,0 раза (рис. 3В) по сравнению с группой животных с СД2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что введение мелаксена, корригирующего уровень мелатонина в организме, снижает уровень ОС в организме, что выражается в изменении параметров БХЛ, характеризующих интенсивность СРП, и уровня ДК, а также активности антиоксидантных ферментов в сторону контрольных значений.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Дедов И.И.* (2010) Сахарный диабет, №3, 6-13.
2. *DeFronzo R.A.* (1997) Diabetes Rev., **5** (3), 177-269.
3. *Brownlee M.* (2001) Nature, **414**, 813-820.
4. *Brownlee M., Cerami A.* (1981) Ann. Rev. Biochem., **50**, 385-432.
5. *Brownlee M.* (2000) Metabolism, **49**, 9-13.
6. *Wolff S.P., Jiang Z.Y., Hunt J.V.* (1991) Free Radic. Biol. Med., **10**, 339-352.
7. *Zhou Y.-P., Grill V.E.* (1994) J. Clin. Invest., **93**(2), 870-876.
8. *Zhou Y.-P., Grill V.E.* (1995) Diabetes, **44**(4), 394-399.
9. *Assimacopoulos-Jeannet F., Thumelin S., Roche E., Esser V., McGarry J.D., Prentki M.* (1997) J. Biol. Chem., **272**(3), 1659-1664.
10. *Inoguchi T., Li P., Umeda F., Yu H.Y., Kakimoto M., Imamura M., Aoki T., Etoh T., Hashimoto T., Naruse M., Sano H., Utsumi H., Nawata H.* (2000) Diabetes, **49**(11), 1939-1945.
11. *Беспятых А.Ю., Бурлакова О.В., Голиченков В.А.* (2010) Успехи современной биологии, **130**(5), 487-496.
12. *Ульянов А.М., Тарасов Ю.А.* (2000) Вопросы мед. химии, **46**, 149-154.
13. *Богомолов А.Ф., Лукьянов И.Ю., Горбачева Л.Р.* (2005) Методические рекомендации по курсу экспериментальной физиологии для студентов биологического отделения биолого-химического факультета. Иваново: Ивановский государственный университет, 43 с.
14. *Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А., Корниец Г.В., Холодова Ю.А.* (1997), Биохимия, **62**(6), 712-715.
15. *Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д.* (1991) Лаб. дело, №7, 16-19.
16. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. и др.* (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
17. *Ha E., Yim S.V., Chung J.H., Yoon K.S., Kang I., Cho Y.H., Baik H.H.* (2006) J. Pineal Res., **41**(1), 67-72.
18. *Turk H.M., Sevinc A., Camci C., Cigli A., Buyukberber S., Savli H., Bayraktar N.* (2002) Acta Diabetologica, **39**(3), 117-122.
19. *Phillips S., Thornalley P.* (1993) Eur. J. Biochem., **212**(1), 101-105.
20. *Hardeland R., Poeggeler B., Niebergall R., Zelosko V.* (2003) J. Pineal Res., **34**(1), 17-25.
21. *Aydogan S., Yerer M.B., Goktas A.* (2006) J. Endocrinol. Invest., **29**(3), 281-287.
22. *Reiter R.J., Tan D.X., Manchester L.C., Qi W.* (2001) Cell Biochem. Biophys., **34**(2), 237-256.
23. *Hardeland R., Balzer I., Poeggeler B., Fuhrberg B., Uría H., Behrmann G., Wolf R., Meyer T.J., Reiter R.J.*. (1995) J. Pineal Res., **18**(2), 104-111.
24. *Rodríguez A.B., Nogales G., Ortega E., Barriga C.* (1998) J. Pineal Res., **24**(1), 9-14.
25. *Gulcin I., Buyukokuroglu M.E., Kufrevioglu O.I.* (2003) J. Pineal Res., **34**(4), 278-281.


Поступила: 09. 07. 2014.

## EFFECT OF MELAXEN ON FREE RADICAL PROCESSES INTENSITY AND SOME ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY IN RATS LIVER AND BLOOD SERUM UNDER TYPE 2 DIABETES MELLITUS

***A.N. Verevkin, T.N. Popova, A.A. Agarkov, A.V. Semenikhina***

Voronezh State University,
1 Universitetskaya sq., Voronezh, Russia 394006;
tel.: +7 (473) 228-11-60 (1110); fax: +7 (473) 220-87-55; e-mail: wer.all@mail.ru

The effect of melaxen on free radical processes and activity of superoxide dismutase and catalase in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM) has been investigated. It was established that melaxen administration to diabetic rats caused a decrease of the intensity of free radical processes as evidenced a decrease of the lipid peroxidation primary products content and biochemiluminescence parameters. The activity of the antioxidant enzymes changed towards normal values. These effects were probably induced by the correction of the melatonin level at the result of the melaxen action.

**Key words:** type 2 diabetes mellitus, biochemiluminescence, conjugated dienes, superoxide dismutase, catalase, melaxen