

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНОВОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

А. А. Сынорова¹, Т. Н. Попова¹, О. А. Сафонова¹, А. В. Макеева²

Проведена оценка влияния мелатонина на содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы в сыворотке крови, сердце, печени и скелетных мышцах крыс на фоне развития экспериментального ревматоидного артрита. При воздействии гормона было выявлено изменение данных параметров в направлении контрольных значений. Полученные результаты могут быть связаны с реализацией антиоксидантных и протекторных свойств мелатонина в условиях оксидативного стресса, сопровождающего развитие ревматоидного артрита.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; модель; глутатионовая антиоксидантная система; мелатонин; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Аутоиммунные патологии являются одной из серьезных проблем современной медицины, поскольку они относятся к числу наиболее тяжелых хронических заболеваний. Актуальность проблемы ревматических болезней, в основе патогенеза которых лежит сложное сочетание генетически детерминированных и приобретенных дефектов иммунорегуляторных механизмов, определяется их высокой распространенностью в популяции, трудностью их ранней диагностики и выбора эффективных средств терапии, быстрым развитием инвалидности [4]. В то же время имеются данные о патогенетической роли оксидативного стресса в повреждении клеток, обусловленном иммунным воспалением, что опосредовано увеличением образования активных форм кислорода (АФК) и продуктов их взаимодействия с биомолекулами [5]. Генерируемые синовиальными макрофагами свободные радикалы нарушают синтетические процессы в хондроцитах, вызывают развитие субхондральной эрозии и способствуют развитию некроза хондроцитов, что в дальнейшем усугубляет иммунные нарушения и способствует воспалительно-деструктивным процессам при ревматоидном артрите (РА) [13, 15]. Защиту от АФК в организме выполняет многоуровневая антиоксидантная система (АОС), одним из важнейших звеньев которой является глутатионовая система, обезвреживающая пероксид водорода и продукты свободнорадикального окисления (СО) биомолекул.

В связи с этим весьма важной задачей современной медицины и фармакологии является поиск средств, способных влиять на процесс развития оксидативного стресса при РА. В настоящее время особый интерес ученых проявляется к эндогенным антиоксидантам, среди которых особое место занимает мелатонин – гормон, продуцируемый эпифизом и некоторыми экстрапинеальными тканями млекопитающих. Мелатонин, который можно рассматривать как универсальный антиоксидант, обладает противовоспалительной активностью и уменьшает разрушение ткани при воспалительных реакциях посредством связывания свободных радикалов [6].

В связи с вышесказанным целью настоящей работы явилось исследование влияния мелатонина на функционирование глутатионовой АОС: содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9), глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) и глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18) в условиях развития экспериментального РА у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150 – 200 г, полученных из вивария, расположенного по адресу: Воронежская обл., с. Медовка, ул. Новоселов, 6. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Проводимые исследования одобрены этическим комитетом Воронежского государственного университета, что отражено в соответствующем протоколе. Моделирование экспериментального РА

¹ ФГБОУ ВО “Воронежский государственный университет”, Россия, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1.

² ГБОУ ВПО “Воронежский государственный университет” им. Н. Н. Бурденко, Россия, Воронеж.

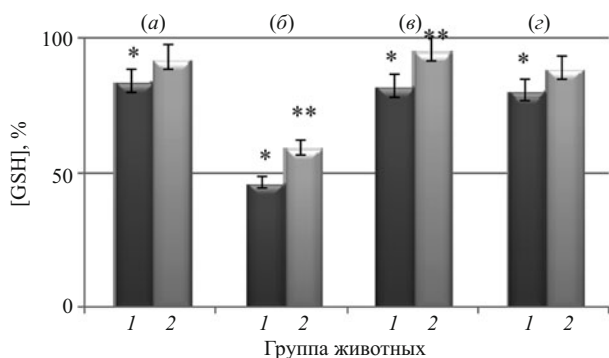


Рис. 1. Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и скелетных мышцах (г) крыс: 1 – животные с ревматоидным артритом без лечения; 2 – животные с патологией, которым вводили мелатонин. За 100 % принимали контрольные значения (в сыворотке крови – 0,37 мМ, в сердце – 0,29, в печени – 0,21, в скелетных мышцах – 0,52 мкмоль/мг белка тканевого гомогената). Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$; * различия по сравнению с контролем достоверны; ** различия по сравнению с патологией достоверны.

осуществляли путем однократного подкожного введения в подушечку лапки животного полного адьюванта Фрейнда – комплекса соединений, вызывающего развитие данной патологии, в количестве 0,1 мл на крысу [8].

Животные были разделены на 3 группы: I группу ($n = 22$) составили контрольные животные; II группу ($n = 23$) – животные, подвергнутые введению адьюванта Фрейнда; III ($n = 11$) – группа животных с РА, которым внутрибрюшинно вводили мелатонин (“Sigma”, США) в дозе 1 мг/кг массы животного в 0,5 мл 0,9 % раствора NaCl, начиная с 7 сут после начала индуцирования РА, ежедневно в утренние часы. На 15 сут после начала эксперимента под наркозом осуществляли забор биоматериала для исследований. В работе использовали сыворотку крови и гомогенат сердца, печени и икроножной мышцы (расположенной на лапке, где визуализировалось воспаление вследствие введения полного адьюванта Фрейнда) крыс.

Уровень восстановленного глутатиона определяли по реакции с реактивом Элмана при длине волны 412 нм [2]. Определение активности ферментов проводили спектрофотометрически при длине волны 340 нм [3].

Реакцию начинали добавлением ферментного препарата. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции или превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре +25 °С. Активность ферментов выражали в единицах в расчете на 1 мг белка. Определение общего белка проводили по методу Лоури. В работе были использованы

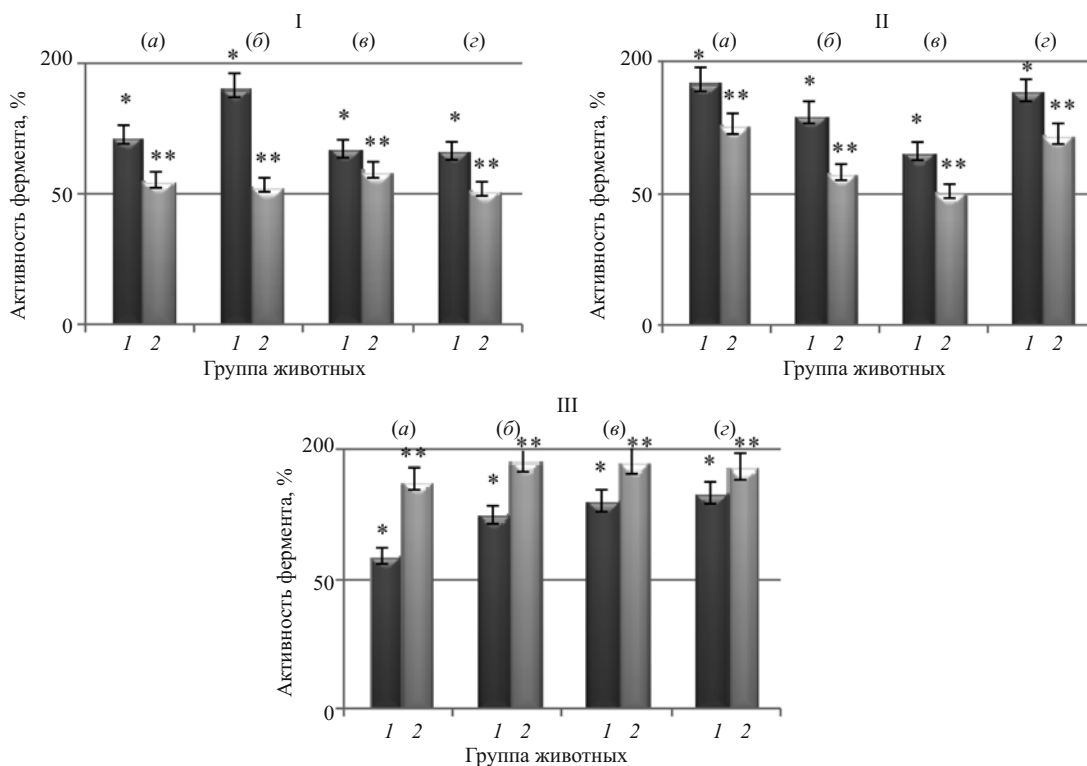


Рис. 2. Активность ГП (I), ГР (II) и ГТ (III) в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и скелетных мышцах (г) крыс: 1 – животные с ревматоидным артритом без лечения, 2 – животные с патологией, которым вводили мелатонин. За 100 % принимали контрольные значения (для I: в сыворотке крови – 0,0180, в сердце – 0,0590, в печени – 0,0118, в скелетных мышцах – 0,0366 Е/мг белка; для II: в сыворотке крови – 0,0019, в сердце – 0,0070, в печени – 0,0680, в скелетных мышцах – 0,0027 Е/мг белка; для III: в сыворотке крови – 0,0009, в сердце – 0,0108, в печени – 0,0072, в скелетных мышцах – 0,0079 Е/мг белка). Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$; * различия по сравнению с контролем достоверны, ** различия по сравнению с патологией достоверны.

следующие материалы и реактивы: трис, препарат глутатионредуктазы, GSH, GSSG, 5,5'-дителио-бис-(2-нитробензойная кислота), изоцитрат ("Sigma", США), NADP, NADPH (AppliChem, Германия), глюкозо-6-фосфат (MP Biomedicals (ICN), США), остальные реактивы – отечественного производства марки "х.ч." или "ч.д.а."

Данные, полученные при проведении опытов в 2-кратной аналитической повторности, обрабатывали с использованием статистических критериев [6]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$. На рисунках приводятся средние арифметические значения исследуемых параметров и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным ранее результатам, при экспериментальном РА у крыс наблюдается снижение содержания GSH в тканях животных в среднем на 27 % ($p \leq 0,05$) (рис. 1), что может быть объяснено сдвигом баланса между процессами образования, восстановления данного антиоксиданта и его расходования на обезвреживание образующихся интермедиатов и продуктов СО биомолекул [3]. Кроме того, в этих условиях было отмечено возрастание активности ГП и ГР в среднем на 25 % ($p \leq 0,05$) (рис. 2), что могло иметь важное адаптивное значение для формирования ответной реакции на развитие оксидативного стресса. При этом, очевидно, уменьшение уровня GSH не могло быть уравновешено даже выявленным повышением активности ГР – фермента, катализирующего восстановление глутатиона за счет использования НАДФН [3]. В то же время для активности ГТ, использующей восстановленный глутатион для обезвреживания экзо- и эндогенных токсикантов, при развитии РА у крыс было выявлено снижение значений относительно контроля в среднем на 34 % ($p \leq 0,05$) [3], что соотносится с изменением активности данного фермента при развитии окислительного стресса у пациентов с остеоартритом коленного сустава [14].

В ходе проведенной работы установлено, что после введения мелатонина на фоне развития РА в тканях животных отмечается увеличение содержания GSH относительно данных при патологии. Так, было показано, что воздействие мелатонина приводит к возрастанию содержания GSH в сердце в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), в печени – в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с животными с РА без лечения, в сыворотке крови и ткани скелетной мышцы была отмечена лишь тенденция к увеличению (рис. 1). Кроме этого, введение гормона крысам с патологией приводило к снижению удельной активности ГР в сыворотке крови и скелетных мышцах в 1,2 раза, в сердце – в 1,4 раза, в печени – в 1,3 раза относительно данных при РА ($p \leq 0,05$). Под действием мелатонина у крыс с РА наблюдалось уменьшение удельной активности ГП в сыворотке крови крыс и

скелетных мышцах в 1,3 раза, в сердце – в 1,7 раза, в печени – в 1,1 раза по сравнению с животными с патологией ($p \leq 0,05$) (рис. 2). Возрастание уровня глутатиона и снижение активности ферментов глутатионовой АОС организма после введения мелатонина может быть следствием торможения свободнорадикальных процессов под действием гормона, что, по-видимому, приводило к уменьшению нагрузки на данную систему, отвечающую за обезвреживание АФК и продуктов их взаимодействия с биомолекулами. Так, в литературе имеются сведения, что мелатонин способен как напрямую выступать в качестве ловушки свободных радикалов, так и снижать утечку электронов при работе электрон-транспортной цепи митохондрий, а также выступать синергистом при функционировании других антиоксидантов, что в результате может приводить к ингибированию процессов СО биомолекул. В частности, известно, что каждая молекула мелатонина способна связывать 2 $\cdot\text{OH}$ -радикала и генерировать в качестве продукта циклический 3-гидроксимелатонин, который появляется в моче и является показателем антирадикального действия мелатонина [9]. Кроме того, имеются данные, что экзогенно введенный мелатонин способен уменьшать образование $\text{NO}\cdot$ и поглощать ONOO^- , тем самым проявляя свои защитные эффекты. Помимо этого, данный гормон может непосредственно активировать синтез глутатиона [11, 12]. Также известно, что в качестве активных ловушек свободных радикалов может выступать не только сам гормон, но и продукты его взаимодействия с АФК, что многократно повышает его эффективность как антиоксиданта [12]. Так, известно, что в процессе формирования N'-ацетил-N2-формил-5-метоксикинурамина из мелатонина нейтрализуется до 4 различных типов свободных радикалов [10].

Установлено, что после внутрибрюшинного введения мелатонина крысам с РА происходит также увеличение активности ГТ по сравнению с уровнем при патологии: в сыворотке крови – в 1,5 раза, в сердце – в 1,3 раза, в печени – в 1,2 раза, в скелетных мышцах – в 1,1 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 2). Наблюдаемое изменение активности ГТ в сторону контрольных значений может быть также объяснено с точки зрения реализации антиоксидантных и протекторных свойств мелатонина.

Таким образом, введение мелатонина крысам с экспериментальным РА вызывает изменение содержания одного из важнейших антиоксидантов – GSH, а также активности ферментов глутатионовой АОС – ГП, ГР, ГТ – в направлении контрольных значений, что может быть объяснено торможением процессов СО биомолекул при участии данного гормона. В связи с вышесказанным представленные данные могут иметь определенное значение для разработки новых способов фармакологической коррекции исследуемого заболевания, сопряженного с развитием окислительного стресса.

Полученные результаты, свидетельствующие об изменении активности большинства компонентов глута-

тионовой АОС в сторону контрольных значений при действии мелатонина на фоне развития РА, могут служить обоснованием возможности применения мелатонин-корректирующих средств для фармакологической коррекции изменений метаболизма при развитии оксидативного стресса в условиях данной патологии.

ВЫВОДЫ

1. Внутривнутрибрюшинное введение мелатонина в дозе 1 мг/кг массы животного ежедневно в течение 8 дней на фоне развития экспериментального РА вызывает увеличение уровня восстановленного глутатиона в ткани сердца в 1,3 раза, в печени – в 1,2 раза относительно патологии ($p \leq 0,05$), в сыворотке крови и ткани скелетной мышцы отмечена лишь тенденция к увеличению.

2. В условиях введения гормона крысам с патологией было выявлено уменьшение активности ГР в сыворотке крови и скелетных мышцах в 1,2 раза, в сердце – в 1,4 раза, в печени – в 1,3 раза относительно данных при ревматоидном артрите ($p \leq 0,05$).

3. В группе животных с патологией, которым вводили мелатонин, было выявлено изменение в сторону контроля активности ГП: данный параметр снижался в сыворотке крови крыс и скелетных мышцах в 1,3 раза, в сердце – в 1,7 раза, в печени – в 1,1 раза ($p \leq 0,05$).

4. Введение мелатонина крысам с ревматоидным артритом сопровождалось увеличением активности ГТ: в сыворотке крови – в 1,5 раза, в сердце – в 1,3 раза, в печени – в 1,2 раза, в скелетных мышцах – в 1,1 раза по сравнению с уровнем при патологии ($p \leq 0,05$).

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ВУЗам в

сфере научной деятельности на 2014 – 2016 годы. Задание № 6.2477.2014/К.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Дмитриев, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Москва (2008).
2. В. С. Бузлама, М. И. Рецкий, Н. П. Мещеряков, Т. Е. Рогачева, *Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных*, Воронеж (1997).
3. Е. Д. Крыльский, Т. Н. Попова, Е. М. Кирилова, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **160**(7), 30 – 34 (2015).
4. Е. Л. Насонов, *Достижения ревматологии в XXI в. Научно-практ. ревматол.*, **52**(2), 133 – 140 (2014).
5. *Клиническая ревматология (руководство для врачей)*, В. И. Мазуров (ред.), Санкт-Петербург (2005).
6. Э. Ллойд, У. Ледерман, *Справочник по прикладной статистике*, Финансы и статистика, Москва (1990).
7. D. P. Cardinali, *Cur. Drug Targets. Immune, Endocrine Metabol. Disord.*, **4**(1), 1 – 10 (2004).
8. D. Wang, Y. Chang, Y. Wu, et al., *Clin. Exp. Immunol.*, **163**(2), 225 – 234 (2010).
9. D. X. Tan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**(3), 614–620 (1998).
10. E. J. Sanchez-Barcelo, C. M. Martinez-Campa, M. D. Mediavilla Gonzalez, et al., *Recent Patents Endocrine, Metabol. Immune Drug Discov.*, **1**(2), 142 – 151 (2007).
11. R. J. Reiter, D. X. Tan, C. Osuna, E. Gitto, *J. Biomed. Sci.*, **7**(6), 444 – 458 (2000).
12. R. J. Reiter, D. X. Tan, M. P. Terron, et al., *Acta Biochim. Polon.*, **54**(1), 1 – 9 (2007).
13. S. Paredes, *J. Rheumatol.*, **29**(11), 2271–2277 (2002).
14. W. Kulich, N. Fagerer, H. Schwann, *Cur. Med. Res. Opin.*, **23**(8), 1981 – 1986 (2007).
15. Y. E. Henrotin, P. Bruckner, J. P. Pujol, *Osteoarthritis Cartilage*, **11**(10), 747 – 755 (2003).

Поступила 15.09.15

EFFECT OF MELATONIN ON THE GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM ACTIVITY IN RAT TISSUES UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS

A. A. Synorova, T. N. Popova, O. A. Safonova, and A. V. Makeeva

Voronezh State University; 394006 Voronezh, Universitetskaya sq., 1; VSU

The influence of melatonin on the reduced glutathione content, activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione transferase in blood serum, heart, liver, and skeletal muscle of rats under conditions of experimental rheumatoid arthritis development has been estimated. A change in these parameters toward normal control values under the action of hormone has been revealed. The results can be related to realization of the melatonin antioxidant and protective properties under conditions of oxidative stress accompanying the development of rheumatoid arthritis.

Keywords: rheumatoid arthritis; model; glutathione antioxidant system; melatonin; rats.