

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ЭФФЕКТ МЕЛАТОНИНА НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

В. В. Зинчук, Е. В. Шульга¹

Исследованы эффекты мелатонина на кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние организма через 12 ч после введения липополисахарида кроликам. У животных, получавших мелатонин (внутрибрюшинно, 4 мг/кг) перед инъекцией липополисахарида (внутривенно, 500 мкг/кг), наблюдается улучшение кислородтранспортной функции крови, повышение сродства гемоглобина к кислороду, снижение уровня нитрат/нитритов, уменьшение прироста свободнорадикальных процессов, повышение уровня антиоксидантных факторов защиты. Очевидно, через NO-зависимые механизмы мелатонин модулирует кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние, уменьшая негативное действие эндотоксина на организм.

Ключевые слова: липополисахарид, мелатонин, кислород, кровь, антиоксиданты

ВВЕДЕНИЕ

Липополисахарид (ЛПС) — структурный компонент внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий, состоящий из полисахаридной части и липида А. При введении в организм в больших дозах приводит к развитию окислительного стресса, существенному снижению напряжения кислорода (pO_2) в тканях и уменьшению насыщения гемоглобина кислородом в микроциркуляторном русле [13]. Известно, что при этом виде стресса, вызванном введением ЛПС от *E. Coli*, на протяжении первых 3 ч наблюдаются ухудшение кислородсвязывающих свойств крови, сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, увеличение содержания нитрат/нитритов [4].

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), продуцируемый эпифизом, сетчаткой глаза, клетками APUD-системы, печени и других тканей, выступает в качестве эффективной “ловушки” свободных радикалов (ОН, ·ООН, ·O₂, NO· и ONOO⁻), в силу чего проявляет прямые антирадикальные эффекты [15]. В то же время он может действовать и как вторичный антиоксидант, стимулируя активность антиоксидантных ферментов: глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [3]. Есть данные о том, что мелатонин влияет на кислородтранспортную функцию крови [12]. Его регуляторное влияние на процесс образования и функцию основных элементов крови обеспечивает адаптивный характер их измене-

ний при неблагоприятных воздействиях [2], однако конкретные механизмы влияния данной субстанции на кислородтранспортную функцию крови, свободнорадикальные процессы в условиях введения ЛПС мало изучены. Цель работы — исследовать эффект мелатонина на кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние у кроликов через 12 часов от введения ЛПС.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве экспериментальных животных использовали кроликов-самцов массой 2,5 – 3,5 кг, которых содержали по одному в клетке при свободном доступе к воде и пище, 20 – 22 °С и режиме искусственной освещенности с 12-часовой периодичностью свет/темнота. Эксперименты проводили в светлое время суток (8.00 – 12.00). Животные были разделены на три группы. Кролики контрольной группы получали внутривенно болюсно 1 мл стерильного физиологического раствора ($n = 6$). Животным второй ($n = 8$) и третьей ($n = 7$) групп вводили в краевую вену уха ЛПС от *E.coli* (Serotype O111:B4, “Sigma” L-2630) в дозе 500 мкг/кг. Последним также предварительно в течение трех суток вводили внутрибрюшинно мелатонин в дозе 4 мг/кг/день в 1 % растворе этанола. Через 12 ч после введения ЛПС в условиях наркоза (30 мг/кг тиопентал-натрия внутривенно) через гепаринизированный катетер из правого предсердия проводили забор смешанной венозной крови для оценки кислородтранспортной функции крови и тканей (легкие, сердце, печень, почки, аорта) для определения показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты. Эксперименты проводили с соблюдением

¹ Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. В. В. Зинчук) Гродненского государственного медицинского университета, Беларусь, Гродно, 230015, ул. Горького, 80.
E-mail: zvvv@tut.by

правил работы с использованием экспериментальных животных.

С помощью микрогазоанализатора Syntesis-15 Instrumentation Laboratory определяли параметры кислородтранспортной функции и кислотно-основного состояния крови при температуре 37 °С: pO_2 , содержание кислорода (C_vO_2), степень оксигенации (SO_2), а также pH крови, напряжение углекислого газа (pCO_2), реальный и стандартный недостаток/избыток буферных оснований (ABE/SBE), стандартный бикарбонат (SBC), концентрацию бикарбоната (HCO_3^-) и общей углекислоты плазмы (TCO_2). По показателю $p50$ (pO_2 крови при 50 % насыщении ее кислородом), определяемому методом “смешивания”, оценивали сродство гемоглобина к кислороду (СГК) при стандартных значениях (температура 37 °С, pH 7,4, pCO_2 40 мм рт. ст.) ($p50_{\text{станд}}$) [17], а затем рассчитывался $p50$ при реальных условиях этих параметров по формулам J. W. Severinghaus ($p50_{\text{реал}}$) [18]. Количественное определение суммарного содержания нитратов/нитритов (NO_3^-/NO_2^-) в плазме крови проводили спектрофотометрическим методом с помощью реактива Грисса [9].

Активность свободнорадикальных процессов оценивали по содержанию первичных (диеновые конъюгаты, ДК) и вторичных (малоновый диальдегид, МДА) продуктов ПОЛ. Содержание ДК определяли на спектрофотометре СФ-46 по интенсивности поглощения липидным экстрактом монохроматического светового потока в области спектра 232 – 234 нм [5]. МДА измеряли спектрофотометрически на Solar PV1251С при длине волны 535 нм по образованию окрашенного комплекса, образуемого с тиобарбитуровой кислотой. Его концентрацию рассчитывали по формуле, исходя из коэффициента молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5$ моль/л [16]. Уровень антиоксидантной защиты оценивали по содержанию α -токоферола и активности каталазы. Определение α -токоферола в гексановой фракции осуществляли с помощью спектрофлуориметра F-4010 (“Hitachi”) при длине возбуждения 295 нм и длине испускания 326 нм [7]. В качестве стандарта использовали α -токоферол фирмы “Sigma”. Активность каталазы оценивали по способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 410 нм [8]. Значения признаков выражали в виде $M \pm m$, где M — среднее значение, m — ошибка среднего значения. Для расчета статистической значимости различий ($p < 0,05$) между экспериментальными группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (U).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основные параметры кислотно-основного состояния и кислородтранспортной функции крови у кроликов при введении мелатонина и ЛПС представлены в табл. 1. Введение ЛПС приводит к развитию метабо-

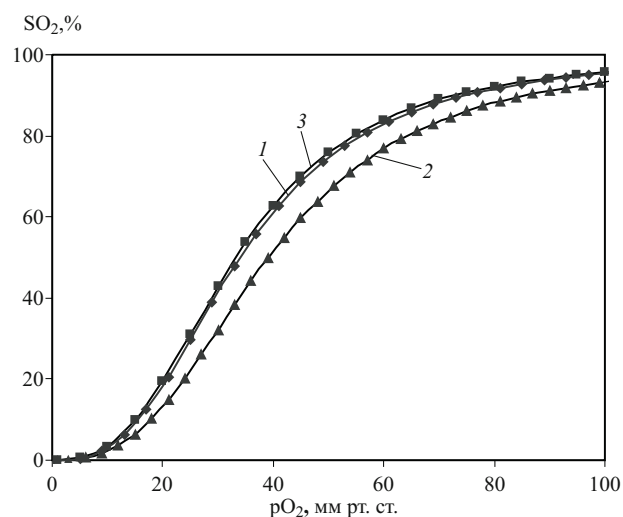


Рис. 1. Кривые диссоциации оксигемоглобина у кроликов при реальных значениях pH, pCO_2 и температуры в контроле (0,9 % NaCl) (1), после введения липополисахарида (2), после введения мелатонина и липополисахарида (3).

лического ацидоза. У животных, получавших мелатонин перед инъекцией ЛПС, отмечается повышение pH на 0,77 % ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС, но по сравнению с контролем — снижение на 1,09 % ($p < 0,05$). При введении мелатонина и ЛПС наблюдается также увеличение значений SBC на 16,7 % ($p < 0,05$), SBE на 28 % ($p < 0,05$), ABE на 23,5 % ($p < 0,05$), TCO_2 на 21,6 % ($p < 0,05$) и HCO_3^- на 22 % ($p < 0,05$) по отношению к

Таблица 1. Показатели кислородтранспортной функции крови у кроликов после введения мелатонина и липополисахарида ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n = 6)	Липополисахарид (n = 8)	Мелатонин + липополисахарид (n = 7)
$p50_{\text{реал}}$, мм рт. ст.	33,2 ± 0,7	39,2 ± 0,93*	34,1 ± 0,86 [#]
$p50_{\text{станд}}$, мм рт. ст.	31,0 ± 0,21	29,5 ± 0,45*	28,5 ± 0,32*
T, °С	38,9 ± 0,17	39,3 ± 0,12	38,6 ± 0,12 [#]
pH, ед.	7,42 ± 0,01	7,288 ± 0,02*	7,343 ± 0,02 [#]
Гемоглобин, г/л	93,5 ± 6,5	85,4 ± 2,65	102,0 ± 3,94 [#]
C_vO_2 , %	8,75 ± 1,26	6,6 ± 0,65	9,37 ± 0,66 [#]
SO_2 , %	75,17 ± 1,45	59,8 ± 2,38*	68,44 ± 1,86 [#]
MetHb, %	1,68 ± 0,23	1,08 ± 0,23	1,17 ± 0,19
pO_2 , мм рт. ст.	43,2 ± 1,96	38,5 ± 1,45	42,1 ± 0,59 [#]
pCO_2 , мм рт. ст.	40,4 ± 1,92	28,2 ± 1,3*	31,2 ± 1,66*
HCO_3^- , ммоль/л	26,7 ± 0,88	13,64 ± 0,59*	16,64 ± 1,05 [#]
TCO_2 , ммоль/л	27,95 ± 0,93	14,49 ± 0,62*	17,61 ± 1,08 [#]
ABE, ммоль/л	2,78 ± 0,75	- 11,0 ± 0,7*	- 8,4 ± 0,8 [#]
SBE, ммоль/л	2,1 ± 0,87	-13,18 ± 0,79*	- 9,49 ± 1,3 [#]
SBC, ммоль/л	26,77 ± 0,66	15,7 ± 0,59*	18,31 ± 0,92 [#]

Примечание. Здесь и в табл. 2 изменения статистически значимы по отношению: * – к контролю ($p < 0,05$), [#] – к группе липополисахарида ($p < 0,05$). n – число животных в группе.

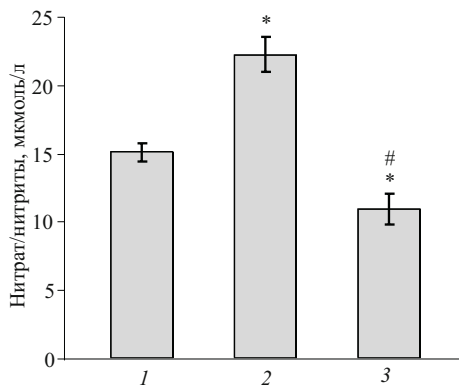


Рис. 2. Концентрация нитрат/нитритов в плазме крови у кроликов после введения мелатонина и липополисахарида.

1 – контроль, 2 – липополисахарид, 3 – мелатонин + липополисахарид. Изменения статистически значимы ($p < 0,05$) по отношению: * – к контролю, # – к группе введения липополисахарида.

группе ЛПС. Однако в сравнении с контролем отмечается снижение значений SBC на 8,45 ммоль/л ($p < 0,05$), SBE на 11,56 ммоль/л ($p < 0,05$), ABE на 11,18 ммоль/л ($p < 0,05$), TCO₂ на 10,34 ммоль/л ($p < 0,05$), HCO₃ на 10,06 ммоль/л ($p < 0,05$), pCO₂ на 9,17 мм рт. ст. ($p < 0,05$). При введении ЛПС наблюдается ухудшение кислородтранспортной функции крови, в то время как использование мелатонина и ЛПС приводит к увеличению C_vO₂, SO₂, pO₂ и гемоглобина на 41,2 % ($p < 0,05$), 14,5 % ($p < 0,05$), 9,5 % ($p < 0,05$) и 19,5 % соответственно.

В условиях введения ЛПС показатель p50 при стандартных значениях pH, pCO₂ и температуры снижается, в то время как при реальных условиях циркуляции наблюдается его повышение в сравнении с контролем. Применение мелатонина и ЛПС снижает значения p50_{станд} на 8,1 % ($p < 0,05$) по отношению к контролю и p50_{реал} на 13,1 % ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС, повышает СГК, что соответствует отклонению кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных условиях циркуляции влево (рис. 1).

По изменению суммарного содержания нитрат/нитритов судят об уровне продукции окиси азота (NO) в организме (рис. 2). После инъекции ЛПС значение NO₃⁻/NO₂⁻ увеличивается в сравнении с контролем. При введении мелатонина и ЛПС отмечается снижение уровня нитрат/нитритов на 50,7 % ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС, и на 27,4 % ($p < 0,05$) в сравнении с контролем.

После инъекции ЛПС наблюдается усиление свободнорадикальных процессов (увеличение уровня ДК и МДА), рис. 3. В условиях введения мелатонина и ЛПС отмечается снижение уровня первичных продуктов ПОЛ на 32,4 % в аорте ($p < 0,05$), на 19,1 % в сердце ($p < 0,05$), на 16,4 % в легких ($p < 0,05$), на 27,9 % в печени ($p < 0,05$) и на 25,8 % в почках ($p < 0,05$). Уменьшается также содержание МДА на 11,9 % в аорте

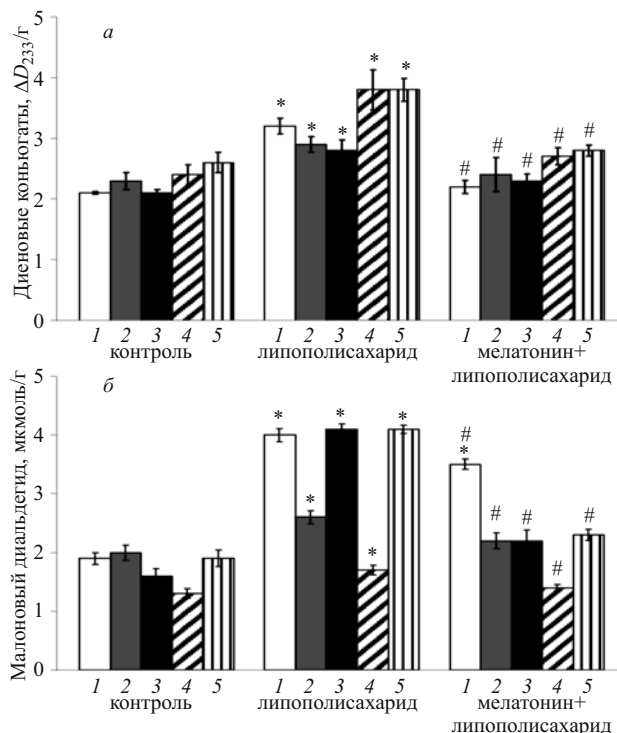


Рис. 3. Изменение содержания диеновых конъюгатов (а) и малонового диальдегида (б) в тканях кроликов после введения мелатонина и липополисахарида.

1 – аорта, 2 – сердце, 3 – легкие, 4 – печень, 5 – почки. Изменения статистически значимы ($p < 0,05$) по отношению: * – к контролю, # – к группе введения липополисахарида.

($p < 0,05$), на 6,7 % в сердце ($p < 0,05$), на 47 % в легких ($p < 0,05$), на 15,4 % в печени ($p < 0,05$), на 44,6 % в почках ($p < 0,05$). Одновременно с уменьшением прироста активности свободнорадикальных процессов наблюдается увеличение уровня антиоксидантных факторов защиты при введении мелатонина и ЛПС (табл. 2). Так, отмечается повышение концентрации α-токоферола на 14,9 % в аорте ($p < 0,05$), на 53 % в сердце ($p < 0,05$), на 11,1 % в легких ($p < 0,05$), на 29,2 % в печени ($p < 0,05$), на 18,2 % в почках ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС. Однако по отношению к контролю наблюдается снижение значений на 18,2 % в аорте ($p < 0,05$), на 12,5 % в сердце ($p < 0,05$) и на 25,7 % в печени ($p < 0,05$). В условиях введения мелатонина и ЛПС повышается активность каталазы на 47,5 % в аорте ($p < 0,05$), на 34,8 % в сердце ($p < 0,05$), на 119 % в легких ($p < 0,05$), на 42,9 % в печени ($p < 0,05$) и на 31,1 % в почках ($p < 0,05$) в сравнении с группой ЛПС, но по отношению к контролю отмечается снижение значений в аорте, сердце, легких, печени и почках на 61,6; 43,9; 49,7; 53,9 и 37,2 % ($p < 0,05$) соответственно.

Как показало проведенное исследование, мелатонин уменьшает развитие метаболического ацидоза, повышает СГК при реальных значениях pH, pCO₂ и температуры, снижает прирост свободнорадикальных

Таблица 2. Показатели антиоксидантной защиты в тканях у кроликов после введения мелатонина и липополисахарида ($M \pm m$)

Показатель		Контроль (n = 6)	Липополисахарид (n = 8)	Мелатонин + липополисахарид (n = 7)
α -Токоферол, мкмоль/г	Аорта	11,3 ± 0,15	8,0 ± 0,22*	9,2 ± 0,19*#
	Сердце	8,5 ± 0,11	4,8 ± 0,25*	7,4 ± 0,26*#
	Легкие	8,1 ± 0,26	7,1 ± 0,24*	7,9 ± 0,15#
	Печень	8,9 ± 0,27	5,1 ± 0,36*	6,6 ± 0,20*#
	Почки	8,9 ± 0,35	6,7 ± 0,25*	7,9 ± 0,17#
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ /мин/г белка	Аорта	6,1 ± 0,79	1,6 ± 0,15*	2,4 ± 0,14*#
	Сердце	5,5 ± 0,69	2,3 ± 0,33*	3,1 ± 0,24*#
	Легкие	5,3 ± 0,84	1,2 ± 0,23*	2,7 ± 0,21*#
	Печень	6,0 ± 0,60	1,9 ± 0,25*	2,8 ± 0,11*#
	Почки	6,2 ± 0,70	3,0 ± 0,19*	3,9 ± 0,23*#

процессов и нарушения антиоксидантной защиты у кроликов после 12 ч от введения ЛПС. Эффект гормона реализуется через влияние на специфические рецепторы, идентифицированные на мембранах и в ядерном аппарате клеток красной крови [2]. ЛПС приводит к образованию свободных радикалов кислорода, которые оказывают повреждающее воздействие на различные ткани организма. Мелатонин является нейтрализатором свободных радикалов, в частности, высокотоксичного $\cdot\text{OH}$, а также его предшественника H₂O₂. Он эффективнее (в 60 и 70 раз), чем витамины С и Е, соответственно, при защите ДНК от окислительных повреждений, индуцированных различными агентами, способными генерировать свободные радикалы, в частности, токсином из *Microcystis aeruginosa*, что, по-видимому, также связано с его способностью с легкостью проникать через биомембрану [1]. При введении мелатонина возрастает активность антиоксидантных факторов защиты в печени при незначительном изменении активности ферментов крови у интактных животных, снижается интенсивность свободнорадикального окисления в гепатоцитах и крови при токсическом поражении печени [6]. Данный гормон значительно увеличивает уровень глутатиона и снижает уровень NO и МДА при окислительных повреждениях печени [10], а также снижает активность свободнорадикальных процессов и ингибирует активность транскрипционного ядерного фактора каппа В ткани легкого [20].

ЛПС стимулирует активность цитокинов и индукцию индуцибельной изоформы NO-синтазы, в результате чего продуцируется большое количество NO [14]. Эффект мелатонина и его производных может быть связан не только с их прямым действием как “ловушки” радикалов, но и дисрегуляцией прооксидантных и провоспалительных ферментов, включая индуцибельную изоформу NO-синтазы, циклооксигеназу и др. [19]. В наших исследованиях при введении мелатонина прослеживается снижение суммарного содержания нитрат/нитритов, что связано с ингибированием продукции NO путем угнетения экспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы и ингибирования активно-

сти транскрипционного ядерного фактора каппа В, стимулированных ЛПС [11]. Мелатонин, нейтрализуя свободные радикалы и подавляя активность фермента индуцибельной изоформы NO-синтазы, снижает количество пероксинитрита (ONOO⁻), который образуется при взаимодействии супероксид-аниона с NO [15].

Мелатонин обладает выраженной способностью вмешиваться в функцию эритроцитов, которая носит защитный характер и базируется, по-видимому, как на системных, так и местных его эффектах [2]. Известно, что L-аргинин-NO-система участвует в формировании кислородсвязывающих свойств крови [4]. Результаты наших исследований показывают, что мелатонин снижает образование NO, изменяет СГК при реальных условиях циркуляции, оптимизируя процессы газообмена и оксигенации тканей. Очевидно, через NO-зависимые механизмы данный фактор модулирует кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние организма.

ВЫВОДЫ

1. Мелатонин уменьшает окислительные повреждения, вызванные введением липополисахарида, через 12 ч, судя по уровню диенового конъюгата, малонового диальдегида, содержанию α -токоферола и активности каталазы.

2. Мелатонин оптимизирует кислородтранспортную функцию крови, повышает средство гемоглобина к кислороду через NO-зависимые механизмы, уменьшая негативное действие эндотоксина на организм.

ЛИТЕРАТУРА

- С. Аль-Джассаби, А. М. Халил, *Биохимия*, 71(10), 1377 – 1382 (2006).
- Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер, *Экспер. и клин. фармакол.*, 69(3), 74 – 79 (2006).
- В. А. Барабой, *Укр. биохимич. журнал.*, № 3, 5 – 11 (2000).
- А. Н. Глебов, В. В. Зинчук, *Рос. физиол. ж. им. Сеченова*, 91(9), 1052 – 1059 (2005).
- В. С. Камышников, *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике*, 2-е изд., Т. 2., Мн.: Беларусь, (2002).

6. С. С. Попов, А. Н. Пашков, Т. Н. Попова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(1), 48 – 51 (2007).
7. Ю. И. Рагино, М. И. Воевода, Е. В. Каштанова и др., *Клин. лаб. диагностика*, № 4, 11 – 15 (2005).
8. O. I. Aruoma and S. L. Cuppett, *Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro Concepts*, AOCS Press, New York (1997).
9. N. S. Bryan and M. B. Grisham, *Free Radic Biol Med.*, **43**(5), 645 – 657 (2007).
10. C. Colak, H. Parlakpinar, M. K. Ozer, et al., *Med. Sci. Monit.*, **13**(11), 251 – 254 (2007).
11. G. Escames, L. C. López, F. Ortiz, et al., *Exp. Gerontol.*, **41**(11), 1165 – 1173 (2006).
12. S. V. Hlutkin and V. V. Zinchuk, *Adv. Med. Sci.*, **53**(2), 234 – 239 (2008).
13. S. Maier, W. Pajk, H. Ulmer, et al., *Shock*, **31**(1), 104 – 110 (2009).
14. S. M. McCann, C. Mastronardi, A. de Laurentiis, et al., *Ann N Y Acad. Sci.*, **1057**, 64 – 84 (2005).
15. R. J. Reiter and D. X. Tan, *Cardiovasc. Res.*, **58**(1), 10 – 19 (2003).
16. C. A. Rice-Evans and A. T. Diplock, M. C. R., *Symons Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research*, Elsevier Amsterdam – London – New York – Tokyo (1991).
17. P. Scheid and M. Meyer, *J. Appl. Physiol.*, **45**(5), 616 – 622 (1978).
18. J. W. Severinghaus, *J. Appl. Physiol.*, **21**(5), 1108 – 1116 (1966).
19. D. X. Tan, L. C. Manchester, et al., *J. Pineal. Res.*, **42**(1), 28 – 42 (2007).
20. J. Y. Zhang, C. H. Ding, Y. L. Ling, et al., *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.*, **20**(10), 604 – 606 (2008).

Поступила 03.05.09

EFFECT OF MELATONIN ON THE BLOOD OXYGEN-CARRYING FUNCTION AND PROOXIDANT – ANTIOXIDANT BALANCE AFTER LIPOPOLYSACCHARIDE INJECTION

V. V. Zinchuk* and K. V. Shul'ga

Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, Grodno, 230015, Belarus;

* e-mail: zvvv@tut.by

Effects of melatonin on the blood oxygen-carrying function and prooxidant – antioxidant balance in the organism were studied 12 h after lipopolysaccharide injection in rabbits. The treatment with melatonin (intraperitoneally in a dose of 4 mg/kg) before endotoxic lipopolysaccharide injection (intravenously 500 µg/kg) improved oxygen transport function of the blood, increased the hemoglobin – oxygen affinity, decreased nitrates/nitrites level, reduced the gain of free-radical processes, and increased the level of antioxidant protection factors in test animals. It is concluded that melatonin modulates the blood oxygen-carrying function and prooxidant – antioxidant balance through NO-dependent mechanisms, thus reducing the negative action of endotoxin on the organism.

Key words: Lipopolysaccharide, melatonin, oxygen, blood, antioxidants