

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

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

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

Поступила в редакцию 15.05.2018 г.

Аннотация. Одной из актуальных проблем современной биомедицины является исследование механизмов свободнорадикального окисления (СО) биомолекул, которые играют значительную роль в развитии состояний дезадаптации и функциональном повреждении клеток, приводящих к нарушению клеточного гомеостаза. В данных условиях может меняться функционирование ферментов окислительного метаболизма. Имеются сведения, что активация СО и дезорганизация антиоксидантной системы (АОС) занимают важное место в развитии и прогрессировании ревматоидного артрита (РА). В настоящее время для фармакологической коррекции окислительного стресса широко используют антиоксиданты различной природы. Помимо своих разнообразных биологических эффектов, антиоксидантное действие способен оказывать нейрогормон мелатонин. Целью данной работы явилось исследование процессов СО с помощью методов биофлуориметрии (БХЛ) и определения содержания первичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов (ДК), а также анализ активности ферментов окислительного метаболизма (аконитатгидратазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы) в тканях крыс при действии мелатонина на фоне развития РА. В качестве объекта исследования использовали белых крыс-самцов массой 200-250 г. Ревматоидный артрит у животных опытных групп вызывали путем подкожного введения в подушечку лапки полного адьюванта Фрейнда в объёме 100 мкл. Уровень ДК и активность ферментов оценивали спектрофотометрически. В условиях РА отмечалось возрастание параметров БХЛ и содержания ДК, что свидетельствует об интенсификации свободнорадикальных процессов при данной патологии. Введение мелатонина при развитии РА сопровождалось уменьшением данных показателей в тканях экспериментальных животных. Также при действии гормона на фоне развития патологии отмечалось изменение активности ферментов, генерирующих НАДФН, в сторону контрольных значений. По всей видимости, в этих условиях имеет место уменьшение интенсивности свободнорадикального окисления биосубстратов и, как следствие, снижение функциональной нагрузки на глутатионовую АОС и ферменты, поставляющие НАДФН, необходимый для ее работы. Введение мелатонина экспериментальным животным приводило также к повышению активности аконитазы – чувствительной мишени свободных радикалов - в сторону контрольных значений. Полученные результаты могут свидетельствовать о проявлении мелатонином протекторных и антиоксидантных свойств. Таким образом, представленные данные могут иметь важное значение для разработки новых способов фармакологической коррекции исследуемого заболевания, сопряженного с развитием окислительного стресса.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, мелатонин, свободнорадикальное окисление, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа.

Одной из актуальных проблем современной физико-химической биологии и медицины является исследование механизмов свободнорадикального окисления (СО) биомолекул, которые играют значительную роль в развитии состояний дезадаптации и функциональном повреждении клеток, приводящих к нарушению клеточного

гомеостаза [1]. В частности, в данных условиях может меняться функционирование ферментов окислительного метаболизма. Так, в качестве одной из наиболее чувствительных мишеней действия активных форм кислорода (АФК) в условиях окислительного стресса может выступать аконитатгидратаза (аконитаза, КФ 4.2.1.3; АГ), активность которой подавляется супероксидным анион-радикалом и другими свободными радикалами [2]. При интенсификации процессов СО важную

© Сынорова А. А., Попова Т. Н., Сафонова О. А., Макеева А. В., 2018

адаптивную роль в организме играет активация естественной антиоксидантной защиты, одним из звеньев которой является глутатионовая антиоксидантная система (АОС), функционирование которой лимитирует доступность НАДФН. В поставке данных восстановленных эквивалентов могут участвовать глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) и НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФ-ИДГ).

Имеются сведения, что активация процессов СО и дезорганизация АОС занимают важное место в развитии и прогрессировании воспалительных изменений у больных ревматоидным артритом (РА) [3-5]. РА – хроническое заболевание, характеризующееся развитием воспалительного процесса синовиальной оболочки и формированием костно-деструктивных изменений суставов, а также сопровождающееся рядом системных и внесуставных проявлений [6-8].

В настоящее время для фармакологической коррекции окислительного стресса при различных патологических состояниях широко используют антиоксиданты различной природы. Одним из эндогенных антиоксидантов является гормон эпифиза мелатонин (рис. 1), который помимо своих разнообразных биологических эффектов (снотворный, синхронизационный, иммуномодулирующий и др.) способен оказывать как прямое, так и опосредованное влияние на скорость процессов СО в организме, в том числе путем обезвреживания АФК, в частности, самой агрессивной формы – OH^{\bullet} – радикала [9-11].

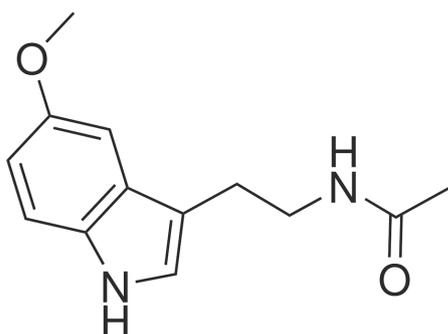


Рис. 1. Структура мелатонина

В связи с вышесказанным, целью данной работы явилось исследование процессов СО с помощью методов биохемилюминесценции (БХЛ) и определения содержания первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК), а также анализ активности ферментов окислительного метаболизма, способных лимитировать интенсивность свободнорадикальных процессов, в тканях крыс при действии мелатонина на фоне развития РА.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 200-250 г. Моделирование экспериментального РА осуществляли путем однократного подкожного введения в подушечку лапки животного полного адьюванта Фрейнда (0.1 мл на крысу) [12].

Животные были разделены на 3 группы: I-ую (n=22) составили контрольные животные; II (n=23) – животные, подвергнутые введению адьюванта Фрейнда; III (n=12) – животные с РА, которым внутривентриально вводили мелатонин в дозе 0.5 мг/кг веса в 0.5 мл 0.9% раствора NaCl с 7-х суток после индуцирования РА, ежедневно в утренние часы. На 15 сутки после начала эксперимента осуществляли забор биоматериала. Для исследований использовали сыворотку крови и гомогенат сердца, печени и икроножной мышцы (расположенной на лапке, где визуализировалось воспаление вследствие введения полного адьюванта Фрейнда) крыс.

Интенсивность процессов СО исследовали с помощью метода индуцированной пероксидом водорода с сульфатом железа БХЛ на биохемилюминометре БХЛ-07М. Оценка уровня ДК осуществляли спектрофотометрически при 235 нм [13]. Активность АГ определяли при длине волны 233 нм в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7.8), 4 мМ цитрат. Активность НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ определяли при длине волны 340 нм. Данные представляли в виде удельной активности. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных методов. Обсуждаются изменения при $p \leq 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно полученным результатам, в тканях животных с РА наблюдается усиление процессов СО, о чем свидетельствовало возрастание параметров БХЛ – светосуммы (S) и максимальной интенсивности сигнала (I_{\max}), и содержания ДК (рис. 2,3) [14]. Полученные результаты согласуются с данными литературы о возможности индуцирования окислительного стресса при развитии РА [3-5].

Введение мелатонина животным с РА в дозе 0.5 мг/кг приводило к снижению данных параметров в тканях крыс по сравнению с патологией. Так, было выявлено уменьшение значений I_{\max} БХЛ в сыворотке крови крыс в 1.5 раза, в сердце и печени – в 1.2 раза, в мышцах – в 1.4 раза. В этих условиях наблюдалось снижение значений S

БХЛ в сыворотке крови крыс в 1.3 раза, в сердце в 1.4 раза. Для ткани печени и скелетных мышц были выявлены незначительные изменения этого показателя в сторону контроля (рис. 2). Кроме того, действие мелатонина сопровождалось снижением уровня ДК в сыворотке крови крыс в 1.9 раза, в сердце в 1.5 раза, в печени – в 3.1 раза относительно значений при патологии (рис. 3). В мышцах при этом наблюдалась лишь тенденция к снижению. Вероятно, данные изменения свидетельствуют об антиоксидантном эффекте действия мелатонина, проявляющемся в уменьшении образования свободных радикалов и продуктов их взаимодействия с биомолекулами, которые в условиях оксидативного стресса оказывают прямое повреждающее действие на различные ткани, нарушая структурно-функциональные свойства молекул и надмолекулярных структур [15,16].

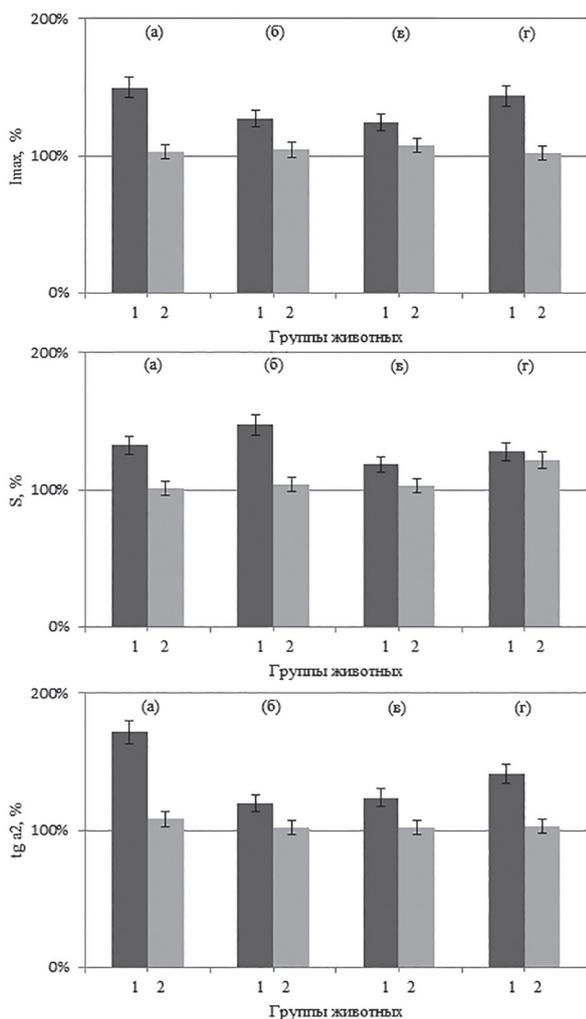


Рис. 2. Параметры БХЛ (I_{max} , mV; S, mV*s; $tg\alpha_2$) в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышечной ткани (г) крыс при РА (1) и действии мелатонина на фоне развития РА (2). За 100% принимали контрольные значения

Также в условиях индуцирования РА было отмечено увеличение значения $tg\alpha_2$ БХЛ, характеризующего общую антиоксидантную активность, что может быть связано с мобилизацией защитных механизмов в организме в ответ на усиление процессов СО [14]. Введение мелатонина на фоне развития экспериментального РА приводило к уменьшению данного показателя в сыворотке крови крыс в 1.6 раза, в сердце и печени – в 1.2 раза, в скелетных мышцах – в 1.4 раза относительно животных второй опытной группы (рис. 2), что может свидетельствовать о снижении степени мобилизации АОС организма вследствие реализации антиоксидантных свойств гормона.

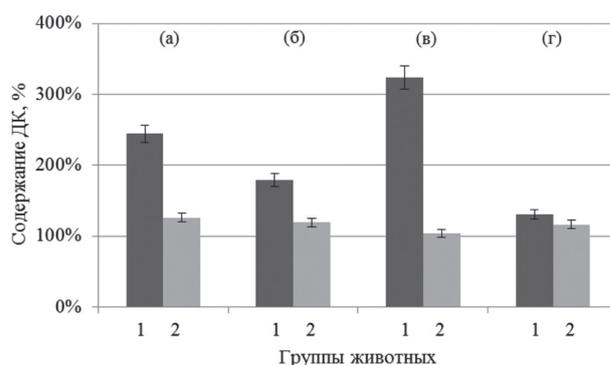


Рис. 3. Содержание ДК в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышечной ткани (г) крыс при РА (1) и действии мелатонина на фоне развития РА (2). За 100% принимали контрольные значения

В задачи нашей работы входило также исследование активности ряда ферментов окислительного метаболизма - АГ, Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ. Показано, что развитие РА сопровождается снижением активности АГ в ряде тканей крыс [14], по-видимому, за счет разрушающего влияния АФК на ее активный центр [2]. Установлено, что при введении мелатонина животным с РА наблюдалось увеличение активности АГ в сыворотке крови крыс в 1.3 раза, то есть до уровня контрольных значений. В этих условиях также возрастала активность фермента в сердце – в 1.4 раза, в печени и мышечной ткани – в 1.2 раза относительно значений при РА (рис. 4). Вероятно, изменения активности АГ в сторону контрольных значений связаны со снижением уровня СО и уменьшением степени повреждения молекулы фермента свободными радикалами.

Необходимость поставки НАДФН в условиях окислительного стресса при РА приводила к увеличению активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ в сы-

воротке крови крыс, печени и мышечной ткани, в то время как в сердце происходит снижение активности НАДФ-ИДГ [17]. Снижение активности НАДФ-ИДГ в сердце крыс могло быть связано с воздействием на данный фермент 4-гидроксиналена - конечного продукта пероксидного окисления n-6 полиненасыщенных жирных кислот, образующегося при ряде патологий, сопряженных с окислительным стрессом [18].

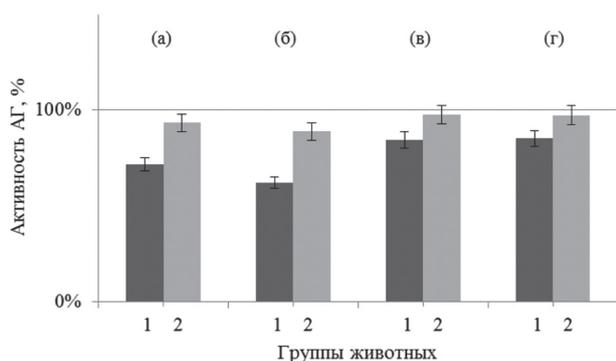


Рис. 4. Активность АГ в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышечной ткани (г) крыс при РА (1) и действии мелатонина на фоне развития РА (2). За 100% принимали контрольные значения

Введение мелатонина сопровождалось уменьшением активности Г6ФДГ в сыворотке крови крыс в 2.6 раза, в сердце и печени – в 1.3 раза, в скелетных мышцах – в 1.5 раза относительно значений при патологии (рис. 5). При этом отмечалось снижение активности НАДФ-ИДГ в сыворотке крови в 1.9 раза, в скелетных мышцах – в 1.7 раза, для печени были выявлены незначительные изменения. Также под воздействием мелатонина наблюдалось увеличение активности НАДФ-ИДГ в сердце в 1.2 раза относительно животных с патологией (рис. 5). Очевидно, введение мелатони-

на на фоне развития РА приводило к снижению интенсивности процессов СО биомолекул в организме животных, что сопровождалось нормализацией функционирования глутатионного редоксцикла и, следовательно, снижением потребности в восстановленных эквивалентах в виде НАДФН и изменением активности исследуемых ферментов окислительного метаболизма в сторону контрольных значений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты в большинстве случаев свидетельствуют об изменении исследуемых показателей – параметров БХЛ, уровня ДК и активностей АГ, Г6ФДГ, НАДФ-ИДГ, при введении мелатонина животным с экспериментальным РА в направлении контрольных значений. Это может являться следствием проявления мелатонином антиоксидантных свойств. В литературе имеются данные, что этот гормон способен участвовать в ингибировании свободнорадикальных процессов различными путями: напрямую выступая в качестве ловушки свободных радикалов, стимулируя ферменты АОС, активируя синтез одного из важнейших антиоксидантов – глутатиона, снижая утечку электронов при работе электрон-транспортной цепи митохондрий, выступая синергистом при функционировании других антиоксидантов [9,19,20]. Кроме того, 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 [9,10,21]. Таким образом, представленные данные могут иметь важное значение для разработки новых способов фармакологической коррекции исследуемого заболевания, сопряженно с развитием окислительного стресса.

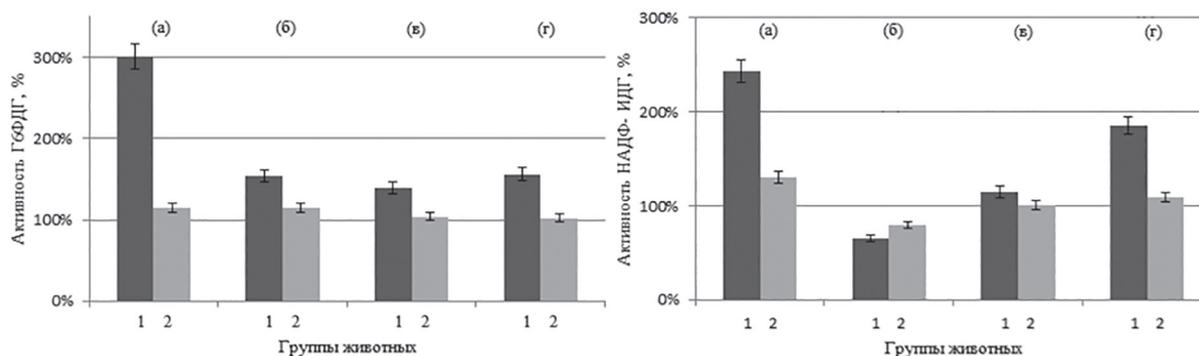


Рис. 5. Активность Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышечной ткани (г) крыс при РА (1) и действии мелатонина на фоне развития РА (2). За 100% принимали контрольные значения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Саиди Л. // Биомед. химия. 2010. Т. 56. № 4. С. 490-498.
2. Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91, No. 25, pp. 12248-12252.
3. Taysi S., Polat F., Gul M. // Rheumatol. Int. 2002. Vol. 21, No. 5, pp. 200-204.
4. Зборовская И.А., Баникова М. В. // Клин. ревматология. 1994. № 4. С. 13-16.
5. Cheng M.L., Ho H.Y., Tseng H.C. // Br. J. Haematol. 2005. Vol. 128, No. 1, pp. 119-127.
6. Мазуров В.И. Клиническая ревматология: руководство для врачей. СПб, Фолиант, 2005, 488 с.
7. Firestein G.S., Ruddy S., Harris E., Sledge C. // Kelly's Textbook of Rheumatology. 6th ed., 2001, pp. 921-966.
8. Majithia V., Geraci S.A. // Am. J. Med. 2007. Vol. 120, No. 11, pp. 936-939.
9. Reiter R.J., Tan D.X., Osuna C., Gitto E. // J. Biomed. Sci. 2000. Vol. 7, pp. 444-458.
10. Tan D.X. // Faseb J. 2001. Vol. 15, No. 12, pp. 2294-2296.
11. Paulis L., Simko F. // Physiological research. 2007. Vol. 56, No. 6, pp. 671-684.
12. Wang D. // Clin. and Exp. Immunol. 2011. No. 163, pp. 225-234.
13. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии. Москва, Медицина, 1972. С. 63-64.
14. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 160, №7. С. 30-34.
15. Reiter R.J., Tan D.X., Terron M.P. // Acta Biochimica Polonica. 2007. Vol. 54, No. 1, pp. 1 - 9.
16. Reiter R.J., Tan D.X., Poeggeler B. // Ann N. Y. Acad. Sci. 1994. Vol. 31, No. 719, pp. 1-12.
17. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49, № 9. С. 8-11.
18. Eaton P., Li J-M., Hears D. J., Shattock M. J. // Am. J. Physiol. 1999. No. 276, pp. H935 - H943.
19. Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J. // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 29, pp. 1177-1185.
20. Tan D.X. // Biol. Signals Recept. 2000. Vol. 9, pp. 137 - 159.
21. Zang L.Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1425, No. 3, pp. 469 - 477.

Воронежский государственный университет

** Сынорова А. А., аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии*

Тел.: +7 (473) 228-11-60, добавочный 1111

E-mail: nastia.gr@mail.ru

Voronezh State University

** Synorova A. A., post-graduate student, Department of Medical Biochemistry and Microbiology*

Ph.: +7 (473) 228-11-60, добавочный 1111

E-mail: nastia.gr@mail.ru

Попова Т. Н., профессор, докт. биол. наук, зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии

E-mail: tpopova@bio.vsu.ru

Popova T. N., PhD. (Biology), DSci., Full Professor, head of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology

E-mail: tpopova@bio.vsu.ru

Сафонова О. А., канд. биол. наук, доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии

e-mail: solya333@mail.ru

Safonova O. A., PhD (Biology), associate professor, Department of Medical Biochemistry and Microbiology

e-mail: solya333@mail.ru

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

Makeeva A. V., канд. биол. наук, доцент кафедры патологической физиологии

Тел.: +7 (473) 253-14-12

E-mail: a.makeeva@vsmaburdenko.ru

Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

Makeeva A. V., Ph.D. (Biology), associate professor, Department of Pathological Physiology

Ph.: +7 (473) 253-14-12

E-mail: a.makeeva@vsmaburdenko.ru

EFFECT OF MELATONIN ON OXIDATIVE STATUS AND ACTIVITY OF OXIDATIVE METABOLISM ENZYMES IN RATS TISSUES AT EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS

A.A. Synorova¹, T.N. Popova¹, O.A. Safonova¹, A.V. Makeeva²

¹Voronezh State University

²Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

Abstract. The study of the mechanisms of biomolecules free radical oxidation (FRO) is of current interest in modern biomedicine. Such processes play a significant role in the development of disadaptation states and cells functional damage that lead to disruption of cellular homeostasis. Under these conditions, the functioning of oxidative metabolism enzymes can change. There is evidence that activation of FRO and disorganization of the antioxidant system (AOS) occupy an important place in the development and progression of rheumatoid arthritis (RA). At present, antioxidants of various nature are widely used for pharmacological correction of oxidative stress. In addition to its various biological effects, the neurohormone melatonin is able to exert an antioxidant effect. The purpose of this work was to study FRO processes by methods of biochemiluminescence (BCL) and determination of LPO primary products - diene conjugates (DC) - content as well as analysis of the activity of oxidative metabolism enzymes (aconitate hydratase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADP-isocitrate dehydrogenase) in tissues of rats during melatonin action against the background of RA development. White male rats weighing 200-250 g were used as the object of the study. Rheumatoid arthritis in animals of the experimental groups was induced by subcutaneous injection of the complete Freund's adjuvant in a volume of 100 µl into the foot pad. DC level and enzymes activity were assessed spectrophotometrically. Under the conditions of RA, there was an increase in the BCL parameters and DC content, which indicates free radical processes intensification in this pathology. The introduction of melatonin at the development of RA was accompanied by a decrease in these parameters in the tissues of experimental animals. Also, with the hormone action against the background of the pathology development, there was a change in the activity of the enzymes that generate NADPH, toward the control values. Apparently, under these conditions there is a decrease in the intensity of biosubstrates free radical oxidation and, as a consequence, a decrease in the functional load on glutathione AOS and the enzymes that supply NADPH necessary for its action. The introduction of melatonin to experimental animals also led to an increase in the activity of aconitase, which is a sensitive target for free radicals, toward the control values. The obtained results may indicate the manifestation of protective and antioxidant properties by melatonin. Thus, the presented data can be of great importance for the development of new methods of pharmacological correction of the investigated disease, associated with the development of oxidative stress.

Keywords: rheumatoid arthritis, melatonin, free radical oxidation, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-isocitrate dehydrogenase

REFERENCES

1. Safonova O.A., Popova T.N., Saidy L., Biomedical chemistry, 2010, Vol. 56, No. 4, pp. 490-498.
2. Gardner P.R., Nguyen D.M, White C.W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1994, Vol. 91, No. 25, pp. 12248-12252.
3. Taysi S., Polat F., Gul M., Rheumatol. Int., 2002, Vol. 21, No. 5, pp. 200-204.
4. Zborovskaya I.A., Banikova M.V., Clinical rheumatology, 1994, No. 4, pp. 13-16.
5. Cheng M.L., Ho H.Y., Tseng H.C., Br. J. Haematol., 2005, Vol. 128, No. 1, pp. 119-127.
6. Mazurov V.I. Clinical rheumatology: rucovodstvo dlya vrachey. SPb, Foliant, 2005, 488 p.
7. Firestein G.S., Ruddy S., Harris E., Sledge C., Kelly's Textbook of Rheumatology. 6th ed., 2001, pp. 921-966.
8. Majithia V., Geraci S.A., Am. J. Med., 2007, Vol. 120, No. 11, pp. 936-939.
9. Reiter R. J., Tan D. X., Osuna C., Gitto E., J. Biomed. Sci., 2000, Vol. 7, pp. 444-458.
10. Tan D.X., Faseb J., 2001, Vol. 15, No. 12, pp. 2294-2296.
11. Paulis L., Simko F., Physiological research, 2007, Vol. 56, No. 6, pp. 671-684.
12. Wang D., Clin. and Exp. Immunol, 2011, No. 163, pp. 225-234.
13. Stal'naya I.D. Sovremennye metody v

biohimii. Moscow, Medicine, 1972, pp. 63-64.

14. Kryl'skiy E.D., Popova T.N., Kirilova E.M., Biulleten` eksperimental'noi biologii i meditsiny, 2015, Vol. 160, No. 7, pp. 30-34.

15. Reiter R.J., Tan D.X., Terron M.P., Acta Biochimica Polonica, 2007, Vol. 54, No. 1, pp. 1-9.

16. Reiter R.J., Tan D.X., Poeggeler B., Ann N. Y. Acad. Sci., 1994, Vol. 31, No. 719, pp. 1-12.

17. Kryl'skiy E.D., Popova T.N., Kirilova E.M., Chemico-pharmaceutical J., 2015, Vol. 49, No. 9, pp. 8-11.

18. Eaton P., Li J-M., Hearse D. J., Shattock M. J., Am. J. Physiol., 1999, No. 276, pp. H935-H943.

19. Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Free Radic. Biol. Med., 2000, Vol. 29, pp. 1177-1185.

20. Tan D. X., Biol. Signals Recept., 2000, Vol. 9, pp. 137 – 159.

21. Zang L.Y., Biochim. Biophys. Acta, 1998, Vol. 1425, No. 3, pp. 469 – 477.