

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 616.36-002-02:615.9]-008.9-074

А. Н. Пашков¹, С. С. Попов¹, А. В. Семенихина², Л. В. Матасова², Т. Н. Попова¹**ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС, СОДЕРЖАНИЕ ЦИТРАТА И АКТИВНОСТЬ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ¹**¹Кафедра биологии с экологией (зав. — проф. А. Н. Пашков) Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко, ²кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии (зав. — проф. Т. Н. Попова) Воронежского государственного университета

При введении мелатонина в печени крыс с токсическим гепатитом наблюдали снижение интенсивности свободнорадикальных процессов и степени мобилизации антиоксидантной системы, оцениваемых по показателям биоchemiluminescence и уровню α -токоферола, что, очевидно, объясняется антиоксидантным действием данного гормона. Введение мелатонина intactным животным приводит к уменьшению активности аконитатгидратазы и увеличению уровня цитрата, что отражает усиление антиоксидантного потенциала, так как способствует уменьшению образования гидроксильного радикала в реакции Фентона. Под действием мелатонина при токсическом гепатите в печени животных наблюдаются увеличение содержания цитрата и изменение активности аконитатгидратазы в сторону нормы по сравнению с крысами с токсическим гепатитом, которым не вводили гормон, что, видимо, связано с меньшей степенью мобилизации антиоксидантной системы в присутствии мелатонина, способного давать антиоксидантный эффект.

Ключевые слова: токсический гепатит, мелатонин, аконитатгидратаза, цитрат, α -токоферол, антиоксидантная система.

When melatonin was injected into the liver of rats with toxic hepatitis, there was a reduction in the rate of free radical processes and in the mobilization of the antioxidative system, as estimated by the parameters of biochemiluminescence and the level of α -tocopherol, which is likely to be accounted for by the antioxidative effect of this hormone. The administration of melatonin to intact animals causes a reduction in the activity of aconitate hydratase and an increase in the level of citrate, which reflects the enhancement of the antioxidative potential as it promotes the decreased hydroxyl radical formation in the Fenton reaction. Melatonin-induced elevations in citrate levels and changes in the activity of aconitate hydratase were observed in the liver of animals with toxic hepatitis as compared with those not receiving the hormone, which seems to be associated with the less mobilization of the antioxidative system in the presence of melatonin that is able to produce an antioxidative effect.

Key words: toxic hepatitis, melatonin, aconitate hydratase, citrate, α -tocopherol, antioxidative system.

Гормон диффузной нейроэндокринной системы мелатонин играет роль регулятора многих физиологических функций: участвует в формировании суточных биоритмов, торможении некоторых функций гипофиза, регуляции иммунных реакций, оказывает снотворное, анальгезирующее и седативное действие [3, 8, 15]. Имеются данные о протективном действии мелатонина при канцерогенезе [10, 18] и свободнорадикальном повреждении тканей [13, 16]. Известно, что интенсификация свободнорадикального окисления, возникающая вследствие дисбаланса между чрезмерной продукцией активных форм кислорода (АФК) и недостаточностью функционирования антиоксидантной системы (АОС), является важнейшим патогенетическим фактором в развитии ряда заболеваний, включая многие заболевания печени [1, 14]. Центральное место в неферментативном звене АОС занимает α -токоферол. Известно, что роль синергиста α -токоферола, способного восстанавливать его хинонную форму в фенольную и таким образом регенерировать антирадикальную активность, может выполнять цитрат [4]. Кроме того, цитрат обладает способностью связывать ионы Fe^{2+} , являющиеся участниками реакции Фентона, в ходе которой образуется одна из наиболее реакционно-способных АФК — гидроксильный радикал [17, 19]. Имеются данные о накоплении цитрата в миокарде и мозге

крыс при гипоксии [11]. Предполагается, что решающая роль в регуляции накопления цитрата принадлежит аконитатгидратазе (КФ 4.2.1.3). Аконитатгидратаза катализирует реакцию превращения цитрата в изоцитрат, и таким образом данный фермент может участвовать в регуляции уровня Fe^{2+} [5]. В некоторых работах сообщается о факте индуцируемого АФК подавления активности аконитатгидратазы, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве чувствительной и критической мишени действия АФК в условиях окислительного стресса [6].

Целью настоящей работы явилось исследование действия мелатонина на уровень свободнорадикальных процессов, содержание α -токоферола, цитрата и активность аконитатгидратазы в норме и при экспериментальном токсическом гепатите.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали белых крыс-самцов (*Rattus rattus* L.) массой 150—200 г. Животных разделили на 4 экспериментальные группы: 9 крыс 1-й (контрольной) группы содержали на стандартном режиме вивария; 9 животных 2-й группы для индуцирования токсического гепатита однократно вводили гепатотропный токсин CCl_4 в дозе 0,064 мл на 100 г массы тела после пищевой депривации животных в течение 1 сут; максимальный цитолиз гепатоцитов имел место на 3—4-е сутки [7], когда активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы воз-

¹Работа поддержана грантом программы "Университеты России" УР 07.01.004.

растала в 7,4 и 4,3 раза соответственно; 8 животным 3-й группе вводили мелатонин (2 мг/кг) внутрибрюшинно ежедневно в течение 3 дней в утренние часы; 8 крысам 4-й группе на следующий день после индуцирования токсического гепатита вводили мелатонин (2 мг/кг) в утренние часы в течение 3 дней. Печень извлекали у животных под наркозом после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором [7]. Ткань печени крыс измельчали и гомогенизировали в 4-кратном объеме охлажденного 0,1М трис-НСI-буфера (рН 7,8), содержащего 1 мМ ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали при 10 000 г 12 мин. Интенсивность свободнорадикальных процессов и общую антиоксидантную активность оценивали методом биохемилюминесценции [2]. Активность аконитатгидратазы определяли на спектрофотометре СФ 56 при 235 нм в среде, содержащей 0,05 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,8), 4 мМ цитрат. За ферментативную единицу (ФЕ) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в минуту при 25°C. Количество цитрата определяли по методу Нателсона [4]. Концентрацию α -токоферола определяли по методу, основанному на фотометрировании хромогенного комплексного соединения Fe^{2+} и ортофенотролина [9], уровень белка — по методу Лоури [12]. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

В работе использовали мелатонин, цитрат фирмы "Sigma" (США), трис-НСI-буфер, ЭДТА фирмы "Reanal" (Венгрия), остальные реактивы отечественного производства марки х. ч. или ч. д. а.

Результаты и их обсуждение

При токсическом гепатите показатели биохемилюминесценции — светосумма хемилюминесценции (*S*) и интенсивность максимальной вспышки (I_{max}), отражающие интенсивность процессов свободнорадикального окисления, — возрастали в гомогенате печени в 2,2 раза (см. таблицу). Величина тангенса угла наклона кинетической кривой ($tg \alpha_2$), являющаяся показателем антиокислительного потенциала, увеличивалась в 3 раза по сравнению с контролем. При введении мелатонина intactным животным происходило увеличение *S* и I_{max} в 1,4 раза; $tg \alpha_2$ возрастал на 73%. Мелатонин на фоне развития токсического гепатита снижал *S* и I_{max} в 1,3 раза, а величина $tg \alpha_2$ уменьшалась на 53% по

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления в гомогенате печени

Группа животных	<i>S</i> , мVх с	I_{max} , мV	$tg \alpha_2$
1-я	23,7 ± 1,16	4,3 ± 0,18	1,5 ± 0,06
2-я	52,5 ± 2,36*	9,4 ± 0,46*	4,5 ± 0,23*
3-я	33,2 ± 1,56*	5,9 ± 0,27*	2,6 ± 0,15*
4-я	40,7 ± 1,75***	7,1 ± 0,35***	2,4 ± 0,10***

Примечание. Звездочки — достоверность различий (*p* < 0,05): одна — с intactными животными (1-я группа), две — с животными с экспериментальным токсическим гепатитом (2-я группа).

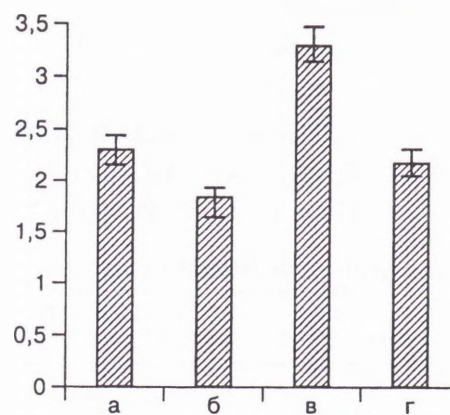


Рис. 1. Содержание α -токоферола в печени крыс (в мкмоль на 1 г сырой массы) в норме (а), при токсическом гепатите (б) и действии мелатонина на intactных (в) животных и подвергнутых токсическому гепатиту (г).

сравнению со 2-й опытной группой. Полученные результаты согласуются с данными о способности мелатонина к перехвату свободных радикалов. Так, показано, что мелатонин является мощным ингибитором макромолекулярного повреждения, вызванного гидроксильным радикалом [16].

Содержание α -токоферола в гомогенате печени крыс с токсическим гепатитом было ниже, чем в печени контрольных животных (рис. 1). При введении мелатонина наблюдали увеличение содержания α -токоферола в печени как intactных животных, так и крыс с токсическим гепатитом. Поскольку α -токоферол является основным антиоксидантом в липидной фазе мембран, то, очевидно, возрастание его концентрации свидетельствует о положительном действии мелатонина на ферментативную АОС печени и является подтверждением гепатопротекторного действия данного гормона.

При токсическом гепатите в печени крыс происходило снижение активности аконитатгидратазы: удельная активность фермента уменьшалась в 3 раза, активность, выраженная в ФЕ на 1 г сырой массы, — в 1,6 раза по сравнению с нормой (рис. 2). При этом содержание цитрата увеличивалось в 1,3 раза (рис. 3). По-видимому, это может быть следствием того, что молекула данного фермента легко

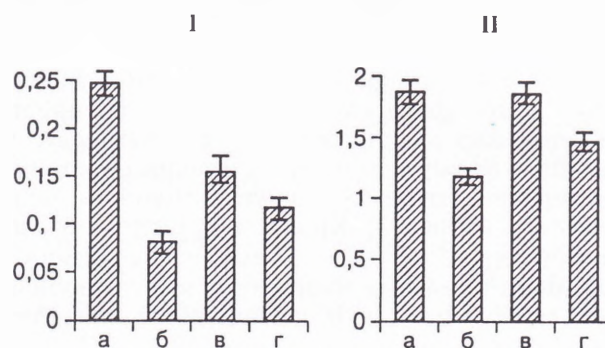


Рис. 2. Активность аконитатгидратазы в печени крыс в норме (а), при токсическом гепатите (б) и действии мелатонина на intactных животных (в) и крыс с токсическим гепатитом (г). I — удельная активность (в ФЕ на 1 мг белка); II — активность, выраженная в ФЕ на 1 г сырой массы.

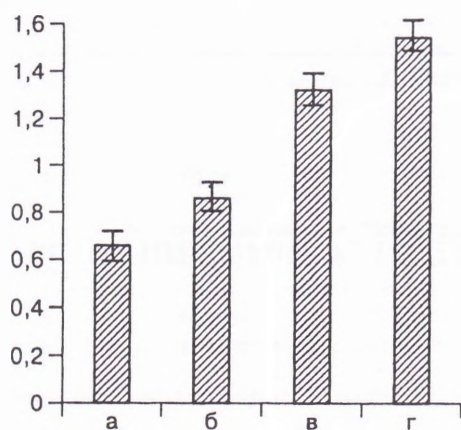


Рис. 3. Содержание цитрата в печени крыс (в μмоль на 1 г сырой массы) в норме (а), при токсическом гепатите (б) и действии мелатонина на intactных животных (в) и крыс с токсическим гепатитом (г).

разрушается АФК, содержание которых при токсическом гепатите возрастает. Это приводит к накоплению цитрата, способного выполнять антиоксидантную функцию за счет хелатирования Fe^{2+} . При введении мелатонина intactным животным также наблюдали снижение активности аконитатгидратазы, хотя оно было выражено в значительно меньшей степени по сравнению со 2-й группой (удельная активность аконитатгидратазы снижалась в 1,6 раза). Однако уровень цитрата возрастал в 2 раза. Нельзя исключить, что это могло быть связано с изменением активности других ферментов, участвующих в метаболических превращениях цитрата, — цитратсинтазы, АТФ-цитратлиазы, карнитинацетилтрансферазы. Повышение содержания цитрата в печени под действием мелатонина также можно рассматривать как усиление антиоксидантного потенциала, так как это способствует уменьшению образования агрессивного $OH^{\cdot}$ -радикала в реакции Фентона. После введения мелатонина крысам с токсическим гепатитом удельная активность аконитатгидратазы возросла в 1,4 раза, а концентрация цитрата — в 1,8 раза по сравнению с результатами, полученными во 2-й группе. По-видимому, антиоксидантное действие мелатонина снижает потребность в цитрате, а также уменьшает степень повреждения молекулы фермента свободными радикалами, что приводит к изменению активности аконитатгидратазы в сторону нормы.

Выводы

1. Введение мелатонина животным с токсическим гепатитом положительно влияет на оксидативный статус ткани печени, что проявляется в снижении интенсивности свободнорадикальных

процессов и степени мобилизации АОС, оцениваемых по показателям биохемилюминесценции.

2. Введение мелатонина вызывает увеличение содержания α -токоферола в печени как intactных животных, так и крыс с токсическим гепатитом, что является подтверждением гепатопротекторного действия данного гормона.

3. Введение мелатонина intactным животным приводит к снижению активности аконитатгидратазы и повышению уровня цитрата, что можно рассматривать как усиление антиоксидантного потенциала, так как это способствует уменьшению образования $OH^{\cdot}$ -радикала в реакции Фентона. Под действием мелатонина при токсическом гепатите в печени животных наблюдаются возрастание содержания цитрата и изменение активности аконитатгидратазы в сторону нормы по сравнению с крысами с токсическим гепатитом, которым не вводили гормон. Это, по-видимому, связано с меньшей степенью мобилизации АОС организма в присутствии мелатонина, способного давать антиоксидантный эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дудник Л. Б., Вискна Л. М., Майоре А. Я. // *Вопр. мед. химии* — 2000. — № 6. — С. 46—52.
2. Кузьменко А. И., Морозова Р. П., Николенко И. А. и др. // *Биохимия*. — 1997. — Т. 62, № 6. — С. 712—715.
3. Малиновская Н. К. // *Клин. мед.* — 1998. — № 10. — С. 15—22.
4. Медведова Л. В., Попова Т. Н., Артюхов В. Г. и др. // *Бюл. экспер. биол.* — 2002. — Т. 134, № 8. — С. 151—156.
5. Скулачев В. П. // *Биохимия*. — 1999. — Т. 64, № 12. — С. 16679—16688.
6. Скулачев В. П. Кислород и явления запрограммированной смерти. — М., 2000.
7. Федорова Н. Ю. Состояние системы глутатионпероксидазы—глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и ее роль в клеточной пролиферации: Дис. ... канд. биол. наук — ВГУ, Воронеж, 1999.
8. Dawson D. // *Ann. Med.* — 1998. — V.30, N 1. — P. 95—102.
9. Desai I. D., Martinez F. E. // *Clin. Chim. Acta.* — 1986. — Vol. 154, N3. — P. 247—250.
10. El-Sokkary G. H. // *Neuroendocrinol. Lett.* — 2002. — Vol. 23, N 4. — P. 335—340.
11. Freminet A. // *Comp. Biochem. and Physiol.* — 1981. — Vol. 70, N 3. — P. 427—430.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. L., Farr A. L. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 194, N 1. — P. 265—271.
13. Pahkla R., Zilmer M., Kullisaar T., Rago L. // *J. Pineal Res.* — 1998. — Vol. 24. — P. 96—101.
14. Park K. I. // *Yonsei Med. J.* — 2000. — Vol. 41, N 6. — P. 825—835.
15. Pevet P. // *Therapie.* — 1998. — Vol. 53, N 5. — P. 411—420.
16. Reiter R. J., Tan D. X., Qi W. // *Acta Pharmacol. Sinica.* — 1998. — Vol. 19. — P. 575—581.
17. Riess P., Zhang C., Saatman K. E. // *Neurosurgery.* — 2002. — Vol. 51, N 4. — P. 1043—1052.
18. Sener G., Sehirlir A. O., Ayanoglu-Dulger G. // *Pharmacol. Toxicol.* — 2003. — Vol. 93, N 6. — P. 290—296.
19. Skulachev V. P. // *Biosci. Rep.* — 1997. — Vol. 17, N 3. — P. 347—366.

Поступила 30.12.04