

ГУМОРАЛЬНЫЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭПИФИЗАРНОГО ГОРМОНА МЕЛАТОНИНА ПРИ ОТРАВЛЕНИИ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Э. Б. Арушанян, К. С. Эльбекьян

Ставропольская медицинская академия

В опытах на крысах показано, что комплекс солей тяжелых металлов вызывают развитие окислительного стресса и определенные биохимические сдвиги, а эпифизарный гормон мелатонин способен ослаблять их токсическое действие.

Ключевые слова: тяжелые металлы, супероксиддисмутаза, каталаза, мелатонин.

HUMORAL EVIDENCE OF THE PROTECTIVE ACTION OF EPIPHYSEAL HORMONE MELATONIN IN POISONING WITH THE HEAVY METALS SALTS

E. B. Arushanyan, K. S. Elbekyan

After chronic administration of complex heavy metal salts the oxidative stress with pathological changes in blood plasma was observed in the experimental animals (rats). These shifts on the contrary attenuated upon repeated injections of the main pineal hormone melatonin. As suggested melatonin may be universal natural factor for protection against different environmental toxic agents.

Key words: heavy metals, superoxide-dismutase, catalase, melatonin.

Известно, что различные соединения тяжелых металлов (ТМ) при длительном воздействии оказывают неблагоприятное влияние на деятельность многих органов и систем человека. Между тем их содержание в окружающей среде (почве, воде, воздухе) отдельных регионов нашей страны порой многократно превышает санитарно-гигиенические нормы, превращаясь в серьезную экологическую проблему, которая с годами все больше угрожает здоровью населения [3]. В том числе эта проблема чрезвычайно остро стоит в г.Ставрополе и некоторых районах Ставропольского края.

Согласно результатам проведенного нами анализа данных Ставропольского городского гидрометеорологического центра за последний пятилетний период, уровень ряда ТМ (железа, цинка, меди, хрома, никеля и свинца) в атмосферном воздухе, почве и воде в десятки, а порой и в сотни раз превышает их предельно допустимые концентрации. Это коррелирует и с более значительной распространенностью некоторых соматических заболеваний при сопоставлении городских и сельских показателей, а также с неодинаковым содержанием отдельных микроэлементов в слюне лиц, проживающих в разных экологических условиях.

Актуальность проблемы побуждает к поиску естественных механизмов защиты от подобной химической агрессии. На такую роль вполне могла бы претендовать мозговая железа эпифиз, биологически активные вещества которого, в частности, основной гормон мелатонин, обеспечивают протективный эффект при различных неблагоприятных воздействиях на организм [1].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выяснить эпифизарный вклад в развитие интоксикации, обусловленной ТМ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 40 белых беспородных крысах-самцах массой 110—150 г. Животные были разделены на 4 группы. 1-я группа (контрольная) получала физиологический раствор внутривентриально. Во 2-ю группу вошли животные, которым вводили смесь ТМ в течение 10, 30 и 90 дней: $K_2Cr_2O_7$ — 17,85 мг/кг; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 20,4 мг/кг; $NiSO_4$ — 14,7 мг/кг; $Pb(COOCH_3)_2$ — 36 мг/кг; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 565,95 мг/кг; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ — 51,9 мг/кг; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 8,85 мг/кг. Соотношение доз металлов в смеси приблизительно соответствовало среднему соотношению в атмосферном воздухе и питьевой воде г. Ставрополя. В 3-ей группе использовали мелатонин в дозе 0,1 мг/кг, внутривентриально в вечернее время суток (18⁰⁰ ч). Животным 4-й группы ТМ вводили утром, а вечером мелатонин.

Механизмы антиоксидантной защиты изучались по активности ферментов супероксиддисмутаза (определение проводили по методу Mistrá и Fridowich (1972) в модификации О. С. Брусова) и каталазы (по методике Баха А. Н., Зубковой С. А., 1997).

Ферментные маркеры повреждения клеток печени аланин- и аспартаттрансаминазы (АЛТ и АСТ) определялись в сыворотке крови унифицированным динитрофенилгидразиновым методом Райтмана-Френкеля с помощью наборов реактивов, которые используются в клинико-диагностических и научных лабораториях.

Определение билирубина проводилось колориметрическим диазометодом (Йендрашик, Клегторн, Гроф) с помощью набора реагентов фирмы «Ольвекс-диагностикум», общего белка сыворотки крови по биуретовой реакции (Lowry O. H., et al, 1951).

Крыс содержали в условиях вивария при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного и пищевого режима со свободным доступом к воде и еде. Полученные результаты подвергали вариационной статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под действием использованной смеси солей ТМ были отмечены выраженные биохимические сдвиги, свидетельствующие об их высокой токсичности. В частности, существенная информация о состоянии паренхимы печени была получена при определении активно-

сти ферментов АСТ и АЛТ. Известно, что содержание АСТ и АЛТ в сыворотке крови является высокоинформативным тестом, т. к. эти ферменты рассматриваются в качестве маркеров цитолиза. По нашим наблюдениям, десятидневная затравка крыс комбинацией металлов сопровождалась гепатотоксическим эффектом, признаком которого являлось статистически значимое повышение активности АЛТ в сыворотке крови животных (с $0,116 \pm 0,02$ до $0,244 \pm 0,01$ МЕ/мл). К концу первого месяца наблюдаемое нарастание активности АЛТ оставалось значимым ($0,270 \pm 0,021$ МЕ/мл, в контроле $0,114 \pm 0,03$ МЕ/мл, $p < 0,001$) и достигало наибольшего уровня к концу третьего месяца ($0,370 \pm 0,017$ МЕ/мл, $p < 0,001$) (см. табл.).

Таблица

Влияние сочетанного действия мелатонина и солей тяжелых металлов на биохимические показатели (М±m) крови крыс

Группа животных	Дни	Билирубин	Общий Белок	Альбумины	АСТ	АЛТ	СОД	КАТ
I	10	$14,02 \pm 0,20$	$74,3 \pm 1,70$	$33,9 \pm 0,80$	$0,199 \pm 0,010$	$0,186 \pm 0,020$	$335,0 \pm 13,300$	$6,54 \pm 0,720$
	30	$13,40 \pm 0,20$	$74,8 \pm 1,50$	$34,0 \pm 0,10$	$0,198 \pm 0,020$	$0,146 \pm 0,030$	$337,0 \pm 12,20$	$6,90 \pm 0,200$
	90	$13,40 \pm 0,40$	$75,1 \pm 0,90$	$34,2 \pm 0,20$	$0,200 \pm 0,03$	$0,121 \pm 0,02$	$336,0 \pm 13,50$	$6,90 \pm 0,65$
II	10	$14,10 \pm 0,40$	$58,5 \pm 3,00$	$24,9 \pm 0,01$	$0,213 \pm 0,05$	$0,244 \pm 0,01^*$	$216,0 \pm 9,47^*$	$3,10 \pm 0,10\#$
	30	$15,39 \pm 0,20$	$62,0 \pm 1,20$	$24,1 \pm 1,2$	$0,185 \pm 0,03$	$0,270 \pm 0,02^*$	$190,0 \pm 4,00^*$	$2,90 \pm 0,25\#$
	90	$16,39 \pm 1,20^*$	$59,0 \pm 1,27^*$	$20,1 \pm 1,10^*$	$0,400 \pm 0,01^*$	$0,370 \pm 0,017^*$	$190,0 \pm 4,50^*$	$2,50 \pm 0,90\#$
III	10	$14,39 \pm 0,01$	$60,5 \pm 3,10$	$28,5 \pm 1,25$	$0,200 \pm 0,01$	$0,120 \pm 0,02^*$	$279,0 \pm 21,60$	$7,71 \pm 0,40\#$
	30	$14,39 \pm 0,15$	$65,0 \pm 1,20$	$28,8 \pm 1,70$	$0,230 \pm 0,03^*$	$0,150 \pm 0,01$	$220,0 \pm 4,95^*$	$5,30 \pm 1,20$
	90	$13,00 \pm 0,30$	$65,3 \pm 5,10$	$29,0 \pm 0,12$	$0,220 \pm 0,01^*$	$0,150 \pm 0,03$	$250,0 \pm 5,23^*$	$5,90 \pm 0,01\#$
IV	10	$13,65 \pm 0,01$	$55,9 \pm 2,40$	$34,2 \pm 2,40\#$	$0,172 \pm 0,01^*$	$0,170 \pm 0,02\#$	$335,0 \pm 15,20\#$	$4,20 \pm 0,10\#$
	30	$13,6 \pm 0,01$	$59,0 \pm 3,20$	$35,5 \pm 1,20\#$	$0,180 \pm 0,09$	$0,150 \pm 0,01\#$	$320,0 \pm 12,70\#$	$4,30 \pm 0,42\#$
	90	$13,8 \pm 0,02\#$	$57,0 \pm 4,90$	$35,9 \pm 0,35\#$	$0,180 \pm 0,01\#$	$0,170 \pm 0,05\#$	$332,0 \pm 13,70\#$	$4,59 \pm 0,12\#$

Примечание. I группа — контрольные животные, II группа — с введением ТМ, III группа — с введением мелатонина, IV группа — с введением комбинации ТМ и мелатонина. * $p < 0,05$ — достоверность показателей по отношению к данным I группы; — по отношению к данным II группы.

Повышение активности АСТ, свидетельствующее о более глубоких изменениях в печеночной ткани, становится заметным лишь через 90 дней от начала введения крысам комплекса ТМ ($0,400 \pm 0,01$ МЕ/л против $0,200 \pm 0,03$ МЕ/л, $p < 0,001$).

Ключевую роль в антиоксидантной защите клеток играют ферменты супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Защитное действие этих ферментов предупреждает повреждение макромолекул клетки (липидов, белков, ДНК) избытком активных форм кислорода.

Как свидетельствуют приведенные данные, смесь солей ТМ вызывает снижение активности СОД (с $335,0 \pm 13,3$ до $216,0 \pm 9,5$ МЕ/мл) и КАТ (с $6,5 \pm 0,7$ до $3,1 \pm 0,1$ МЕ/л) в первые 10 дней затравки комплексом ТМ. На 30-е сутки активность ферментов снижалась еще больше (СОД $190 \pm 4,1$ МЕ/мл и КАТ $2,9 \pm 0,3$ МЕ/л, $p < 0,001$) и сохранялась до конца эксперимента.

Смесь солей ТМ вызывала снижение активности СОД (с $335,0 \pm 13,3$ до $216,0 \pm 9,5$ МЕ/мл) и КАТ (с $6,5 \pm 0,7$

до $3,1 \pm 0,1$ МЕ/л) в первые 10 дней затравки комплексом ТМ. На 30-е сутки активность ферментов снижалась еще больше (СОД $190 \pm 4,1$ МЕ/мл и КАТ $2,9 \pm 0,3$ МЕ/л, $p < 0,001$).

Нарушения были выявлены также со стороны белоксинтезирующей функции печени. Через 30 дней после начала эксперимента содержание общего белка в сыворотке крови опытной группы крыс достоверно снижалось ($56,2 \pm 1,2$ г/л против $74,8 \pm 1,5$ г/л в контрольной группе) и продолжало уменьшаться, достигнув к концу эксперимента величины $52,0 \pm 1,2$ г/л (в контроле $75,1 \pm 0,9$ г/л, $p < 0,001$). Снижение содержания общего белка в крови в сравнении с показателями контрольной группы животных выявлено значительно раньше, нежели изменения в содержании сывороточных альбуминов. Через 10 дней после введения солей ТМ содержание альбумина составляло 96,5 % относительно контрольных величин, через 30 дней — 74 % ($p < 0,001$), к третьему месяцу показатель составлял 59 % ($p < 0,001$) в сравнении с показателями контрольных

животных. Поскольку известно, что в печени синтезируется 95 % альбуминов плазмы крови, становится понятным важность данного показателя для оценки нарушения функции печени у крыс под влиянием ТМ

Особого внимания заслуживает содержание общего билирубина в сыворотке крови. Через месяц после начала опытов оно достигало $15,4 \pm 0,2$ мкмоль/л (в контроле — $13,0 \pm 0,2$ мкмоль/л, $p < 0,001$) и продолжало прогрессивно нарастать, достигая максимума к концу эксперимента $16,4 \pm 0,4$ мкмоль/л ($p < 0,001$).

При изучении биохимических показателей крови у третьей группы животных было установлено, что после 10 дней введения крысам мелатонина содержание общего белка начинало снижаться и принимало выраженный характер через месяц ($65 \pm 1,2$ г/л против $74,8 \pm 1,5$ г/л в контроле, $p < 0,05$). Одновременно наблюдалось значимое уменьшение содержания сывороточных альбуминов во все сроки наблюдений.

Воздействие мелатонина не изменяло активности антиоксидантных ферментов СОД и КАТ, хотя на протяжении всего эксперимента прослеживалась тенденция к их активации. Маркерные ферменты цитолиза АЛТ и АСТ под влиянием мелатонина также не изменяли свою активность.

Если же соли ТМ комбинировали с мелатонином, то негативное влияние смеси ксенобиотиков заметно ослабевало, свидетельствуя о существовании антагонистических отношений между веществами (см. табл.).

Таким образом, на основании полученных сведений, можно говорить о том, что мелатонин сглаживал неблагоприятные биохимические сдвиги, вызванные солями тяжелых металлов, что проявлялось в снижении активности цитолитических ферментов АЛТ и АСТ, усилении выработки антиоксидантных ферментов (СОД и КАТ) и восстановлении значений основных показателей крови (билирубина, общего белка, альбумина).

Согласно полученным результатам, умеренная гиперактивность индикаторного цитолитического фермента АЛТ (1,5 раза больше, чем в контрольной группе) после введения смеси ТМ может указывать на нарушение структуры мембран. Изменение целостности мембран может способствовать увеличению продукции O_2^- . В этом случае генерация супероксидных анионов возрастает, и возникает угроза токсического поражения организма за счет действия активных форм кислорода [4, 5, 9].

Внутрибрюшинное введение смеси солей ТМ сопровождалось снижением активности СОД и КАТ, являющихся ключевыми антиоксидантными ферментами, что соответствует другим литературным данным. Так, повышению содержания свинца сопутствовали снижение активностью СОД и более высокий уровень ПОЛ [5]. В условиях *in vitro* добавление свинца вызывало ингибирование активности СОД, КАТ и глутатионпероксидазы в эритроцитах периферической крови, подчеркивая важную роль окислительного стресса в свинцовой интоксикации [5, 9]. На развитие окислительного стресса

указывает и зарегистрированное нами увеличение содержания билирубина, которое, по мнению ряда авторов [3], может быть связано с тем, что работающие с повышенной нагрузкой гепатоциты печени не способны полностью обезвреживать билирубин, образующийся при лизисе поврежденных ксенобиотиками эритроцитов.

Согласно полученным результатам, при сочетанном введении мелатонина негативное влияние ТМ ослабевало. Активность АЛТ снижалось и приближалось к норме, СОД и КАТ восстанавливали свою активность. Следовательно, действие мелатонина оказывается направленным на защиту антиоксидантной активности клеток. Возможно, что это связано с его способностью непосредственно связывать свободные радикалы. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* было показано, что мелатонин обладает значительно более выраженной активностью, чем такие мощные внутриклеточные антиоксиданты как глутатион и витамины Е и С [11]. Такая высокая антиоксидантная эффективность мелатонина не может быть объяснена только его способностью мелатонина прерывать процесс липидной перекисидации путем инактивации радикала $ROO\cdot$. Возможно, что она может включать в себя еще и инактивацию радикала $OH\cdot$, являющегося одним из инициаторов процесса ПОЛ [7, 9]. Помимо высокой антиоксидантной активности, ряд авторов указывают на хелатирующие свойства мелатонина, что выражается в его способности образовывать прочные комплексы с такими металлами как Cu, Fe, Zn Pb [9].

Тем самым, резонно полагать, что накапливаясь, ТМ приводят к изменению активности ферментов, нарушая целостность клеточных мембран, стимулируют перекисное окисление липидов, а мелатонин за счет своих антиоксидантных, хелатирующих свойств способен ослаблять их токсическое действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арушанян Э. Б. Уникальный мелатонин. — Ставрополь, 2006. — 399 с.
2. Трахтенберг И. М., Иванова Л. А. // Мед. труда и пром. экол. — 1999. — № 11. — С. 28—32.
3. Хазанов А. И. Функциональная диагностика болезней печени — М., 1988.
4. El-Missiry M. A. // J. Biochem. Mol. Toxicol. — 2000 — Vol. 4. — P. 57—62.
5. Ito Y., Niiya Kurita H., Shima S., et al. // Int. Arch. Occup. Environ Health. — 1985. — Vol. 56 — P. 119—127
6. Pablos M.I., Agapito M.T., Gutierrez R., et al. // J. Rineal Res. — 1995. — Vol. 9. — P. 111—115.
7. Parmar P., Limson J., Nyokong T., et al. // J. Pineal Res. — 2002. — Vol. 4. — P. 237—242.
8. Reiter R. S., Melchiorri D., Sewerynek E., et al. // J. Pineal Res. — 1995. — Vol. 8. — P. 2—11.
9. Sugawara E., Nakamura K., Miyake T., et al. // Br. J. In. Med. — 1991. — Vol. 8. — P. 239—242.
10. Susa N., Ueno S., Furukawa Y., et al. // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 1997. — Vol. 2. — P. 377—384.