

## ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ СЕМЕННИКОВ НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ НИТРАТНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Шаталин Б.О., Костенко В.О.

ВГУЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», Полтава, Украина

*Введение мелатонина (0,3 мг/кг) крысам, получавшим 30 дней по 200 мг нитрата натрия в сутки на кг массы тела и три раза в последнюю неделю рентгеновское облучение (по 0,08 Гр) повышает продукцию супероксида НАДН-стимулированной электронно-транспортной цепью, антиоксидантный потенциал, активность супероксиддисмутазы, каталазы, цитохромоксидазы, однако существенно не влияет на выработку супероксида НАДФН-оксидазой в тканях семенников. Сочетанное действие рентгеновского облучения и нитратной интоксикации способствует усилению прооксидантного звена и ослаблению антиоксидантного. Мелатонин частично компенсирует эти изменения.*

**Ключевые слова:** нитратная интоксикация, рентгеновское облучение, мелатонин, свободно-радикальное пероксидное окисление, антиоксидантный потенциал, семенники.

**Введение.** Ухудшение мужского репродуктивного здоровья связано с антропогенным загрязнением окружающей среды, особенно действием ионизирующей радиации [14]. Облучение половых желез особенно опасно из-за риска генетических повреждений, в том числе усиления свободно-радикального перекисного окисления биополимеров [3, 6]. Доказано отрицательное влияние нитратов и продуктов их биотрансформации (нитритов, оксида азота) на семенники, в том числе вследствие усиления свободно-радикального пероксидного окисления биополимеров [4].

Оксид азота (NO) образуется в цикле преобразования экзогенного нитрат-аниона [8]. Главными биохимическими мишенями для NO, которые им активируются, является растворимая гуанилатциклаза (в составе кальциевой мессенджерной системы) и АДФ-рибозилтрансфераза, транскрипционные факторы NF-κB и AP-1, система MAP-протеинкиназа, контролируемая G-белком H-Ras [2,12]. Супероксидный анион-радикал окисляет NO в токсический пероксинитрит, который в отличие от вазодилатора NO является вазоконстриктором. Есть сведения, что NO модулирует интенсивность сперматогенеза и подвижность сперматозоидов [13].

Мелатонин эпифиза образуется в темноте, является сомногенным нейромедиатором, гормоном, стимулятором иммунной системы, радиопротектором, мощным антиоксидантом, блокаторм пролиферации большинства клеток, однако снижает секрецию гонадотропинов гипофизом [1]. К амфифильному мелатонину есть рецепторы мембранные и ядерные. Через последние усиливается экспрессия генов антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, при угнетении экспрессии генов NO-синтазы и липоксигеназы [1]. Есть данные о влиянии избытка мелатонина (1 мг/кг массы тела крыс в сутки – 55 дней) на семенники крыс, сопровождающемся уменьшением антиоксидантного потенциала по сравнению с нормой [6].

В литературе отсутствуют данные о влиянии мелатонина при сочетанном воздействии на организм нитратной интоксикации и рентгеновского облучения.

Целью работы является экспериментальное исследование влияния мелатонина на окислительный метаболизм в семенниках крыс, получавших рентгеновское облучения и нитрат натрия.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 24 крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г в трёх сериях опытов (в каждой по 8 животных): пер-

вая – интактные крысы; вторая – животных наряду с ежедневным интрагастральным введением нитрата натрия в дозе 200 мг/кг массы в виде водного раствора в течение 30 суток [4] на 4-й неделе интоксикации тотально облучали рентгеновским излучением в ежедневной дозе 0,08 Гр (суммарно 0,25 Гр); третья – на фоне сочетанного влияния нитрата натрия и рентгеновского облучения крысам вводили мелатонин интрагастрально в дозе 0,3 мг/кг в виде водного раствора ежедневно утром в течение 30 суток. Крыс декапитировали под эфирным наркозом. При обращении с животными соблюдались принципы биоэтики.

В семенниках определяли биохимические параметры: продукцию супероксидного анион-радикала – при проведении теста с нитросиним тетразолием в гомогенате тканей с индукторами в виде никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата восстановленного (НАДФН) (для оценки выработки супероксида соответственно митохондриальной и микросомальной электронно-транспортными цепями [7], концентрацию ТБК-реагирующих продуктов до и после инкубации гомогената семенников в прооксидантном железо-аскорбатном буферном растворе [5], активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы [5], глутатионпероксидазы [11], цитохромоксидазы (ЦХО) [15].

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для проверки распределения на нормальность применяли расчет критерия Шапиро-Вилка. Если данные соответствовали нормальному распределению, то для их сравнения использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. В случае, когда ряды данных не подлежали нормальному распределению, статистическую обработку осуществляли с использованием непараметрического метода – теста Мана-Уитни. Статистические расчеты проводили с использованием программ «Microsoft Excel 2007» и «StatisticSoft 6.0».

**Результаты и обсуждение.** При сочетанном действии нитратной интоксикации и рентгеновского облучения генерация супероксида стимулированной НАДН электронно-транспортной цепью окисления увеличилась на 41%. Введение в этих условиях мелатонина снизило величину указанного показателя на 22%, то есть до уровня нормы. Увеличение продукции супероксида может быть связано с угнетением активности цитохромоксидазы и одноэлектронным восстановлением кислорода на уровне митохондрии-

альных ферментных комплексов I (НАДН – убихинооксидоредуктаза), III (убихинонол – цитохром с оксидоредуктаза) и цитохром b-c1 комплекса [9].

Генерация супероксида стимулированной НАДФН электронно-транспортной цепью снизилась при сочетании действия исследуемых факторов – на 39%. Действие мелатонина существенно не изменило значение этого показателя.

Предполагаем, что нитраты окисляют Fe+2 и стабилизируют цитохром P-450, что снижает его активность, оксид азота блокирует фермент, образуя комплекс с Fe+3 по лигандному месту субстрата [9]. Рентгеновское облучение может подавлять синтез фермента на генном уровне. Возможно, мелатонин не только снижает экспрессию гена NO-синтазы, но и связывает железо цитохром-P-450-подобных гемопротеинов этого фермента.

**Таблица** - Параметры семенников при совместном действии на крыс нитрата натрия, рентгеновского облучения и мелатонина

Показатели	Интактные животные	Нитрат натрия + рентгеновское облучение	Нитрат натрия + рентгеновское облучение+ мелатонин
Супероксид, стимуляция НАДН, нмоль/г·с	18,6±1,2	26,3±1,2 p1<0,002	20,4±1,2 p1>0,05 p2<0,01
Супероксид, стимуляция НАДФН, нмоль/г·с	16,7 ±1,3	10,2±0,9 p1<0,002	12,1±1,5 p1<0,05 p2>0,5
ТБК-реактанты до инкубации, мкмоль/кг	19,3±2,2	49,7±2,5 p1<0,001	28,5±3,2 p1<0,05 p2<0,001
ТБК-реактанты после инкубации, мкмоль/кг	23,2±3,2	61,7±7,1 p1<0,001	51,1±2,8 p1<0,001 p2>0,05
Прирост ТБК-реактантов за время инкубации, мкмоль/кг	3,9±2,7	12,4±4,1 p1>0,05	22,6±1,1 p1<0,002 p2<0,05
СОД, ед. акт.	3,8±0,3	2,5±0,1 p1<0,002	3,7±0,3 p1>0,05 p2<0,01
Глутатионпероксидаза, ед. акт	82,9±7,4	65,1±5,6 p1<0,05	88,4±5,2 p1>0,05 p2<0,05
Каталаза, ед. акт.	0,95±0,08	0,52±0,07 p1<0,002	0,70±0,06 p1<0,05 p2>0,05
ЦХО, ед. акт.	1,45±0,21	0,57±0,06 p1<0,05	1,41±0,20 p1<0,5 p2<0,002

*Примечание: сравнение величин p1 с данными интактной группы; p2 – с результатом второй серии*

Концентрация ТБК-реагирующих продуктов в семенниках по сравнению с величинами нормы увеличились при сочетании действия нитратной интоксикации и рентгеновского облучения – на 158%. Введение в этих условиях мелатонина сопровождалось снижением значения показателя на 42% (p<0,001).

Таким образом, мелатонин выявляет способность ограничивать развитие пероксидации в семенниках. Возможный механизм действия мелатонина в этом случае двоякий: прямой антиоксидантный эффект и косвенный через супрессию экспрессии гена NO-синтазы [10].

При оценке результатов второй серии прирост ТБК-реагирующих продуктов за время инкубации в прооксидантном буферном растворе не изменился, что, очевидно, связано с мобилизацией низкомолекулярных антиоксидантов.

Введение мелатонина в условиях эксперимента увеличивало прирост МДА по сравнению со значениями нормы – на 480%.

Активность цитохромоксидазы в семенниках жи-

вотных второй группы оказалась меньше нормы, что способствует утечке электронов на кислород вне терминальной оксидазы дыхательной цепи митохондрий и, соответственно, повышает генерацию активных форм кислорода. Введение мелатонина на фоне сочетанного действия нитратной интоксикации и рентгеновского облучения нормализовало активность фермента. Возможный механизм подавления цитохромоксидазы нитратами связан с окислением нитратами Fe+2 в Fe+3, а также связывания Fe+3 с NO по лигандному месту субстрата [9]. Рентгеновское облучение может также вызывать разрывы пептидных связей фермента и способствовать окислению боковых гидрофобных радикалов аминокислот.

Активность супероксиддисмутазы семенников по сравнению с величинами нормы при сочетании действия исследуемых факторов достоверно снизилась на 34%. Величина этого показателя при воздействии мелатонина нормализовалась. Следует отметить, что на генном уровне экспрессию фермента активируют супероксид и мелатонин [6], что предположительно объясняет результаты активности СОД в 3-й группе. Действие рентгеновского облучения может блокировать синтез фермента и вызвать его разрывы.

Активность каталазы достоверно снизилась в семенниках контрольной группы – на 24% от значений нормы, но в условиях применения мелатонина при сочетании действия повреждающих факторов активность фермента существенно не изменилась. Поскольку ферменты СОД и каталаза связаны тем, что СОД является главным продуцентом перекиси водорода в клетке, которая разрушается каталазой, то снижение активности каталазы может способствовать накоплению H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ее окислительного действия [6].

Активность глутатионпероксидазы по сравнению с данными нормы существенно не изменилась у животных второй группы. При коррекции мелатонином величина этого показателя повысилась на 36%, что, по-видимому, объясняется тем, что мелатонин стимулирует экспрессию гена глутатионпероксидазы [1].

Можно предположить, что продукция активных форм кислорода, которые инициируют свободно-радикальное пероксидное окисление биополимеров, связана, главным образом, с функционированием митохондриальной электронно-транспортной цепи, образующимся в реакции NO с супероксидом высокотоксичного пероксинитрита, действием рентгеновского облучения на молекулы воды (радиолиз). Антиоксидантное звено, ослабленное частично на уровне супероксиддисмутазы и каталазы, возможно, компенсируется активностью глутатионпероксидазы и низкомолекулярными антиоксидантами.

Образование в процессе восстановления нитрат-ионов NO, по-видимому, снижает активность цитохромоксидазы, а генерация супероксида может способствовать образованию пероксинитрита с его повреждающим действием на ДНК и белки [12].

**Выводы.** 1. Сочетанное действие рентгеновского облучения и нитратной интоксикации способствует усилению прооксидантного звена и ослаблению антиоксидантного.

2. Введение мелатонина на фоне сочетанного действия факторов приводит ограничению продукции супероксидного анион-радикала митохондриями и повышению активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, и цитохромоксидазы, однако существенно не влияет на уровне генерации супероксида митохондриальной электронно-транспортной цепью.

## Литература

1. Барабой, В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина / В.А. Барабой // Укр. біохім. журн. -2000. - Т.72, №3. - С.5-11.
2. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / А.Н. Осипов [и др.] // Успехи биологической химии. – 2007. – Т.47. – С.259-292.
3. Введение в молекулярную радиобиологию / Тимофеев-Ресовский [и др.]. – М.: Медицина, 1981. – 320 с.
4. Денисенко, С.В. Динаміка змін перекисного окислення ліпідів і антиоксидантного захисту в сім'яниках при хронічній нітратній інтоксикації / С.В. Денисенко // Пробл. екол та мед. – 2002. – Т.6, №5. – С.8-10.
5. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / за ред. І.П. Кайдашева. – Полтава : Полімет, 2003. – 319 с.
6. Прооксидантно-антиоксидантная система семенников и спермы : монография / О.И. Цебржинский [и др.]. – Полтава, 2008. – 102 с.
7. Цебржинский, О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / О.И. Цебржинский // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стоматол. академії. – 2002. – Т. 2, №1. – С.96-97.
8. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / В.П. Реутов [и др.]. – М. : Наука, 1998. – 159 с.
9. Dröse, S. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain / S. Dröse, U. Brandt // Adv. Exp. Med. Biol. –2012. – V. 748. – P. 145-169.
10. Melatonin and nitric oxide / S. Aydogan S. [et al.] // J. Endocrinol. Invest. – 2006. – Vol. 29, №3. – P. 281-287.
11. Mills, G.C. The purification of glutathione peroxidase of erythrocytes / G.C. Mills // J. Biol. Chem. –1954. –Vol. 234, №3. –P. 502–506.
12. Nitric Oxide, Second Edition: Biology and Pathobiology / L.J. Ignarro [et al.]. – 2nd ed. – N.Y. : Science Press, 2009. – 845 p.
13. NO-залежні механізми стимуляції репродуктивної системи самців / В.М. Запорожан [та ін.] // Безплідність у чоловіків. – Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2001. – С. 52-60.
14. Ogivy-Syuact, A.L. Effect of radiation on the human reproductive system / A.L. Ogivy-Syuact, S.M. Shalet // Environ. Health. Perspect. – 1993. – Vol. 101, Suppl.2. – P. 109-116.
15. Straus, W. Colorimetric microdetermination of cytochrom oxidase / W. Straus // J. Biol. Chem. –1954. – Vol. 207, №2. – P. 733-743.

## Literatura

1. Baraboy, V.A. Antiokislitel'naya i biologicheskaya aktivnost' melatonina / V.A. Baraboy // Ukr. biokhim. zhurn. -2000. -T.72, №3. - S.5-11.
2. Biologicheskaya rol' nitrozil'nykh kompleksov gemoproteinov / A.N. Osipov [i dr.] // Uspekhi biologicheskoy khimii. – 2007. –Т.47. – С.259-292.
3. Vvedeniye v molekulyarnuyu radiobiologiyu / Timofeyev-Resovskiy [i dr.]. – М. : Meditsina, 1981. – 320 s.
4. Denysenko, S.V. Dynamika zmin perekysnoho okyslennya lipidiv i antyoksydantnoho zakhystu v sim'yanykakh pry khronichniy nitratniy intoksykatsiyi / S.V. Denysenko // Probl. ekol ta med. – 2002. – Т.6, №5. –S.8-10.
5. Metody klinichnykh ta eksperymentalnykh doslidzhen v medytsyni / za red. I.P. Kaydasheva. – Poltava : Polimet, 2003. – 319 s.
6. Prooksidantno-antioksidantnaya sistema semennikov i spermy : monografiya / O.I. Tsebrzhinskiy [i dr.]. – Poltava, 2008. – 102 s.
7. Tsebrzhinskiy, O.I. Differentsirovannoye spektrofotometricheskoye opredeleniye produktii superoksida v tkanyakh NST-testom / O.I. Tsebrzhinskiy // Aktual'ni problemi suchasnoi meditsini: Visn. Ukr. med. stomatol. akademii. – 2002. – Т. 2, №1. – С.96-97.
8. Tsiklicheskiye prevrashcheniya oksida azota v organizme mlekopitayushchikh / V.P.Reutov [i dr.]. – М. : Nauka, 1998. – 159 s.
9. Dröse, S. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain / S. Dröse, U. Brandt // Adv. Exp. Med. Biol. –2012. – V. 748. – P. 145-169.
10. Melatonin and nitric oxide / S. Aydogan S. [et al.] // J. Endocrinol. Invest. – 2006. – Vol. 29, №3. – P. 281-287.
11. Mills, G.C. The purification of glutathione peroxidase of erythrocytes / G.C. Mills // J. Biol. Chem. – 1954. – Vol. 234, №3. – P. 502–506.
12. Nitric Oxide, Second Edition: Biology and Pathobiology / L.J. Ignarro [et al.]. – 2nd ed. – N.Y. : Science Press, 2009. – 845 p.
13. NO-zalezni mekhanizmy stymulyatsiyi reproduktyvnoyi systemy samtsiv / V.M. Zaporozhan [ta in.] // Bezplidnist' u cholovikiv. – Odesa : Odes. derzh. med. un-t, 2001. –S. 52-60.
14. Ogivy-Syuact, A.L. Effect of radiation on the human reproductive system / A.L. Ogivy-Syuact, S.M. Shalet // Environ. Health. Perspect. – 1993. – Vol.101, Suppl.2. – P. 109-116.
15. Straus, W. Colorimetric microdetermination of cytochrom oxidase / W. Straus // J. Biol. Chem. –1954. – Vol. 207, №2. – P. 733-743.

## EFFECT OF MELATONIN ON OXIDATIVE METABOLISM IN TESTICLES UNDER COMBINED NITRATE INTOXICATION AND X-RAY IRRADIATION

Shatalin B.O., Kostenko V.A.

Higher State Educational Institution of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava, Ukraine

*Rats were administered sodium nitrate in a dose of 200 mg/kg of body wt per day for 30 days and exposed to X-ray (0.08 Gy) three times during the last week. The introduction of melatonin in a dose of 0.3 mg/kg led to the increased production of superoxide by NADH-stimulated electron transport chains to normal limits as well as normalized the activity of superoxide dismutase, catalase, cytochrome oxidase, but did not increase superoxide production by NADPH-stimulated chains in the testes to the normal values. Combined effect produced by X-ray irradiation and sodium nitrate intoxication contributes to enhancing pro-oxidant level and weakening antioxidant level. Melatonin partially resulted in the compensation of these changes.*

**Key words:** sodium intoxication, X-ray irradiation, melatonin, free-radical lipid peroxidation, antioxidant potential.