

О. Г. Чака, Т. М. Заморська, М. І. Левашов, С. Л. Сафонов

**ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ МЕЛАТОНІНУ НА АКТИВНІСТЬ
ФЕРМЕНТІВ АЕРОБНОГО ОКИСЛЕННЯ В МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ
ЛІНІЇ SHR З РІЗНИМ РІВНЕМ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ**

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ,
e-mail: lenchaka@ukr.net

Реферат. Е. Г. Чака, Т. М. Заморська, М. И. Левашов, С. Л. Сафонов. **ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ МЕЛАТОНИНА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС ЛИНИИ SHR С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА.** Изучали изменение активности ферментов сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохромоксидазы (ЦХО) в печени 3-х месячных крыс линии SHR, которым на протяжении 28 суток вводили мелатонин (5 мг/кг массы тела). В зависимости от потребления кислорода крыс разделили на группы с высоким и с низким уровнем энергетического метаболизма. Проведенные исследования показали, что активность СДГ и ЦХО более высокая у крыс с высоким уровнем энергетического метаболизма. Влияние мелатонина на активность ферментов окислительного метаболизма зависит от исходного уровня энергетического метаболизма животного. Активность СДГ у крыс с высоким уровнем энергетического метаболизма достоверно увеличивалась, а с низким уровнем метаболизма, наоборот, имела тенденцию к снижению.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, цитохромоксидаза, мелатонин, энергетический метаболизм, митохондрии.

Реферат. О. Г. Чака, Т. М. Заморська, М. І. Левашов, С. Л. Сафонов. **ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ МЕЛАТОНІНУ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АЕРОБНОГО ОКИСЛЕННЯ В МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR З РІЗНИМ РІВНЕМ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ.** Вивчали зміну активності ферментів сукцинатдегідрогенази (СДГ) і цитохромоксидази (ЦХО) в печінці 3-х місячних щурів лінії SHR, яким на протязі 28 діб вводили мелатонін (5 мг/кг ваги тіла). В залежності від вживання кисню щурів розділили на групи з високим і з низьким рівнем енергетичного метаболізму. Проведені дослідження показали, що активність СДГ і ЦХО більш висока у щурів з високим рівнем енергетичного метаболізму. Вплив мелатоніну на активність ферментів окислювального метаболізму залежить від вихідного рівня енергетичного метаболізму тварини. Активність СДГ у щурів з високим рівнем енергетичного метаболізму достовірно збільшувалася, а з низьким рівнем метаболізму, навпаки, мала тенденцію до зниження.

Ключові слова: сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза, мелатонін, енергетичний метаболізм, митохондрії.

Summary. E. Chaka, T. Zamorska, M. Levashov, S. L. Saphonov. **EFFECTS OF MELATONIN ON THE ENZYMES ACTIVITY OF THE OXIDATIVE METABOLISM OF LIVER MITOCHONDRIA IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS DEPENDING ON ENERGY METABOLISM.** We study changes of the enzymes activity succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (CO) in 3-month-old male SHR rats were administered melatonin (5 mg/kg body weight orally) during 28 days. The animals were divided into high - and low-energy metabolism groups. Studies have shown that activity of enzymes SDH and CO was higher in rats with high-energy metabolism. Effect of melatonin on the

activity enzymes of the oxidative metabolism depends on the output level of energy metabolism in rats. We registered significant increasing of activity SDH in rats with high-energy metabolism and conversely, tended to decrease of activity enzyme in rats with low- energy metabolism.

Key words: Succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, melatonin, mitochondrium, energy metabolism.

Вивчали зміни активності ферментів сукцинатдегідрогенази (СДГ) та цитохромоксидази (ЦХО) у 3-місячних щурів-самців лінії SHR, яким протягом 28 діб вводили меланін в концентрації 5 мг/кг маси тіла. В залежності від рівня споживання кисню, щурів розділили на групи з високим та з низьким рівнем енергетичного метаболізму. Проведені дослідження показали, що активність СДГ та ЦХО була вище у щурів з високим рівнем енергетичного метаболізму. Вплив мелатоніну на активність ферментів окисного метаболізму залежав від вихідного рівня їх енергетичного метаболізму. Активність СДГ у щурів з високим рівнем енергетичного метаболізму вірогідно збільшувалась, а у тварин з низьким рівнем енергетичного метаболізму, навпаки, мала тенденцію до зниження.

Ключові слова: сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза, мелатонін, мітохондрії, енергетичний метаболізм.

Вступ

Печінка - центральний орган хімічного гомеостазу, де створюється єдиний обмінний та енергетичний пул метаболізму білків, жирів та вуглеводів. Печінка, порівняно з іншими паренхіматозними органами, має більшу здатність до регенерації. Унікальна здатність печінки до самовідновлення була відмічена, ще в роботах проф. Подвисоцького В.В [1]. Захворювання печінки стоять на восьмому місці серед причин смертності, що пов'язано з посиленням фізіологічного навантаження на неї в умовах збільшення забруднення питної води, зростання кількості хімічних домішок у продуктах харчування, неконтрольованим прийомом лікарських препаратів та алкоголю. З наукових джерел відомо, що більшість хвороб печінки супроводжується зниженням активності ферментів циклу Кребса зокрема, сукцинатдегідрогенази (СДГ) та цитохромоксидази (ЦХО), що призводить до порушення енергетичного метаболізму мітохондрій. Тому пошук ефективних методів відновлення активності ферментів енергетичного метаболізму є важливою задачею сучасної медицини. В останні десятиріччя велику увагу лікарів та вчених різного фаху привертає гормон епіфізу мелатонін. Він має універсальні адаптогенні властивості, які реалізуються на різних функціональних рівнях. В багатьох дослідженнях показані його біоритмологічні, антиоксидантні, імунomodуючі, геропротекторні, гепатопротекторні, атистресові властивості [2,3,4]. Показано, що мелатонін та його похідні нормалізують активність дихальних комплексів мітохондрій, зокрема і ЦХО, в умовах експериментального окислювального стресу [5]. Він підвищує антиоксидантний потенціал печінки, має виражені цитопротекторні властивості [3]. Прийом мелатоніну при інтоксикації щурів тетрахлоретаном або антибіотиками тетрациклінового ряду запобігав розвитку структурних пошкоджень тканини печінки, попереджував некротичну та апоптичну загибель гепатоцитів [2,6,7]. Показано, що прийом мелатоніну збільшує на 60% активність СДГ у щурів з експериментальним холестазом [4]. Встановлено, що мелатонін є не тільки сильним ендogenous антиоксидантом, але й здатен активувати комплекси I та IV дихального ланцюга [5]. Така мультифункціональна дія мелатоніну пов'язана з його антиоксидантними властивостями і здатністю попереджувати окисне пошкодження білків та ліпідів. В той же час, інші дослідники не спостерігали нормалізуючого впливу мелатоніну на активність ферментів циклу Кребса при токсичному ураженні печінки ацетомінофеном [8]. Неоднозначність результатів досліджень може бути пов'язана з використанням різних доз мелатоніну, введенням мелатоніну в різний час доби та в різні сезони року. Мало дослідженим залишається питання особливостей впливу мелатоніну в залежності від вихідного рівня енергетичного метаболізму тварини.

Мета роботи - дослідити вплив мелатоніну на активність ферментів енергетичного метаболізму у печінці щурів лінії SHR з різним рівнем енергетичного метаболізму.

Матеріали та методи

В якості об'єкту дослідження використовували 48 3-місячних щурів-самців лінії SHR. Тварини цієї лінії відрізняються від інших ліній підвищеним артеріальним тиском та емоційною лабільністю. Дослідження проведено в осінньо-зимовий період, коли рівень мелатоніну в крові найбільший порівняно з іншими сезонами року. Було сформовано чотири групи. Контрольні щури I групи - з високим рівнем енергетичного метаболізму (ВРЕМ) та II групи - з низьким рівнем енергетичного метаболізму (НРЕМ). Дослідним щурам III (з ВРЕМ) та IV (з НРЕМ) груп щодня, протягом 28 днів, о 10 годині ранку вводили перорально екзогенний мелатонін (Віта-мелатонін), в дозі 5 мг/кг маси тіла. Для визначення рівня енергетичного метаболізму у тварин в перший та в останній день експерименту вимірювали рівень споживання кисню методом непрямой калориметрії. Розраховували споживання кисню у мл·час/кг маси тіла. Також визначали базальну температуру тіла електронним термометром. Вимірювання споживання кисню та ректальної температури проводили натщесерця. Щури усіх груп знаходилися в умовах природного режиму освітлення та отримували стандартний раціон харчування.

По закінченню експерименту щурів декапітували під ефірним наркозом з дотриманням умов Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей. Видаляли печінку, промивали дистильованою водою та зважували. Визначали печінковий індекс, як співвідношення маси тіла до маси печінки. Методом диференційного центрифугування з печінки видаляли мітохондрії. В отриманій суспензії мітохондрій фотометрично визначали активність ферментів енергетичного метаболізму: сукцинатдегідрогенази за методом Стингер та Керні, цитохромоксидази за методом Кривченкова Р.С. та вміст білку по Лоурі. Статистичну обробку отриманих даних проводили за методом Стьюдента. Зміни показників вважали вірогідними при $p < 0,05$.

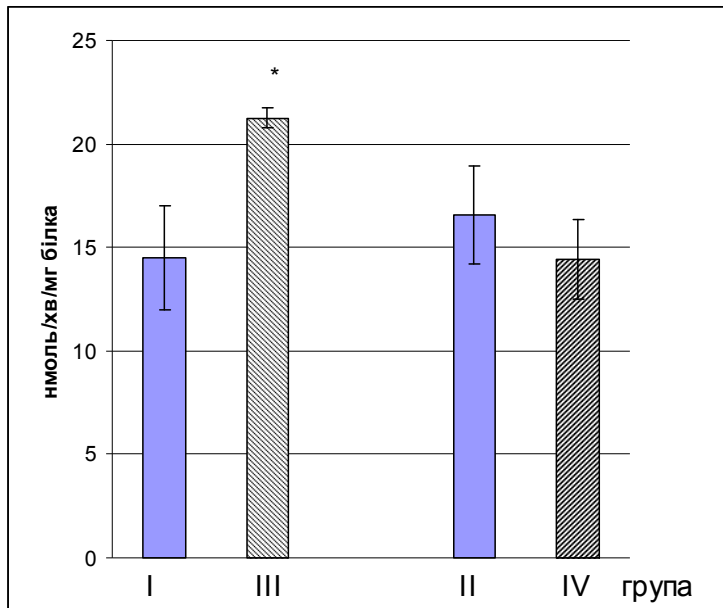
Результати та їх обговорення

Інтегральним показником метаболізму є інтенсивність споживання кисню. Після 28 днів введення мелатоніну рівень споживання кисню вірогідно знизився на 23 %, тоді як базальна температура навпаки збільшилась на $0,71^{\circ}\text{C}$. Печінковий індекс у щурів, які отримували мелатонін, вірогідно збільшився на 14 %. Так у контрольних тварин цей показник був - $29,5 \pm 1,98$, у дослідних - $33,6 \pm 0,79$. Збільшення цього співвідношення пов'язано з прискоренням росту щурів під впливом введення екзогенного мелатоніну. Встановлено, що печінковий індекс у контрольних та дослідних щурів не залежав від рівня їх енергетичного метаболізму.

Одним з головних ферментів енергетичного метаболізму є СДГ, яка окислює бурштинову кислоту в циклі Кребса. СДГ життєво важливий фермент для організму [4,5]. Він входить до складу II комплексу дихального ланцюга та на відміну від інших ферментів передає відщеплені атоми водню безпосередньо в дихальний ланцюг. При зниженні активності СДГ порушується енергетичний обмін, оскільки цей фермент пов'язує між собою цикл трикарбонових кислот та дихальний ланцюг. Важливим ферментом окисного фосфорилування є також ЦХО, яка входить до IV комплексу дихального ланцюга.

Ми виявили ряд відмінностей у функціонуванні мітохондрій печінки спонтанно-гіпертензивних щурів в залежності від рівня енергетичного метаболізму. Так, у контрольних тварин II групи з НРЕМ активність СДГ була вище на 14 % порівняно з I групою з ВРЕМ (рис.1).

Активність ЦХО у контрольних щурів, навпаки, була на 17% вище в I групі тварин з ВРЕМ порівняно з II групою з НРЕМ. Після введення мелатоніну у щурів IV групи з НРЕМ активність СДГ мала тенденцію до зниження на 14% порівняно з контрольними щурами II групи. Тоді, як у щурів III групи, з ВРЕМ активність СДГ вірогідно збільшилась на 46% відносно I групи контрольних щурів. Введення мелатоніну вірогідно не змінювало активність ЦХО у щурів III та IV групи порівняно з контрольними тваринами. У дослідних щурів III групи з ВРЕМ активність СДГ була на 47% вище, а ЦХО на 14% вище ніж активність цих ферментів у тварин IV групи з НРЕМ. Отримані нами дані свідчать про те, що після курсу введення мелатоніну в мітохондріях щурів лінії SHR з ВРЕМ відбувається активація процесів аеробного окислення.



- - вірогідні зміни порівняно з контролем

Рис.1. Зміни активності сукцинатдегідрогенази у щурів лінії SHR після 28 діб курсу введення екзогенного мелатоніну.

Порівнюючи вміст білку в суспензії мітохондрій у щурів з різним рівнем енергетичного метаболізму, ми виявили, що цей показник був більшим у тварин з низьким рівнем енергетичного метаболізму. Після курсу прийому мелатоніну у щурів, як з високим, так і з низьким рівнем метаболізму, концентрація білку мала тенденцію до зниження на 10 %. Оскільки концентрація білку є одним з показників білок-синтетичної активності гепатоцитів, можна зробити припущення, що введення мелатоніну не приводить до активації цієї функції гепатоцитів.

Проведені дослідження показали, що високий рівень енергетичного метаболізму у щурів лінії SHR поєднується з підвищенням активності ферментів аеробного окислення. Тоді як концентрація білку в мітохондріях гепатоцитів є більш сталою величиною, яка не залежить від рівня енергетичного метаболізму.

Одержані нами експериментальні дані дають можливість зробити висновок, що вплив мелатоніну на активність ферментів окисного метаболізму залежить від вихідного рівня енергетичного метаболізму. У тварин з високим рівнем метаболізму під впливом мелатоніну активність СДГ вірогідно збільшується, а у тварин з низьким рівнем метаболізму – навпаки, має тенденцію до зниження. Практичне значення цих даних полягає в тому, що при застосуванні мелатоніну для корекції активності ферментів аеробного окислення слід враховувати вихідний рівень енергетичного метаболізму особини.

Література

1. Подвысоцкий В.В. Возрождение печеночной ткани у млекопитающих животных. - Киев: Медицина, 1986. – 237 с.
2. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Гормон мозговой железы эпифиза мелатонин - универсальный естественный адаптоген // Успехи физиологических наук. - 2012. - № 3. - С.82-100.
3. Malhotra S., Sawhney G., Promila Pandhi P. The Therapeutic Potential of Melatonin: A Review of the Science // Med. Gen. Med. – 2004. -V 6, № 2. – P. 46.
4. Мохорева С.И., Колоскова О.В. Коррекция мелатонином активности сукцинатдегидрогеназы в печени крыс с экспериментальной патологией печени // Материалы III Международной научной конференции: Ксенобиотики и живые системы - 2008. - Минск. - С.97-99.
5. Acuña-Castroviejo D., Martín M., Macías M., Escames G., León J., Khaldy H., Reiter R.J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics // J. Pineal Res. - 2001. -

V.30. - P.65–74.

6. Забродская С.В., Заводник И.Б. Повреждение митохондрий печени крыс при интоксикации тетрахлолорметаном. Эффекты мелатонина. // Биологические мембраны. - 2010. -Т.27, № 3. - С. 262-271.

7. Martin M., Macias M., Escames G., Leon J., Acuna-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress // The FASEB Journal. - 2000. -V.14, № 12. - P.1677–1679.

8. Zavodnik L.B., Zavodnik L.B., Lapschina E.A. et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats // Cell Biochem. Funct. – 2005. - V.23. - P.353-359.

9. Дремза И.К., Чешевик В.Т., Забродская С.В. и др. Гепатотоксические эффекты ацетаминофена. Протекторные свойства производных триптофана // Биомедицинская химия. - 2010. - Т.56, вып. 6. - С.710-718.

References

1. Pidvysotsky V.V. Revival of hepatic tissue in mammals // Medicine, Kiev. – 1986. – 237 p.

2. Arushanyan E.B., Beyer E.V. Pineal hormone melatonin is an universal adaptogenic agent // Usp Fiziol Nauk. – 2012. – V. 43, №3. – P. 82-100.

3. Malhotra S., Sawhney G., Promila Pandhi P. The Therapeutic Potential of Melatonin: A Review of the Science // Med. Gen. Med. – 2004. – V.6, №2. – 46 p.

4. Mokhoreva S.I, Koloskova O.V. Corrections by melatonin of succinate dehydrogenase activity in the liver of rats under experimental liver diseases // Xenobiotics and living systems. Proceedings of the III International Conference. Minsk. – 2008. – P. 97-99.

5. Acuña-Castroviejo D., Martín M., Macías M. et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics // J. Pineal Res. - 2001. - V.30. - P.65-74.

6. Zabrodskaya S.V, Zavodnik I.B. Rat liver mitochondrial damage under intoxication of tetrachloromethane. Effects of melatonine // Biological membranes - 2010. -V. 27, № 3. - P. 262-271.

7. Martin M., Macias M., Escames G. et al. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress // The FASEB Journal. - 2000. -V.14, № 12. - P.1677–1679.

8. Zavodnik L.B., Zavodnik L.B., Lapschina E.A. et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats // Cell Biochem. Funct. – 2005. - V.23. - P.353-359.

9. Dremza I.K., Cheshchevik V.T., Zabrodskaya S.V. et al. Hepatotoxic effects of acetaminophen. Protective properties of tryptophan derivatives // Biomedical Chemistry. – 2010, – V. 56, Issue 6. – P. 264-268.

Работа поступила в редакцию 17.07.2015 года.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования