

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2016

Т. Н. Попова¹, А. А. Азарков¹, М. В. Горбенко¹, С. С. Попов², К. К. Шульгин¹

ВЛИЯНИЕ МЕЛАКСЕНА И ВАЛЬДОКСАНА НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПТОВ СУПЕРОКСИДИДИСМУТАЗЫ И КАТАЛАЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПЕРТИРЕОЗЕ У КРЫС

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Россия, Воронеж

² ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко», Россия, Воронеж

Исследовано воздействие мелаксена и вальдоксана на уровень транскриптов генов супероксиддисмутазы (СОД (КФ 1.11.1.6)) и каталазы (КФ 1.11.1.6) в печени и сердце крыс с гипертиреозом. Установлено, что введение данных препаратов при этой патологии сопровождается изменением экспрессии СОД и каталазы в исследуемых тканях крыс в сторону контрольных значений.

Ключевые слова: уровень транскриптов; мелаксен; вальдоксан; супероксиддисмутазы; каталаза.

Известно, что тиреоидным гормонам (ТГ) принадлежит важная роль в реализации окислительных процессов, в том числе протекающих в митохондриях и клеточных мембранах. Под их влиянием повышается концентрация окислительных ферментов, транспорт АДФ в митохондрии, активность Na^+K^+ -АТФ-азы [1]. Основным и наиболее важным свойством данных гормонов является их способность увеличивать потребление кислорода [2].

Ускорение митохондриального электронного транспорта ТГ приводит к увеличению генерации супероксиданионрадикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$) на участке убихинона. $\text{O}_2^{\cdot-}$ в свою очередь может приводить к формированию других активных форм кислорода (АФК), включая гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) [3]. Кроме того, во время синтеза ТГ существует необходимость в постоянном производстве H_2O_2 , который необходим для внутрифоликулярного окисления йода в присутствии тиреоидной пероксидазы [4].

Высокие концентрации ТГ при синдроме тиреотоксикоза могут стимулировать чрезмерную генерацию АФК [5] и, как следствие, нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза организма.

В данных условиях может происходить активация экспрессии редокс-чувствительных генов, в том числе и генов ключевых антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД (КФ 1.11.1.6)) и каталазы (КФ 1.11.1.6) [6], что позволяет регулировать уровень клеточной антиоксидантной защиты.

Длительная генерация аномально большого количества АФК может привести к стойким изменениям в трансдукции сигнала и экспрессии генов и возникновению патологических состояний [7]. Поэтому представляет интерес поиск путей фармакологической коррекции этих изменений с помощью различных лекар-

ственных веществ с антиоксидантным действием, таких как мелаксен и вальдоксан.

Мелаксен (N-ацетил-5-метокситриптамин, $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$, молекулярная масса 232,3) и вальдоксан (2-(7-метоксинафтаден-1-ил)этилацетамид, $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_2$, молекулярная масса 243,301) – препараты, с помощью которых возможно осуществлять коррекцию содержания эндогенного гормона мелатонина в организме. Первый является аналогом натурального гормона мелатонина, а вальдоксан или агомелатин — агонист мелатонинергических рецепторов MT_1 и MT_2 и антагонист серотониновых 5- HT_2C -рецепторов [8].

Мелатонин, будучи производным индола, обладает мощной антиоксидантной активностью, которая определяется во всех клеточных структурах, включая ядро клетки [9 – 11].

Целью настоящей работы явилось исследование влияния указанных мелатонинергических препаратов на уровень транскриптов СОД и каталазы в печени и сердце крыс при экспериментальном гипертиреозе (ЭГ) для дифференцировки возможных механизмов, лежащих в основе изменения общей активности, а именно оценки вклада синтеза ферментов *de novo*.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали 64 самца белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) массой 200 – 250 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (УК РФ ст. 245 “Жестокое обращение с животными”).

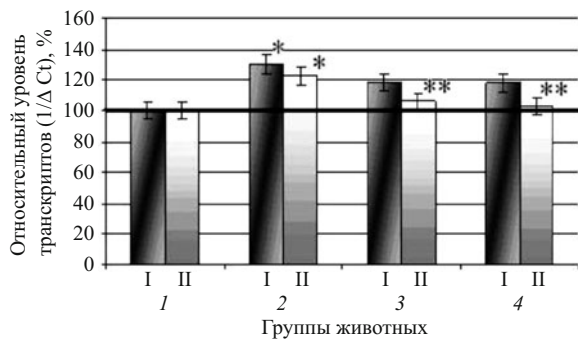


Рис. 1. Относительный уровень транскриптов гена супероксиддисмутазы в печени (I) и сердце (II) крыс в норме (1) при ЭГ (2) и действии мелаксена (3) и вальдоксана (4) на фоне экспериментального гипертиреоза. Достоверность значений: $p \leq 0,05$ (*) – по сравнению с нормой, (**) – по сравнению с патологией; $\Delta Ct = Ct(\text{СОД}) - Ct(\text{GAPDH})$, где Ct – значение порогового цикла.

Гипертиреоз вызывали внутрибрюшинным введением трийодтиронина (“Sigma”, США, субстанция кристаллическая). Гормон вводили здоровым животным в дозе 100 мкг на 100 г массы тела в виде раствора в 0,9 % NaCl [12]. Инъекции осуществляли трижды через день в течение 6 дней.

Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: в 1-й группе ($n = 19$) животных содержали на стандартном режиме вивария; во 2-й группе ($n = 9$) у животных индуцировали гипертиреоз; в 3-й группе ($n = 18$) животным после индуцирования гипертиреоза вводили внутрибрюшинно мелаксен (“Юнифарм”, США, таблетки, покрытые оболочкой) в дозе 5 мг/кг массы животного ежедневно в течение 3 дней в утренние часы; в 4-й группе ($n = 18$) крысам с ЭГ вводили внутрибрюшинно вальдоксан (“Лаборатория Сервье Индастри”, Франция, таблетки, покрытые пленочной оболочкой) в дозе 5 мг/кг. Выбор дозы, вводимой животным, осуществлялся в соответствии с рекомендациями, имеющимися в инструкции к препаратам в пересчете на массу тела крысы. Суспензию мелаксена и вальдоксана готовили в керамической ступке путем растирания таблеток и последующего добавления 1 мл 0,9 % раствора NaCl непосредственно перед использованием. Образцы для анализа забирали на 7 сут после начала эксперимента.

Для извлечения печени крысам производили лапаротомию, затем под портальную вену подводили лигатуру, надсекали и канюлировали ее на 10 мм ниже синуса, переднюю полую вену пересекали в диафрагмальной области и перфузировали печень ледяным изотоническим раствором со скоростью 5 мл/мин в течение 5 мин. Печень забирали для дальнейшего исследования.

Для получения тканевого гомогената печени измельченную ткань растирали в фарфоровой ступке в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л *трис*-HCl-буфер, pH 7,6, 10 ммоль/л ЭДТА, 0,5 ммоль/л β -меркаптоэтанол. Полученную в результате гомогенизации вытяжку фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками

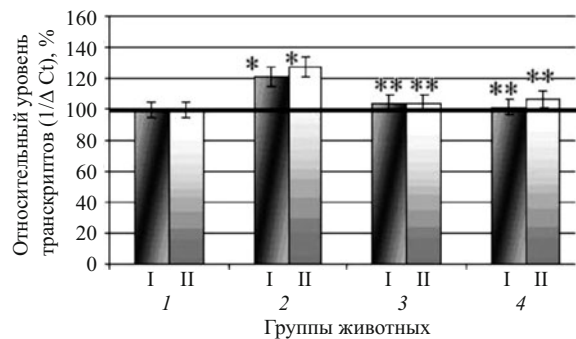


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов гена каталазы в печени (I) и сердце (II) крыс в норме (1) при ЭГ (2) и действии мелаксена (3) и вальдоксана (4) на фоне экспериментального гипертиреоза: $\Delta Ct = Ct$ (каталаза) – Ct (GAPDH), где Ct – значение порогового цикла. Достоверность значений: $p \leq 0,05$ (*) – по сравнению с нормой, (**) – по сравнению с патологией.

(0,1 мм) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин для отделения неразрушенных тканевых элементов. Супернатант использовали в дальнейших исследованиях.

Сердце извлекали у животных после многократного промывания ледяным физиологическим раствором. Промытое сердце осушали фильтровальной бумагой и тщательно измельчали ножницами. Измельченную ткань взвешивали на торсионных весах и гомогенизировали в фарфоровой ступке в 3-кратном объеме охлажденной среды выделения. Полученную в результате гомогенизации вытяжку фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и центрифугировали при 3500 g в течение 10 мин для отделения неразрушенных тканевых элементов и мембран кардиомиоцитов. Супернатант использовали для определения исследуемых параметров.

Для оценки уровня транскриптов генов исследуемых ферментов на первом этапе проводили экстракцию тотальной РНК из печени и сердца крыс с последующей обратной транскрипцией. Выделение тотальной РНК осуществляли с использованием набора YellowSolve (“Clonogene”, Россия). Степень деградации РНК оценивали с помощью электрофореза в денатурирующем 1 % агарозном геле. Количество РНК определяли на спектрофотометре Hitachi U1900 по поглощению при длине волны 260 нм.

Для проведения обратной транскрипции использовали M-MuLV обратную транскриптазу (“Fermentas”, Литва). В качестве праймера использовали олиго(dT)₁₈, что позволило получить ДНК, комплементарную мРНК. Реакцию проводили при температуре +40 °C в течение 1 ч с последующей инактивацией транскриптазы при 70 °C в течение 15 мин. Готовую кДНК использовали для амплификации в режиме реального времени.

Для амплификации участка гена в работе использовались праймеры, подобранные с помощью программы “Genamics Expression”.

Для проведения ПЦР использовали набор реактивов с SYBR GreenI (“Синтол”, Россия). ПЦР-ампли-

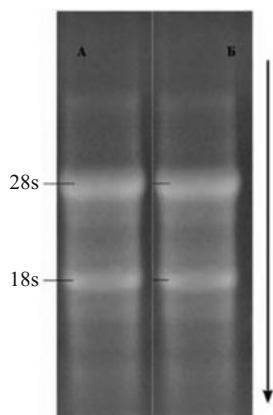


Рис. 3. Электрофореграмма тотальной РНК из печени (А) и сердца (Б) крыс. Данные представлены для образцов тотальной РНК, выделенной из печени и сердца крыс 1-й группы; электрофореграммы для образцов, полученных из тканей животных других экспериментальных групп имели аналогичный вид.

фикацию в режиме реального времени проводили на приборе АНК-32 по следующей схеме: 95 °С – 5 мин, затем 40 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 15 с, 72 °С – 30 с. Далее анализировали значение пороговых циклов, полученных в результате ПЦР-амплификации. Также оценивали отрицательный контроль: а) на загрязнение компонентов наборов чужеродной ДНК; б) на чистоту условий подготовки образцов для амплификации. Постановку отрицательного контроля осуществляли в отдельной пробирке при каждом проведении амплификации путём добавления в реакционную смесь вместо исследуемого образца ДНК такого же объёма воды.

Оценку уровня экспрессии гена СОД и каталазы осуществляли с помощью программы “qgene” [13]. Данные обрабатывали с использованием *t*-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что в условиях ЭГ происходит возрастание удельной активности СОД и каталазы в печени и сердце крыс по сравнению с группой контрольных животных [14]. Подобная тенденция отмечалась и при расчете ферментативной активности в виде Е на 1 г сырой массы. Данные изменения активности исследуемых ферментов согласуются с результатами расчетов уровня транскриптов их генов (рис. 1, 2), о чем свидетельствует разница экспрессии генов СОД и каталазы в печени и в сердце крыс с патологией с учетом порогового цикла для глицеральдегид-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH) и значений эффективности амплификации. Показано, что при ЭГ происходит увеличение уровня транскриптов генов СОД в печени и в сердце крыс на 30 и 18 % соответственно (рис. 1). Также отмечено увеличение уровня экспрессии генов каталазы как в печени (на 21 %), так и в сердце (на 27 %) животных с патологией (рис. 2). Таким образом, изменения активности СОД и каталазы могут быть связаны

с увеличением скорости синтеза данных ферментов при ЭГ.

Следует отметить, что на процесс амплификации в режиме реального времени не оказывала влияние деградация РНК. Это подтверждалось с помощью электрофоретического анализа, в ходе которого показано, что в образцах общей РНК 28S рРНК значительно преобладает над 18S рРНК (рис. 3), что было характерно для всех вариантов эксперимента.

Известно, что окислительный стресс, развитие которого имеет место при ЭГ [15], может вызывать реализацию адаптивных защитных механизмов, которые приводят к росту клеточного редокс-статуса и появлению нового соотношения АФК/антиоксиданты.

Установлено, что у бактерий при возрастании уровня АФК наблюдается изменение активности факторов транскрипции *OxyR* и *SoxR*, которое сопровождается синтезом антиоксидантных ферментов, в том числе СОД и каталазы [16]. При этом изменения структуры и соответственно активности *OxyR* происходит за счет образования множественных дисульфидных связей. Кроме того, уровень окисленной формы белка *OxyR* связан отрицательной обратной связью с его синтезом [17]. Окисление активного центра белка *SoxR* в условиях окислительного стресса стимулирует транскрипцию *sox*-локуса, что приводит к синтезу белков с антиоксидантными свойствами [18]. В нормальных физиологических условиях белок *SoxR*, содержащий железо-серный кластер, находится в восстановленном состоянии и не активен. Таким образом, степень генерации АФК эффективно контролируется в клетках бактерий путем изменения активности факторов транскрипции *OxyR* и *SoxR*.

Более сложная система редокс-регулирования обнаружена у *S. cerevisiae*, добавление перекиси водорода к культуре которых сопровождалось индукцией фактора транскрипции AP-1. Обнаружено, что ответный синтез протеинов зависит от уровня как перекиси водорода, так и белка AP-1. Воздействие малых доз H₂O₂ сопровождалось продукцией тиоредоксина, увеличение концентрации перекиси водорода сопровождалось гиперэкспрессией AP-1 и дополнительным синтезом СОД, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [19]. Длительное воздействие высоких доз перекиси водорода на *S. cerevisiae* приводило к активизации синтеза 115 белков, в том числе антиоксидантных ферментов, таких как Mn-СОД, Cu/Zn-СОД, глутатионредуктаза, каталаза, тиоредоксин-редуктаза, цитохром-с-пероксидаза и белков теплового шока [20].

Активация редокс-чувствительных факторов транскрипции *Nf-κB*, AP-1, p53 в клетках животных и человека приводит к изменению экспрессии нескольких сотен генов и, соответственно, активности многих ферментативных процессов [6].

Установлено, что воздействие мелаксена в дозе 5 мг/кг приводит к снижению уровня транскриптов гена СОД в печени и сердце на 13 и 18 % ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению со 2-й группой животных (рис. 1). Введение вальдоксана в исследуемой дозе

крысам с ЭГ также отмечалось снижением количества транскриптов гена СОД: в печени – на 12 % ($p \leq 0,05$), в сердце крыс – на 20 % ($p \leq 0,05$) (рис. 1).

Согласно полученным результатам, под воздействием мелаксена в дозе 5 мг/кг на фоне развития гипертиреоза отмечается 17 % снижение экспрессии каталазы в печени, в сердце отмечено 24 % уменьшение (рис. 2). Воздействие вальдоксана в указанной дозе приводило к снижению уровня транскриптов исследуемого фермента в печени на 20 % и сердце – на 21 % (рис. 2).

Вероятно, наблюдаемые изменения уровня экспрессии СОД и каталазы при введении мелаксена и вальдоксана могут быть объяснены их мелатонинергической активностью. Известно, что мелаксен является синтетическим аналогом гормона мелатонина и способен эффективно обезвреживать СР. Вальдоксан обладает свойствами селективного агониста специфических мелатониновых рецепторов на мембранах нейронов супрахиазматических ядер гипоталамуса [21, 22]. Через эти рецепторы мелатонин способен выступать в качестве перехватчика СР. Кроме того, вальдоксан способен имитировать эффекты мелатонина, что тоже приводит к уменьшению степени протекания СО и, как следствие, снижению функциональной нагрузки на СОД и каталазу [23].

Изменения интенсивности экспрессии данных ферментов происходили на фоне снижения активности исследуемых ферментов, наблюдаемого при введении мелаксена и вальдоксана животным с ЭГ по сравнению со значениями при патологии [14].

Известно также, что 6-гидроксимелатонин – продукт метаболизма мелатонина, эффективно поглощает супероксиданионрадикал [24], который выступает по отношению к СОД в качестве индуцирующего и активирующего фактора. Поскольку уровень внутриклеточных ферментативных антиоксидантов находится под генетическим контролем, принцип которого заключается в том, что при повышении в клетке концентрации O_2^- или H_2O_2 активируется транскрипция генов, запускающих синтез каталазы, СОД и др. [25], то коррекция уровня эндогенного мелатонина, по-видимому, может способствовать изменению уровня транскриптов генов СОД и каталазы в сторону контрольных значений.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания вузам в

сфере научной деятельности на 2014 – 2016 годы. Проект №1090.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. И. Кандрор, *Рос. хим. ж.*, **XLIX**(1), 75 – 83 (2005).
2. А. И. Кубарко, С. Ямашита, С. Д. Денисов и др., *Щитовидная железа. Фундаментальные аспекты*, Минск – Нагасаки (1998).
3. G. Loschen, L. Flohe, *FEBS Let.*, **18**(2), 261–264 (1971).
4. M. S. Wolin, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**(6), 1430 – 1442 (2000).
5. S. N. Kumari, N. Sandhya, K. M. Damodara Gowda, *Al. Ameen. J. Med. Sci.*, **4**(1), 49 – 53 (2011).
6. К. Т. Турпаев, *Биохимия*, **61**(3), 339–352 (2002).
7. Dro ge W., *Physiol. Rev.*, **82**, 47 – 95 (2002).
8. V. Srinivasan, Ph. D. R. Zakaria, Z. Otman, et al., *J. Neurophysiol. Clin. Neurosci.*, **24**(3), 290 – 308 (2012).
9. R. J. Reiter, *Prog. Neurobiol.*, **56**, 359 – 384 (1998).
10. D. X. Tan, L. D. Chen, B. Poeggeler, et al., *Endocrine J.*, **1**, 57 – 60 (1993).
11. R. Hardeland, I. Balzer, B. Poeggeler, et al., *J. Pineal. Res.*, **18**(2), 104 – 111 (1995).
12. V. Fernandez, K. Simizu, S. B. M. Barros, *Endocrinology*, **129**(1), 85 – 91 (1991).
13. P. Y. Muller, H. Janovjak, A. R. Miserez, et al., *BioTechniques*, **32**(6), 354 – 360 (2002).
14. М. В. Горбенко, Т. Н. Попова, К. К. Шульгин и др., *Хим.-фарм. журн.*, **47**(11), 7 – 10 (2013); *Pharm.-Chem. J.*, **47**(11), 577 – 580 (2013).
15. A. Seven, O. Seymen, S. Hatemi, et al., *Clin. Chim. Acta*, **256**(1), 65 – 74 (1996).
16. M. Zheng, G. Storz, *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 1 – 6 (2000).
17. M. F. Christman, G. Storz, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3484 – 3488 (1989).
18. P. Gaudu, B. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10094 – 10098 (1996).
19. N. Schnell, B. Krems, K. D. Entian, *Cur. Genet.*, **21**, 269 – 273 (1992).
20. C. Godon, G. Lagniel, J. Lee, et al., *J. Biol. Chem.*, **273**, 22480 – 22489 (1998).
21. Э. Б. Арушанян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(7), 41 – 45 (2011).
22. V. Srinivasan, D. De Berardis, S. D. Shillcutt, et al., *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **21**(10), 1503 – 1522 (2012).
23. L. San, B. Arranz, *Eur. Psychiatry*, **23**(6), 396 – 402 (2008).
24. D. S. Maharaj, R. B. Walker, B. D. Glass, et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 877 – 882 (2005).
25. Н. К. Зенков, *Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты*, МАИК “Наука / Интерпериодика”, Москва (2001).

Поступила 18.07.14

EFFECT OF MELATONIN-CORRECTING DRUGS (MELAXEN AND VALDOXAN) ON THE LEVEL OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE GENE TRANSCRIPTION IN RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERTHYROIDISM

T. N. Popova¹, A. A. Agarkov¹, M. V. Gorbenko¹, S. S. Popov², and K. K. Shul'gin¹

¹ Voronezh State University, Voronezh, 394036 Russia

² N. N. Burdenko Voronezh State Medical Academy, Voronezh, 394036 Russia

The influence of melatonin-correcting drugs melaxen and valdoxan on the gene transcription level of superoxide dismutase (SOD) and catalase in liver and heart of rats with hyperthyroidism have been investigated. Administration of these drugs in animals with model pathology leads to changes in SOD (EC 1.11.1.6) and catalase (EC 1.11.1.6) expression in rat tissues toward control values.

Keywords: gene transcription level; melaxen; valdoxan; superoxide dismutase; catalase.