

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.106>

ПРИМЕНЕНИЕ МЕЛАТОНИНА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ У КРЫС НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СЕПСИСА

Научная статья

Вечканова Н.А.¹, Коробков Д.М.^{2,*}, Чернова Ю.М.³, Зотов И.А.⁴, Абанова Е.В.⁵, Просс С.В.⁶, Парфилкин Н.И.⁷,
Филимонов Е.В.⁸, Сизова С.А.⁹, Волков А.С.¹⁰, Губозов Д.Н.¹¹, Шестакова Л.В.¹², Лысова В.А.¹³, Курошин В.А.¹⁴,
Кузин Д.И.¹⁵, Белина В.А.¹⁶

² ORCID : 0000-0001-8948-0052;

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16} Национальный исследовательский Мордовский государственный университет
им.Н.П.Огарева, Саранск, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (doctordmk[at]mail.ru)

Аннотация

Целью данного исследования было изучение предполагаемого цитопротективного эффекта мелатонина при сепсисе. Оценивая биохимические показатели в исследуемых группах, можно резюмировать, что сепсис (септический шок) приводит к оксидативному стрессу при котором нарушаются функции всех органов и систем. Так, уровень АСТ в группе 3 был в 4,2 раза статистически значимо выше, в сравнении с группой 1, $p < 0,05$. Сепсис вызывал достоверное снижение уровня ГЛТ в гомогенатах всех тканей по сравнению с контрольной группой. Нами отмечено, ЛПСК приводило к статистически значимому снижению ГЛТ в сравнении с контрольной группой, а применение мелатонина в группе 4 статистически значимо ($p < 0,01$) нивелировало уровень ГЛТ до уровня контрольных значений.

Ключевые слова: мелатонин, оксидативный стресс, окислительный стресс, антиоксиданты.

APPLICATION OF MELATONIN IN OXIDATIVE STRESS IN RATS ON THE MODEL OF EXPERIMENTAL SEPSIS

Research article

Vechkanova N.A.¹, Korobkov D.M.^{2,*}, Chernova Y.M.³, Zotov I.A.⁴, Abanova Y.V.⁵, Pross S.V.⁶, Parfilkin N.I.⁷,
Filimonov Y.V.⁸, Sizova S.A.⁹, Volkov A.S.¹⁰, Gubozov D.N.¹¹, Shestakova L.V.¹², Lisova V.A.¹³, Kuroshin V.A.¹⁴, Kuzin
D.I.¹⁵, Belina V.A.¹⁶

² ORCID : 0000-0001-8948-0052;

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16} National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

* Corresponding author (doctordmk[at]mail.ru)

Abstract

The aim of this study was to examine the presumed cytoprotective effect of melatonin in sepsis. Assessing biochemical parameters in the studied groups, it can be summarized that sepsis (septic shock) leads to oxidative stress in which the functions of all organs and systems are disturbed. Thus, AST level in group 3 was 4.2 times statistically significantly higher compared to group 1, $p < 0.05$. Sepsis caused a significant decrease of GLT level in homogenates of all tissues compared to the control group. We noted that LPSK caused statistically significant decrease of GLT in comparison with the control group, and application of melatonin in group 4 statistically significantly ($p < 0,01$) evened the level of GLT to the level of control values.

Keywords: melatonin, oxygenative stress, oxidative stress, antioxidants.

Введение

Сепсис представляет собой генерализованную воспалительную реакцию, недавние исследования показали, что при сепсисе в ходе иммунновоспалительного ответа, образуются атомарные формы кислорода. Активация макрофагов и цитокинов эндотоксином и последующее образование активных форм кислорода имеют центральное патогенетическое значение при различных воспалительных заболеваниях, включая сепсис. Обычно считается, что высвобождение бактериального эндотоксина является начальным событием в развитии сепсиса. Недавно было высказано предположение, что антиоксиданты могут противодействовать токсичности атомарных форм кислорода и что свободнорадикальная абляция при лечении сепсиса может быть полезна при полиорганной недостаточности [1], [2], [10]. Мелатонин, секреторный продукт шишковидной железы и мощный ингибитор свободных радикалов и антиоксидант, играет защитную роль на начальных и поздних стадиях различных заболеваний. Эксперименты как *in vitro*, так и *in vivo* показали, что мелатонин защищает ткани от окислительного повреждения несколькими способами: во-первых, он принимает участие в нейтрализации соляной кислоты со скоростью, достаточной для защиты каталазы от инактивации этой кислотой; во-вторых, он опосредовано ингибирует синтазу оксида азота и уменьшает повреждение тканей пероксинитрит-анионом или его метаболитами; в-третьих, он непосредственно удаляет пероксинитрит и детоксицирует высокотоксичные гидроксильные и пероксильные радикалы *in vitro*; в-четвертых, стимулирует активность эндогенных антиоксидантных ферментов, включая глутатионпероксидазу, супероксиддисмутазу и глутатионредуктазу. Целью данного исследования было изучение предполагаемого цитопротективного эффекта мелатонина при сепсисе.

Методы и принципы исследования

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [3]. Эксперимент проводился на 40 животных (нелинейные белые крысы обоего пола массой 220-335 г.). Животным выполнено анестезиологическое пособие (наркоз), включающее интраперитонеальное введение (и/п) препаратов: «Ксилазина гидрохлорида» (из расчета 0,5 мл/кг массы тела) и «Золетил 100» (из расчета 8мг/кг массы тела) [4]. Выполнялась респираторная поддержка. Животные были распределены в 4 группы:

1 – контроль, ложнооперированные животные (n=10);

2 – ложнооперированные животные + внутрибрюшинное (в/б) введение мелатонина (Sigma) 10мг/кг за 30 минут до операции и через 6 часов после операции;

3 – лигирование и перфорация слепой кишки (ЛПСК) (n=10) (модель сепсиса по Zanotti-Cavazzoni S. L, 2009) [5],

4 – ЛПСК+ в/б мелатонин (Sigma) 10мг/кг за 30 минут до операции и через 6 часов после операции (n=10).

Из хвостовой вены у крыс собирали кровь, и на автоматическом биохимическом анализаторе XL – 1000 по стандартной методике определяли уровень аспартаттрансаминазы (АСТ), аланинтрансаминазы (АЛТ), креатинина, азота мочевины в крови (АМК). По методике Zanotti-Cavazzoni S. L. et al., 2009 извлекался органокомплекс (мозг, легкие, диафрагма, печень, почки) готовились гомогенаты (изолированные органы крысы промывали физиологическим раствором, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до использования). Гомогенат тканей готовили в ножевом гомогенизаторе при скорости 20000 об/мин в течение 30 секунд; соотношение массы ткани к объёму физиологического раствора составляло 1:5. Полученный гомогенат наливали в пробирки и добавляли воду для инъекций ad 5 мл и рабочего раствора реагента (0,57 % ТБК, 10% уксусной кислоты, 0,8% додецилсульфата натрия, pH=3,5) и в соответствии со стандартными методиками происходило определение малонового диальдегида (МДА), глутатиона (ГЛТ) спектрофотометрическими методами на спектрофотометре СФ-56 [6]. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета программ «Statistica 10.0». Был применен параметрический t-критерий Стьюдента и критерий Манна-Уитни. Результаты представлены следующим образом, $M \pm m$ (M – среднее, m – ошибка среднего). Различия принимались за статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Как показано в таблице 1, уровни АЛТ, АСТ, мочевины и креатинина в венозной крови были статистически значимо выше в группе 3, чем в контрольной группе, $p < 0,05$.

Таблица 1 - Биохимические показатели венозной крови у крыс в исследуемых группах

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.106.1>

Показатель	Группа 1. Контроль, ложнооперированные животные	Группа 2. Ложнооперированные животные + внутрибрюшинное (в/б) введение мелатонина	Группа 3. Лигирование и перфорация слепой кишки (ЛПСК)	Группа 4. Лигирование и перевязка слепой кишки (ЛПСК)+ в/б мелатонин
АСТ,ед/л	134,6±15,3	132,5±11,4	574,2±44,6*#	361,5±5,7*#@
АЛТ,ед/л	69,7 ± 8,5	57,8±3,5	153,7±34,2*#	64,2±10,7*@
Мочевина, мг/дл	20,2±1,5	19,0±1,3	56,8±5,4*#	30,0±4,17*
Креатинин, мг/дл	0,29±0,2	0,28±0,1	0,9±0,2*	0,36±0,1

Примечание: для всех групп n=10; * – различия статистически значимы по отношению к группе 1 (контроль) ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по отношению к группе 2 ($p < 0,05$); @ – различия статистически значимы по отношению к группе 3 ($p < 0,05$)

Оценивая биохимические показатели в исследуемых группах, можно резюмировать, что сепсис (септический шок) приводит к оксидативному стрессу при котором нарушаются функции всех органов и систем. Так, уровень АСТ в группе 3 был в 4,2 раза статистически значимо выше, в сравнении с группой 1, $p < 0,05$. (таб .1.) Уровень АЛТ в группе 4 составил 64,2±10,7 ед/л, что статистически значимо ниже в 2,39 раза сравнении с группой 3 (таб.1.).

Уровни МДА в печени, почках, сердце, легких, диафрагме и головном мозге были значительно выше в группе 3, чем в контрольной группе, $p < 0,05$. На фоне применения мелатонина в группе 4, нами отмечено статистически значимое снижение уровня МДА во всех тканях по отношению к группе 3, $p < 0,05$ (таб.2.).

Таблица 2 - Уровень МДА в гомогенатах исследуемых органов

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.106.2>

Группа 1. Контроль, ложнооперированные животные	Группа 2. Ложнооперированные животные + внутрибрюшинное	Группа 3. ЛПСК	Группа 4. ЛПСК+ в/б мелатонин

	(в/б) введение мелатонина		
Печень, нмоль/г			
49,3±2,3	49,2±2,5	73,8±3,4*#	54,5±4,1*#@
Почки, нмоль/г			
34,8±4,1	32,7±5,6	61,9±2,4*#	50,9±2,7*#@
Сердце, нмоль/г			
24,1±3,4	20,5±2,4	36,9±4,8*#	29,7±0,9*#@
Легкие, нмоль/г			
34,9±1,9	32,8±2,7	41,3±2,7*#	35,7±2,8*#@
Диафрагма, нмоль/г			
30,1±3,7	31,8±4,1	40,8±1,6*#	33,7±2,7*#@
Мозг, нмоль/г			
25,4±3,1	23,8±2,8	43,7±3,1*#	31,7±0,7*#@

Примечание: для всех групп $n=10$; * – различия статистически значимы по отношению к группе 1 (контроль) ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по отношению к группе 2 ($p < 0,05$); @ – различия статистически значимы по отношению к группе 3 ($p < 0,05$)

Сепсис вызывал достоверное снижение уровня ГЛТ в гомогенатах всех тканей по сравнению с контрольной группой. Нами отмечено, ЛПСК приводило к статистически значимому снижению ГЛТ в сравнении с контрольной группой, а применение мелатонина в группе 4 статистически значимо ($p < 0,01$) нивелировало уровень ГЛТ до уровня контрольных значений. Так уровень ГЛТ в группе 3 составил $1,05 \pm 0,1$ мкмоль/г, что статистически значимо ниже чем в группе контроля (группа 1), $p < 0,01$ и статистически значимо ниже на 42,8% в сравнении с группой 4, $p < 0,01$. Аналогичная закономерность отмечена и в гомогенатах из других органов (таб.3).

Таблица 3 - Уровень ГЛТ в гомогенатах исследуемых органов

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.106.3>

Группа 1. Контроль, ложнооперированные животные	Группа 2. Ложнооперированные животные + внутрибрюшинное (в/б) введение мелатонина	Группа 3. ЛПСК	Группа 4. ЛПСК+ в/б мелатонин
Печень, мкмоль/г			
2,1±0,1	2,04±0,3	1,05±0,1*#	1,5±0,1*#@
Почки, мкмоль/г			
1,4±0,1	1,45±0,1	0,9±0,2	1,46±0,3
Сердце, мкмоль/г			
1,3±0,1	1,3±0,15	0,7±0,02*#	0,8±0,09*#@
Легкие, мкмоль/г			
1,4±0,1	1,4±0,15	1,1±0,2	1,3±0,1
Диафрагма, мкмоль/г			
1,38±0,05	1,41±0,09	0,7±0,1*#	1,1±0,05*#@
Мозг, мкмоль/г			
1,3±0,05	1,35±0,08	0,8±0,1	1,2±0,03*#@

Примечание: для всех групп $n=10$; * – различия статистически значимы по отношению к группе 1 (контроль) ($p < 0,01$); # – различия статистически значимы по отношению к группе 2 ($p < 0,01$); @ – различия статистически значимы по отношению к группе 3 ($p < 0,01$)

Многие литературные источники свидетельствуют о том, что нарушения в системе перекисного окисления липидов играют важную роль в патогенезе сепсиса и его осложнений. Экспериментальные и клинические исследования показали, что любое пагубное воздействие на ткани (инфекция, травма) воспринимается макрофагами и

моноцитами, которые, в свою очередь, секретируют провоспалительные цитокины, такие, как IL-1 и ФНО- α , тем самым происходит инициация иммуновоспалительного ответа [1], [7], [9]. Недавно было обнаружено, что мелатонин, главный секреторный продукт шишковидной железы, является мощным ингибитором свободных радикалов, и считается, что он играет защитную роль на начальных и поздних стадиях заболеваний, патогенез которых включает повреждение, вызываемое активными кислородными метаболитами. Мелатонин снижает последствия окислительного стресса, нейтрализуя соляную кислоту со скоростью, достаточной для защиты каталазы от инактивации HCl, также мелатонин ингибирует гидроксильные и пероксильные радикалы *in vitro*, и непосредственно стимулирует выработку глутатионпероксидазы, что, возможно, обусловлено его способностью инактивировать H₂O₂ [8], [9], [10]. В результате перекисного окисления липидов может меняться проницаемость мембран, а также увеличивается скорость денатурации белковых структур, что в конечном итоге приводит к лизису клеток. Глутатион является важным компонентом внутриклеточных защитных механизмов против окислительного стресса. Однако восстановленный ГЛТ, как основной компонент эндогенного небелкового сульфгидрильного пула, как известно, является основным низкомолекулярным поглотителем свободных радикалов в цитоплазме. Из-за открытых сульфгидрильных групп небелковые сульфгидрилы связываются с различными электрофильными радикалами и метаболитами, которые могут повреждать клетки. Было высказано предположение, что антиоксиданты, поддерживающие концентрацию ГЛТ, могут восстанавливать механизмы клеточной защиты и блокировать перекисное окисление липидов, тем самым защищая ткани от окислительного повреждения.

Закключение

В настоящем исследовании уровни МДА, как конечного продукта перекисного окисления липидов, были значительно повышены во всех исследованных тканях. Это наблюдение согласуется с предыдущими исследованиями, которые показали повышение уровня липидных фракций и метаболитов в результате окислительного стресса. Кроме того, мы обнаружили, что мелатонин нивелирует повышение уровня МДА, что позволяет предположить, что мелатонин может обладать цитопротективным эффектом, защищая клетки, ткани и органы от деструкции, вызванной сепсисом. Полученные нами результаты также подтверждают, что на фоне окислительного повреждения органов у животных с сепсисом отмечается снижение ГЛТ. Наши результаты также показывают, что мелатонин в определенной степени обладает цитопротективным эффектом, благодаря эффекту восполнения ГЛТ, также стоит отметить, что мелатонин не способствовал нарастанию концентрации ГЛТ в сердечной и легочной ткани, это позволяет предположить, что цитопротективный эффект, возможно, обладает определенной тропностью к клеткам-мишеням, что безусловно требует проведения дальнейших исследований. Мы использовали наиболее клинически значимую модель сепсиса для мониторинга полиорганной недостаточности, вызванной сепсисом, и обнаружили, что мелатонин препятствует развитию полиорганной недостаточности, вызванную сепсисом, благодаря своим антиоксидантным свойствам.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Vasey C. Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin / C. Vasey, J. McBride, K. Penta // *Nutrients*. — 2021. — 30. — p. 1-30. — DOI: 10.3390/nu13103480.
2. Reiter R.J. Melatonin: Exceeding Expectations / R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano // *Physiology (Bethesda)*. — 2014. — 29. — p. 325-333. — DOI: 10.1152/physiol.00011.2014.
3. Appendices A to the European Convention for the Conservation of Vertebrate Animals Used for Experimentation and Other Scientific Purposes (ets no. 123): Guidelines for the Management and Care of Laboratory Animals (article no. 5 of the convention). — 2006. — URL: <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/PDF/123-Arev.pdf> (accessed: 09.09.2023).
4. Inchina V.I. Study of the Characteristics of the Severity of Neurological Deficit in Rats with Cerebral Pathology of Traumatic Origin and Concomitant Hypoxia in the Acute Period / V.I. Inchina, D.M. Korobkov, A.O. Petrunin // *Modern Problems of Science and Education*. — 2020. — 3. — p. 1-9. — URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29794> (accessed: 19.09.2023)
5. Zanotti-Cavazzoni S. L. Animal Models of Sepsis / S. L. Zanotti-Cavazzoni, R. D. Goldfarb // *Critical Care Clinics*. — 2009. — 25. — p. 703-719.
6. Пакет программного обеспечения СФ-56 Руководство пользователя. — URL: https://www.medteh.info/_fr/50/sf56_user_manua.pdf (дата обращения: 19.09.2023)
7. Reiter R.J. Melatonin as an Antioxidant: under Promises but over Delivers / R.J. Reiter, J.C. Mayo, D.X. Tan et al. // *J Pineal Res.* — 2016. — 61. — p. 253-278. — DOI: 10.1111/jpi.12360.
8. Hardeland R. Melatonin and the Programming of Stem Cells / R. Hardeland // *Int J Mol Sci*. — 2022. — 10. — p. 1971. — DOI: 10.3390/ijms23041971.
9. Purcarea A. Sepsis, a 2020 review for the internist / A. Purcarea, S. Sovaila // *Rom J Intern Med*. — 2020. — 58. — p. 129-137. — DOI: 10.2478/rjim-2020-0012.

10. Fabiani I.M. Evaluation of Sepsis Treatment with Enteral Glutamine in Rats / I.M. Fabiani, S.L. Rocha // *Rev Col Bras Cir.* — 2017. — 44. — p. 231-237. — DOI: 10.1590/0100-69912017003002.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Vasey C. Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin / C. Vasey, J. McBride, K. Penta // *Nutrients.* — 2021. — 30. — p. 1-30. — DOI: 10.3390/nu13103480.
2. Reiter R.J. Melatonin: Exceeding Expectations / R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano // *Physiology (Bethesda).* — 2014. — 29. — p. 325-333. — DOI: 10.1152/physiol.00011.2014.
3. Appendices A to the European Convention for the Conservation of Vertebrate Animals Used for Experimentation and Other Scientific Purposes (ets no. 123): Guidelines for the Management and Care of Laboratory Animals (article no. 5 of the convention). — 2006. — URL: <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/PDF/123-Arev.pdf> (accessed: 09.09.2023).
4. Inchina V.I. Study of the Characteristics of the Severity of Neurological Deficit in Rats with Cerebral Pathology of Traumatic Origin and Concomitant Hypoxia in the Acute Period / V.I. Inchina, D.M. Korobkov, A.O. Petrunin // *Modern Problems of Science and Education.* — 2020. — 3. — p. 1-9. — URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29794> (accessed: 19.09.2023)
5. Zanotti-Cavazzoni S. L. Animal Models of Sepsis / S. L. Zanotti-Cavazzoni, R. D. Goldfarb // *Critical Care Clinics.* — 2009. — 25. — p. 703-719.
6. Paket programmnoho obespechenija SF-56 Rukovodstvo pol'zovatelja [Software package SF-56 User's manual]. — URL: https://www.medteh.info/_fr/50/sf56_user_manua.pdf (accessed: 19.09.2023) [in Russian]
7. Reiter R.J. Melatonin as an Antioxidant: under Promises but over Delivers / R.J. Reiter, J.C. Mayo, D.X. Tan et al. // *J Pineal Res.* — 2016. — 61. — p. 253-278. — DOI: 10.1111/jpi.12360.
8. Hardeland R. Melatonin and the Programming of Stem Cells / R. Hardeland // *Int J Mol Sci.* — 2022. — 10. — p. 1971. — DOI: 10.3390/ijms23041971.
9. Purcarea A. Sepsis, a 2020 review for the internist / A. Purcarea, S. Sovaila // *Rom J Intern Med.* — 2020. — 58. — p. 129-137. — DOI: 10.2478/rjim-2020-0012.
10. Fabiani I.M. Evaluation of Sepsis Treatment with Enteral Glutamine in Rats / I.M. Fabiani, S.L. Rocha // *Rev Col Bras Cir.* — 2017. — 44. — p. 231-237. — DOI: 10.1590/0100-69912017003002.