

# ДИНАМИКА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРЕПАРАТОВ АНТИОКСИДАНТНОГО ТИПА ДЕЙСТВИЯ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

УДК 616.001.6—006—074:577.178:615.2

Поступила 15.10.2010 г.



**Д.В. Демидов**, аспирант кафедры патологии с курсом патологической физиологии Медицинского института;  
**Н.А. Плотникова**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологии с курсом патологической физиологии  
Медицинского института

Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, Саранск

**Цель исследования** — изучение влияния мелатонина (Мелаксена) и метформина на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови и ткани опухолей тонкой кожи у мышей в условиях индуцированного бенз(а)пиреном опухолевого роста.

**Материалы и методы.** В экспериментальных исследованиях для коррекции канцерогенного эффекта использовали эндогенный гормон мелатонин и антидиабетический бигуанид метформин. Динамика показателей ПОЛ изучалась на бенз(а)пиреновой модели канцерогенеза. Оценку активности ПОЛ проводили по содержанию малонового диальдегида и по активности каталазы.

**Результаты.** Установлена достоверно высокая антиоксидантная, онкопротекторная и геропротекторная активность у исследуемых препаратов. Наиболее выраженный терапевтический эффект отмечен при одновременном использовании мелатонина и метформина.

**Ключевые слова:** перекисное окисление липидов, каталаза, малоновый диальдегид, мелатонин, метформин, бенз(а)пирен.

## English

### Dynamics of lipid peroxidation under the effect of antioxidant preparations in the conditions of experimental tumour growth

**D.V. Demidov**, Postgraduate, the Department of Pathology with the Course of Pathological Physiology Meical Institute;  
**N.A. Plotnikova**, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Pathology with the Course of Pathological Physiology  
Meical Institute

Mordovian State University named after N.P. Ogaryov, Saransk

**The aim of the investigation** is to study the effect of melatonin (Melaxen) and metformin on the processes of lipid peroxidation (LP) in blood serum and on the tissue of tumours of thin skin in mice in the conditions of tumour growth induced by benzpyrene.

**Materials and Methods.** In experimental studies endogenous hormone, melatonin, and antidiabetic biguanide metformin have been used to correct carcinogenic effect. The dynamics of LP values has been studied on benzpyrene model of carcinogenesis. LP activity has been assessed by the content of malonic dialdehyde and the activity of catalase.

**Results.** There has been detected significantly high antioxidant, oncoprotective and geroprotective activity in the preparations under study. The most pronounced effect has been observed in simultaneous use of melatonin and metformin.

**Kew words:** lipid peroxidation, catalase, malonic dialdehyde, melatonin, metformin, benzpyrene.

Для контактов: Демидов Денис Владимирович, тел. моб. +7 927-180-08-84; e-mail: gerbera1412@yandex.ru

Согласно свободно-радикальной теории канцерогенеза, которая в настоящее время активно изучается, при физиологических условиях синтез свободных радикалов отвечает требованиям клеточного метаболизма, обеспечивающего нормальную жизнедеятельность клеток. При избыточном образовании в организме свободных радикалов, не соответствующем физиологическим потребностям, реализуется их альтернативное воздействие [1]. В клетках происходит нарушение регуляторных и защитных функций. Внедряясь в билипидный слой цитолеммы, свободные радикалы инициируют реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к повреждению мембран, нарушению их функций и к возможной неопластической трансформации [2].

Известно, что свободные радикалы являются одним из канцерогенных факторов, присутствуя на всех стадиях развития опухоли. Они обладают высокой активностью и способны вызывать повреждение липидного бислоя клеточных мембран и непосредственно молекул ДНК.

В организме существует многокомпонентная система, предотвращающая свободно-радикальные процессы и защищающая организм от продуктов метаболизма в подобных реакциях [3]. Однако естественная антиоксидантная система организма часто оказывается перегруженной и бывает не в состоянии инактивировать огромное количество свободных радикалов, что влечет за собой повышенный риск опухолевого роста.

Основными функциями мелатонина (Мелаксена) в организме являются антиоксидантная и иммуномодулирующая. Кроме того, мелатонин служит сильнейшим эндогенным поглотителем свободных радикалов [4]. Механизм действия антидиабетического бигуанида метформина — подавление глюконеогенеза, окисление жиров и образование свободных жирных кислот. К основным его свойствам относятся: гипогликемическое, метаболическое, антиокислительное и нейропротекторное [5].

В литературе данных об онкопротекторном действии антиоксидантов в условиях использования препаратов с выраженным канцерогенным эффектом пока недостаточно [6], поэтому проблема коррекции опухолевого роста препаратами, обладающими антиоксидантной активностью, представляет интерес. Изучение действия метформина и мелатонина на моделях индуцированного канцерогенеза — одно из важных направлений экспериментальной онкологии на современном этапе.

**Цель исследования** — изучение влияния мелатонина (Мелаксена) и метформина на процессы перекисного окисления липидов в сыворотке крови и ткани опухолей тонкой кожи у мышей в условиях индуцированного бенз(а)пиреном опухолевого роста.

**Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 220 самках нелинейных белых мышей. Аутбредные SHR/и белые мыши массой 20–22 г в возрасте 2 мес получены из Питомника лабораторных животных (г. Уфа). Животные содержались в стандартных условиях вивария, при режиме освещения: 12 ч — свет, 12 ч — темнота. Мыши получали воду и гранулированный корм без ограничений.

200 мышей в возрасте 3 мес были рандомизировано поделены на четыре группы по 50 мышей, оставшиеся 20 мышей (5-я группа) служили интактным контролем и не подвергались каким-либо воздействиям.

Животным экспериментальных групп на предварительно выбритый участок кожи спинки диаметром 1,5–2 см (межлопаточная область) два раза в неделю наносили бенз(а)пирен (Fluka, Busch, Швейцария) в концентрации 0,05%, растворенный в ацетоне, в дозе 0,2 мл на мышшь.

Животные 1-й группы составили контрольную группу и получали питьевую воду без добавления мелатонина и метформина. Животные 2-й группы со следующего после введения канцерогена дня получали с питьевой водой в ночные часы (с 19:00 до 07:00) мелатонин (ф. Sigma, США) в концентрации 2 мг/л. Раствор мелатонина готовился ежедневно *ex tempore*: его растворяли в нескольких каплях 96% этилового спирта и доводили до нужной концентрации водой. Животные 3-й группы получали с питьевой водой в течение всего дня метформин (Сиофор 500; ф. БЕРЛИН-ХЕМИ АГ/МЕНАРИНИ ГРУПП, Германия) в концентрации 200 мг/л. Раствор метформина готовился ежедневно *ex tempore*: его растворяли в нескольких миллилитрах теплой воды и доводили до нужной концентрации водой. Животные 4-й группы получали с питьевой водой в течение всего дня метформин (Сиофор 500) в концентрации 200 мг/л и в ночные часы (с 19:00 до 07:00) — мелатонин в дозе 2 мг/л.

Длительность эксперимента составила 26 нед. Оставшиеся в живых мыши забивались путем декапитации под действием эфирного наркоза. У всех интактных мышей и у особей из каждой экспериментальной группы, подвергшихся воздействию канцерогена, брали кровь и ткань кожи для биохимического исследования. Использовали кровь, свободно вытекающую после декапитации (в среднем около 1 мл от каждой мыши).

В сыворотке крови и гомогенатах опухолевой ткани оценивали интенсивность процессов ПОЛ. Для этого определяли уровень малонового диальдегида (МДА) по методу С.Г. Коноховой с соавт. [7] и активность каталазы по методу М.А. Корольюк с соавт. [8]. МДА представляет собой вторичный (промежуточный) продукт реакций ПОЛ. Каталаза является одним из основных ферментов антиоксидантной системы организма, катализирует восстановление перекиси водорода до воды, тем самым уменьшая образование свободных радикалов [9].

Гомогенаты тканей готовили следующим образом: кусочки тканей отрезали ножницами, отмывали от крови охлажденным 0,9% раствором натрия хлорида, обсушивали фильтровальной бумагой. Навески тканей помещали в фарфоровую ступку. С помощью шлифовального пестика проводили тщательное гомогенизирование в 0,9% растворе хлорида натрия в соотношении 1:9.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критериев Стьюдента, точного метода Фишера ( $\chi^2$ ) с помощью пакета прикладных программ «МедСтатистика» и «Биостат». Во всех слу-

чаях различия считались достоверными при уровне вероятности более 95%, т.е.  $p < 0,05$ .

Все эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. №755).

**Результаты и обсуждение.** Одним из механизмов реализации канцерогенного эффекта бенз(а)пирена является изменение показателей ПОЛ.

По сравнению с интактными в группе контрольных животных отмечается статистически значимое увеличение содержания МДА: с  $4,05 \pm 1,35$  до  $8,42 \pm 1,05$  ммоль/л — в сыворотке крови ( $p < 0,05$ ) и с  $4,17 \pm 0,19$  до  $9,62 \pm 0,94$  ммоль/л — в гомогенатах ткани опухолей тонкой кожи ( $p < 0,01$ ).

При использовании эндогенного гормона мелатонина содержание МДА в сыворотке крови составило  $1,53 \pm 0,14$  ммоль/л, что статистически значимо ниже по сравнению с группой интактных животных — в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ) и по сравнению с группой контрольных животных, получавших чистую воду без добавления препарата, — в 5,5 раза ( $p < 0,001$ ).

Применение метформина отдельно и совместно с мелатонином привело к снижению уровня МДА в сыворотке крови до  $1,72 \pm 0,15$  и  $2,40 \pm 0,44$  ммоль/л соответственно. Полученные данные недостоверны по сравнению с интактными животными, по сравнению с контрольной группой отмечается статистически значимое снижение показателей — в 4,9 ( $p < 0,001$ ) и 3,5 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно.

При коррекции канцерогенного эффекта бенз(а)пирена препаратами антиоксидантного ряда наблюдалась тенденция к увеличению показателей МДА в гомогенатах опухолевой ткани по сравнению с интактными животными, но данные недостоверны. При сравнении с группой контрольных животных уровень МДА в ткани опухолей уменьшился статистически значимо — на 78% — в группе животных, получавших метформин ( $p < 0,01$ ), и на 87% — при коррекции мелатонином совместно с метформином ( $p < 0,001$ ).

При биохимическом исследовании сыворотки крови экспериментальных животных выявлено повышение содержания каталазы в контрольной группе относительно группы интактных:  $3,03 \pm 1,13$  мккат/л ( $p > 0,05$ ) и  $1,97 \pm 0,11$  мккат/л соответственно.

Динамика уровня каталазы в сыворотке крови при коррекции экспериментального канцерогенеза исследуемыми препаратами не является статистически значимой, но наблюдается тенденция к уменьшению данного показателя.

Максимально низкая активность каталазы в сыворотке крови отмечалась при использовании одновременно двух препаратов (мелатонина и метформина) —  $1,7 \pm 0,1$  мккат/л.

Коррекция активности ПОЛ препаратами антиоксидантного ряда не привела к значимому изменению уровня содержания каталазы в ткани опухолей (по сравнению с интактными животными), но при этом отмечено некоторое снижение показателей. Подобный эффект, возможно, обусловлен тем, что введение кан-

церогена оказывает угнетающее действие на собственную прооксидантную систему защиты организма.

По завершении эксперимента рассчитывали среднюю продолжительность жизни мышей, продолжительность жизни животных после обнаружения опухолевых узлов и средний латентный период развития опухолей.

Оба препарата и их комбинация не оказывали влияния на средний латентный период развития опухолей и на продолжительность жизни животных с опухолями. Но отмечена тенденция к увеличению данных показателей. Средняя продолжительность жизни животных в группе контроля составила  $169,0 \pm 5,5$  сут, при применении мелатонина —  $178,0 \pm 5,1$  сут, что больше на 5,3%. В группе животных, получавших метформин, средняя продолжительность жизни увеличилась на 8,3% и составила  $182,0 \pm 4,0$  сут, а при совместном применении мелатонина и метформина —  $177,0 \pm 6,4$  сут (что больше на 5,2% по сравнению с контролем). Различия статистически не значимы ( $p > 0,05$ ).

Продолжительность жизни после обнаружения опухолевых узлов в группе животных, получавших мелатонин, составила  $100,0 \pm 2,5$  сут, что на 4% больше, чем в группе контроля ( $96,0 \pm 2,5$  сут), но различия статистически не значимы. При применении одного метформина и совместно с мелатонином данные показатели составили  $103,0 \pm 2,5$  и  $103,0 \pm 3,5$  сут соответственно, что на 7,3 и 7,2% больше, чем в контрольной группе ( $p > 0,05$ ).

Средний латентный период развития опухолей в группе контроля равен  $126,0 \pm 3,9$  сут (минимальный период развития опухолей — 84 сут, максимальный — 156 сут). В группе животных, получавших мелатонин, показатель составил  $137,0 \pm 5,4$  сут (минимальный и максимальный периоды развития опухолей — 86 и 170 сут), что на 8,4% больше, чем в контроле. При использовании метформина на 4,5% увеличился средний латентный период развития опухолей (по сравнению с контролем), он составил  $132,0 \pm 5,3$  сут (минимальный период развития опухолей — 85 сут, максимальный — 169 сут). В группе животных, получавших метформин и мелатонин, данный показатель равнялся  $135,0 \pm 6,6$  сут (минимальный и максимальный периоды развития опухолей — 87 и 176 сут соответственно), что на 6,7% больше, чем в контроле ( $p > 0,05$ ).

Важная особенность злокачественного роста — изменение уровня свободно-радикальных реакций, которое проявляется в повышенной антиоксидантной активности опухолевой ткани, с одной стороны, и истощении антиоксидантной системы защиты организма-опухоленосителя — с другой. В основе антиоксидантного действия исследуемых препаратов лежит их способность ингибировать стадию инициации свободно-радикальной реакции ПОЛ, во многом обусловленную образованием активных форм кислорода и появлением каталитически активных ионов.

Это обстоятельство позволяет рекомендовать применение мелатонина и метформина как ингибиторов свободно-радикальных реакций и образования супероксидных и гидроксильных радикалов в период опухолевой трансформации, когда эффективность

стадии инициации весьма велика. По данным ряда исследователей [5], антиоксиданты могут оказывать тормозящее действие на развитие опухоли в условиях экспериментального канцерогенеза, индуцированного химическими канцерогенами. В условиях моделирования бенз(а)пиренового канцерогенеза тонкой кожи у мышей наиболее выраженные антиоксидантное и герпротекторное действия выявляются при совместном применении мелатонина и метформина.

**Заключение.** Изучение показателей ПОЛ под воздействием препаратов, обладающих антиоксидантной активностью, — мелатонина и метформина — выявило снижение уровня малонового диальдегида и активности каталазы в сыворотке крови и гомогенатах опухолевой ткани экспериментальных животных. Эти препараты влияют на продолжительность жизни мышей в условиях экспериментального опухолевого роста, что подтверждается увеличением средней продолжительности жизни и продолжительности жизни животных после обнаружения опухолевых узлов. Совместное применение препаратов оказывает более выраженное действие на изучаемые показатели бенз(а)пиреновой модели опухолей кожи.

#### Литература

1. *Бобырев В.Н., Почерняева В.Ф., Стародубцев С.П.* Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей — основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами. Экспериментальная и клиническая фармакология 1994; 57(1): 47–54.
2. *Брюгер А.Ф.* Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне; 1986; 160.
3. *Гавриленко Г.А., Анненкова А.М., Рычковский Г.Ф.* Клинико-экспериментальное обоснование применения антиоксидантов в лечении механической желтухи. Хирургия 1991; 11: 35–43.
4. *Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.К., Анисимов В.Н.* Мелатонин в норме и патологии. М: Медпрактика; 2004; 308 с.
5. *Анисимов В.Н.* Канцерогенез и онкогенез: основные направления и результаты исследования. Вопросы онкологии 1997; 43: 88–94.
6. *Зиганшина Л.Е., Студенцова И.А., Зиганшина А.У., Валеева И.Х.* Механизм действия димефосфона. Экспериментальная и клиническая фармакология 1994; 2: 43–47.
7. *Конюхова С.Г., Дубрикайтис А.Ю., Шабуневич Л.В.* Роль активации перекисного окисления в патогенезе экспериментального перитонита. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1989; 5: 557–559.
8. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Определение активности каталазы. Лабораторное дело 1988; 1: 16–19.
9. *Конторщикова К.Н.* Перекисное окисление липидов в норме и патологии. Н. Новгород; 2000; 24 с.