

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА  
МОСКОВСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ  
ИМЕНИ И.М.СЕЧЕНОВА

# **МЕЛАТОНИН: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА**

Под редакцией **С.И. Рапопорта, В.А. Голиченкова**  
Авторы: **А.Ю. Беспярых, В.Я.Бродский, О.В.Бурлакова,  
В.А.Голиченков, Л.А.Вознесенская, Д.Б.Колесников,  
А.Ю.Молчанов, С.И.Рапопорт**

МОСКВА  
2009

УДК  
ББК  
М

**А.Ю. Беспятых, В.Я.Бродский, О.В.Бурлакова, В.А.Голиченков,  
Л.А.Вознесенская, Д.Б.Колесников, А.Ю.Молчанов, С.И.Рапопорт**  
МЕЛАТОНИН: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА / Под ред. С.И. Рапопорта,  
В.А. Голиченкова  
– М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2009. – с.

## Оглавление

Перечень сокращений .....	
Введение .....	
Фундаментальные аспекты мелатонина .....	
Биосинтез и метаболизм мелатонина .....	
Инактивация мелатонина .....	
Рецепторы мелатонина у млекопитающих .....	
Биоритмологические свойства .....	
Мелатонин как антиоксидант .....	
Мелатонин и свободные радикалы .....	
Мелатонин и супероксид-анион ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	
Мелатонин и пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) .....	
Мелатонин и $\bullet OH$ .....	
Мелатонин и синглетный кислород ( $^1O_2$ ) .....	
Мелатонин и пероксил-радикал ( $LOO\bullet$ ) .....	
Мелатонин и оксид азота/пероксититрит-анионы ( $ONOO^-$ ) .....	
Продукты мелатонина как антиоксиданты .....	
АФМК как поглотитель свободных радикалов .....	
Гидроксимелатонин (6-ОНМ) как поглотитель свободных радикалов .....	
Иммуномодулирующие свойства мелатонина .....	
Определение оптимальной дозы .....	
Методы определения мелатонина .....	
Мелатонин .....	
Биосинтез мелатонина .....	
Метод биопределения .....	
Протокол $^1H$ ядерного магнитного резонанса .....	
ELISA-test (или метод иммуноферментного анализа) .....	
Радиоиммунный метод (RIA) определения концентрации мелатонина .....	
Хроматографическая идентичность определения мелатонина и его селективных аналогов .....	

© ?????????, 2009

© Оформление: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2009

ISBN 978-5-98803-

ГАС хроматография – масс спектрометрия (GAS Chromatography – Mass Spectrometry GCMS) в определении мелатонина .....	
Спектральные методы .....	
Определение мелатонина у человека .....	
Практические аспекты мелатонина .....	
Роль мелатонина в репродуктивной системе млекопитающих и человека .....	
Роль мелатонина при беременности .....	
Циркуляция мелатонина между матерью и плодом .....	
Мелатонин, циркадианные ритмы и развитие плода .....	
Взаимосвязь мелатонина и аборттов .....	
Мелатонин и преэклампсия .....	
Мелатонин и плодная гипоксия .....	
Мелатонин и беременность .....	
Краткие выводы .....	
Мелатонин и сердечно-сосудистая система .....	
Продукция мелатонина у больных с патологией сердечно-сосудистой системы .....	
Влияние колебаний электромагнитного поля земли на продукцию мелатонина у больных сердечно-сосудистой патологией .....	
Мелатонин в органах желудочно-кишечного тракта .....	
Роль нарушений обмена мелатонина в развитии заболеваний ЖКТ	
Мелатонин и язвенная болезнь .....	
Мелатонин и синдром раздраженной кишки .....	
Заключение .....	

## Перечень сокращений

АД	– артериальное давление
АМК	– N(1)-ацетил-5метоксикинумарин
АТФ	– аденозин трифосфат
АФМК	– N(1)-ацетил-N(2)-формил-5метоксикинумарин
БК	– болезнь Крона
ВИП	– вазоактивный интестинальный пептид
ГБ II ст.	– гипертоническая болезнь II стадии
ГЗТ	– гормональная заместительная терапия
ДАД	– диастолическое АД
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИБС	– ишемическая болезнь сердца (2фг – второй функциональной группы)
	– интерлейкин
ИЛ	– интерферон
ИФН	– олестерин липопротеинов низкой плотности
ЛПНП-холестерина	– мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин)
М	– матричная рибонуклеиновая кислота
мРНК	– никотинамид динуклеатид
НАДН	
НК клетки	– натуральные (нормальные) киллеры
(NK – natural killer)	– нейроциркуляторная дистония
НЦД	– неспецифический язвенный колит
НЯК	– систолическое АД
САД	– синдром раздраженной кишки
СРК	– среднее артериальное давление
СрАД	– супрахиазматическое ядро
СХЯ	– ультрафиолетовые излучения
УФ-излучения	– фактор активирующий тромбоциты
ФАТ	– фолликулостимулирующий гормон
ФСГ	– циклический аденозин монофосфат
цАМФ	– центральная нервная система
ЦНС	– частота сердечных сокращений
ЧСС	– электромагнитное поле Земли
ЭМПЗ	

ЯБ	– язвенная болезнь
ЯБЖ	– язвенная болезнь желудка
ЯБДК	– язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки
ЯК	– язвенный колит
Bcl-2	– антиапоптотический ген
ЕС-клетках	– энтерохромозинные клетки
FSH (Follicle-stimulating hormone)	– фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)
F-26	– тип простагландинов
GPx (glutathione peroxidase)	– глутатион пероксидаза
GRd (glutathione reductase)	– глутатион оксидаза
HELLP	– разновидность преэклампсии
hCG (Human chorionic gonadotropin)	– человеческий хорионический гонадотропин (ЧХГ)
LH (Luteinizing hormone)	– лютеинизирующий гормон (ЛГ)
MALT (mucosa associated lymphoid tissue)	– лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой
NOS (Nitrous Oxide Systems)	– активные формы азота
6-OHM	– гидроксимелатонин
PBL (lymphocyte peripheral blood)	– лимфоциты периферической крови
PVL (Periventricular leukomalacia)	– размягчение вокруг боковых желудочков
REM rapid eyes movement	– быстрое движение глаз
ROS (reactive oxygen species)	– активные формы кислорода
SOD (superoxidedismutase)	– супероксид дисмутаза
SAD	– seasonal affective disorder
WHO (World Health Organization)	– Всемирная Организация Здравоохранения

## Введение

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают сведения о важной регуляторной роли эпифиза (шишковидной железы) и его основного гормона мелатонина в различных физиологических функциях организма. Ключевая роль мелатонина в организме определяется тем обстоятельством, что ритмам его продукции подчинены все эндогенные ритмы организма. Секреция мелатонина одновременно регулируется супрахиазматическим ядром гипоталамуса, генерирующим эндогенный циркадианный ритм с периодом 23–25 часов, и внешним ритмом свет–темнота, имеющим период 24 часа и корректирующим эндогенные ритмы относительно ритмов внешней среды. Изменения продукции мелатонина, строго следующие за изменениями продолжительности светового и темного времени суток, вызывают суточные и сезонные перестройки в организме человека и животных.

Мелатонин – гормон, присутствующий практически во всех организмах населяющих планету. Он известен, как один из самых эволюционно консервативных веществ–регуляторов. Наличие мелатонина было показано у одноклеточных водорослей *Gonyaulax polyedra*, у беспозвоночных и у позвоночных, включая человека. Единственным источником мелатонина у людей, выполняющего роль фоторегулятора циркадианных биоритмов всего организма, является эпифиз. Однако мелатонин вырабатывается не только в эпифизе, его синтез обнаружен почти во всех органах. Он обнаружен в сетчатке глаза, Гардеровой железе и желудочно-кишечном тракте, тимусе, иммунных клетках, сердце, половых железах, антральных фолликулах. Действие экстрапинеального мелатонина, как правило, ауто- и/или паракринно. Однако, мелатонин глаза личинок амфибий, непосредственно регулирует состояние пигментных клеток покровов тела. Объем его продукции варьирует в зависимости от органа. Считают, что синтез экстрапинеального мелатонина у высших позвоночных не имеет самостоятельной фотопериодичности – она задается мелатонином, синтезируемым в эпифизе. У личинок амфибий не только пинеальный комплекс, но и сетчатка глаза в условиях длительной световой депривации продемонстрировали циркадианный ритм выделения мелатонина, причем с несколько различающимися периодами. Недавно было показано, что различные съедобные растения также содержат мелатонин и его предшественники.

Очевидно, что высокая представленность мелатонина на эволюционном и органном уровне означает его высокое функциональное разнообразие и критическую степень задействованности в регуляции биохимических процессов организма. Поэтому объектом исследования механизмов действия мелатонина у высокоорганизованных существ могут также служить и организмы любого уровня организации.

Биологические ритмы являются универсальным и необходимым инструментом адаптации организма к окружающей среде и охватывают все проявления живого от функций субклеточных структур, клеток, тканей, органов до сложных поведенческих реакций организма, популяций, экологических систем. Адаптация организма – сложный и многоуровневый процесс, включающий в себя взаимодействия всех функциональных систем. Воздействовать на этот процесс чрезвычайно трудно, поскольку речь идет об очень тонких механизмах. На современном этапе, опираясь на результаты многолетних исследований роли мелатонина в организме человека и его использование при состояниях, связанных с рассогласованием биологических ритмов организма, можно более оптимистично подходить к решению проблемы дезадаптации и патологических состояний, возникающих на ее фоне.

Мелатонин обладает также уникальными анти- и прооксидантными свойствами, определяющими его протективные возможности при свободно-радикальном повреждении ДНК, белков и липидов. В связи с малым размером молекулы мелатонина, способной проникать через плазматическую мембрану, а также с тем, что антиоксидантные эффекты мелатонина неопосредованы мембранными рецепторами, он может воздействовать на свободно-радикальные процессы в любой клетке организма.

Не менее значимыми представляются и иммуномодулирующие свойства мелатонина, обуславливающие регуляцией продукции, как самих иммунокомпетентных клеток, так и секреции ими цитокинов.

Вместе с тем, в изучении мелатонина и его многообразной роли в организме остается еще много неясностей, требующих дальнейших исследований. Среди нерешенных вопросов важное место занимает его роль в физиологических функциях и развитии патологических процессов в желудочно-кишечном тракте и заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Как показано в последних работах, эти заболевания носят сезонный характер, и имеют непосредственную связь с профилем сезонных колебаний синтеза мелатонина. Экспериментальные исследования свидетельствуют об отчетливой протективной роли как эндогенного, так и экзогенного

мелатонина при ишемически-реперфузионном поражении различных органов и тканей. Достаточно сказать, что в экспериментах на животных в физиологических и фармакологических концентрациях мелатонин сокращает размеры инфарктов миокарда и снижает летальность.

Монография предоставляет обзор литературы, охватывающей практически все возможные аспекты и современные знания о роли мелатонина в рамках заданной темы исследований. При анализе данных литературы рассмотрена проблема по физиологическому действию мелатонина на организм и его применению в коррекции гастроэнтерологических, кардиологических и ангиологических нарушений.

## Фундаментальные аспекты мелатонина

### *Биосинтез и метаболизм мелатонина*

Предшественником мелатонина (N-ацетил-5-метокситриптамин) является аминокислота L-триптофан. В результате последовательного действия четырех ферментов – триптофангидроксилазы, декарбоксилазы ароматических аминокислот, серотонин-N-ацетилтрансферазы и гидроксиндол-O-метилтрансферазы. В ночное время серотонин N-ацетируется при участии фермента серотонин-N-ацетилтрансфераза в непосредственный предшественник мелатонина N-ацетилсеротонин который, в свою очередь, после O-метилирования ферментом гидроксиндол-O-метилтрансферазой превращается в конечный продукт М [1, 2]. Уровень активности ферментов триптофангидроксилазы и серотонин-N-ацетилтрансфераза в эпифизе регулируется интенсивностью иннервации аксонами супрахиазматического ядра (СХЯ), то есть сигналами несущими внутреннюю информацию о фотопериодике, бета- и в меньшей степени альфа-адренорецепторов на поверхности пинеалоцитов, и определяющей количество синтезируемого мелатонина. Однако уровень активности серотонин-N-ацетилтрансферазы в других мелатонин-продуцирующих тканях ограничивается только его непосредственной востребованностью [3, 4, 5]. Уровень N-ацетилсеротонина максимален ночью, несмотря на то, что активность гидроксиндол-O-метилтрансферазы довольно высока и постоянна в течение суток [6].

### *Инактивация мелатонина*

Мелатонин, циркулирующий в крови, метаболизируется, главным образом, в печени в результате двушаговой реакции [4]. Вначале он под-

вергается 6-гидроксилированию, а затем конъюгации с сульфатом или глюкуронидом. 6-гидроксимелатонинсульфат (6-сульфатоксимелатонин) и 6-гидроксимелатонин глюкуронид затем экскретируются с мочой [4]. У человека основным метаболитом мелатонина является 6-сульфатоксимелатонин. Профиль экскреции этого метаболита в плазме крови и моче отражает качественные и количественные аспекты секреции мелатонина, что часто используют как для анализа ритма эндогенного мелатонина, так и для исследования фармакокинетических свойств гормона, введенного, например, в форме таблеток или капсул [4]. Следует отметить, что при инъекции мелатонина или введении его перорально уровень мелатонина в крови быстро растет, а затем почти сразу снижается за счет поглощения его тканями [7].

В мозге небольшое количество мелатонина может превращаться в N-гамма-ацетил-N-формил-5-метоксикинуренамин и затем в N-гамма-ацетил-5-метоксикинуренамин – вещества с мелатониноподобной активностью по отношению к контролю биологических ритмов [4].

Мелатонин, синтезируемый в сетчатке, инактивируется иным способом, отличным от способа утилизации эпифизарного мелатонина [8, 9]. Вначале мелатонин сетчатки подвергается деацетилированию до 5-метокситриптамина, катализируемому арилациламидазой. Затем 5-метокситриптамин метаболизируется так же, как индоламины и катехоламины, до формирования 5-метоксииндолацетиловой кислоты или превращения в 5-метокситриптофол [10]. Поэтому мелатонин, синтезируемый и утилизируемый в сетчатке, не вносит вклад в характеристику уровня мелатонина в циркулирующей крови, определяемого по продуктам экскреции.

### Список литературы

1. Yu H.-S., Reiter R.J. Melatonin. Biosynthesis, physiological effects, and clinical applications. Boca Raton FL: CRC Press. – 1993. – 527 p.
2. Korf H.W., Schomerus C., Stehle J.H. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system // Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. – 1998. – V.146. – P. 1–100.
3. Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr Rev 1991; 12:151– 80.
4. Arendt J. (ed.) Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. London: Chapman & Hall, 1995.
5. Klein D.C., Roseboom P.H., Coon S.L. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme. Trends Endocrinol Metab 1996; 7:106–12.

6. Анисимов В.Н. Эпифиз и продукция мелатонина, 2004// в кн. Мелатонин в норме и патологии, под ред. Комарова Ф.И., Рапопорта С.И., Малиновской Н.К., Анисимова В.Н. М. С. 7–20.
7. Menerndez-Pelaez A., Reiter R.J. (1993) Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. J Pineal Res 15:59–69.
8. Cahill G.M., Besharse J.C. Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 80:1098–102.
9. Grace M.S., Cahill G.M., Besharse J.C. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. Brain Res 1991; 559:56–63.
10. Nowak J.Z., Zawilska J.B. Melatonin and its physiological and therapeutic properties, Pharm World Sci 1998; 20(1): 18–27.

### Рецепторы мелатонина у млекопитающих

У млекопитающих (и человека) действие мелатонина осуществляется посредством активации по меньшей мере двух высокоаффинных рецепторов, связанных с G-белками,  $MT_1$  ( $MeL_{1a}$ ),  $MT_2$  ( $MeL_{1b}$ ) и  $MT_3$  [1–4].

Эти рецепторы имеют разную молекулярную структуру [5], фармакологические характеристики б) и хромосомную локализацию [7]. Рецепторы  $MT_1$  и  $MT_2$  представляют собой белки, состоящие из 350 и 362 аминокислот соответственно, с молекулярной массой 39–40 кДа [8, 9]. Эти рецепторы несут сайт гликозилирования на N-конце, сайты фосфорилирования для протеинкиназы C, кazeинкиназы 1 и 2 и протеинкиназы A, которые могут принимать участие в регуляции функций рецепторов, что продемонстрировано и для других рецепторов, связанных с G-белками [10]. Рецепторы мелатонина  $MT_1$  и  $MT_2$  составляют обособленную группу внутри суперсемейства рецепторов, связанных с G-белками, т.к. имеют NRY-мотив, а не DRY (или ERY), который содержится во внутриклеточной петле II всех рецепторов, связанных с G-белками [5]. Этот участок  $MT_1$ -рецепторов участвует в рецепторном транспорте и клеточном сигналинге [11].

Передача сигнала при помощи рецепторов мелатонина  $MT_1$  и  $MT_2$  осуществляется за счет связывания гетеротримерных  $G_i$ -белков, состоящих из  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -субъединиц [1, 3]. Активация этих рецепторов приводит к диссоциации G-белка на  $\alpha$ -субъединицу и  $\beta\gamma$ -димер, который взаимодействует с различными эффекторными молекулами, участвующими в клеточном сигналинге [12]. Эффекторная система, на которую действует мелатонин через рецепторы  $MT_1$  и  $MT_2$ , включает аденилатциклазу, фосфолипазу C, фосфолипазу A2, калиевые каналы и потенциально гуанилатциклазу и кальциевые каналы [1, 3, 11, 12].

Предполагаемый рецептор мелатонина  $MT_3$  имеет отличный от остальных рецепторов мелатонина фармакологический профиль и связывание его с мелатонином, по-видимому, вызывает стимуляцию фосфоинозитольного цикла [2, 13, 14]. Показано, что рецептор мелатонина  $MT_3$  представляет собой хиноновую редуктазу II [15, 16]. Ткани, в которых найдены и полностью охарактеризованы  $MT_1$  и/или  $MT_2$ -рецепторы, – сетчатка, супрахиазматическое ядро, pars tuberalis, позвоночные и периферические артерии, почки, поджелудочная железа, кора надпочечников, семенники и иммунные клетки, желудочно-кишечный тракт.

### Список литературы

1. Klein D.C., Moore R.Y., Reppert S.M. *Suprachiasmatic Nucleus, The Mind's Clock*. Oxford: Oxford University Press, 1991.
2. Wittenderby P.A., Dubocovich M.L. Characterization and regulation in human ml(1A) melatonin receptor stably expressed in chinese-hamster ovary cells // *Mol. Pharmacol.* – 1996. V.50. – P.166–174.
3. Gillette M.U. McArthur A.J. Circadian actions of melatonin at suprachiasmatic nucleus // *Behav. Brain Res.* – 1995. – V.73. – P.135–139.
4. Reppert S.M., Weaver D.R., Godson C. (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 17 (3): 100–2.
5. Reppert S.M., Weaver D.R., Godson C. (1996) *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 100–102  
Dubocovich M.L., Masana M.I., Iacob S., Sauri D.M. (1997). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355, 365–375.
6. Dubocovich M.L., Masana M.I., Iacob S., Sauri D.M. (1997) *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355, 365–375.
7. Slaugenhaupt S.A., Roca A.L., Liebert C.B., Altherr M.R., Gusella J.F., Reppert S.M. (1995). *Genomics* 27, 355–357.
8. Song Y., Chan C.W., Brown G.M., Pang S.F., Silverman M. (1997) *Faseb J.* 11, 93–100 .
9. Rivera-Bermudez M.A., Masana M.I., Brown G.M., Earnest D.J., Dubocovich M.L. (2004). *Brain Res.* 1002, 21–27.
10. Ferguson S.S. (2001). *Pharmacol. Rev.* 53, 1–24.
11. Nelson C.S., Ikeda M., Gompf H.S. et al. (2001) *Mol. Endocrinol.* 15, 1306–1317.
12. Vanecek J. (1998). *Physiol. Rev.* 78, 687–721.
13. Dubocovich M.L. (1995). *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 50–56.
14. Popova J.S., Dubocovich M.L. (1995) *J. Neurochem.* 64, 130–138.
15. Nosjean O., Ferro M., Coge F. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 31311–31317.
16. Nosjean O., Nicolas J.P., Klupsch F., Delagrangre P., Canet E., Boutin J.A.

### Биоритмологические свойства

Жизнедеятельность организма можно представить как четко скоординированную систему биологических ритмов, начиная с субклеточного и до организменного уровня [1]. Данная система постоянно корректируется изменениями, происходящими как в самом организме, так и в окружающей среде [2]. Именно способность отвечать на различные эндогенные и экзогенные стимулы путем перестройки биоритмов характеризует стабильность и здоровье человеческого организма.

Эпифиз млекопитающих является звеном передачи нейрохимических сигналов [3], но, не обладая светочувствительной функцией, не может стать генератором ритмов, соотносенных с внешними условиями. Все биологические ритмы находятся в строгой иерархической подчиненности основному водителю ритмов, расположенному в супрахиазматических ядрах гипоталамуса переднего гипоталамуса (СХЯ) [2], которые являются генераторами циркадианного ритма или биологическими часами [4]. Ретиногипоталамические волокна, перикарии которых локализованы в ганглионарном слое сетчатки, передают информацию об освещенности в осциллятор (СХЯ) и синхронизируют его активность с естественной 24-часовой фотопериодичностью [5]. Гормоном, доносящим информацию о ритмах, генерируемых в СХЯ, до органов и тканей является мелатонин.

В СХЯ определены и охарактеризованы специальные рецепторы к М, при воздействии на которые М корректирует период эндогенных ритмов, генерируемых СХЯ, относительно ритмов внешней среды [6]. М оказывает влияние на биологические ритмы организма путем связывания с собственными рецепторами, находящимися на органах-мишенях [7]. В опосредовании ритмогенных эффектов М играет не только его уровень в кровотоке, но также и продолжительность его ночной продукции [8]. Роль мелатонина как регулятора биологических ритмов универсальна для всех живых организмов, о чем свидетельствует факт присутствия М и циркадианный ритм его продукции у всех известных животных, начиная от одноклеточных [9], а также у растений [10, 11].

Независимо от того, активно ли животное днем, ночью или не имеет четкого плана активности, максимальный уровень мелатонина наблюдается всегда во время темновой фазы естественного или искусственно созданного цикла чередования дня и ночи [12–15]. Скорость и профиль ночного увеличения продукции мелатонина зависит, среди прочих факторов, от вида и типа ткани. У человека уровень эпифизарного мелатонина плавно растет, начиная со времени наступления сумерек, и дости-

гает максимума в середине ночи, а затем плавно снижается к рассвету до дневного уровня. Максимальный уровень мелатонина в плазме крови часто обнаруживается между 2:00 и 3:00 часами. Вечернее постепенное увеличение концентрации М в крови приводит к возрастанию плотности рецепторов мелатонина  $MT_1$  на поверхности нейронов СХЯ гипоталамуса [16].

Исследования, проведенные на грызунах и человеке, указывают на то, что способность эпифиза вырабатывать мелатонин прогрессивно снижается с возрастом, приводя к значительному уменьшению разницы между ночным и дневным уровнем гормона [14, 17]. Низкий уровень мелатонина у старых животных и пожилых людей (по сравнению с молодыми) позволяет предполагать, что нормализация динамики мелатонин в организме может компенсировать процессы, связанные со старением.

Свет – главный сигнал окружающей среды, регулирующий биосинтез мелатонина, и он воздействует на продукцию гормона двумя способами. Свет (как в видимой части спектра, так и в невидимой области, до УФ-излучения А-типа) подавляет активность N-ацетилтрансферазы и снижает содержание мелатонина и его секрецию до базального уровня в любое время суток [18–20]. Вспышки света регулируют осциллятор, генерирующий ритм продукции мелатонина, в зависимости от фазы либо усиливая, либо ослабляя продукцию. Например, воздействие вспышки света ранней ночью вызывает снижение нарастающего уровня гормона (задержку фазы), тогда как вспышка света, примененная поздней ночью, обуславливая снижение уровня мелатонина, вызывает сдвиг фазы ритма вперед. Воздействие вспышки света днем не влияло на циркадианную ритмику образования мелатонина [21–24].

Данные исследований последних лет свидетельствуют, что для получения эффекта сдвига фаз при воздействии ярким светом необходимым условием является подавление светом продукции М. Но при одновременном воздействии светом и введении мелатонина (1 мг за час до световой экспозиции и 1 мг – через 2 часа после начала экспозиции) эффекта сдвига фаз не наблюдается [25]. И более того, уже при возникновении разбалансировок ритмики после регулярного воздействия яркого света, можно избежать их развития и нивелировать вовсе, принимая определенные дозы мелатонина за час до и во время светового облучения в ночные часы, тем самым сохранив циклику изменения концентрации эндогенного мелатонина в течение суток, поддерживая нормальный тонус в течение дня [26]. Свободно текущие ритмы могут возникать как

в условиях постоянной световой интенсивности (света и темноты) [27], так и в условиях сумеречного освещения, что приводит к нарушению ночного сна у пациентов. Эти факты свидетельствуют о вторичности, по сравнению со светопериодом, социальных датчиков времени и других природных регуляторов циркадианных ритмов, каковыми являются колебания электромагнитного поля Земли, температура и влажность [28; 29].

Участие мелатонина в сезонных перестройках живых организмов до последнего времени тщательно изучалось у животных в связи с их строгой сезонной ритмикой размножения, миграций, смены меха и зимней спячки. С точки зрения клинициста основополагающая роль мелатонина в сезонных перестройках чрезвычайно важна для понимания причин и механизмов сезонных обострений хронически протекающих заболеваний внутренних органов. На настоящем этапе многочисленными исследованиями подтверждено, что главная роль в механизме сезонных перестроек организма человека принадлежит строго следующим за фотопериодом изменениям продукции мелатонина [30]. Наличие сезонной ритмики продукции мелатонина является необходимым условием здоровья человеческого организма. Подтверждением этому являются факты учащения депрессивного состояний и алкоголизма у лиц с нарушенной сезонной ритмикой секреции мелатонина при перемещении из средних широт на работу в условия крайнего Севера [31], а также факт отсутствия сезонной ритмики продукции мелатонина у пациентов со злокачественными новообразованиями [32]. Как было сказано, с помощью применения мелатонина можно избежать разбалансировки его внутреннего уровня секреции из-за несвоевременного воздействия светом, и восстановить сон [26], но употребление мелатонина также необходимо для восстановления эффективности ночного сна и преодоления инсомнии во время отдыха и восстановления сил у людей, работающих в ночное время суток [33].

Как показали последние исследования – весьма важно употребление мелатонина слепым людям, так как их циркадианный ритм значительно больше нормы, ввиду отсутствия аффлекторного звена его регуляции [34]. Употребление 10 мг мелатонина пациентами в одно и то же время перед уходом ко сну, привело к исчезновению инсомнии и повысило результативность сна. Результаты полисомнографии показали, что ритм нормализуется и восстанавливается в границах равных стандартному 24-часовому дню. Похожие исследования влияние мелатонина на восстанов-

ление 24-часового ритма проводились с измерением ритмов кортизола и продуктом метаболизма мелатонина аМТ6s. Результаты работы показали, что после прекращения употребления мелатонина ритмы возвращались к исходным [35]. Расстройства циркадианного характера ритма присуще и зрячим людям, живущим в зоне полярного дня, или подвергаемым ненормальному световому облучению в течение ночного времени. Сезонные расстройства такого типа seasonal affective disorder (SAD) близки по характеру к нарушениям у слепых людей и также могут быть вылечены благодаря применению мелатонина в определенные часы [36]. Употребление мелатонина в зимнее время, может быть хорошим лекарством против депрессии, которая также может являться результатом SAD, ввиду недостатка солнечного света [37].

Таким образом, М представляет собой гормон, обладающий уникальными адаптивными возможностями. Нарушение его продукции, как количественно, так и его ритма является пусковым моментом, приводящим на начальных этапах к десинхронозу, за которым следует возникновение органической патологии. Следовательно, сам факт нарушения продукции мелатонина может являться причиной возникновения различных заболеваний. С биоритмологической позиции сезонные обострения хронически протекающих заболеваний внутренних органов представляет собой клиническую реализацию дезадаптации организма в условиях, требующих повышенной активности адаптивной системы организма при изменении условий окружающей среды.

### **Список литературы**

1. Arendt J., Skene D.J., Melatonin as a chronobiotic, *Sleep Med Rev.* 2005 Feb; 9(1):25–39.
2. Touitou Y., Haus E. Alterations with aging of the endocrine and neuroendocrine circadian system in humans. *Chronobiol Int.* 2000 May; 17(3):369–90.
3. Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 1974; 184: 1341–8.
4. Moore R.Y. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 1996; 73:125–30.
5. Klein D.C., Moore R.Y., Reppert S.M. (eds.) *Suprachiasmatic Nucleus, The Mind's Clock.* Oxford: Oxford University Press, 1991.
6. Wittenderby P.A., Dubocovich M.L. Characterization and regulation in human ml(1A) melatonin receptor stably expressed in chinese-hamster ovary cells // *Mol. Pharmacol.* – 1996. V.50. – P.166–174.
7. Gillette M.U. McArthur A.J. Circadian actions of melatonin at suprachiasmatic nucleus // *Behav. Brain Res.* – 1995. – V.73. – P.135–139.

8. Reiter R.J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar // *Experientia.* – 1993. – V.49. – N.8. – P.654–644.
9. Poeggeler B., Balzer I., Harderland R., Lerchl A. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften* 1991; 78:268–9.
10. Balzer I., Hardeland R. Melatonin in algae and higher plants – possible new roles as a phytohormone and antioxidant // *Botanica Acta.* 1996. V.109. – P.180–183.
11. Caniato R., Filippini R., Piovan A., Puricelli L., Borsarini A., Cappelletti E.M. Melatonin in plants. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 527:593–7.
12. Binkley S. (ed.) *The Pineal: Endocrine and Nonendocrine Function.* Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988.
13. Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12:151– 80.
14. Arendt J. (ed.) *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland.* London: Chapman & Hall, 1995.
15. Zawilska J.B., Nowak J.Z. Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem Int* 1992; 20:23–36.
16. Pishak V.P., Bulyk R.Ie. (2008) Circadian changes of the density of melatonin receptors 1A in the neurons of the suprachiasmatic nuclei of the rat hypothalamus under conditions of diverse functional activity of the pineal gland *Fiziol Zh.* 2008; 54(4):11.
17. Reiter R.J. Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp* 1994; 54(Suppl.):31–9.
18. Reiter R.J. The mammalian pineal gland as an end organ of the visual system. In: Wetterberg L., ed. *Light and Biological Rhythms in Man.* Oxford: Pergamon Press 1993; 145.
19. Zawilska J.B., Jarmak A., Woldan-Tambor A., Nowak J.Z. Lightinduced suppression of nocturnal serotonin N-acetyltransferase activity in chick pineal gland and retina: a wavelength comparison. *J Pineal Res* 1995; 19:87–92.
20. Zawilska J.B. Melatonin as a chemical indicator of environmental light-dark cycle. *Acta Neurobiol Exp* 1996; 56:757– 67.
21. Robertson L.M., Takahashi J.S. Circadian clock in cell culture: I. Oscillation of melatonin release from dissociated chick pineal cells. *J Neurosci* 1988; 8:22–30.
22. Cahill G.M., Besharse J.C. Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythm by light and D2 dopamine receptors. *J Neurosci* 1991; 11:2959–71.
23. Zawilska J.B. Clonidine in vivo mimics the acute suppressive but not the phase-shifting effects of light on the circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in chick pineal gland. *J Pineal Res* 1994; 17:63–8.
24. Zawilska J.B. Stimulation of D4-like dopamine receptor suppresses serotonin N-acetyltransferase activity but does not phase-shift the circadian oscillator in chick retina. *Neurosci Lett* 1994; 179:107–10.

25. Zaidan R., Geoffriau M., Burn J. et al, Melatonin is able to influence its secretion in humans: description of a phase-response-curve // Neuroendocrinology. –1994. – V.60. – P.105–112.
26. Richardson G.S. (2005) The human circadian system in normal and disordered sleep. J Clin Psychiatry. 2005; 66 Suppl 9:3–9; quiz 42–3.
27. Kennaway D.J., Van Dorp C.F. Free-running rhythm of melatonin, cortisol, electrolytes, and sleep in humans in Antarctica // Am.J.Physiol. – 1991. – V.260. – P.R1137–R1144.
28. Bartsch H., Bartsch C., Mecke D., Lippert T.H. Seasonality of pineal melatonin production in the rat: possible synchronization by the geomagnetic field // Chronobiol. Int. – 1994. –V.11. – P.21–26.
29. Bergiannaki J., Paparrigopoulos T.J. Stefanis C.N. Seasonal pattern melatonin excretion in humans: relationship to daylength variation and geomagnetic field fluctuations // Experientia. 1996. V52. P.253–258.
30. Wehr T.A. A “clock for all seasons” in the human brain // Prog. Brain. Res. – 1996. –V.111 – P.321–342.
31. Levine M.E., Milliron A.N., Duffy L.K. Diurnal and seasonal rhythm of melatonin, cortisol and testosterone in interior Alaska // Arctic. Med. Res. – 1994. – V.53. – P.25–34.
32. Bartsch H., Bartsch C., Mecke D., Lippert T.H. The relationship between the pineal gland and cancer: seasonal aspects. In: L Wetterberg (eds). Light and biological rhythm in man. Pergamon Press. – 1993. – V.52 – P.253–258.
33. Sadeghniai-Haghighi K., Aminian O., Pouryaghoub G., Yazdi Z. (2008) Efficacy and hypnotic effects of melatonin in shift-work nurses: double-blind, placebo-controlled crossover trial. J Circadian Rhythms. 2008 Oct 29; 6(1):10. pubmed/18957133 .
34. Robert L., Sack M.D., Richard W., Brandes B.S., Adam R., Kendall B.S., Alfred J., Lewy M.D. (2000) Entrainment of Free-Running Circadian Rhythms by Melatonin in Blind People, V. 343:1070–1077, Oct. 12, 2000, N15.
35. Hack L.M., Lockley S.W., Arendt J., Skene D.J. (2003) The Effects of Low-Dose 0,5-mg Melatonin on the Free-Running Circadian Rhythms of Blind Subjects. J Biol Rhythms 18: 420–429.
36. Lewy A.J. (2007) Melatonin and Human Chronobiology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 72: 623–636.
37. Lewy A.J., Lefler B.J., Emens J.S., Bauer V.K. (2006) The circadian basis of winter depression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 7414–7419.

### **Мелатонин как антиоксидант**

Такие свойства мелатонина, как способность активно поглощать свободные радикалы и проявлять антиоксидантные свойства, были обнаружены только в последнее десятилетие [1–3].

### **Мелатонин и свободные радикалы**

В последние 10–12 лет появилось много работ, касающихся способности мелатонина, непосредственно нейтрализовать свободные радикалы и родственные токсические вещества, и их вредное воздействие на клетки и ткани организма.

### **Мелатонин и супероксид-анион ( $O_2^{\bullet-}$ )**

Эффективность мелатонина при нейтрализации  $O_2^{\bullet-}$  охарактеризована недостаточно. Было показано, что мелатонин минимально реагирует с  $O_2^{\bullet-}$  [4, 5], хотя работа, в которой для идентификации 5,5-диметилпирролин-N-оксид - аддукта  $O_2^{\bullet-}$  – был использован электронный спиновый резонанс, было показано, что мелатонин умеренно реагирует с  $O_2^{\bullet-}$  [6].

### **Мелатонин и пероксид водорода ( $H_2O_2$ )**

Было показано, что мелатонин способен устранять  $H_2O_2$  по меньшей мере тремя различными способами: он стимулирует активность двух метаболизирующих  $H_2O_2$ -фермента, глутаматпероксидазы и каталазы [7–9], и непосредственно реагирует с  $H_2O_2$  для удаления его из клетки [10]. Недавно появились доказательства того, что мелатонин способен самостоятельно взаимодействовать с  $H_2O_2$ , понижая его уровень в простой химической системе [11, 12]. Продукт взаимодействия мелатонина и  $H_2O_2$  – АФМК (N(1)-ацетил-N(2)-формил-5метоксикинумарин) [13]. Кроме того, было показано, что АФМК сам способен отдавать два электрона и играть, таким образом, роль поглотителя свободных радикалов [3]. Таким образом, не только мелатонин, но и, по меньшей мере, один из его метаболитов может эффективно поглощать свободные радикалы.

### **Мелатонин и $\bullet OH$**

Было показано, что каждая молекула мелатонина способна поглощать два  $\bullet OH$ -радикала и генерировать в качестве продукта циклический 3-гидроксимелатонин [14]. Авторы работы также показали, что циклический 3-гидроксимелатонин – молекула, которая появляется в моче и является показателем поглощающего действия мелатонина. Многие исследователи также подтвердили способность мелатонина нейтрализовать  $\bullet OH$  [15, 16].

Поглощающая способность мелатонина *in vitro* также была подтверждена [17], на примере различных искусственных системах *in vitro* [18, 19] Снижение образования аддукта при помощи мелатонина зависит от концентрации гормона. При помощи измерения индольной флуоресцен-

ции было показано, что мелатонин быстро окисляется  $\cdot\text{OH}$ , образованными при реакции Фентона, но не самим железом. Также есть данные, что мелатонин окисляется только в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  и при поглощении радикалов действует синергично с другими антиоксидантами, такими как витамины С и Е. В соответствие с этим, весьма вероятно, что *in vivo* особенно в присутствии других поглотителей свободных радикалов, мелатонин может играть роль физиологически значимого антиоксиданта. Li с соавт. (1997) [20] показали, что экзогенный мелатонин *in vivo* способен поглощать  $\cdot\text{OH}$ -радикалы.

Важность того, что мелатонин способен поглощать  $\cdot\text{OH}$ -радикалы, связана с тем, что эти радикалы являются самыми опасными из всех активных частиц эндогенного происхождения. Образовавшись,  $\cdot\text{OH}$ -радикал реагирует с любой молекулой, находящейся в непосредственной близости. Тем не менее, его высокая реакционная способность играет и положительную роль –  $\cdot\text{OH}$ -радикал не может мигрировать от места своего образования больше, чем на несколько диаметров молекул. Таким образом, для предотвращения повреждений, связанных с появлением  $\cdot\text{OH}$ -радикалов, любой поглотитель должен находиться в месте, где эти радикалы образуются. Амфифильность мелатонина позволяет ему поглощать  $\cdot\text{OH}$  и в липидных, и в водных клеточных компартментах [3].

Вторичные и третичные метаболиты мелатонина, которые образуются *in vitro* и *in vivo* (например, 6-ОНМ, N-ацетил-5-метоксикинурамин и АФМК [21], как полагают, формируются при взаимодействии мелатонина со свободными радикалами и также считаются эффективными поглотителями свободных радикалов [21, 22–25]. Метаболиты мелатонина, как и сам гормон, способны нейтрализовать активные формы кислорода [86]. Данный эффект мелатонина и его метаболитов называется антиоксидантным каскадом, который позволяет мелатонину и его метаболитам поглощать дополнительные радикалы сверх того, что может нейтрализовать только мелатонин [12, 22]. Этот метаболический каскад позволяет мелатонину поглощать ряд радикалов в отличие от классических антиоксидантов, для которых соотношение количества поглотителя к количеству нейтрализованных радикалов обычно 1:1.

#### Мелатонин и синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ )

Косвенные доказательства, указывающие на то, что мелатонин способен нейтрализовать  $^1\text{O}_2$ , впервые были получены Cagnoli с соавт. (1995)

[26]. Roegeller с соавт. (1996) [27] показали, что мелатонин нейтрализует  $^1\text{O}_2$  одновременно с образованием АФМК. Гасящая способность мелатонина также была подтверждена Zang с соавт. (1998) [10] и Roberts с соавт. (2000) [28].

Известно, что мелатонин предотвращает апоптоз нейронов и ингибирование активности креатинкиназы. Так как в фармакологических концентрациях мелатонин подавляет фотодинамическое повреждение нейронов, авторы сделали вывод, что мелатонин непосредственно нейтрализует  $^1\text{O}_2$ . Формирование АФМК при окислении мелатонина  $^1\text{O}_2$  подтвердили Almeida с соавт. (2003) (цит. по [29]). В свете этих исследований можно предположить, что АФМК – продукт, общий для нескольких типов взаимодействий мелатонина с активными формами кислорода. В одном из последних исследований Maharaj с соавт. [30] показали, что под действием лазерного излучения мелатонин способен вырабатывать свободные радикалы. В этом же исследовании было продемонстрировано способность мелатонина поглощать  $^1\text{O}_2$ , образованные нафталеном. Авторы сделали вывод, что в биологических условиях мелатонин является поглотителем синглетного кислорода и/или других свободных радикалов, генерируемых из нафталена под действием лазерного излучения. Это может быть использовано при фотодинамической терапии опухолей, что является новым направлением в терапевтическом применении мелатонина.

#### Мелатонин и пероксил-радикал ( $\text{LOO}\cdot$ )

Один из наиболее интенсивно изучаемых процессов в биологии свободных радикалов – перекисное окисление липидов, во время которого образуется радикал  $\text{LOO}\cdot$ . Этот радикал окисляет соседние молекулы липидов в цепной реакции перекисного окисления. Тем не менее, нельзя считать доказанным то, что мелатонин является антиоксидантом, прерывающим реакционную цепь. Было показано, что *in vivo* мелатонин довольно эффективно уменьшает перекисное окисление липидов [31, 32], наравне с витамином Е [33, 34]. Способность мелатонина снижать перекисное окисление липидов *in vivo*, возможно, связана не с прерыванием цепных реакций переноса свободных радикалов в липидах, а со способностью поглощать эти радикалы [35] и с возможностью действовать внутри билипидного слоя [35, 36]. Несмотря на то, что мелатонин, видимо, не способен поглощать  $\text{LOO}\cdot$ , он может нейтрализовать трихлорметилпероксил-радикал [5, 37].

### Мелатонин и оксид азота/пероксиднитрит-анионы (ONOO<sup>-</sup>)

При проверке способности мелатонина поглощать ONOO<sup>-</sup> выяснилось, что он поглощает и радикалы и продукты их реакции [10, 38, 39]. Более того, во многих случаях, когда ONOO<sup>-</sup> образуются *in vivo*, экзогенно введенный мелатонин сокращает молекулярные и физиологические повреждения, сопровождающие появление ONOO<sup>-</sup> [40]. Cuzzocrea с соавт. (1997) [41] показали, что мелатонин *in vivo* снижает воспалительную реакцию, вызванную карагинаном, во время которой, как считается, воспаление вызывают радикалы и NO<sup>•</sup>, и ONOO<sup>-</sup> [42]. Во всестороннем исследовании Cuzzocrea с соавт. (1997) [41], продемонстрировали, наличие у мелатонина противовоспалительной способности и сделали теоретическое заключение о том, что она связана со способностью индолы ингибировать активность NOS и поглощать ONOO<sup>-</sup> и \*ОН-радикалы. Эта работа была продолжена той же рабочей группой [43], и было показано, что мелатонин является потенциальным ингибитором острой воспалительной реакции у крыс, которым вводили провоспалительную молекулу небактериального происхождения, зимозан; эта молекула, кроме значительной воспалительной реакции, вызывала также множественные повреждения органов [44]. Здесь Cuzzocrea с соавт. (1998) [43] также предполагают, что в основе защитных эффектов мелатонина лежит его способность уменьшать образование NO<sup>•</sup> и поглощать ONOO<sup>-</sup> и связанные с ним радикалы.

Кроме того, было показано, что мелатонин нейтрализует NO<sup>•</sup> [37, 39, 45]. Хотя и мало активный сам по себе, NO<sup>•</sup> быстро реагирует с O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, в результате формируя ONOO<sup>-</sup> [46], которые уже могут вызывать значительные повреждения молекул [47]. Таким образом, при поглощении NO<sup>•</sup> мелатонин косвенно ограничивает окислительный стресс. Помимо непосредственного поглощения NO<sup>•</sup>, мелатонин уменьшает его образование в некоторых условиях, подавляя активность фермента, лимитирующего скорость его образования, – NO-синтазу [48, 49].

Для позвоночных животных показана значительная разница между физиологическим уровнем мелатонина в организме и концентрациями, требовавшимися в большинстве экспериментов по определению защитных свойств мелатонина. Важно и то, что другие антиоксиданты присутствуют в клетке и жидкостях организма в намного больших концентрациях. Так как же мелатонин может играть роль антиоксиданта в клетке, если его количество там меньше, чем веществ, действующих сходным образом?

Следует учитывать, что сама постановка экспериментов по определению защитных свойств мелатонина требовала концентрации гормона, больше, чем физиологические [50]. Когда в эксперименте создают условия окислительного стресса (введением веществ, вызывающих окислительный стресс или облучением УФ- или рентгеновскими лучами), противострессорный фактор должен быть интенсивнее физиологических защитных механизмов, поэтому мелатонин (или любой другой антиоксидант) в физиологических дозах будет не эффективен. Тем не менее, используемые концентрации могут различаться на несколько порядков, поэтому необходимо четко различать результаты, полученные при различных дозировках. Использование мелатонина в миллимолярных концентрациях уместно только в химических экспериментах, поставленных, чтобы определить продукты взаимодействия с окислителями и прояснить механизмы окислительных реакций. В биологических же экспериментах такие концентрации являются намного превышающими физиологические и не могут применяться для воздействия на организм.

Тем не менее, существенное число доказательств, основанных на результатах, полученных при применении наномолярных концентраций мелатонина, свидетельствует о его участии в антиоксидантной защите в физиологических условиях. Однако, как будет показано ниже, это происходит не только за счет опосредованной рецепторами активации антиоксидантных и ингибирования прооксидантных ферментов. Более того, защитный эффект, продемонстрированный на наномолярном уровне, не уменьшает важность описанной ранее способности непосредственного поглощения только из-за того, что, возможно, в физиологических концентрациях мелатонин так не действует. Такая точка зрения, во-первых, игнорирует тот факт, что в радикальных реакциях образуются новые продукты, некоторые из которых, как показано, также обладают защитными свойствами. Во-вторых, мелатонин может являться промежуточным звеном в цепи передачи электронов через образование мелатонил-радикала. Предполагают, что это является основой для квазикаталитического процесса, для которого требуются очень малые количества мелатонина, концепция, которая обсуждается на основе снижения образования свободных радикалов при взаимодействии с компонентами дыхательной цепи митохондрий [51]. Оба эти аспекта обладают значительным потенциалом для объяснения защитных свойств мелатонина в физиологических концентрациях. Они требуют дальнейшего обсуждения [52].

### Продукты мелатонина как антиоксиданты. АФМК как поглотитель свободных радикалов

Недавно в качестве поглотителя свободных радикалов значительное внимание стал привлекать АФМК. Циклическая вольтметрия показала, что АФМК способен отдавать два электрона. Более того, кинуренамин уменьшает повреждения ДНК и липидов свободными радикалами и уменьшает гибель нейронов, если они подвергаются воздействию глутамата,  $H_2O_2$  или амилоида 50–61 (каждое из этих веществ образует свободные радикалы [13]). Таким образом, не только сам мелатонин, но и его продукты, то есть, 3-гидроксимелатонин и АФМК, могут также поглощать токсические вещества. В недавнем исследовании Tan с соавт. (2007) [53] подчеркнули тот факт, что мелатонин, действующий через АФМК-путь, является весьма эффективным и поглощает до 10 активных форм кислорода/азота на молекулу мелатонина. Во время окислительного стресса уровень мелатонина снижается за счет его превращения при реакциях со свободными радикалами. Так как при окислительном стрессе количество образованного АФМК повышается, этот продукт и [53]. Такой каскад реакций поглощения может быть одной из причин неожиданно высокой эффективности мелатонина при уменьшении повреждений, вызванных свободными радикалами, *in vivo*. Было также проведено исследование участия АФМК и АМК (N-ацетил-N<sup>2</sup>-формил-5-метоксикинурамина) в ингибировании активности нейрональной NO-синтазы *in vitro* и в стриатуме крыс *in vivo*, в результате которого было показано, что АМК, но не АФМК способен ингибировать NO-синтазу и *in vitro*, и *in vivo*. Исследования показали, что АМК является на 25% более эффективным ингибитором, чем мелатонин [53].

### Гидроксимелатонин (6-ОНМ) как поглотитель свободных радикалов

Выявлено, что конечный метаболит мелатонина в печени, 6-ОНМ, также эффективно поглощает свободные радикалы [22]. Таким образом, даже если сам мелатонин при нейтрализации токсических веществ или радикалов превращается в 6-ОНМ, 6-ОНМ также способен к поглощению свободных радикалов [54]. Кроме того, 6-ОНМ образуется, когда мелатонин реагирует с пероксинитритом при отсутствии бикарбоната [10]. Показано, что в некоторых физиологических эффектах 6-ОНМ сходен с мелатонином [55]. Утверждают, что эти продукты деградации при ингибировании перекисного окисления липидов могут быть даже более эф-

фективными [56, 57]. В работе Pierrefiche с соавт. (1993) [56] было показано, что при ингибировании перекисного окисления липидов 6-ОНМ в 30 раз более эффективен, чем мелатонин. Более того, Nara с соавт. (1997) [57] и Lui с соавт. (2002) [58] подтвердили эти результаты и показали, что по своим антиоксидантным свойствам 6-ОНМ так же эффективен, как мелатонин. Кроме того, Nara с соавт. (2001) [59] продемонстрировали, что обработка 6-ОНМ предотвращает увеличение в ткани сетчатки дисульфида окисленного глутатиона, вызванное цисплатином. Maharaj с соавт. (2003) [26] сообщают, что 6-ОНМ способен уменьшать вызванный цианидом окислительный стресс, а в другом исследовании показали, что 6-ОНМ может связывать железо (III) и превращать его в железо (II) – более удобную для использования в биологических системах форму железа [23]. Более того, авторы показали, что 6-ОНМ уменьшает вызванное железом (II) перекисное окисление липидов и, таким образом, останавливает реакцию Фентона. Yoshida с соавт. (2003) [60] выяснили, что 6-ОНМ эффективно поглощает супероксид-анионы, что недавно подтвердили Maharaj с соавт. (2005) [25], продемонстрировавшими способность 6-ОНМ поглощать  $^1O_2$ .

Тем не менее, Matuszak с соавт. (1997) [15] сообщили, что этот гидроксильрованный индол, в отличие от негидроксильрованного мелатонина, функционирует и как стимулятор \*ОН, и как его поглотитель. Прооксидантная способность 6-ОНМ в дальнейшем была подтверждена Sakano с соавторами [61], которые показали, что 6-ОНМ индуцирует сайт-специфические повреждения ДНК в присутствии меди (II). Авторы сделали вывод, что мелатонин может быть карциногенным агентом за счет окислительного повреждения ДНК своим продуктом. Как ясно из этих многочисленных исследований, существует множество противоречий относительно того, является ли 6-ОНМ более или таким же эффективным антиоксидантом, как мелатонин, или он обладает прооксидантными свойствами.

### Список литературы

1. Tan D.X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C., Reiter R.J. (1993a) Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1:57–60.
2. Hardeland R., Balzer I., Poeggeler B., Fuhrberg B., Uria H., Behrmann G., Wolf R., Meyer T.J., Reiter R.J. (1995) On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in unicell, photoxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res* 18:104–111.

3. Reiter R.J., Tan D.X., Sainz R.M., Mayo J.M., Lopez-Burillo S. (2002) Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 75:1299–1321.
4. Chan T.Y., Tang P.L. (1996) Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. *J Pineal Res* 20:187–191.
5. Marshall K.A., Reiter R.J., Poeggeler B., Aruoma O.I., Halliwell B. (1996) Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Rad Biol Med* 21:307–315.
6. Lewy A.J. (2007) Melatonin and Human Chronobiology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72: 623–636.
7. Pablos M.I., Agapito M.T., Gutierrez R., Recio J.M., Reiter R.J., Barlow-Walden L.R., Acun a-Castroviejo D., Menerndez-Pelarez A. (1995) Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J Pineal Res* 19:111–115.
8. Montilla P., Tunez I., Mun oz M.C., Lopez A., Loria J.V. (1997) Hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin: effect of melatonin administration. *Nephron* 76:345–350.
9. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000b) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *J Biomed Sci* 7:444–458.
10. Zang LY, Cosma G, Cardner H, Vallyathan V (1998) Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1425:469–477.
11. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, Qi W, (2000a) Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Rad Biol Med* 29:1177–1185.
12. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo VR (2000b) Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* 9:137–159.
13. Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YX, Hardeland R, Reiter RJ (2001) N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *Faseb J*. 15:2294–2296.
14. Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer B.F., Hardies L.J., Weintraub S., Vijayalaxmi, Shepherd A.M.M. (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Comm* 253:614–62015. Matuszak K., Reszka K.J., Chignell C.F. (1997) Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigation. *Free Rad Biol Med* 23:367–372.
16. Poeggeler B., Thuermann S., Dore A., Schoenke M., Burkhardt S., Hardeland R. (2002) Melatonin's unique scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogues. *J Pineal Res* 33:20–30.
17. Pahkla R., Zilmer M., Kullisaar T., Rago L. (1998) Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vivo. *J Pineal Res* 24:96–101.

18. Barreto J.C., Smith G.S., Strobel N.H.P., McQuillin P.A., Miller T.A. (1994) Terephthalic acid: a dosimeter for the detection of hydroxyl radicals in vitro. *Life Sci* 56:89–96.
19. Poeggeler B., Reiter R.J., Hardeland R., Tan D.X., Barlow-Walden L.R. (1996) Melatonin and structurally related endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. *Redox Rep* 2:179–184.
20. Li X.J., Zhang L.M., Gu J., Zhang A.Z., Sun F.Y. (1997) Melatonin Decreases Production of Hydroxyl Radical during Cerebral Ischemia-reperfusion. *Acta Pharmac Sinica* 18:394–396.
21. Horstman J.A., Wrona M.Z., Dryhurst G. (2002) Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorg Chem* 30:371–382.
22. Maharaj D.S., Anoopkumar-Dukie S., Glass B.D., Antunes E.M., Lack B., Walker R.B., Daya S. (2002) Identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. *J Pineal Res* 32:257–261.
23. Maharaj D.S., Limson J.L., Daya S. (2003a) 6-Hydroxymelatonin converts Iron (III) to Iron (II). *Life Sci* 72:1367–75.
24. Maharaj D.S., Walker R.B., Glass B.D., Daya S. (2003b) 6-Hydroxymelatonin protects against KCN-induced free radical attack in rat brain homogenates. *J Chem Neuroanat* 26:103–107.
25. Maharaj D.S., Maharaj H., Antunes E.M., Maree D.M., Nyokong T., Glass B.D., Daya S. (2005b) 6-Hydroxymelatonin protects against quinolinic acid induced oxidative neurotoxicity and quenches singlet oxygen. *J Pharm Pharmacol* 57:877–882.
26. Cagnoli C.M., Atabay C., Kharlamova E., Manev H. (1995) Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 18:222–226.
27. Poeggeler B., Reiter R.J., Hardeland R., Tan D.X., Barlow-Walden L.R. (1996) Melatonin and structurally related endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. *Redox Rep* 2:179–184.
28. Roberts J.E., Hu D.N., Martinez L., Chignell C.F. (2000) Photophysical studies on melatonin and its receptor agonists. *J Pineal Res* 29:94–99.
29. Maharaj D.S., Glass B.D., Santy D. Melatonin: New Places in Therapy, *Biosci Rep* (2007) 27:299–320.
30. Maharaj D.S., Molell H., Antunes E.M., Maharaj H., Maree D.M., Nyokong T., Glass B.D., Daya S. (2005a) Melatonin generates singlet oxygen on laser irradiation but acts as a quencher when irradiated by lamp photolysis. *J Pineal Res* 38:153–156.
31. Reiter R.J. (1998a) Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 56:359–384.
32. Reiter R.J., Tan D.X., Qi W. (1998b) Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Acta Pharmacol Sinica* 19:575–581.
33. Pieri C., Moroni M., Marcheselli F., Marra M., Recchioni R. (1995) Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch Gerontol Geriatr* 20:159–165.

34. Reiter R.J., Tan D.X., Acun a-Castroviejo D., Burkhardt S., Karbownik M. (2000) Melatonin: mechanisms and actions as an antioxidant. *Curr Topics Biophys* 24:171–183.
35. Garcia J.J., Reiter R.J., Ortiz G.G., Oh C.S., Tang L., Yu B.P., Escames G. (1998) Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J Membr Biol* 162:59–65.
36. Tesoriere L., D'Arpa D., Conti S., Giaccone V., Pintaudi A.M., Livrea M.A. (1999) Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: new insights into the radical-scavenging activity. *J Pineal Res* 27:95–105.
37. Mahal H.S., Sharma H.S., Mukherjee T. (1999) Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study. *Free Rad Biol Med* 26:557–565.
38. Gilad E., Cuzzocrea S., Zingarelli B., Salzman A.L., Szabo C. (1997) Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 60:169–174.
39. Blanchard B., Pompon D., Ducroq C. (2000) Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J Pineal Res* 29:184–192.
40. Cuzzocrea S., Reiter R.J. (2001) Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *J Pharmacol* 426:1–10.
41. Cuzzocrea S., Zingarelli B., Gilad E., Hake P., Salzman A.L., Szabo C. (1997) Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 23:106–116.
42. Beckman J.S., Koppenol W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:427–437.
43. Cuzzocrea S., Costantino G., Caputi A.P. (1998) Protective effect of melatonin on cellular energy depletion mediated by peroxynitrite and poly (ADP-ribose) synthetase activation in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. *J Pineal Res* 25:78–85.
44. Mainous M.R., Ertel W., Chaudry I.H., Deitch E.A. (1995) The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 4:193–199.
45. Noda Y., Mori A., Liburty R., Packer L. (1999) Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *J Pineal Res* 27:159–163.
46. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620–1624.
47. Phelps D.T., Ferro T.J., Higgins P.J., Sankar R., Parker D.M., Johnson M. (1995) TNF-alpha induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. *Am J Physiol* 269:551–559.
48. Pozo D., Reiter R.J., Calvo J.R., Guerrero J.M. (1997) Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 65:430–442.
49. Crespo E., Macias M., Pozo D., Escames G., Martin M., Vives F., Guerrero J.M., Acun a-Castroviejo D (1999) Melatonin inhibits expression of the inducible NO

- synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Faseb J* 13:1537–1546.
50. Hardeland R. (1997) In: *Skin cancer and UV radiation*. Altmeyer P., Hoffmann K., Stucker M. (eds.). Springer: Berlin, Heidelberg, P. 186–198.
51. Hardeland R., Coto-Montes A., Poeggeler B. (2003) *Chronobiol. Int.* 20, 921–962.
52. Hardeland R. *Antioxidative Protection by Melatonin*. 2005, *Endocrine*, vol. 27, no. 2, 119–130.
53. Xu, M. and Ashraf, M. (2002). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 75–79.
54. Tan D.-X., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L.F., Reiter R.J. (2007) One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42:28–42.
55. Reiter R.J., Tan D.X. (2003) Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/ reperfused heart. *Cardiovasc Res* 58:10–9.
56. Vaughan M.K., Vaughan G.M., Reiter R.J. (1976) Inhibition of human chorionic gonadotrophin-induced hypertrophy of the ovaries and uterus in immature mice by some pineal indoles, 6-hydroxymelatonin and arginine vasotocin. *J Endocrinol* 68:397–400.
57. Pierrefiche G., Topal G., Courbin I., Henriot I., Laborit H. (1993) Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 80:211–223.
58. Lui X., Chen Z., Chua C.C., Ma Y.-S., Youngberg G.A., Hamdy R., Chua B.H.L. (2002) Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H254–H263.
59. Hara M., Yoshida M., Nishijima H., Yokosuka M., Iigo M., Ohtani-Kaneko R., Shimada A., Hasegawa T., Akama Y., Hirata K. (2001) Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 30:129–138.
60. Yoshida M., Fukuda A., Hara M., Terada A., Kitanaka Y., Owada S. (2003) Melatonin prevents the increase in hydroxyl radical-spin trap adduct formation caused by the addition of cisplatin in vitro. *Life Sci* 72:1773–1780.
61. Sakano K., Oikawa S., Hiraku Y., Kawanishi S. (2004) Oxidative DNA damage induced by a melatonin metabolite, 6-hydroxymelatonin, via a unique non-o-quinone type of redox cycle. *Biochem Pharmacol* 68:869–878.

### **Иммунотулирующие свойства мелатонина**

Мелатонин способен оказывать двойственное влияние на функцию иммунной системы [1]. Этот гормон может и угнетать, и стимулировать иммунную систему. Повторное введение низких доз гормона животным резко ослабляет нарушение продукции антител, снижение массы тимуса и противовирусной резистентности, которые среди прочего сопутствуют длительному истощающему стрессу. Эпифизэктомия, напротив, усиливает иммунологический дефект стрессорного происхождения. С дру-

гой стороны, в условиях исходной гиперактивности иммунной системы мелатонин дозозависимо тормозит образование ряда цитокинов в ответ на введение фитогемагглютина, снижает функцию активированных макрофагов и Т-хелперов. Следовательно, речь идет о наличии у гормона иммуномодулирующей активности, что совпадает с представлениями об адаптогенной роли эпифиза в целом.

В основе мелатониновой иммуномодуляции, по-видимому, лежат несколько моментов, среди которых – прямое воздействие через специфические рецепторы  $MT_1$ ,  $MN_2$  и  $MT_3$  и на функцию клеток лимфоидных органов и клеточных элементов крови [2], а также опосредованное влияние через мобилизацию опиоидных механизмов и модификацию выработки кортикостероидов корой надпочечников. Представленные факты позволяют с новых позиций подойти к оценке клинических возможностей мелатонина, – теперь еще и в роли природного иммуномодулятора. Этими надежно обоснованными свойствами правомерно воспользоваться как для комплексной терапии иммунодефицитных состояний, так и для коррекции повышенной иммунной реактивности.

На данный момент известны следующие факторы взаимодействия мелатонина и иммунной системы.

Присутствие рецепторов к мелатонину определено на мембранах человеческих лимфоцитов [3] и нейтрофилов [4], а также лейкоцитах и нейтрофилах и иммунокомпетентных клетках тимуса и селезенки различных лабораторных и диких животных [5, 6] и Th-лимфоцитах костного мозга крыс [7].

В экспериментах на животных продемонстрировано угнетение продукции антител лимфоцитами, как у пинеалэктомированных животных, так и при введении препаратов, блокирующих синтез мелатонина [8, 9].

Пинеалэктомия и подавление ночной продукции мелатонина у подопытных животных угнетает пролиферацию в костном мозге клеток – предшественников гранулоцитов и макрофагов [10]. Пинеалэктомия в неонатальном развитии [11, 12] приводит к значительно сниженным гематологическим параметрам, включая количество эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, и приводит к увеличенному инфицированию мозга *Staphylococcus aureus*. У эпифизэктомированных особей наблюдается уменьшение массы селезенки, тимуса, в некоторых случаях исчезновение лимфоцитов и красной пульпы селезенки [13–16]; редуцируется Т-зависимая и В-зависимая области паракортекса тимуса [17]. Эпифизэктомия

у новорожденных крысят приводит к дезорганизации тимуса [18], и, как было сказано, усиливает процессы развития иммунологических дефектов стрессорного характера [1]. Продолжительное действие пинеалэктомии у крыс приводит к остановке продукции пептидов тимуса тимозина  $\alpha 1$  и тимулина [19] и увеличению  $\alpha 2$ -адренергической катехол-индуцированной иммуносупрессии лимфоцитов периферической крови (PBL) [20]. Эффекты, вызванные пинеалэктомией, полностью устраняются введением экзогенного мелатонина в вечернее время суток [21].

Т-хелперы имеют рецепторы к мелатонину на клеточной мембране и, возможно, ядерные рецепторы мелатонина. *In vitro* и при экзогенном введении животным мелатонина стимулирует продукцию лимфоцитами и иммунокомпетентными клетками селезенки интерлейкинов и гамма-интерферона, который, в свою очередь, увеличивает синтез мелатонина клетками эпифиза [22]. Активизация иммунных клеток мелатонином обусловлена его стимулирующим действием на продукцию внутриклеточной цАМФ [6]. Активирует НК клетки [23, 24]. Также было показано, что мелатонин приводит к увеличению выбросов лимфокинов [25–27].

Введение мелатонина животным стимулирует пролиферацию клеток-предшественников лейкопоэза в костном мозге [28], за счет активации Th-лимфоцитов костного мозга и секрецией последними еще не идентифицированных опиоидных пептидов (близких по строению интерлейкину-4 и динорфину).

*In vitro* продемонстрирован стимулирующий эффект мелатонина на секрецию интерлейкина-1 человеческими моноцитами [235]. Мелатонин также увеличивает производство интерлейкина-6 моноцитами человека [29].

В исследованиях *in vitro* показано, что мелатонин активирует человеческие лимфоциты посредством стимуляции продукции цАМФ лимфоцитами. Демонстрировано также, что этот процесс значительно активизируется в присутствии вазоактивного интестинального полипептида [4]. Авторы подчеркивают стимулирующий эффект мелатонина и вазоактивного интестинального полипептида на продукцию цАМФ для физиологических дозировок обоих гормонов. Предполагается, что эффект мелатонина и цАМФ обусловлен его ингибирующим влиянием на внутриклеточную фосфодиэстеразу.

Гамма-интерферон стимулирует синтез и секрецию мелатонина макрофагами и моноцитами периферической крови человека [30], что представляет несомненный интерес.

Таким образом, мелатонин принимает участие в регуляции функций иммунной системы организма человека. Об этом свидетельствует как присутствие рецепторов к мелатонину у периферических иммунокомпетентных клеток человека и потенцирование им выработки цитокинов, так и иммуностимулирующий эффект мелатонина в экспериментах на животных при моделировании состояний, физиологические ответы на которые идентичны в организме человека и животных. Это эндотоксический шок, вызываемый введением летальных доз липосахаридов мембран бактериальных клеток [28], и подавление иммунитета различными агентами – стресс, кортикостероиды [17], вирусы [31], противоопухолевые химиотерапевтические препараты [32]. Кроме того, механизмы, посредством которых мелатонин стимулирует синтез опиоидных пептидов иммунокомпетентными клетками животных и человека, идентичны [6]. В пользу тесной взаимосвязи мелатонина и иммунной системы говорит факт стимуляции гамма-интерфероном продукции мелатонина эпифизом [22], свидетельствующий о существовании регуляции секреции гормона со стороны иммунной системы. Еще одним свидетельством взаимосвязи иммунной системы и мелатонина в организме человека являются циркадианные ритмы изменения количества нейтрофилов, Т- и В-лимфоцитов в кровотоке с максимум в темное время суток [33]. Митотический индекс клеток костного мозга человека *in vitro* также максимален в ночное время суток [34].

Таким образом, мелатонин оказывает стимулирующее влияние на гемопоз и потенцирует выработку иммунокомпетентными клетками цитокинов, принимая участие как в клеточном, так и в гуморальном звене иммунитета.

Суммируя вышеизложенные сведения можно заключить, что спектр эффектов мелатонина в организме чрезвычайно широк. В отличие от многих гормонов, его действие на клеточные структуры зависит как от концентрации в кровотоке или околкеклеточном пространстве, так и от исходного состояния клетки, на которую осуществляется воздействие. Эти факты позволяют считать мелатонин универсальным эндогенным адаптером, поддерживающим баланс организма на определенном уровне и корригирующим изменения в гомеостазе в соответствии с изменениями окружающей среды и локальными воздействиями.

### Список литературы

1. Arushanyan E.B., Beier E.V. Immunological properties pineal melatonin // *Experimental and clinical pharmacologia* . – 2002. – Т.65. – №5. – С.73–80.

2. Marc J. Barjavel, Zahra Mamdouh, Nadjibe Raghbate, Ouahid Bakouche (1998) Differential Expression of the Melatonin Receptor in Human Monocytes // *The Journal of Immunology*, 1998, 160: 1191–1197.
3. Calvo J.R., Raffi-El-Indrissi M., Pozo D., Guerrero J.M. Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells // *J. Pineal Res.* – 1995. – V.18. – P.119–126.
4. Lopez-Gonzalez M.A., Martin-Cacao A., Calvo J.R., Reiter R.J., Osuna C., Guerrero J.M. Specific binding of 2-[125I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J Neuroimmunol.* 1993 Jun; 45(1–2):121–6.
5. Martin-Cacao A., Lopez-Gonzalez M.A., Reiter R.J., Calvo J.R., Guerrero J.M., Binding of 2-[125I]melatonin by rat thymus membranes during postnatal development, *Immunol Lett.* 1993 Apr; 36(1):59–63.
6. Raffi-El-Idrissi M., Pozo D., Calvo J.R. et al., Specific binding of 2-(125I)iodmelatonin by rat splenocytes: characterization and its role of regulation of cyclic AMP production // *J. Neuroimmunol.* – 1995. – V.57. – P.171 – 178.
7. Maestroni G.J. (1995) T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J. Pineal Res.* 18:84.
8. Maestroni G.J., Pierpaoli W., Zinkernagel R.M., Immunoreactivity of long lived H-2 incompatible irradiation chimeras (H-2d leads to H-2b), *Immunology.* 1982 Jun; 46(2):253–60.
9. del Gobbo V., Libri V., Villani N., Calir R., Nistic G., Pinelectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice, *Int J Immunopharmacol.* 1989; 11(5):567–73.
10. Kuci S., Becker J., Veit G. Circadian variation of immunomodulatory role of the pineal gland // *Neuroendocrinol. Lett.* – 1983. – V.10. – P.65 – 79.
11. Beskonakli E., Palaoglu S., Aksaray S., Alanoglu G., Turhan T., Taskin Y. (2001) *Neurosurg. Rev.* 24, 26–30.
12. Beskonakli E., Palaoglu S., Renda N., Kulacoglu S., Turhan T., Taskin Y. (2000) *J. Clin. Neurosci.* 7, 320–324.
13. Vaughan M.K., Reiter, R.J. (1971) *Tex. Rep. Biol. Med.* 29, 579–586.
14. McKinney T. D., Vaughan M. K., Reiter R.J. (1975) *Physiol. Behav.* 15, 213–216.
15. Cunnane S.C., Horrobin D.F., Manku M.S., Oka M. (1979) *Endocr. Res. Commun.* 6, 311–319.
16. Brainard G.C., Watson-Whitmeyer M., Knobler R.L., Lublin F.D. (1988) *Ann. NY Acad. Sci.* 540, 704–706.
17. Maestroni G.J., Conti A., Pierpaoli W. (1986) *J. Neuroimmunol.* 13, 19–30.
18. Csaba G., Barath P. (1975) *Endocrinol. Exp.* 9, 59–67.
19. Molinero P., Soutto M., Benot S., Hmadcha A., Guerrero J.M. (2000) *J. Neuroimmunol.* 103, 180–188.
20. Liebmann P.M., Hofer D., Felsner P., Wolfler A., Schauenstein K. (1996) *J. Neuroimmunol.* 67, 137–142.

21. Maestroni G.J.M. The immunoendocrine role of melatonin // *J. Pineal Res.* – 1993. – V.14. – P.1–10.
22. Withyachumnamkul B., Nonaka K.O., Santana C. et al. Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal gland in organ culture // *J. Interferon Rev.* – 1990. – V.10. – P. 403 – 411.
23. Del Gobbo V., Folli A., Balzarini J., De Clercq E., Balestra E., Villani N., Marini S., Perno C.F., Calio R. Immunomodulatory activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA), a potent anti-HIV nucleotide analogue, on in vivo murine models, *Antiviral Res.* 1991 Jul; 16(1):65–75.
24. Guerrero J.M., Reiter R.J. 1992. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr. Res.* 18:91. [Medline] del Gobbo, V., V. Libri, N. Villani, R. Calio, G. Nistico. 1989. Pinelectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 11:567.
25. Maestroni G.J.M. T helper 2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin // *J. Pineal Res.* – 1995. – V.18. – P.84–89.
26. Lissoni P., S. Barni, G. Tancini, F. Brivio, E. Tisi, B. Zubelewicz, R. Braczkowski. 1994. Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implication in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *J. Biol. Regul. Homeostatic Agents* 8:126.
27. Waldhauser F., B. Ehrhart E. Forster. 1993 Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia* 49:671.
28. Maestroni G.J.M. Melatonin as therapeutic agent in experimental endotoxic shock // *J. Pineal Res.* – 1996. – V.20. – P.84–89.
29. Morrey M.K., McLachlan J.A., Serkin C.D., Bakouche O., Activation of human monocytes by the pineal neurohormone melatonin // *J. Immunol.* – 1994. – V.153. – P.2671–2680.
30. Finocchiaro L.E., Nahmod E., Launay J.M. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes // *Biochen. J.* 1991. – V.280. – P.727–732.
31. Ben-Nathan D., Maestroni G.J.M., Lustig S., Conti A. Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses // *Arch. Virol.* – 1995. – V.140. – P.223–230.
32. Maestroni G.J.M., Conti A., Lissoni P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin-4 // *Cancer Res.* – 1994. – V.54. – P.4740–4743.
33. Caradente F., Devecchi A., Dammacco F., Halberg F., Halberg F., Multifrequency rhythms of immunological function // *Chronobiologia.* – 1988. – V.15. – P.7–23.
34. Mauer A.M. Diurnal variation of proliferation activity in the human bone marrow // *Blood.* – 1965. – V.26. – P.1–7.

### **Определение оптимальной дозы мелатонина**

С целью определения оптимальных доз мелатонина для синхронизации клеточных ритмов и для оценки влияния мелатонина на организацию кинетики синтеза белка при старении были поставлены опыты на молодых (возраст 3–4 месяца) и старых (возраст 2–2,5 года) крысах. Всего поставлено 11 опытов, каждый продолжительностью 2–3 недели. Мелатонин (мелаксен) вводили внутривентриально. С помощью коллагеназы изолировали клетки печени и ставили первичные культуры гепатоцитов на стеклах, покрытых коллагеном. Через сутки или 2 суток исследовали включение лейцина, меченного тритием, и пул свободного меченого лейцина для каждой культуры отдельно. В течение 2 или 3 часов с 10 минутными интервалами брали пробы по 3 культуры каждая. Каждый опыт ставили на клетках одной и той же крысы. В предварительных опытах было показано, что для полного действия мелатонина на печень требуется, чтобы между введением мелатонина крысе и изоляцией клеток было не менее 1,5 часов. Также предварительно было показано, что физиологический раствор, введенный внутривентриально крысе, не влиял на кинетику синтеза белка, что послужило контролем к исследованиям эффектов мелатонина. Ранее в наших работах и в литературе действие биологически активных факторов на клеточные культуры изучали при введении их в культуральную среду. Инъекция мелатонина крысе с последующим изучением культур – оригинальный прием, приближающий результаты работы к интересам клиники.

Показано, что мелатонин, введенный молодой крысе, эффективно синхронизирует околочасовой ритм синтеза белка в чрезвычайно низких дозах (0,012–0,014 мкг/кг); у крыс, которым не вводили мелатонин, ритма не было. Следовательно, введенный крысе мелатонин накапливается в печени и синхронизирует гепатоциты до их изоляции. Добавление в среду суточных культур 5 нМ мелатонина не увеличило средний уровень синтеза белка.

Мелатонин, введенный старым крысам (дозы 0,013–0,017 мкг/кг веса) также синхронизировал ритм синтеза белка и, кроме того, повышал средний уровень синтеза. Известно, что в старости снижается интенсивность синтеза белка в печени. Таким образом, впервые показано, что мелатонин может нормализовать синтез белка в печени при старении. Тот же вывод мы сделали и при изучении кинетики синтеза белка. Ранее мы показали, что в культурах гепатоцитов старых крыс синхронизация рит-

ма синтеза белка резко снижена сравнительно с молодыми - в среднем вдвое. Мелатонин повышал синхронизацию клеток: ритм синтеза белка у старых крыс не отличался от молодых.

Далее провели исследования продолжительности действия мелатонина на клетки печени. Исследовали кинетику синтеза белка через 1 и 2 сут. после инъекции мелатонина. На 2 сут. средний уровень синтеза белка был не ниже, чем через 1 сут после введения мелатонина крысе. Таким образом, после однократного введения мелатонина крысе его синхронизирующий эффект сохраняется по меньшей мере сутки. Все это время сохраняется и высокий уровень синтеза белка.

Околочасовой ритм в клеточной культуре, в наших опытах, ритм синтеза белка – маркер прямых межклеточных взаимодействий. Синхронизация ритма – важный процесс функционирования многих органов млекопитающих, показатель нормальных прямых межклеточных взаимодействий; нарушение таких взаимодействий приводит к включению механизмов клеточной гибели. Синтез сывороточных белков и ферментов детоксикации характеризует важнейшие функции печени, что характеризует значимость исследований кинетики синтеза белка. В наших опытах для синхронизации ритма синтеза белка в гепатоцитах использовали внутрибрюшинное введение 0,01–0,02 мкг мелатонина (мелаксена) на кг. веса крысы. В клинике различных болезней используют капсулы мелаксена в суточной дозе 3 мг, т.е. примерно 0,03–0,05 мг на кг веса человека, даже если принимать одну капсулу в сутки. Представляется целесообразной рекомендация снижения доз мелатонина, используемых в клинике, особенно, для целей профилактики или как снотворного.

Мелатонин, как известно, является агонистом (стимулятором) внутриклеточного кальция. Обнаруженная нами сигнальная (в организации ритма синтеза белка) функция мелатонина открывает возможность анализа механизмов действия различных лекарств-агонистов кальция. Каков цитологический и биохимический эффект мелатонина и других лекарств агонистов кальция - важная перспектива дальнейших исследований.

### Заключение

Мелатонин, введенный внутрибрюшинно крысе, синхронизирует околочасовой ритм синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов, полученных через 1 час 40 минут после инъекции мелатонина и изученных через сутки или через 2 сут. Эффективные синхронизирующие концент-

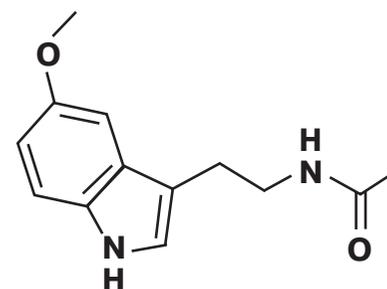
рации мелатонина – 0,01-0,02 мкг/кг веса крысы – на три порядка ниже, доз мелатонина, используемых в клинике.

### Методы определения мелатонина

Мелатонин – эволюционно консервативная молекула, и его формула остается неизменной в течение филогенеза. Она обнаружена у простейших [1], у беспозвоночных [2] и у позвоночных, включая человека [3–5], также он найден и у растений [6]. Основным источником мелатонина, циркулирующего в крови, является эпифиз. Но паракринный синтез обнаружен практически во всех органах и тканях: тимусе, желудочно-кишечном тракте, половых железах, соединительной ткани [4, 7, 8]. Столь высокий уровень представленности мелатонина в живом мире подчеркивает необходимость мелатонина для жизнедеятельности организмов. А также требует поиск оптимальных путей детекции и количественного измерения мелатонина в растворах, смесях (препаратах физиологических жидкостях).

### Мелатонин

Мелатонин (N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]) – основной гормон шишковидного тела мозга (эпифиза). Время биологического полураспада мелатонина равно 45 минутам. Это означает, что для исследовательских целей образцы крови должны быть собраны через короткие промежутки времени для того, чтобы определить период в продукции мелатонина. Кроме того, нарушение сна пациента в течение ночи с целью сбора образцов может повлиять на уровень мелатонина в крови. Этих проблем можно избежать, если определять его концентрации по количеству метаболитов: мелатонин сульфата (6-сульфатокимелатонина) и 6-гидроксиглюкуронида, 80–90% которых секретируется в мочу в виде мелатонин сульфата. Концентрация исследуемых образцов достоверно коррелирует с общим уровнем мелатонина в крови в течение периода сбора образцов.



### Биосинтез мелатонина

Мелатонин синтезируется из аминокислоты L-триптофана при помощи последовательного действия четырех ферментов – триптофангидрок-

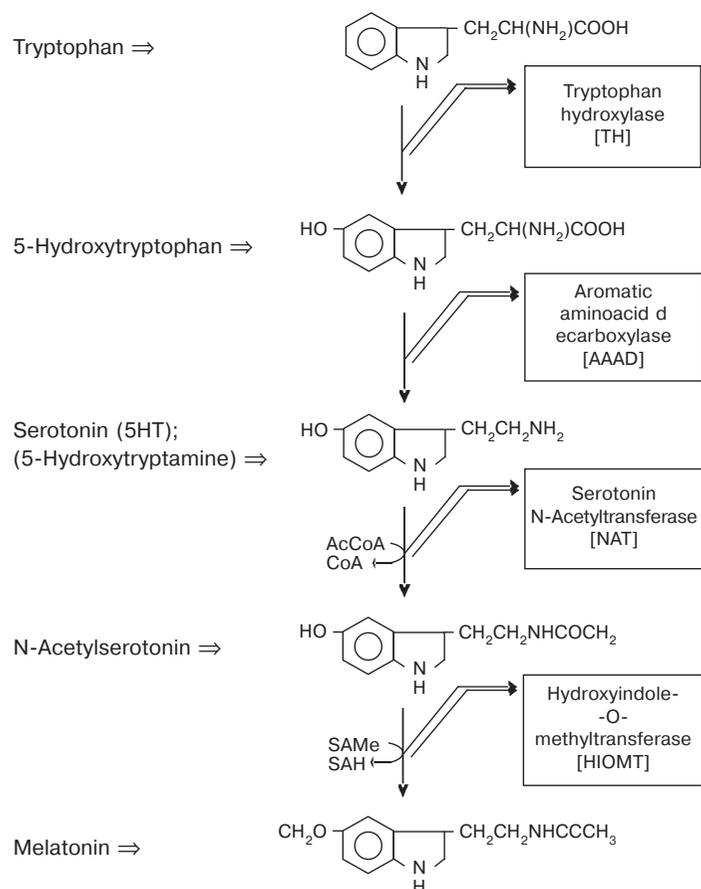


Рис. 1. Схема биосинтеза мелатонина (по 12)

силазы, декарбоксилазы ароматических аминокислот, серотонин-N-ацетилтрансферазы и гидроксииндол-0-метилтрансферазы (рис. 1). Два из них (триптофангидроксилаза и серотонин-N-ацетилтрансфераза) пошагово превращают L-триптофан в N-ацетил-5-метокситриптамин и играют ключевую роль в регуляции, так как определяют количество образованного 5-гидрокситриптамина (серотонина) и, позднее, мелатонина.

Триптофангидроксилаза превращает L-триптофан в 5-гидрокситриптофан. Триптофангидроксилаза в небольших количествах присутствует в различных частях центральной нервной системы, но особенно высокая

концентрация фермента определяется в эпифизе позвоночных [9–11]. В эпифизе и сетчатке – тканях, синтезирующих мелатонин, – активность триптофангидроксилазы имеет суточную ритмику с несколькими ночными пиками и регулируется при помощи циркадианных часов [10, 11, 13]. Вспышка света в ночное время [13, 14], действие антагониста  $\beta$ -адренергических рецепторов пропранололом у крыс [15] или  $\alpha$ 2-адренергических рецепторов клонидина у кур [11] ингибируют ночной пик активности триптофангидроксилазы в эпифизе.

Серотонин-N-ацетилтрансфераза, в отличие от триптофангидроксилазы, присутствующей во всех тканях, способных синтезировать серотонин, присутствие серотонин-N-ацетилтрансферазы ограничивается только мелатонин-продуцирующими тканями [4, 5, 16]. Регуляция активности серотонин-N-ацетилтрансферазы и продукции мелатонина осуществляется отростками постганглионарных симпатических нейронов, иннервирующих эпифиз [3–5, 17]. У крыс регуляция суточного ритма активности серотонин-N-ацетилтрансферазы в эпифизе, а также поступление информации о времени суток происходит за счет изменений концентрации норадреналина, поступающего в периваскулярное пространство. Многие субстраты в метаболическом пути синтеза мелатонина проявляют отчетливый циркадианный ритм (Yu et al., 1993; Arendt, 1995, цит. по [18]). Интенсивность ацетилирования определяет количество мелатонина, продуцируемого каждую ночь [18]. Так, уровень серотонина, поднимающийся днем, существенно снижается в течение темной фазы суток, что определяется увеличением превращения серотонина в N-ацетилсеротонин. Уровень N-ацетилсеротонина также максимален ночью, и, несмотря на то, что активность гидроксииндол-0-метилтрансферазы довольно высока и постоянна в течение суток, содержание мелатонина в эпифизе также максимально ночью [18].

На современном уровне развития техники стало доступным использование немалого количества методов и подходов, ранее бывших узкоспециализированных на решение своих конкретных задач, для определения уровня содержания мелатонина в жидких растворах и в сухих смесях. Химическая формула мелатонина – это 5-теокситриптамин. Определение мелатонина может проведено как при измерении непосредственно его концентрации в крови или других жидкостях (например, в слюне или моче) и его структурных аналогов, метаболитов, или при определении активности соответствующих ферментов, участвующих в синтезе мелатонина.

## Методы определения мелатонина

Методы	Описание
Биоопределение	<i>Rana pipiens</i> , <i>Rana esculenta</i> , <i>Rana temporaria</i> , <i>Xenopus laevis</i> , <i>Nannostomus beckfordi</i> <i>anomalous</i> ,
Флуориметрия	Не специфическая (длительные процедуры выделения и сепарации), концентрация (интенсивность) (>10 pg)
Газ хроматография, ВЭЖХ	Высоко эффективная жидкостная хроматография, капиллярная хроматография
RIA	Радиоиммунологическое определение, чувствительность 10–14 моль/л
ЯМР	Определение с помощью ядерного магнитного резонанса (NMR)
Спектрометрия	Спектрометрия в область инфракрасного диапазона, комбинационное рассеяние, когерентное антистоксово рассеяние света, чувствительность 10 <sup>-8</sup> –10 <sup>-6</sup> моль/л
АСМ	Определение с помощью атомного силового микроскопа
Масс спектрометрия	Высокая специфичность и чувствительность (<0,01 pg)

Мелатонин может быть определен различными методами, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Все они представлены на таблице 1.

## Метод биоопределения [19]

Количественное биоопределение мелатонина основан на функции гормона (благодаря которой он и получил свое название) вызывать агрегацию меланосом (пигментных гранул, содержащих черный пигмент меланин) в пигментных клетках –меланофорах покровов амфибий в перикариальное положение, в результате чего животное светлеет. Этот процесс легко наблюдать непосредственно или при использовании оптических средств с небольшими увеличениями. Вне организма выделенные с окружающими тканями меланофоры в физиологическом растворе длительное время (до 4–6 часов, а в случае обогащенной и сменяемой среды еще дольше) сохраняют четкую адекватную реакцию на присутствие в среде инкубации экзогенных гормонов регуляторов. На этом свойстве дермальных меланофоров личинок бесхвостых амфибий основано использование их для биологического тестирования физиологически активных веществ, обладающих меланинагрегирующей активностью [20]. После адаптации личинок к свету на темном фоне (в этих условиях пигмент в меланофорах максимально диспергирован по клетке) выделяли участок кожи с подлежащими тканями и помещали эти эксплантаты (по 3 от разных личинок) в обогащенную среду для холоднокров-

ных, куда добавляли тестируемый раствор. Контрольные группы инкубируют в среде без добавления тестируемых растворов. Через 30–45 мин. оценивали степень дисперсии пигмента в дермальных меланофорах куточка по шкале меланофорных индексов ( $m_i$ ), предложенной Хогбеном и Слоумом (Hogben, Slome, 1931), согласно которой максимальная степень дисперсии пигмента оценивается индексом  $m_i=5$ , минимальная (меланофор выглядит как черная точка)  $m_i=1$ . Тестируя последовательные разведения испытуемого раствора, определяют наибольшее разведение, при котором средний  $m_i$  для 50–100 меланофоров инкубируемых эксплантатов не превышает 1,5–2 (в следующем разведении, как и в контроле, степень дисперсии пигмента в меланофорах эксплантатов должна превышать  $m_i$  4.). Это разведение соответствует действию синтетического мелатонина на меланофоры эксплантата в концентрации  $1 \times 10^{-7}$  г/л. Рассчитывают концентрацию агрегирующего гормона в тестируемом препарате. Точность определения будет определяться шагом при разведении тестируемого раствора.

Протокол <sup>1</sup>H ядерного магнитного резонанса

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) – резонансное поглощение электромагнитной энергии веществом, содержащим ядра с ненулевым спином во внешнем магнитном поле, обусловленное переориентацией магнитных моментов ядер. Одни и те же ядра атомов в различных окружениях в молекуле показывают различные сигналы ЯМР. Отличие такого сигнала ЯМР от сигнала стандартного вещества позволяет определить так называемый химический сдвиг, который обусловлен химическим строением изучаемого вещества. В методиках ЯМР есть много возможностей определять химическое строение веществ, конформации молекул, эффекты взаимного влияния, внутримолекулярные превращения. В основе явления ядерного магнитного резонанса лежат магнитные свойства атомных ядер, состоящих из нуклонов с полуцелым спином 1/2, 3/2, 5/2 (только с нечетным спином).

Для качественного анализа с помощью ЯМР используют анализ спектров, основанный на таких замечательных свойствах данного метода:

- сигналы ядер атомов, входящих в определенные функциональные группы, лежат в строго определенных участках спектра;
- интегральная площадь, ограниченная пиком, строго пропорциональна количеству резонирующих атомов;
- ядра, лежащие через 1–4 связи, способны давать мультиплетные сигналы в результате т. н. расщепления друг на друге.

Положение сигнала в спектрах ЯМР характеризуют химическим сдвигом их относительно эталонного сигнала. В качестве последнего в ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  применяют тетраметилсилан  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ , однако также можно использовать и  $\text{CDCl}_3$ . Единицей химического сдвига является миллионная доля частоты прибора. Если принять сигнал ТМС (тетраметилсилана) за 0, а смещение сигнала в слабое поле считать положительным химическим сдвигом, то мы получим так называемую шкалу  $\delta$ . Если резонанс тетраметилсилана приравнять 10 миллионных долей и обратить знаки на противоположные, то результирующая шкала будет шкалой  $\phi$ , практически не используемой в настоящее время. Если спектр вещества слишком сложен для интерпретирования, можно воспользоваться квантовохимическими методами расчета констант экранирования и на их основании соотнести сигналы.

Мелатонин является относительно малой биологической молекулой даже в сравнении с остальными НМС. Он является производной всего одной аминокислоты. Однако именно это свойство и дает ему колоссальные преимущества быть использованным для измерения методом ядерного магнитного резонанса. Так как ЯМР работает со спектрами или магнитными частотами атомных ядер, то анализируя структуру мелатонина,

Таблица 2

Связь	Химические сдвиги/ррт	Константа взаимодействия	Пик
3H, 2-CH <sub>3</sub>	1,87	–	синглетный
3H, Acetone	2,32	–	синглетный
2H and b-CH <sub>2</sub>	2,87	6,5Hz,	триплетный
2H and l-CH <sub>3</sub>	3,48	6,5Hz	квартетный
3H, OCH <sub>3</sub>	3,84	–	синглетный
N, NH	5,7	–	общий и синглетный
1H and 6-H	6,78	2 and 8,5 Hz	квартетный
1H and 4H	7,00	2 Hz	дуплетный
1H and 7H	7,17	8,5 Hz	дуплетный
H, NH	8,3	–	общий и синглетный

#### Ларморовы частоты разных атомных ядер

Ядро	Ларморова частота в МГц при 0,5 Тесла	Ларморова частота в МГц при 1 Тесла
$^1\text{H}$ (Водород)	21,29	42,58
$^2\text{D}$ (Дейтерий)	3,27	6,53
$^{13}\text{C}$ (Углерод)	5,36	10,71

логично использовать для измерения следующие связи, которые показаны на таблице 2.

В таблице 2 показаны химические сдвиги и сопряжения констант мелатонина с использованием  $\text{CDCl}_3$  как стандарта.

Таким образом, очевидно что использования метода ЯМР дает возможность количественно определять мелатонин и его близкие аналоги в биологических жидкостях и смесях. Однако данный метод является весьма трудоемким.

#### ELISA TEST (или метод иммуноферментного анализа)

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) – это диагностический *in vitro* тест, основанный на методе иммуноферментного анализа (ИФА) – лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов и антител.

#### Принцип действия

В основе иммуноферментного анализа лежит иммунная реакция антигена с антителом. Среди различных модификаций ИФА наибольшее распространение получил метод двойного связывания, обычно используемый в серодиагностике инфекций. В методе двойного связывания первая реакция происходит между определяемым иммуноглобулином и очищенным антигеном возбудителя, фиксированным к поверхности лунок иммунологического планшета. После завершения первой реакции планшет отмывается. При этом несвязавшиеся компоненты исследуемой пробы удаляются, а на стенках лунок остается комплекс антиген-антитело. Для выявления образовавшихся иммунных комплексов проводят вторую иммунологическую реакцию, в которой в качестве антигена выступает связавшийся специфический иммуноглобулин, а в качестве антител к нему – конъюгат, представляющий собой иммуноглобулин (например, кроличий) к соответствующему иммуноглобулину человека, меченный ферментом (обычно пероксидазой). После завершения второй иммунологической реакции следует отмывка лунок планшета от избытка конъюгата и далее – третий этап – ферментативная реакция, катализируемая ферментной частью молекулы конъюгата. Субстратом данной реакции служит бесцветное вещество – хромоген (орто-фенилендиамин, ОФД или тетраметилбензидин, ТМБ), который в ходе реакции образует окрашенное вещество. Интенсивность окраски в лунке определенным образом зависит от количества содержащихся в пробе Ig. После остановки ферментативной реакции проводят фотометрирование лунок. Да-

лее с учетом значений оптической плотности контрольных проб проводят математическую обработку результатов анализа. В общем случае, чем выше оптическая плотность в данной лунке, тем большее количество специфических антител содержится в соответствующей пробе и, следовательно, выше титр анализируемой сыворотки. При отсутствии в сыворотке исследуемых антител лунки остаются неокрашенными.

В зависимости от того, какие антигены используются, все иммуноферментные тест-системы для выявления антител подразделяются на:

- лизатные – в которых используется смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);
- рекомбинантные – в которых используются полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определенных белковых антигенов возбудителя;
- пептидные – использующие химически синтезированные фрагменты белков.

Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо из всего антигенного многообразия возбудителя выбирать антигены только высоко иммуногенные (антител в организме человека должно вырабатываться в достаточном количестве) и высокоспецифичные (то есть, характерными лишь для данного возбудителя и не дающими перекрестных реакций с антителами другой природы). Кроме того, большое значение имеет качество очистки рекомбинантных белков. В идеальном случае возможно получение рекомбинантной тест-системы практически со 100%-ной специфичностью при высокой чувствительности. На практике этого не всегда удаётся достичь, однако специфичность лучших рекомбинантных тест-систем приближается к 100%.

Таким образом, за счёт несомненных преимуществ иммуноферментного анализа: удобства в работе, быстроты, объективности за счет автоматизации учёта результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза) он в настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

#### **Радиоиммунный метод (RIA) определения концентрации мелатонина**

Этот метод очень широко используется в лабораторной диагностике. С помощью РИА в биологических жидкостях определяют концентрации

гормонов, факторов роста, ферментов, аутоантител, маркеров злокачественных новообразований и других веществ (например, лекарственных средств и наркотиков).

#### **I. Принцип**

В основе РИА лежит феномен конкуренции: связывание антител с антигеном, меченным радиоактивным изотопом, подавляется в присутствии немеченного антигена. Методика РИА проста и включает следующие основные этапы:

- А. К раствору антител добавляют меченный антиген и пробу (содержащую неизвестное количество немеченного антигена). Концентрацию антител в реакционной смеси подбирают так, чтобы число мест связывания было намного меньше общего числа антигенов. Концентрация меченного антигена должна превышать максимальную возможную концентрацию антигена в пробе.
- Б. Реакционную смесь инкубируют при определенной температуре. Меченный и немеченный антигены конкурентно связываются с антителами, при этом образуются иммунные комплексы, содержащие либо меченный, либо немеченный антиген. Таким образом, к концу инкубации в реакционной смеси присутствуют меченные и немеченные иммунные комплексы, а также свободные меченные и немеченные антигены. Количество меченных иммунных комплексов обратно пропорционально количеству немеченного антигена в пробе.
- В. Чтобы оценить количество меченных иммунных комплексов, их надо отделить от свободного меченного антигена. Наиболее распространены два способа разделения:
  1. К реакционной смеси добавляют вещество, повышающее ее плотность, например полиэтиленгликоль.
  2. К реакционной смеси добавляют вещество с большой молекулярной массой, которое специфически связывается с антителами в составе иммунных комплексов. Для этого используют вторые антитела либо стафилококковый белок А.
- В обоих случаях иммунные комплексы, имеющие большую молекулярную массу, чем свободные антигены, осаждают центрифугированием и измеряют радиоактивность осадка.
- Г. Определяют концентрацию антигена в пробе по калибровочной кривой. Для ее построения используют несколько стандартных калибровочных растворов с известными концентрациями немеченного антигена.

Разработано множество вариантов РИА. Методика, описанная выше, называется жидкофазным РИА (все реагенты находятся в растворенном состоянии). Существует и твердофазный РИА, в котором антитела иммобилизируются на водонерастворимом носителе, например на полистироле. Особая разновидность метода – иммунорадиометрический анализ, в котором используются меченные антитела, а не меченный антиген.

Принцип РИА распространяется и на другие иммунохимические и неиммунохимические методы анализа. Например, в ИФА вместо радиоактивного изотопа в качестве метки используют ферменты, а в иммунофлуориметрическом анализе – флуоресцирующие вещества. В неиммунохимических методах роль антител выполняют реагенты, специфически связывающие определяемое вещество. Этими реагентами могут быть рецепторы гормонов или связывающие белки плазмы. Так, в радиорецепторном анализе тиреостимулирующих и тиреоблокирующих аутоантител используются очищенные рецепторы ТТГ, а для измерения уровня свободного Т4 иногда применяется тироксинсвязывающий глобулин.

**II. Оценка результатов.** В отличие от биологических методов анализа, РИА является количественным иммунохимическим методом и дает возможность точно измерить содержание вещества (антигена) в пробе. Результат РИА зависит только от соотношения компонентов реакции антиген–антитело.

Для каждой системы РИА подбирают оптимальный pH. Состав реакционной смеси также влияет на реакцию антиген–антитело. Энергия взаимодействия антигена с антителом уменьшается при высокой концентрации солей в пробе или в реакционной смеси.

У животных разных видов первичные структуры одного и того же пептидного гормона могут быть идентичными, но чаще различаются по одной или нескольким аминокислотам. Аминокислотные замены возникают в результате мутаций и, как правило, локализируются в участках молекулы гормона, не играющих первостепенной роли в его биологической активности. Различия в первичной структуре определяют иммунореактивность гормона.

Лекарственные средства и наркотики. Вещества, структурно сходные с препаратом, и его метаболиты могут связываться или не связываться с антителами. Если измеряют содержание токсичного препарата, то необходимо знать, выявляет ли данная методика только активную форму препарата. Напротив, если требуется доказать употребление наркотика, то различия в иммунореактивности между самим наркотиком и его мета-

болитами можно не учитывать. Таким образом, требования к специфичности РИА зависят от цели анализа.

### III. Чувствительность и специфичность РИА.

А. Чувствительность РИА очень высока. Некоторые методики выявляют очень низкие концентрации веществ, такие, как 10–14 моль/л. Чувствительность особенно важна при измерении базальных концентраций пептидных гормонов (эти концентрации обычно находятся в пределах от 10–13 до 10–10 моль/л), а также при определении гормонов непептидной природы, наркотиков и лекарственных средств, ферментов, бактериальных и вирусных антигенов.

Б. Специфичность РИА определяется специфичностью антител и может быть чрезвычайно высокой. Получены антитела и разработаны методики РИА, позволяющие дифференцировать антигены с малейшими структурными различиями, в том числе:

**IV. Особенности применения РИА в клинике.** В основе определения многих сотен эндогенных и экзогенных веществ лежит общий принцип, но требования к чувствительности метода и диагностическое значение результатов различаются.

А. Концентрации некоторых пептидных гормонов у одного человека меняются в очень широких пределах: под влиянием стимуляторов или ингибиторов секреции и в зависимости от времени суток уровень гормона может изменяться на 1–2 порядка. В таких случаях результаты РИА сами по себе не имеют первостепенного значения для диагноза. Пример: базальная концентрация гастринина в плазме у здоровых людей обычно < 50 пг/мл. У больных со сниженной кислотностью желудочного содержимого, с гастриномами (синдром Золлингера–Эллисона) или с нарушением регуляции продукции гастринина в привратнике (неопухолеватая гипергастринемическая гиперхлоргидрия) базальный уровень гастринина значительно повышен и находится в пределах от 100 до 5000 пг/мл. Чтобы установить причину гипергастринемии, необходимо исследовать желудочную секрецию и провести дифференциальную диагностику синдрома Золлингера–Эллисона и неопухолеватой гипергастринемической гиперхлоргидрии. Для дифференциальной диагностики применяют стимуляционные пробы с секретинном или с пищевой нагрузкой. В/в введение секретина вызывает выброс гастринина из опухоли, но не из нормальных клеток привратника. Напротив, пищевая нагрузка стимулирует секрецию гастринина в клетках привратника, но не в клетках

гастриномы. Стимуляционные и супрессивные пробы могут потребоваться и в других подобных случаях.

Б. Концентрацию гормона следует сопоставлять с концентрациями веществ, метаболизм которых регулируется данным гормоном, и веществ, регулирующих его секрецию. Например, продукция инсулина усиливается при повышении концентрации глюкозы и некоторых аминокислот в крови и снижается при гипогликемии. Уровень СТГ возрастает при стрессе и гипогликемии и снижается при гипергликемии. Высокий уровень АКТГ в плазме на фоне сниженного уровня кортикостероидов свидетельствует о первичной надпочечниковой недостаточности; если же содержание кортикостероидов повышено, следует заподозрить гипофизарный синдром Кушинга. Для уточнения результатов РИА нередко требуются стимуляционные и супрессивные пробы.

Как показано на таблице 3 существуют разные методы получения антител к мелатонину (анти-мелатонин антисыворотки) для радиоиммунологического анализа. Так в некоторых случаях сама молекула не является антигеном, то мелатонин должен связаться с соответствующей молекулой-носителем. Метод сопряжения (связывания) мелатонина самого с собой или с его аналогами показан на таблице 2. Все эти структурно-различные антигены обладают общей специфичностью и имеют высокий уровень титра антисера (antisera) или высокую чувствительность для того, чтобы быть использованы для определения мелатонина. Тип белка-носителя и метод инъекции (внедрения-связывания) не оказывает значительного влияния на форму антител. Тем не менее, интеграция N-acetyl групп не обязательна для проявления специфичности. В качестве экспериментальных животных часто используют кроликов. В качестве трэйсеров используются йодированный гаптен, йодированный антиген и тритированный мелатонин ( $^3\text{H-MT}$ ). Отмечены определенные преимущества, связанные с повышенной чувствительностью, в использовании йодированного гаптена в определении мелатонина. Метод РИА требует экстракции мелатонина в неполярный раствор со слабощелочной рН. Также для определения антисыворотки и тканевой концентрации гормона или его концентрации в биологических жидкостях необходимо прибегать к очищению мелатонина с использованием тонкослойной хроматографической колонки [21–25].

Требования и необходимые условия для проведения радиоиммунологического определения концентрации мелатонина.

Таблица 3

## Метод продукции анти-мелатониновой сыворотки у кроликов

Близкие индольные соединения	Белки носители	Реакция конъюгации	Гаптен/белок моль	Tracer	Titer
Мелатонин	BSA	Формальдегидная конденсация	3 /50	$^3\text{H}$ -мелатонин	–
N-ацетил-5-метокситриптамиин	TG,BSA	Карбодимидное соединение	10/47	$^3\text{H}$ -мелатонин	1:20,000
Индометацин	HSA	Карбодимидное соединение	–	$^3\text{H}$ -мелатонин	1:13,000
N-сукцинил-5-метокситриптамиин	BSA	Ангидридное соединение	30	125I- N-3-(4-гироксифенил)-пропионил-5-метокситриптамиин	1:256,000

Аббревиатуры: BSA = bovine serum albumin, TG = тироглобулин, HSA = Human serum albumin.

После экстракции и соответствующего очищения появляется основная проблема для РИА выражающаяся в специфичности мелатонина. Два антитела R8 и K244 чаще всего используются в данной системе. Классические требования к достоверности РИА приведены ниже.

Специфичность РИА теста с участием мелатонина.

Низкая кросс-реактивность структурных аналогов.

Сходство между стандартными аликвотами и стандартной кривой разбавления.

Совпадение показателей хроматографии с иммунореактивностью с участием мелатонина в соответствующем растворе.

Хорошая корреляция между биоопределением и (или) газ-хроматографией масс-спектрометрии.

Необходимые требования к РИА:

1. Консистенция высоко восстановленного (сбалансированного, очищенного) мелатонина.
2. Приемлемый разброс внутри- и межопытных результатов.
3. Низкий уровень нарушений и отклонений экстракции.

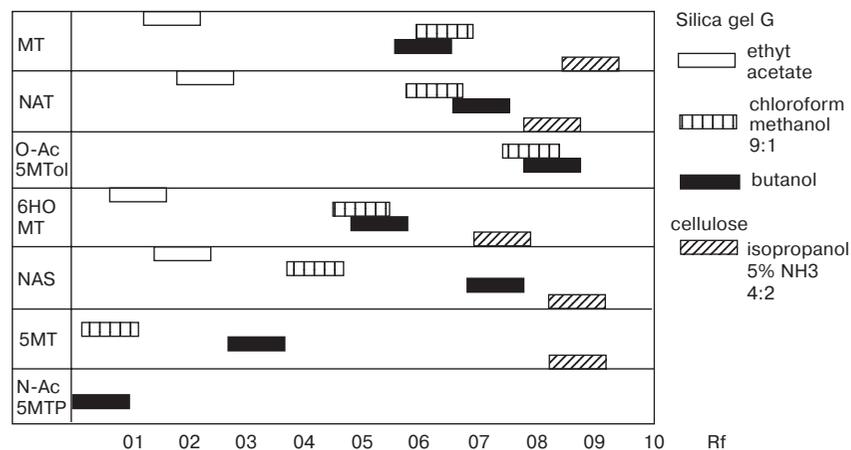
#### Хроматографическая идентичность определения мелатонина и его селективных аналогов

На данный момент совершенным методом получения постоянных достоверных результатов с помощью хроматографии является использование системы, состоящей из четырех растворов, как показано на рис. 1. Rf значения селективных аналогов мелатонина показаны в порядке иллюстрации пригодности для силикагельных G-би-

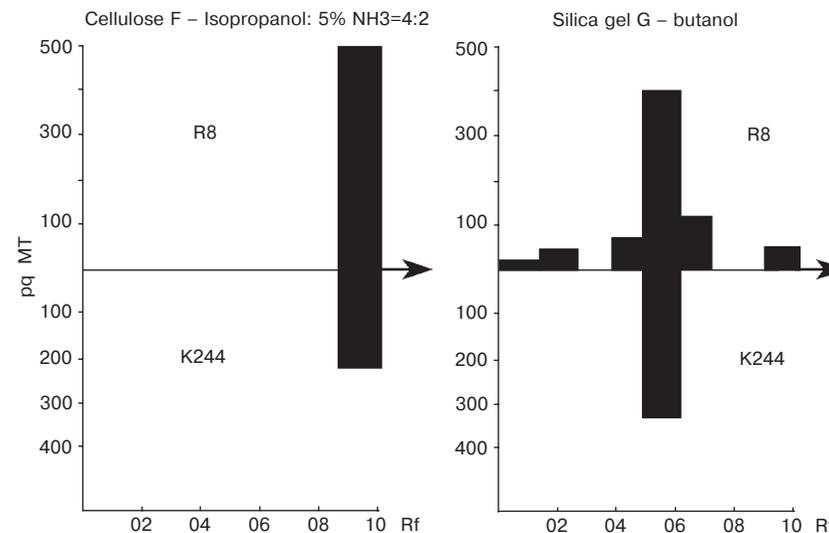
танольных систем и трудности сепарирования N-ацетилтриптамина от мелатонина.

При использовании K244 антитела, иммунореактивного материала кроме мелатонина найдено не было. Но при использовании R8 антитела показана незначительная интерференция двух неизвестных продуктов, одним из которых мог быть N-ацетилтриптамин (рис. 2). Определения концентрации мелатонина по концентрации экстрагируемых метаболитов в моче также представляет из себя не маловажную проблему как и измерение его в других жидкостях. Экстрагирование из урины с применением K244 системы показало наличие нескольких иммунореактивных пиков на хроматографической картине. Возможно определение мелатонина в моче с разумным понижением специфичности RIA после первичного хроматографического сепарирования, но эта процедура весьма утомительна. Для улучшения техники должна быть применена высокоэффективная жидкостная хроматография (High pressure liquid chromatography HPLC).

В работе S.V. Rozov [26] описаны методы определения аналогов мелатонина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с применением флуоресцентным и электрохимическим способа-



**Рис. 1.** Различия уровня миграции мелатонина и селективных аналогов в тонкослойной хроматографии. Сокращения: MT = мелатонин, NAT = N-ацетилтриптамин, O-Ac5MTol = O-ацетил-5-метокситриптофол, 6НОМТ = 6-гидрокси мелатонин, NAS = N-ацетилсеротонин, 5MT = 5-метокситриптамин, N-Ac5MTP = N-ацетил-5-метокситриптофан



**Рис. 2.** Локализация иммунореактивных элементов селективно близких к мелатонину взятых из плазмы крови на хроматографической картине при применении тонкослойной хроматографии с использованием двух антител K244 и R8. Основной пик соответствует Rf мелатонину

ми детекции. Выдвинута попытка определения концентрации AFMK и AMK в крови и сетчатки цыплят. Один путь образования AFMK и AMK продукции есть следствие взаимодействия мелатонина с реактивными формами кислорода [27, 28], другой путь – это окисление индоламин-2,3-диоксигеназы или миелопероксидазы, которые приводят к появлению AFMK с последующей деформилизацией в AMK с помощью формамидазы или каталазы [27, 29, 30]. Т.е. так называемые кенуриновый путь деградации мелатонина, который так или иначе связан с антиоксидантными свойствами мелатонина [1, 31].

Для приготовления необходимых растворов биологические образцы крови после необходимой обработки центрифугировали при 2200 g, а образцы сетчатки и пинеальной железы при 15000 g при +40C и при постоянном pH=7 среде. Очистку образцов осуществляли с помощью растворов содержащих метанол. Сначала растворы прогоняли через неполярную фазу стандартной C18 хроматографической колонке. Получившиеся образцы предварительно высушивали на стекле при помощи жидкого азота и смешивали с жидкой фазой HPLC. После повторного цент-

рифугирования при 15000 g образцы пропускали через данную колонку. Для определения мелатонина и AFMK использовали системы Agilent Technologies 1100 серии (Agilent Technologies, United States) с флуоресцентными детекторами с волнами возбуждения  $\lambda_{ex}=280$  и  $\lambda_{em}=340$  для мелатонина и  $\lambda_{ex} 340$  и  $\lambda_{em} 480$  для AFMK. Для определения АМК использовали ESA Coulochem III электрохимический детектор с 5011 колометрическими клетками (Chelmsford, United States). Электродный потенциал был выставлен на 450 mV. Однако и в этом случае использовалась хроматографическая колонка C18. Результаты обоих тестов показали, что максимальные концентрация мелатонина и АМК находится в области 1 ng и 230 pg соответственно.

### **ГАС хроматография – МАСС спектрометрия (GAS chromatography – MASS spectrometry GCMS) в определении мелатонина**

GCMS реально является одним из наиболее эффективных методов детекции и идентификации неизвестных компонентов [32], тех, что трудны для определения все остальными методами. Масс-спектрометрия – метод исследования вещества путём определения отношения массы к заряду (качества) и количества заряженных частиц, образующихся при том или ином процессе воздействия на вещество. Масс-спектрометрия в отличие от остальных методов детектирует сами частицы вещества. Благодаря возможности продолжительного изучения свойств молекул газового элюента подсчитать концентрацию удается достаточно точно. В 1959 году впервые была идентифицирована 5-гидроксиндолуксусная кислота в экстракте бычей пинеальной железы [33].

#### **Базовый принцип функционирования масс спектрометрии**

Масс-спектрометр – это вакуумный прибор, использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях. Объектом изучения являются масс-спектры веществ. Масс-спектр – это зависимость интенсивности ионного тока от отношения массы к заряду. Из общей теории следует, что типичный масс-спектр при квантовании массы и заряда будет дискретным. Однако не всегда так. Природа анализируемого вещества, особенности метода ионизации и вторичные процессы в масс-спектрометре могут оставлять свой след в масс-спектре. Так ионы с одинаковыми отношениями массы к заряду могут оказаться в разных частях спектра и даже сделать часть его непрерывным. Поэтому масс-спектр в широком смысле – это нечто боль-

шее, несущее специфическую информацию, и делающее процесс его интерпретации более сложным и увлекательным.

Сейчас используются диодные вторично-электронные умножители, в которых ион, попадая на первый диод, выбивает из него пучок электронов, которые в свою очередь, попадая на следующий диод, выбивают из него ещё большее количество электронов и т.д. Другой вариант – фотоумножители, регистрирующие свечение, возникающее при бомбардировке ионами люминофора. Кроме того, используются микроканальные умножители, системы типа диодных матриц и коллекторы, собирающие все ионы, попавшие в данную точку пространства (коллекторы Фарадея). Газовая хроматография как нельзя лучше подходит для сочетания с ионным источником масс-спектрометра с ионизацией электронным ударом или химической ионизацией, поскольку в колонке хроматографа соединения уже находятся в газовой фазе. Приборы, в которых масс-спектрометрический детектор скомбинирован с газовым хроматографом, называются хромато-масс-спектрометрами («Хромасс»).

#### **GCMS определение мелатонина**

Определение мелатонина в данном ключе основано на селективном мониторинге ионов  $m/e$  (мелатонина) 232 или  $m/e$  (триметилсила, TMS) 245 (рис. 3). Аналоги мелатонина имеют значительно более продолжительное время задержки и ионы их находятся глубже, чем  $m/e$  232 и/или 245. Эти ионы, которые совершенно точно соответствуют структуре мелатонина, могут использоваться для стандартного определения мелатонина с высоким разрешением также хорошо как и для других метоксииндолов. Этот тип стандарта предпочтителен с использовать дейтерием меченных аналогов, несмотря на проблемы дейтериевого замещения и трудности приготовления таких образцов с высокой изотопной чистотой.

#### **Спектральные методы**

Для определения мелатонина разумнее всего применять следующие спектральные методы.

- Спектроскопия инфракрасного диапазона (является наиболее информативной, из большого спектрально диапазона и особенностей светодиодов).
- Спектроскопия комбинационного рассеяния (или Раман спектрометрия).
- Спектроскопия когерентного антистоксового рассеяния света (КАРС – усовершенствование метода КР).

Таблица 4  
**Инфракрасный спектр  
 спектрального определения  
 мелатонина**

Связь	Частота / см <sup>-1</sup>
NH	3240
C=O, amide I	1627
C=O, amide II	1555
Aromatic C=C	1620, 1587, 1492
C-O 1217, 1180	
Aromatic Substitution	828, 810, 800

сравнению с энергией падающего на объект (возбуждающего) излучения. Комбинационное рассеяние (КР) обусловлено неупругими столкновениями фотонов с молекулами (или ионами), в ходе которых они обмениваются энергией. По изменению энергии фотона можно судить об изменении энергии молекулы, т.е. о переходе ее на новый энергетический уровень.

При КР происходит изменение поляризации света, характеризующее степень деполяризации.

Спектрометрия комбинационного рассеяния применяется для изучения органических и неорганических веществ в любых агрегатных состояниях, за исключением черных и глубоко окрашенных образцов и соединений, обладающих сильной флуоресценцией в видимой области спектра. По сравнению с ИК спектрами имеет преимущества при исследовании водных растворов, тонких волокон, микрообъектов, при изучении низкочастотных колебаний. КР используют для идентификации веществ, определения отдельных химических связей и групп в молекулах, для исследования внутри- и межмолекулярных взаимодействий, различных видов изомерии, фазовых переходов, водородных связей, адсорбированных молекул и катализаторов, для обнаружения микропримесей веществ, загрязняющих окружающую среду. Использование лазеров значительно расширило границы применения. Спектрометрия комбинационного рассеяния привело к развитию ряда новых методов в спектроскопии. Возможность изменения длины волны возбуждения путем замены лазеров или с помощью лазера с перестраиваемой частотой привела к развитию резонансного КР, которое возникает, когда частота возбуждающего света попадает в область поглощения вещества. Этот метод позволяет

Наиболее простым, доступным и информативным методом определения мелатонина является спектроскопия инфракрасного диапазона. На таблице 4 предложены основные спектральные полосы для определения гормона.

Комбинационное рассеяние (КР) (рамановская спектроскопия), раздел оптич. спектроскопии, изучающий взаимод. монохроматич. излучения с в-вом, сопровождающееся изменением энергии рассеянного излучения по

определять низкие концентрации веществ, что особенно важно для биологии и биохимии. При возбуждении КР лазерами большой мощности наблюдаются новые эффекты, обусловленные нелинейными членами в разложении.

Новые возможности для исследования структуры оптически активных молекул в области колебательных переходов открывает спектр кругового дихроизма КР, представляющий собой разность спектров, полученных при возбуждении КР излучением, поляризованным по кругу вправо и влево. Обнаружение резкого усиления (до 10<sup>6</sup> раз) интенсивности КР молекул на поверхности некоторых металлов (Ag, Au, Cu), так называемое гигантское КР, позволяет исследовать процессы адсорбции и гетерогенного катализа. В настоящее время выпускают спектрометры, которые регистрируют спектры КР бесцветных и окрашенных образцов в количествах до 10<sup>-4</sup> г (или мл). Разработаны скоростные спектрометры с использованием импульсных лазеров, регистрирующие спектр КР за 10–9 с, а также приборы, которые сочетают лазер с микроскопом и позволяют получать спектры КР от объектов размером порядка 1 мкм. КР открыт в 1928 Л.И. Мандельштамом и Г.С. Ландсбергом (СССР) для кристаллов и независимо от них Ч.В. Раманом и К.С. Кришнаном (Индия) для жидкостей.

Когерентное антистоксово рассеяние света (КАРС) связано с третьим членом в разложении [32], содержащим поляризуемость третьего порядка  $g$ . При одновременном облучении образца двумя лазерами с частотами  $\nu_1$  и  $\nu_2$ , направленными под небольшим углом, и если разность  $\nu_1 - \nu_2 = \nu_i$  совпадает с одной из внутримолекулярных частот, на частоте  $2(\nu_1 - \nu_2)$  возникает направленное лазероподобное излучение, интенсивность которого значительно выше интенсивности обычного КР. Плавно меняя частоту  $\nu_2$ , можно получить весь спектр КАРС.

#### Определение мелатонина у человека

Из результатов последних работ стало очевидным, что наилучшим образцом биологических жидкостей для использования в клинических для определения мелатонина является слюна. В работе S. Benloucif et al. рассмотрены три варианта: моча, кровь и слюна. Замеры производили каждые 2 часа. Ночное измерение проводили единожды. Для измерения концентрации мелатонина в крови, пациенту вводили катетер внутривенно за 2 часа до измерения. Как показали исследования, изменение уровня адреналина не оказывает никакого влияния на продукцию

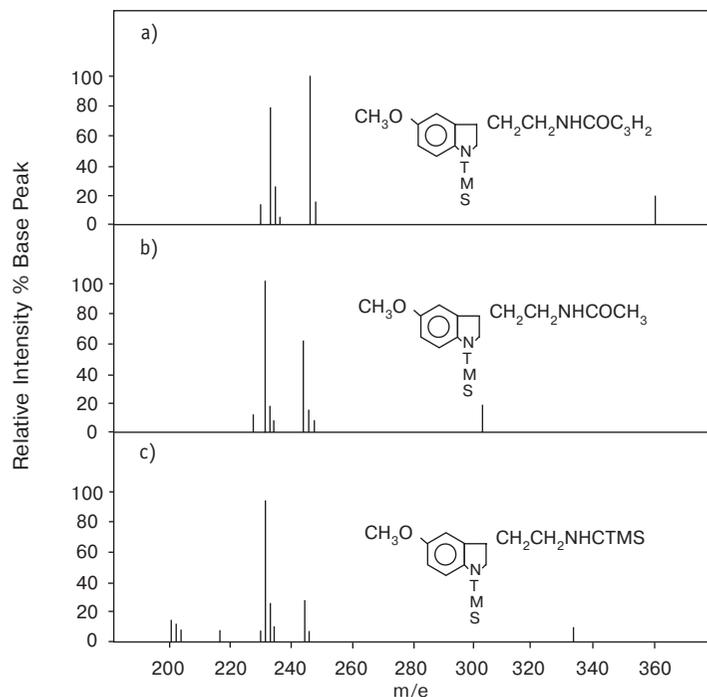


Рис. 3. Порциальный масс спектр TMS мелатонина (b) и его близких аналогов (a) и (c)

мелатонина. Однако этот метод по результатам обследований продемонстрировал себя, как самый трудоемкий и неперспективный по сравнению с измерениями мелатонина в слюне и моче.

В слюне и в крови определяли количество самого мелатонина, а в моче 6-сульфагидроксимелатонина. По результатам работы были получены четкие данные, подтверждающие наличие суточной цикличности в динамики концентрации мелатонина во всех исследуемых жидкостях. В плазме крови пик был обнаружен с 24:00 по 8:00 в моче с 4:00 по 8:00 часов утра. Все ночные заборы проб проводили под освещением <30 люкс. Минимальный уровень мелатонина в плазме составляет 10 pg/ml а в слюне 2 pg/ml.

#### Список литературы

1. Poeggeler B., Balzer I., Harderland R., Lerchl A. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften* 1991; 78:268–9.

2. Vivien-Roels B., Pйvet P. Melatonin: presence and formation in invertebrates. *Experientia* 1993; 49:642–7.

3. Binkley S. (ed.). *The Pineal: Endocrine and Nonendocrine Function*. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988.

4. Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12:151–80.

5. Arendt J. (ed.). *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland*. London: Chapman & Hall, 1995.

6. Hattori A., Migitaka H., Iigo M., Itoh M., Yamamoto K., Ohtani- Kaneko R., Hara M., Suzuki T., Reiter R.J. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Molec Biol Int* 1995; 35:627–34.

7. Zawilska J.B., Nowak J.Z. Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem Int* 1992; 20:23–36.

8. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 1993; 49:665–70.

9. Lovenberg W., Jequier E., Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem and carcinoid tumor. *Science* 1967; 155:217–9.

10. Ehret M., Gobaille S., Cash C.D., Mandel P., Maitre M. (1987). Regional distribution of rat brain tryptophan hydroxylase apoenzyme determined by enzyme-linked immunoassay. *Neurosci Lett* 1987; 73:71–6.

11. Florez J.C., Takahashi J.S. Quantitative 2-dimensional gel-electrophoretic analysis of clock-controlling proteins in cultured chick pineal cells – circadian regulation of tryptophan hydroxylase. *J Biol Rhythms* 1996; 11:241–57.

12. Nowak J.Z., Zawilska J.B. Melatonin and its physiological and therapeutic properties, *Pharm World Sci* 1998; 20(1): 18–27.

13. Thomas K.B., Iuvone P.M. Circadian rhythm of tryptophan hydroxylase activity in chicken retina. *Cell Molec Neurobiol* 1991; 11:511–7.

14. Green C.B., Besharse J.C. Tryptophan hydroxylase expression is regulated by a circadian clock in *Xenopus laevis* retina. *J Neurochem* 1994; 62:2420–8.

15. Shibuya H. Toru M, Watanabe S. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res* 1978; 138:364–8.

16. Klein D.C., Roseboom P.H., Coon S.L. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme. *Trends Endocrinol Metab* 1996; 7:106–12.

17. Moore R.Y. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 1996; 73:125–30.

18. Анисимов В.Н. Эпифиз и продукция мелатонина, 2004// в кн. Мелатонин в норме и патологии, под ред. Комарова Ф.И., Раппопорта С.И., Малиновской Н.К., Анисимова В.Н. М., С.7–20.

19. Бурлакова О.В., Калистратова ЕН, Мацкевич А.А., Попов Д.В., Голиченков В.А. Становление циркадианных ритмов физиологических реакций пигментной системы в онтогенезе бесхвостых амфибий // *Вестн.Моск.ун-та, сер.16.-Биология.*– 2005– №1.– С.13–17.

20. Бурлакова О.В., Голиченков В.А., Калистратова Е.Н., Попов Д.В. Способ анализа жидкой среды на присутствие мелатонина. 1991. А.с. N 1645892 СССР // Бюл. Откр. Изобр. N 16.
21. Yalow R.S. Radioimmunoassay. *Annu Rev Biophys Bioeng* 9:327, 1980.
22. Yalow R.S. Heterogeneity of peptide hormones: Its relevance in clinical radioimmunoassay. *Adv Clin Chem* 20:1, 1978.
23. Yalow R.S. Heterogeneity of peptide hormones. *Recent Prog Horm Res* 30:597, 1974.
24. Yalow R.S. Radioimmunoassay: Practices and pitfalls. *Circ Res* 32, 33(Suppl 1):1, 1973.
25. Yalow R.S., Berson S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39:1157, 1960.
26. Rozov S.V., Features of Melatonin Catabolism in Chicks *Neurochemical Journal*, 2008, Vol. 2, No. 3, P.188–192.
27. Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J. et al. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, vol. 29, P.1177–1185.
28. Stasica P., Paneth P., Rosiak, J.M. *J. Pineal Res.*, 2000, vol. 29, P.125–127.
29. Hirata F., Hayaishi O., Tokuyama T., Seno S. *J Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, P.1311–1313.
30. Ximenes V.F., Silva S.O., Rodrigues M.R. et al. *J.Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, P.38160–38169.
31. Tan D.X., Manchester L.C., Di Mascio P. et al. *Faseb J.*, 2007, vol. 21, no. 8, P.1724–1729.
32. Wilson B.W. The Application of Mass Spectrometry to the Study of the Pineal Gland, *J. Neural Trans., Suppl.* 13, 279, 1978.
33. Lerner A.B., Case J. D., Heinzelman R.V. Structure of melatonin, *J. Amer. Chem Soc.*, Vol 18, 6085, 1959.
34. Benloucif S., Burgess H., Klerman E., Lewy A., Middleton B., Murphy P., Parry B., Revell V. (2008) *J. of Clinical Sleep Medicine* 2008; 4(1) 66–69.

## Практические аспекты мелатонина

### **Роль мелатонина в репродуктивной системе млекопитающих и человека**

В данной главе мы рассмотрим роль и значение мелатонина для беременности у человека. Концентрация мелатонина в крови увеличивается в ходе беременности. Этот липофильный индоламин свободно проникает через плаценту без всяких изменений. Материнский мелатонин запускает циркадные ритмы плода, сообщая информацию о фотоперио-

дике. Мелатонин работает по множеству направлений, как циркулярный модулятор, эндокринный модулятор, иммуномодулятор, как прямой и непрямой антиоксидант, цитопротективный агент в беременности у людей и становится весьма важным для успешного завершения беременности. Кроме того, возможно, мелатонин вовлечен в корректировку патофизиологии беременности, такие как, например аборт, преэклампсия (преждевременные роды) и поражения мозга плода [1].

Мелатонин оказывает сильное влияние на сезонность размножения некоторых видов млекопитающих, включая овец, норок, хорьков, скунсов, лошадей, хомяков и мышей [2–4] и людей. У самки сирийского хомячка перенесенной из условий короткого светового дня (8L:16D) в условия продолжительного освещения (14L:10D) подавляется синтез фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и созревание фолликулов останавливается на стадии анеструса [5]. В то же время смена фотопериода с длинного (14L:10D) на короткий (8L:16D) приводит к тому, что у самцов развивается тестикулярная атрофия и редукция ассоциированных гормонов. Пинеалэктомия блокирует ингибирующие действия фотопериода для обоих полов, но введения экзогенного мелатонина также привело к замедлению тестикулярного развития даже у пинеалэктомированных хомячков [6].

### **Роль мелатонина при беременности**

Сезонность размножения присуща и животным, и людям в течение всего репродуктивного периода [7], сезонность уровня оплодотворения и качества эмбрионов [8], концентрация сперматозоидов в эякуляте и конденсация хроматина у мужчин также имеют сезонное разнообразие с максимум в течение поздней зимы и ранней весны [9]. Показана обратная сезонная зависимость количества сперматозоидов в эякуляте и конденсации хроматина между жителями южного и северного полушария [9]. Основной причиной обратной корреляции между сезонным пиком концентрации мелатонина [10] и сезонной низкой овариальной активностью у популяции высоких (полярных) широт [11] может считаться непосредственное влияние изменения концентрации мелатонина, объясняющие причины сезонных изменений фертильности [12].

В женском организме мелатонин может оказывать влияние на фертильность в зависимости от его концентрационных изменений при гипоталамической аменорее [13, 14], что говорит о существовании причинно-следственной связи между высокой концентрацией мелатонина и гитоталамо-питуитарно-гонадальной гиподисфункцией [15]. Ритм мелатони-

на полностью связан с репродуктивными гормонами в препубертатном периоде, а также важно взаимовлияние гормонов друг на друга во время пубертации. Повышенный уровень мелатонина способен обеспечить и поддерживать в нормальном физиологическом состоянии гипоталамо-питуитарно-гонадальную цепь [16]. Опухоль эпифиза, возможно в зависимости от происхождения клеток (характера активности), также может стимулировать или понижать развитие половых признаков [17]. Ненаступление пубертации, которое ассоциировано с пониженным уровнем мелатонина, может быть вызвано опухолевым повреждением и разрушением эпифиза, что схоже с эффектом пинеалэктомии, или, наоборот, явление – понижение/замедление пубертации может быть связано с избыточной концентрацией мелатонина, вызванной разрастанием и гиперфункцией эпифиза. Оба предположения имеют право на существование, но не одно из них полностью не доказано. Абсолютно или частично слепые пациенты имели уровень мелатонина в целом в течение дня выше, чем здоровые [18]. Но незрячие молодые люди имели значительно более низкий базальный и пиковый уровень лютеинизирующего гормона (ЛГ), ФСГ и тестостерона в сравнении со зрячими [19].

Также мелатонин регулирует секрецию гонадотропина и пролактина в соответствии с фотопериодом [20, 21]. Пульсирующая секреция гонадотропин-релизинг гормона, контролирующего секрецию ЛГ и ФСГ секрецию, и генная экспрессия регулируются мелатонином и обладают цикличностью с периодом в 24 часа [22].

Мелатонин способен напрямую влиять на элементы женского репродуктивного тракта, где регулирует секрецию половых стероидных гормонов у хомяков [23] и у людей [24, 25]. Высокий уровень мелатонина, который может зависеть от сезонных вариаций [26], был обнаружен в жидкости преовуляторных фолликулах в концентрации в три раза превышающей в крови [27, 28]. Недавно было показано также, что мелатонин уменьшает степень оксидативного стресса в фолликулах яичников и защищает ооциты от повреждающего действия свободных радикалов [29,30]. А, как известно из исследований последних лет [31–34], уровень окислительно-восстановительного баланса является чуть ли не самым важным признаком дальнейшего качества ооцита и его потенциями к развитию здорового эмбриона.

#### **Циркуляция мелатонина между матерью и плодом**

Информация о продолжительности дня и суточном ритме в первую очередь передается за счет транспорта материнского мелатонина плоду. Та-

ким образом, происходит синхронизация ритмов плода и матери [35]. Ритм проявляет себя в цикличности клеточной активности и иммунореактивности [36], синтеза гормонов, в том числе пролактина [37], интенсивности дыхания плода [38, 39]. Уровень мелатонина продолжает оставаться высоким у матери в течение определенного индивидуального периода после родов. Плод же сохраняет ритм синтеза мелатонина, заданный им материнским организмом (у крыс) лишь некоторое время, после чего ритмы десинхронизируются [40]. В исследованиях на людях группа ученых Okatani et al. [41] измеряли уровень передачи мелатонина между матерью и плодом. Доза эндогенного мелатонина, получаемая матерями, составляла 3 мг. Установили, что максимум мелатонина в крови матери регистрировали через два часа ( $21,84 \pm 2,09$  нг/мл) после употребления лекарства, а количество мелатонина в пупочной вене коррелирует с его количеством в материнской вене. Это доказывает, что мелатонин у людей от материнского организма плоду передается достаточно быстро и легко.

В исследованиях [42], проведенных на 55 здоровых беременных женщин (13 в течение первого, 18 во втором и 24 в течение третьего триместра) и 11 небеременных женщин контрольной группы была измерена концентрация мелатонина в сыворотке крови радиоиммунологическим методом в 11:00 ч. Концентрация мелатонина в сыворотке крови из 12 женщин на ранней стадии и 11 женщин в конце беременности измерялась каждые четыре часа в течение дня. Уровни мелатонина в сыворотке в течение третьего триместра беременности ( $76,5 \pm 38,3$  моль/л), были значительно ( $p < 0,01$ ) выше, чем в ходе первого ( $29,7 \pm 9,9$  моль/л) и второго триместра ( $39,1 \pm 11,2$  моль/л), а также небеременных женщин контроле ( $41,7 \pm 15,5$  моль/л), и существует положительная корреляция между беременностью и изменениями концентрации мелатонина в крови на протяжении недели в одно и тоже время дня в 11.00 ч. И в начале и в конце беременности был обнаружен четкий циркадианный ритм мелатонина. Амплитуда и продолжительность ночного подъем концентрации мелатонина были выше, в конце беременности, однако без проявления фазовых сдвигов. Увеличение сывороточной концентрации мелатонина в конце беременности может быть обусловлено увеличением синтеза и секреции или замедлением метаболизма мелатонина.

Сравнительные исследования [43] показали значительное понижение уровня секреции ночного мелатонина и его концентрации в крови у женщин с выраженным депрессивным синдромом в течение беременности и после родов по сравнению со здоровыми.

### Мелатонин, циркадианные ритмы и развитие плода

Зарождение циркадианных ритмов происходит в течение плодного периода [44]. Ритм задается в течение последнего триместра [45]. Мелатонин регулирует циркадианный уровень кортизола, вазопрессина, адренкортикотропного гормона и других гормонов, частоты сердечных сокращений (ЧСС), температуру, уровень дыхания. Мелатонин значительно улучшает развитие мозга, участвует в ингибировании ожидаемого повышения уровня синтеза нестина, но увеличивает пролиферацию нейральных клеток мозжечка, в течение созревания зародышей крыс предрасположенных к эпилепсии, так что признаки повреждения становятся менее выраженными [46]. На клеточном уровне, циркадианные ритмы включаются за счет саморегуляторных взаимодействий группы генов, кодирующих белки мозга и мышц ARNT-like protein 1 (Bmal-1), Period (Per1-3), Cryptochrome (Cry1-2), и Clock-genes и их продукты (BMAL1, PER, CRY, CLOCK) [47]. Обеспечение циркадианных ритмов зависит от функционирования генов Clock и их активности в продукции белков при ауторегуляторной обратной петле, состоящей одновременно и стимулирующих и ингибирующих элементов [48]. Известно, что мелатонин увеличивает продолжительность сна у людей в последний триместр, а также в ранний период неонатального развития до 16–18 часов [49]. Также показано, что мелатонин увеличивает фазу парадоксального сна (REM – rapid eyes movement) у беременных матерей и новорожденных [50]. Некоторые работы показали, что клеточная пролиферация плода зависит от суточных колебаний концентрации мелатонина. Пролиферация клеток человеческого эпителия выше в ночные часы и ниже в течение дня [51], пролиферативная активность клеток костного мозга, миелоидных и эритроидных клеток подчиняется циркадианному ритму [52]. Мелатонин (50–100 мМ) увеличивает пролиферацию у человека остеобластов [53]. Недоразвитость циркадианных ритмов приводит к супрессии нейрогенеза у крыс [54]. Показано, что мелатонин матери ингибирует продукцию кортизола в адреналовой железе в плоде приматов и у новорожденных [55] и стимулирует рост адреналовой железы у плода у капуцинов [56].

### Взаимосвязь мелатонина и аборт

Спонтанные аборты или прерывание беременности до истечения 20 недельного срока вынашивания плода с момента последнего менструального цикла или при массе плода менее 500 г (World Health Organization,

WHO), происходит в 15–20% от общего количества регистрируемых беременностей, частота спонтанного аборта возрастает до 15% у женщин моложе 25 лет, и до 35% и более у женщин старше 38 лет [57]. Причины спонтанных аборт могут быть подразделены на две категории: те, что связаны с хромосомными аномалиями и те, что связаны с нарушением внутриматочной среды. Некоторые исследования показали влияние систематического и плацентарного окислительного стресса в патофизиологии аборт и повторяющейся остановке беременности [58, 59]. Недостаток антиоксидантной защиты приводит к повторяющимся аборт [60]. Активные формы кислорода или АФК – индуцированные повреждение мембран с продуцированием пероксидов липидов, резко возрастая спонтанно, а также ввиду каких-то нарушений или дезорганизаций, незамедлительно вызывают аборт [61]. Есть версии, что пинеальная недостаточность может быть связана со спонтанными аборт, даже в тех случаях, когда нет хромосомных аномалий и структурных нарушений матки. Эта гипотеза основана на том, что мелатонин является сильным антиоксидантом, связывающим свободные радикалы, что концентрация мелатонина в норме значительно возрастает во время беременности, и что пинеаэктомированных крыс частота спонтанных аборт возрастает. Мелатонин имеет иммуномодулирующее действие. К тому же, он стимулирует секрецию прогестерона, который уменьшает степень сокращенности матки и предотвращает иммунологическое отторжение трофобласта. Мелатонин ингибирует синтез простагландинов, которые потенциально могут индуцировать сокращение и родовые потуги матки. В последний триместр беременности было показано увеличение генерации супероксида ( $O_2^{\cdot-}$ ) плацентарными митохондриями [62] и полиморфонуклеарными лейкоцитами [63]. А это означает, что нарушается оксидант/антиоксидантный баланс связанный с беременностью [64]. В норме уровень мелатонина в крови вынашивающих женщин постоянно возрастает [42, 65], что необходимо для уменьшения окислительного стресса. Пинеаэктомия приводит к значительному понижению уровня циркулирующего в крови мелатонина и приводит к аборт у крыс [66].

Мелатонин способен реактивировать супероксид  $O_2^{\cdot-}$ , гидроксил радикал ( $\bullet OH$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), гидрокси пероксид ( $H_2O_2$ ), гипохлорную кислоту ( $HOCl$ ), оксид азота ( $NO\bullet$ ) и пероксинитрит анион ( $ONOO^-$ ) [67–70]. Не только сам мелатонин обладает антиоксидантными свойствами, но и его метаболиты циклический 3-гидроксимелатонин, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (АФМК) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine

(AMK) являются великолепными охотниками на свободных радикалов [68, 71–74]. Также мелатонин стимулирует синтез энзимов, эндогенным антиоксидантов, супероксид дисмутаза (superoxidedismutase – SOD) глутатион пероксидаза (glutathione peroxidase – GPx), и глутатион пероксидаза (glutathione reductase – GRd) превращающих реактивные виды в безвредные молекулы [75, 76]. Мелатонин увеличивает генную экспрессию SOD, GPx [77], а, следовательно, лимит продукции глутатиона [78], а глутатион является очень важным внутриклеточным антиоксидантом. Увеличение уровня мелатонина у беременных женщин может сыграть существенную роль в антиоксидантной защите против окислительного стресса, который возникает в результате метаболических процессов плаценты и полиморфонуклеарных лейкоцитов.

Обнаружены механизмы ответственные за выживание плода в матке матери, предотвращающие негативные последствия атак материнских иммунных клеток при их непосредственном контакте. На данный момент ведутся дебаты об иммунном отторжении плода, как о возможной причине неимплантации эмбриона или спонтанного аборта. Удаление эпифиза, или любая другая операция, уменьшающая синтез мелатонина и секрецию, так как постоянный свет или денервация эпифиза, одновременно угнетает клеточный и гуморальный иммунитет, который частично может быть восстановлен введением экзогенного мелатонина [79, 80].

Иммунomodulatory и антиапоптотическая роль мелатонина выражена в основном через регуляцию активности Т-хелперов лимфоцитов (Th), NK-киллеров и моноцитов. Прямое действие мелатонина на иммунную систему человека возможно благодаря присутствию особых участков связывания мелатонина на лимфоцитах [81], моноцитах [82] и гранулоцитах [83]. Th1/Th2 баланс цитокинов с доминированием Th2 является наиважнейшим механизмом, предопределяющим выживание плода в матке матери [84]. Физиологически ритм мелатонина коррелирует с ритмикой Th1/Th2 баланса [85], и мелатонин стимулирует Th2 иммунную активность [86]. Недавно, регуляторные Т-клетки (Treg) были предложены как важные участники толерантности в течение всего существования плода. CD4+/CD25+ регулируемые Treg, являются уникальной популяцией Т-клеток [87], также играющей важную роль в аутоиммунной защите и толерантность к аллогенам органов плода [88]. Мелатонин стимулирует пролиферацию Th (CD4+) лимфоцитов [89] и Т-лимфоцитов [90].

NK-клетки – предсуществующие иммунные клетки, присутствующие на эндометрии в лютеиновую фазу и в течение ранней беременности [91].

90% NK-клеток являются CD56dim клетками, тогда 90% клеток матки – CD56bright, которые имеют низкую активность, не способны уничтожить трофобласт и продуцирует цитокины, которые стимулирует трофобласт к развитию и созреванию [92]. Существует баланс CD56dim/CD56bright клеток. У женщин перенесших аборт уровень CD56dim выше, чем у беременных [93]. Мелатонин увеличивает количество NK-клеток, их пролиферацию и активность [94]. Но регулирует ли он соотношение CD56dim/CD56bright до сих пор остается неясным.

Прогестерон также необходим для поддержания беременности. На ранних этапах его источниками являются желтое тело и плацента. Прекращение продукции прогестерона между желтым телом и плацентой происходит на 8–9 недели вынашивания, причем редукция желтого тела на 7–8 неделе, когда плацента не включилась полностью в работу, приводит к понижению прогестерона в крови и следующему за этим аборту [95]. Благодаря наличию участков связывания мелатонина на гранулезных клетках и клетках желтого тела [26, 28], он обладает способностью прямого влияния на стероидогенез [96, 97]. Мелатонин стимулирует секрецию прогестерона в гранулезном слое клеток и/или клетках желтого тела. Увеличение концентрации мелатонина в лютеиновую фазу сравнимо с увеличением его в фолликулярную фазу менструального цикла [98, 99]. Уровень имплантации снижается у пинеалэктомированных крыс [100]. В то время как мелатонин, хорионический гонадотропин (hCG)/LH, пролактин [101], цитокины [402], ростовые факторы [103] стимулирует выработку прогестерона, простагландины F-2α [101], окситацин [105], другие цитокины [106] и активные формы кислорода (АФК) [107] супрессируют продукцию мелатонина. Мелатонин ингибирует продукцию простагландинов у овец [108], мелатонин увеличивает секрецию пролактина [109] и понижает уровень АФК.

#### Мелатонин и преэклампсия

Преэклампсия – одно из самых важных нарушений в течение беременности. Преэклампсия характеризуется гипертензией, вызываемой беременностью (более 140/90) и наличием протеинурии (более 300 мг в день), возникающей, как правило, во второй половине беременности [110]. В среднем в мире этим заболеванием страдают 5–7% беременных матерей [111, 112]. Потенциальные последствия этих заболеваний: малый вес, недоразвитость или даже смерть плода. У матери это заболевание проявляет себя почечной недостаточностью, HELLP (гемолиз, повы-

шение печеночных энзимов, тромбоцитопения), печеночной недостаточностью, церебральным отеком и в редких случаях приводит к летальному исходу. На 10–12 неделе вынашивания, изменения в плаценте приводят к окислительному взрыву. Аномалии в плацентации приводят к преэклампсии и выкидышам. Преэклампсия характеризуется повышенным уровнем оксидативного стресса и повышенным количеством свободных радикалов. Повышенный уровень оксидативного стресса может привести к преэклампсии.

Преэклампсию можно разделить на две стадии: первая – продуцирование плацентой цитотоксических факторов, в том числе и свободных радикалов, продуцируемых плацентарными митохондриями, вторая – материнский ответ на токсичные факторы плаценты формированием высокотоксичных ROS (АФК). Аномалии плацентации приводят к ишемии плаценты [113], которая в свою очередь приводит к сильному плацентарному окислительному стрессу. Окисление липидов АФК приводит к образованию пероксидов и гидропероксидов липидов, которые формируют липотеины, и, перемещаясь, образуют цепочку пероксидации липидов, что означает систематический окислительный стресс.

У женщин, страдающих преэклампсией, отмечают значительно больший уровень малодиальдегида [114, 115]. В тоже время уровень антиоксидантов при преэклампсии меньше. Понижен уровень глутатион пероксидазы, супероксид дисмутазы, витаминов С и Е [116, 117]. Кроме того, было показано, что концентрация мелатонина в ночное время у женщин с данным заболеванием после 32 недели вынашивания значительно ниже, чем у здоровых женщин [65]. Мелатонин значительно понижает уровень оксидативного стресса, в мозге, матке, тимусе, легких, почках до уровня не беременных крыс [118], понижает уровень NOS и ROS в эндотелии матки [119] и маточных артериях [120]. Мелатонин играет роль кардиоваскулярного регулятора, с его ночным пиком совпадает кардиоваскулярная активность [121]. Удаление пинеальной железы у крыс приводит к повышению давления [122], выравнивающемуся при введении экзогенного мелатонина [123]. Также было показано, что у женщин с преэклампсией отсутствует циркадианный характер ритмики мелатонина, а его потеря в здоровом состоянии может привести к развитию заболевания [124], особенно если ночной уровень гормона значительно меньше, чем в норме [65]. Следовательно, мелатонин может быть востребован в терапии антиэклампсии в качестве антиоксиданта, как используются витамины С и Е.

### Мелатонин и плодная гипоксия

Понижение изменчивости частоты сердечных сокращений плода прежде трактовались как последствие развития в условиях гипоксии и ацидоза. Ныне определение маточного артериального кислотно/щелочного статуса применяется достаточно широко для оценки перинатальной асфиксии [125]. Размягчение мозгового вещества (некроз) вокруг боковых желудочков (Periventricular leukomalacia – PVL) является основным субстратом для церебрального паралича, характеризующегося глубоким поражением белого вещества мозга, сопровождающегося большими областями некроза, что влияет на дальнейшее развитие мозга и когнитивные способности [126]. Этиология процесса повреждения белого вещества до конца не ясна, но известно, что ишемия/реперфузия, а также свободные радикалы [127] и токсичные цитокины (особенно эпидемиологически ассоциированные с PVL с материнской инфекцией) [128] играют важную роль в данном процессе. В тканях, подвергнувшихся гипоксии, формируются разнообразные формы свободных радикалов, которые могут привести к патологии, включая как нейрологические повреждения, так и повреждения множества других типов тканей [129, 130]. Последние исследования показали связь между повышением уровня свободных радикалов и перинатальной гипоксией. В работе Wang et al. [131] показана связь между кислотно-щелочным балансом и продукцией перикисного окисления липидов, показателя степени окисления мембраны. При этом второй показатель является более чувствительным показателем окислительного стресса, чем данные измерения кислотно-щелочного баланса. Исследования Roger et al. [132] демонстрируют, что клеточное повреждение, вызванное активностью свободных радикалов, является следствием гипоксии и реперфузии в течение родовых схваток и предлагает использовать уровень перекисного окисления липидов как маркер плодной гипоксии. В норме клетки и ткани защищены от нарушений липидов с помощью антиоксидантов, SOD, каталазы, глутатион пероксидазы и глутатион-S-пероксидазы. Уровень этих антиоксидантов поддерживается и увеличивается в течение беременности за счет плаценты и плода и резко падает во время родовых схваток Их уровень, как показала группа Okatani et al. [133], в значительной степени зависит от суточного уровня экспрессии мелатонина у крыс.

У взрослых животных мелатонин выступает в роли нейропротектора при фокальной церебральной ишемии [434]. Введение мелатонина в концентрации 10 мг/кг уменьшает активность микроглии после воспали-

ния, вызванного каиновой кислотой у крыс [135], уменьшает повреждение в концентрации 5 мг/кг причиняемых PVL [136], в концентрации 20 мг/кг снижает уровень сепсиса у неонатальных крысят и понижает уровень малондиальдегида. [137], а также нитрита/нитрата в крови [138]. В концентрации 10мг/кг мелатонин снижает уровень окислительного повреждения липидов, ДНК и митохондрий в мозге до нормального уровня у плода [139], увеличивает экспрессию анти-апоптотических генов группы Bcl-2, защищая липиды от пероксидного окисления и последующего апоптоза клеток [141]. Мелатонин снижает уровень пероксида •ОН в матке при возникновении асфиксии уже в концентрации 1 мг/кг [140].

### Мелатонин и беременность

Ранее обнаружена и теперь считается очевидной функция мелатонина как регулятора сезонных размножений у животных и у человека [142, 143]. Родовые схватки чаще происходят ночью и рождение утром [142]. Механизм определяющий периодичу родов до сих пор остается не до конца ясен, но есть работы подтверждающие зависимость времени рождения от суточной фотопериодичности у людей [144, 145] и крыс [146]. Длительное пребывание в темноте [147] или световая пульсация может как понижать, так и повышать продолжительность родов у молодых [148]. Становится очевидным значение фотопериодичности, как фактора контролирующего время родов.

Как известно, именно мелатонин, синтезируемый в эпифизе матери, передает информацию о фотопериодике и продолжительности дня плоду. Максимум мелатонина в организме матери обнаружено между 24:00 и 05:00 ч. [149], что совпадает с пиками мелатонина в амниотической жидкости и в матке и этот уровень еще больше повышается к моменту родов. Продолжительные нарушения могут немедленно прервать беременность.

### Краткие выводы

Обширные исследования мелатонина привели к громадному прогрессу в понимании регуляции синтеза гормона и описанию механизмов его действия. Синтез плацентарного мелатонина находится под контролем его выработки в материнском эпифизе. Существующее разнообразие путей взаимодействия мелатонина с эндокринной и иммунной системой, его антиоксидантная функция и цитопротективное участие на всех уровнях взаимодействия материнского организма, плаценты и плода, делает ме-

латонин необходимым элементом благополучного завершения беременности. Изменения экспрессии и/или понижения уровня выделения мелатонина в кровь приводит к возникновению нарушений в течение беременности, таким как аборт, преэклампсия и неонатальные неврологические расстройства. Нарушение фотопериода с увеличением светового промежутка или его смещение, световое облучение в ночное время, подвергают риску увеличения возможных нарушений в протекании беременности, так как подавляют секрецию эндогенного мелатонина у беременных женщин.

Интересны идеи и разработки отечественного пинеолога (специалиста по эпифизу) А.М. Хелимского. Он впервые указал, что социальный стресс (результат всё ускоряющихся темпов и ритмов развития человеческого общества) стал главной движущей силой эволюции человека, которая реализуется через эпифиз и его основной гормон – мелатонин. По мнению Хелимского, хронический стресс матери во время беременности, столь характерный для больших городов, повышает уровень кортикостероидов (гормонов стресса), которые могут проникать через плаценту и подавлять у плода формирование эпифиза. За первую половину минувшего века средний вес эпифиза зрелого плода снизился, по его данным, почти в два раза! Такова, видимо, эпигенетическая (не связанная с наследственностью) реакция человеческой популяции на условия жизни в постиндустриальном обществе, с характерным действием стрессующих факторов не только днём, но и ночью (залитые ярким светом ночные города – так называемый эффект Эдисона, ночной шум от автомобилей и самолётов, ночные будоражащие передачи по телевидению и пр.), и полным разрушением естественного для человека чередования периодов активности–покоя и сна–бодрствования.

### Список литературы

1. Hiroshi Tamura, Yasuhiko Nakamura M., Pilar Terron, Luis J. Flores, Lucien C. Manchester, Dun-Xian Tan, Norihiro Sugino and Russel J. Reiter (2008) Melatonin and pregnancy in the human, *Reproductive Toxicology*, Volume 25, Issue 3, April 2008, Pages 291–303.
2. Arendt J. (ed.). *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland*. London: Chapman & Hall, 1995.
3. Reiter R.J. Melatonin and human reproduction. *Ann Med* 1998;30:103–8. *J Pineal Res* 2005; 38: 217–22.
4. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336:186–95.
5. Benson B., McAssey M.E. An essential role for ovarian inhibin in pineal gland-mediated anestrus in Syrian hamsters. *J Pineal Res* 1998; 25:5–11.

6. Gunduz B., Stetson M.H. Effects of photoperiod, pinealectomy, and melatonin implants on testicular development in juvenile Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Biol Reprod* 1994; 51:1181–7.
7. Bronson F.H. Seasonal variation in human reproduction: environmental factors. *Q Rev Biol* 1995; 70:141–64.
8. Rojansky N., Benshushan A., Meirsdorf S., Lewin A., Laufer N., Safran A. Seasonal variability in fertilization and embryo quality rates in women undergoing IVF. *Fertil Steril* 2000; 74:476–81.
9. Henkel R., Menkveld R., Kleinhappl M., Schill W.B. Seasonal changes in human sperm chromatin condensation. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18:371–7.
10. Stokkan K.A., Reiter R.J. Melatonin rhythms in Arctic urban residents. *J Pineal Res* 1994; 16:33–6.
11. Kauppila A., Kivela A., Pakarinen A., Vakkuri O. Inverse seasonal relationship between melatonin and ovarian activity in humans in a region with a strong seasonal contrast in luminosity. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65:823–8.
12. Partonen T. Short note: melatonin-dependent infertility. *Med Hypotheses* 1999; 52:269–70.
13. Okatani Y., Sagara Y. Enhanced nocturnal melatonin secretion in women with functional secondary amenorrhea: relationship to opioid system and endogenous estrogen levels. *Horm Res* 1995; 43:194–9.
14. Walker A.B., English J., Arendt J., MacFarlane I.A. Hypogonadotropic hypogonadism and primary amenorrhea associated with increased melatonin secretion from a cystic pineal lesion. *Clin Endocr (Oxf)* 1996; 45:353–6.
15. Berga S.L., Mortola J.F., Yen S.S. Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:242–4.
16. Murcia Garcera J., Munoz Hoyos A., Molina Carballo A., Fernandez Garcera J.M., Narbona Lopez E., Uberos Fernandez J. *An Esp Pediatr* 2002; 57:121–6.
17. Vaughan G.M., Meyer G.G., Reiter R.J. Evidence for a pineal–gonad relationship in humans. In: Reiter R.J., editor. *The pineal and reproduction*. Basel: Karger; 1978. P.191–223.
18. Bellastella A., Sinisi A.A., Criscuolo T., De Bellis A., Carella C., Iorio S. et al. Melatonin and the pituitary–thyroid axis status in blind adults: a possible resetting after puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43:707–11. 300 H. Tamura et al. / *Reproductive Toxicology* 25 (2008) 291–303.
19. Bellastella A., Criscuolo T., Sinisi A.A., Iorio S., Mazzuca A., Parlato F. et al. Influence of blindness on plasma luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and testosterone levels in prepubertal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:862–4.
20. Diaz Lopez B., Diaz Rodriguez E., Urquijio C., Fernandez Alvarez C. Melatonin influences on the neuroendocrine–reproductive axis. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1057:337–64.

21. Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12:151–80.
22. Roy D., Belsham D.D. Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons: signal transduction mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277:251–8.
23. Tamura H., Nakamura Y., Takiguchi S., Kashida S., Yamagata Y., Sugino N. et al. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. *J Pineal Res* 1998; 25:135–41.
24. Woo M.M.M., Tai C.J., Kang S.K., Nathwani P.M., Pang S.F., Leung P.C.K. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4789–97.
25. Nakamura Y., Tamura H., Takayama H., Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril* 2003; 80:1012–6.
26. Yie S.M., Brown G.M., Liu G.Y., Collins J.A., Daya S., Hughes E.G. et al. Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production. *Hum Reprod* 1995; 10:50–5.
27. Brzezinski A., Seibel M.M., Lynch H.J., Deng M.H., Wurtman R.J. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 865–7.
28. Ronnberg L., Kauppila A., Leppaluoto J., Martikainen H., Vakkuri O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:492–6.
29. Takasaki A., Nakamura Y., Tamura H., Shimamura K., Morioka H. Melatonin as a new drug for improving oocyte quality. *Reprod Med Biol* 2003; 2:139–44.
30. Tamura H., Takasaki A., Miwa I., Taniguchi K., Maekawa R., Asada H. et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* 2008; 44:280–7.
31. Van Blerkom J., Antczak M., Schrader R. (1997) The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood flow characteristic. *Hum. Reprod.* 12, 1047–1055.
32. Nargund G., Bourne T., Doyle P. (1996) Association between ultrasound indices of follicular blood flow, oocyte recovery, and preimplantation embryo quality. *Hum. Reprod.* 11, 109–111.
33. Huey S., Abuhamad A., Barroso G., Hsu M., Kolm P., Mayer J., Oehninger S. (1999) Perfollicular blood flow Doppler indices but not follicular pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 72, 707–712.
34. Chui D., Pugh, N., Walker, S., Gregory, L. and Shaw, R. (1997) Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro, fertilization programme: a preliminary study. *Hum. Reprod.* 12, 191–196.
35. Reppert S.M. Maternal entrainment of the developing circadian system. *Ann NY Acad Sci* 1985; 453:162–9.
36. Breen S., Rees S., Walker D. The development of diurnal rhythmicity in fetal suprachiasmatic neurons as demonstrated by fos immunohistochemistry. *Neuroscience* 1996; 74:917–26.

37. Parraguez V.H., Valenzuela G.J., Vergara M., Ducsay C.A., Yellon S.M., Seron n-Ferrer M. Effect of constant light on fetal and maternal prolactin rhythms in sheep. *Endocrinology* 1996; 137:2355–61.
38. McMillen I.C., Walker D.W. Effects of different lighting regimes on daily hormonal and behavioural rhythms in the pregnant ewe and sheep fetus. *J Physiol* 1991; 442:465–76.
39. McMillen I.C., Nowak R., Walker D.W., Young I.R. Maternal pinealectomy alters the daily pattern of fetal breathing in sheep. *Am J Physiol* 1990; 258:R284–7.
40. Jimenez-Jorge S., Guerrero J.M., Jimenez-Caliani A.J., Naranjo M.C., Lardone P.J., Carrillo-Vico A. et al. Evidence formelatonin synthesis in the rat brain during development. *J Pineal Res* 2007; 42:240–6.
41. Okatani Y., Okamoto K., Hayashi K., Wakatsuki A., Tamura S., Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res* 1998; 25:129–34.
42. Kivela A. Serum melatonin during human pregnancy. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991 Mar; 124(3):233–7.
43. Parry B.L., Meliska C.J., Sorenson D.L., Lopez A.M., Martinez L.F., Nowakowski S., Elliott J.A., Hauger R.L., Kripke D.F., (2008) Plasma Melatonin Circadian Rhythm Disturbances During Pregnancy and Postpartum in Depressed Women and Women With Personal or Family Histories of Depression. *Am J Psychiatry*. 2008 Oct 1.
44. Seron-Ferre M., Torres-Farfan C., Forcelledo M.L., Valenzuela G.J. The development of circadian rhythms in the fetus and neonate. *Semin Perinatol* 2001; 25:363–70.
45. Reppert S.M., Schwartz W.J. Functional activity of the suprachiasmatic nucleus in the fetal primate. *Neurosci Lett* 1984; 46:145–9.
46. Uyanikgil Y., Turgut M., Ates U., Baka M., Yurtseven M.E. Beneficial effects of melatonin on morphological changes in postnatal cerebellar tissue owing to epileptiform activity during pregnancy in rats: light and immunohistochemical study. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Oct 6; 159(2):79–86.
47. Hawkins G.A., Meyers D.A., Bleecker E.R., Pack A.I. Identification of coding polymorphisms in human circadian rhythm genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Amtl*, *Cry1*, *Cry2* and *timeless* in a multi-ethnic screening panel. *DNaseq* 2007; 10:1.
48. Hastings M.H. Circadian clockwork: two loops are better than one. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1:143–6.
49. Mirmiran M., Maas Y.G., Ariagno R.L. Development of fetal and neonatal sleep and circadian rhythms. *Sleep Med Rev* 2003; 7:321–34.
50. Cajochen C., Krauchi K., Graw P., Wirz-Justice A. Melatonin and S-20098 increase REM sleep and wake-up propensity without modifying NREM sleep homeostasis. *Am J Physiol* 1997; 272:R1189–96.
51. Marra G., Anti M., Percesepe A., Armelao F., Ficarelli R., Coco C. et al. Circadian variations of epithelial cell proliferation in human rectal crypts. *Gastroenterology* 1994; 106:982–7.
52. Smaaland R., Sothorn R.B., Laerum O.D., Abrahamsen J.F. Rhythms in human bone marrow and blood cells. *Chronobiol Int* 2002; 19:101–27.

53. Nakade O., Koyama H., Arijji H., Yajima A. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res* 1999; 27:106–10.
54. Guzman-Marin R., Suntsova N., Methippara M., Greiffenstein R., Szymusiak R., McGinty D. Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 2005; 22:2111–6.
55. Torres-Farfan C., Richter H.G., Germain A.M., Valenzuela E.J., Campino C., Rojas-Garcia P. et al. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J Physiol* 2004; 554:841–56.
56. Torres-Farfan C., Valenzuela F.J., Germain A.M., Viale M.L., Campino C., Torrealba F. et al. Maternal melatonin stimulates growth and prevents maturation of the capuchin monkey fetal adrenal gland. *J Pineal Res* 2006; 41:58–66.
57. Tallia A.F., Cardone D.A., Howarth D.F., Ibsen K.H. Swanson's family practice review. St. Louis, MO: Mosby; 2005, 337 p.
58. Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:28.
59. Gupta S., Agarwal A., Banerjee J., Alvarez J.G. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2007; 62:335–47.
60. Simsek M., Naziroglu M., Simsek H., Cay M., Aksakal M., Kumru S. Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion. *Cell Biochem Funct* 1998; 16:227–31.
61. Sane A.S., Chokshi S.A., Mishra V.V., Barad D.P., Shah V.C., Nagpal S. Serum lipoperoxides in induced and spontaneous abortions. *Gynecol Obstet Invest* 1991; 31:172–5.
62. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:369–82.
63. Fait V., Sela S., Ophir E., Khoury S., Nissimov J., Tkach M. et al. Hyperemesis gravidarum is associated with oxidative stress. *Am J Perinatol* 2002; 19:93–8.
64. Lagod L., Paszkowski T., Sikorski R., Rola R. The antioxidant-prooxidant balance in pregnancy complicated by spontaneous abortion. *Ginekol Pol* 2001; 72:1073–8.
65. Nakamura Y., Tamura H., Takayama H., Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril* 2003; 80:1012–6.
66. Guerra M.O., Silva N.O., Guimaraes C.S., Souza J.P., Andrade A.T. Pinealectomy and blindness during pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 115:582–3.
67. Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M.A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003; 34:1–10.
68. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin. *Endocrine* 2005; 27:119–30.
69. Tan D.X., Manchester L.C., Sainz R.M., Mayo J.C., Leon J., Havdeland R. et al. Interaction between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J Pineal Res* 2005; 39:185–94.
70. Reiter R.J., Tan D.X., Gitto E., Sainz R.M., Mayo J.C., Leon J. et al. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol* 2004; 56:159–70.

71. Rosen J., Than N.N., Koch D., Poeggeler B., Laatsch H., Hardeland R. Interactions of melatonin and its metabolites with the ABTS cation radical: extension of the radical scavenger cascade and formation of a novel class of oxidation products, C2-substituted 3-indolinones. *J Pineal Res* 2006; 41:374–81.
72. Silva S.O., Rodrigues M.R., Carvalho S.R., Catalani L.H., Campa A., Ximenes V.F. Oxidation of melatonin and its catabolites N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J Pineal Res* 2004; 37:171–5.
73. Tan D.X., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L.J.D., Reiter R.J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and reactive nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; 42:28–42.
74. Manda K., Ueno M., Anzai K. AFMK a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. *J Pineal Res* 2007; 42:386–93.
75. Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martin V. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36:1–9.
76. Tomas-Zapico C., Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidant enzymes. *J Pineal Res* 2005; 39:99–104.
77. Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Rodriguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:1706–13.
78. Urata Y., Honma S., Goto S., Todoroki S., Iida T., Cho S. et al. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 838–47.
79. Carrillo-Vico A., Guerrero J.M., Lardone P.J., Reiter R.J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27:189–200.
80. Guerrero J.M., Reiter R.J. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med* 2002; 167–79. *Chem* 2.
81. Garceran-Perganeda A., Pozo D., Guerrero J.M., Calvo J.R. Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis-toxin sensitive G protein. *J Immunol* 1997; 159:3774–81.
82. Barjavel M.J., Mamdouh Z., Raghbati N., Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol* 1998; 160:1191–7.
83. Lopez-Gonzalez M.A., Calvo J.R., Segura J.J., Guerrero J.M. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotech Ther* 1993; 4:253–62.
84. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2001; 47:87–103.
85. Petrovsky N., Harrison L. The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol* 1998; 16:635–49.
86. Raghavendra V., Singh V., Kulkarni S.K., Agrewala J.N. Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists. *Mol Cell Biochem* 2001; 221: 57–62.

87. Waldmann H., Graca L., Cobbold S., Adams E., Tone M., Tone Y. et al. T cells and organ transplantation. *Semin Immunol* 2004; 16:119–26.
88. Kingsley C.L., Karim M., Bushell A.R., Wood K. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168:1080–6.
89. Labunets I.F., Butenko G.M., Khavinson V.Kh., Magdich L.V., Dragunova V.A., Pishel I.N. et al. Regulating effect of pineal gland peptides on development of T lymphocytes in CBA aging mice: role of microenvironment of immune system organs and neuroendocrine factors. *Adv Gerontol* 2003; 12:111–20.
90. Konakchieva R., Kyurkchiev S., Kehayov I., Taushanova P., Kanchev L. Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *J Neuroimmunol* 1995; 63:125–32.
91. Trundley A., Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63:1–12.
92. Tabiasco J., Rabot M., Aguerre-Girr M., Elcosta H., Berrebi A., Parant O. et al. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties—a review. *Placenta* 2006; 27(Suppl. A):S34–9.
93. Michou V.I., Kanavaros P., Athanassiou V., Chronis G.B., Stabamas S., Tsilivakos V. Fraction of the peripheral blood concentration of CD56+/CD16-/CD3-cells in total natural killer cells as an indication of fertility and infertility. *Fertil Steril* 2003; 80(suppl 2):691–7.
94. Currier N.L., Sun L.Z., Miller S.C. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J Neuroimmunol* 2000; 104:101–8.
95. Csapo A.I., Pulkinen M.O., Ruttner B., Sauvage J.P., Wiest W.G. The significance of the human corpus luteum in pregnancy maintenance. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 112:1061–7.
96. Nakamura Y., Tamura H., Takayama H., Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril* 2003; 80:1012–6.
97. Brzezinski A., Schenker J.G., Fibich T., Laufer N., Cohen M. Effects of melatonin on progesterone production by human granulosa lutein cells in culture. *Fertil Steril* 1992; 58:526–9.
98. Brun J., Claustrat B., David M. Urinary melatonin, LH oestradiol, progesterone excretion during the menstrual cycle or in women taking oral contraceptives. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987; 116:145–9.
99. Wetterberg L., Arendt J., Paunier L., Sizonenko P.C., Donselaar W., Heyden T. Human serum melatonin changes during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42:185–8.
100. Dair E.L., Simoes R.S., Simoes M.J. et al. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertil Steril* (in press).
101. Freeman M.E., Smith M.S., Nazian S.J., Neill J.D. Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 1974; 94:875–82.

102. Okuda K., Sakumoto R. Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:95–104.
103. Webb R., Woad K.J., Armstrong D.G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23:277–85.
104. Wiltbank M.C., Ottobre J. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:91–101.
105. Stormshak F. Biochemical and endocrine aspects of oxytocin production by the mammalian corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:92–7.
106. Penny L.A., Armstrong D., Bramley T.A., Webb R., Collins R., Watson E.D. Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis. *J Reprod Fertil* 1999; 115:87–96.
107. Sugino N., Takiguchi S., Kashida S., Karube A., Nakamura Y., Kato H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:19–25.
108. Abecia J.A., Lozano J.M., Forcada F. A preliminary study on effects of dietary energy and melatonin on the ex vivo production of progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub> by corpora lutea and endometrial tissue of ewes. *Vet Res Commun* 1999; 23:115–21.
109. Zisapel N. Melatonin–dopamine interactions: from basic neurochemistry to a clinical setting. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 21:605–16.
110. Brown M.A., Lindheimer M.D., de Swiet M., Van Assche A., Moutquin J.M. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Preg* 2001; 20:IX–XIV.
111. Walker J.J. Pre-eclampsia. *Lancet* 2000; 356:1260–5.
112. Zhang J., Meikle S., Trumble A. Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. *Hypertens Preg* 2003; 22:203–12.
113. van Beck E., Peeters L.L. Pathogenesis of preeclampsia: a comprehensive model. *Obstet Gynecol Surv* 1998; 53:233–9.
114. Atamer Y., Kocyigit Y., Yokus B., Atamer A., Erden A.C. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 119:60–6.
115. Aydin S., Benian A., Madazli R., Uludag S., Uzun H., Kaya S. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113:21–5.
116. Palan P.R., Shaban D.W., Martino T., Mikhail M.S. Lipid-soluble antioxidants and pregnancy: maternal serum levels of coenzyme Q10, alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in preeclampsia and normal pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 2004; 58:8–13.

117. Serdar Z., Gur E., Colakoethullary M., Develioethlu O., Sarandol E. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 268:19–25.
118. Walters-Laporte E., Furman C., Fouquet S., Martin-Nizard F., Lestavel S., Gozzo A. et al. A high concentration of melatonin inhibits in vitro LDL peroxidation but not oxidized LDL toxicity toward cultured endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32:582–92.
119. Wang Y., Gu Y., Zhang Y., Lewis D.F. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:817–24.
120. Wakatsuki A., Okatani Y., Ikenoue N., Shinohara K., Watanabe K., Fukaya T. Melatonin protects against oxidized low-density lipoprotein-induced inhibition of nitric oxide production in human umbilical artery. *J Pineal Res* 2001; 31:281–8.
121. Cagnacci A. Melatonin in regulation to physiology in adult humans. *J Pineal Res* 1996; 21:200–13.
122. Vaughan G.M., Becker R.A., Allen J.P., Vaughan M.K. Elevated blood pressure after pinealectomy in the rat. *J Endocrinol Invest* 1979; 2:281–4.
123. Holmes S.W., Sugden D. The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. *Br J Pharmacol* 1976; 56:360–1.
124. Tranquilli A.L., Turi A., Giannubilo S.R., Garbati E. Circadian melatonin concentration rhythm is lost in pregnant women with altered blood pressure rhythm. *Gynecol Endocrinol* 2004; 18:124–9.
125. Socol M.L., Garcia P.M., Riter S. Depressed Apgar scores, acid–base status and neurologic outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:991–8.
126. Perlman J.M. White matter injury in the preterm infant: an important determination of abnormal neurodevelopment outcome. *Early Hum Dev* 1998; 53:99–120.
127. Volpe J.J. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001; 50:553–62.
128. Rocha G., Proence E., Quintas C., Rodrigues T., Guimar H. Chorioamnionitis and brain damage in the preterm newborn. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20:745–9.
129. Nordstrom L., Arulkumaran S. Intrapartum fetal hypoxia and biochemical markers: a review. *Obstet Gynecol Surv* 1998; 53:645–57.
130. Schmidt H., Grune T., Muller R., Siems W.G., Wauer R.R. Increased levels of lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia. *Pediatr Res* 1996; 40:15–20.
131. Wang W., Pang C.C.P., Rogers M.S., Chang A.M.Z. Lipid peroxidation in cord blood at birth. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:62–5.
132. Rogers M.S., Wang W., Mongelli M., Pang C.P., Duley J.A., Chang A.M.Z. Lipid peroxidation in cord blood at birth: a marker of fetal hypoxia during labor. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 44:229–33.

133. Okatani Y., Wakatsuki A., Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res* 2000; 28:89–96.
134. Macleod M.R., O'Collins T., Horkey L.L., Howells D.W., Donnan G.A. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of melatonin in experimental stroke. *J Pineal Res* 2005; 38:35–41.
135. Chung S.Y., Han S.H. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. *J Pineal Res* 2003; 34:95–102.
136. Husson I., Mesples B., Bac P., Vamecq J., Evrard P., Gressens P. Melatoninergic neuroprotection of the murine periventricular whitematter against neonatal excitotoxic challenge. *Ann Neurol* 2002; 51:82–92.
137. Gitto E., Karbownik M., Reiter R.J., Tan D.X., Cuzzocrea S., Chiurazzi P. et al. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res* 2001; 50:756–60.
138. Fulia F., Gitto E., Cuzzocrea S., Reiter R.J., Dugo L., Gitto P. et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res* 2001; 31:343–9.
139. Watanabe K., Wakatsuki A., Shinohara K., Ikenoue N., Yokota K., Fukaya T. Maternally administered melatonin protects against ischemia and reperfusion-induced oxidative mitochondrial damage in premature fetal rat brain. *J Pineal Res* 2004; 37:276–80.
140. Miller S.L., Yan E.B., Castillo-Melendez M., Jenkin G., Walker D.W. Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion. *Dev Neurosci* 2005; 27:200–10.
141. Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Etem E., Nedzvetsky V.S. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. *J Pineal Res* 2007; 43:225–31.
142. Anderka M., DeClercq E.R., Smith W. A time to be born. *Am J Public Health* 2000; 90:124–6.
143. Wellings K., MacDowall W., Catchpole M., Goodrich J. Seasonal variations in sexual activity and their implications for sexual health promotion. *J R Soc Med* 1999; 92:60–4.
144. Kaiser I.H., Halberg F. Circadian periodic aspects of birth. *Ann NY Acad Sci* 1962; 98:1056–68.
145. King P.D. Increased frequency of birth in the morning hours. *Science* 1956; 123:985–6.
146. Boer K., Lincoln D.W., Swaab D.F. Effects of electrical stimulation of the neurohypophysis on labour in the rat. *J Endocrinol* 1975; 65:163–76.
147. Lincoln D.W., Porter D.G. Photoperiodic dissection of endocrine events at parturition. *Anim Reprod Sci* 1979; 2:97–115.
148. Bosc M.J., Nicolle A. Influence of photoperiod on the time of parturition in the rat. II. Demonstration of a photoinducible phase and determination of some of its characteristics. *Reprod Nutr Dev* 1980; 20:939–48.

149. Longo L.D., Yellon S.M. Biological timekeeping during pregnancy and the role of circadian rhythms in parturition. In: Kunzel W, Jensen A, editors. *The endocrine control of the fetus*. Berlin: Springer-Verlag; 1988. P. 73–92.

### **Мелатонин и сердечно-сосудистая система**

#### **Продукция мелатонина у больных с патологией сердечно-сосудистой системы**

Наличие циркадианной ритмики артериального [1] и центрального венозного давления у людей [2] свидетельствует об участии мелатонина и в регуляции функций сердечно-сосудистой системы. В пользу этого говорит также присутствие рецепторов к мелатонину в мышечном слое и эндотелии сосудов [3, 4].

В экспериментах на животных выявлено, что пинеалэктомия приводит к стойкому повышению артериального давления (АД) [5], уровень которого снижается до нормальных цифр при экзогенном введении мелатонина [6]. У пинеалэктомированных животных также определена повышенная чувствительность рецепторного аппарата сосудов к вазоконстрикторным агентам [7]. В большом числе исследований на животных в условиях повышенного тонуса артериальных сосудов *in vitro* и *in vivo* продемонстрировано, что как физиологические, так и фармакологические дозировки мелатонина оказывают значимый сосудорасширяющий эффект [8, 9]. В многочисленных экспериментальных исследованиях на крысах с генетически обусловленной спонтанной гипертензией введение фармакологических и физиологических доз мелатонина приводило к снижению цифр среднего АД (СрАД), систолического (САД) и диастолического АД (ДАД), урежению частоты сердечных сокращений (ЧСС), во время как у нормотензивных крыс линии Вистар – Киото введение мелатонина не оказывало значимого влияния на уровень АД [10–16]. При интраназальном введении 2 мг М ежедневно в течение 7 дней больным эссенциальной гипертензией отмечалось снижение цифр ДАД, в среднем, на 30 мм рт. ст. [17]. В то же время пероральный прием 1 мг мелатонина здоровыми добровольцами приводил к снижению как САД, так и ДАД, только в пределах нормальных физиологических колебаний АД [18]. Очевидно, что влияние мелатонина на сосудистый тонус неоднозначно и зависит от исходного состояния сосудов. В частности, в условиях искусственно созданной гипотонии (на модели эндотоксического бактериального шока у мышей) [19] введение мелатонина приводило к достоверному уменьшению смертности и повышению резко сниженного в ус-

ловиях шока АД, что объясняют ингибцией продукции оксида азота, не связанного с подавлением секреции NO – синтазы Th – хелперами и макрофагами. Снижение летальности у мышей, получавших мелатонин, связывают с его антиоксидантными свойствами.

Механизмы, посредством которых мелатонин оказывает влияние на сосудистый тонус, включают в себя: связывание мелатонина с собственными рецепторами гладкомышечных клеток и эндотелия сосудов [20, 21], воздействие на адренергические и пептидергические (ВИП и субстанция Р) окончания периваскулярных нервов [22, 23], воздействие на адренергические рецепторы или вторичные мессенджеры в цепи адренергической стимуляции мышечного сокращения [21], блокирование серотонинергической стимуляции гладкомышечного сокращения [20], ингибирование секреции серотонина структурами ЦНС [24] и тромбоцитами [25], вазопрессина гипоталамусом [26] и норадреналина надпочечниками [18]. Помимо вышеперечисленных эффектов [14] в эксперименте на крысах со спонтанной гипертензией выявили стимулирующее влияние мелатонина на продукцию NO-синтазы клетками эндотелия сосудов с последующим увеличением продукции оксида азота и вазодилатацией. У пожилых постменопаузальных женщин, получавших гормональную заместительную терапию (ГЗТ), ежедневный прием мелатонина в дозе 1 мг приводил к снижению цифр САД, в среднем на 8 мм рт. ст., а ДАД – на 4 мм рт. ст. [27]. Авторами отмечено повышение продукции оксида азота на фоне приема мелатонина по сравнению с исходным уровнем. Полученные результаты позволили авторам рекомендовать добавление мелатонина в схему ГЗТ (гормона заместительная терапия) для профилактики возникновения сердечно-сосудистых заболеваний.

Исследование [28], проведенное у 47 больных гипертонической болезнью, находившихся на терапии пролонгированным нифедипином в суточной дозе 30 или 60 мг., показало, что на фоне терапии мелатонина у всех пациентов наблюдается достоверное повышение среднесуточного САД на 6,5 мм рт. ст., ДАД – на 4,9 мм рт. ст. и увеличение среднесуточной ЧСС на 3,9 уд. в мин. Основываясь на экспериментальных исследованиях на крысах [29], продемонстрировавших способность мелатонина блокировать поступление ионов  $Ca^{2+}$  в кардиомиоциты, представляется, что мелатонин может конкурентно ингибировать  $Ca^{2+}$  – каналы клеточных мембран, ослабляя эффекты нифедипина.

Практически всеми авторами, изучавшими эффекты мелатонина на крысах с генетически обусловленной спонтанной гипертензией, отмеча-

ется, что гипотензивные эффекты мелатонина обусловлены его прооксидантной и антиоксидантной активностью. В этой связи безусловный интерес представляет исследование [13], в котором определено снижение антиоксидантной активности клеток эндотелия сосудов и их повышенная чувствительность к свободно-радикальному повреждению у крыс со спонтанной гипертензией по сравнению с нормотензивными крысами линии Вистар–Киото. При длительном (в течение 6 недель) введении мелатонина в дозе 10 мг на 100 мл питьевой воды крысам со спонтанной гипертензией продемонстрировано, что гипотензивный эффект М обусловлен, помимо вышеперечисленных эффектов, также его способностью снижать на 40–60% инфильтрацию почечной ткани лимфоцитами, макрофагами и ангиотензин II – позитивными клетками. У животных, получавших мелатонин, по сравнению с крысами контрольной группы достоверно снижалось содержание в почечной ткани супероксида и малонового диальдегида [16].

Несмотря на многочисленность экспериментальных исследований, касающихся гипотензивных эффектов мелатонина при исходно повышенном АД и их механизмов, в литературе имеются единичные экспериментальные работы, посвященные изучению продукции самого мелатонина на моделях животных с генетически обусловленной спонтанной гипертензией, в то время как данные исследования позволили бы судить, что является первопричиной: генетически обусловленное снижение продукции М, приводящее к формированию гипертензии, или относительная недостаточность его продукции, возникающая в процессе формирования самого заболевания. О правомочности первого предположения свидетельствуют вышеприведенные экспериментальные данные о стойком повышении АД у пинеалэктомированных животных, введение которым мелатонина приводило к снижению АД [5]. В пользу второго предположения говорит исследование [10], в котором выявлено, что у молодых крыс с генетически обусловленной спонтанной гипертензией в “догипертоническую” стадию уровень мелатонина в крови в ночное время (12 часов ночи) был достоверно выше, чем у нормотензивных крыс линии Вистар–Киото аналогичного возраста (5 недель). У взрослых крыс (15 недель) со сформированной гипертензией уровень в крови мелатонина в ночное время был достоверно ниже, чем у нормотензивных крыс этого же возраста. Дневные уровни мелатонина в крови крыс разного возраста со спонтанной гипертензией не отличались от таковых у нормотензивных крыс. Авторы исследования считают, что механизм низкой про-

дукции мелатонина в ночное время у крыс со спонтанной гипертензией обусловлен относительной недостаточностью ферментных систем, участвующих в трансформации триптофана в мелатонин. В связи с тем, что, по мнению авторов, мелатонин является одним из главных эндогенных центральных гипотензивных факторов, повышенная потребность в нем в условиях сформированной гипертензии приводит к истощению ферментных систем его синтеза с последующим снижением его продукции в интервале времени, когда в физиологических условиях отмечается пик эпифизарной секреции М. Подтверждением данной гипотезы служит исследование, проведенное [30] у 15 больных ИБС. Авторами выявлено снижение концентрации мелатонина в крови больных в ночное время суток [31], в то время как его концентрация в крови в дневное время [32] у больных не отличалась от таковой в группе здоровых, сравнимых по возрасту. При исследовании концентрации серотонина, являющегося промежуточным субстратом в цепочке последовательной трансформации триптофана в мелатонин, определено его достоверное снижение в крови больных ИБС в дневное время и тенденция к снижению его уровня в крови в ночное время по сравнению со здоровыми. Концентрация в крови больных N-ацетилсеротонина, непосредственного прекурсора мелатонина, была повышена как в ночное, так и в дневное время. Авторы исследования считают, что у больных ИБС имеет место относительная недостаточность, возможно генетически обусловленная, фермента гидрокси-О-метилтрансферазы, необходимого для трансформации N-ацетилсеротонина в мелатонин, что и реализуется в снижении ночной продукции мелатонина, когда нагрузка на эту ферментную систему многократно возрастает по сравнению с дневными часами. Представляет интерес гипотеза, высказанная о том [33], что патология беременности с нарушением внутриутробного питания плода, может приводить к гипоплазии эпифиза с последующим снижением продукции мелатонина и, как следствием этого, ранним развитием атеросклероза с поражением коронарных артерий и артерий мозга. Представляется, что данная гипотеза имеет право на существование только при сочетании с другими факторами риска возникновения раннего атеросклероза. С учетом прооксидантных и антиоксидантных эффектов мелатонина, роль снижения его продукции в патогенетических механизмах атеросклеротического поражения артерий в настоящее время активно обсуждается [34]. В обзоре [35] приводятся сведения об исследовании продукции мелатонина у больных с гиперхолестеринемией (ЛПНП-холестерина). Автор указывает на обрат-

ную корреляционную зависимость между уровнем в крови ЛПНП-холестерина и уровнем продукции мелатонина эпифизом.

На современном этапе не вызывает сомнений, что нарушение продукции мелатонина может играть значимую роль в патогенетических механизмах возникновения коронарной патологии. Об этом свидетельствуют как эффекты самого мелатонина, так и клинические исследования, в которых продемонстрировано снижение его ночной продукции у больных ИБС [37, 38], кардиальным синдромом Х [38], а также достоверно более низкая ночная продукция мелатонина у больных со стенокардией покоя по сравнению с больными со стенокардией напряжения [39], отсутствие у больных коронарной патологией возрастной динамики секреции мелатонина эпифизом, характерной для здоровых [40], выявленное в большинстве исследований отсутствие эффекта подавления продукции мелатонина при приеме  $\beta$ -адреноблокаторов у больных ИБС [37, 40]. В экспериментальных работах на животных продемонстрированы протективные эффекты М при моделировании ишемически-реперфузионного поражения миокарда, мозга, почек, кишечника [34, 40–42]. Авторы исследований связывают протективные свойства мелатонина с его про- и антиоксидантными эффектами, торможением миграции нейтрофилов в очаг поражения, ингибированием секреции активных факторов воспаления иммунокомпетентными клетками, торможением агрегации тромбоцитов, улучшением микроциркуляции в очаге ишемии. Кардиопротективные эффекты мелатонина при ишемически-реперфузионном поражении миокарда обусловлены не только его способностью оказывать влияние на размеры очага поражения, но и уменьшать частоту появления и тяжесть желудочковых аритмий и фибрилляций, а, следовательно, в целом, снижать летальность [40]. В исследовании [43] на крысах продемонстрировано, что физиологические дозы мелатонина обладают не меньшим кардиопротективным эффектом, чем фармакологические дозы мелатонина. Авторы считают, что применение мелатонина в низких дозах, близких к физиологическим, у лиц пожилого возраста, когда уровень и амплитуда продукции мелатонина снижены, позволило бы уменьшить частоту внезапной коронарной смерти.

Изучению антиагрегационных свойств мелатонина посвящен целый ряд работ. В исследовании [44] на тромбоцитах человека продемонстрировано ингибирующее влияние мелатонина на их агрегацию. Определено, что чувствительность рецепторов к мелатонину на тромбоцитах имеет циркадианную ритмику с минимумом в утренние часы и миниму-

мом в вечерние и ночные [45]. В ночное время пик чувствительности тромбоцитарных рецепторов к мелатонину предшествует секреторному пику самого мелатонина [44]. Показано, что количество мелатонина, необходимое для ингибирования агрегации тромбоцитов *in vitro* в утренние часы в 100 раз выше, чем количество мелатонина, требуемого для вызывания аналогичного эффекта в вечернее и ночное время [45]. Одним из механизмов, посредством которых мелатонин оказывает ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, является подавление М выделения серотонина тромбоцитами, оказывающего местное вазоконстрикторное действие [25]. Авторами исследования показано, что эффективность ингибиции мелатонином выделения серотонина тромбоцитами также минимальна в утренние часы [25]. Совокупность выявленного снижения чувствительности тромбоцитарных рецепторов к мелатонину в утренние часы и минимального ингибирующего эффекта мелатонина в отношении выделения серотонина тромбоцитами в это же время суток позволила авторам исследования предположить наличие взаимосвязи между выявленными феноменами и частым возникновением острых коронарогенных состояний у больных ИБС в утренние часы [25]. В пользу данной гипотезы также свидетельствует определенное в целом ряде исследований снижение продукции М в ночные часы.

Таким образом, приведенные литературные данные отчетливо демонстрируют изменения продукции мелатонина у больных сердечно-сосудистой патологией. На настоящем этапе нельзя однозначно ответить на вопрос, что первично: генетически обусловленные нарушения продукции мелатонина, приводящие, наряду с другими факторами, к формированию патологии сердечно-сосудистой системы или в результате повышенной потребности в мелатонина в связи с наличием сердечно-сосудистой патологии истощаются резервные возможности ферментных систем, участвующих в его синтезе, с последующим снижением его ночной секреции эпифизом. Возможно, что имеют место оба механизма.

Было проведено исследование продукции мелатонина у 54-х больных нейроциркуляторной дистонией (НЦД), гипертонической болезнью II стадии (ГБ II ст.), ИБС различных функциональных классов. Целью исследования явилось не только изучение секреции мелатонина при различных патологиях сердечно-сосудистой системы, но и оценка влияния тяжести патологии на уровень его продукции и суточную ритмику. Этим исследованием было подтверждено предположение об изменении продукции мелатонина у больных с заболеваниями сердечно-сосудистой

системы. Авторы делают вывод, что повышение продукции мелатонина у больных НЦД является свидетельством активизации компенсаторных механизмов на стадии функциональных расстройств с последующим истощением резервных возможностей на стадии формирования соматического заболевания. По мере увеличения степени тяжести сердечно-сосудистой патологии снижается не только продукция мелатонина в целом, но и резко нарушается ритмика его продукции с отсутствием достоверных различий между дневными и ночными уровнями.

#### **Влияние колебаний электромагнитного поля земли на продукцию мелатонина у больных сердечно-сосудистой патологией**

Интерес к проблеме влияния колебаний естественного электромагнитного поля Земли (ЭМПЗ) на продукцию мелатонина обусловлен как теоретическими, так и практическими аспектами этой проблемы [46].

В связи с тем, что начальным этапом фотопериодической регуляции ритма секреции мелатонина является восприятие световых импульсов сетчаткой с последующей передачей информации о светопериоде по ретиногипоталамическому тракту, наличие магнорецепторных свойств у палочек сетчатки [47] позволяет предполагать, что воспринимаемые ей колебания ЭМПЗ также могут оказывать влияния на продукцию мелатонина эпифизом. Подтверждением этому являются экспериментальные исследования, выполненные на животных при моделировании в лабораторных условиях колебаний электромагнитных полей аналогичных по силе ЭМПЗ. Показано, что колебания слабых электромагнитных полей подавляют активность эпифизарной N-ацетилтрансферазы, являющейся лимитирующим ферментом в цепи реакций трансформации серотонина в мелатонин [48], снижают электрическую активность пинеалоцитов [49] и содержание в них цАМФ [50], и ингибируют синтез мелатонина [51]. Другим, не менее важным фактом, логически вытекающим из изменения функций эпифиза в ответ на колебания слабых электромагнитных полей, является феномен изменения циркадианных ритмов физиологических функций животных в результате колебаний искусственных электромагнитных полей аналогичных по силе ЭМПЗ [52]. Данный факт позволил исследователям предположить, что колебания ЭМПЗ могут являться дополнительным внешним синхронизирующим фактором (кроме фотопериода) эндогенных ритмов живых организмов.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* у животных, а также в исследованиях на добровольцах продемонстрировано, что колебания искусствен-

ных электромагнитных полей аналогичных по силе ЭМПЗ изменяют проницаемость клеточных мембран, посредством снижения их гидрофобности [53] и повышают активность  $\text{Ca}^{2+}$  каналов клеточных мембран [54].

Помимо слабых колебаний ЭМПЗ существуют колебания, расцениваемые как геомагнитные возмущения или бури, характеризующиеся резкими изменениями параметров геомагнитного поля Земли [55]. Известно, что частота и интенсивность геомагнитных возмущений и бурь строго зависит от солнечной активности, имеющей циклический характер с периодом 11,1 года. Наибольшее количество геомагнитных возмущений и бурь приходится на вторую половину солнечного цикла [56]. Кроме того, геомагнитные возмущения и бури имеют строгую сезонную ритмику с максимумами в периоды равноденствия, то есть в переходные сезоны года [57].

В литературе имеются единичные исследования, в которых изучалось влияние колебаний естественных, а не искусственно смоделированных, ЭМПЗ на продукцию мелатонина. В эксперименте на крысах, при содержании их в течение 2-х лет в условиях искусственного фотопериода, показано наличие сезонной ритмики продукции мелатонина, совпадающей с ритмом горизонтальной Н-компоненты ЭМПЗ [39]. В исследованиях, проведенных на людях в условиях крайнего Севера [58], выявлено изменение суточной ритмики продукции мелатонина в периоды геомагнитных возмущений и бурь. У здоровых добровольцев в условиях высоких северных широт в разные сезоны года [59] показана прямая корреляционная зависимость между колебаниями ЭМПЗ (смотрели по величине К-индекса, измеряемого с 3-х часовыми интервалами в течение суток) и суточным ритмом секреции мелатонина (суточный ритм продукции мелатонина определяли по его концентрации в слюне).

Все вышеперечисленное позволяет предполагать, что, помимо фотопериода, в механизмах регуляции ритмической продукции мелатонина принимают участие колебания ЭМПЗ. С другой стороны, чрезмерные по интенсивности колебания (геомагнитные возмущения и бури) могут оказывать патологическое влияние на организм человека, вероятно, посредством подавления продукции мелатонина и нарушения ритмики его продукции.

Научным коллективом под руководством С.И. Рапопорта в 2006 г. [60] было проведено исследование влияния колебаний ЭМПЗ на секрецию мелатонина у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями на выборке из 42 больных с гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца разных функциональных классов.

Данным исследованием было доказано, что у больных с заболеваниями сердечнососудистой системы в периоды геомагнитных возмущений и магнитных бурь отмечается достоверное подавление продукции мелатонина.

### Список литературы

1. Portaluppi F., Montanari L., Bagni B. et al. Circadian rhythms of atrial natriuretic peptide, blood pressure and heart rate in normal subjects. // *Cardiology*. – 1989. – V.76. – P.428–432.
2. Engel B.T., Talan M.I. Diurnal variations in central venous pressure. // *Acta. Physiol. Scand.* – 1991. – V.141. – P.273–278.
3. Viswanathan M., Laitinen J.T., Saavedra J.M. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1990. – V.87. – P.6200–6203.
4. Stankov B., Capsoni S., Lucini V. et al. Autoradiographic localization of putative receptors in the brains of two old world primates: cercopithecus aethiops and papio ursinus. // *Neuroscience*. – 1993. – V.52. – P.459–468.
5. Vaughan G.M., Becker R., Allen J., Vaughan M. Elevated blood pressure after pinealectomy in the rat. // *J. Endocrinol. Invest.* – 1979. – V.2. – P.281–286.
6. Holmes S.W., Sugden D. The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. // *Br. J. Pharmacol.* – 1976. – V.56. – P.360–364.
7. Karppanen H., Vapatolo H., Lahovara S., Pasonen M.K. Pinealectomy-induced hypertension in rats. // *Acta Physiol. Scand. Suppl.* – 1969. – V.330. – P.94–101.
8. Weekley B.L. Melatonin-induced relaxation of rat aorta: interaction with adrenergic agonists. // *J. Pineal Res.* – 1991. – V.11. – P.28–34.
9. Shibata S., Satake N., Takagi T., Usui H. Vasorelaxing action of melatonin in rabbit basilar artery. // *Gen. Pharmacol.* – 1989. – V.20. – P.677–680.
10. Kawashima K., Nagakura A., Wurzbarger R.J., Spector S. Melatonin in serum and the pineal of spontaneously hypertensive rats. // *Clin. Exp. Hypertens. A.* – 1984. – V.6. – P.1517–28.
11. Kawashima K., Miwa Y., Fujimoto K., Oohata H., Nishino H., Koike H. Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. // *Clin. Exp. Hypertens. A.* – 1987. – V.9. – P.1121–31.
12. K-Laflamme A., Wu L., Foucart S., de Champlain J. Impaired basal sympathetic tone and alpha1-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. // *Am. J. Hypertens.* – 1998. – V.11. – P.219–29.
13. Wu L., Wang R., de Champlain J. Enhanced inhibition by melatonin of alpha-adrenoceptor-induced aortic contraction and inositol phosphate production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. // *J. Hypertens.* – 1998. – V.16. – P.339–47.

14. Girouard H., Chulak C., Lejossec M., Lamontagne D., de Champlain J. Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. // *J. Hypertens.* – 2001. – V.19. – P.1369–77.
15. Girouard H., Chulak C., LeJossec M., Lamontagne D., De Champlain J. Chronic antioxidant treatment improves sympathetic functions and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rats. // *J. Hypertens.* – 2003. – V.21. – P.179–88.
16. Nava M., Quiroz Y., Vaziri N., Rodriguez-Iturbe B. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – V.284. – P.F447–54.
17. Birau N., Peterssen U., Meyer C., Goyyschalk J. Hypotensive effect of melatonin in essential hypertension. // *IRSC Med. Sci.* – 1981. – V.9. – P.906.
18. Cagnacci A., Arangino S., Angiolucci M., et al. Potentially beneficial cardiovascular effects of melatonin administration in women. // *J. Pineal Res.* – 1997. – V.22. – P.16–19.
19. Maestroni G.J.M. Melatonin as therapeutic agent in experimental endotoxic shock // *J. Pineal Res.* – 1996. – V.20. – P.84–89.
20. Satake N., Oe H., Sawada T., Shibata S. Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta: possible endothelium dependent relaxation. // *Gen. Pharmacol.* – 1991. – V.22. – P.1127–1133.
21. Weekley L.B. Effects of melatonin on isolated pulmonary artery and vein: role of vascular endothelium. // *Pulm. Pharmacol.* – 1993. – V.6. – P.149–154.
22. Weekley L.B. Effects of melatonin on pulmonary and coronary vessels are exerted through perivascular nerves. // *Clin. Auton. Res.* – 1993a. – V.6. – P.149–154.
23. Weekley L.B. Pharmacologic studies on the mechanism of melatonin-induced vasorelaxation in rat aorta. // *J. Pineal Res.* – 1995. – V.19. – P.133–138.
24. Chuang J.I., Chen S.S., Lin M.T. Melatonin decrease brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. // *Pharmacology.* – 1993. – V.47. – P.91–97.
25. Martin F.J., Atienza G., Aldegunde M., Miquez J.M. Melatonin effect on serotonin uptake and release in rat platelets: diurnal variation in responsiveness. // *Life Sci.* – 1993. – V.53. – P.1079–1087.
26. Yasin S., Bojanowska E., Forsling M.L. The in vivo effect of melatonin on neurohypophysial hormone release in the rat. // *J. Physiol.* – 1994. – V.475. – P.142–5.
27. Cagnacci A., Arangino S., Angiolucci M., Melis G.B., Facchinetti F., Malmusi S., Volpe A. Effect of exogenous melatonin on vascular reactivity and nitric oxide in postmenopausal women: role of hormone replacement therapy. // *Clin. Endocrinol.* – 2001. – V.54. – P.261–6.
28. Lusardi P., Piazza E., Fogari R. Cardiovascular effects of melatonin in hypertensive patients well controlled by nifedipine: a 24-hour study. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2000. – V.49. – P.423–7.
29. Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Qi W., Kim S.J., El-Sokkary G.H. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. // *J. Pineal Res.* – 1998. – V.25. – P.184–91.

30. Marktl W., Brugger P., Herold M. Melatonin and coronary heart disease. // *Wien. Klin. Wochenschr.* – 1997. – V.109. – P.747–9.
31. Vaughan MK, Vaughan GM, Reiter RJ (1976) Inhibition of human chorionic gonadotrophin-induced hypertrophy of the ovaries and uterus in immature mice by some pineal indoles, 6-hydroxymelatonin and arginine vasotocin. *J Endocrinol* 68:397–400.
32. Wakatsuki, A., Okatani, Y., Shinohara, K., Ikenoue, N., Kaneda, C., and Fukaya, T. (2001). *J. Pineal Res.* 30, 22–28.
33. Maurizi C.P. Short note: The fetal origins hypothesis: linking pineal gland hypoplasia with coronary heart disease and stroke. // *Med. Hypotheses.* – 1998. – V.50. – P.357–8.
34. Cuzzocrea S., Reiter R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2001. – V.426. – P.1–10.
35. Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system. // *Neuroendocrinol. Lett.* – 2002. – V.23. – Suppl. 1. – P.79–83.
36. Brugger P., Marktl W., Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. // *Lancet.* – 1995. – V.345. – P.1408.
37. Sakotnik A., Liebmann P.M., Stoschitzky K., Lercher P., Schauenstein K., Klein W., Eber B. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. // *Eur. Heart J.* – 1999. – V.20. – P.1314–7.
38. Altun A., Yaprak M., Aktöz M., Vardar A., Betül U.A., Ozbay G. Impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with cardiac syndrome X. // *Neurosci. Lett.* – 2002. – V.327. – P.143–5.
39. Girotti L., Lago M., Ianovsky O., Carbajales J., Elizari M.V., Brusco L.I., Cardinali D.P. Low urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in patients with coronary artery disease. // *J. Pineal Res.* – 2000. – V.29. – P.138–42.
40. Lee Y.M., Chen H.R., Hsiao G., Sheu J.R., Wang J.J., Yen M.H. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. // *J. Pineal Res.* – 2002. – V.33. – P.72–80.
41. Pei Z., Pang S.F., Cheung R.T. Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. // *J. Pineal Res.* – 2002. – V.32. – P.168–72.
42. Sener G., Sehirlı A.O., Keyer-Uysal M., Arbak S., Ersoy Y., Yegen B.C. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. // *J. Pineal Res.* – 2002. – V.32. – P.120–6.
43. Sahna E., Olmez E., Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: can the incidence of sudden cardiac death be reduced? // *J. Pineal Res.* – 2002. – V.32. – P.194–8.
44. Vacas M.I., Del Zar M.M., Martinuzzo M., et al. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane B2 production by melatonin. Correlation with plasma melatonin levels. // *J. Pineal Res.* – 1991. – V.11. – P.135–139.

45. Del Zar M.M., Martinuzzo M., Falcon C., et al. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane B2 production by melatonin. Evidence for a diurnal variation. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1990. – V.70. – P.246–251.
46. Т.К. Бреус, С.И. Рапопорт (2003). Магнитные бури: медико-биологические и геофизические аспекты, Советский спорт, 2003. – 192 с.:ил.
47. Cope F.W. On the relativity and uncertainty of electromagnetic energy measurement at a superconductive boundary. Application to perception of weak magnetic fields by living systems. // *Physiol. Chem. Phys.* – 1981. – V.13. – P.231–239.
48. Welker H.A., Semm P., Willig R.P., et al. Effects of an artificial magnetic field on serotonin N-acetyl-transferase activity and melatonin content of the rat pineal gland. // *Explor. Brain Res.* – 1983. – V.50. – P.426–432.
49. Semm P., Schneider T., Vollrath L. Effects of an earth strength magnetic field on electrical activity of pineal cells. // *Nature.* – 1980. – V.288. – P.607–608.
50. Rudolph K., Wirz-Justice A., Krauchi K., et al. Static magnetic fields decrease nocturnal pineal cAMP in the rat. // *Brain Res.* – 1988. – V.446. – P.159–160.
51. Olcese J., Reuss S., Vollrath L. Evidence for the involvement of the visual system in mediating magnetic field effects on pineal melatonin synthesis in the rat. // *Brain Res.* – 1985. – V.333. – P.382–384.
52. Gribble R.E. The effect of extremely low frequency electromagnetic fields on the circadian biorhythms of common mice. // *Chronobiologia (suppl.)*. – 1975. – V.1. – P.24–25.
53. Tenforde T.S., Kaune W.T. Interaction of extremely low frequency electric and magnetic fields with humans. // *Health Physics.* – 1987. – V.53. – P.585–606.
54. Kavaliers M., Ossenkopp K.P. Calcium channel involvement in magnetic field inhibition of morphine induced analgesia. // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1987. – V.336. – P.308–315.
55. Vestine E.H. Main geomagnetic field. In: *Physics of geomagnetic phenomena.* (ed. W.H.Campbell). – New York : Academic Press. – 1967. – V.1. – P.181–235.
56. Meyers H., Allen J.H. Some summary geomagnetic activity data: 1932–1976 (NGSDC data fact sheet № 1). – Boulder, Colorado: National geophysical data center. – 1977.
57. Allen J.H., Kihn E.A. Major magnetic storms: Ap\* (1932–1989) and AA\* (1868–1988). Boulder, Colorado: National geophysical data center. – 1990.
58. Dubbels R. Possible effects of the magnetic field in the Antarctic on urinary melatonin in man. // 6th Intern. Congress of Eye Res. – Alicanta. – Spain. – 1984. – Ref. № 0003.
59. Weydah A., Sothorn R.B., Cornelissen G., Wetterberg L. Geomagnetic activity influences the melatonin secretion at latitude 70 degrees N. // *Biomed. Pharmacother.* – 2001. V.55. – Suppl 1. – P. 57s–62s.
60. Рапопорт С.И., Бреус Т.К., Клейменова Н.Г. с соавт. Геомагнитные пульсации и инфаркты миокарда // *Терапевтический архив.* – 2006 – №4. – С. 56–61.

### **Мелатонин в органах желудочно-кишечного тракта**

#### **Роль нарушений обмена мелатонина в развитии заболеваний ЖКТ**

В последние годы большое внимание обращено на роль М в функционировании желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1, 2], синтезируемому в ЕС-клетках желудочно-кишечного тракта [3, 4].

В ЖКТ синтезируется в 400 раз больше мелатонина, чем в эпифизе [5], но его действие в основном местное (паракринное, аутокринное, нейрокринное), т.к. до 95% мелатонина, синтезированного в ЖКТ, поступая в портальную вену, метаболизируется в печени [6]. Биоритмы содержания мелатонина в ЖКТ в основном регулируются приемом и характером пищи, имеются и центральные пути регуляции синтеза мелатонина в ЖКТ [6].

Мелатонин в ЖКТ, действуя на гладкую мускулатуру, ингибирует его моторику, в т.ч. стимулируемую различными агентами (серотонин, КСI и др.), блокирует действие холецистокинина, активирующего сократительную способность ЖКТ [7]. Мелатонин регулирует поступление  $Ca^{2+}$  в клетку путем влияния на активность  $Ca^{2+}$ -каналов и  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^{+}$ -каналов клеточных мембран [8].

Мелатонин так же ингибирует холинэргические никотиновые каналы клеток нервных сплетений подслизистой кишки [9], что свидетельствует не только о прямом (пара- и аутокринном), но и о нейрокринном пути воздействия мелатонина на моторику ЖКТ.

Мелатонин так же обуславливает релаксацию гладкой мускулатуры кровеносных сосудов ЖКТ [8] путем действия на каналы клеточных мембран. Мелатонин нивелирует, вызванное серотонином, сокращение гладкой мускулатуры кровеносных сосудов ЖКТ. Между действием мелатонина и серотонина имеется сбалансированная система, как в ЦНС, так и в ЖКТ [10], как между мелатонином и другими гормонами (гастрином, холецистокинином, соматостатином и пр.) в отношении регуляции различных функций ЖКТ [6].

#### **Мелатонин и язвенная болезнь**

До настоящего времени в этиопатогенезе язвенной болезни остаются неясные вопросы, на которые не может ответить ни одна из существующих теорий. В первую очередь, это касается суточной ритмики клинических проявлений заболевания и сезонности его обострений. Полученные в последние годы данные о генетической природе биоритмов человеческого организма, а также о сущности феномена дезадаптации как о

результате рассогласования генетически детерминированных эндогенных ритмов организма и ритмов внешней среды [11], обосновывают принципиально новую концепцию о роли мелатонина в патогенезе как собственно язвенной болезни (ЯБ), так и ее сезонных обострениях. С учетом вышперечисленных свойств мелатонина, как на уровне целого организма, так и на уровне органов желудочно-кишечного тракта (участие в механизмах регуляции моторики, микроциркуляции, пролиферации и возможное участие в регуляции секреторной функции), представляется вероятным, что нарушения количества и ритмики (суточной и сезонной) продукции мелатонина могут играть важную роль в патогенетических механизмах возникновения и обострений ЯБ.

В рамках изучения роли нарушения продукции мелатонина в патогенезе язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки было проведено исследование секреции мелатонина у больных ЯБДК и ЯБЖ в стадию обострения и полной ремиссии заболевания [12]. Результаты работы (в исследование было включено 80 пациентов однородной по возрасту и полу группы с контрольной группой из 15 человек) выявили грубые нарушения продукции мелатонина у больных ЯБ в стадию обострения, уменьшающиеся, но не исчезающие полностью в стадию ремиссии заболевания. Был сделан вывод о том, что наличие нарушений в суточной ритмике продукции мелатонина у больных в стадию ремиссии свидетельствует, что изменение продукции мелатонина в стадию обострения является не только реакцией организма в ответ на обострение ЯБ, но и вероятным фактором возникновения самого обострения.

Изучение уровня и ритмики секреции мелатонина у больных с различной длительностью язвенного анамнеза позволило авторам также сделать вывод о том, что с течением заболевания в организме происходят изменения, которые можно охарактеризовать как адаптацию к заболеванию, в результате которой нарушения продукции мелатонина в стадию ремиссии ЯБДК нивелируются по мере увеличения длительности заболевания.

На современном этапе доказана основополагающая роль мелатонина в механизмах сезонных перестроек организма человека [13]. С клинической точки зрения сезонные изменения, происходящие в организме, могут являться одной из причин феномена сезонности в обострениях ЯБДК. В связи с этим логично предположить, что нестабильность суточной ритмики мелатонина в переходные сезоны года, обусловленная особенностями фотопериода в эти сезоны, может являться одной из основных причин сезонных обострений ЯБДК. Сезонность в обострениях ЯБЖ

как клиническим наблюдениям [14], так и по данным литературы [15], прослеживается значительно менее отчетливо, чем у больных ЯБДК. Вероятно, это связано с имеющимися особенностями патогенетических механизмов развития данных заболеваний [15].

Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о резком нарушении как уровня, так и ритмики продукции мелатонина во все сезоны года у больных ЯБДК и ЯБЖ в стадию ремиссии. Наиболее выраженные изменения у больных ЯБДК выявлены в летнее и осеннее время года, о чем свидетельствует отсутствие суточного ритма секреции мелатонина и низкая амплитуда его продукции в эти сезоны. Известно, что клинически обострения ЯБДК в осеннее время протекают более тяжело, по сравнению с обострениями в другие сезоны года [16, 17]. Кроме того, в осеннее время отмечаются более длительные сроки рубцевания язвенных дефектов [16]. Наблюдение за пациентами, страдающими ЯБДК, на протяжении длительного времени (до 10 лет) позволяет констатировать, что у многих больных, имеющих сезонность в обострениях заболевания, начало осенних обострений приходится на середину или конец августа. То есть, изменения продукции мелатонина, отмеченные в летний сезон, характеризуют сдвиги в организме, являющиеся отражением периода готовности организма к формированию обострения ЯБДК. Данные факты, в сочетании с полученными нами результатами о резком изменении продукции мелатонина в осеннее время года и в предшествующий осени сезон позволяют обоснованно предполагать участие мелатонина в патогенезе осенних обострений ЯБДК.

Анализ влияния различных видов противоязвенной терапии на продукцию мелатонина у больных ЯБДК позволил выявить стимулирующее влияние как ранитидина, так и омепразола (при курсовом лечении) на продукцию мелатонина [17].

Анализ влияния различных видов противоязвенной терапии на продукцию мелатонина у больных ЯБДК позволил выявить стимулирующее влияние как ранитидина, так и омепразола (при курсовом лечении) на продукцию мелатонина [17]. В последующих наших клинических исследованиях было установлено, что включение в схему лечения больных ЯБДК лекарственного препарата мелатонина (комбинированная терапия омепразол + мелаксен) по сравнению с монотерапией омепразолом отчетливо улучшает морфологическую, электронномикроскопическую и иммуногистохимическую картину у больных ЯБДК, что свидетельствует о достижении более глубокой ремиссии на комбинированной терапии в те же сроки, что и на монотерапии омепразолом [20].

Экспериментальное исследование, проведенное Н.К. Малиновской [18] на 88 крысах Вистар со смещением светопериода, на 12 часов приводило к перестройке биологических ритмов организма крыс, свидетельством чего являлась инверсия фазы температурного ритма животных и ритма продукции мелатонина. В условиях смещенного светопериода отмечалось увеличение амплитуды суточного ритма температуры и ритма секреции мелатонина. Данный феномен свидетельствовал о сохраняющейся активной перестройке биологических ритмов организма крыс в ответ на инверсию светопериода. Был сделан вывод, что нестабильность биологических ритмов крыс, находившихся в условиях смещенного светопериода, является причиной достоверного увеличения степени и протяженности эрозивно-язвенного повреждения слизистой желудка в данных группах крыс по сравнению с группами крыс, находившимися в условиях естественного светопериода. На настоящем этапе можно только предполагать посредством каких механизмов сдвиг фазы биологических ритмов реализуется в появлении эрозивно-язвенных дефектов слизистой желудка крыс. Нам представляется правомочным объяснять этот феномен с позиций широкого спектра эффектов мелатонина и, в первую очередь, антиоксидантных его эффектов. Нарушение ритмики продукции мелатонина в ответ на сдвиг фотопериода также может реализоваться в увеличении язвообразования в желудке крыс за счет возникновения нарушений регуляции пролиферативных процессов в слизистой желудка, зависящих от ритмической продукции мелатонина. Аналогичная связь существует и между эффектами мелатонина на моторику ЖКТ и микроциркуляцию. Интраперитонеальное введение мелатонина в дозе 2 мг/кг крысам, содержащимся в условиях смещенного светопериода, полностью предотвращало возникновение эрозивно-язвенных поражений желудка крыс [20].

Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что нарушение ритмики продукции мелатонина может являться одним из важных факторов этиопатогенеза ЯБ.

### **Синдром раздраженной кишки**

Синдром раздраженной кишечника (СРК) рассматривается в ряду наиболее спорных нозологических форм. Термин “функциональное” для этого заболевания применяется с целью подчеркнуть отсутствие грубой органической патологии и не должен пониматься буквально как нарушение функции при отсутствии субстрата. Патогномичных изменений,

характерных для данной группы заболеваний до настоящего времени не определено, что отнюдь не означает их отсутствие. Поскольку при функциональных заболеваниях речь идет об изменениях чувствительности, реактивности и моторики, на фоне которых и формируется полиморфная клиническая картина, субстратом заболевания могут быть различные минимальные нарушения в секреции гормонов и биогенных аминов на уровне ЦНС, изменения в функциях рецепторного и синаптического аппаратов в органах-мишенях и многие другие более тонкие механизмы, не реализующееся в изменениях морфологического строения тканей органов с нарушенной функцией [21].

Частота СРК среди населения развитых стран Европы составляет в среднем 15–20%, а заболеваемость – 1% в год. Пик заболеваемости приходится на возраст – 30–40 лет. У женщин СРК встречается, примерно, в два раза чаще, чем у мужчин [22,23].

Диагностика СРК проводится в соответствии с рекомендациями согласительного совещания Международной рабочей группы по совершенствованию диагностических критериев функциональных заболеваний желудочно-кишечного тракта, состоявшегося в 2001 г. в г. Риме.

Многие последователи подчеркивают неоднозначность и противоречивость данных о микроскопических изменениях в стенке кишки у больных СРК [21,24,25]. Отсутствие четких представлений о факторах, способствующих возникновению СРК, механизмов его патогенеза и морфологических проявлениях не позволяет определить и оптимальную схему лечения этого заболевания, несмотря на достаточно обширную в этом направлении литературу [26–29]. Ясно, что на сегодняшний день лечение СРК должно быть комплексным, направленным на ликвидацию взаимозависимых центральных и негативных висцеральных проявлений [30].

Мелатонин обладает широким спектром биологической активности и играет ключевую роль в регуляции многих функций ЖКТ. В частности, мелатонин регулирует моторику ЖКТ, улучшает микроциркуляцию слизистой оболочки, восстанавливает местный гормональный баланс гастроинтестинальных гормонов, участвует в регуляции секреции и моторики ЖКТ в соответствии с биоритмами приема пищи и пищеварительной функции мелатонина важнейший регулятор пролиферации и апоптоза клеток слизистой оболочки ЖКТ [4].

Было проведено исследование клинической эффективности и ультраструктурных и гистологических особенностей слизистой оболочки сиг-

мовидной кишки у 21 больного СРК, леченных с применением лекарственной формы мелатонина – препарат Мелаксен, “Unipharm, Inc” [31]. В результате исследований показано, что в стадии обострения у больных СРК в слизистой оболочке толстой (сигмовидной) кишки при гистологическом и ультраструктурном исследовании обнаруживаются воспалительные изменения, нарушения слизеобразования, дистрофические изменения и разрушение щеточной каемки призматических клеток, снижение количества эндокринных и увеличение числа тучных клеток, наблюдаются г.о. пердиапидезные кровоизлияния, истончение или утолщение сосудистых клеток, набухание эндотелия, усиливаются процессы пролиферации и апоптоза.

У больных СРК в стадии обострения в условиях примерно одинаковой клинической картины не было выявлено характерных изменений в слизистой оболочке толстой кишки.

Применение мелатонина при лечении СРК приводило к более выраженной редукции морфологических нарушений строения слизистой оболочки толстой кишки.

Было установлено, что мелатонин обладает и выраженной психотропной активностью. Эффективность применения его у пациентов с СРК, в клиническую картину которого включены психические расстройства<sup>1</sup>, была сравнима с действием психотропной терапии.

### Список литературы

1. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. (ред.) Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта // 2000.– М.,– Советский спорт.
2. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.К., Анисимов В.Н. (ред.) Мелатонин в норме и патологии // М.– 2004.
3. Raikhlin N.T., Kvetnoy I.V., Tolkachev V.N. Melatonin may be synthesized in enterochromaffin cells // Nature. 1975.– 255.– P.344–345.
4. Райхлин Н.Т. Кветной И.М. Биологическая идентификация мелатонина в энтерохромоаффинных клетках // Доклады АН СССР.– 1974.–215.– 3.– С.731–732.
5. Huether G. Melatonin Synthesis in the Gastrointestinal Tract and the Impact of Nutritional Factors on Circulating Melatonin // Ann. NY Acad. Sci.– 1994. – May.– 31.– 719.– P.146–158.
6. Малиновская Н.К. Мелатонин и функции желудочно-кишечного тракта // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2005.– 25.– 5.– С.73–79.
7. Kachi T., Kurushima M. Review. Pineal-Digestive Organ Relations: Physiological and Pathophysiological Significance of Melatonin in the Digestive System // P. Hiroaki Med.J.– 2000.– 51.– P.93–108.

8. Shibata S., Satake N., Takagi T., Usui H. Vasorelaxing action of melatonin in rabbit basilar artery // Gen. Pharmacol. – 1989. – 20.– P.677–680.
9. Barajas-Lopez C., Pereso A., Espinos-Luna R. et al. Melatonin modulates cholinergic-transmission blocking nicotinic channels in quinea-piq submucous-plexus // Eur. J.Pharmacol. – 1996. – 8. – P.312–319.
10. Bubenik G., Pang S. The role of serotonin and melatonin in gastrointestinal physiology: ontogeny, regulation of food intake, and mutual serotonin-melatonin feedback // Jour. Pineal Res. – 1994. – 16. – P.91–99.
11. Touitou Y., Haus T. (eds.) Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine. – Springer-Verl.– 1992.– 730 p.
12. Колесников Д.Б. Синдром раздраженной кишки (психосоматические соотношения, типология, терапия). // Дисс. Канд. Мед. наук. – М.– 2001. – 169 с.
13. Wehr T.A. A “clock for all seasons” in the human brain // Prog. Brain. Res. – 1996. – V.111 – P.321–342.
14. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. (ред.) Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта // 2000.– М.,– Советский спорт.
15. Василенко В.Х., Гребенев А.Л., Шептулин А.А. Язвенная болезнь. – М.: Медицина. – 1987. – 285 с.
16. Хараян Л.В. Течение язвенной болезни двенадцатиперстной кишки в различные сезоны года по данным клинико-инструментального обследования больных. // Автореф. дисс. канд. мед. наук. – М.– 1988.– 25 с.
17. Расулов М.И. Эндоскопические и электрогастрографические особенности сезонного течения язвенной болезни 12-перстной кишки. // Дисс. канд. мед. наук.– М. 1988, 163 с.
18. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Лакшин А.А., Вознесенская Л.А., Расулов М.И. Новые подходы к терапии язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Актуальные вопросы гастроэнтерологии в терапии и хирургии.– Сборник научных трудов. – Рязань–Москва. 2004 – С.42–44.
19. Малиновская Н.К. Мелатонин и язвенная болезнь – автореф дисс док мед наук – 1998. М. – 48 с.
20. Малиновская Н.К., Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Лакшин А.А., Вознесенская Л.А., Расулов М.И. Мелатонин в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Клиническая медицина. – 2006. – №1 – С. 5–13.
21. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.К., Судаков К.В., Сосновский А.С., Перцов С.С., Виттеберг Л. Язвотекторный эффект мелатонина при искусственном десинхронозе у крыс.
22. Рапопорт С.И. Синдром раздраженной кишки – не самостоятельное заболевание, а симптомокомплекс // Врач. – 1999.– 8.– С.32–33.
23. Дворецкий Л.И. Соматоформные расстройства в практике терапевта. // Русск. мед. журн. – 2002. – Т.10. – №19. – С.167–171.

24. Ивашкин В.Т., Баранская Е.К. Синдром раздраженного кишечника. // Избранные лекции по гастроэнтерологии (под ред. В.Т. Ивашкина и А.А. Шептулина). – М. – 2001. – С.54–83.
25. Фролькис А.В. Функциональные заболевания желудочно-кишечного тракта // Ленинград Медицина, 1991.
26. Шархун О.О. Морфологические эквиваленты синдрома раздраженного кишечника // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2000.– 10.
27. Camilleri M. Review article: clinical evidence to support current therapies of irritable bowel syndrome // Aliment Pharmacol. Ther.– 1999. – 13.– 2.– P.48–53.
28. Златкина А.Р., Белоусова Е.А., Никитина Н.В., Петухова Н.Г., Черногорова М.В. Влияние Дифенгидрамина на интенсивность абдоминальной боли при синдроме раздраженного кишечника // Русский медицинский журнал.–2005.–7.–1.– С.1–4.
29. Полуэктова Е.А. Опыт применения дюспаталана в лечении больных синдромом раздраженного кишечника // Южнорусский медицинский журнал. – 2001.– №3–4. – С.69–74.
30. Яковенко Э.П. Агафонова Н.А., Солюянова И.П. и др. Синдром раздраженного кишечника // Практикующий врач. – 1998. – 13.– С.38–40.
31. Гриневич В.Б., Симаненков В.И., Успенский Ю.П., Кутуев Х.А. Синдром раздраженного кишечника: клиника, диагностика, лечение // С.-Пб. – 2000.
32. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.К., Вознесенская Л.А., Румянцев А.И. Морфологическое исследование слизистой оболочки сигмовидной кишки у больных СРК при лечении мелаксеном.//Тезисы.

### **Заключение**

Обширные исследования мелатонина в различных областях химии, биологии и медицины привели к громадному прогрессу в понимании механизмов контроля синтеза мелатонина и его регуляцией и координацией физиологических процессов, описания механизмов его действия.

Существующее разнообразие физиологических свойств мелатонина и его путей взаимодействия с эндокринной и иммунной системами, способности дезактивации свободных радикалов и антиоксидантная и биоритмологическая функция, циторотективные свойства в жизнедеятельности организма и участие на всех уровнях взаимодействия материнского организма, плаценты и плода делают мелатонин необходимым элементом благополучного завершения беременности, а также универсальным адаптогеном, обладающим неспецифическим действием.

В проведенной работе показано, что применения мелатонина в дозировке 3 мг один раз в день на протяжении месяца, является достаточным для получения клинического эффекта. Предположительно, дозировка мелатонина может быть уменьшена до 0,3 мг (физиологическая про-

дукция мелатонина). Полученные результаты позволяют рекомендовать создание комбинированных препаратов (в зависимости от характера заболевания), в состав которых должен быть включен мелатонин. В этих случаях можно ожидать, опираясь на результаты проведенных работ, сокращение сроков лечения, уменьшение количества применяемых традиционных препаратов и/или понижение их дозировки, и, следовательно, заметное уменьшение финансовых затрат на лечение каждого больного.

На данный момент предложено множество методов для определения мелатонина в биологических жидкостях, но все они достаточно затратны и трудоемки. Популярными и хорошо изученными в наши дни являются два метода – метод иммуноферментного анализа и радиоиммунологический. Однако эти методы не дают возможности просматривать большое количество проб с необходимой скоростью. Уже известен, но пока находится в разработке, альтернативный метод определения мелатонина с помощью спектрометрии комбинационного рассеяния.

Показано, что социальный стресс (результат всё ускоряющихся темпов и ритмов развития человеческого общества) стал главной движущей силой эволюции человека, которая реализуется через эпифиз и его основной гормон – мелатонин. Хронический стресс матери во время беременности, столь характерный для больших городов, повышает уровень кортикостероидов, которые могут проникать через плаценту и подавлять у плода формирование эпифиза. За первую половину минувшего века средний вес эпифиза зрелого плода снизился, по его данным, почти в два раза! Такова, видимо, эпигенетическая (не связанная с наследственностью) реакция человеческой популяции на условия жизни в постиндустриальном обществе, с характерным действием стрессорирующих факторов не только днём, но и ночью (залитые ярким светом ночные города – так называемый эффект Эдисона, ночной шум от автомобилей и самолётов, ночные будоражающие передачи по телевидению и пр.), и полным разрушением естественного для человека чередования периодов активности–покоя и сна–бодрствования.

Все выше перечисленное даёт основание считать дальнейшую разработку проблемы мелатонина в теоретических и практических планах чрезвычайно важной в наши дни.

---

Подписано в печать 00.00.2009 года. Формат 60x88/16.  
Гарнитура OfficinaSansC. Печать офсетная. Бумага офсетная № 1.  
Усл. печ. л. . Тираж экз.

Заказ

Издательский Дом «МЕДПРАКТИКА-М»,  
Москва, Волоколамское ш. 4  
Тел. (499)158-4702, E-mail: [id@medpractika.ru](mailto:id@medpractika.ru), <http://www.medpractika.ru>

Отпечатано с готовых диапозитивов в ФГУП «Производственно-издательский комбинат ВИНТИ».  
140010, г. Люберцы Московской обл., Октябрьский пр-т, 403.  
Тел. (495)554-2186