

УДК: 612.4.05; 612.33; 612.018.2

Я.М.Алексєєв, О.І.Добржинський
Мікробіологічний національний університет ім.В.О.Сухомлинського, м.Ужгород

ПРОДУКЦІЯ СУПЕРОКСИДУ В ТОНКІЙ КИШЦІ ЩУРІВ ПРИ ГІПО- ТА ГІПЕРМЕЛАТОНІНЕМІЯХ

У тонкій кишці щурів 30-добова (цілодобове освітлення 1000-1500 лк) гіпомелатоніємія сприяє збільшенню продукції супероксиданіонрадикалу від фагоцитарних електронно-транспортних ланцюгів, а 30-добова (утримання щурів у темряві та пероральне введення мелатоніну у щоденній дозі 1 мг/кг маси тіла) гіпермелатоніємія – від мітохондріального окиснення, що відповідає антиоксидантним властивостям мелатоніну. Витік супероксиду з мікросомального електронно-транспортного ланцюга окиснення в обох випадках не змінювався.

Ключові слова: тонкий кишечник, супероксиданіонрадикал, гіпомелатоніємія, гіпермелатоніємія.

Біологічне значення мелатоніну зараз дуже активно досліджується («мелатоніновий бум», навіть створено журнал «Journal of Pineal Research»). Мелатонін має антистресову, антиканцерогенну, антигеріатричну, антиоксидантну дію. Мелатонін синтезується для усього організму в епіфізі та для локальної дії в клітинах APUD-системи. В епіфізі синтез проходить тільки тоді, коли на очі не потрапляє світло. Мелатонін є нейромедіатором, імуностимулятором, гормоном, який має майже на всіх клітинах організму три типи мембранних рецепторів, що діють крізь аденілатциклазну або кальцієву месенджерні системи, та ядерні рецептори, що впливають на експресію більш ніж 250 генів. Як нейромедіатор, він має сомногенні властивості, сприяє секреції ГАМК, активує проведення нервових імпульсів. Як імуностимулятор, він активує поділ стовбурових клітин червоного кісткового мозку, стимулюючи регулює тимус та лімфоцити. Як гормон, він впливає на секрецію рлізингів гіпоталамусу та блокує тропіни гіпофізу, особливо гонадотропінів, інгібує проліферацію більшості стовбурових клітин [1; 9], проявляє властивості непрямого антиоксиданту шляхом активації експресії генів антиоксидантних ферментів. Мелатонін сам є також прямим антиоксидантом, який діє ароматичним ядром та воднем аміногрупи [3; 14].

Прооксидантно-антиоксидантна система складається з генерації активних форм кисню, які ініціюють неферментативне вільно-радикальне пероксидне окиснення біополімерів, що лімітується антиоксидантним захистом. Найбільш слабка активна форма кисню – супероксиданіонрадикал (супероксид), але з нього утворюються більш сильніші (пероксиди водню, синглетний кисень, гідроксилрадикал). Утворюється супероксид: 1) реакцією катіонів металів змінної валентності з відновниками та O₂, 2) при функціонуванні флавінових та гемових оксидаз, 3) витіком з мітохондріальної та мікросомальної електронно-транспортних ланцюгів, 4) цілеспрямовано при неспецифічному імунному захисті з фагоцитів (дихальний вибух). У крові нейтрофіли (а також моноцити) мають НАДФН-оксидазу (електронно-транспортний ланцюг НАДФН → ФАДН₂ → цитохром 558 нм за довжиною хвилі світопоглинання або -245 мв за потенціалом), яка з O₂ утворює одноелектронним переносом супероксид. Активується ланцюг через кальцієву месенджерну систему. У тканинах при запаленнях діють нейтрофіли, яких на другій фазі запалення замінюють макрофаги, що в нормі містяться в тканинах, як нащадки моноцитів.

Макрофаги містять ксантинооксидазу. Ксантинооксидаза – димер, містить 2 або 3 субодиниці, в кожній з яких є ФАД, залізо-сірчаний кластер Fe₂-S₂, птерин, багато цистеїнів для дисульфідних містків між субодиницями, молібден, причому Мо+5 має зв'язки – два з ФАД, два з птерином, один з сіркою цистеїну, можливо одну з групою -S-SH. Ксантинооксидаза формується з ксантиндегідрогенази лімітованим протеолізом кальційзалежною протеїназою або окисненням дисульфідних містків, переважно при гіпоксії. Окиснення заліза у FeS-центрі дає супероксид; ФАД дегідрує субстрат, даючи активний семіхінон. ФАД дегідрує навіть воду, утворюючи гідроксилрадикал і ФАДН₂; останній відновлює супероксид у H₂O₂. Електрон ФАД може відновлювати залізо, а два гідроксилрадикали сполучаються у H₂O₂. Мо+5 віддає електрон на H₂O₂ з розщепленням її на •ОН і OH⁻, Мо+6 зв'язує OH⁻ та гідроксилное субстрат, віддаючи •ОН та окислюючись до Мо+5. Оскільки (молярно) на 2 FeS приходить 1 ФАД і 1 Мо, то супероксиду генерується в надлишку [12].

Там, де існує можливість бактеріального забруднення з негативними наслідками, багато макрофагів та підвищена активність ксантинооксидази (молоко, сироватка крові, печінка та особливо тонкий кишечник). Але не досліджені джерела та кількість генерованого у тонкому кишечнику супероксиду при гіпомелатоніємії та гіпермелатоніємії [2; 6].

Метою роботи було визначення джерел та кількості супероксиданіонрадикалу в тонкій кишці при гіпо- та гіпермелатонієміях.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проводились на щурах-самцях Вістар (3 групи по 5 тварин, середня маса 160 г), які утримувались у стандартних умовах віварію при сталій температурі і вологості повітря, вільному доступі до води і їжі. Перша група – інтактна, що витримувалася при світловому режимі: 12 годин темнота – 12 годин світло терміном 30 діб. У другій групі для моделювання гіпомелатоніємії тварини утримувались в режимі постійного освітлення (1000-1500 люкс) 30 діб. У третьої групі гіпермелатоніємія

моделювалася введенням мелатоніну в харчовий раціон дозою 1 мг/кг маси тіла/добу та цілодобовою темрявою 30 діб [7]. Сезон дослідження – піздня весна, коли секреція мелатоніну середня між максимумом взимку та мінімумом у літку [11]. Тварин виводили з експерименту здійснюючи одномоментну декапітацію під кетаміновим наркозом (40,0 мг/кг маси тіла).

Джерела та кількість супероксиду визначали за НСТ-тестом [13]. Принцип методу полягає у відновленні водорозчинного жовтого нітросинього тетразолію (НСТ) супероксидом у гранули синього формазану який елююється сумішшю диметилсульфоксиду з хлороформом. Інтенсивність забарвлення оцінюється при 540 нм на фотоелектроколориметрі. Результат виражали у нмоль $\bullet\text{O}_2^{-1}/\text{г}\cdot\text{хв}$. Для визначення джерел проводили стимуляцію: НАДН – для мітохондріального окиснення, НАДФН – для мікросомального окиснення, пірогеналом (або протігіозаном, зимозаном) – для фагоцитарного окиснення. Визначалася також відносна маса тонкої кишки [8]. Отримані цифрові дані обробляли методами варіаційної статистики для малих виборок з використанням для оцінки ймовірності різниць середніх для окремих груп даних за критерієм Стьюдента. За статистично достовірні вважали зміни при $p < 0,05$, а значення p в межах 0,1 – 0,05 вважали тенденцією до достовірності [5. По [4], якщо обсяг сукупності менший за 20 варіант, то слід використовувати розподіл Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Отримані дані в результаті дослідження наведені в таблиці. При порівнянні однакових за терміном дії гіпомелатоніемії та гіпермелатоніемії виявилось, що при гіпомелатоніемії відносна маса тонкої кишки у 1,8 рази менше чим при гіпермелатоніемії ($p_2 < 0,001$). Майже у двічі відносна маса тонкої кишки при 30-денній гіпомелатоніемії менша за умовну норму. На 10% з тенденцією до достовірності коефіцієнт маси тонкої кишки при гіпомелатоніемії менше за умовну норму, що можливо оцінити, як наслідок дисбалансу продукції мелатоніну.

Таблиця

Величини показників відносної маси тонкої кишки і кількості продукції з супероксиданіонрадикалу від різних джерел

Показники, $M \pm m$	Норма	Гіпомелатоніемія	Гіпермелатоніемія
Відносна маса тонкої кишки, %	$4,83 \pm 0,20$	$2,36 \pm 0,14$ $p_1 < 0,001$	$4,31 \pm 0,22$ $p_1 < 0,1, p_2 < 0,001$
НАДН – стимульований (мітохондріальне окиснення) вихід супероксиду нмоль $\bullet\text{O}_2^{-1}/\text{г}\cdot\text{хв}$	$21,67 \pm 12,50$	$27,59 \pm 4,74$	$19,40 \pm 2,31$ $p_2 < 0,1$
НАДФН – стимульований (мікросомальне окиснення) вихід супероксиду нмоль $\bullet\text{O}_2^{-1}/\text{г}\cdot\text{хв}$	$26,47 \pm 2,30$	$24,92 \pm 5,97$	$27,60 \pm 3,38$
Пірогенал – стимульований (фагоцитарне окиснення) вихід супероксиду нмоль $\bullet\text{O}_2^{-1}/\text{г}\cdot\text{хв}$	$6,47 \pm 0,71$	$8,13 \pm 0,59$ $p_1 < 0,1$	$6,49 \pm 0,37$ $p_2 < 0,05$

Примітка: p_1 відноситься до значень норми, p_2 – порівняння гіпо- та гіпермелатоніемії

Як видно з результатів дослідження, тонка кишка виявилась відносно стійкою за генерацією супероксиду до дії гіпо- та гіпермелатоніемії. Але в умовах гіпомелатоніемії пірогенал стимулює збільшення на 26% викиду супероксиданіонрадикалу з макрофагів лімфатичних вузлів тонкого кишечника та нейтрофілів капілярної крові з тенденцією до достовірності. Враховуючи, що в макрофагах джерелом супероксиду являється ксантиноксидаза, можна припустити Са-залежну активацію переходу ксантиндегідрогенази в активну ксантиноксидазу при зниженні продукції мелатоніну епіфізом. Не виключена можливість дії мелатоніну місцевої продукції. При гіпермелатоніемії продукція супероксиду з мітохондріального окиснення в 1,4 рази менше, ніж при гіпомелатоніемії, але з тенденцією до достовірності. Це вказує на суттєву антиоксидантну активність мелатоніну та можливе зниження рівня мітохондріального окиснення. Генерація супероксиду з мікросомального окиснення практично однакова в нормі, гіпо- та гіпермелатоніемії. Стимульований пірогеналом дихальний вибух фагоцитів фактично проявився при гіпомелатоніемії, де продукція супероксиду в 1,3 рази більше ($p_2 < 0,05$). Тому фагоцитарна продукція супероксиду в тонкій кишці при гіпермелатоніемії, хоча і відповідає нормі, але на 20% ($p_2 < 0,05$) менше значенню аналогічного показника при гіпомелатоніемії. Мабуть в нормі і при гіпермелатоніемії мелатоніну досить для пригнічення не стимульованої активності фагоцитів. Можна передбачити, що при гіпермелатоніемії можливе блокування якихось ланок регуляції прооксидантно-антиоксидантної системи. Враховуючи, що надлишок та нестача біологічно активної речовини може давати суттєві порушення регуляції метаболізму, можливо солідаризуватися з думкою [10], що зміни величин показника при високій біологічній значущості його, тенденція до достовірності ($p < 0,1$), слід розглядатися як достовірність.

Висновок

У тонкій кишці хронічні гіпомелатоніемія сприяє збільшенню продукції від фагоцитарних електронно-транспортних ланцюгів, а гіпермелатоніемія – від мітохондріального окиснення, що відповідає антиоксидантним властивостям мелатоніну.

Література

1. Анисимов В.Н. Мелатонин: роль в организме и применение в клинике. –СПб: Система, 2007. -40 с.
2. Анисимов В.Н., Кветной И.М., Комаров Ф.И., Малиновская Н.К., Рапопорт С.И. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта. –М.: Советский спорт, 2000. -184 с.
3. Барабой В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина // Укр. біохім. журн. -2000. - Т.72, N3. -С.5-11.

4. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Є. Курс варіаційної статистики. –Київ: Вища школа, 1977. -208 с.
5. Г.Ф.Лакин. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1968. -293 с.
6. Малиновская Н.К. Мелатонин в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки //Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Ф.И.Комарова, С.И.Рапопорта, Н.К.Малиновской, В.Н.Анисимова. –М.: ИД МЕДПРАКТИКА, 2003. –Гл. 9., С. 147-162.
7. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації. –Чернівці: Медакадемія, 2003. -152 с.
8. Посібник з експериментальних клінічних досліджень в біології та медицині / Беркало Л.В., Бобович О.В., Гейко О.О., [та інш.]. -Полтава, 1997. -271 с.
9. Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы мелатонина // Биохимия. -2001. -Т.66, N1. -С. 28-36.
10. Проблема нормы в токсикологии / И.М.Трахтенберг, Сова Р.Е., Шефтель В.О. [та інш.]. –М.: Медицина, 1991. -208 с. –С.42-43.
11. Турчина С.И., Шляхова Н.В. Сезонные ритмы продукции мелатонина и иммунореактивности у здоровых детей. -Всероссийская научно-практическая конференция 50 лет мелатонину: итоги и перспективы исследований, Тезисы докладов, СПб, 2008.- С. 41].
12. Цебржинский О.И. Некоторые аспекты антиоксидантного статуса // Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза. –Полтава, 1992. –С.120-155.
13. Цебржинский О.И. Количественное определение супероксида НСТ-тестом в тканях // Тези доповідей науково-практичної конференції "Організація токсикологічної допомоги в Україні". –Київ, 2002. – С. 65-66.
14. Reiter R.J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals // News Physiol. Sci. -2000. -Vol. 15. -P.246-250.

Резюме

ПРОДУКЦИЯ СУПЕРОКСИДА В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС ПРИ ГИПО- И ГИПЕРМЕЛАТОНИНЕМИЯХ

Анасевич Я.М., Цебржинський О.И.

В тонкой кишке крыс 30-суточная гипомелатонинемия способствует увеличению продукции супероксиданионрадикала от фагоцитарных электронно-транспортных цепей, а 30-суточная (содержание крыс в темноте и пероральное введение мелатонина в ежедневной дозе 1 мг/кг массы тела) гипермелатонинемия – от митохондриального окисления, которая отвечает антиоксидантным способностям мелатонина. Выход супероксида из микросомальной электронно-транспортной цепи окисления в обоих случаях не изменялся.

Ключевые слова: тонкий кишечник, супероксиданионрадикал, гипомелатонинемия, гипермелатонинемия.

Стаття надійшла 16.11.10 р.

PRODUCTS OF SUPEROXIDE IN THE THIN BOWEL OF RATS AT HYPO- AND HYPERMELATONINEMIA

Anasevich Ya.M., Cebrzhins'kiy O.I.

In a small intestine of rats each 30 days hypomelatoninemia conducted production of increase of superoxidanion radical from chains of powered and transported fagocyte, and each 30 days (the maintenance of rats in the dark and perorals melatonin introduced in a daily dose of weight of 1 mg/kg) hypermelatoninemia is from mitochondrial oxidation which is answers antioxidant to abilities of melatonin. Exit of superoxid from microsoming and power-transport chain of oxidation was not changed in both cases.

Keywords: small intestines, superoxidanionradical, hypomelatoninemia, hypermelatoninemia.

УДК: 611.018.5.013.8:611-018.53:615.014.41

А.К.Удовський, О.І.Цебржинський, І.Н.Молосева
Вплив низькомолекулярної фракції кордової крові на фагоцитарну активність лейкоцитів, підвергнутих гіпотермічному зберіганню

ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ КОРДОВОЙ КРОВИ НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ, ПОДВЕРГНУТЫХ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМУ ХРАНЕНИЮ

Полученные результаты обосновывают перспективу включения низкомолекулярной фракции кордовой крови и Актовегина в состав восстанавливающих сред после гипотермического хранения лейкоцитов для повышения их фагоцитарной активности.

Ключевые слова: кордовая кровь, актовегин, лейкоциты.

Робота виконана згідно плану НІР ІПКіК НАН України в відділі біохімії холодової адаптації по темі № 21 "Використання низьких температур для виділення біологічно активних низькомолекулярних компонентів (менше 5 кДа) з кордової крові тварин з метою отримання ранозагоючих препаратів" (№ДР 0105U003917).

Совершенствование технологии хранения лейкоконцентрата до трансфузии представляет большой интерес для медицинской практики [14, 7]. Хранение лейкоцитов в условиях гипотермии (+4°C) является одним из доступных и простых методов для широкого применения в трансфузиологии [6]. Накопленный опыт свидетельствует о том, что жизнеспособность лейкоцитов в условиях положительных температур (при +4°C)