

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© О.І. Антонова

УДК 616.36-002:615.322

О.І. Антонова

ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ ПРИ НЕСТАЧІ, НАДЛИШКУ МЕЛАТОНІНУ ТА ЗА УМОВ ОКИСНЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ

Кременчуцький національний університет імені Михайла Остроградського

(м. Кременчук)

Робота є фрагментом комплексної теми “Вплив мелатоніну на функції систем організму” (№ держреєстрації в УкраІНТІ 0106U002994).

Вступ. Однією з актуальних проблем фізіології людини і тварин є вивчення фізіологічних властивостей печінки, особливо за умов окиснювального стресу. Печінка – найважливіший біохімічний орган організму, забезпечуючий метаболічну деградацію речовин, які вона перетворює або в речовини для інших органів, або в речовини для видалення з організму, і завдяки цьому обладає найбільш досконалим механізмом детоксикації. В печінці відбувається деградація не тільки ендо-, а й екзотоксичних речовин, в тому числі лікувальних препаратів. До теперішнього часу залишаються невиявленими механізми, які регулюють детоксикаційні потенції печінки при патологічних станах. Враховуючи приведені вище відомості, можливо припустити, що в гуморальній ланці регуляції механізмів детоксикації печінки, ведуча роль належить мелатоніну [7].

Крім того, печінка являє собою важливий орган антиоксидантного захисту організму. Це пов’язано з тим, що печінка багата антиоксидантами - вітамінами Е, С, Р, РР, А, тиолами, ферментами - супероксиддисмутазою, пероксидазою, глутатіонпероксидазою, глутатіонредуктазою, глутатіонтрансферазою. Регуляції функцій печінки забезпечуються рядом гормонів, серед яких знаходиться і мелатонін, до якого є рецептори у печінці та на генному рівні активує синтез супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-пероксидази, глукозо-6-фосфатдегідрогенази [8].

В наш час існування людини пов’язане з забрудненням навколошнього середовища та дії зовнішніх пошкоджуючих хімічних та фізичних агентів, які призводять до широкого розповсюдження стресів хімічного генезу [3; 4]. Окиснювальний стрес викликають активні форми кисню, і він призводить до нездатності клітин подолати збільшення виділення активних форм кисню та запобігти пошкодженню клітин. У людини окиснювальний стрес є причиною або важливою складовою частиною багатьох серйозних захворювань.

Враховуючи стресогенність сучасного існування людини, гіпо- й гіперфункціональні стани часто формуються на фоні стресу, у тому числі хімічного, який пов’язаний з надходженням в організм великої кількості стресорних хімічних речовин. Важливим органом, який першим сприймає токсичні сполуки, є печінка, яка наділена найбільш досконалим механізмом детоксикації.

Метою даної роботи явилось встановлення стану печінки при нестачі, надлишку мелатоніну та за умов окиснювального стресу.

Об’єкт і методи дослідження. У 10-добовому дослідженні використані щури-самці лінії Wistar, середньою масою 240г. Інтактну групу склали 8 тварин. Дослідну групу склали теж 8 тварин, яким протягом 10- діб вводили перорально водний розчин пероксигіборату натрія у дозі 0,05 ЛД100 (60 мг/кг маси тіла на добу), для моделювання окиснювального стресу. Інтоксикацію пероксигіборатом створювали для того, щоб виявити, як проявляє себе печінка за умов стресу. За літературними даними відомо, що десятиденне введення пероксигіборату натрія у вигляді водного розчину per os у добовій дозі 120 мг/кг маси тіла призводить до збільшення концентрації малонового діальдегіда у печінці в 4,5 рази, що вказує на дуже сильний токсичний та прооксидантний ефект [2].

При моделюванні гіpermelatoninemii, дослідну групу утворили 8 тварин, яких витримували при освітленні 1000 – 1500 лк цілодобово протягом 10-ти діб. Для моделювання гіpermelatoninemii щури дослідної групи отримували протягом 10-діб перорально мелатонін у дозі 1 мг/кг маси тіла. По завершенню експериментів здійснювали забій тварин під гексеналовим наркозом (50 мг/кг маси тіла) (згідно з нормами біоетики), шляхом кровопускання, декапітації. Об’єктами дослідження у всіх дослідах були кров та печінка.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Для виконання завдань були використані методи, які характеризували б функціональний стан печінки, як головного органу метаболічного гомеостазу організму. Функціональні зміни печінки при патологічних станах оцінювали за допомогою комплексу біохімічних та гістологічних показників.

Маркерами функціональних порушень можуть служити зміни вмісту речовин у крові, поступаючих з печінки. Саме тому ми досліджували у сироватці крові вміст загального білірубіну та співвідношення його фракцій [6], які характеризують метаболічні процеси в печінці.

У якості маркерів ушкодження печінки використовували визначення її індикаторних ферментів: алланінамінотрасферазу (АлАТ) [6]. У якості маркерів

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

окиснювального стресу використовували визначення концентрації дієнових кон'югатів [6].

Стан прооксидантно-антиоксидантної системи печінки оцінювали за приростом вторинних оксо-продуктів пероксидації (ПО), переважно малонового діальдегіду (МДА) за умов спонтанного та індукованого (аскорбатзалежного і ферментативного) перекисного окиснення, а також активністю супероксиддисмутази (СОД) та каталази [5; 9], вмістом в печінці відновлених (ГШ) й окиснених (ГСГ) форм глютатіону [10]. Визначалася загальна протеолітична активність в тканинах печінки [1].

Отримані цифрові дані піддавали статистичному аналізу з використанням параметричного t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження 10-добової нестачі мелатоніну виявили порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, яке супроводжувалося посиленням вільноважильного окиснення, що проявлялось підвищеннем вмісту первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів - дієнових кон'югатів (**табл.1**).

Вміст дієнових кон'югатів збільшився на 30% ($p<0,05$), але мала місто тенденція до зниження

Таблиця 1

Біохімічні параметри при нестачі мелатоніну ($M \pm m$)

| Показники | Об'єкт дослідження | Групи | |
|---|--------------------|-------------|------------------------|
| | | I (норма) | II (гіпомелатонінемія) |
| Вміст дієнових мкмоль/кг | Гомогенат печінки | 9,44±0,15 | 14,04±2,26 $p<0,05$ |
| Вміст малонового деальдегіду, мкмоль/кг | | 45,89±5,55 | 31,89±5,37 $p<0,1$ |
| Супероксиддисмутаза, од.акт. | | 0,534±0,133 | 0,361±0,10 |
| Кatalаза, мкат/кг | | 5,25±0,17 | 5,20±0,77 |
| Активність глутатіонпероксидази, мкат/кг | Гомогенат печінки | 6,03±0,35 | 5,43±0,46 |
| Загальна протеолітична активність, нкат/кг мкат/л | Гомогенат печінки | 16,57±4,03 | 13,84±4,19 |
| Аланінаміотрансфераза, мккат/л | Сироватка крові | 0,46±0,05 | 0,41±0,008 |
| Загальний білірубін, мкмоль/л | Сироватка крові | 6,24±0,69 | 4,69±0,67 |

Примітка: p - вірогідність різниці порівняно з величинами I групи. $p>0,05$ не вказано, але мається тенденція до вірогідності при $0,05 < p < 0,1$

вмісту малонового діальдегіда на 30% ($p<0,1$). Таким чином, спостерігається збільшення концентрації тільки первинних продуктів пероксидації.

Активність супероксиддисмутази (СОД), каталази та глутатіонпероксидази суттєво не змінилися. Загальна протеолітична активність (ЗПА) в печінці теж суттєво не змінилася. У сироватці крові активність аланінаміотрансферази суттєво не змінилася. Концентрація загального білірубіну не змінилася та відповідає нормі.

Таким чином, при 10-добовій нестачі мелатоніну виявилося збільшення вмісту дієнових кон'югатів,

що може свідчити про посилення пероксидації у печінці.

Дослідження 10-добового впливу надлишку мелатоніну на функціональний стан печінки виявили наступне (**табл.2**): суттєвих змін у концентрації дієнових кон'югатів в печінці не знайдено, але вміст МДА зменшився у два рази ($p<0,01$), тобто мелатонін проявив себе як антиоксидант. Активність СОД, каталази та глутатіонпероксидази суттєво не змінилася. Загальна протеолітична активність в печінці також суттєво не змінилася. У сироватці крові активність аланінаміотрансферази та концентрація білірубіна не змінилися.

Таблиця 2

Біохімічні параметри при гіперфункції ($M \pm m$)

| Показники | Об'єкт дослідження | Групи | |
|--|--------------------|-------------|-------------------------|
| | | I (норма) | II (гіпермелатонінемія) |
| Вміст дієнових кон'югатів, мкмоль/кг | Гомогенат печінки | 9,44±0,15 | 10,17±0,72 |
| Вміст малонового диальдегіду, | | 45,89±5,55 | 23,46±3,39 $p<0,01$ |
| Супероксиддисмутаза, од.акт. | | 0,534±0,133 | 0,387±0,079 |
| Кatalаза, мкат/кг | | 5,25±0,17 | 5,1±0,20 |
| Активність глутатіонпероксидази мкат/кг | Гомогенат печінки | 6,03±0,35 | 5,25±0,42 |
| Загальна протеолітична активність, нкат/кг | Гомогенат печінки | 16,57±4,03 | 11,34±2,42 |
| Аланінаміотрансфераза, мккат/л | Сироватка крові | 0,46±0,05 | 0,34±0,05 |
| Загальний білірубін, мкмоль/л | Сироватка крові | 6,24±0,69 | 4,37±1,20 |

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з величиною I групи, $p>0,05$ не вказано.

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

Таким чином, при 10-добовому впливі підвищених доз мелатоніну, в печінці знишилися процеси пероксидації, що доводиться зменшенням вмісту МДА.

Дослідження функціонального стану печінки в умовах окиснювального стресу дозволило встановити суттєві відмінності в стані прооксидантно-антиоксидантної системи печінки. У 10-добовому

досліді виявилося у печінці підвищення вмісту дієнових кон'югатів та МДА (відповідно $p<0,001$ і $p<0,1$) в порівнянні з контролем (**табл. 3**), які характеризують процеси пероксидації.

У той час антиоксидантні процеси знишилися, що виражається у зменшенні активності СОД у печінці в 2,6 ($p<0,05$) в порівнянні з контролем. Активність

Таблиця 3

Біохімічні параметри при інтоксикації ($M \pm m$)

| Показники | Об'єкт дослідження | Групи | |
|--|--------------------|--------------|---|
| | | I (контроль) | II (інтоксикація пероксиборатом натрію) |
| Вміст дієнових кон'югатів, мкмоль/кг | Гомогенат печінки | 9,44±0,15 | 17,92±1,51 $p<0,001$ |
| Вміст малонового діальдегіду, мкмоль/кг | | 45,89±5,55 | 92,85±26,70 $p<0,1$ |
| Супероксиддисмутаза, од.акт. | | 0,534±0,133 | 0,205±0,068 $p<0,05$ |
| Кatalаза, мкат/кг | | 5,25±0,17 | 2,70±0,30 $p<0,001$ |
| Активність глутатіонпероксидази мкат/кг | Гомогенат печінки | 6,03±0,35 | 3,89±0,21 $p<0,001$ |
| Загальна протеолітична активність, нкат/кг | Гомогенат печінки | 16,57±4,03 | 21,11±4,91 |
| Загальний білірубін, мкмоль/л | Сироватка крові | 6,24±0,69 | 9,58±1,14 $p<0,05$ |

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з величиною I групи, $p>0,05$ не вказано, але вказана тенденція до вірогідності при $0,05 < p < 0,1$. Кatalази в печінці знишилися теж майже в 2 рази ($p<0,001$) в порівнянні з нормою. Активність глутатіонпероксидази в печінці зменшилась на 35% ($p<0,001$). При цьому загальна протеолітична активність не змінилась, а концентрація білірубіна в сироватці крові збільшилась на 54% ($p<0,05$).

Таким чином, інтоксикація ПОБ призвела до порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, що проявилосься підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів пероксидації - дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду, та інертністю ферментної системи антиоксидантного захисту, що проявилось зниженням активності супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази. Збільшилася концентрація загального білірубіну, що призвело до деяких змін з боку метаболічної функції печінки.

Висновки.

1. Дослідження 10-дової нестачі мелатоніну виявили порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, яке супроводжувалося посиленням вільнопардикального окиснення, що проявлялось підвищенням вмісту первинних продуктів ПОЛ - дієнових кон'югатів.

2. При 10-добовому впливі підвищених доз мелатоніну, в печінці знишилися процеси пероксидації та

3. Інтоксикація ПОБ призвела до порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, що проявилосься підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів пероксидації - дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду, та інертністю ферментної системи антиоксидантного захисту, що проявилось зниженням активності супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази.

Таким чином, пероксиборат виявив виражену прооксидантну дію в печінці та зумовив поглиблення оксидантного стресу клітин через інгібування активності антиоксидантних ферментів. Це негативно відображується на метаболічних процесах печінки, що доводиться збільшенням концентрації загального білірубіну.

Перспективи подальших досліджень. Дані експериментальні дослідження не вичерпують повністю проблеми. В подальшому продовжаться дослідження з проблем використання мелатоніну при експериментальних патологіях печінки.

Список літератури

1. Барабаш Р.Д. Казеинолитическая и БАЭЭ-стеразная активность слюнных и слюнных желез у крыс в постнатальном онтогенезе / Р.Д. Барабаш, А.П. Левицкий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1973. - №8. - С. 65-67.
2. Безопасно ли применение пероксибората в медицине? / О.И. Цебржинский, В.Н. Балацкий, А.В. Гринчишин [та інш.] // Актуальні проблеми сучасної медицини. - 2003. - Т.3., Вип.1. - С. 111-112.
3. Вольнов И.И. Пероксибораты / И.И. Вольнов. - М.: Наука, 1984. - 96 с.
4. Вредные вещества в промышленности. Т.3. Неорганические и элементоорганические соединения / Под ред. Н.В. Лазарева. - Л.: Химия, 1977. - 608 с.
5. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. - 1988. - № 1. - С.16 -19.
6. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Під ред. проф. Кайдашева І.П.-Полтава: Полімет, 2003. - 319 с.
7. Регуляция антиоксидантного гомеостаза и системы детоксикации организма гормоном мелатонином. Роль мелатонинзависимых рецепторов в реализации этой функции / И.Ф. Беленичев, Ю.И. Губский, Е.Л. Левицкий, С.И. Кова-

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

- ленко // Сучасні проблеми токсикології [электронный ресурс]. - 2003. - №2. http://www.medved.kiev.ua/arxiv_mg/st2003/03_2.htm.
8. Роль антиоксидантной системы в патогенезе токсического гепатита / Я.И. Гонский, М.М. Корда, И.Н. Клиш, Л.С. Фира // Пат. физ. и эксп. терап. – 1996. – №2. – С. 43-45.
9. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирота // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45, Вып. № 3 – С. 263-272.
10. Чернышев В.Г. Определение восстановленного и окисленного глютатиона в эритроцитах беременных женщин / В.Г. Чернышев // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С.31-33.

УДК 616.36-002:615.322

ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ ПРИ НЕСТАЧІ, НАДЛИШКУ МЕЛАТОНІНУ ТА ЗА УМОВ ОКИСНЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ

Антонова О.І.

Резюме. Стаття присвячена вивченю прооксидантно-оксидантного балансу печінки, метаболічної функції печінки при дії надлишку і нестачі мелатоніну та в змодельованих умовах окиснювального стресу прооксидантною гепатотропною токсичною речовиною. Печінка є органом, який знешкоджує токсичну речовину. При 10-добовій гипомелатонініемії збільшується вміст діенових кон'югатів і зменшується вміст малонового діальдегіду, тобто відбувається коливання пероксидації в печінці.

В результаті введення різних доз мелатоніну посилюється антиоксидантна ланка і слабшає прооксидантна ланка оксидативної системи печінки, тобто, мелатонін проявляє свій антиоксидативний ефект.

При моделюванні умов окиснювального стресу інтоксикацією пероксиборатом натрію посилюється пероксидація в печінці, тобто, пероксиборат проявляє свій прооксидантний ефект, підсилюючи оксидантний стрес клітин, що виявляється збільшенням вмісту первинних і вторинних продуктів пероксидації та інертністю ферментної системи антиоксидантного захисту. Зміни метаболічної функції проявляються в збільшенні концентрації загального білірубіну.

Ключові слова: печінка, мелатонін, прооксидантно-антиоксидантний баланс.

УДК 616.36-002:615.322

ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ НЕДОСТАТКЕ, ИЗБЫТКЕ МЕЛАТОНИНА И В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Антонова Е.И.

Резюме. Статья посвящена изучению прооксидантно-оксидантного баланса печени, метаболической функции печени при действии избытка и недостатка мелатонина и в смоделированных условиях окислительного стресса прооксидантным гепатотропным токсическим веществом. Печень является органом, который обезвреживает токсическое вещество. При 10-суточной гипомелатонинемии увеличивается содержание диеновых коньюгатов и уменьшается содержание малонового диальдегида, то есть происходит колебание пероксидации в печени.

В результате введения различных доз мелатонина усиливается антиоксидантно-антиоксидантное звено оксидативной системы печени, то есть, мелатонин проявляет свой антиоксидативный эффект.

При моделировании условий окислительного стресса интоксикацией пероксиборатом натрия усиливается пероксидация в печени, то есть, пероксиборат проявляет свой прооксидантный эффект, усиливая оксидантный стресс клеток, что проявляется увеличением содержания первичных и вторичных продуктов пероксидации и инертностью ферментной системы антиоксидантной защиты. Изменения метаболической функции проявляются в увеличении концентрации общего билирубина.

Ключевые слова: печень, мелатонин, прооксидантно-антиоксидантный баланс.

UDC 616.36-002:615.322

The Research Of Liver Functional State In Melatonin Shortage And Excess And Under Condition Of Oxidizing Stress

Antonova E.I.

Summary. It is experimentally proved that melatonin with its lack and surplus is able to change the pro-oxidant and antioxidant balance of liver and metabolic function. The complex research of melatonin lack and surplus on liver state in its normal functioning and in the conditions of oxidant stress was carried on.

The proved physiological features of melatonin effect on liver functioning warn against unchecked melatonin usage that is used as medicine or continuous twenty-four-hour lighting that results in melatonin secretion reduction including dreaming. The data gained can become the base for elaboration of physiologically based doses of melatonin usage.

It was established that while oxidizing stress modeling with natrii peroxiborat intoxication against a background of hypo- and hypermelatoninemia for liver damage is peroxyborate activity, but not melatonin lack or surplus.

Key words: liver, melatonin, pro-oxidant and antioxidant balance.

Стаття надійшла 14.10.2011 р.