

## ВПЛИВ СТРЕСУ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ШЛУНКУ ЩУРІВ ПРИ НЕСТАЧІ ТА НАДЛИШКУ МЕЛАТОНІНУ

Миколаївський національний університет імені В. О. Сухомлинського (м. Миколаїв)

Робота виконана як самостійний фрагмент планової наукової роботи кафедри фізіології та біохімії Миколаївського національного університету імені В. О. Сухомлинського «Органні ефекти мелатоніну» (zareєстрована в УкрІНТЕІ за №0106U002994 від 15.03.2006).

**Вступ.** На сьогоднішній день проблема стресів і адаптацій, і функціональних порушень залишається одним з нагальних питань сучасної біології і медицини. Останнім часом науковцями та медиками активно вивчаються фізіологічні ефекти мелатоніну на різні органи та системи організму, оскільки цей гормон епіфізу володіє сомногенним ефектом, є регулятором циркадіанної системи організму, стимулятором імунної системи, проявляє геро-, канцеро- та стресопротекторні властивості та є антиоксидантом [1, 3, 4, 5, 8].

При стресі активується гіпоталамо-гіпофізарна-надниркова система, гормони якої впливають на посилення секреції соляної кислоти, пепсину, гіпертону слунку, ішемії судин шлунку. Все це спричиняє внутрішньошлунковий протеоліз та пошкодження слизової оболонки [7,10]. Крім того стрес, в тому числі і іммобілізаційний, призводить до посилення вільнорадикального перекисного окиснення (ВРПО), а як наслідок – до окислювального порушення цілісності тканин, що також призводить до виникнення гастрододуоденальних ерозій та виразок [12, 13].

Для профілактики ВРПО та корекції патологій, що були викликані вільними радикалами в сучасній медичній практиці використовують цілий ряд антиоксидантів. Оскільки мелатонін є стресопротектором, стимулятором імунної системи, геро- та канцеропротектором, антиоксидантом (АО) [1, 3, 4, 5, 6,], він здатний позитивно впливати на стан шлунково-кишкового тракту та здійснювати антиульцерогенний ефект [3, 4, 5]. Механізми антиоксидантної дії мелатоніну пов'язані із здатністю безпосередньо знешкоджувати вільні радикали, а також виступати непрямим антиоксидантом активуючи АО ферменти: супероксиддисмутазу (СОД), глутатіонпероксидазу (ГПО) [2].

Для нас є цікавим вивчення зміни показників прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС) в тканинах шлунку на тлі гіпо- та гіпермелатонінемії при дії стресу, що і стало **метою** нашої роботи.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проводили на 48 самцях щурів лінії Wistar середньою масою 300-320 г. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

В кожній групі по 8 щурів: перша – інтактна (умовна норма); у тварин другої моделювали гіпомелатонінемію гіпопінеалізмом: щурів цієї групи цілодобово витримували при світлі 1000-1500 лк [9] терміном 10 днів; у тварин третьої моделювали гіпермелатонінемію: щурам цієї групи вводили мелатонін 10 днів (per os 1 мг/кг маси тіла на добу); тварин четвертої групи піддавали стресу шляхом іммобілізації на 5 годин одноразово за Сельє; п'ята група була стресована на дев'ятий день гіпомелатонінемії, а на десятий проводили евтаназію декапітацією; тварин шостої стресували на дев'ятий день гіпермелатонінемії. Робили відбір шлунку для подальшої роботи.

У шлунковому соці визначали рН. На слизовій оболонці шлунку обчислювали кількість виразок та підраховували індекс Паулса.

В гомогенаті шлунку визначали концентрації первинних (дієнові кон'югати – ДК за методом Стальной І. Д.) та вторинних (малоновий діальдегід – МДА за методом Стальной І. Д., Гаришвили Т. Г.) продуктів ВРПО [11]. Також визначали в гомогенаті шлунку активності каталази за методом М. А. Королюка, Л. І. Іванової [2], глутатіонпероксидази (ГПО) за методом В. О. Пахомової [6], супероксиддисмутази (СОД) за методом Чевари С., Чаба І. [15], загальну протеолітичну активність (ЗПА) за Kunitz.

Використовували наступні методи статистичного аналізу: перевірка нормальності розподілу за допомогою критерія Шапіро-Уїлка, достовірність різниці між середніми величинами кожного з біохімічних параметрів в досліджуваних групах визначали за допомогою t-критерія Стьюдента. Статистичний аналіз проводили з використанням комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2007.

Параметри виборок, що приводяться надалі мають наступні значення: М – середнє значення, m – похибка середнього, n – об'єм групи, що

аналізується, р – досягнутий рівень значущості.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Отримані дані презентовані у вигляді таблиць та графіків (рис. 1, 2).

У щурів з гіпомелатоніемією виразки в шлунку були відсутні, але у шлунковому соці на 20% збільшилася величина рН, що означає зниження кислотності. У щурів третьої групи, яким вводили мелатонін 10 днів (per os 1 мг/кг) величина рН шлункового соку знизилася в порівнянні з інтактною групою на 24% ( $p_1 < 0,1$ ), що свідчить про підвищення кислотності шлунку. У щурів четвертої групи величина рН практично не змінилася в порівнянні з інтактною групою. При нестачі мелатоніну та дії стресу у щурів п'ятої групи спостерігалася збільшення величини рН та зниження кислотності. У щурів шостої групи, які отримували мелатонін (per os 1 мг/кг), величина рН неістотно знизилася (рис. 1).

Розрахунок індекса Паулса проводили окремо по точковим, лінійним, звичайним виразкам та ерозіям. Отримані результати представлені у табл. 1.

У щурів третьої групи процент тварин із виразками не перевищував 12,5%, про що свідчать невеликі значення індекса Паулса (ІП), тоді як у стресованих тварин по точковим виразкам ІП зростає більше ніж в 400 разів, по лінійним виразкам в 12 разів, та по звичайним – в 300 разів. В шлунках щурів п'ятої групи при гіпомелатоніемії та сумісній дії стресу ІП точкових виразок в порівнянні із стресованою групою зростає майже в двічі, але у стільки ж разів зменшується ІП по лінійним виразкам. ІП щурів шостої групи по точковим виразкам в порівнянні із стресованими щурами зменшився у 3 рази, по лінійним виразкам – зменшився у 12 разів (табл. 1).

Визначали противиражкову активність (ПВА) мелатоніну як відношення індексу Паулса в стрес-контролі до індексу Паулса в дослідній групі, що отримувала мелатонін та була стресована на дев'ятий день. Дослідну речовину вважали активною, якщо ПВА складала 2 та більше одиниць (Pauls et al., 1947). ПВА мелатоніну складала по точковим

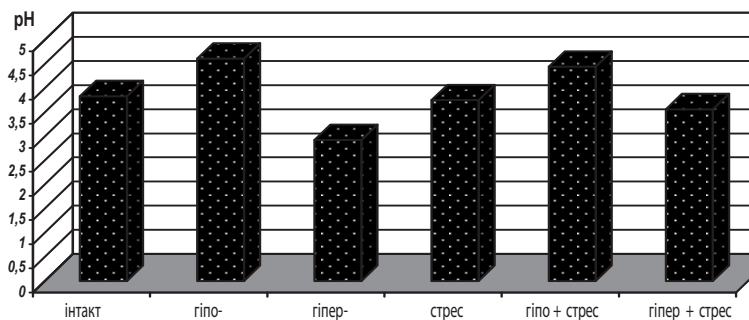


Рис. 1. рН шлункового соку щурів.

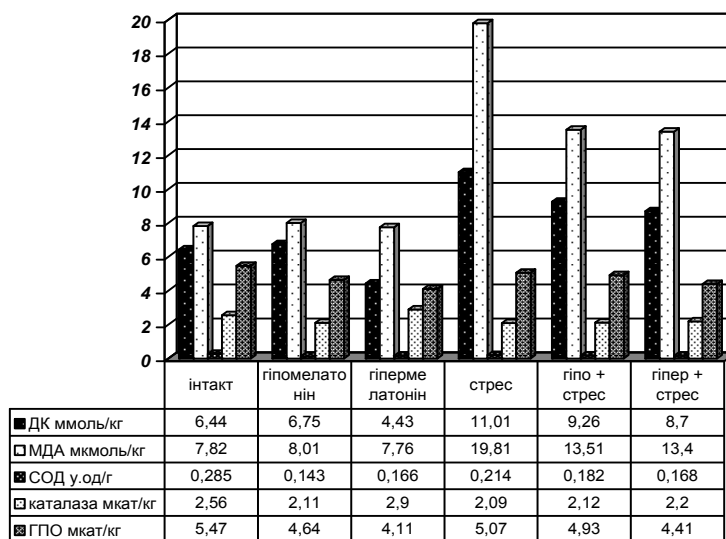


Рис. 2. Зміни біохімічних характеристик ПАС тканин шлунку щурів.

виразкам 3,167 одиниці, а по лінійним виразкам – 12,096.

Зміни біохімічних показників ПАС шлунку при гіпо- та гіпермелатоніемії, а також при дії стресу на фоні нестачі чи надлишку мелатоніну показані на рис. 2.

В гомогенаті шлунку концентрації первинних продуктів ВРПО – дієнових кон'югатів при гіпермелатоніемії не відрізнялися істотно від показників інтактною групою. При додатковому введенні мелатоніну цей показник знизився на 31% ( $p_1 < 0,01$ ). Стрес викликав посилення ВРПО, про що свідчить збільшення концентрації дієнових кон'югатів в гомогенаті тканин шлунка в 1,7 рази в порівнянні з

Таблиця 1

### Індекс Паулса щурів

	Інтакт n = 8	Гіпомелатоніемія n = 8	Гіпермелатоніемія n = 8	Стрес n = 8	Гіпомелатонін + стрес n = 8	Гіпермелатонін + стрес n = 8
Точкові виразки	-	-	0,015	6,187	12,25	1,953
Лінійні виразки	-	-	0,031	0,375	0,187	0,031
Звичайні виразки	-	-	0,015	4,687	-	-
Ерозії	-	-	-	-	0,062	-

**Загальна протеолітична активність (ЗПА) тканин шлунка щурів M(m), нкат/кг**

Інтакт n = 8	Гіпомелатоніемія n = 8	Гіпермелатоніемія n = 8	Стрес n = 8	Гіпомелатонін + стрес n = 8	Гіпермелатонін + стрес n = 8
50,32(5,4)	53,56(8,3)	46,75(10,5)	70,03(13,8)	52,19(14,4)	62,51(13,7)

нормою ( $p_1 < 0,001$ ). В групі стресованій на дев'ятий день гіпермелатоніемії рівень дієвних кон'югатів був на 21% нижче в порівнянні із стресованою групою ( $p_3 < 0,002$ ).

У шлунку концентрація вторинного продукту ВРПО МДА при гіпомелатоніемії не значно зросла, що спостерігалось і при гіпермелатоніемії. При стресі концентрація МДА збільшилася в 2,5 рази ( $p_1 < 0,001$ ). Концентрація МДА в гомогенаті шлунку щурів п'ятої групи виявилася в 1,7 рази більше норми ( $p < 0,01$ ) і значень контролю на нестачу мелатоніну. Рівень малонового діальдегіду в шостій групі, що отримувала мелатонін, нижче на 32% в порівнянні із стресом ( $p_3 < 0,05$ ), але вище норми в 1,7 рази.

Активність антиоксидантних ферментів в умовах гіпо- гіпермелатоніемії та стресу на їх фоні змінювалась неоднозначно.

Так, при гіпомелатоніемії активність СОД знизилася вдвічі ( $p < 0,05$ ) проти значень норми. Активність СОД при гіпермелатоніемії знизилася на 23% ( $p_1 < 0,25$ ). Цікаво, що при стресі, як і при гіпермелатоніемії, активність СОД знизилася ( $p_1 < 0,25$ ) на 25%. При одночасній дії нестачі мелатоніну та стресу супероксиддисмутазна активність у шлунку щурів знизилася на 36% в порівнянні з нормою ( $p_1 < 0,002$ ) і на 15% в порівнянні з контролем на стрес. У групі стресованій на фоні гіпермелатоніемії активність СОД знизилася на 21% в порівнянні з стресованою групою, але при цьому цей показник є в 1,7 разів нижче норми.

Активність каталази при гіпомелатоніемії знизилася на 18% ( $p_1 < 0,01$ ). При гіпермелатоніемії достовірно зросла активність каталази на 13% ( $p_1 < 0,02$ ). Активність каталази при стресі також достовірно нижче норми ( $p_1 < 0,001$ ), що може бути пояснено зниженням рівня синтезу білків. При комплексній дії нестачі мелатоніну та стресу активність каталази знизилася по відношенню до норми на 17% ( $p_1 < 0,002$ ), але відповідала значенням обох контролів. В шостій групі підвищилася активність каталази на 5%, в порівнянні зі стресовою групою.

Активність глутатіонпероксидази (ГПО) в умовах гіпомелатоніемії істотно не змінилася. При гіпермелатоніемії активність глутатіонпероксидази достовірно знизилася на 25% ( $p_1 < 0,002$ ). При стресі активність ГПО знизилася на 7% ( $p_1 < 0,25$ ) порівняно з нормою. При стресі на фоні гіпомелатоніемії активність глутатіонпероксидази суттєво не змінилася в порівнянні зі значеннями норми та обох контролів. В групі стресованій на дев'ятий день гіпермелатоніемії активність глутатіонпероксидази знизилася на 13% в порівнянні з стресованою групою.

Загальна протеолітична активність (ЗПА) тканин шлунка щурів змінюється за умов нетривалої гіпо- та гіпермелатоніемії та при дії стресу. Зміни ЗПА репрезентовані в **табл. 2**.

При стресі ЗПА зросла не значно, різниця між вибірковими середніми невірогідна на рівні значущості  $p_{0,05}$ .

**Висновок.** При стресі на тлі гіпомелатоніемії посилюється ульцерогенний ефект, вміст шлунку стає менш кислотним, посилюється рівень пероксидації з ослабленням ферментативної ланки антиоксидантного захисту в тканинах шлунку. На тлі гіпермелатоніемії у стресованих щурів спостерігається антиоксидантний та антиульцерогенний ефект мелатоніну, знижується рівень пероксидації в тканинах шлунку.

**Перспективи подальших досліджень.** В подальшому планується дослідити тривалий вплив екзогенного мелатоніну та нестачі мелатоніну в організмі на стан шлунку та на показники ПАС шлунку в нормі та при стресі. Дослідити недовготривалий та тривалий вплив екзогенного мелатоніну та нестачі мелатоніну в організмі на стан шлунку та на показники ПАС шлунку при пептичних виразках.

### Література

1. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К. : Книга плюс, 2006. – 462 с.
2. Каролюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Каролюк, Л. И. Иванова, Н. Т. Майорова, К. Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1998. – №1. – С. 16-18.
3. Малиновская Н. К. Мелатонин и язвенная болезнь : автореф. на соискание ученой степени доктора мед. н. : спец. 14.00.47 «Гастроэнтерология» / Н. К. Малиновская. – М., Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова. – 1998. – 47 с.
4. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта / [Анисимов В. Н., Кветной И. М., Комаров Ф. И., Малиновская Н. К., Рапопорт С. И.]. – М. : Советский спорт, 2000. – 204 с.
5. Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Ф. И. Комарова, С. И. Комарова, С. И. Рапопорта, Н. К. Малиновской, В. Н. Анисимова. – М. : ИД Медпрактика, 2004. – 308 с.
6. Пахомова В. А. Способ определения активности глутатионпероксидазы в биологических тканях / В. А. Пахомова, Г. Н. Крюкова, Н. П. Козлянина [и др.] // А. С. 922637 СССР, МКИ в G 01. Оpubл. 23. 04. 1982. Биол. ИиО №15. – 2 с.
7. Передерій В. Г. Стрес і його наслідки / В. Г. Передерій, М. М. Безюк // Укр. мед. часопис. – 2003. – №6 (38). – XI/XII. – С. 65-69.
8. Перекисное окисление и стресс / [В. А. Барабой, И. И. Брахман, В. Г. Голотин, Ю. Б. Кудряшов] – СПб. : Наука, 1992. – 148 с.
9. Пішак В. П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації / В. П. Пішак. – Чернівці : Медакадемія, 2003. – 152 с.

- 
- 
10. Рошчін Г. Г. Гострі виразки травного каналу в післяопераційний період у постраждалих із поєднаною травмою [Електронний ресурс] / Г. Г. Рошчін, В. О. Крилюк // Острые и неотложные состояния в практике врача. – 2009. – №2(15) – Режим доступу до журн. : <http://urgent.com.ua/article/237.html>.
  11. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили – М. : Медицина, 1977. – С. 63, 66-68.
  12. Тарасенко Л. М. Особенности реакции желудка на острый и хронический стрессы, а также их сочетание / Л. М. Тарасенко, В. Ф. Гребенникова., Т. А. Девяткина, Т. А. Петрушанко, О. И. Цебржинский // Физиологический журнал. – 1989. – Т. 35, №5. – С. 78-82.
  13. Тарасенко Л. М. Роль ендотеліальної дисфункції у виразкоутворенні шлунка за умов гострого стресу / Л. М. Тарасенко, О. Є. Омельченко // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, №4 (додаток 2). – С. 175.
  14. Цебржинский О. И. Источники супероксида при остром стрессе / О. И. Цебржинский, К. С. Непорада, С. В. Денисенко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2002. – Т. 2, Вип. 2 (4). – С. 42-44.
  15. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее активности в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лабораторное дело. – 1985. – №11. – С. 678-681.

**УДК 612. 32 (678. 048)**

### **ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ НЕХВАТКЕ И ИЗБЫТКЕ МЕЛАТОНИНА**

**Цвях О. А.**

**Резюме.** Изучены изменения, происходящие с прооксидантно-антиоксидантной системой желудка при недостатке и избытке мелатонина при стрессе. Полученные данные показали, что вследствие иммобилизационного стресса проявился язвобразующий эффект в желудке крыс, усилившийся при недостатке мелатонина. Однако при дополнительном введении мелатонина в течение 10 суток повреждения желудка язвами оказалось значительно меньшим, что подтверждает антиязвобразующий эффект этого гормона.

При стрессе на фоне гипомелатонинемии усиливается язвобразующий эффект, содержимое желудка становится менее кислотным, усиливается уровень перекисидации с ослаблением ферментативного звена антиоксидантной защиты в тканях желудка. На фоне гипермелатонинемии у стрессированных крыс наблюдается антиоксидантный и антиязвобразующий эффект мелатонина, снижается уровень перекисидации в тканях желудка.

**Ключевые слова:** мелатонин, прооксидантно-антиоксидантная система, стресс, гипомелатонинемия, гипермелатонинемия, желудок, язвы.

**УДК 612. 32 (678. 048)**

### **ВПЛИВ СТРЕСУ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ШЛУНКУ ЩУРІВ ПРИ НЕСТАЧІ ТА НАДЛИШКУ МЕЛАТОНІНУ**

**Цвях О. О.**

**Резюме.** Вивчені зміни, що відбуваються з прооксидантно-антиоксидантною системою шлунка при нестачі та надлишку мелатоніну при стресі. Одержані данні виявили що, внаслідок іммобілізаційного стресу проявився язвобразуючий ефект в шлунку щурів, який посилювався при нестачі мелатоніну. Проте при додатковому введенні мелатоніну протягом 10 діб ушкодження шлунку виразками виявилось значно меншим, що підтверджує антиязвобразуючий ефект цього гормону.

При стресі на тлі гіпомелатонінемії посилюється язвобразуючий ефект, вміст шлунку стає менш кислотним, посилюється рівень перекисидації з ослабленням ферментативної ланки антиоксидантного захисту в тканинах шлунку. На тлі гіпермелатонінемії у стресованих щурів спостерігається антиоксидантний та антиязвобразуючий ефект мелатоніну, знижується рівень перекисидації в тканинах шлунку.

**Ключові слова:** мелатонін, прооксидантно-антиоксидантна система, стрес, гіпомелатонінемія, гіпермелатонінемія, шлунок, виразки.

**UDC 612. 32 (678. 048)**

### **Effect of Stress on the State of Prooxidant-Antioxidant System in Rats Stomach with Deficiency and Excess Melatonin**

**Tsvyakh O. O.**

**Summary.** Now the problem of stress, adaptation, and functional impairment remains is one of the most pressing issues of modern biology and medicine. Scientists and doctors are actively studying the physiological effects of melatonin on organs and body systems. This pineal hormone has drowsiness effect. It is a regulator of the circadian system of the body and stimulator of the immune system. It protects against stress and cancer. Melatonin is an antioxidant.

We studied the changes occurring to the prooxidant-antioxidant system of the stomach with a deficiency and an excess of melatonin under stress.

---

---

Researches were conducted on 48 males of Wistar rats weighing 300-320 grammas. We formed 6 groups of 8 rats each. The first group is intact (conditional rule). We modeled hypomelatoninemy in the second group of animals: the rats of this group were maintained all the time by the light of 1000-1500 lux during 10 days. We modeled hipermelatoninemy in the third group of animals: melatonin was entered the rats of this group 10 days (per os 1 mg / kg of the body weight). The rats of the fourth group subjected to stress by immobilization on time for 5:00 by Selye. The fifth group was subjected to stress by Selye on the ninth day of hypomelatoninemy. The sixth group of animals subjected to stress by Selye on the ninth day of hipermelatoninemy.

In gastric juice pH was determined. In the gastric mucosa we calculated number of ulcers and index of Pauls. In the homogenate of the stomach we determined the activity of antioxidant enzymes and products of free radical oxidation.

The research showed that, due to immobilizing stress manifested ulcerogenic effect in the stomach of rats intensified with a lack of melatonin.

However, the additional administration of melatonin during 10 days damage of the stomach with ulcers was significantly lower, confirming antiulceration effect of this hormone.

The activity of antioxidant enzymes under stress during hypo- or hipermelatoninemy changed ambiguous.

Under stress indicators MDA and diene conjugates increased significantly. In the group of rats that received melatonin concentration of MDA and diene conjugates during stress were significantly smaller than in stress-control group.

During stress on the background of hypomelatoninemy ulcerogenic effect increases, the contents of the stomach becomes less acidic, increasing the level of enzymatic peroxidation with the weakening of antioxidant defense in the tissues of the stomach.

We observed antioxidant and antiulceration effect of melatonin with additional administration of this hormone to rats that were exposed to immobilization stress. The level of peroxidation decreased in the tissues of the stomach.

**Key words:** melatonin, prooxidant-antioxidant system, stress, gipomelatoninemy, gipermelatoninemy, stomach ulcer.

*Рецензент – проф. Непорада К. С.*

*Стаття надійшла 20.08.2013 р.*