© Ларичева О. М.

УДК 57.023+57.04+577.171.5

Ларичева О. М.

ПРОЦЕСИ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ТА СТАН АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ ІЗ ЗНИЖЕНОЮ АКТИВНІСТЮ ЕПІФІЗУ

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

laricheva72@gmail.com

Дослідження проведені в рамках науково-дослідної роботи біологічного факультету Миколаївського національного університету ім. В. О. Сухомлинського «Вплив біологічно-активних речовин епіфізу на морфо функціональний стан вісцеральних систем організму тварин» (№ державної реєстрації 0112U002854).

Вступ. Роль мелатоніну (МТ) в організмі людини в останні роки привертає до себе увагу багатьох дослідників. Відомі його чисельні ефекти [1,14,20], але виключно важливими є дані відносно антиоксидантних властивостей мелатоніну [2,5]. На нашу думку, він (МТ) має особливе значення в антиоксидантному захисті (АОЗ) легень, де проходить обмін кисню між повітрям і кров'ю, тому існує великий ризик переводу кисню на активні форми Оксигену (АФО) [17].

На сьогодні залишаються відсутніми дані про вплив недостатньої кількості або надлишку мелатоніну на зміни прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС), від стану якої залежить функціонування багатьох систем організму. Тому доцільним є вивчення прооксидантно-антиоксидантного балансу в умовах різного рівня активності шишкоподібної залози.

У тварин при утриманні в умовах постійного освітлення пригнічується мелатонінутворююча функція епіфізу. Виявлено, що утримання тварин в умовах природного або постійного освітлення призводить до суттєво більш швидкого розвитку спонтанних пухлин [7]. В деяких дослідженнях на старих самцях щурів популяції Wistar показано, що курсове введення МТ викликає дозозалежну морфофункціональну активацію пінеалоцитів, яка супроводжувалася збільшенням площі ядер, оптичної щільності ядер та цитоплазми при використанні гістохімічного забарвлення на нуклеїнові кислоти, що було розцінено авторами [8] як ознаки стимуляції епіфізарної продукції гормонів як індольної, так і пептидної природи.

Питання впливу МТ на прооксидантно-антиоксидантний стан легень у літературі підкреслено тільки з імунологічної точки зору [9,10].

Мета дослідження. Метою роботи було дослідження стану прооксидантно-антиоксидантної системи в легенях щурів в умовах 10- та 30-добової нестачі мелатоніну в легенях щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на 42 щурах-самцях лінії Wistar масою 240-260 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Дослідження складалося з двох серій: перша серія – визначення стану ПАС легень в умовах 10-добової нестачі мелатоніну; друга – визначення стану ПАС легень в умовах 30-добової нестачі мелатоніну. В кожній серії досліджень тварини були рандомізовані на три групи по 7 тварин: інтактна група, 10-добова та 30-добова гіпофункція епіфізу.

Гіпофункцію епіфізу та гіпомелатонінемію викликали цілодобовим освітленням інтенсивністю 1000-1500 Лк двома лампами з обох боків клітки впродовж 10 і 30 діб [19]. Евтаназію щурів проводили згідно норм біоетики у відповідності до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для наукових експериментів та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986), а також «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Легені видалялися, перфузувалися розчином хлориду натрія та визначалася їх вага. Далі визначали масовий коефіцієнт легень за формулою:

загальна маса органів / вага тварини х 100%.

Для оцінки інтенсивності процесів пероксидації в гомогенатах органів визначали вміст первиннихі вторинних її продуктів: дієнових кон'югатів (ДК), оксидієнів, триєнів та ТБК-активних продуктів. Ефективність антиоксидантного захисту легень оцінювалася за активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази (КТ), глутатіонпероксидази (ГПО) та концентрацій вітамінів А, α-токоферолу та β-каротину.

Продукцію АФО оцінювали за вмістом супероксиду. Продукцію супероксиданіонрадикалу в гомогенатах тканин визначали за реакцією з нітросинім тетразолієм (НСТ) [18]. Концентрацію дієнових кон'югатів визначали за методом І. Д. Стальної (1977) [15]. Концентрацію ТБК-активних продуктів визначали за методом І. Д. Стальної, Т. Г. Гарішвілі (1977) за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою [16].

Активність каталази визначали за методом М.О. Каролюк із співавторами (1988) [11]. Активність супероксиддисмутази визначали за реакцією аутоокислення адреналіну у лужному середовищі з

генерацією супероксиданіонрадикалу кінетичним методом [6]. Активність глутатіонпероксидази визначали за методом В.О. Пахомової із співавторами [13]. Загальну протеолітичну активність визначали за гідролізом казеїну [12].

Концентрацію триєнів, оксидієнів, α-токоферолу, вітаміну А та β-каротину визначали за модифікованою методикою [6].

Статистичну обробку проводили за допомогою програми Microsoft Office Excel 2003.

Перевірку на нормальний розподіл проводили з використанням критерію W Шапіро-Уілка [3]. Оцінку достовірності різниці між групами з нормальним розподілом ознак проводили з використанням t-критерію Ст'юдента [4]. При порівнянні двох груп з вільним розподілом ознак використовували непараметричний U-критерій Уілкоксона (Манна-Уітні). Розходження вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. 10-добова дія світла не викликала зниження маси тіла дослідних тварин у порівнянні з інтактною групою (**табл. 1**).

Внаслідок 10-добового освітлення щурів концентрація первинних продуктів перекисного окиснення вірогідно не змінилася, а концентрація ТБК-активних продуктів в легенях вірогідно збільшилася на 22% ($p<0,05$) (**табл. 2**). Підвищення вмісту ТБК-активних продуктів може вказувати як на посилення процесів вільнорадикального неферментативного перекисного окиснення біополімерів (ВРПО), так і на зменшення антиоксидантного захисту внаслідок нестачі мелатоніну.

Таблиця 1.

Зміни маси легень тварин під впливом десятидобового освітлення

Група	Легеневий індекс (%)
Інтакт (n=7)	0,360±0,023
10-добова гіпофункція епіфізу (n=7)	0,395±0,022

Примітки: в цій та наступних таблицях $p>0,05$ не вказано.

Таблиця 2.

Показники вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів (ВРПО) тканин легень щурів в умовах короткотривалої гіпофункції епіфізу

Група / Показники	Інтакт (n=7)	10-добова гіпофункція епіфізу (n=7)
Дієнові кон'югати (ммоль/кг)	10,140±0,810	9,723±0,316
Триєни (мкмоль/кг)	216,757±43,374	151,669±27,872
Оксидієни (мкмоль/кг)	531,231±71,307	398,334±37,938
ТБК-активні продукти (мкмоль/г)	8,423±0,354	10,290±0,692 p<0,05

Внаслідок гіпофункції епіфізу відмічалося вірогідне зростання концентрації супероксиданіонрадикалу ($\cdot O_2^-$) в гомогенаті легень експериментальної групи щурів від усіх джерел: від мітохондріального електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) – на 63% ($p<0,01$), від мікросомального ЕТЛ та NO-синтази – на 44% ($p<0,01$) та від фагоцитів – 42% ($p<0,01$) (**рис. 1**).

Активність антиоксидантних та протеолітичних ферментів в тканинах легень щурів експериментальної групи у порівнянні з інтактною суттєво не змінилася, хоча у тварин, які знаходились в умовах нетривалого постійного освітлення, активність каталази вірогідно зменшилася на 8% ($p<0,01$) (**табл. 3**).

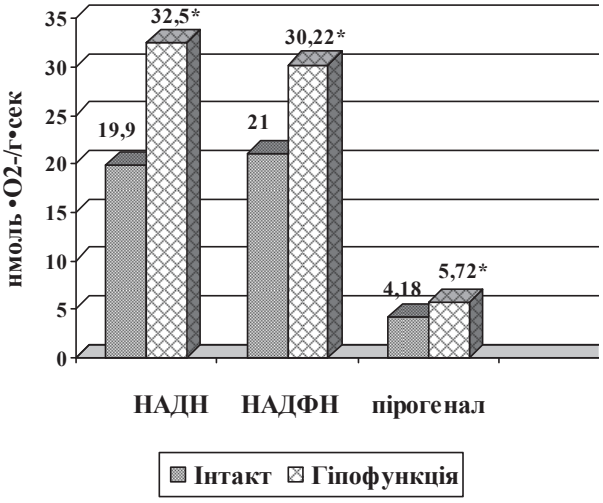

Рис. 1. Концентрація супероксиданіонрадикалу в гомогенаті легень в умовах гострого експерименту
Примітка: * – статистично вірогідно ($p<0,01$)

Таблиця 3.

Показники антиоксидантної ланки ПАС легень при 10-добовій світловій експозиції

Група / Показники	Інтакт (n=7)	10-добова гіпофункція епіфізу (n=7)
Активність каталази (мкат/кг)	4,691±0,017	4,311±0,078 p<0,01
Активність СОД (ум.од./г)	0,091±0,021	0,195±0,086
Активність ГПО (мкат/кг)	5,500±0,431	4,959±0,282
Загальна протеолітична активність (мкат/кг)	57,320±10,160	68,210±12,400
Вітамін А (мкмоль/кг)	337,578±22,139	221,433±35,945 p<0,05
β-каротин (мкмоль/кг)	73,439±13,187	44,298±17,319
α-токоферол (мкмоль/кг)	525,685±40,563	351,258±22,098 p<0,01

У щурів з короткотривалою гіпофункцією епіфізу спостерігалося зниження вмісту вітаміну А на 34% ($p<0,05$) та α-токоферолу – на 33% ($p<0,01$) відносно показників інтактних щурів.

У тварин, які знаходились в умовах постійного освітлення впродовж 30 діб, масовий коефіцієнт легень був достовірно меншим ($p<0,01$), ніж у інтактних тварин (**табл. 4**).

У щурів з хронічним зниженням активності епіфізу спостерігалася зміна концентрації деяких первинних продуктів пероксидації в гомогенаті легень у порівнянні з інтактною групою: збільшення концентрації дієнових кон'югатів – на 19% ($p<0,01$) та зменшення концентрації оксидієнів – на 37% ($p<0,05$) (**табл. 5**). Достовірної різниці між концентрацією оксидієнів та ТБК-активних речовин між двома групами не виявлено.

При оцінці рівня та джерел генерації супероксиданіонрадикалу в гомогенаті тканин легень щурів експериментальної групи виявлено зростання його вмісту за абсолютними значеннями від мітохондріального ЕТЛ на 18%, мікросомального ЕТЛ та NO-синтази – на 29% та від фагоцитів тканин – на 10%, але ці зміни не були достовірно значущими (**рис. 2**).

Тривале освітлення призвело до 9%-го ($p<0,01$) зниження активності каталази в гомогенаті досліджуваних органів щурів у порівнянні з інтактними тваринами без зміни активності супероксиддисмутази, глютатіонпероксидази та загальної протеолітичної активності (**табл. 6**). Серед неферментативних антиоксидантів спостерігалося достовірне зниження вмісту α-токоферолу на 29% ($p<0,05$).

Таблиця 4.

Зміни маси легень тварин під впливом тридцятидобового освітлення

Група	Легеневий індекс (%)
Інтакт (n=7)	0,571±0,035
30-добова гіпофункція епіфізу та гіпомелатонінемія (n=7)	0,439±0,018 p<0,01

Таблиця 5.

Показники вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів (ВРПО) тканин легень щурів в умовах тривалої гіпофункції епіфізу

Група / Показники	Інтакт (n=7)	30-добова гіпофункція епіфізу (n=7)
Дієнові кон'югати (ммоль/кг)	11,170±0,299	13,310±0,745 p<0,01
Триєни (мкмоль/кг)	112,489±24,798	55,641±19,608
Оксидієни (мкмоль/кг)	425,119±56,432	267,892±41,639 p<0,05
ТБК-активні продукти (мкмоль/г)	9,816±1,104	12,750±2,131

Таблиця 6.

Показники антиоксидантної ланки ПАС легень при 30-добовій світловій експозиції

Група / Показники	Інтакт (n=7)	30-добова гіпофункція епіфізу (n=7)
Активність каталази (мкат/кг)	6,570±0,069	5,957±0,180 p<0,01
Активність СОД (ум.од./г)	0,176±0,036	0,207±0,044
Активність ГПО (мкат/кг)	7,380±1,009	5,250±0,626
Загальна протеолітична активність (мкат/кг)	60,160±10,950	65,600±11,090
Вітамін А (мкмоль/кг)	565,071±87,429	376,684±41,367
β-каротин (мкмоль/кг)	229,143±36,281	154,279±16,454
α-токоферол (мкмоль/кг)	467,712±46,931	333,605±29,122 p<0,05

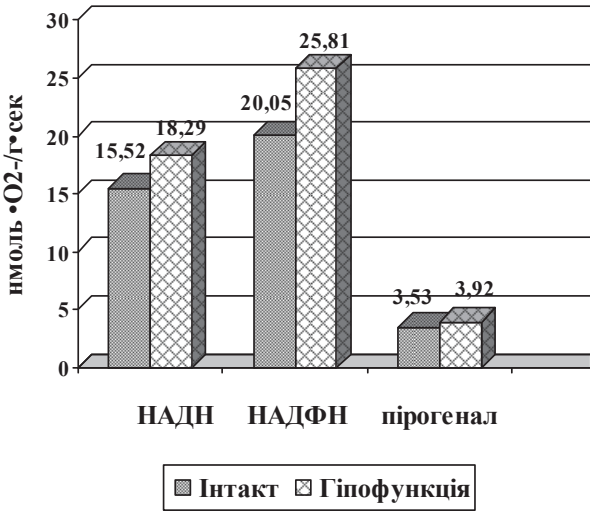

Рис. 2. Концентрація супероксиданіонрадикалу в гомогенаті легень в умовах хронічного експерименту

Висновки. Отримані дані свідчать про те, що короткотривале пригнічення продукції мелатоніну епіфізу світлом викликало незначний дисбаланс ПАС з частковим підсиленням процесів пероксидації та зменшенням потужності антиоксидантного захисту в легенях щурів.

Тривала світлова експозиція викликала більш значні порушення балансу ПАС легень, ніж 10-добове освітлення, у бік активації прооксидантної ланки й зниження антиоксидантного захисту на фоні зниження маси тіла експериментальних тварин.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується вивчення змін у прооксидантно-антиоксидантній системі легень в умовах високої активності епіфізу.

Література

1. Анисимов В. Н. Мелатонин: роль в организме и применение в клинике / В. Н. Анисимов- СПб: Система, 2007. – 40 с.
2. Арутюнян А. В. Полифункциональное антиоксидантное действие мелатонина / А. В. Арутюнян, Л. С. Козина // Всероссийская научно-практическая конференция 50 лет мелатонину: итоги и перспективы исследований. – СПб, 2008. – С. 4-5.
3. Атраментова Л. О. Біометрія. Ч. І. Характеристики розподілів: Підручник / Л.О. Атраментова, О.М. Утєвська. – Х. : Видавництво «Ранок», 2007. – 176 с.
4. Атраментова Л.О. Біометрія. Ч. ІІ. Порівняння груп та аналіз зв'язку: Підручник / Л. О. Атраментова, О. М. Утєвська. – Х. : Видавництво «Ранок», 2007. – 176 с.
5. Барабой В. А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина / В. А. Барабой // Український біохімічний журнал. – 2000. – Т. 72, №3. – С.5-11.
6. Беркало Л. В. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва та ін..; під ред. Кайдашева І. П. – Полтава : Полімет, 2003. – 320 с.
7. Виногардова И. А. Влияние светового режима на развитие спонтанных опухолей у самок крыс / [И. А. Виноградова, А. В. Букалев, М. А. Забежинский и др.] // Вопросы онкологии. – 2007. – Т.53, №5. – С. 554-561.
8. Губина-Вакулик Г. И. Морфологический ответ пинеальной железы старых животных на курсовое введение мелатонина / Г.И. Губина-Вакулик, Л. А. Бондаренко, А. Р. Геворкян // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22, № 4. – С. 626-630.
9. Дадамбаев Е. Т. Состояние иммунологической реактивности и содержание мелатонина при бронхопневмонии у детей раннего возраста с увеличенной вилочковой железой: автореф. дис. д-ра мед. наук : 14.00.09 / Е. Т. Дадамбаев-Москва, 1986. – 24 с.
10. Евсюкова Е. В. Мелатонин и аспириновая бронхиальная астма. – В кн.: Российская научно-практическая конференция «50 лет мелатонину: итоги и перспективы исследований». – Санкт-Петербург, 2008. -14 с.
11. Каролюк М. А. Метод определения активности каталазы / [Каролюк М. А., Иванова Л. И., Майорова Н. Т., Токарев К. Е.] // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16-18.
12. Левицкий А. П. Пищеварительные ферменты слюнных желез: автореф. дис. канд. биол. наук : 03.00.04 / А. П. Левицкий. – Одесса. 1974. – 53 с.
13. Пахомова В. А. Способ определения активности глутатионпероксидазы в биологических тканях / [Пахомова В. А., Крюкова Г. Н., Козлянина Н. П. и др.] // А.С. 922637 СССР, МКИ в G 01. Опубл. 23.04.1982. Биол. ИиО №15. – 2 с.
14. Пішак В. П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації / В. П. Пішак. – Чернівці: Медакадемія, 2003. – 152 с.
15. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная // М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
16. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // М.: Медицина, 1977. – С.63.
17. Сыромятникова Н. В. Метаболическая активность легких / Н. В. Сыромятникова, В. А. Гончарова, Т. В. Котенко // – Л. Медицина, 1987. – 168 с.
18. Цебржинский О. И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / О. И. Цебржинский. – Актуальні проблеми сучасної медицини. – Вип.1. -2002. -Т.2. -С. 96-97.
19. Чеботар Л. Д. Кардіогенні ефекти мелатоніну: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.13 «Фізіологія людини та тварин» / Л. Д. Чеботар. – Симферополь, 2010. – 21 с., включ. обкл.
20. Reiter R. J. Melatonin: Lowering the High Price of Free radicals / R. J. Reiter. – News Phisiol. Sci. – 2000. – Vol. 15. – P. 246-250.

УДК 57.023+57.04+577.171.5

ПРОЦЕСИ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА СТАН АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ ІЗ ЗНИЖЕНОЮ АКТИВНІСТЮ ЕПІФІЗУ

Ларичева О. М.

Резюме. Короткотривале зниження активності епіфізу у щурів викликало незначний дисбаланс прооксидантно-антиоксидантної системи з частковим підсиленням процесів пероксидації та зменшенням потужності антиоксидантного захисту в легенях щурів.

Тривала світлова експозиція викликала більш значні порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу легень, ніж 10-добове освітлення, у бік активації прооксидантної ланки й зниження антиоксидантного захисту, при цьому відмічалося і зниження маси тіла експериментальних тварин.

Ключові слова: мелатонін, перекисне окиснення, антиоксидантні ферменти, дієнові кон'югати, ТБК-активні продукти, супероксиддисмутаза, каталаза, глютатіонпероксидаза.

УДК 57.023+57.04+577.171.5

ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОСОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ЛЕГКИХ КРЫС СО СНИЖЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЭПИФИЗА

Ларичева Е. Н.

Резюме. Кратковременное снижение активности эпифиза у крыс вызывало незначительный дисбаланс прооксидантно-антиоксидантной системы с частичным усилением процессов пероксидации и снижением антиоксидантной защиты в легких крыс.

Длительная световая экспозиция вызывала более существенные нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса легких, чем 10-суточное освещение, в сторону активации прооксидантного звена и снижения антиоксидантной защиты, при этом отмечалась потеря массы тела экспериментальных животных.

Ключевые слова: мелатонин, перекисное окисление, антиоксидантные ферменты, диеновые конъюгаты, ТБК-активные продукты, супероксиддисмутаза, каталаза, глютатионпероксидаза.

UDC 57.023+57.04+577.171.5

THE PROCESSES OF FREE RADICAL LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT STATUS OF THE LUNGS OF RATS WITH REDUCED EPIPHYSIS ACTIVITY

Larycheva O.

Abstract. 10-day light exposure has not caused weight loss of experimental animals compared to the intact group.

As a result of 10-day lighting of the rats, the concentration of TBA-active products in the lungs has increased by 22% ($p<0.05$). In consequence of epiphysis hypothyroidism, the expectable increase of the *superoxide anion radical* concentration in the lung homogenate of the experimental group of rats has been observed under the impact of all the sources: mitochondrial electron transport chain – by 63% ($p<0.01$); microsomal ETL and NO-synthase – by 44% ($p<0.01$); phagocytes – by 42% ($p<0.01$).

In the organisms of animals exposed to short-term permanent lighting, catalase activity has decreased by 8% ($p<0.01$). In the organism of rats with short-term epiphysis hypofunction the decrease of vitamin A content by 34% ($p<0.05$) and α-tocopherol – by 33% ($p<0.01$) relative to the indicators of intact rats has been observed.

Among the animals exposed to continuous lighting for 30 days, pulmonary mass index was reliably lower ($p<0,01$) than in intact animals.

Prolonged lighting led to 9% ($p<0.01$) decrease in catalase activity in homogenate of the rats studied in comparison with intact animals without altering the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and general proteolytic activity. Among non-enzymatic antioxidants a significant reduction of α-tocopherol by 29% ($p <0.05$) has been observed.

Short-term reduction of activity in epiphysis of rats caused a slight imbalance in prooxidant-antioxidant system with partial reinforcement of peroxidation processes and reduced antioxidant protection capacity in the lungs of rats.

Prolonged light exposure caused more significant disturbance of prooxidant-antioxidant balance in the lungs, than maintaining 10-day lighting, toward the activation of prooxidant link and decrease of antioxidant protection, while the decrease in body weight of experimental animals was observed.

Keywords: melatonin, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, diene conjugates, TBA-active products, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 22.09.2015 р.