

І. І. Заморський

ФОТОПЕРІОДИЧНІ ЗМІНИ ІНТЕНСИВНОСТІ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ В СІМ'ЯНИКАХ ЩУРІВ ЗА ГОСТРОЇ ГІПОКСІЇ

Кафедра патологічної фізіології і медичної фізики (зав. — проф. В. Ф. Мислицький)
Буковинської державної медичної академії

Ключові слова: дієнові кон'югати, малоновий діальдегід, каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, хроноритми, гіпоксія.

Резюме. В роботі досліджувався вплив гострої гіпобаричної гіпоксії на фоні введення мелатоніну на вміст первинних і вторинних продуктів пероксидного окислення ліпідів та активність основних антиоксидантних ферментів в сім'яниках ювенільних щурів за трьох умов освітлення — природних умов, постійного світла і постійної темряви. У інтактних тварин ($n = 7$) зареєстровані фотоперіодичні зміни інтенсивності пероксидного окислення ліпідів в статевих залозах. За гострої гіпоксії ($n = 7$) різна довжина фотоперіоду модулює інтенсивність пероксидного окислення в сім'яниках щурів: постійне світло погіршує адаптацію до окисного стресу, а постійна темрява сприяє такій адаптації. “Гормон темряви” мелатонін зменшує інтенсифікацію пероксидного окислення ліпідів, яка виникає внаслідок дії гострої гіпоксії.

Вступ. Уява про негативний вплив гіпоксії на статеву систему як людини, так і тварин, склалася в науковій літературі досить давно [3, 9]. Гостра і, особливо, хронічна гіпоксії викликають значні, критичні порушення сперматогенезу внаслідок атрофії сперматогенного епітелію з одночасним порушенням гормонопродукуючої функції сім'яників. В жіночих статевих залозах теж виникають тривалі порушення утворення статевих стероїдів, хоча і без помітного порушення формування яйцеклітин. Основні механізми тривалого порушення функцій статевих залоз залишаються недостатньо відомими.

Твердо встановлено, що за гострої гіпоксії в різних органах і тканинах, в тому числі і в сім'яниках, виникає в більшій або в меншій мірі інтенсифікація вільнорадикального пероксидного окислення ліпідів [2, 11]. З іншого боку, функція статевих залоз суттєво модулюється тривалістю зовнішнього фотоперіоду [15]. При цьому головним нейроендокринним трансдуктором [12], що передає інформацію від світлосприймаючої ланки фотоперіодичної системи головного мозку до периферичних тканин і, таким чином, здійснює їх фотоперіодичну модуляцію, є гормон шишкоподібного тіла мелатонін.

Адаптація до змін фотоперіодизму є одним з еволюційно стародавніх компонентів адаптаційної системи, що забезпечує підвищення толерантності до небезпечних умов у зовнішньому середовищі, зокрема в зимовий період року [10]. Можна припустити, що фотоперіодичні механізми

адаптації можуть використовуватись організмом для підвищення толерантності до інших небезпечних впливів, зокрема до гіпоксії.

Мета. Дослідити взаємозв'язок між станом пероксидного окислення ліпідів та фотоперіодичними змінами в сім'яниках статевонезрілих щурів за гострої гіпоксії, а також визначити вплив мелатоніну на цей зв'язок.

Матеріали і методи. Експерименти проведені на 76 статевонезрілих самцях безпородних білих щурів масою 65-75 г, які знаходились в досліді 7 діб і доростали на момент визначення інтенсивності пероксидного окислення ліпідів до ювенільного віку 5,5-6,0 тижнів. Щурів утримували при температурі 20-24°C на стандартному вітамінізованому харчовому раціоні з вільним доступом до води. Фотоперіодичні зміни в організмі тварин моделювали протягом одного тижня згідно методики [1].

За тиждень до моделювання фотоперіодичних змін визначали чутливість щурів до гіпоксії і в подальшому використовували лише середньостійких до гіпоксії тварин. Після моделювання фотоперіодичних змін тварини зазнавали впливу гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії в модифікованій барокамері шляхом "підйому" тварин на висоту 12000 метрів зі швидкістю 58 мм.рт.ст. за 1 хвилину при 22°C. На "висотному плато" щурів витримували до зупинки дихання, після чого здійснювали "спуск" на попередню нульову висоту, відновлюючи нормальний атмосферний тиск і життєдіяльність тварин. За природних умов освітлення частині тварин за 30 хвилин до моделювання гострої гіпоксії внутрішньоочеревинно вводили мелатонін, розчинений в 0,1% розчині етанолу, в дозі 1 мг на кг ваги тіла. Контрольним тваринам вводили еквівалентну кількість розчинника. Евтаназія тварин виконувалась під легким ефірним наркозом шляхом декапітації через 30 хвилин після припинення дії гострої гіпоксії.

Після декапітації наважки сім'яників швидко охолоджували в холодному фізіологічному розчині і зберігали в рідкому азоті. При проведенні визначення продуктів пероксидного окислення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів наважку тканини сім'яника гомогенізували в 0,25 М трис-HCL (Sigma, США) буфері (pH 7,4). Аліквоти гомогенатів центрифугували при 900 g 15 хвилин, отримані супернатанти використовували в подальших дослідженнях стану пероксидного окислення ліпідів.

Інтенсивність пероксидного окислення ліпідів оцінювалась за вмістом первинних і вторинних (проміжних) продуктів ліпопероксидації — дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду — і активністю антиоксидантних ферментів — каталази [КФ 1.11.1.6], супероксиддисмутази [КФ 1.15.1.1] і глутатіонпероксидази [КФ 1.11.1.9]. Вміст дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду визначали згідно описаних методик [4, 8], розраховуючи кількість дієнових кон'югатів в нмоль на 1 г тканини сім'яника, а малонового діальдегіду в мкмоль на 1 г тканини сім'яника. Активність каталази, супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази визначали спектрофотометрично, виражаючи активність каталази в мкмоль пероксиду водню, що розклався за 1 хв на 1 мг білка [5], глутатіонпероксидази — в нмоль відновленого глутатіону (Reanal, Угорщина), що використався за 1 хв на 1 мг білка [7], а супероксиддисмутази — в одиницях активності за 1 хв на 1 мг білка. За одиницю

активності супероксиддисмутази приймали ту кількість фермента, яка за умов реакції [18] необхідна для гальмування відновлення 50% нітросинього тетразолію (Sigma, США) [14]. Вміст білка визначали за методом Лоурі [16]. Отримані дані обробляли методом варіаційної статистики з врахуванням параметричного критерію t Стьюдента та непараметричного критерію U Вілкоксона-Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення. Встановлено (табл. 1), що вміст початкових продуктів пероксидного окислення ліпідів — дієнових кон'югатів — в сім'яниках контрольних тварин збільшується в середньому на 47% за постійного світла в порівнянні з показниками за природних умов освітлення, а проміжних продуктів — малонового діальдегіду — збільшується за постійного світла в середньому на 37% і гальмується за постійної темряви в середньому на 30%. Активність глутатіонпероксидази (табл. 2) за різних умов освітлення у контрольних тварин змінюється в протилежному напрямку: зменшується за постійного світла (в середньому на 44%) і зростає за постійної темряви (в середньому на 11%). При цьому активність каталази в порівнянні з показниками у тварин за природних умов освітлення знижується за постійної темряви в середньому на 27%, а активність супероксиддисмутази зростає за постійного світла в середньому на 60%. Отже у інтактних тварин рееструються виражені фотоперіодичні зміни інтенсивності пероксидного окислення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів.

Таблиця 1

Вплив гострої гіпобаричної гіпоксії за різної довжини світлового періоду на вміст дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду в сім'яниках ювенільних щурів ($M \pm m, n = 7$)

Характер впливу	Вміст дієнових кон'югатів (нмоль на г тканини)	Вміст малонового діальдегіду (мкмоль на г тканини)
Інтактні в природних умовах освітлення	2,26±0,116	85,5±6,11
Гіпоксія в природних умовах освітлення	2,86±0,204*	106,2±8,73*
Інтактні за постійного світла	3,32±0,289**	116,8±8,92**
Гіпоксія за постійного світла	3,14±0,411	141,4±9,72*
Інтактні за постійної темряви	2,34±0,223	60,0±4,29**
Гіпоксія за постійної темряви	2,61±0,092***	114,5±8,18*

Примітка. * $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у інтактних тварин за відповідних досліду умов освітлення;
 ** $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у інтактних тварин за природних умов освітлення;
 *** $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у тварин після гіпоксії за постійного світла

За гострої гіпоксії (табл. 1) вміст дієнових кон'югатів зростає за природних умов освітлення в порівнянні з інтактними тваринами за цих же умов освітлення в середньому на 26%, залишається високим за постійного світла і найменшим — за постійної темряви. Аналогічних змін зазнає вміст малонового діальдегіду, причому найбільше зростання продуктів пероксидного окислення ліпідів (в середньому на 65% в порівнянні з інтактними тваринами за природних умов освітлення) спостерігається за постійного світла. Активність глутатіонпероксидази (табл. 2) в сім'яниках щурів за природного освітлення та постійної темряви зменшується (відповідно на 46% і 21% в порівнянні з показниками у інтактних тварин за схожих умов освітлення), залишаючись високою за постійної темряви та найменшою за постійного світла. При цьому активність каталази після гіпоксії за постійної темряви зростає, в порівнянні з показниками у інтактних тварин за цих же умов освітлення, в середньому на 28%, а активність супероксиддисмутази суттєво не змінюється. Отже, умови постійного світла погіршують стан антиоксидантного захисту та збільшують інтенсивність пероксидного окислення ліпідів в сім'яниках щурів за гострої гіпоксії. За постійної темряви, в цілому, спостерігаються протилежні зміни.

Таблиця 2

Вплив гострої гіпобаричної гіпоксії за різної довжини світлового періоду на активність антиоксидантних ферментів в сім'яниках ювенільних щурів ($M \pm m$, $n = 7$)

Характер впливу	Активність ферментів		
	Каталази (мкмоль пероксиду водню за 1 хв на 1 мг білка)	Супероксиддисмутази (умовних одиниць за 1 хв на 1 мг білка)	Глутатіонпероксидази (нмоль відновленого глутатіону за 1 хв на 1 мг білка)
Інтактні в природних умовах освітлення	4,84±0,363	0,25±0,029	0,71±0,023
Гіпоксія в природних умовах освітлення	4,54±0,253	0,21±0,036	0,38±0,019*
Інтактні за постійного світла	4,29±0,238	0,40±0,033**	0,40±0,046**
Гіпоксія за постійного світла	4,69±0,108	0,43±0,012	0,27±0,019***
Інтактні за постійної темряви	3,52±0,316**	0,24±0,018	0,79±0,024**
Гіпоксія за постійної темряви	4,49±0,135*	0,29±0,016	0,62±0,046*

Примітка. * $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у інтактних тварин за відповідних дослідних умов освітлення;
 ** $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у інтактних тварин за природних умов освітлення;
 *** $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у тварин після гіпоксії за природних умов освітлення

Отримані дані можна пояснити, якщо врахувати виражені антиоксидантні властивості “гормону темряви” — мелатоніну [13, 17]: за

постійного світла його рівень в організмі падає майже до нуля, що може викликати активацію пероксидного окислення ліпідів. Постійна темрява є фізіологічним стимулятором синтезу мелатоніну в шишкоподібному тілі [19], що може протидіяти окисному стресу та сприяти кращій адаптації до гострої гіпоксії.

Для перевірки такого припущення досліджено вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів після введення мелатоніну на фоні гіпоксії. При цьому виявлено, що (табл. 3) вміст дієнових кон'югатів після введення мелатоніну зменшується в середньому на 19% в порівнянні з показниками у тварин без введення мелатоніну, а вміст малонового діальдегіду — на 30% до рівнів, що суттєво не відрізняються від показників у контрольних тварин.

Таблиця 3

Вплив мелатоніну за гострої гіпобаричної гіпоксії у природних умовах освітлення на вміст дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду в сім'яниках ювенільних щурів ($M \pm m$, $n = 7$)

Характер впливу	Вміст дієнових кон'югатів (нмоль на г тканини)	Вміст малонового діальдегіду (мкмоль на г тканини)
Інтактні в природних умовах освітлення	2,26±0,116	85,5±6,11
Введення розчинника в природних умовах освітлення	2,21±0,119	84,3±6,15
Мелатонін в природних умовах освітлення	2,29±0,191	87,9±7,39
Гіпоксія в природних умовах освітлення	2,86±0,204*	106,2±8,73*
Введення розчинника і гіпоксія в природних умовах освітлення	2,91±0,209*	108,7±9,88*
Мелатонін і гіпоксія в природних умовах освітлення	2,31±0,125**	73,8±5,29**

Примітка. * $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у інтактних тварин;

** $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у тварин після гіпоксії без введення мелатоніну

Отже, мелатонін є гормоном, що зменшує пошкодження клітин за гострої гіпоксії, а активація утворення ендogenous мелатоніну може сприяти адаптації до гіпоксії. З іншого боку, мелатоніну властиві прямі антигонадні і антигонадотропні властивості [20]. Це, в якійсь мірі, може дати пояснення механізму порушення функцій статевих залоз за гострої гіпоксії. Тривале порушення функцій статевих залоз за гіпоксії можна вважати своєрідною “платою за адаптацію” [6]. Останнє припущення, безумовно, вимагає подальших досліджень.

Висновки.

1. В сім'яниках статевонезрілих щурів за різних умов освітлення рееструються помітні фотоперіодичні зміни інтенсивності пероксидного окислення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів.

2. Умови постійного світла погіршують стан антиоксидантного захисту та збільшують інтенсивність пероксидного окислення ліпідів в сім'яниках щурів за гострої гіпоксії, а за постійної темряви спостерігаються протилежні зміни.

3. Внутрішньоочеревинне введення мелатоніну за 30 хвилин до моделювання гострої гіпобаричної гіпоксії зменшує інтенсивність пероксидного окислення ліпідів в сім'яниках статевонезрілих щурів.

Література 1. *Заморський І. І.* Інтенсивність пероксидного окислення ліпідів за різного освітлення // Буковинський медичний вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 108-112. 2. Особливості механізмів інтенсифікації перекисного окислення ліпідів у тканинах щурів при гіпоксії різного типу / *Маньковська І. М., Середенко М. М., Нагнибіда Н. М. та ін.* // Физиол. журн. – 1993. – Т. 39, № 4. – С. 25-33. 3. *Васильев Г. А., Медведев Ю. А., Хмельницкий О. К.* Эндокринная система при кислородном голодании. – Л.: Наука, 1974. – 172 с. 4. *Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И.* Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-36. 5. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19. 6. *Кулинский В. И., Ольховский И. А.* Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях — резистентная и толерантная. Роль гормонов и рецепторов // Успехи современной биологии. – 1992. – Т. 112, Вып. 5-6. – С. 697-714. 7. *Мешишен И.Ф.* Механизм действия четвертичных аммониевых соединений (этония, тиония, додекония и их производных) на обмен веществ в норме и патологии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Киев, 1991. – 37 с. 8. *Стальная И. Д., Гаршивили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68. 9. *Хмельницкий О. К., Тарарак Т. Я.* Морфологическая характеристика гипофизарно-гонадной системы при действии на организм высокогорной гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1991. – Т. 111, № 4. – С. 432-436. 10. *Чернышев В.Б.* Суточные ритмы // Биологические ритмы / Проблемы космической биологии. – М.: Наука, 1980. – Т. 41. – С. 186-229. 11. *Шугалей В. С., Ананян А. А., Милютин Н. П., Чин Ким Тхуй Тхоа* Регуляция аргинином активности цитохрома P-450 и перекисного окисления липидов в печени и семенниках крыс при гипоксии // Вопр. мед. химии. – 1991. – Т. 37, № 4. – С. 51-54. 12. *Axelrod J.* The pineal gland as a neuroendocrine transducer: [Pap.] Meet. FESN Study Group "Circadian Rhythms", Geneva, Apr. 4-6, 1991 // Discuss. Neurosci. – 1992. – V. 8, N 2-3. – P. 52-53. 13. *Chan T. Y., Tang P.* Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro // J. Pineal Res. – 1996. – V. 20, N 4. – P. 187-191. 14. *Fried R.* Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase // Biochemie. – 1975. – V. 57, N 3. – P. 657-660. 15. *Lincoln G. A.* Seasonal aspects of testicular function // The testis / Ed. H. Burger, D. de Kresten – New York: Raven Press, 1989. – P. 329-385. 16. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, N 1. – P. 265-275. 17. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E / *Pieri C., Marra M., Moroni F. et al.* // Life Sci. – 1994. – V. 55, N 15. – P. PL271-276. 18. *Nashikimi N., Appajik R., Jagi K.* The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenasin methosulfate and molecular oxygen // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1972. – V. 46, N 2. – P. 849-854. 19. *Ostrowska Z., Buntner B., Zwirska-Korczyńska K., Kniazewski B.* Wpływ warunków długiego i krótkiego dnia na rytm dobowy testosteronu u szczurów // Acad. med. siles. – 1990. – V. 21. – P. 17-23. 20. *Reiter R. J.* Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation // Front. Neuroendocrinol. – 1995. – V. 16, N4. – P. 383-415.

PHOTOPERIODIC CHANGES OF THE INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION IN THE RATS TESTES IN CASE OF ACUTE HYPOXIA

I. I. Zamorsky

Abstract. The paper studies an influence of acute hypobaric hypoxia at a background of melatonin administration on the content of primary and secondary products of lipid peroxidation and activity of main antioxidant enzymes in juvenile rats testes under three conditions of illuminating — natural conditions, constant light and constant darkness. The photoperiodic changes an intensity of lipid peroxidation in intact animals gonads has been registered. The different photo-

periodic length modulates an intensity of lipid peroxidation in rats testes in case of acute hypoxia: constant light worsens an adaptation to oxidative stress, but constant darkness assists such adaptation. The “hormone of darkness” melatonin reduces of intensification of lipid peroxidation in case of acute hypoxia.

Key words: conjugated dienes, malondialdehyde, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, chronorhythms, hypoxia.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)
