

Показники про- та антиоксидантної системи нирок щурів при токсичному гепатиті та дії мелатоніну за різної тривалості світлового дня

Екологічна ситуація, яка склалася на території нашої держави і пов'язана з викидами в навколишнє природне середовище отруйних хімічних сполук різного походження, призвела до виникнення порушень роботи органів і систем організму людини. Наслідком такого впливу найчастіше є токсичний гепатит. В експериментальних умовах токсичний гепатит, викликаний введенням тетрахлорметану (CCl_4), є модельною системою токсичного ураження гепатоцитів. В основі пошкоджувальної дії тетрахлорметану лежить його потужний прооксидантний ефект [3]. Піддаючись метаболізму в мікросомальній системі печінки, CCl_4 ініціює ланцюг реакцій вільнорадикального окиснення в мембранних структурах клітин [4]. У реалізації молекулярних механізмів пошкодження гепатоцитів провідна роль належить активним метаболітам та електрофільним інтермедіатам CCl_4 , які утворюються у процесі його біотрансформації за участю цитохром Р-450-залежних монооксигеназ. Вільнорадикальні похідні тетрахлорметану (CCl_3 , CCl_3O_2) є мембрано-тропними отрутами, що здатні атакувати метиленові містки ненасичених жирних кислот, ініціюючи ланцюг ліпопероксидації в гепатоцитах. Вільнорадикальна концепція гепатотоксичності тетрахлорметану відкрила нові можливості в лікуванні та профілактиці уражень печінки цією отрутою за рахунок використання антиоксидантів [10]. Мелатонін є досить сильним і ефективним ендогенним перехоплювачем вільних радикалів. Цей епіфізарний індоламін взаємодіє з високотоксичним гідроксил-радикалом, забезпечуючи місцевий захист проти окиснювального пошкодження біомолекул у клітині. Головний біохімічний механізм дії мелатоніну на клітину — антиоксидантний. Можливо, це відбувається за рахунок кетоенольної таутомерії молекули мелатоніну з утворенням активної ОН-групи, яка може виступати донором протонів. Окрім прямого антирадикального ефекту гормон діє, як вторинний антиоксидант, стимулюючи активність антиоксидантних ферментів (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, супероксиддисмутази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази) [6]. Як відомо, саме цей гормон забезпечує підтримання та регуляцію циркадіанних ритмів органів і систем організму [9, 11]. Порушення циркадіанних ритмів може виникати при перебуванні організму в умовах постійного освітлення і виявляться десинхронозом. Інтенсивне освітлення призводить не тільки до порушення біоритмів організму внаслідок пригнічення синтезу мелатоніну, а й виступає потужним стресовим фактором, запускає активацію стрес-реалізуючих систем організму [12].

Мета дослідження — дослідити вплив тривалості та інтенсивності світлового періоду дня на стан про- та антиоксидантної системи нирок за умов токсичного гепатиту та дії мелатоніну.

Матеріали та методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували в умовах віварію зі сталим температурним (+20°C) режимом протягом усього експерименту. Тварин поділили на серії та групи. У I серії тварин утримували в умовах штучного освітлення інтенсивністю 1500 лк у режимі 12 год

світла і 12 год темряви (12С:12Т). До першої групи ввійшли тварини, яких утримували в умовах віварію зі сталим температурним (+20°C) і світловим режимом (12 год світла і 12 год темряви) протягом 7 діб — контрольна група тварин (експеримент проводили у грудні 2007 р.); у другій групі тваринам дворазово з інтервалом в 1 день вводили тетрахлорметан — 50% олійний розчин у дозі 0,25 мл/100 г маси тіла; у третій групі — на фоні гострого тетрахлорметанового гепатиту тваринам внутрішньошлунково вводили щоденно зранку розчин мелатоніну (Sigma, США) з розрахунку 3 мг/кг маси тіла тварини. У II серії тварин утримували за умов природного освітлення в період найкоротшого світлового дня — з 13 по 23 грудня 2007 р. (8 год світла : 16 год темряви, освітленість 400–600 лк); тварин також поділили на такі ж групи, як у I серії експерименту. Через 5 та 7 діб від початку введення мелатоніну проводили евтаназію тварин шляхом декапітації під легким ефірним наркозом.

У 5% (на трис-НСІ буфері, рН = 7,4) гомогенатах нирок визначали вміст малонового альдегіду (МА) [7], відновленого глутатіону (ВГ)[7], окисно-модифікованих білків (ОМБ) [8] та активність каталази [5] і глутатіонпероксидази (ГП) [7]. Усі досліди на тваринах проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Отримані цифрові дані опрацьовували статистично.

Результати досліджень та їх обговорення. Пероральне дворазове введення тваринам олійного розчину тетрахлорметану призвело до посилення у тканинах нирок процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та накопичення молекулярних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Зокрема, на 5-ту добу після останнього введення розчину тетрахлорметану в нирках досліджуваних тварин, які перебували в умовах 12 год світла та 12 год темряви, збільшився вміст одного з кінцевих продуктів ПОЛ — малонового альдегіду, на 44% порівняно з контролем, а на 7-му добу — на 64%. Введення мелатоніну гепатитним тваринам впродовж 7-ми діб знижувало вміст МА до рівня контролю (табл. 1).

Таблиця 1

Показники про- та антиоксидантної системи нирок щурів при токсичному гепатиті за дії мелатоніну та 12 год світла і 12 год темряви ($M \pm m$, $n = 6$)

Дослід	5-та доба	7-ма доба
Вміст малонового альдегіду, мкмоль/г тканини		
Контроль	40,9 ± 2,18	40,9 ± 3,89
Гепатит	*58,9 ± 4,23	*66,9 ± 5,71
Гепатит + Мелатонін	44,25 ± 1,43	*47,7 ± 3,89
Вміст окисно-модифікованих білків, о.о.г./г тканини		
Контроль	24,3 ± 1,80	24,9 ± 1,30
Гепатит	*30,4 ± 2,35	*30,9 ± 2,33
Гепатит + Мелатонін	*26,7 ± 1,60	*28,0 ± 1,18
Активність каталази, мкмоль/хв·г тканини		
Контроль	17,4 ± 0,74	17,3 ± 1,41
Гепатит	*9,6 ± 0,68	*10,9 ± 1,64
Гепатит + Мелатонін	*11,3 ± 1,04	*12,3 ± 1,79
Вміст відновленого глутатіону, мкмоль/г тканини		
Контроль	6,2 ± 0,71	7,6 ± 0,32
Гепатит	*9,3 ± 1,01	*9,4 ± 1,41
Гепатит + Мелатонін	*7,8 ± 0,83	8,0 ± 1,01
Активність глутатіонпероксидази, нмоль/хв·мг білка		
Контроль	113,8 ± 9,56	128,2 ± 14,78
Гепатит	*235,1 ± 6,67	*225,5 ± 32,59
Гепатит + Мелатонін	*177,4 ± 11,20	*215,7 ± 12,15

* Вірогідність різниці порівняно з показниками контрольної групи $p \leq 0,05$

Активні форми кисню, крім посилення ПОЛ, сприяють окиснювальній модифікації білків, що призводить до втрати їх функціональної активності [8]. Ми встановили зростання рівня ОМБ нирок при отруєнні CCl_4 на 24–25% вище від контролю протягом 7 діб експерименту, а при введенні мелатоніну гепатитним тваринам — зниження їх вмісту до 10,0–12,5% порівняно з контрольними значеннями. Інтенсивність перебігу вільнорадикальних реакцій у тканинах великою мірою визначається функціонуванням систем антиоксидантного захисту [1]. Зокрема, вміст відновленого глутатіону (ВГ) був вищим за контроль на 50% на 5-ту добу і на 24% — на 7-му добу експерименту, а мелатонін знизив його показник до 26% на 5-ту добу, а на 7-му добу він досягав значень контролю. Знижувалась активність каталази нирок у тварин, яким перорально вводили 50% олійний розчин тетрахлорметану — на 46% на 5-ту і на 7-му доби експерименту порівняно зі значеннями в контрольній групі. При внутрішньошлунковому введенні мелатоніну активність ферменту була нижчою на 36% і 29% відповідно на 5-ту та 7-му доби порівняно з показниками першої групи тварин (див. табл. 1). Важливою ланкою захисту тварин від переокиснення є глутатіонпероксидаза (ГП), яка здатна до знешкодження пероксидних сполук — пероксиду водню та ліпопероксидів, що за умов інтоксикації CCl_4 генеруються в надлишку [2]. Ми встановили підвищення активності ГП нирок на 5-ту та 7-му доби експерименту у групі тварин з токсичним гепатитом відповідно на 106% і 76% порівняно з контролем. При введенні мелатоніну активність даного ферменту була вищою за контроль на 55% на 5-ту добу і на 68% на 7-му добу експерименту в умовах 12С:12Т (див. табл. 1).

В інших експериментальних умовах (природне освітлення в період найкоротшої тривалості світлового дня у грудні) також досліджували про- та антиоксидантний стан нирок щурів за умов токсичного тетрахлорметанового гепатиту з додатковим введенням розчину мелатоніну (табл. 2). Зокрема, спостерігали зростання кількості МА в гепатитній групі тварин на 50% порівняно з контролем на 5-ту добу експерименту,

Таблиця 2

Показники про- та антиоксидантної системи нирок щурів при токсичному гепатиті за дії мелатоніну та природного освітлення (8 год світла і 16 год темряви)
($M \pm m, n = 6$)

Дослід	5-та доба	7-ма доба
Вміст малонового альдегіду, мкмоль/г тканини		
Контроль	39,9 ± 2,68	38,2 ± 1,47
Гепатит	*60,0 ± 4,61	40,8 ± 2,15
Гепатит + Мелатонін	43,5 ± 2,46	39,8 ± 3,12
Вміст окисно-модифікованих білків, о.о.г./г тканини		
Контроль	18,2 ± 2,00	17,1 ± 1,23
Гепатит	*33,3 ± 1,4	*28,5 ± 1,37
Гепатит + Мелатонін	20,9 ± 3,38	19,6 ± 2,57
Активність каталази, мкмоль/хв·г тканини		
Контроль	16,8 ± 1,36	12,5 ± 2,62
Гепатит	*8,7 ± 0,74	*6,3 ± 3,43
Гепатит + Мелатонін	*14,4 ± 1,06	11,2 ± 2,26
Вміст відновленого глутатіону, мкмоль/г тканини		
Контроль	6,3 ± 0,26	6,9 ± 0,54
Гепатит	*9,8 ± 0,51	*9,7 ± 1,20
Гепатит + Мелатонін	*7,3 ± 0,62	7,0 ± 0,36
Активність глутатіонпероксидази, нмоль/хв·мг білка		
Контроль	112,9 ± 7,02	106,7 ± 9,18
Гепатит	*233,5 ± 19,25	*181,8 ± 11,11
Гепатит + Мелатонін	*133,8 ± 14,67	111,9 ± 7,85

* Вірогідність різниці порівняно з показниками контрольної групи $p \leq 0,05$

а на 7-му добу показники були в межах контролю. Додаткове введення тваринам мелатоніну (III-тя група) призвело до наближення кількісних значень вмісту МА до контролю. Вміст ОМБ в нирках гепатитних тварин на 5-ту добу перевищував контроль на 83%, а на 7-му добу — на 67%. Мелатонін корегував показники ОМБ на 5-ту і 7-му доби експерименту і вони були вище значень першої групи лише відповідно на 14 і 15% (див. табл. 2). Експериментальний токсичний гепатит, викликаний введенням 50% олійного розчину тетрахлорметану, є модельною системою токсичного ураження організму. У молекулярних механізмах мембраноушкоджувальної дії CCl_4 *in vivo* слід розрізняти такі фактори: 1) зв'язування молекул ксенобіотика з гідрофобними ділянками біомембран; 2) здатність ксенобіотика до метаболізму за участю специфічної ферментної системи монооксигеназ ендоплазматичного ретикулуму з утворенням високотоксичних реакційноздатних метаболітів, що взаємодіють з біоструктурами клітини [3]. Тому за умов токсичного гепатиту зросла кількість активних форм кисню, що призвело до зниження активності каталази в нирках на 49% на 5-ту добу і на 51% на 7-му добу експерименту. Введення тваринам за цих же умов експерименту мелатоніну призводило до підвищення активності даного ферменту, вона була лише на 15% і 11% нижчою від значень контрольної групи відповідно на 5-ту та 7-му доби. Вміст ВГ в нирках гепатитних тварин був підвищеним на 54% на 5-ту добу і на 40% на 7-му добу дослідів, а при введенні препарату його рівень зріс і був нижчим за контроль лише на 15% на 5-ту добу, а на 7-му добу досягав значень показників першої групи (див. табл. 2). Ми встановили підвищення активності ГП нирок на 5-ту добу експерименту у групі тварин з токсичним гепатитом в 2 рази порівняно з контролем, а при введенні мелатоніну — лише на 18%. Водночас на 7-му добу дослідів активність даного ферменту була в межах значень контролю у групі тварин, яким вводили мелатонін, а в гепатитній групі була вищою за контроль на 70% (див. табл. 2).

Порівнюючи показники про- та антиоксидантної системи нирок щурів при токсичному гепатиті за дії мелатоніну та різної тривалості світлового дня (12С:12Т (I серія) і 8С:16Т (II серія)), можна відмітити покращення показників у гепатитній групі тварин з введенням мелатоніну (третья група) II серії експериментів порівняно з I серією. Додаткове введення гепатитним тваринам розчину мелатоніну за умов меншої тривалості світлового дня більше наближало значення до контролю, ніж за умов 12С:12Т. Це може бути пов'язане насамперед із різною продукцією мелатоніну епіфізом за умов зміненого світлового дня.

Висновки. Тривалість світлового періоду дня змінювала показники про- та антиоксидантної системи нирок за умов токсичного гепатиту, а введення мелатоніну корегувало їх, наближаючи до контролю. Тривалість освітлення впливає на роботу шишкоподібної залози, а додаткове введення мелатоніну стимулює захисні антиоксидантні системи організму.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беленічев І.Ф., Левицький Є.Л., Губський Ю.І. та ін. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) // Совр. пробл. токсикологии. — 2002. — № 3. — С. 24–30.
2. Горожанская Э.Г., Ларионова В.Б., Зубрихина Г.Н. и др. Роль глутатионзависимых пероксидаз в регуляции утилизации липопероксидов в злокачественных опухолях // Биохимия. — 2001. — Т. 66, вып. 2. — С. 273–278.
3. Губский Ю.И. Коррекция химического поражения печени. — К.: Здоровья, 1989. — 168 с.
4. Кліщ І.М. Особливості перебігу окисно-відновних процесів у печінці щурів різного віку за токсичного ураження тетрахлорметаном // Укр. біохім. журн. — 1998. — Т. 70, № 6. — С. 106–111.
5. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майоров И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
6. Мецишен І.Ф., Пішак В.П., Заморський І.І. Мелатонін: обмін та механізм дії // Бук. мед. вісн. — 2001. — Т. 5, № 2. — С. 3–15.
7. Мецишен И.Ф. Механизм действия четвертичных аммониевых соединений на обмен веществ в норме и патологии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Черновцы, 1991. — 254 с.
8. Мецишен І.Ф. Метод визначення окиснювальної модифікації білків плазми

(сироватки) крові // Бук. мед. вісн. — 1998. — Т. 2, № 1. — С. 156–158. 9. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації. — Чернівці: Медакадемія, 2003. — 152 с. 10. Скакун Н.П., Писько Г.Т., Мосейчук И.П. Поражение печени четыреххлористым углеродом: Обзорн. информ. — М.: НИИТЭХИМ, 1989. — 106 с. 11. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. — СПб.: Наука, 2003. — 223 с. 12. Хлусов И.А., Фомина Т.И., Дыгай А.М. и др. Реакция медуллярного вещества надпочечников на действие экстремальных факторов различной природы // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1997. — Т. 123, № 3. — С. 293–295.

Стаття надійшла до редколегії 19.02.08

**READINGS OF RPO- AND ANTIOXIDATIVE SYSTEM IN KIDNEYS
OF RATS UNDER CONDITION OF TOXIC HEPATITIS AND MELATONIN
ACTION IN CASE OF VARYING DURATION OF THE DAYLIGHT**

I.MESHCHYSHEN, I.MATSIOPA

Antioxidative action of melatonin has been studied under conditions of a varying duration of the photoperiod on nonline male rats with toxic hepatitis induced by tetrachloromethane solution. It was established that mechanism of melatonin antioxidative action consist in decrease of lipids and proteins peroxidation intensity in kidneys and activation of antioxidative enzymes.

Key words: melatonin, toxic hepatitis, lipid and protein peroxidation, kidneys.

**ПОКАЗАТЕЛИ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОЧЕК КРЫС
В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА И ДЕЙСТВИЯ МЕЛАТОНИНА
ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СВЕТОВОГО ДНЯ**

И.Ф.МЕЩИШЕН, И.В.МАЦЁПА

На белых нелинейных крысах-самцах с токсическим гепатитом, вызванным раствором тетрахлорметана, изучено антиоксидантное действие мелатонина, которое состоит в снижении интенсивности процессов перекисного окисления липидов, белков почек и активации антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: мелатонин, токсический гепатит, перекисное окисление липидов и белков, почки.

УДК 616-056.3-092 : 612.017-08

*О.В.САДЛЯК, Л.А.ЛЮБИНЕЦЬ, О.Л.ІВАНКІВ, М.О.КАЧМАРСЬКА
Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького*

**Визначення продуктів NO-синтазної активності
у лімфоцитах білих щурів до і після їх інкубації
з ендотеліоцитами за умов хронічної
гіперімунокомплексемії**

Відкриття властивостей оксиду азоту (NO) як поліфункціонального фізіологічного регулятора стало одним із багатьох видатних досягнень кінця ХХ ст. [10, 12].

В організмі ссавців оксид азоту синтезується з амінокислоти L-аргініну. Одним із основних продуктів метаболізму NO є іони NO_2^- і NO_3^- . Іони NO_2^- досить активно перетворюються в NO і NO_3^- , при цьому в основному виводяться з організму. Цей процес є окиснювальною реакцією, яку каталізує фермент NO-синтазу (NOS) [7]. Стабільні метаболіти NO — нітрیتی/нітрати, GSNO, іони аміаку та багато інших є взаємо-