

ПОКАЗНИКИ ПРО- ТА АНТИОКСИДНОГО СТАНУ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ РАДІАЦІЇ ТА МЕЛАТОНІНУ

Е.В. Олійник, І.Ф. Мецишен, О.В. Плачінта
БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

Вивчено стан про- й антиоксидних показників шлунка щурів під впливом радіації сумарною осередковою дозою 20 Гр та мелатоніну. Опромінення ділянки епігастрія широкими полями у тварин посилює процеси перекисного окиснення ліпідів та білків і пригнічує показники антиоксидного захисту шлунка. При введенні в шлунок опромінених щурів мелатоніну впродовж 5 днів спостерігався чіткий антиоксидний ефект даного гормону.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: перекисне окиснення ліпідів та білків, мелатонін, опромінення, антиоксиданти.

ВСТУП. Променеву терапію все частіше застосовують для покращення результатів лікування хворих на рак шлунка. Останнім часом у багатьох клініках використовують широкі поля опромінення, що включають шлунок з пухлиною та шляхи регіонарного лімфовідтоку. Разом з тим, при застосуванні таких схем опромінення, особливо в доопераційний період, різко зростає рівень післяопераційних ускладнень, порушується загоєння анастомозів, виникають загальні токсичні прояви використання променевої терапії. Опромінені хворі погано переносять лікування [10, 14]. У розвитку цих ускладнень важливу патогенетичну роль відіграє активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окиснювальної модифікації білків (ОМБ). Як компенсаторна реакція організму на посилення ПОЛ відбувається активація антиоксидних систем організму, особливо глутатіонової системи, з наступним розвитком фази виснаження [4].

У дослідженнях багатьох авторів вказано, що мелатонін (МТ) проявляє виражені антиоксидні властивості [12, 13, 15]. Однак його вплив на стан процесів ПОЛ і ОМБ шлунка при проведенні променевої терапії раку шлунка не вивчали, що і стало метою нашої роботи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на 32 дорослих безпородних білих
© Е.В. Олійник, І.Ф. Мецишен – д.біол.н., проф.,
О.В. Плачінта, 2004.

щурах-самцях масою 190-210 г. Тварин утримували у віварії при температурі (20±1) °С (14 год світла, 10 год темряви) на стандартній дієті при вільному доступі до води. Їх поділили на чотири групи (по 8 у кожній): 1-ша – контрольна; 2-га – щури, яким перорально вводили МТ (суспензія препарату "Віта-мелатонін" фірми "Дарниця") у дозі 10 мг/кг; 3-тя – щури, яким опромінювали ділянку епігастрія широкими полями, перорально впродовж чотирьох днів вводили фізіологічний розчин NaCl із розрахунку 1 мл/100 г маси; 4-та – щури, яким на фоні опромінення вводили МТ у дозі 10 мг/кг. Дистанційне гамма-опромінення епігастрія проводили чотири рази на апараті "АГАТ Р1У" з енергією випромінювання 1,25 MeV (радіоактивний ізотоп Co60) із двох зустрічних полів розмірами 4x4 см у разовій осередковій дозі 5 Гр до сумарної осередкової дози 20 Гр. Відстань від джерела до поверхні складала 75 см. Для опромінення щурів іммобілізували у спеціальних пластикових пеналах, екранування здійснювали свинцевими пластинами, залишивши відкритою тільки ділянку епігастрія розміром 4x4 см. МТ вводили перорально через зонд за 1 год до сеансу опромінення, починаючи за 1 день до початку променевої терапії та протягом усього курсу опромінення (всього п'ять разів).

Евтаназію здійснювали під легким ефірним наркозом, після забою у тварин забирали шлунок, з якого на 50 мМ трис-НСІ буфері

(рН-7,4) готували 5 % гомогенат, центрифугували його, а супернатант використовували для аналізу.

У супернатантах гомогенату шлунка визначали вміст малонового діальдегіду (МДА) [9], ОМБ [5], відновленого глутатіону (ГSH) [7], активність каталази (К) [3], глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФД) [2], глутатіонредуктази (ГР) [11]. Концентрацію білка визначали за Лоурі й співавт.

В роботі використовували такі реактиви: трис, НАДФ⁺ і НАДФН ("Reanal", Угорщина). Решта реактивів – вітчизняного виробництва кваліфікацій ч.д.а. і х.ч.

Достовірність результатів дослідження оцінювали шляхом визначення критерію Стюдента (t) з використанням пакета програм "Statistica 5.0".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Опромінення епігастрія широкими полями активувало процеси ПОЛ у щурів. Рівень одного з кінцевих продуктів ПОЛ – МДА в шлунку у опроміненіх тварин достовірно зростав на 99 % порівняно з групою контролю. Вільні радикали, які виникали в процесі опромінення, стимулювали й окиснення білків, що проявлялось у вірогідному збільшенні рівня ОМБ на 60 % у опроміненіх щурів порівняно з контрольними тваринами.

В основі пошкоджувальної дії вільнорадикальних продуктів ліпопероксидації лежить їх властивість ковалентно модифікувати біополімери, перш за все білки [8].

На відміну від ПОЛ, окиснювальна модифікація білків при окиснювальному стресі (порушення рівноваги між анти- і проокисною системами в бік переважання генерації активних форм кисню (АФК)) має специфічний характер. При вільнорадикальній патології перш за все відбувається окиснення ліпідів, інтенсивність якого залежить від стану антиоксид-

ного захисту тканин. Білки окиснюються на другому етапі, й у цей процес включаються не лише АФК, але й інші радикальні продукти, зокрема органічні радикали ПОЛ. На глибоких стадіях окиснювального стресу, коли спостерігається виснаження антиоксидного захисту тканини, мають місце більш виражені окиснювальні руйнування білків. Внаслідок особливостей хімічної будови білків, їх функціональної активності, яку вони проявляють у різних тканинах, їх окиснювальна деструкція може бути однією із патогенетичних ланок дії радіації.

Як відомо [6], при опроміненні, крім АФК, особливо гідроксильного радикала, утворюється велика кількість пероксиду водню, який на перших порах є індуктором активності каталази. За нашими даними, активність цього ферменту на 82 % вища порівняно з контрольними тваринами.

Опромінення тканини шлунка призводить до виснаження багатьох компонентів антиоксидного захисту, викликаючи зниження рівня ферментних і неферментних антиоксидантів. Так, рівень ГSH у шлунку опроміненіх щурів достовірно знижувався на 34,4 % порівняно з групою контролю. Відомо [4], що ГSH є кофактором глутатіонпероксидази і при зниженні його рівня зменшується знешкодження ліпопероксидів.

Активність ГР у шлунку опроміненіх щурів достовірно знижувалася на 26,9 % порівняно з контрольною групою. При зменшенні активності ГР та рівня ГSH порушувалось функціонування глутатіонової системи [4]. Натомість активність Г-6-ФД у шлунку компенсаторно підвищувалася (на 57,8 %), що можна розглядати як захисну роль, оскільки при цьому зростає синтез НАДФН, який є необхідним компонентом відновлювального циклу глутатіону.

Отже, при опроміненні епігастрія у сумарній дозі 20 Гр спостерігаються посилення ліпо-

Таблиця 1 – Показники про- та антиоксидного стану шлунка щурів за умов дії радіації та мелатоніну (M±m, n=8)

Показник	Контроль	Мелатонін	Опромінення	Опромінення+ мелатонін
Малоновий діальдегід, мкмоль/г тканини	20,30±0,27	20,10±0,17	40,50±0,51*	18,20±0,17*
Окисно-модифіковані білки, E ₃₇₀ (о.о.г./г тканини)	5,13±0,06	4,54±0,09*	8,21±0,12*	5,73±0,12*
Відновлений глутатіон, мкмоль/г тканини	5,76±0,10	6,57±0,10*	3,78±0,13*	5,21±0,06*
Каталаза, нмоль/хв-г тканини	0,50±0,01	0,50±0,01	0,91±0,01*	0,39±0,01*
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, мкмоль/хв-мг білка	2,44±0,10	2,35±0,08	3,85±0,09*	2,61±0,11
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв-мг білка	1,30±0,09	1,68±0,10*	0,95±0,07*	1,50±0,12

Примітка. * – різниця між контролем і дослідними групами є достовірною (p<0,05).

пероксидації та ОМБ у тканині шлунка і пригнічення антиоксидного захисту, що може призводити до порушення загоєння анастомозів після променевої терапії.

У щурів, яким перорально вводили МТ, мали місце достовірне зниження рівня ОМБ на 11,5 %, зростання вмісту GSH у шлунку на 14,1 % порівняно з контролем. МТ може стимулювати синтез антиоксидних ферментів, що проявлялося у підвищенні активності ГР у шлунку на 29,2 %. Не виявлено впливу МТ на активність Г-6-ФД, каталази та рівень МДА (табл. 1).

В опромінених тварин, яким вводили МТ, достовірно зменшувався рівень МДА порівняно з тільки опроміненими щурами (на 55,1 %) і контрольною групою (на 10,4 %), що може свідчити про пряму антиоксидну дію МТ. Під впливом МТ у опромінених щурів вірогідно знижувався і рівень ОМБ порівняно з лише опроміненими тваринами (на 30,2 %), залишаючись підвищеним на 11,7 % порівняно з контролем.

Рівень GSH у шлунку опромінених щурів, які отримували МТ, зростав на 37,8 % порівняно з тільки опроміненими тваринами, але залишався нижчим, ніж у групі контролю, на 9,5 %.

Підвищена активність К у шлунку під впливом опромінення суттєво знижувалася на 133,3 % порівняно з опроміненими щурами та на 28,2 % порівняно з контролем. Активність Г-6-ФДГ зменшувалася під впливом МТ на 32,2 %, порівняно з опроміненими тваринами,

до рівня контролю. Знижена активність ГР під впливом опромінення підвищувалася до рівня контрольної групи внаслідок дії МТ.

Під впливом радіації утворюється цілий ряд вільних радикалів, які володіють високою цитотоксичністю [1], ушкоджуючи фосфоліпіди та білки клітинних мембран. При цьому змінюються біологічні властивості білків мембран, що призводить до руйнування клітин. У наших дослідженнях зміни показників МДА й ОМБ можуть бути доказом прооксидної дії радіації.

МТ володіє як прямими, так і непрямими антиоксидними властивостями, що проявляється і в безпосередньому знешкодженні вільних радикалів, ліпопероксидів, пероксиду водню, і в стимуляції ферментів глутатіонової системи та інших антиоксидних ензимів (супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, ГР, К) [15].

Отже, проведені нами дослідження та наявні літературні дані дозволяють рекомендувати МТ як засіб реабілітаційного лікування при проведенні променевої терапії.

ВИСНОВКИ. 1. Опромінення ділянки епігастрія широкими полями в сумарній осередковій дозі 20 Гр викликає у шлунку щурів посилення ліпопероксидації, окиснювальної модифікації білків та пригнічення антиоксидного захисту.

2. Введення тваринам мелатоніну впродовж 5 днів на тлі опромінення проявляється чіткою антиоксидною дією даного гормону.

ЛІТЕРАТУРА

1. Давыдов В.В., Божков А.И. Метаболизм эндогенных альдегидов: участие в реализации повреждающего действия оксидативного стресса и его возрастные аспекты // Биомед. химия. – 2003. – 49, № 4. – С. 374-387.
2. Захарьин Ю.Л. Метод определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы // Лаб. дело. – 1967. – № 6. – С. 327-330.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
4. Мещишен І.Ф. Глутатіонова система організму за умов норми та патології. – Чернівці: БДМА, 1999. – 26 с.

5. Мещишен І.Ф. Метод визначення окиснювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Бук. мед. вісн. – 1998. – 2, № 1. – С. 156-158.
6. Мещишен І.Ф. Обмін речовин у людини. – Чернівці: БДМА, 1993. – 180 с.
7. Мещишен І.Ф., Петрова І.В. Окисление и восстановление глутатиона в органах крыс при введении этония // Укр. биохим. журн. – 1983. – 55, № 5. – С. 571-573.
8. Мещишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окиснювальної модифікації білків // Бук. мед. вісн. – 1999. – 3, № 1. – С. 196-205.
9. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в

биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

10. Arcangeli G., Saracino B., Arcangeli G. et al. Postoperative adjuvant chemoradiation in completely resected locally advanced gastric cancer // *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* – 2002. – **54**, № 4. – P. 1069-1075.

11. Beutler E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vitro and in vivo studies // *J. Clin. Invest.* – 1969. – **48**, № 11. – P. 1957-1965.

12. Karbownik M., Lewinski A., Reiter R.J. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants // *Int. J. Biochem. Cell Biology.* – 2001. – **33**,

№ 3. – P. 735-753.

13. Reiter R.J., Tan D., Osuna C., Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review // *J. Biomed. Sci.* – 2000. – **7**, № 6. – P. 444-458.

14. Smalley S.R., Gunderson L., Tepper J. et al. Gastric surgical adjuvant radiotherapy consensus report: rationale and treatment implementation // *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* – 2002. – **52**, № 2. – P. 283-293.

15. Vijayalaxmi, Thomas C.R., Reiter R.J. et al. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – **20**, № 10. – P. 2575-2601.

ПОКАЗАТЕЛИ ПРО- И АНТИОКСИДНОГО СОСТОЯНИЯ ЖЕЛУДКА КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ РАДИАЦИИ И МЕЛАТОНИНА

Э.В. Олейник, И.Ф. Мещишен, О.В. Плачинта
БУКОВИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

Резюме

Изучено состояние про- и антиоксидных показателей желудка крыс под воздействием радиации суммарной очаговой дозой 20 Гр и мелатонина. Облучение области эпигастрия широкими полями у животных усиливает процессы перекисного окисления липидов и белков и подавляет показатели антиоксидантной защиты желудка. При введении в желудок облученных крыс мелатонина в течение 5 дней наблюдался четкий антиоксидный эффект данного гормона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксидное окисление липидов и белков, мелатонин, облучение, антиоксиданты.

THE INDICES OF PRO- AND ANTIOXIDANT STATE OF RAT STOMACH UNDER CONDITIONS OF RADIATION AND MELATONIN ACTION

E.V. Oliynyk, I.F. Meshchysheh, O.V. Plachinta
BUCOVYNIAN STATE MEDICAL ACADEMY

Summary

The state of pro- and antioxidant indices of rat stomach under conditions of radiation with the total dose 20 Gy and melatonin has been studied. The irradiation of epigastria with wide portals in rats activates the processes of lipid and protein peroxidation and decreases the indices of antioxidant defense. The 5-day introduction of melatonin to the stomach of the irradiated rats resulted in a clear antioxidant effect.

KEY WORDS: lipid and protein peroxidation, melatonin, irradiation, antioxidants.

Отримано 25.01.2004 р.

Адреса для листування: І.Ф. Мещишен, кафедра медичної хімії, Буковинська державна медична академія, Театральна пл., 2, Чернівці, 58000, Україна.