

УДК 57.034:612.82:577.12:612.273.2:612.826.33.015.22
 © Заморський І.І., 2003

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ ЗА ГОСТРОЇ ГІПОКСІЇ НА АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ -АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗИ В ПЕРЕДНЬОМУ МОЗКУ ЩУРІВ НА ФОНІ РІЗНОЇ ДОВЖИНИ ФОТОПЕРІОДУ

Заморський І. І.

Кафедра фармакології та фармації (зав. - д-р мед. наук І. І. Заморський)
 Буковинська державна медична академія, м. Чернівці

Ключові слова: гостра гіпобарична гіпоксія, мелатонін, фотоперіод, Na^+ , K^+ -аденозинтрифосфатаза, передній мозок.

Mg^{2+} -залежну аденозин-5'-трифосфатазу, яка активується іонами натрію і калію (Na^+ , K^+ -АТФ-фосфогідролаза або Na^+ , K^+ -АТФаза) [КФ 3.6.1.3], вважають ключовим ферментом нейронів. Цей фермент визначає рівень функціональної активності нервових клітин, беручи участь у механізмах підтримки трансмембранного потенціалу спокою і забезпеченні їх електричної збудливості [9]. Від цього залежить генерація нейронного потенціалу дії, проведення нервового імпульсу та обмін нейромедіаторів нервовими закінченнями. Робота самої Na^+ , K^+ -АТФази залежить від наявності АТФ, а, отже, й від енергетичного обміну і загальної забезпеченості нервової тканини киснем. Тому за будь-якого виду гіпоксії активність цього ферменту суттєво пригнічується [1], що й відбивається на високій чутливості головного мозку до кисневого голодування [9].

Водночас Na^+ , K^+ -АТФаза є інтегральним білком плазматичних мембран. Це обумовлює високу залежність функціонування ферменту від мембранемедійного ліпідного оточення [8]. Через це Na^+ , K^+ -АТФазу відносять до маркерного ферменту плазматичних мембран [1]; він характеризує структурно-функціональний стан останніх. Більше того, доведено, що Na^+ , K^+ -АТФаза мозкової тканини більш чутлива до руйнівної дії вільних радикалів, що генеруються за гіпоксії [11], ніж в інших тканинах [9].

Отже, за активністю Na^+ , K^+ -АТФази можна судити як про зміну енергетичного обміну в нервовій тканині за умов гіпоксії, так і про стан плазматичних мембран нейронів. Це, в цілому, може характеризувати функціональний стан нервової системи, високочутливої до кисневого голодування. Тому попередженню інактивації Na^+ , K^+ -АТФази та усуненню порушень структури цитоплазматичних мембран присвячено низка досліджень [2, 8, 14]. Крім того, за таким біохімічним маркером визначають ефективність протекторної дії антигіпоксантних речовин [2]. Серед останніх перспективним для впровадження у клінічну практику можна вважати гормон мелатонін, що володіє вираженими і комплексними антигіпоксантними властивостями [5, 6], є компонентом фотоперіодичної системи головного мозку та виробляється в організмі залежно від тривалості фотоперіоду [10].

Метою дослідження стало встановлення змін активності Na^+ , K^+ -аденозинтрифосфатази в передньому мозку щурів після застосування мелатоніну за гострої гіпобаричної гіпоксії на фоні зміненої довжини фотоперіоду.

Матеріал і методи дослідження. Експерименти проведено на 107 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 65–75 г, які дося-

гали на момент закінчення досліджень ювенільного віку 5,5–6,0 тижнів. В дослідженнях використовували лише середньостійких до гіпоксії тварин [6]. Для моделювання фотоперіодичних змін в організмі тварин упродовж одного тижня застосовували три різні режими освітлення — звичайна зміна світлової і темної фаз доби у весняно-літній період року (із середнім співвідношенням світло: темрява — 16 год : 8 год); а також цілодобові постійне штучне освітлення і постійна темрява. Доступ до тварин останньої групи здійснювали тільки при слабкому (в 2 лк) червоному освітленні.

Гостру гіпоксичну гіпобаричну гіпоксію моделювали у проточній барокамері шляхом розрідження повітря до величин, що еквівалентні висоті 12000 м, зі швидкістю 50 м/с. На “висотному шлюзі” щурів витримували до моменту другого агонального вдиху, після чого здійснювали “спуск” на попередню нульову висоту, відновлюючи нормальний атмосферний тиск і життєдіяльність тварин. Частині тварин за 30 хв до моделювання гострої гіпоксії внутрішньоочеревинно вводили мелатонін (“Sigma”, США) в 0,1% розчині етанолу в дозі 1 мг/кг маси тіла. Контрольним тваринам вводили еквівалентну кількість розчинника.

Евтаназію щурів виконували в світловий період доби шляхом декапітації через 30 хв після припинення дії гострої гіпоксії. Видалений головний мозок промивали в холодному фізіологічному розчині і зберігали в рідкому азоті до проведення подальших біохімічних досліджень. Активність Na^+ , K^+ -АТФази досліджували в супернатанті, який отримували після центрифугування при 900 g упродовж 15 хв гомогенатів наважок’тканин переднього мозку. Наважки гомогенізували в охолодженому до 2–4°C 0,25 M трис-HCl (“Sigma”, США) буфері (рН 7,4). Активність ферменту визначали за збільшенням під час реакції кількості неорганічного фосфату (P_i) [17] та виражали в нмоль P_i , що утворився за хв на мг білка. Кількісне визначення P_i проводили колориметричним методом [13]. Вміст білка визначали за методом Лоурі-Фоліна [12]. Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою пакета програм “STATISTICA 5.0” з використанням для оцінки вірогідності різниць окремих груп даних параметричного (t Стьюдента) та непараметричних (Вілкоксона, U Манна-Уїтні) критеріїв, а також дисперсійного аналізу “ANOVA”.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати досліджень показали (табл.), що за різних умов освітлення активність Na^+ , K^+ -АТФази в клітинах переднього мозку контрольних (нормоксичних) щурів вірогідно не змінювалась. Після гострої гіпоксії за звичайних умов

освітлення активність Na^+ , K^+ -АТФази в передньому мозку знижувалась на 23%, а за постійного освітлення ще суттєвіше — в середньому на 52% порівняно з даними у контрольних тварин за цих же умов освітлення і була найнижчою серед інших умов освітлення. Водночас за умов постійної темряви у гіпоксичних тварин активність цього ферменту залишається незмінною. Гальмування активності Na^+ , K^+ -АТФази у головному мозку узгоджується з даними літератури [1] і виникає, в першу чергу, внаслідок дефіциту АТФ, а також імовірної деструкції плазматичних мембран нейронів як результат дії вільнорадикальних окиснювачів, для яких Na^+ , K^+ -АТФаза є безпосередньою мішенню впливу [8]. Останнє пояснення узгоджується з отриманими результатами про посилення ліпідної і білкової пероксидації за гіпоксії [6, 11]. Разом з тим, наші дані вказують на істотне погіршення функціонування нейронів переднього мозку (про що можна стверджувати на підставі змін активності Na^+ , K^+ -АТФази) за умов постійного попереднього впродовж тижня освітлення, а постійна темрява протидіє інактивації Na^+ , K^+ -АТФази за кисневого голодування.

Відомо, що за умов темряви відбувається посилення продукції пінеального гормону мелатоніну [3], який проявляє виражені антиоксидантні властивості, "перехоплює" вільні радикали, сприяє

утворенню ендogenous антиоксиданту відновленого глутатіону та активує інші системи антиоксидантного захисту нейронів, викликаючи комплексну антигіпоксантну дію [6, 7, 16]. Логічно припустити, що завдяки посиленому утворенню мелатоніну умови постійної темряви протидіють інактивації Na^+ , K^+ -АТФази за гострої гіпоксії. Таке припущення підтвердила серія досліджень з введенням мелатоніну перед викликанням гіпоксії.

Так, введення мелатоніну на фоні гострої гіпоксії усуває негативний вплив гіпоксії на активність Na^+ , K^+ -АТФази при звичайному та постійному освітленнях — активність Na^+ , K^+ -АТФази у порівнянні з показниками за окремого впливу гіпоксії підвищувалась в середньому на 86% за звичайного освітлення, а за постійного освітлення — у 2,1 раза, реєструючись на рівні показників у контрольних тварин. Отже, мелатонін протидіє пригніченню активності Na^+ , K^+ -АТФази за гострої гіпобаричної гіпоксії в передньому мозку щурів, що повинно зменшувати пошкоджувальний вплив гострого кисневого голодування та покращувати функціонування нейронів. Отримані дані підтверджують доведену нами [6] комплексну антигіпоксантну і нейропротекторну дію мелатоніну, а також підкріплюються даними щодо здатності мелатоніну протидіяти інактивації Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази сарколеми кардіоміоцитів за окисного стресу [14].

Таблиця. Вплив мелатоніну на активність Na^+ , K^+ -АТФази в передньому мозку щурів за різного освітлення та гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії ($M \pm m$, $n = 7$)

Умови освітлення	Характер впливу	Активність Na^+ , K^+ -АТФази (мкмоль Р _i за хв на мг білка)
Звичайне освітлення	Контроль	0,48±0,026
	Мелатонін	0,44±0,024
	Гіпоксія	0,37±0,018 *
	Мелатонін і гіпоксія	0,69±0,039 * +
Постійне освітлення	Контроль	0,46±0,024
	Мелатонін	0,43±0,027
	Гіпоксія	0,22±0,014 * ++
	Мелатонін і гіпоксія	0,47±0,030 + ^
Постійна темрява	Контроль	0,52±0,026
	Мелатонін	0,46±0,034
	Гіпоксія	0,52±0,032 #
	Мелатонін і гіпоксія	0,47±0,031 ^

Примітки: * $p < 0,05$ щодо показників у контрольних тварин за тих же умов освітлення; + $p < 0,05$ щодо показників після гіпоксії без введення мелатоніну за тих же умов освітлення; ++ $p < 0,05$ щодо показників після гіпоксії без введення мелатоніну за звичайних умов освітлення; ^ $p < 0,05$ щодо показників після гіпоксії з введенням мелатоніну за звичайних умов освітлення; # $p < 0,05$ щодо показників після гіпоксії без введення мелатоніну за постійного освітлення.

Такий антигіпоксичний вплив мелатонін може здійснювати як за рахунок згаданих вище антиоксидантних властивостей, які протидіють інактивації ферментів плазматичних мембран вільними радикалами; так й за імовірного прямого впливу пінеальних гормонів на окисно-відновні процеси [4], за допомогою чого збільшується внутрішньоклітинний вміст АТФ в нейронах, що сприяє роботі Na^+ , K^+ -АТФази. Оскільки мелатонін здатний попереджати підвищення спорідненості ізоферментів Na^+ , K^+ -АТФази до уабайну, яке виникає після пінеалектомії [15], можна припустити, що пінеальні гормони усувають гальмівні впливи на активність Na^+ , K^+ -

АТФази з боку ендogenous уабайноподібних речовин, вироблення яких наднирковими залозами імовірно підвищується при гострій гіпоксії, так само, як і за умов стресу [8].

Висновки:

1. Вплив гострої гіпоксії на активність Na^+ , K^+ -АТФази в передньому мозку щурів залежить від характеру фотоперіоду, при якому знаходиться організм, — активність ферменту найбільш істотно знижується за умов постійного освітлення, а за постійної темряви суттєво не змінюється.

2. Мелатонін усуває інактивацію Na^+ , K^+ -АТФази нейронів переднього мозку, що виникає внаслідок дії гострої гіпоксії.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Активність маркерних ферментов клітинних мембран у крыс при адаптації к гипоксической гипоксии / Маньковская И. Н., Вавилова Г. Л., Харламова О. Н. и др. // Укр. биохим. журн. — 1997. — Т. 69,

№ 2. — С. 79–87.

2. Антиоксидантна дія таурину за умов гострої гіпоксичної гіпоксії / Маньковська І. М., Середенко М. М., Вавілова Г. Л. та ін. // Фізіол. журн. — 1998. —

- Т. 44, № 5-6. – С. 65-72.
3. Бондаренко Л. А. Современные представления о физиологии эпифиза // *Нейрофизиология*. – 1997. – 29, № 3. – С. 212-237.
4. Влияние эпифаламина на углеводный обмен и состояние сердечно-сосудистой системы у больных инсулиннезависимым сахарным диабетом / Шустов С.Е., Хавинсон В. Х., Шутак Т. С., Ромашевский Е. В. // *Клин. медицина*. – 1998. – Т. 76, № 9. – С. 45-48.
5. Заморський І. І. Вплив мелатоніну та різного фотоперіоду на виживання щурів за гострої гіпоксії // *Одеський мед. журн.* – 1998. – № 6 (50). – С. 23-25, 73-74.
6. Заморский И. И., Пишак В. П. Влияние мелатонина на содержание циклических нуклеотидов и интенсивность ПОЛ в гиппокампе и габенуле головного мозга крыс при острой гипоксии // *Биол. эксперим. биол. и мед.* – 2000. – Т. 130, № 8. – С. 168-171.
7. Зленко О. Т., Скочко-Волкова Т. А., Демченко О. М. Вплив мелатоніну на процеси перекисного окислення ліпідів у різних відділах мозку в умовах гіпоксії // *Одеський мед. журн.* – 2000. – № 6 (62). – С. 24-26.
8. Капля А. А. Структурная организация изоферментов Na^+ , K^+ -АТФ-азы в плазматической мембране // *Укр. биохим. журн.* – 1997. – Т. 69, № 5-6. – С. 12-24.
9. Лелевич В. В. Особенности энергетического обмена в ткани головного мозга // *Весті АН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 1996. – № 2. – С. 113-119.
10. Пишак В. П. Клінічна анатомія шишкоподібного тіла: 2-е видання. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 160 с.
11. Савченкова Л. В., Лукьянчук В. Д. Современные представления о генезе гипоксического синдрома и принципах его фармакокоррекции (обзор литературы и собственных исследований) // *Журн. АМН України*. – 1997. – Т. 3, № 4. – С. 554-566.
12. Справочник биохимика: Пер. с англ. / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
13. Fiske S., Subbarow J. The colorimetric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.* – 1925. – Vol. 66, N 7. – P. 375-400.
14. Melatonin prevents the suppression of cardiac Ca^{2+} -stimulated ATPase activity induced by alloxan / Chen L. D., Kumar P., Reiter R. J. et al. // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 267, N 1, Pt. 1. – P. E57-E62.
15. Modulation by pineal gland of ouabain high-affinity binding sites in rat cerebral cortex / Acuna-Castroviejo D., Castillo J. L., Fernandez B. et al. // *Am. J. Physiol.* – 1992. – Vol. 262, N 4 (Pt 2). – P. R698-706.
16. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo / Reiter R. J., Tan D. X., Qi W. et al. // *Biol. Signals Recept.* – 2000. – Vol. 9, N 3-4. – P. 160-171.
17. Robinson J. D. Interaction between monovalent cations and the $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -dependent adenosine triphosphatase // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1970. – Vol. 139, N 1. – P. 17-27.

Заморский И.И. Влияние мелатонина при острой гипоксии на активность Na^+ , K^+ -аденозинтрифосфатазы в переднем мозге крыс на фоне разной длительности фотопериода // *Український медичний альманах*. – 2003. – Том 6, №1. – С.27-29.

В работе исследовано влияние однократного внутривнутрибрюшинного введения мелатонина в дозе 1 мг на кг массы тела на активность Na^+ , K^+ -аденозин-5'-трифосфатазы (Na^+ , K^+ -АТФазы) в переднем мозге ювенильных самцов белых крыс на фоне острой гипобарической гипоксии при трех условиях освещения — естественных условиях освещения в весенне-летний период года, постоянном освещении и постоянной темноте в течении одной недели. Установлено, что острая гипоксия вызывает уменьшение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, наиболее выраженное при постоянном освещении. Постоянная темнота и введение мелатонина предупреждают уменьшение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, вызываемое острой гипоксией. Такие эффекты постоянной темноты и мелатонина содействуют антигипоксической защите нейронов.

Ключевые слова: острая гипобарическая гипоксия, мелатонин, фотопериод, Na^+ , K^+ -аденозинтрифосфатаза, передний мозг.

Zamorsky I. I. Melatonin effects under acute hypoxia on the activity of Na^+ , K^+ -adenosinetriphosphatase in the rats' forebrain against the background of varying duration of photoperiod // *Український медичний альманах*. – 2003. – Том 6, №1. – С.27-29.

The effect of a single-shot intraperitoneally administration of melatonin in a dose of 1 mg per kg body weight on the activity of Na^+ , K^+ -adenosine-5'-triphosphatase (Na^+ , K^+ -ATPase) in the forebrain of juvenile male white rats against the background of acute hypobaric hypoxia was investigated under three conditions of lighting — natural conditions of lighting in the spring-summer period of the year, constant lighting and constant darkness during the one week. It was established that acute hypoxia induced the reduction of activity of Na^+ , K^+ -ATPase, especially under the constant lighting. Constant darkness and melatonin prevented activity under acute hypoxia inducing inactivation of Na^+ , K^+ -ATPase. Such effects of constant darkness and melatonin promoted antihypoxic protection of neurons.

Key words: acute hypobaric hypoxia, melatonin, photoperiod, Na^+ , K^+ -adenosinetriphosphatase, forebrain.

Надійшла 03.12.2002 р.