

**Литература.** 1. Антохин А.И. Пространственно-временная организация пролиферативной системы эпителия крипты тонкой кишки в норме и при различных воздействиях // Автореф. дис... докт. мед. н. - М., 2001. 2. Ириков О.А., Романов Ю.А., Филиппович С.С. и др. Иерархическая структура разнопериодических биоритмов деления клеток в некоторых тканях мышей и ее реакция на инверсию фотопериода // В кн.: Пространственно-временная организация онтогенеза. - М., МГУ. 1998. - С. 176-182. 3. Романов Ю.А. Теория биологических систем и проблема их временной организации // Проблемы хронобиологии. - 1990. - Т.1, №3-4. - С. 105-122. 4. Романов Ю.А. Пространственно-временная организация биологических систем // Актовая речь. - М., РГМУ. - 2001. - 38 с. 5. Романов Ю.А., Филиппович С.С., Кузин С.М. и др. Анализ временных параметров деления клеток при изменении фотопериодичности // В кн.: Способы регенерации и клеточное деление. - М.: Наука, 1979. - С. 44-53. 6. Романов Ю.А., Евстафьев В.В., Филиппович С.С. Изучение влияния фотоинверсии на общую структуру биологических ритмов митотической активности тимоцитов // Бюлл. эксп. биол. и мед., - 1990. - №5. - С. 481-483. 7. Евстафьев В.В. Влияние фотоинверсии на разнопериодические биологические ритмы митотического индекса в эпителии пищевода мышей // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 1996. - №1. - С. 94-97. 8. Романов Ю.А., Маркина В.В., Слинкова А.Ю. и др. Хронотопобиологический анализ состояния пространственно-временной организации систем пролиферации и энергетического обмена у мышей до и после заражения их брюшнотифозной инфекцией // В кн.: Хронобиология и хрономедицина. - М.: Триада-Х. - 2000. - С. 25-49. 9. Рыбаков В.И. Клеточно-популяционные закономерности механизма формирования суточного ритма репродукции клеток // Автореф. дис... докт. мед. н. - М., 1992.

## A STUDY OF THE SPATIAL-TEMPORAL ORGANIZATION OF THE EPITHELIAL CRYPT PROLIFERATIVE SYSTEM IN THE MOUSE SMALL INTESTINE IN CASE OF TYPE III OF ITS TEMPORAL ORGANIZATION

*N.A.Zarkova, Yu.A.Romanov, A.I.Antokhin, S.S.Filippovich*

**Abstract.** The research presents findings pertaining to the spatial-temporal organization of the crypt epithelial proliferative system in the mouse small intestine in case of type III of its temporal organization. This type of temporal organization is evidenced by a dependence of the period duration of nearly one hour fluctuations of the mitotic activity in the epithelial crypt on the phases of its diurnal rhythm. Distinctions in the spatial dynamics in the crypt cellular division during the active and passive phases of the proliferative circadian rhythm, being indicative of a spatial-temporal organization of the proliferative system in the epithelium of the small intestine.

**Key words:** small intestinal crypt, proliferative system, type III of temporal organization, spatial-temporal organization.

Russian State Medical University (Moscow)

*Надійшла до редакції 20.06.2002 року*

УДК 612.273.2:612.82:612.826.33.015.22:577.352.38

*І.І.Заморський, І.Ю.Сопова, Н.Д.Філіпец*

## ОСОБЛИВОСТІ АНТИОКСИДАНТНОЇ ДІЇ МЕЛАТОНІНУ В ПЕРЕДНЬОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ГОСТРОЇ ГІПОКСІЇ

Кафедра фармакології та фармації (зав. — д. мед. н. І. І. Заморський)  
Буковинської державної медичної академії

**Резюме.** У статті подані результати дослідження антиоксидантної дії мелатоніну в корі великих півкуль та гіпокампі головного мозку ювенільних щурів за умов гострої гіпобаричної гіпоксії. Антиоксидантна дія мелатоніну оцінювалась за показниками вмісту продуктів ліпідної і білкової пероксидації та активністю основного антиоксидантного ферменту нейронів — глутатіонпероксидази. Встановлено, що мелатонін підвищує активність глутатіонпероксидази, зменшує інтенсивність ліпідної пероксидації у нормоксичних тварин та усуває порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу за гострої гіпоксії особливо помітно у гіпокампі. Водночас введення мелатоніну посилює білкову пероксидацію у гіпокампі.

**Ключові слова:** мелатонін, антиоксидантна дія, гостра гіпобарична гіпоксія, кора головного мозку, гіпокамп.

**Вступ.** За останнє десятиріччя як один з напрямків терапії багатьох захворювань розглядають застосування антиоксидантів для відновлення порушеної прооксидантно-антиоксидантної рівноваги [7]. Мелатонін є одним з найпотужніших антиоксидантів організму. Мелатонін виробляється шишкоподібним тілом у темряві та проявляє нейропротекторні [13] і протирадикальні властивості не тільки *in vitro*, але також *in vivo* [14]. Однак механізми антиоксидантної дії мелатоніну залишаються недостатньо зрозумілими. Особливо неясним є достатньо помітні протіокиснювальні властивості цього гормону в живому організмі, оскільки *in vivo* антиоксидантна дія забезпечується мелатоніном у концентраціях, які на декілька порядків нижчі, ніж ті, за допомогою яких мелатонін знешкоджує вільні радикали *in vitro*. Крім того, є дані про менш помітну захисну дію мелатоніну щодо білкової пероксидації порівняно з ліпідною [11].

**Мета дослідження.** Встановити особливості антиоксидантної дії мелатоніну в організмі лабораторних щурів за окисного стресу.

**Матеріали і методи.** Експерименти проведені на 49 статевонезрілих самцях безпородних білих щурів масою 65–75 г, які досягали на момент закінчення досліджень ювенільного віку 5,5–6,0 тижнів. За два тижні до початку досліджень визначали чутливість щурів до гіпоксії [4] і в подальшому використовували лише середньостійких до гіпоксії тварин. За 30 хв до моделювання гострої гіпоксії внутрішньоочередово вводили мелатонін ("Sigma", США), розчинений у 0,1% розчині етанолу, в дозі 1 мг/кг маси тіла. Контрольним тваринам вводили еквівалентну кількість розчинника. Гостру гіпоксичну гіпобаричну гіпоксію моделювали за звичайних умов освітлення [5]. Евтаназію щурів виконували шляхом деканітації через 30 хв після припинення дії гострої гіпоксії та швидко забирали головний мозок, який зберігали в рідкому азоті до проведення подальших досліджень. Вміст продуктів пероксидації та активність глутатіонпероксидази досліджували у супернатанті, який отримували після центрифугування при 900 g упродовж 15 хв гомогенатів наважок тканин кори великих півкуль (переважно фронтальної частини) та гіпокампа. Останні виділяли на зрізах переднього мозку згідно стереотаксичного атласу мозку статевонезрілих щурів [15]. Наважки досліджуваних структур головного мозку гомогенізували в охолодженому до 2–4°C 0,25 М трис-НСІ ("Sigma", США) буфері (рН 7,4).

Продукти білкової пероксидації визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином за методом І.Ф.Мешишєва [3]. Аліфатичні альдегід- і кетон-динітрофенілгідразони основного характеру реєстрували при 430 нм, а нейтрального — при 370 нм і розраховували у нмоль 2,4-динітрофенілгідразонів на г білка [8, 12]. Малоновий альдегід визначали згідно [9] в нмоль на 1,0 г тканини мозку. Активність глутатіонпероксидази визначали спектрофотометрично, в нмоль окисленого глутатіону ("Reanal", Угорщина), що утворився за 1 хв на 1,0 мг білка [6]. Вміст білка визначали за методом Лоурі-Фоліна [16]. Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою пакету програм "STATISTICA 5.0" з використанням для оцінки вірогідності різниць окремих груп даних параметричного (t Стюдента) та непараметричних (Вілкоксона, U Манна-Уїгні) критеріїв, а також дисперсійного аналізу "ANOVA".

**Результати дослідження та їх обговорення.** З даних, які наведені в таблиці, видно, що введення мелатоніну підвищувало активність глутатіонпероксидази в корі великих півкуль на 36%, а в гіпокампі — в 2 рази порівняно з показниками у контрольних тварин. Це призводило до зменшення вмісту малонового альдегіду в гіпокампі на 21%. Водночас збільшувався вміст продуктів окисної модифікації білків як нейтрального (на 20%), так і основного (на 34%) характеру, хоча в корі великих півкуль вміст продуктів білкової пероксидації після введення мелатоніну залишався незмінним.

За умов гострої гіпоксії зареєстрований виражений зсув прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в структурах переднього мозку щурів у бік посилення вільнорадикального окиснення молекул: накопичення малонового альдегіду (на 13–16%) і продуктів окисної модифікації білків (у корі у середньому на 48%, у гіпокампі — на 20%) з одночасним пригніченням активності глутатіонпероксидази як в корі (на 17%), так і в гіпокампі (на 24%). Такі результати відповідають літературним даним [1]. Введення мелатоніну до моделювання гострої гіпоксії нормалізувало прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в корі великих півкуль до показників у контрольних тварин. У той же час, у гіпокампі наближалася до норми лише інтенсивність ліпідної пероксидації та активність глутатіонпероксидази, але вміст продуктів білкової пероксидації в клітинах гіпокампа продовжував збільшуватися.

Отже, мелатонін, як у нормоксичних, так і у постгіпоксичних тварин, зменшував інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів та посилював активність антиоксидантних систем, в першу чергу за рахунок ферментів глутатіонової системи, що підтверджує його високі антирадикальні протекторні властивості [14]. Це сприяє антиокиснювальному захисту ліпідів і цитозольних білків, зокрема білків у

**Вплив мелатоніну за умов гострої гіпобаричної гіпоксії на вміст продуктів ліпідної (малонового альдегіда) і білкової (продукти окиснювальної модифікації білків, ОМБ) пероксидації та активність глутатіонпероксидази у корі та гіпокампі головного мозку ювенільних щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 7$ )**

Характер впливу	Кора великих півкуль				Гіпокамп			
	Малоновый альдегід (мкмоль на г тканини)	Продукти ОМБ (ммоль 2,4-динітрофенілгидразонів на г білка)		Глутатіонпероксидаза (ммоль окисненого глутатіону за хв на мг білка)	Малоновый альдегід (мкмоль на г тканини)	Продукти ОМБ (ммоль 2,4-динітрофенілгидразонів на г білка)		Глутатіонпероксидаза (ммоль окисненого глутатіону за хв на мг білка)
		нейтрального характеру	основного характеру			нейтрального характеру	основного характеру	
<i>Контроль</i>	38,7± 1,60	2,53± 0,132	1,36± 0,108	164,9± 8,23	45,5± 1,35	2,53± 0,127	1,38± 0,096	184,8± 17,37
<i>Мелатонін</i>	34,5± 1,52	2,60± 0,174	1,51± 0,064	223,9± 10,95*	36,0± 1,29*	3,03± 0,213*	1,85± 0,125*	384,1± 38,09*
<i>Гіпоксія</i>	43,7± 1,98*	3,50± 0,206*	2,16± 0,136*	137,1± 6,98*	52,9± 2,36*	2,96± 0,136*	1,69± 0,104*	140,7± 16,78*
<i>Гіпоксія і мелатонін</i>	33,2± 1,66 <sup>+</sup>	2,52± 0,367 <sup>+</sup>	1,41± 0,207 <sup>+</sup>	162,9± 7,53 <sup>+</sup> ^	35,6± 3,90* <sup>+</sup>	3,74± 0,274* <sup>+</sup> ^	2,10± 0,140* <sup>+</sup>	205,8± 27,44 <sup>+</sup> ^

**Примітки:** \* зміни вірогідні щодо показників у контрольних тварин,  $p < 0,05$ ;  
<sup>+</sup> зміни вірогідні щодо показників у тварин після гіпоксії без введення мелатоніну,  $p < 0,05$ ; ^ зміни вірогідні щодо показників у тварин при введенні мелатоніну без дії гіпоксії,  $p < 0,05$ .

корі великих півкуль за умов гострої гіпоксії, а також інтегральних білків плазматичних мембран, які переважно розташовані у ліпідному шарі мембрани, зокрема  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази нейронів переднього мозку. Хоча при цьому мелатонін не завжди ефективно захищає білкові молекули, іноді навіть посилюючи інтенсивність окиснювальної модифікації білків нейронів, імовірно за рахунок тих білків, які знаходяться на поверхні плазматичних мембран, зокрема глюкозо-6-фосфатаз [10] та білків плазми крові [11]. Такі дані можна пояснити меншою розчинністю мелатоніну у водному середовищі [10] та імовірною зміною активності серотонінергічної системи головного мозку під впливом мелатоніну. Останнє припущення підтверджує зареєстрований нами факт зменшення вмісту серотоніну після введення мелатоніну у фронтальній ділянці кори [2]. Одним з можливих механізмів антиоксидантної дії мелатоніну можна вважати зменшення внутрішньоклітинного пулу іонів кальцію, оскільки деякі дослідження вказують на такі ефекти мелатоніну та роль блокерів кальцієвих каналів в їх модуляції [17].

У цілому, наведені результати та опубліковані нами раніше дані [2] свідчать, що гормон мелатонін, основний синхронізатор хроноперіодичної системи організму, може застосовуватись як протекторний засіб за тих патологій, які супроводжуються виникненням окисного стресу. Водночас необхідні подальші дослідження змін білкової пероксидації у тканинах організму, зокрема в базальних гангліях та інших структурах головного мозку, які особливо чутливі до змін прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, на фоні введення мелатоніну та встановлення ролі окиснювальної модифікації білків у патогенезі гіпоксичного пошкодження нейронів.

#### **Висновки.**

1. Мелатонін запобігає інтенсифікації пероксидного окиснення ліпідів та протидіє зменшенню антиоксидантного захисту нейронів кори великих півкуль і гіпокампа ювенільних щурів за умов гострої гіпоксії, що вказує на антигіпоксанти властивості мелатоніну.

2. За введення мелатоніну посилюється окиснювальна модифікація білків у клітинах гіпокампа, особливо на фоні гострої гіпоксії.

**Література.** 1. 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.

2. *Заморський І.І.* Фотоперіодичний компонент механізмів адаптації до гострої гіпоксії: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – К., 2000. – 35 с. 3. *Мецишен І.Ф.* Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Бук. мед. вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156–158. 4. *Гіпоксія* и индивидуальные особенности реактивности / Березовский В.А., Бойко К.А., Клименко К.С. и др. / Под общ. ред. В.А.Березовского. – К.: Наук. думка, 1978. – 216 с. 5. *Заморский И.И., Пишак В.П.* Влияние мелатонина на содержание циклических нуклеотидов и интенсивность ПОЛ в гиппокампе и габенуле головного мозга крысы при острой гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, № 8. – С. 168–171. 6. *Мецишен І.Ф.* Механізм дії четвертичних аммонієвих сполучень (етонія, тиюнія, додеконія и их производных) на обмен веществ в норме и патологии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – К., 1991. – 37 с. 7. *Михайлов И. Б.* Настольная книга врача по клинической фармакологии. – СПб: Фолиант, 2001. – 736 с. 8. *Окислительная* модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов И.Г. // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, вып. 1. – С. 24–26. 9. *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. 10. *Free radical scavenging effects of melatonin and serotonin: possible mechanism* / Daniels W.M. U., van Rensburg S. J., van Zyl J. M., et al. // NeuroReport. – 1996. – 7, N 10. – P. 1593–1596. 11. *Melatonin protects LDL from oxidation but does not prevent the apolipoprotein derivatization* / Pieri C., Marra M., Gaspar R., Damjanovich S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol. 222, N 2. – P. 256–260. 12. *Micikel H.S., Oliver C.N., Starke-Reed P.E.* Protein oxidation and myelinolysis occur in brain following rapid correction of hyponatremia // Biochem. Biophys. Res. Com. – 1990. – Vol. 172, N 1. – P. 92–97.

## THE FEATURES OF ANTIOXIDANT ACTION OF MELATONIN IN THE FOREBRAIN OF RATS UNDER ACUTE HYPOXIA

*I.I.Zamorskyi, I.Y.Sopova, N.D.Filipets*

**Abstract.** This paper presents the results of antioxidant action of melatonin in the cerebral cortex and hippocampus of the brain of juvenile male rats under acute hypobaric hypoxia. The antioxidant action of melatonin was estimated on parameters of the contents of products of lipide peroxidation (malonic aldehyde) and protein peroxidation (the products of the oxidative modification of proteins), and activity main antioxidant enzyme of neurones — glutathione peroxidase. It was established that melatonin raised the activity of glutathione peroxidase, reduced the intensity of lipide peroxidation in normoxic animals, and eliminated a disbalance of the prooxidant-antioxidant homeostasis at the acute hypoxia especially in a hippocampus. At the same time the melatonin administration enhanced protein peroxidation in a hippocampus.

**Key words:** melatonin, antioxidant action, acute hypobaric hypoxia, cerebral cortex, and hippocampus.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Надійшла до редакції 7.06.2002 року