ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 612. 273. 2: 616. 33/. 34]: 612. 018

О.В.Бойко

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА СТАН ФІБРИНОЛІЗУ І ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У КИШКАХ ЗА УМОВ ГОСТРОЇ ГІПОКСИЧНОЇ ГІПОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ

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

Ключові слова: гостра гіпоксична гіпобарична гіпоксія, мелатонін, дієнові кон'югати, тканинний фібриноліз.

Резюме. У дослідах на 50 статевонезрілих нелінійних білих щурах-самцях встановлено активацію фібринолітичної системи в шлунку та тонкій кишці за гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії на фоні введення мелатоніну. У даній групі тварин у шлунку виявлено позитивні кореляційні зв'язки між ферментативною, неферментативною фібринолітичною активністю і концентрацією дієнових кон'югатів, що пояснюється активацією тканинного фібринолізу за рахунок збільшення проникності клітинних мембран на фоні введення мелатоніну, з наступним вивільненням активатора плазміногену тканинного типу.

Вступ. У виникненні та розвитку багатьох захворювань людини суттєва роль належить гіпоксії, оскільки любий патологічний стан прямо чи опосередковано пов'язаний з порушенням кисневої рівноваги організму. Гостра гіпоксія може викликати пошкодження внутрішніх органів за рахунок активації процесів мікротромбоутворення та реакцій пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) [7]. У розвитку цих патологічних процесів важлива роль належить стану фібринолітичної системи. Разом з тим, патогенетичне значення тканинного фібринолізу в патології шлунково-кишкового тракту практично не досліджено. Враховуючи той факт, що в кишках міститься значна кількість клітин дифузної ендокринної системи, які здатні реагувати зміною секреції біологічно активних речовин з модулюючими впливами на процеси фібринолізу, вбачається актуальність дослідження цієї ланки регуляції гомеостазу за умов гострої гіпоксії. Крім того, добре відомі антигіпоксантні властивості індолалкіламінів, до яких належить і мелатонін, що дає можливість припустити протекторні впливи останнього за даного патологічного процесу. Але це питання практично не досліджено.

Мета дослідження. Дослідити зміни в системі тканинного фібрінолізу, пероксидного окислення ліпідів у шлунку та тонкій кишці за умов гострої

гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії та встановити роль мелатоніну як фактора патогенетичної корекції цих порушень.

Матеріали і методи. Враховуючи дані про зменшення з віком чутливості, а також кількості рецепторів до мелатоніну, досліди проводились на 50 білих нелінійних статевонезрілих (віком 5-6 тижнів) щурах-самцях. За 2 тижні до моделювання гострої гіпоксії визначали чутливість щурів до гіпоксії і в подальшому використовували лише середньостійких тварин [8]. Мелатонін, з розрахунку 1 мг/кг маси тіла, вводили в черевну порожнину за 30 хв до моделювання гострої гіпоксії в об'ємі 0,3 мл розведеного в 0,1% розчині етанолу. Контрольним тваринам вводили еквівалентну кількість розчинника. Гостру гіпобаричну гіпоксичну гіпоксію моделювали за допомогою барокамери, в якій створювали низький барометричний тиск, що відповідало підйому тварин на висоту 12000 метрів із зниженням барометричного тиску, еквівалентного швидкості підйому 50 м/с [5]. На висотному плато щурів витримували до зворотної зупинки дихання, реєструючи час втрати пози та загальний час перебування на висоті, після чого проводили опускання на попередню нульову висоту, відновлюючи нормальний атмосферний тиск і життєдіяльність тварин. Евтаназію виконували шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Після проведення серединної лапаротомії, пілоричний відділ шлунка, дванадцятипалу та проксимальну частину клубової кишки швидко вилучали і заморожували в рідкому азоті. Фібринолітичну активність визначали за лізисом азофібрину, з визначенням сумарної (СФА), неферментативної (НФА) та ферментативної фібринолітичної активності (ФФА), яку розраховували за формулою: ФФА=СФА–НФА [4]. НФА визначали шляхом інкубації гомогенатів в присутності інгібітора ферментативного фібринолізу е-амінокапронової кислоти.

У вказаних органах визначали концентрації дієнових кон'югатів [2] і малонового діальдегіду [6]. Білок в тканинах визначали за методом Лоурі [10].

Статистичний аналіз, включаючи кореляційний та регресійний методи, проводили на комп'ютері IBM PC AT 386 DX за допомогою програми "Statgraphics" США.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати дослідження виявили зниження в шлунку всіх видів фібринолітичної активності за гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії в порівнянні з контролем (табл.1.). Введення мелатоніну на фоні моделювання гострої гіпоксії призвело до зростання в шлунку сумарної, неферментативної та ферментативної фібринолітичної активності в порівнянні з групою тварин, яким моделювали гіпоксію. Аналіз фібринолітичної активності в дванадцятипалій кишці виявив зростання трьох вищевказаних видів фібринолізу при введенні мелатоніну. Моделювання гострої гіпоксії на фоні введення мелатоніну супроводжувалося зростанням всіх видів фібринолізу як в порівнянні з гострою гіпоксією, так і в порівнянні з групою тварин, яким вводили мелатонін без моделювання гострої гіпоксії. У клубовій кишці виявлено зниження сумарної, неферментативної та ферментативної фібринолітичної активності при введені мелатоніну в порівнянні з контрольною групою тварин. За гострої гіпоксії всі три види фібринолітичної активності також знижувались в порівнянні з інтактними тваринами. За гіпоксії на фоні введення мелатоніну сумарна, неферментативна та ферментативна

Таблиця 1

Вплив мелатоніну на фібринолітичну активність шлунково-кишкового тракту за гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Показники фібринолітичної активності: $E_{440/1\ год}$	Контроль (n = 6)	Мелатонін (n = 6)	Гіпоксія (n = 6)	Гіпоксія + Мелатонін (n = 6)
ШЛУНОК				
СФА	119,47±15,081	235,19±58,846	85,72±8,614	238,09±52,285 $P_3 < 0,01$
НФА	60,41±8,071	122,78±30,926	39,59±4,414 $P_1 < 0,05$	126,59±26,31 $P_3 < 0,01$
ФФА	59,06±7,176	112,41±27,965	46,12±5,956	111,50±26,038 $P_3 < 0,05$
ДВАНАДЦЯТИ-ПАЛА КИШКА				
СФА	95,45±6,853	108,97±8,761	102,77±17,600	210,07±18,696 $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,01$
НФА	45,08±3,728	57,15±5,078	54,89±8,755	101,98±5,363 $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,01$
ФФА	50,37±3,833	51,81±4,099	50,72±8,000	94,598±6,480 $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,01$
ТОНКА КИШКА				
СФА	163,14±21,312	98,98±7,208 $P_1 < 0,05$	102,37±9,130 $P_1 < 0,05$	163,66±9,231 $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$
НФА	78,37±8,798	50,097±3,625 $P_1 < 0,05$	52,00±6,719 $P_1 < 0,05$	85,65±5,714 $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,01$
ФФА	84,94±14,613	45,88±3,847 $P_1 < 0,05$	50,38±3,520 $P_1 < 0,05$	78,01±3,856 $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$

Примітка: СФА – сумарна фібринолітична активність;
НФА – неферментативна фібринолітична активність;
ФФА – ферментативна фібринолітична активність;
P_1 – вірогідність різниць у порівнянні з контролем;
P_2 – вірогідність різниць у порівнянні з мелатоніном;
P_3 – вірогідність різниць у порівнянні з гіпоксією;
n – число спостережень.

фібринолітична активності зростали в порівнянні з групою тварин, яким моделювали гіпоксію, та з групою тварин, яким вводили мелатонін без моделювання гіпоксії.

Дослідження процесів пероксидного окислення ліпідів у шлунку показало зниження концентрації дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду на фоні

Таблиця 2

Вплив мелатоніну на пероксидне окислення ліпідів за гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Показники Нмоль/мг білка	Контроль (n = 6)	Мелатонін (n = 6)	Гіпоксія (n = 6)	Гіпоксія + Мелатонін (n = 6)
ШЛУНОК				
1.Дієнові кон'югати	2,71±0,288	1,06±0,020 $P_1 < 0,001$	3,06±1,492	3,66±0,122 $P_2 < 0,001$
2.Малоновий діальдегід	1,09±0,322	0,318±0,006 $P_1 < 0,05$	0,93±0,314	0,49±0,011 $P_2 < 0,001$
ДВАНАДЦЯТИПАЛА КИШКА				
1.Дієнові кон'югати	6,09±1,301	2,91±0,856	4,032±2,056	3,65±0,132
2.Малоновий діальдегід	2,29±0,488	0,95±0,179 $P_1 < 0,05$	0,83±0,311 $P_1 < 0,05$	0,55±0,012
ТОНКА КИШКА				
1.Дієнові кон'югати	2,73±1,026	2,01±0,422	2,70±0,440	2,81±0,383
2.Малоновий діальдегід	1,07±0,540	0,80±0,112	0,83±0,111	0,62±0,150

Примітка: P_1 – вірогідність різниць у порівнянні з контролем;
P_2 – вірогідність різниць у порівнянні з мелатоніном;
n – число спостережень.

введення мелатоніну в порівнянні з контрольною групою тварин (табл.2). Мелатонін при моделюванні гострої гіпобаричної гіпоксії підвищував концентрацію дієнових кон'югатів та знижував концентрацію малонового діальдегіду в порівнянні з групою тварин, яким моделювали гіпоксію. При дослідженні пероксидного окислення ліпідів в дванадцятипалій кишці виявлено зниження концентрації малонового діальдегіду як на фоні введення мелатоніну, та і при введенні мелатоніну з моделюванням гострої гіпоксії в порівнянні з контрольною групою тварин. Дослідження пероксидного окислення ліпідів у клубовій кишці не виявило вірогідних відмінностей.

Проведення кореляційного та регресійного аналізу дало можливість виявити позитивні кореляційні залежності між ферментативною фібринолітичною активністю та концентрацією дієнових кон'югатів (рис.1.а), а також між неферментативною фібринолітичною активністю і концентрацією дієнових кон'югатів у шлунку (рис. 1.б).

На наш погляд, активація ферментативної фібринолітичної активності в шлунку та тонкій кишці за гострої гіпоксії на фоні введення мелатоніну пояснюється здатністю останнього підвищувати проникність клітинних мембран. Це супроводжується вивільненням активатора плазміногену тканин-

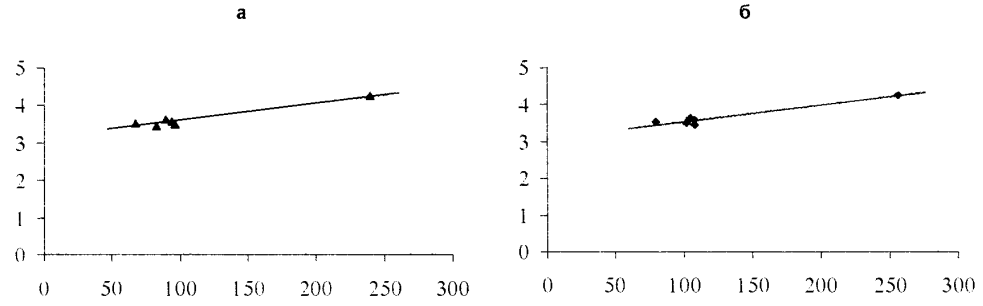

Рис. 1. Регресійна залежність між концентрацією дієнових кон'югатів і фібринолітичною активністю в шлунку білих щурів за гострої гіпоксичної гіпобаричній гіпоксії на фоні введення мелатоніну.

Вісь абсцис: а-ферментативна фібринолітична активність (E_{440}/г/год),
б- неферментативна фібринолітична активність (E_{440}/г/год).
Вісь ординат: а, б - дієнові кон'югати (нмоль/мг білка).

ного типу та відповідною активацією ферментативного фібринолізу. Наші дані знаходять підтвердження в літературних джерелах, з яких відомо про здатність мелатоніну підвищувати проникність клітинних мембран [1]. Активацію неферментативного фібринолізу в досліджуваних тканинах при введенні мелатоніну на фоні моделювання гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії можна тлумачити як наслідок розвитку стресової реакції на гіпоксію, яка призводить до зростання рівня адреналіну в крові. Мелатонін підвищує проникність мембран тучних клітин [9]. Це викликає утворення комплексу адреналін–антитромбін III–гепарин, який є основою неферментативної фібринолітичної активності. У підвищенні проникності клітинних мембран певна роль належить зростанню концентрації дієнових кон'югатів, на що вказують позитивні кореляційні звязки між неферментативною, ферментативною фібринолітичною активністю та дієновими кон'югатами. Разом з тим, ми не можемо стверджувати, що мелатонін активує пероксидне окислення ліпідів, так як його зміни за гострої гіпоксії на фоні введення мелатоніну супроводжувалися зростанням первинного продукту ПОЛ – дієнових кон'югатів та одночасним зниженням вторинного продукту – малонового діальдегіду в шлунку, крім того, з літератури відомо про антигіпоксантні властивості індолалкіламінів [3].

Висновки. Встановлено вплив мелатоніну на активацію сумарної, неферментативної та ферментативної фібринолітичної активності в шлунку та дванадцятипалій кишці, а також нормалізацію фібринолізу в клубовій кишці. Це можна пояснити здатністю мелатоніну підвищувати проникність клітинних мембран із вивільненням гепарину та активатора плазміногену тканинного типу, що вказує на нові захисні властивості мелатоніну за гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії.

Література. 1. *Арушанян Э.Б., Арушанян Л.Г.* Эпифизарный мелатонин как антистрессорный агент //Экспериментальная и клин. фармакология.–1997.–Т.60, №6.–С.71-77. 2. *Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И.* Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови //Лаб. дело.–1983.–N3.–С. 33-36. 3. *Кулинский В.И., Ольховский И.А.* Поиски новых медикаментозных средств противогипоксической защиты организма на основе изучения рецепторной регуляции кислородного обмена //Фармакологическая коррекция гипоксических состояний.–М.: НИИ фармакологии АМН СССР.–1989.–С.133-143. 4. *Кухарчук О.Л.* Патогенетична роль та методи корекції інтегративних порушень гормонально-месенжерних систем регуляції гомеостазу натрію при патології нирок: Автореф. дис ... д-ра мед.наук: 14.03.05 //Буковинська держ. мед. академ.–Одеса, 1996.–36 с. 5. *Пастушенко Л.В.* Основные методы оценки протекторного действия антигипоксантов в эксперименте и особенности их влияния на обменные

процессы в клетке //Фармакологическая коррекция гипоксических состояний.–М.: НИИ фармакологии АМН СССР.–1989.–С.118-124. 6. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты //Современные методы в биохимии.- М.: Медицина, 1977.–С. 66-68. 7. *Ступина А.С., Квитницкая-Рыжова Т.Ю., Межиборская Н.А., Герман А.К., Бережков Н.В.* Возрастные особенности ультраструктуры различных клеток при острой гипоксии //Арх. анат., гист., и эмбр.–1989.–Т.97, №12.–С. 25-31. 8. *Тимочко М.Ф., Алексевич Я.И., Бобков Ю.Г.* О некоторых биохимических механизмах жизнеобеспечения у высокорезистентных животных //Пат. физиол. и экспер. тер.–1991.–№2.–С.28-29. 9. *Цибулевский А.Ю., Елецкий Ю.К.* Тканевые базофилы желудочно-кишечного тракта и их роль в физиологических и патологических процессах // Арх. анат., гист., и эмбр.–1991.–Т.100, №2.–С.92-100. 10. *Lowry O.H., Rosebrough N.I., Parr A.L., Randwall R.I.* Protein measurment with Folin phenol reagent// J.Biol.Chem.–1951.–V. 193, N1.–P. 265-275.

THE INFLUENCE OF MELATONIN ON THE STATE OF FIBRINOLYSIS AND LIPID PEROXIDATION OF THE GASTROINTESTINAL TRACT UNDER CONDITIONS OF ACUTE HYPOXIC HYPOBARIC HYPOXIA

O.V.Boiko

Abstract. In experiments on 50 nonpubertal non-line albino male rats we established the activation of the fibrinolytic system in the stomach, duodenum and small intestine in case of acute hypoxic hypobaric hypoxia against a background of melatonin administration.

Positive correlation connections between the enzymatic, nonenzymatic fibrinolytic activity and the concetration of dien conjugates in the stomach were revealed; this explains the fact of tissue fibrinolysis activation at the expense of an increase of cellular membrane permeability against a background of melatonin administration followed by a further release of plasminogen activator of the tissue type.

Key words: acute hypoxic hypobaric hypoxia, melatonin, dien conjugates, tissue fibrinolysis.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsy)