

УДК 618.19-006.6-085.28-019
© Ташук І.В., Ганусевич І.І., 2001

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ З АДЕНОКАРЦИНОМОЮ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ Ca755, ЯКИМ ПРОВОДИЛАСЬ ПОЛІХІМІОТЕРАПІЯ В УМОВАХ ТЕМРЯВИ АБО НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ

Ташук І.В., Ганусевич І.І.

Буковинська державна медична академія

*Кафедра онкології, променевої діагностики та променевої терапії (зав. – проф. Сенютович Р.В.)
ІЕПОР ім. Р.Е.Кавецького НАН України, м. Київ*

Ключові слова. мелатонін, перекисне окислення ліпідів, глутатіонова система, поліхіміотерапія, шишкоподібне тіло.

Вступ. В різноманітних органах і системах організму ссавців можуть виникати фотоперіодичні реакції. Відомо, що інформація про освітленість потрапляє в організм через фоторецептори сітківки, по зоровим нервам досягає супрахіазматичних ядер, які є своєрідними колекторами в передачі цієї інформації до інших органів, а також і до епіфізу. Утворення мелатоніну в шишкоподібному тілі залежить від рівня виділеного норадреналіну симпатичними волокнами, власного ритму утворення мелатоніну в епіфізі ссавців не існує [5]. Цим і пояснюється нічний підйом активності серотонін-N-ацетилтрансферази в шишкоподібному тілі, наслідком чого є збільшення в 3-10 разів рівня мелатоніну в крові [1]. У цьому зв'язку привертають увагу дані про епіфіз, який, з одного боку, є головним хронобіологічним нейроендокринним трансдуктором [4], що контролює рівень циркулюючого пінеального мелатоніну [5, 9], з іншого боку, він здійснює антистресовий захист мозку та інших органів шляхом утворення гормонів індольної (мелатонін) та пептидної природи, які мають нейропротекторні та антиоксидантні властивості [2,6,8].

Мета роботи. Обґрунтувати використання екзогенного мелатоніну та ендогенного мелатоніну, створивши умови для його продукції [5, 7, 10] при проведенні поліхіміотерапії мишам з аденокарциномою Ca 755 з метою зниження токсичного впливу цитостатиків.

Матеріали та методи дослідження. Дослід проведено на мишах-самках лінії C57Bl розведення віварію ІЕПОР НАНУ ім. Р.Е.Кавецького (м Київ), вагою 20 г., із підшкірно перещепленою аденокарциномою молочної залози Ca 755. Експеримент було розпочато на 14 добу після щеплення. Мишей було розподілено на 5 терапевтичних груп, по 5 мишей в кожній. Миші 1-ї групи цілодобово знаходились в умовах темряви (маніпуляції проводились в умовах слабого червоного світла) та отримували внутрішньочеревно поліхіміотерапію (ПХТ) за схемою CMF (циклофосфан (Латвія, "Olain

Farm") - 25мг/кг, з 1-ї по 10-у добу, метотрексат (Австрія, "Ebewe") – 10мг/кг, 1-ї та 8-ї доби, 5-фторурацил (Україна, "Дарниця") – 154мг/кг, 1-ї та 8-ї доби. Тварини 2-ї групи знаходились в умовах звичайного освітлення та отримували внутрішньочеревно мелатонін (Латвія, "OlainFarm") – 40 мг/кг 3 рази на добу з інтервалом 4 години, на протязі 10 днів. Тварини 3-ї групи – контроль в умовах темряви. Миші 4-ї групи – контроль в умовах звичайного освітлення. Тварини 5-ї групи знаходились в звичайних умовах освітлення, отримували ПХТ та мелатонін, як описувалось вище.

По закінченні експерименту тварин забивали та проводили забір тканин печінки та нирок, які негайно заморожували та зберігали в рідкому азоті при температурі -90°C . Безпосередньо перед біохімічним дослідженням взірці тканини подрібнювали в рідкому азоті до гомогенного стану та визначали вміст в них малонового діальдегіду (МДА), відновленого глутатіону (GSH) та активність глутатіон-S-трансферази (GST). Концентрацію МДА визначали за допомогою тіобарбітурової кислоти, реагуючи з якою МДА утворює триметиновий комплекс, що флуоресцює, з максимумом поглинання 535 нм. Визначення вмісту відновленого глутатіону проводили за допомогою дитіонітробензойної кислоти спектрофотометричним методом. Метод визначення активності глутатіон-S-трансферази базується на взаємодії GST із субстратом – 1-хлор-4,6-динітробензолом, результатом якої є утворення продукту, що максимально поглинає при 340 нм. Показники концентрації GSH та активності GST розраховуються по відношенню до кількості білка, що передбачає визначення його вмісту в досліджуваних зразках тканин, останнє було проведено за методом Лоурі.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерія Ст'юдента. [3]

Результати дослідження, їх обговорення. Передусім потрібно зазначити, що концентрація МДА в печінці мишей, які знахо-

дилися в темряві, виявилася достовірно вищою, ніж така у тварин, які перебували в звичайному світловому режимі. Це можна пояснити стресом, в якому перебували тварини, знаходячись в темряві 24 години, що

не є для них звичною умовою існування. У цих умовах посилювалося перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), що призводило до збільшення утворення МДА, який накопичувався в печінці (Табл 1).

Таблиця 1. Концентрація МДА (нмоль/мг тканини).

Тканина	Темрява+ Хіміотерпія (група 1)	Світло+ Мелатонін (група 2)	Темрява (група 3; кон- троль)	Світло (група 4; кон- троль)	Світ- ло+мелатонін+ хіміотерпія (група 5)
Печінка	58,8 ± 0,5*	70,5 ± 0,7*	57,6 ± 5,8**	35,6 ± 2,5	60,4 ± 0,8*
Нирка	43,9 ± 0,5*	58,2 ± 0,9*	40,6 ± 3,4	31,0 ± 3,7	41,2 ± 0,6*

Примітка: * - $p < 0,05$ в порівнянні з відповідним контролем. ** - $p < 0,05$ в порівнянні з групою 4.

На цьому фоні привертає до себе увагу відсутність збільшення концентрації МДА в печінці мишей, які отримували протипухлинні препарати в умовах темряви. Це може свідчити про те, що в умовах темряви активно синтезується власний мелатонін, який і активує антиоксидантні системи організму, сприяючи як гальмуванню ПОЛ, так і метаболізму кінцевих продуктів ПОЛ. Це пояснює, чому в умовах темряви, яка все ж залишається стресовим чинником, протипухлинні препарати не посилюють стресові реакції і, таким чином, не призводять до ще більшої активації ПОЛ.

У той же час при введенні протипухлинних препаратів мишам, які знаходилися в звичайних світлових умовах, відмічено значне збільшення концентрації МДА в печінці. Цікаво, що концентрація МДА в печінці виявилася приблизно рівною у мишей, які знаходилися в темряві і не отримували протипухлинних препаратів, та у мишей, які знаходилися на світлі і отримували препарати разом з мелатонином. Примітним виявився факт значного збільшення концентрації МДА в печінці мишей, які знаходили-

ся на світлі і отримували мелатонін. Цей факт можна пояснити таким чином: по-перше, застосований мелатонін не має необхідної активності, особливо для мишей; по-друге, миші отримували три ін'єкції мелатоніна щодня протягом 10 днів, що може бути для них своєрідним стресом, який і призводив до посилення ПОЛ, яке на фоні неактивного мелатоніна і обумовило зростання концентрації МДА в печінці.

У нирках відмічені подібні зміни, хоча умови темряви не спричинили такого значного зростання концентрації МДА, як в печінці; в умовах темряви протипухлинні препарати не призводили до збільшення вмісту МДА; і, крім того, в звичайних світлових умовах введення мелатоніна одного, і мелатоніна в комбінації з протипухлинними препаратами також не спричинило такого зростання концентрації МДА, як в печінці. Це може бути зумовлене фізіологічними і біохімічними особливостями даних органів.

Стан системи глутатіона, може бути оцінений по концентрації відновленого глутатіона та активності глутатіон-S-трансферази (Табл. 2, 3).

Таблиця 2. Концентрація відновленого глутатіона (нмоль/мг білка).

Тканина	Темрява+ Хіміотерапія (група 1)	Світло+ Мелатонін (група 2)	Темрява (група 3; кон- троль)	Світло (група 4; кон- троль)	Світ- ло+мелатонін+ хіміотерапія (група 5)
Печінка	46,8 ± 2,2	24,7 ± 0,4*	52,9 ± 1,9	46,2 ± 0,4	34,3 ± 0,7
Нирка	41,5 ± 0,9	14,0 ± 0,4*	37,0 ± 0,7	31,8 ± 4,3	32,5 ± 0,9

Примітка: * - $p < 0,05$ в порівнянні з відповідним контролем.

Таблиця 3. Активність глутатіон-S-трансферази (мікроМ/хв на мг білка).

Тканина	Темрява+ Хіміотерапія (група 1)	Світло+ Мелатонін (група 2)	Темрява (група 3; кон- троль)	Світло (група 4; кон- троль)	Світ- ло+мелатонін+ хіміотерапія (група 5)
Печінка	124,7 ± 5,2*	104,1 ± 4,4	70,8 ± 12,2	94,7 ± 17,8	122,5 ± 8,4
Нирка	84,0 ± 4,7	79,7 ± 7,5	87,9 ± 5,7	88,1 ± 6,2	н.в.

Примітка: * $p < 0,05$ в порівнянні з групами 2, 3 і 4.

Підвищення вмісту відновленого глутатіона в печінці мишей, які знаходилися в темряві, вказує як на стан стресу, в якому

перебували тварини, так і на активацію системи глутатіона, що в даних умовах цілком логічно. З таблиці видно, що введення про-

типухлинних препаратів в темряві не впливає на вміст відновленого глутатіона, що може вказувати на наявність активного природного антиоксидантного захисту, який може бути зумовлений синтезом власного мелатоніна в умовах пролонгованої темряви. Потрібно при цьому зазначити, що цей факт підтверджується вище наведеними даними про концентрацію МДА у мишей, які знаходилися в темряві і отримували протипухлинні препарати.

При визначенні концентрації відновленого глутатіона в печінці мишей, які знаходилися при звичайному освітленні і отримували при цьому як один мелатонін, так і мелатонін в комбінації із протипухлинними препаратами, встановлене його зниження, особливо виражене при введенні одного лише мелатоніна. Це може свідчити про своєрідне «виснаження» системи глутатіона, яка виявилася як би переактивованою в цих умовах і не здатною забезпечувати відновлення окисленого глутатіона. Певною мірою можна говорити як про вияв захисної функції мелатоніна, так і про його нездатність підтримати цю природну антиоксидантну систему на належному функціональному рівні.

Концентрація відновленого глутатіона в нирках змінилась не так різко, як в печінці, за винятком значного зниження у мишей, які отримували мелатонін в звичайних світлових умовах. Не зовсім зрозумілим виглядає при цьому відсутність змін концентрації глутатіона у мишей, які отримували мелатонін в поєднанні з протипухлинними препаратами. Певною мірою це можна пояснити активацією системи глутатіона при впливі на організм цитостатиків, що забезпечувало збереження необхідної концентрації відновленого глутатіона в тканині.

Зниження активності глутатіон-S-трансферази в печінці мишей, що знаходилися в умовах темряви, недостовірне в порівнянні з такою у тварин, що перебували в умовах звичайного світлового режиму.

Примітно при цьому, що активність ферменту значно підвищувалася в печінці мишей, які знаходилися в темряві і отримували при цьому протипухлинні препарати. Це може свідчити про те, що при введенні цитостатиків, тобто при стані, коли організм потребує стимуляції захисних систем, при пролонгованій темряві дуже активно починає синтезуватися мелатонін, який підтримує активність антиоксидантної системи печінки. Потрібно зазначити, що активність глутатіон-S-трансферази в нирках не змінювалася в досліджених групах мишей, що вказує як на різну роль печінки і нирок в здійсненні антиоксидантних захисних функцій, так і на різний вплив, який здійснюють мелатонін та протипухлинні препарати на ці органи.

Висновки.

1. В умовах експериментів на мишах з аденокарциномою молочної залози Ca755 триразове введення мелатоніна протягом 10 днів викликає у тварин своєрідний стрес. Потрібно також врахувати, що мелатонін, який було використано в досліді, зроблений не всесвітньо визнаною фармацевтичною фірмою і, можливо, не був в належній мірі високоочищений.
2. Звертає на себе увагу той факт, що темрява, яка, як відомо, є природним індуктором мелатоніна, має сприятливий вплив на антиоксидантну систему організму. Природний мелатонін, який в умовах пролонгованої темряви синтезується більш активно, стимулює антиоксидантну систему значно сильніше, ніж екзогенний мелатонін.
3. Отримані результати дозволяють стверджувати, що доцільним і перспективним є введення протипухлинних препаратів в умовах темряви, зокрема у вечірній час доби, або в спеціальних «темних» кімнатах на зразок режимів проведення фотодинамічної терапії.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Анисимов В.Н., Reiter R.J. Функция эпифиза при раке и старении // *Вопр. Онкологии.* - 1990. - Т. 36, № 3. - С. 259-268.
2. Арашунян Э.Б. Участие эпифиза в антистрессовой защите мозга // *Успехи физиол. наук.* - 1996. - Т. 27, № 3. - С. 31-50.
3. Ашмарин И.П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Изд. 2-е, испр. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1975. - 78 с.
4. Axelrod J. The pineal gland as a neuroendocrine transducer: [Pap.] Meet. FESN Study Group "Circadian Rhythms", Geneva, Apr. 4-6, 1991 // *Discuss. Neurosci.* - 1992. - Vol. 8, № 2-3. - P. 52-53.
5. Cassone V.M. Melatonin: Time in a bottle // *Oxford Rev. Reprod. Biol.* - Oxford etc., 1990. - Vol. 12. - P. 319-367.
6. Cell protective role of melatonin in the brain / Acunacastroviejo D., Escames G., Macias M. et al. // *J. Pineal Res.* - 1995. - Vol. 19, № 2. - P. 57-63.
7. Lemaigre-Voreaux P. Melatonine et lumiere // *LUX.* - 1986. - № 139. - P. 183-197.
8. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger / Tan D.X., Chen L.D., Poeggler B. et al. // *Endocrine J.* - 1993. - Vol. 1. - P. 57-60.
9. Reiter R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar // *Experientia.* - 1993. - Vol. 49, № 8. - P. 654-664.
10. The effect of ovine pineal compounds prepared under red or green light on the activity of male rat anterior pituitaries in vitro / Slama-Scemama A., Noteborn H. P. J. M., de Moree A. et al. // *J. Neural Transmiss.* - 1985. - Vol. 62, № 1-2. - P. 155-167.

Ташук И.В., Ганусевич И.И. Стан антиоксидантної системи мишей з аденокарциномою молочної залози Ca755, яким проводилась поліхіміотерапія в умовах темряви або на фоні введення мелатоніну // Український медичний альманах.– 2001.– Том 4, № 6– С. 160-163

Изучено состояние антиоксидантной системы мышей с перепривитой аденокарциномой молочной железы Ca 755 после проведения полихимиотерапии в разных световых режимах и на фоне введения мелатонина. Установлено, что в условиях постоянной темноты активируются антиоксидантные системы организма, которые оказывают содействие как торможению перекисного окисления липидов, так и метаболизма его конечных продуктов. Естественный мелатонин, что постоянно синтезируется в условиях пролонгированной темноты, более активно стимулировал антиоксидантную систему мышей в сравнении с тем, какой вводился экзогенно.

Ключевые слова: мелатонин, перекисное окисление липидов, глутатионовая система, полихимиотерапия, шишковидное тело.

Tashchuk I.V., Ganusevich I.I. The state of antioxidant system of the mice with mammary adenocarcinoma Ca 755, who had been given the polychemotherapy in the conditions of darkness or against the background of introduction of melatonin // Український медичний альманах.– 2001.– Том 4, № 6– С. 160-163.

There was investigated the state of antioxidant system of the mice, with the inoculated mammary adenocarcinoma Ca 755, after carrying out of polychemotherapy in various light conditions or against the background of injection of melatonin. It was established, that in the condition of constant darkness the antioxidant systems are getting more active, they promote as to the inhibition of the lipid peroxidation, so as to metabolism of its final products. Natural melatonin, which constantly is being synthesized in the conditions of prolonged darkness, more actively stimulated the antioxidant system of mice in comparison with melatonin which was injected.

Key words: melatonin, lipid peroxidation, polychemotherapy, glutathione system, epiphysis.