

УДК 612.4.05; 612.33; 612.018.2

Я.М. Анасевич, О.І. Цебринський

Миколаївський національний університет імені В.О.Сухоманського, м. Миколаїв

ПРОДУКЦІЯ СУПЕРОКСИДУ В ТОНКІЙ КИШЦІ ЩУРІВ ПРИ ГІПО- ТА ГІПЕРМЕЛАТОНІНЕМІЯХ

У тонкій кишці щурів 30-добова (цілодобове освітлення 1000-1500 лк) гіпомелатонінемія сприяє збільшенню продукції супероксиданіонрадикалу від фагоцитарних електронно-транспортних ланцюгів, а 30-добова (утримання щурів у темряві та пероральне введення мелатоніну у щоденній дозі 1 мг/кг маси тіла) гіпермелатонінемія – від мітохондріального окиснення, що відповідає антиоксидантним властивостям мелатоніну. Витік супероксиду з мікосомального електронно-транспортного ланцюга окиснення в обох випадках не змінювався.

Ключові слова: тонкий кишечник, супероксиданіонрадикал, гіпомелатонінемія, гіпермелатонінемія.

Біологічне значення мелатоніну зараз дуже активно досліджується («мелатоніновий бум», навіть створено журнал «Journal of Pineal Research»). Мелатонін має антистресову, антиканцерогенну, антигеріатричну, антиоксидантну дію. Мелатонін синтезується для усього організму в епіфізі та для локальної дії в клітинах APUD-системи. В епіфізі синтез проходить тільки тоді, коли на очі не потрапляє світло. Мелатонін є нейромедіатором, імуностимулятором, гормоном, який має майже на всіх клітинах організму три типи мембранних рецепторів, що діють крізь аденілатциклазну або кальцієву месенджерні системи, та ядерні рецептори, що впливають на експресію більш ніж 250 генів. Як нейромедіатор, він має сомногенні властивості, сприяє секреції ГАМК, активує проведення нервових імпульсів. Як імуностимулятор, він активує поділ стовбурових клітин червоного кісткового мозку, стимулює регулює тимус та лімфоцити. Як гормон, він впливає на секрецію рілізінгів гіпоталамусу та блокує тропіни гіпофізу, особливо гонадотропінів, інгібує проліферацію більшості стовбурових клітин [1, 8], проявляє властивості непрямого антиоксиданту шляхом активації експресії генів антиоксидантних ферментів. Мелатонін сам є також прямим антиоксидантом, який діє ароматичним ядром та воднем аміногрупи [3, 13].

Прооксидантно-антиоксидантна система складається з генерації активних форм кисню, які ініціюють неферментативне вільно-радикальне пероксидне окиснення біополімерів, що лімітується антиоксидантним захистом. Найбільш слабка активна форма кисню – супероксиданіонрадикал (супероксид), але з нього утворюються більш сильніші (пероксиди водню, синглетний кисень, гідроксилрадикал). Утворюється супероксид: 1) реакцією катіонів металів змінної валентності з відновниками та O_2 , 2) при функціонуванні флавінових та гемових оксидаз, 3) витоком з мітохондріальної та мікосомальної електронно-транспортних ланцюгів, 4) цілеспрямовано при неспецифічному імунному захисті з фагоцитів (дихальний вибух). У крові нейтрофіли (а також моноцити) мають НАДФН-оксидазу (електронно-транспортний ланцюг $НАДФН \rightarrow ФАДН_2 \rightarrow$ цитохром 558 нм за довжиною хвилі світопоглинання або -245 мв за потенціалом), яка з O_2 утворює одноелектронним переносом супероксид. Активується ланцюг через кальцієву месенджерну систему. У тканинах при запаленнях діють нейтрофіли, яких на другій фазі запалення замінюють макрофаги, що в нормі містяться в тканинах, як нащадки моноцитів. Макрофаги містять ксантинооксидазу. Ксантинооксидаза – димер, містить 2 або 3 субодиниці, в кожній з яких є ФАД, залізо-сірчаний кластер Fe_2-S_2 , птерин, багато цистеїнів для дисульфідних містків між субодиницями, молібден, причому Mo^{+5} має зв'язки – два з ФАД, два з птерином, один з сіркою цистеїну, можливо одну з групою -S-SH. Ксантинооксидаза формується з ксантиндегідрогенази лімітованим протеолізом кальційзалежною протеїназою або окисненням дисульфідних містків, переважно при гіпоксії. Окиснення заліза у FeS-центрі дає супероксид; ФАД дегідрує субстрат, даючи активний семіхінон. ФАД дегідрує навіть воду, утворюючи гідроксилрадикал і $ФАДН_2$; останній відновлює супероксид у H_2O_2 . Електрон ФАД може відновлювати залізо, а два гідроксилрадикали сполучаються у H_2O_2 . Mo^{+5} віддає електрон на H_2O_2 з розщепленням її на $\bullet OH$ і OH^- , Mo^{+6} зв'язує OH^- та гідроксилне субстрат, віддаючи $\bullet OH$ та окислюючись до Mo^{+5} . Оскільки (молярно) на 2 FeS приходить 1 ФАД і 1 Мо, то супероксиду генерується в надлишку [11]. Там, де існує можливість бактеріального забруднення з негативними наслідками, багато макрофагів та підвищена активність ксантинооксидази (молоко, сироватка крові, печінка та особливо тонкий кишечник). Але не досліджені джерела та кількість генерованого у тонкому кишечнику супероксиду при гіпомелатонінемії та гіпермелатонінемії [2, 6].

Метою роботи було визначення джерел та кількості супероксиданіонрадикалу в тонкій кишці при гіпо- та гіпермелатонінеміях.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проводились на щурах-самцях Wistar (3 групи по 5 тварин, середня маса 160 г), які утримувались у стандартних умовах віварію при сталій температурі і вологості повітря, вільному доступі до води і їжі. Перша група – інтактна, що утримувалася при світловому режимі: 12 годин темнота – 12 годин світло терміном 30 діб. У другій групі для моделювання гіпомелатонінемії тварини

утримувались в режимі постійного освітлення (1000-1500 люкс) 30 днів. У третьої групи гіпермелатоніемія моделювалася введенням мелатоніну в харчовий раціон дозою 1 мг/кг маси тіла/добу та цілодобовою темрявою 30 днів [7]. Сезон дослідження – пізня весна, коли секреція мелатоніну середня між максимумом взимку та мінімумом у літку [10]. Тварин виводили з експерименту здійснюючи одномоментну декапітацію під кетаміновим наркозом (40,0 мг/кг маси тіла). Джерела та кількість супероксиду визначали за НСТ-тестом [12]. Принцип методу полягає у відновленні водорозчинного жовтого нітросинього тетразолію (НСТ) супероксидом у гранули синього формазану який єлюється сумішшю диметилсульфоксиду з хлороформом. Інтенсивність забарвлення оцінюється при 540 нм на фотоелектроколориметрі. Результат виражали у нмоль $\bullet\text{O}_2^{-1}/\text{г}\cdot\text{хв}$. Для визначення джерел проводили стимуляцію: НАДН – для мітохондріального окиснення, НАДФН – для мікросомального окиснення, пірогеналом (або продігіозаном, зимозаном) – для фагоцитарного окиснення. Визначалася також відносна маса тонкої кишки.

Отримані цифрові дані обробляли методами варіаційної статистики для малих виборок з використанням для оцінки ймовірності різниць середніх для окремих груп даних за критерієм Стьюдента. За статистично достовірні вважали зміни при $p < 0,05$, а значення p в межах 0,1 – 0,05 вважали тенденцією до достовірності [5, 4]. Якщо обсяг сукупності менший за 20 варіант, то слід використовувати розподіл Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Отримані дані наведені в таблиці.

Показники, $M \pm m$	Норма	Гіпомелатоніемія	Гіпермелатоніемія
Відносна маса тонкої кишки, %	$4,83 \pm 0,20$	$2,36 \pm 0,14$ $p_1 < 0,001$	$4,31 \pm 0,22$ $p_1 < 0,1, p_2 < 0,001$
НАДН – стимульований (мітохондріальне окиснення) вихід супероксиду нмоль $\bullet\text{O}_2^{-1}/\text{г}\cdot\text{хв}$	$21,67 \pm 12,50$	$27,59 \pm 4,74$	$19,40 \pm 2,31$ $p_2 < 0,1$
НАДФН – стимульований (мікросомальне окиснення) вихід супероксиду нмоль $\bullet\text{O}_2^{-1}/\text{г}\cdot\text{хв}$	$26,47 \pm 2,30$	$24,92 \pm 5,97$	$27,60 \pm 3,38$
Пірогенал – стимульований (фагоцитарне окиснення) вихід супероксиду нмоль $\bullet\text{O}_2^{-1}/\text{г}\cdot\text{хв}$	$6,47 \pm 0,71$	$8,13 \pm 0,59$ $p_1 < 0,1$	$6,49 \pm 0,37$ $p_2 < 0,05$

*Примітка: p_1 відноситься до значень норми, p_2 – порівняння гіпо- та гіпермелатоніемії.

При порівнянні однакових за терміном дії гіпомелатоніемії та гіпермелатоніемії виявилось, що при гіпомелатоніемії відносна маса тонкої кишки у 1,8 рази менше чим при гіпермелатоніемії ($p_2 < 0,001$). Майже у двічі відносна маса тонкої кишки при 30-денній гіпомелатоніемії менша за умовну норму. На 10% з тенденцією до достовірності коефіцієнт маси тонкої кишки при гіпомелатоніемії менше за умовну норму, що можливо оцінити, як наслідок дисбалансу продукції мелатоніну.

Як видно з результатів дослідження, тонка кишка виявилась відносно стійкою за генерацією супероксиду до дії гіпо- та гіпермелатоніемії. Але в умовах гіпомелатоніемії пірогенал стимулює збільшення на 26% викиду супероксиданіонрадикалу з макрофагів лімфатичних вузлів тонкого кишечника та нейтрофілів капілярної крові з тенденцією до достовірності. Враховуючи, що в макрофагах джерелом супероксиду являється ксантиноксидаза, можна припустити Са-залежну активацію переходу ксантиндегідрогенази в активну ксантиноксидазу при зниженні продукції мелатоніну епіфізом. Не виключена можливість дії мелатоніну місцевої продукції. При гіпермелатоніемії продукція супероксиду з мітохондріального окислення в 1,4 рази менше, ніж при гіпомелатоніемії, але з тенденцією до достовірності. Це вказує на суттєву антиоксидантну активність мелатоніну та можливе зниження рівня мітохондріального окиснення. Генерація супероксиду з мікросомального окислення практично однакова в нормі, гіпо- та гіпермелатоніемії. Стимульований пірогеналом дихальний вибух фагоцитів фактично проявився при гіпомелатоніемії, де продукція супероксиду в 1,3 рази більше ($p_2 < 0,05$). Тому фагоцитарна продукція супероксиду в тонкій кишці при гіпермелатоніемії, хоча і відповідає нормі, але на 20% ($p_2 < 0,05$) менше значенню аналогічного показника при гіпомелатоніемії. Мабуть в нормі і при гіпермелатоніемії мелатоніну досить для пригнічення не стимульованої активності фагоцитів. Можна передбачити, що при гіпермелатоніемії можливе блокування якихось ланок регуляції прооксидантно-антиоксидантної системи.

Враховуючи, що надлишок та нестача біологічно активної речовини може давати суттєві порушення регуляції метаболізму, можливо солідаризуватися з думкою [9], що зміни величин показника при високій біологічній значущості його, тенденція до достовірності ($p < 0,1$), слід розглядатися як достовірність.

Висновок

У тонкій кишці хронічні гіпомелатоніемія сприяє збільшенню продукції від фагоцитарних електронно-транспортних ланцюгів, а гіпермелатоніемія – від мітохондріального окиснення, що відповідає антиоксидантним властивостям мелатоніну.

Перспективи подальших досліджень. У подальших дослідженнях планується визначити рівень прооксидантно-антиоксидантного балансу та всмоктування у тонкій кишці при різній забезпеченості організму мелатоніном.

Література

1. Анисимов В.Н. Мелатонин: роль в организме и применение в клинике. / Анисимов В.Н. – СПб: Система, 2007. – 40 с.
2. Анисимов В.Н. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта. / Анисимов В.Н., Кветной И.М., Комаров Ф.И., Малиновская Н.К., Рапопорт С.И. – М.: Советский спорт, 2000. – 184 с.

3. Барабой В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина / Барабой В.А. // Укр. біохім. журн. – 2000. – Т.72, N3. – С.5-11.
4. Деркач М.П. Курс варіаційної статистики. / Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.С.– Київ:Вища школа, 1977. – 208 с. – С.25.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. / Лакин Г.Ф. – Москва: Высшая школа, 1968. – 293 с.
6. Малиновская Н.К. Мелатонин в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки / Малиновская Н.К., Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Лакшин А.А., Вознесенская Л.А., Расулов М.И. // Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Ф.И. Комарова, С.И. Рапопорта, Н.К. Малиновской, В.Н. Анисимова. – М.: ИД МЕДПРАКТИКА, 2003. – Гл. 9., с. 147-162.
7. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації. / Пішак В.П. – Чернівці: Медакадемія, 2003. – 152 с.
8. Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы мелатонина / Смирнов А.Н. // Биохимия. –2001. – Т.66, N1. – С.28-36.
9. Трахтенберг И.М. Проблема нормы в токсикологии. / Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О. – М.: Медицина, 1991. – 208 с. – С.42-43.
10. Турчина С.И. Сезонные ритмы продукции мелатонина и иммунореактивности у здоровых детей. / Турчина С.И., Шляхова Н.В. –Всероссийская научно-практическая конференция 50 лет мелатонину: итоги и перспективы исследований, Тезисы докладов, СПб, 2008. – С. 41].
11. Цебржинский О.И. Некоторые аспекты антиоксидантного статуса / Цебржинский О.И. // Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза. – Полтава, 1992. – С.120-155.
12. Цебржинский О.И. Количественное определение супероксида НСТ- тестом в тканях / Цебржинский О.И. // Тези доповідей науково-практичної конференції "Організація токсикологічної допомоги в Україні". – Київ, 2002. – С. 65-66.
13. Reiter R.J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals /Reiter R.J.// News Physiol.Sci. – 2000. – Vol. 15. – P.246-250.

Реферати

ПРОДУКЦИЯ СУПЕРОКСИДА В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС ПРИ ГИПО- ТА ГИПЕРМЕЛАТОНИНЕМИЯХ

Анасевич Я.Н., Цебржинский О.И.

В тонкой кишке крыс 30-суточная (круглосуточное освещение 1000-1500 лк) гипомелатонинемия способствует увеличению продукции супероксиданионрадикала от фагоцитарных электронно-транспортных цепей, а 30-суточная (содержание крыс в темноте и пероральное введение мелатонина в ежедневной дозе 1 мг/кг массы тела) гипермелатонинемия – от митохондриального окисления, которая отвечает антиоксидантным способностям мелатонина. Выток супероксида с микросомальной электронно-транспортной цепи окисления в обоих случаях не изменялся.

Ключевые слова: тонкий кишечник, супероксиданионрадикал, гипомелатонинемия, гипермелатонинемия.

Стаття надійшла 14.04.2012 р.

PRODUCTION OF SUPEROXIDE IN THE SMALL INTESTINE OF RATS OF HYPO- AND HIPERMELATONINEMIA

Anasevych Y.M., Tsebrzhynskyy O.I.

Hypomelatoninemia over the 30 days (clock lighting 1000-1500 lux) increases the production of superoxideanionradical from phagocytic electron-transport chains, hypermelatoninemia over the 30 days (retention of rats in the dark and oral administration of melatonin in the daily dose of 1 mg/kg of body weight) – from mitochondrial oxidation, that responsible the antioxidant properties of melatonin. Leak superoxide from the microsomal electron-transport chain oxidation in the both cases didn't change.

Key words: small intestine, superoxidanionradical, hipomelatoninemia, hypermelatoninemia.

УДК 611.018

В.С. Брус, В.О. Удьянов

Одесский национальный медицинский университет, м. Одесса

ОСОБЛИВОСТІ РОЗТАШУВАННЯ ЕМАЛЕВИХ ПРИЗМ У ТОПОГРАФІЧНО РІЗНИХ ШАРАХ ЕМАЛІ ПОСТІЙНИХ РІЗЦІВ ЛЮДИНИ

Визначені закономірності змін кутів нахилу емалевих призм до дентинно-емалевої поверхні в топографічно різних шарах емалі коронки різців. Максимальний кут нахилу призм виявлено в середньому шарі емалі з вестибулярних, оральних та бокових сторін коронок різців. В оклюзійній частині коронок кут нахилу емалевих призм в середньому шарі емалі був меншим з усіх сторін, порівняно з середньою та цервікальною частинами.

Ключові слова: емалева призма, емалево-дентинна поверхня, різці.

Робота виконана в рамках науково-дослідної роботи Одеського державного медичного університету, «Морфогенез епітеліальної та сполучної тканин за фізіологічних та патологічних умов» (№ держреєстрації: 0109U008570).

Значна щільність емалі, яка дозволяє зубам приймати участь у механічній обробці їжі, зумовлена, у першу чергу, унікальним хімічним складом цієї тканини зуба. Крім цього, міцність емалі забезпечується і за рахунок будови головних гістологічних структур емалі – емалевих призм. Складний хід призм у зубній емалі є одним з факторів, які забезпечують міцність емалі як тканини [2, 8]. Біомеханічні властивості емалі в різних ділянках коронки зуба відрізняються [7]. Виявлено, також, зменшення мікротвердості емалі від її поверхні до дентинно-емалевої межі [1]. Особливості мікротвердості емалі мають суттєве значення при формуванні дефектів твердих тканин зуба каріозного і некаріозного походження [5]. Врахування особливостей нахилу