

УДК 504 (616.32, 678.048)

О. О. ЦВЯХ

м. Миколаїв

ВПЛИВ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ШЛУНКУ ЩУРІВ НА ТЛІ КОРОТКОТРИВАЛОЇ ТА ДОВГОТРИВАЛОЇ ГІПОМЕЛАТОНІЕМІЇ

У роботі вивчено вплив короткотривалої та довготривалої нестачі мелатоніну на стан прооксидантно-антиоксидантної системи шлунка щурів в умовах іммобілізаційного стресу. Доведено, що недостатність синтезу мелатоніну призводить до різноспрямованих змін в тканинах шлунку, та призводить до розбалансування прооксидантно-антиоксидантної системи. В умовах іммобілізаційного стресу на фоні довготривалої гіпомелатоніемії середня кількість деструкцій на одну тварину зростає, а також збільшується індекс Паулса, що свідчить про більш важкі ураження слизової оболонки шлунку.

Ключові слова: мелатонін, прооксидантно-антиоксидантна система, стрес, гіпомелатоніемія, шлунок, виразки.

Постановка проблеми. На сьогоднішній день ще недостатньо вивчені фізіолого-біохімічні ефекти адаптацій прооксидантно-антиоксидантних систем (ПАС) організму до гіпомелатоніемії різної тривалості в тому числі в умовах стресу. Нами було висунуто гіпотезу, що стреси на фоні тривалої гіпомелатоніемії призводять до більшого накопичення продуктів вільнорадикального перекисного окислення та знижують активність ферментативної ланки антиоксидантного захисту в тканинах шлунку щурів ніж короткотривалі. А також, що на фоні довготривалої гіпомелатоніемії в умовах іммобілізаційного стресу слизова оболонка шлунка щурів зазнає більш важких уражень.

Аналіз досліджень та публікацій. Існує безліч факторів, що впливають на гомеостаз людини. Одним з таких факторів є стрес. При стресі активується гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова система, при цьому гормони, що виділяються, посилюють секрецію соляної кислоти, пепсину, спричиняють гіпертонус шлунка та ішемію судин шлунку. Все це призводить до внутрішньошлункового протеолізу і ушкодження слизової оболонки [1, 2]. Крім того стрес, в тому числі й іммобілізаційний, посилює вільнорадикальне перекисне окиснення (ВРПО), і призводить до окислювального порушення цілісності тканин, що також призводить до виникнення гастродуоденальних ерозій та виразок [3].

Для профілактики ВРПО та корекції патологій, що були викликані вільними радикалами в сучасній медичній практиці використовують

цілий ряд антиоксидантів. Останні десятиліття науковцями та медиками приділяється значна увага дослідженню ефектів мелатоніну, який є стреспротектором, стимулятором імунної системи, геро- та канцеропротектором, антиоксидантом (АО) [4, 5, 6, 7]. Він позитивно впливає на стан шлунково-кишкового тракту, здійснюючи антиульцеровгенний ефект [4, 6]. Механізми антиоксидантної дії мелатоніну пов'язані із здатністю безпосередньо знешкоджувати вільні радикали, а також виступати не прямим антиоксидантом активуючи АО ферменти: супероксиддисмутазу (СОД), глутатіонпероксидазу (ГПО) [5, 8, 9].

Постановка завдання.

1. Вивчення зміни морфо-функціональних показників та прооксидантно-антиоксидантної системи шлунку щурів при іммобілізаційному стресі на фоні 10-добової гіпомелатоніемії

2. Вивчення зміни морфо-функціональних показників та прооксидантно-антиоксидантної системи шлунку щурів при іммобілізаційному стресі на фоні 30-добової гіпомелатоніемії

3. Порівняльний аналіз морфо-функціональних показників та прооксидантно-антиоксидантної системи шлунку щурів при іммобілізаційному стресі на фоні коротко – (10 діб) та довготривалої (30 діб) гіпомелатоніемії.

Матеріали та методика досліджень. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) та

«Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

При дослідженнях на самцях щурів лінії Wistar моделювали гіпомелатоніемію (щурів цієї групи цілодобово витримували при світлі 1000-1500 лк 10 діб та 30 діб). Тварин піддавали стресу шляхом іммобілізації одноразово на дев'ятий та двадцять дев'ятий день експерименту, а на десятій та тридцятій, відповідно, проводили забій за вимогами біоетики. Для подальшої роботи проводили відбір шлунків.

У шлунковому соці визначали рН. На слизовій оболонці шлунку (СОШ) обчислювали кількість виразок та підраховували індекс Паулса.

В гомогенаті шлунку визначали концентрації первинних (дієнові кон'югати – ДК за методом Стальной І. Д.) та вторинних (малоновий діальдегід – МДА за методом Стальной І. Д., Гаришвили Т. Г.) продуктів вільнорадикального перекисного окиснення. Також визначали в гомогенаті шлунку активності каталази за методом Королюка М. А., Іванової Л. І., глутатіонпероксидази (ГПО) за методом Пахомової В. О., супероксиддисмутази (СОД) за методом Чевари С., Чаба І., загальну протеолітичну активність (ЗПА) за Куниц (Kunitz).

Використовували наступні методи статистичного аналізу: перевірка нормальності розподілу за допомогою критерія Шапіро-Уїлка, достовірність різниці між середніми величинами кожного з біохімічних параметрів в досліджуваних групах визначали за допомогою t-критерія Стьюдента. Статистичний аналіз проводили з використанням комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2007.

Результати досліджень та їх обговорення. За умови нестачі мелатоніну терміном 10 діб відмічається несуттєва зміна секреції хлористоводневої кислоти парієнтальними клітинами шлунка, що не перевищує 20%, і складає $4,61 \pm 0,25$ через 10 діб гіпомелатоніемії. При іммобілізаційному стресі величина рН зменшується, що вказує на підвищення кислотності в порівнянні з інтактною групою (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,01$). При тривалій (30 діб) гіпомелатоніемії величина рН змінюється несуттєво (різниця між вибірковими

середніми невірогідна) в порівнянні з інтактною групою. При стресі на фоні тривалої гіпомелатоніемії величина рН несуттєво змінилася по відношенню до інтактної групи і по відношенню до гіпо-контролю.

При 10-и-добовій гіпомелатоніемії загальна протеолітична активність (ЗПА) СОШ щурів збільшилася на 6,4% (різниця між середніми двох груп невірогідна). При іммобілізаційному стресі ЗПА збільшилася на 22,7% в порівнянні з інтактною групою. При 10-и-добовій гіпомелатоніемії на фоні стресу ЗПА зменшилася на 15,5% в порівнянні зі групою, у якій моделювали іммобілізаційний стрес (різниця між вибірковими середніми невірогідна), але в порівнянні з інтактною групою це на 3,7% більше рис. 1.

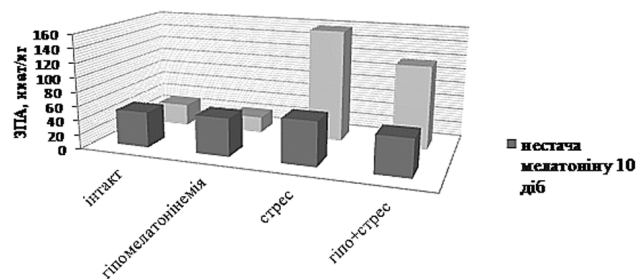


Рис. 1. Зміни ЗПА при короткотривалій та довготривалій гіпомелатоніемії

Загальна протеолітична активність тканин шлунка змінюється при тривалій (30 діб) гіпомелатоніемії – ЗПА знижується на 26,5% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$). За умов моделювання іммобілізаційного стресу ЗПА зростає у 5 разів (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$) в порівнянні із контролем. А за умов моделювання іммобілізаційного стресу при тривалій гіпомелатоніемії ЗПА зростає у 3,8 рази в порівнянні з інтактною групою (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$) і в 5 разів в порівнянні з контролем на гіпомелатоніемію (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$), але це на 25,9 % менше ніж при стрес-контролі ($p < 0,05$) рис. 1.

Вірогідних змін концентрації дієнових кон'югатів у гомогенатах тканин шлунку групи з 10-добовою гіпомелатоніемією у порівнянні з інтактною групою виявлено не було. При стресі концентрація дієнових кон'югатів

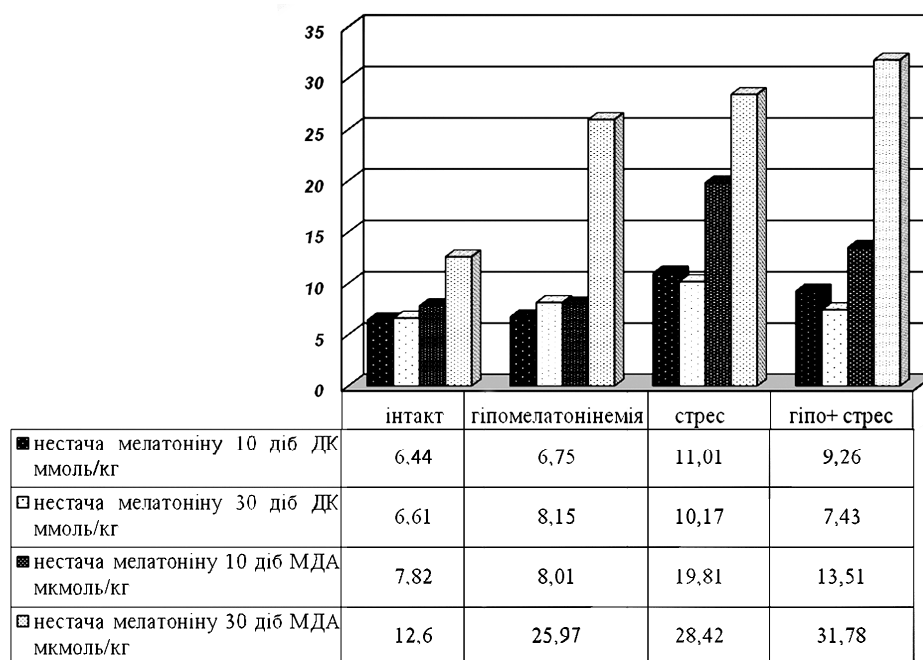


Рис. 2. Зміна концентрацій первинних та вторинних продуктів вільнорадикального перекисного окиснення в гомогенатах шлунків щурів при коротко- та довготривалій гіпомелатоніемії

(ДК) у гомогенатах тканин шлунку зросла в 1,7 рази в порівнянні з інтактною групою (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$). При стресі на фоні гіпомелатоніемії рівень ДК на 15,9% менший рис. 2.

У групі, де моделювали тривалу гіпомелатоніемію, на 30-ту добу експерименту були виявлені зміни у концентрації дієнових кон'югатів у гомогенатах шлунків – концентрація зросла на 23,24% в порівнянні з інтактною групою (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$). За умов іммобілізаційного стресу концентрація ДК зросла в 1,54 рази (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$) в порівнянні з інтактною групою. При іммобілізаційному стресі на фоні тривалої гіпомелатоніемії концентрація ДК більше за цей показник у інтактній групі на 12% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,01$), але менше за показник у групі гіпо-контроль на 8,79% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,05$), в порівнянні зі стрес-контролем концентрація ДК менше на 26,9% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$) рис. 2.

Концентрація малонового диальдегіду (МДА) в групі з гіпомелатоніемією (10 діб) зросла незначно – на 2,5% в порівнянні з інтактною групою. При іммобілізаційному стресі концентрація МДА в гомогенаті тканин шлунка щурів зростає в 2,5 рази (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,01$) в порівнянні з інтактною групою. При стресі на фоні нестачі мелатоніну концентрація МДА нижча ніж у групі стрес-контроль на 31,8%, але цей показник все одно перевищує концентрацію МДА в інтактній групі у 1,7 рази (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,05$) рис. 2.

Концентрація ТБК-реактивних продуктів (МДА) при тривалій гіпомелатоніемії виросла у 2 рази (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$) в порівнянні з інтактом. При іммобілізаційному стресі концентрація МДА зростає в порівнянні з інтактом у 2,25 рази (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$), хоча при стресі на фоні гіпомелатоніемії ця різниця ще істотніше – у 2,52 рази. При іммобілізаційному стресі на фоні 30-добової гіпомелатоніемії концентрація МДА в порівнянні із стрес контролем зросла несуттєво, всього на 11,82 %, а в порівнян-

ні з гіпомелатонін-контролем зросла на 22,37 % (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $\rho = 0,01$) рис. 2.

Активність СОД в гомогенаті тканин шлунку за умов недовготривалої гіпомелатоніемії знизилася майже в 2 рази (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $\rho = 0,05$) в порівнянні з інтактом. Немає суттєвої різниці між активністю СОД в стресованій та інтактних групах. При стресі на фоні гіпомелатоніемії активність СОД знизилася на 14,95% (але різниця між вибірковими середніми цієї групи та стрес-контроля невірогідна) рис.3.

За відсутності стресу, але при тривалій (30 діб) гіпомелатоніемії активність СОД знизилася в 2,09 рази (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $\rho = 0,001$). При іммобілізаційному стресі активність СОД зросла на 27,95% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $\rho = 0,001$). При сукупній дії гіпомелатоніемії та іммобілізаційного стресу активність СОД зросла у порівнянні із інтактною групою на 53,65% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості

$\rho = 0,001$), у порівнянні із стрес-контролем зросла на 20,08% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $\rho = 0,05$), а у порівнянні з групою з тривалою гіпомелатоніемією активність більша у 3,2 рази (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $\rho = 0,001$) рис. 3.

Активність каталази (КТ) при нестачі мелатоніну (10 діб) знизилася на 17,4% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $\rho = 0,01$). При іммобілізаційному стресі активність КТ вірогідно ($\rho = 0,01$) знизилася на 18,3% порівняно з інтактною групою. На фоні гіпомелатоніемії іммобілізаційний стрес практично не змінив активності каталази порівняно з групою, що мала гіпомелатоніемію рис.3.

Активність каталази при тривалій недостатності мелатоніну знижується на 13% (різниця між вибірковими середніми невірогідна). При моделюванні іммобілізаційного стресу активність ферменту в тканинах шлунку незначно зростає – на 10,11% (різниця між вибірковими середніми невірогідна). Моделювання іммобілізаційного стресу на фоні тривалої нестачі мелатоніну призвело до зро-

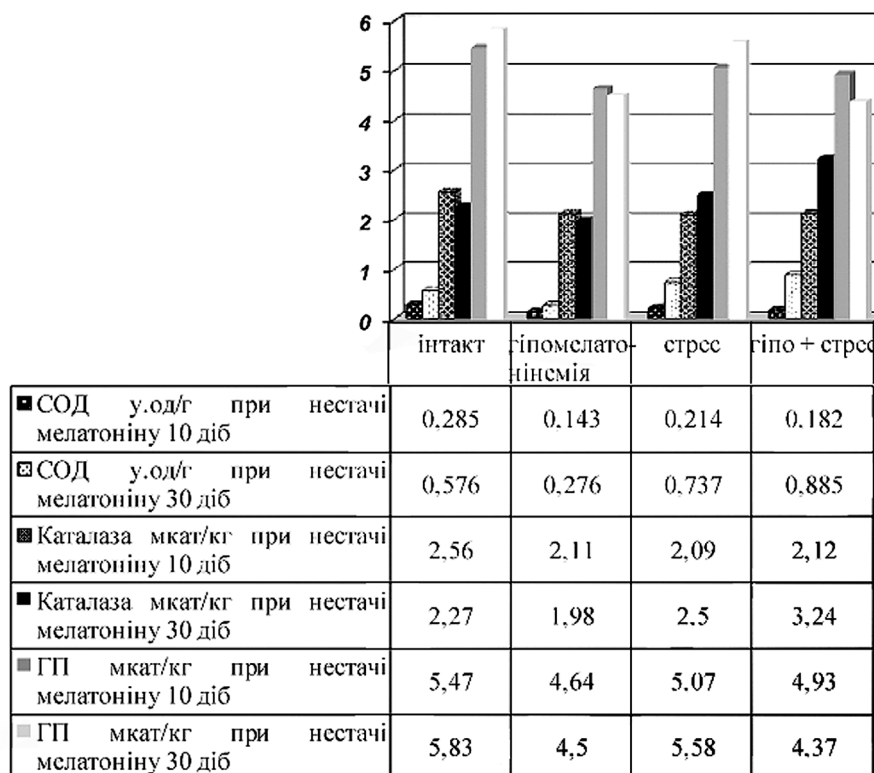


Рис. 3. Зміна активності антиоксидантних ферментів при короткотривалій та довготривалій нестачі мелатоніну

стання активності КТ на 42,57% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,01$) в порівнянні з інтактною групою, в порівнянні зі стрес-контролем активність виросла на 29,47% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,05$) рис. 3.

Активність глутатіонпероксидази (ГП) при гіпомелатоніемії протягом 10 діб на 15% нижча за інтактну (різниця між вибірковими середніми невірогідна). При моделюванні іммобілізаційного стресу активність ГП на 7% нижче ніж у інтактній групі (різниця між вибірковими середніми невірогідна). При моделюванні іммобілізаційного стресу на фоні гіпомелатоніемії активність ГП на 2,8% нижче ніж у групі з іммобілізаційним стресом і на 9,7% нижче ніж в інтактній групі (різниця між вибірковими середніми невірогідна) рис. 3.

При тривалій (30 діб) нестачі мелатоніну активність глутатіонпероксидази (ГП) знизилася на 22,83 % (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$). При іммобілізаційному стресі активність ГП в порівнянні з інтактом змінилася несуттєво – знизилася на 4,4% (різниця між вибірковими середніми невірогідна). Іммобілізаційний стрес на фоні тривалої нестачі мелатоніну призвів до зниження активності ГП в порівнянні з інтактною групою на 25,09% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$), в порівнянні із стрес-контролем активність знизилася на 21,63% (різниця між вибірковими середніми вірогідна на рівні значущості $p = 0,001$), а в порівнянні з гіпо-контролем активність змінилася не суттєво – знизилася на 2,93% (різниця між вибірковими середніми невірогідна) рис. 3.

При іммобілізаційному стресі спостерігається зростання тяжкості виразкового процесу в шлунку щурів: зростає частота уражень, збільшується середня кількість деструкцій на одну тварину, зростає середній ступінь виразки в групі, збільшується індекс Паулса. При моделюванні іммобілізаційного стресу на фоні 10-добової гіпомелатоніемії тяжкість процесу виразкоутворення зростає навіть в порівнянні зі стресованою групою: частота уражень зросла на 12,5% і досягла рівня 100%, середня кількість деструкцій на одну тварину

збільшилася на 37,6%, середній ступінь виразки збільшився в 1,4 рази, індекс Паулса зріс на 57,4%.

В усіх групах, окрім інтактної, при моделі тривалої (30 діб) нестачі мелатоніну спостерігається 100% ураження тварин, але в групах різна кількість деструкцій на одну тварину, середній ступінь виразки та індекс Паулса. Так, у групах з тривалою нестачею мелатоніну, спостерігається незначне зростання середньої кількості деструкцій на одну тварину, а також середній ступінь виразки і індекс Паулса. При іммобілізаційному стресі спостерігається зростання тяжкості виразкового процесу в шлунку щурів: збільшується середня кількість деструкцій на одну тварину, зростає середній ступінь виразки в групі, збільшується індекс Паулса. В умовах гіпофункції епіфізу іммобілізаційний стрес призводить до більш тяжких наслідків: так середня кількість деструкцій на одну тварину зросла в порівнянні із стрес-контролем у 1,86 рази і індекс Паулса також, що означає зміну показника більш ніж на 86%.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Нестача мелатоніну внаслідок цілодобового освітлення щурів призводила до дисбалансу ПАС в шлунку, спрямованість якого залежала від терміну гіпомелатоніемії. 10-добова експозиція щурів в умовах постійного освітлення при моделюванні іммобілізаційного стресу не виявила значних ознак посилення процесів пероксидації на фоні послаблення антиоксидантного захисту, що проявилось в зниженні активності супероксиддисмутази, несуттєво каталази та ГП. Встановлено, що короткотривала гіпомелатоніемія супроводжувалася морфологічними змінами у вигляді зростання середньої кількості деструкцій на одну тварину в 1,6 рази, а індекса Паулса на 57,4%. У той же час рівень рН знижується несуттєво, як і ЗПА.

Зміни стану ПАС при іммобілізаційному стресі на фоні тривалої гіпомелатоніемії були більш вираженими ніж при короткотривалій нестачі мелатоніну: концентрація ДК знижується, концентрація МДА зростає і є максимальною серед всіх дослідних груп; на тлі виражених змін антиоксидантної ланки: активність СОД підвищується, на відміну від зниження активності цього ферменту при 10-

добовій нестачі мелатоніну, суттєво зростає активність каталази, активність ГП різко знижується. Встановлено, що середня кількість деструкцій на одну тварину зростає в 1,86 рази, а індекс Паулса зростає на 86% відповідно, що свідчить про більш важкі ураження слизової оболонки шлунку при тривалих нестачах мелатоніну. При тривалій нестачі мелатоніну рН знижується, що свідчить про підвищення кислотності в шлунку. При стресі на фоні тривалої нестачі мелатоніну загальна протеолітична активність значно вище, ніж при короткотривалій нестачі мелатоніну.

Список використаних джерел

1. Передерій В. Г. Стрес і його наслідки / В. Г. Передерій, М. М. Безюк // Український медичний часопис. — № 6 (38) - XI/XII 2003.
2. Рошін Г. Г. Гострі виразки травного каналу в післяопераційний період у постраждалих із поєднаною травмою / Г. Г. Рошін, В. О. Крилюк // Острые и неотложные состояния в практике врача. — № 2 (15) апр. 2009.
3. Тарасенко Л. М. Особенности реакции желудка на острый и хронический стрессы, а также их соче-

тание / Л. М. Тарасенко, В. Ф. Гребенникова, Т. А. Девяткина, Т. А. Петрушанко, О. И. Цебржинский // Физиологический журнал. — 1989. — Т. 35, No 5. — С. 78—82.

4. Анисимов В. Н. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта / В. Н. Анисимов, И. М. Кветной, Ф. И. Комаров, Н. К. Малиновская, С. И. Рапопорт. — М.: Советский спорт, 2000. — 84 с.
5. Барабой В.А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. — К.: Книга плюс, 2006. — 462 с.
6. Малиновская Н. К. Мелатонин и язвенная болезнь: Автореф. дис. на соиск. уч. степ. д.м.н. Москва. Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова. — 1998.
7. Мелатонин в норме и патологии / В. Н. Анисимов, Ф. И. Комаров, Н. К. Малиновская, С. И. Рапопорт. — М.: ИД Медпрактика, 2004. — 308 с.
8. Сергійчук А. А. Активність антиоксидантних ферментів в клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов дії різних чинників / А. А. Сергійчук, В. А. Ковальова, Ю. В. Степанов, Л. В. Дробінська, Л. І. Остапченко // Фізика живо-го. — 2008. — Т. 16, No 1. — С. 149—151.
9. Цебржинский О. И. Источники супероксида при остром стрессе / О. И. Цебржинский, К. С. Непорада, С. В. Денисенко, Т. И. Пурденко и др. // Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Української медичної стоматологічної академії. — 2002. — Т. 2, Вип. 2 (4). — С. 42—44.

TSVIAKH O. O.
Mykolaiv

THE INFLUENCE OF IMMOBILIZATION STRESS ON THE PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE STOMACH OF RATS UNDER SHORT- AND LONG-TERM HYPOMELATONINEMIA

We studied the changes occurring in the prooxidant-antioxidant system of the stomach with a lowered level of melatonin under stress. The research showed that, due to the immobilization stress ulcerogenic effect of hypomelatoninemia intensified in the stomach of rats. The changes of prooxidant-antioxidant system in immobilization stress on the background of prolonged hypomelatoninemia were more pronounced than in the short-term hypomelatoninemia. The total proteolytic activity under immobilization stress on the background of prolonged decrease of melatonin was much higher than under short-term hypomelatoninemia.

Keywords: melatonin, prooxidant-antioxidant system, stress, hypomelatoninemia, stomach, ulcer.

ЦВЯХ О. А.
г. Николаев

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ И ДЛИТЕЛЬНЫХ ГИПОМЕЛАТОНИНЕМИЯХ

В работе изучено влияние кратковременной и долговременной нехватки мелатонина на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы желудка крыс в условиях иммобилизационного стресса. Доказано, что недостаток синтеза мелатонина приводит к разнонаправленным изменениям в тканях желудка и к разбалансировке прооксидантно-антиоксидантной системы. В условиях иммобилизационного стресса на фоне длительной гипомелатонинемии среднее количество деструкций на одно животное увеличивается, а также растет индекс Паулса, что свидетельствует о более тяжелых поражениях слизистой оболочки желудка.

Ключевые слова: мелатонин, прооксидантно-антиоксидантная система, стресс, гипомелатонинемия, желудок, язвы.

Стаття надійшла до редколегії 04.04.2014