

ЕФЕКТИ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ НА СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ОПРОМІНЕНИХ ЩУРІВ

Т. М. Горідько¹, Є. А. Гудзь¹, А. А. Чумак², Т. О. Хмель¹,
А. Г. Бердишев¹, В. В. Талько², М. В. Шелковський², Н. М. Гула¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, м. Київ

²ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", м. Київ

Ключові слова: *N*-стеароїлетаноламін, ферменти антиоксидантного захисту, іонізуюче випромінювання, щури.

Незважаючи на виявлення радіопротекторних властивостей у широкого кола різних за походженням сполук, пошук біологічно активних речовин, які здатні підвищувати резистентність організму до дії іонізуючого випромінювання, залишається актуальною проблемою в плані їх використання при загрозі променевого ураження, пов'язаного з променевою терапією онкологічних хворих, аваріями на ядерних об'єктах чи застосуванні ядерної зброї. Оптимальний радіопротектор має впливати на ланцюгове вільнорадикальне окислення, що складає патогенетичну основу променевого ураження [1], мати низьку токсичність, відсутність побічних реакцій.

Останнім часом велику увагу в світовій науковій літературі приділяють вивченню біологічної дії ендоканабіноїдів, які проявляють високу біологічну й фармакологічну активність, здатні модулювати багато функцій організму. Серед ендоканабіноїдів окремо виділяється клас насичених та ненасичених *N*-ацилетаноламінів (NAE). На сьогодні встановлено, що ці сполуки за різних патологічних станів проявляють антиоксидантні, протизапальні, мембранопротекторні, адаптивні, антипроліферативні властивості [2–6]. Раніше нами було показано, що насичені NAE за умов опромінення здатні модулювати стероїдогенез в корі надниркових залоз [7], а також впливати на ліпідний склад печінки та серця щурів [8]. Оскільки безпосереднім біологічним ефектом радіаційного впливу є виникнення в опроміненому об'ємі тканин, в його водній та ліпідній фазах, великої кількості вільних радикалів, які здатні ініціювати вільнорадикальні реакції пероксидного окислення ліпідів і, як наслідок, активацію стрес-реалізуючих систем [9], дослідження

впливу насичених NAE на процеси пероксидного окислення ліпідів за умов іонізуючого опромінення тварин безперечно має актуальність.

Мета роботи: вивчення впливу одного з насичених NAE — N-стеа-роїлетаноламіну (NSE), на стан антиоксидантної системи в плазмі крові опромінених шурів.

Матеріал та методи. Білі безпородні шури-самці масою 200–250 г, яких утримували у віварії на стандартному комбікормі для шурів і доступі до води *ad libitum*, були розподілені на 6 експериментальних груп згідно з протоколом дослідження (табл.).

Отримання плазми крові. Зібрану цитратну кров (кров: цитрат у співвідношенні 5:1) центрифугували 10 хв при 500 g, супернатант (плазму) відбирали для подальшого аналізу.

Стан антиоксидантної системи в плазмі крові опромінених шурів крові оцінювали за вмістом кінцевих продуктів ПОЛ — ТБК-реагуючих продуктів та активністю основних ферментів антиоксидантного захисту — глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази і каталази.

Активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] в плазмі крові визначали за методом, що описаний в [10]. Принцип визначення ґрунтується на відновленні нітросинього тетразолію супероксидними радикалами, які утворюються в реакції між феназинметасульфатом і $\text{NAD}\cdot\text{H}$. Утворення нітроформазау, продукту відновлення нітротетразолію, блокується СОД. Отже, за кількістю нітроформазау в пробі можна оцінити активність СОД.

Таблиця. Розподіл шурів на експериментальні групи і протокол дослідження

№ групи	Характеристика групи ¹	Експериментальні впливи		
		опромінення	NSE 50 мг/кг	вода
1	Інтактні	—	—	—
2	Інтактні + H_2O	—	—	(+7 днів ³)
3	Інтактні + NSE	—	(+7 днів)	—
4	Опромінені	так ²	—	—
5	NSE + опромінені	так	до опромінення (–7 днів)	—
6	Опромінені + NSE	так	після опромінення (+7 днів)	—

Примітки. ¹ — в кожній групі 6 шурів. ² — тотальне опромінення шурів проводили на рентгенівському апараті “РУМ-17” (Росія), (напруга 200 кВ, сила струму 10 мА, відстань 40 см, фільтри 0,5 мм Cu+1,0 мм Al, потужність експозиційної дози $2,09 \cdot 10^{-4}$ Кл/(кг·с); доза 2,0 Гр. ³ — день опромінення прийнятий за день 0. На +8-й день шури виведені з дослідів шляхом гільйотинування.

До 1 мл плазми крові додавали 0,750 мл 96% етанолу, 0,375 мл хлороформу і для прискорення розділу фаз додавали 300 мг KH_2PO_4 . Після ретельного струшування та центрифугування протягом 40 хв при 3000 g у супернатанті визначали активність СОД. До інкубаційної суміші (1,5 мл 0,15 М фосфатного буферу, 0,49 мкМ EDTA- Na_2 , 2 мкМ нітросинього тетразолію, 90 мкМ феназинметасульфату, рН 7,8) вносили 0,1 мл супернатанту. Холоста проба містила 0,1 мл води. Реакцію запускали додаванням 0,05 мл 3 мМ розчину NAD·H у 1 М TRIS-EDTA буфері, рН 8,0. Після інкубації (2 хв при 20–22°C у темряві) вимірювали величину оптичної густини досліджуваних проб на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 540 нм проти контролю, який містив всі компоненти, окрім NAD·H. Відсоток блокування утворення нітроформагану розраховували за формулою:

$$\frac{E_{\text{хол}} - E_{\text{досл}}}{E_{\text{хол}}} \times 100, \%$$

де $E_{\text{хол}}$ — екстинкція холостої проби, $E_{\text{досл}}$ — екстинкція дослідної проби.

Активність СОД визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартного розчину СОД (10000 МО/мл, виробництво Mites, США).

Активність глутатіонпероксидази (ГП) [КФ 1.11.1.9] визначали за накопиченням у середовищі інкубації окисленого глутатіону [11]. До інкубаційної суміші, що містила 1 мл фосфатного буферу (0,3 М, рН 7,4), 12 мМ азида натрію, 6 мМ EDTA та 0,5 мл 2,5 мМ відновленого глутатіону додавали 0,2 мл 10 % гомогенату тканини чи плазми крові. Реакцію запускали додаванням 0,5 мл 1,8 мМ H_2O_2 . Через 2 хв інкубації при 37°C реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10% розчину ТХО. Після центрифугування при 1500 g протягом 15 хв визначали екстинкцію окисленого глутатіону на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 260 нм. Активність ензиму виражали у нмоль окисленого глутатіону, що утворився за 1 хв в розрахунку на 1 мг білка.

Активність каталази [КФ 1.11.1.6] визначали за швидкістю розпаду пероксиду водню за методом Королюк [12]. До 2 мл 0,03% розчину H_2O_2 (готували ex tempore) вносили 0,02 мл плазми крові, а в холосту пробу вносили відповідну кількість H_2O . Реакцію зупиняли через 1 хв додаванням 1 мл 4 % розчину молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення комплексу, що утворився за реакції молібдату амонію і перекисом водню, що не розклався каталазою, вимірювали на спектрофотометрі

при 410 нм проти контрольної проби, в яку замість H_2O_2 вносили 2 мл H_2O . Холоста проба містила 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 , 1 мл 4 % розчину молібдату аммонію та відповідний пробі об'єм води. Активність ензиму виражали у мкмоль пероксиду водню, що був розкладений у ензиматичній реакції і розраховували за формулою:

$$\frac{(E_0 - \overset{\circ}{A}) \cdot V_0}{V_1 \cdot 0,034 \cdot t \cdot P}, \text{ мкмоль/хв/мг білка,}$$

де $\overset{\circ}{A}$ — екстинкція дослідної проби; E_0 — екстинкція холостої проби; V_0 — загальний об'єм інкубаційної суміші, мл; V_1 — об'єм дослідної проби, мл; 0,034 — коефіцієнт перерахунку вмісту H_2O_2 на мкмоль; t — час реакції, хв; P — вміст протеїну у пробі, мг/мл.

Визначення інтенсивності процесів пероксидного окислення ліпідів проводили за накопиченням кінцевих продуктів ПОЛ, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реагуючі продукти), за методом Ю. А. Владимирова та А. И. Арчакова [13] з деякою модифікацією [14]. 0,2 мл плазми крові вносили до 1,1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,35) і додавали 0,5 мл 35% розчину трихлороцтової кислоти (ТХО). Після перемішування додавали 1 мл 0,75% розчину тіобарбітурової кислоти. Далі проби нагрівали протягом 15 хв при 100°C , швидко охолоджували, додавали 1 мл 35% розчину ТХО і центрифугували 5 хв при 1500 g. Екстинкцію супернатанту вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 у 1 см кюветі при довжині хвилі 532 нм проти контрольної проби, що замість біологічного матеріалу містила 0,2 мл води. Вміст ТБК-реагуючих продуктів розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції для малонового діальдегіду $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Вміст білка визначали загальноновживаним методом Бредфорд [15].

Експериментальні дані було оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента.

Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що СОД дисмутує супероксиданіон-радикал до пероксиду водню, запобігаючи оксидативному пошкодженню мембранних ліпідів.

З рис. 1 видно, що за умов опромінення активність СОД в плазмі крові шурів вірогідно підвищена відносно значень у інтактних тварин (рис. 1, ст. 4), що свідчить про інтенсифікацію утворення активних форм кисню. За умов введення NSE лабораторним тваринам як до, так і після опромінення такого підвищення активності СОД не спостерігалось (рис. 1 ст. 5, 6), що є свідченням протекторного впливу NSE за даних умов.

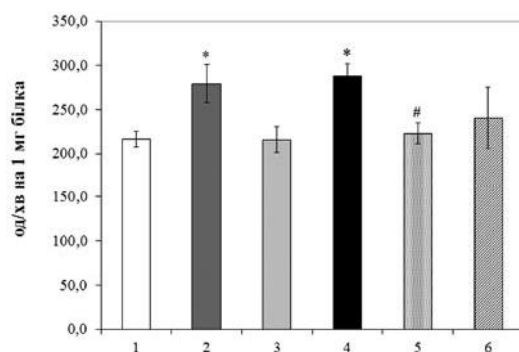


Рис. 1. Активність супероксиддисмутази в плазмі крові експериментальних тварин: 1 — інтактні; 2 — інтактні + H_2O ; 3 — інтактні + NSE; 4 — опромінені; 5 — NSE + опромінені; 6 — опромінені + NSE; * — зміни вірогідні відносно значень у групі “Інтактні” (ст. 1), $p < 0,05$; # — зміни вірогідні відносно значень у групі “Опромінені” (ст. 4), $p < 0,05$

Відомо, що пероксид водню, утворений при дисмутації супероксиданіону, розкладається до води та кисню каталазою, яка грає ключову роль за умов оксидативного стресу.

З рис. 2 видно, що за опромінення в плазмі крові щурів відбувається пригнічення активності каталази (ст. 4). За умов введення NSE після дії іонізуючого опромінення активність цього ферменту залишається на рівні інтактних тварин (рис. 2, ст. 6), що свідчить про антиоксидантну дію NSE.

Глутатіонпероксидаза (ГП) каталізує реакцію відновлення гідропероксидів за допомогою глутатіону з досить широким спектром субстратних речовин. ГП здатна відновлювати гідропероксиди вільних жирних кислот та фосфоліпідів. Оскільки ГП має вищу спорідненість до H_2O_2 , ніж каталаза, вона більш ефективно працює за низьких концентрацій пероксиду водню.

Опромінення викликало значне пригнічення активності ГП в плазмі крові (рис. 1, ст. 4) порівняно з інтактними тваринами чи щурами, яким давали лише воду.

За умов введення щурам NSE як до, так і після опромінення пригнічення активності ГП не відбувалось (рис. 3, ст. 5, 6), що свідчить про здатність NSE чинити протекторну дію при іонізуючому опроміненні.

Вторинні продукти пероксидного окислення ліпідів (ТБК-активні продукти) утворюються при деструкції поліненасичених жирних кислот

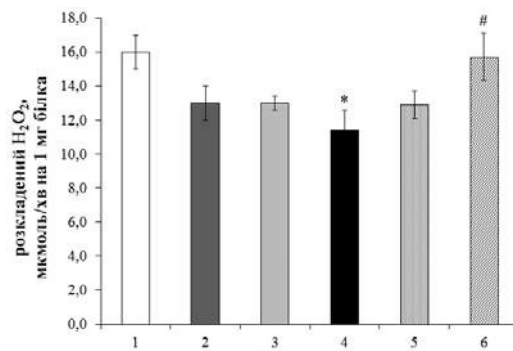


Рис. 2. Активність каталази в плазмі крові експериментальних тварин: 1 — інтактні; 2 — інтактні + H_2O ; 3 — інтактні + NSE; 4 — опромінені; 5 — NSE + опромінені; 6 — опромінені + NSE; * — зміни вірогідні відносно значень у групі “Інтактні” (ст. 1), $p < 0,05$; # — зміни вірогідні відносно значень у групі “Опромінені” (ст. 4), $p < 0,05$

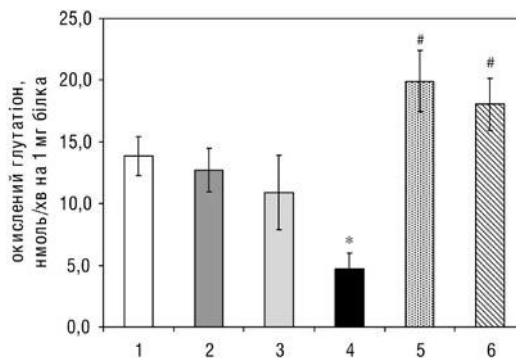


Рис. 3. Активність глутатіонпероксидази в плазмі крові експериментальних тварин: 1 — інтактні; 2 — інтактні + H_2O ; 3 — інтактні + NSE; 4 — опромінені; 5 — NSE + опромінені; 6 — опромінені + NSE; * — зміни вірогідні відносно значень у групі “Інтактні” (ст. 1), $p < 0,05$; # — зміни вірогідні відносно значень у групі “Опромінені” (ст. 4), $p < 0,05$.

за дії гідропероксидів з утворенням великої кількості карбонільних сполук, в тому числі малонового діальдегіду (МДА), який є біомаркером вільнорадикального пероксидного окислення ліпідів. З рис. 4. видно, що за опромінення у плазмі крові щурів відбувалось достовірне підвищення вмісту МДА (рис.4, ст. 4). Попередене введення щурам NSE до опро-

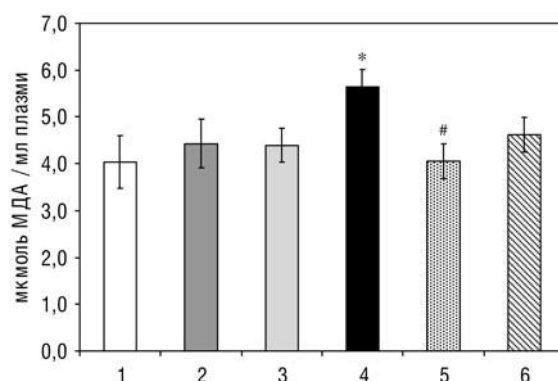


Рис. 4. Вміст ТБК-реагуючих продуктів у плазмі крові експериментальних тварин: 1 — інтактні; 2 — інтактні + H_2O ; 3 — інтактні + NSE; 4 — опромінені; 5 — NSE + опромінені; 6 — опромінені + NSE; * — зміни вірогідні відносно значень у групі “Інтактні” (група 1), $p < 0,05$; # — зміни вірогідні відносно значень у групі “Опромінені” (група 4), $p < 0,05$

мінення запобігало накопиченню МДА у плазмі крові тварин (рис. 4, ст. 5), що, на нашу думку, свідчить про антиоксидантну дію NSE.

Висновок. Введення NSE опроміненим щурам гальмує процеси пероксидного окислення ліпідів шляхом модуляції активностей основних ферментів антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та каталази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой, В. А. Перекисное окисление и радиация [Текст] / В. А. Барабой, В. Э. Орел, И. М. Карнаух. — К.: Наукова думка, 1991. — 256 с.
2. Long-chain N-acylethanolamines inhibit peroxidation in rat liver mitochondria under acute hypoxic hypoxia [Текст] / N. M. Gulaya [et al.] // Chem. Phys. Lipids. — 1998. — Vol. 97, No 1. — P. 49–54.
3. Parinandi, N. L. Effects of long-chain N-acylethanolamines on lipid peroxidation in cardiac mitochondria [Text] / N. L. Parinandi, H. H. Schmid // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 237, No 1–2. — P. 49–452.
4. N-стеароїлетаноламін гальмує ріст та метастазування карциноми Льюїс та модулює ліпідний склад легеневої тканини у мишей за канцерогенезу [Текст] / Н. М. Гула [та ін.] // Укр. біохім. журн. — 2006. — Т. 78, № 1. — С. 113–119.
5. Вплив N-ацилетаноламінів на виживання культури ембріональних клітин за дії радіаційного опромінення [Текст] / В. С. Асмолкова [та ін.] // Укр.біохім. журн. — 2009. — Т. 81, № 5. — С. 66–73.
6. N-ацилетаноламіни — новий клас природних адренотропних модуляторів [Текст] / О. Д. Жуков [та ін.] // Укр. біохім. журн. — 2000. — Т. 72, № 2. — С. 24–27.
7. Incorporation of labeled N-acylethanolamine (NAE) into rat brain regions *in vivo* and adaptive properties of saturated NAE under X-ray irradiation [Text] / M. Ariamonov

- [et al.] // Укр. біохім. журн. — 2005. — Т. 77, № 6. — С. 48–59.
8. Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідні компоненти мікросом печінки та серця за дії на шурів іонізуючого випромінювання [Текст] / М. В. Артамонов [та ін.] // Укр. біохім. журн. — 2003. — Т. 75, № 4. — С. 81–90.
 9. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии [Текст] / В. А. Барабой, Д. А. Сутковой / под общ. ред. Ю. А. Зозули — К.: Наукова думка, 1997. — 420 с.
 10. Чевари, С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте [Текст] / С. Чевари, Т. Андял, Я. Штрэнгер // Лаб. дело. — 1991. — № 10. — С. 9–13.
 11. Переслєгина, И. А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей [Текст] / И. А. Переслєгина // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 20–23.
 12. Метод определения активности каталазы [Текст] / М. Л. Корольок, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
 13. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах [Текст] / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
 14. Мельничук, С. Д. Влияние углекислоты на свободно-радикальные процессы в условиях искусственного гипобииоза у крыс [Текст] / С. Д. Мельничук, А. И. Кузьменко, В. М. Маргитич [и др.] // Укр. биохим. журн. — 1998. — Т. 70, № 1. — С. 87–94.
 15. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [Text] / M. M. Bradford // Anal. Biochem. — 1976. — V. 72. — P. 248–254.

ЭФФЕКТЫ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА В СИСТЕМЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

Т. Н. Горидько¹, Е. А. Гудзь¹, А. А. Чумак², Т. О. Хмель¹, А. Г. Бердышев¹,
В. В. Талько², М. В. Шелковский², Н. М. Гулая¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, г. Киев

²ГУ “Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, г. Киев

Установлено, что N-стеароилэтанолламин (NSE) предотвращает изменения активностей основных ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы) в плазме крови крыс при действии ионизирующего излучения в дозе 2 Гр. Такое действие NSE приводит к торможению процессов перекисного окисления липидов у облученных крыс.

Ключевые слова: N-стеароилэтанолламин, ферменты антиоксидантной защиты, ионизирующее излучение, крысы.

N-STEAROYLETHANOLAMINE EFFECTS IN THE ANTIOXIDANT PROTECTION OF IRRADIATED RATS

T. M. Goridko¹, E. A. Gudzy¹, A. A. Chumak², T. O. Khmel¹, A. G. Berdyshev¹,
V. V. Talko², M. V. Shelkovskii², N. M. Gula¹

¹A. V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²SI “National Research Center for Radiation Medicine,
National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv

N-stearoylethanolamine prevents changes in activities of major antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) in rat plasma under the influence of ionizing radiation at a dose of 2 Gy leading to inhibition of lipid peroxidation in irradiated rats.

Key words: N-stearoylethanolamine, antioxidant enzymes, ionizing radiation, rats.