

Л. П. Дерев'янко¹, Н. П. Атаманюк¹, Г. В. Косякова²,
О. Ф. Мегель², А. Г. Бердишев², А. М. Яніна¹, В. В. Талько^{1, *},
А. А. Чумак¹, Н. М. Гула²

¹Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини
Національної академії медичних наук України”,
53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, м. Київ

ВПЛИВ Н-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМИНУ НА СТАН ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ У ОПРОМІНЕНИХ ЩУРІВ

Встановлено, що введення N-стеароїлєтаноламіну (NSE) здатно гальмувати процеси перекисного окислення ліпідів. Попереднє введення NSE тотально одноразово опроміненім в дозі 6,0 Гр щуром запобігає підвищенню концентрації ТБК-активних продуктів в плазмі крові, ініціює підвищення ефективності антиоксидантного захисту.

Ключові слова: *N-стеароїлєтаноламін, іонізуюче випромінювання, про- і антиоксидантна система, щури.*

Дію радіації поєднує з іншими стресорними впливами здатність викликати активацію вільнопардикального окислення в опроміненому організмі та порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Продуктами вільнопардикального окислення є активні форми кисню, що викликають мобілізацію антиоксидантних резервів організму, його фізіологічної антиоксидантної системи, яка здійснює контроль за активованими метаболітами кисню, вільними радикалами, продуктами ліпопероксидації, регулює збалансованість прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, а також забезпечує активацію фізіологічних і біохімічних механізмів, що запобігають зростанню надмірної продукції активних форм кисню [1–3]. Стан про- і антиоксидантної систем є одним з основних індикаторів впливу іонізуючого випромінювання в комбінації з іншими пошкоджуючими факторами на організм. Показано, що стрес-реакція призводить до оксидативного стресу, накопичення

* Талько Вікторія Василівна, e-mail: talko1950@gmail.com

© Дерев'янко Л. П., Атаманюк Н. П., Косякова Г. В., Мегель О. Ф., Бердишев А. Г., Яніна А. М., Талько В. В., Чумак А. А., Гула Н. М., 2012

продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), змін активності антиокислювальних ферментів [4, 5].

На початку 1980-х років в Інституті біохімії в клітинах нейробластоми миши C1300 N18 було ідентифіковано ліпіди, що належать до класу біологічно активних сполук — N-ацилетаноламін (NAE) та його попередник — N-ацилфосфатидилетаноламін (NAPE). З того часу розпочалася широкомасштабна робота з вивчення функціональної ролі цих малополярних ліпідів у клітині. Дослідження біологічних ефектів ендоканабіноїдів (NAE) дозволили встановити їх пряму мембранотропну та мембранопротекторну дію [6, 7]. Дослідження впливу насичених NAE в концентрації 50 мг/кг маси тіла на активність ферментів антиоксидантної системи за умов тотального опромінення щурів у дозі 2,0 Гр встановили ефект, що призводить до гальмування процесів ПОЛ в опромінених тварин [8]. Оскільки показано ефективність NAE у малих концентраціях [9], були змінені умови експерименту, — зменшено концентрацію препарату і збільшено дозу опромінення.

Мета роботи: визначення впливу NSE в концентрації 10 мг/кг на стан про-антиоксидантної систем в плазмі крові щурів, опромінених тотально в дозі 6,0 Гр.

Матеріали та методи. Білі безпородні щури-самці масою 180–200 г, яких утримували у віварії на стандартному комбікормі для щурів за умов необмеженого доступу до води, були розподілені на 5 експериментальних груп згідно з протоколом дослідження (таблиця).

Тотальне опромінення щурів в дозі 6,0 Гр здійснювали на апараті Teratron (Канада), джерело опромінення — ^{60}Co , потужність поглинутої дози — 1,02 Гр/хв.

Таблиця. Розподіл щурів на експериментальні групи та протокол дослідження

№ групи	Характеристика групи ¹	Експериментальний вплив	
		опромінення	NSE 10мг/кг
1	Інтактні	—	—
2	Опромінені	Так	—
3	Інтактні + NSE	—	(+7 днів)
4	Опромінені + NSE	Так	До опромінення (-7 днів)
5	NSE + опромінені	Так	Після опромінення (+7 днів)

Примітка. ¹ — в кожній групі 6 щурів; ² — день опромінення прийнятий за нульовий. На +7-й та +14-й день щурів виводили з експерименту з використанням гільйотини.

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

Інтенсивність процесів пероксидного окислення ліпідів визначали за накопиченням кінцевих продуктів ПОЛ, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти), за методом Ю. А. Владимирова та А. И. Арчакова [10] з модифікацією [11]. 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; після перемішування додавали 1 мл 0,75% розчину тіобарбітурової кислоти. Проби нагрівали протягом 15 хв при 100°C, швидко охолоджували, додавали 1 мл 35% розчину трихлороцтової кислоти і центрифугували 5 хв при 1500 g. Екстинкцію супернатantu вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 532 нм проти контрольної проби. Вміст ТБК-активних продуктів розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції для малонового діальдегіду $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Активність каталази [КФ 1.11.1.6] визначали за швидкістю розпаду пероксиду водню за методом М. А. Королюка із співавт. [11]. До 2 мл 0,03% розчину H_2O_2 (готували ех tempore) вносили 0,05 мл плазми крові, а в холосту пробу вносили відповідну кількість H_2O . Реакцію зупиняли через 0,5 хв додаванням 1 мл 4% розчину молібдату аммонію. Інтенсивність забарвлення комплексу, що утворився в реакції молібдату аммонію з перекисом водню, що не розкладався 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 ензимній реакції і розраховували за формулою:

$$\frac{(E_0 - E_1) \cdot V_0}{V_1 \cdot 0,034 \cdot t \cdot P}, \text{ мкмоль} \cdot (\text{хв} \cdot \text{мг протеїну})^{-1},$$

де E_1 — 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.

Вміст нітрит-аніонів визначали у колориметричній реакції за допомогою реактива Гріса методом Гріна, яка полягає в утворенні забарвлених комплексів рожевого кольору солі діазонію, що утворюється при

взаємодії NO_2 — з сульфаніламідом та N(1-нафтіл)-етилендіаміном у кислому середовищі [13]. До 0,5 мл депротеїнізованої проби додавали рівні частини 1% розчину сульфаніламіду (“Sigma”) у 4% ортофосфорній кислоті та 1% водного розчину N(1-нафтіл)-етилендіаміну дигідрохлориду (“Sigma”), перемішували і через 30 хв вимірювали екстинкцію при довжині хвилі 540 нм на спектрофотометрі Specol-211. Кількість нітратів оцінювали за калібрувальною кривою, побудованою для стандартних розчинів NaNO_2 .

Підготовку біологічного матеріалу для визначення в ньому вмісту нітратів проводили в такий спосіб: до 1 мл плазми крові додавали 0,2 мл 35% розчину сульфосаліцилової кислоти, перемішували та залишали на 30 хв за кімнатної температури, далі проби нейтралізували додаванням 0,12 мл 5% NaOH , після чого центрифугували при 3000 г протягом 15 хв. До 0,5 мл супернатанту додавали реактив Гріса.

Вміст протеїну визначали загальнозваживаним методом Бредфорд [14].

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

Результати досліджень та їх обговорення.

ТБК-активні продукти належать до вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів, які утворюються внаслідок деструкції поліненасичених жирних кислот, що супроводжується появою великої кількості карбонільних сполук, у тому числі, малонового діальдегіду (МДА) [1, 2].

Тотальне опромінення тварин в дозі 6,0 Гр призвело до закономірного достовірного збільшення вмісту МДА, що реєструвалося як на 7-му, так і 14-му добу після опромінення (рис. 1).

Попереднє введення шурам NSE перед тотальним опроміненням запобі-

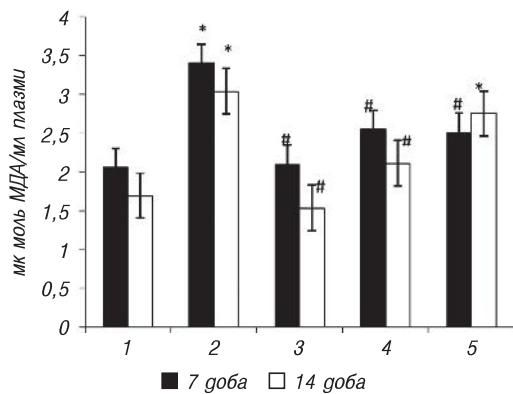


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові щурів: 1 — інтактні; 2 — опромінені; 3 — інтактні + NSE; 4 — NSE + опромінені; 5 — опромінені + NSE; * — зміни вірогідні відносно значень у групі “Інтактні” (група 1), $p < 0,05$; # — зміни вірогідні відносно значень у групі “Опромінені” (група 3) $p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

гало накопиченню МДА в плазмі крові (група 4), проте не було настільки ефективним в разі введення NSE після опромінення (група 5). Подібні зміни зареєстровані в експерименті, де доза тотального опромінення була втричі менша (2,0 Гр), а концентрація NSE — в 5 разів вища (50 мг/кг) [9]. Згідно з отриманими даними, можна зробити висновок, що NSE можна розглядати як препарат з радіопротекторними властивостями.

Дослідження активності одного з найпотужніших ферментів антиоксидантного захисту — каталази — визначило його достовірне пригнічення за умов тотального одноразового опромінення щурів в дозі 6,0 Гр, що зареєстровано на 7-му та 14-ту добу після опромінення (рис. 2, група 2).

Введення NSE впродовж 7 діб не призводило до суттєвих змін активності каталази в плазмі крові (група 3). Введення NSE перед опроміненням (група 4), так само, як і після опромінення (група 5), ініціювало незначне за величиною, проте достовірне у порівнянні з показником опромінених тварин, підвищення активності каталази, що було зареєстровано на 7-му добу після опромінення. Слід відзначити, що отримані дані в попередньому експерименті виявилися більш значущими, тобто при опроміненні в меншій дозі та використанні більшої концентрації NSE було досягнуто більш виразного ефекту щодо підвищення активності каталази, особливо за умов введення NSE після опромінення [9].

Вміст нітрит-аніону в плазмі крові опромінених щурів реєструвався достовірно вищим від даних в інтактних щурів на 7-му добу після опромінення та нижчим — на 14-ту добу (рис. 3, група 2). Введення NSE інтактним щурам призводило

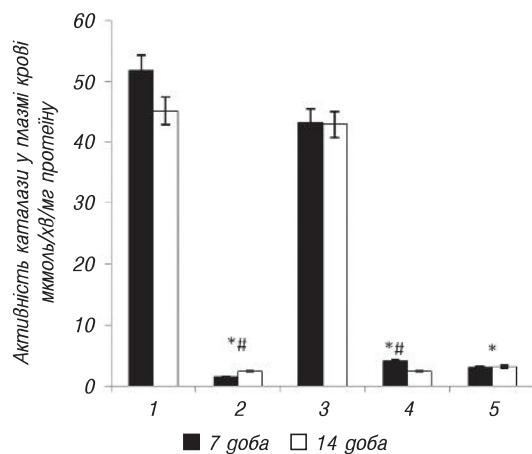


Рис. 2. Активність каталази в плазмі крові щурів: 1 — інтактні; 2 — опромінені; 3 — інтактні + NSE; 4 — NSE + опромінені; 5 — опромінені + NSE; * — зміни вірогідні відносно значень у групі “Інтактні” (група 1), $p < 0,01$; # — зміни вірогідні відносно значень у групі “Опромінені” (група 3) $p < 0,05$

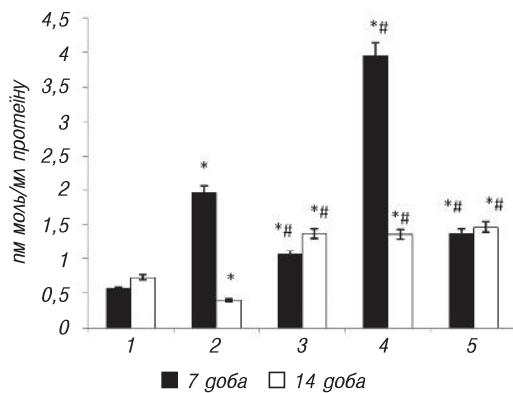


Рис. 3. Вміст нітрат-аніону в плазмі крові щурів: 1 — інтактні; 2 — опромінені; 3 — інтактні + NSE; 4 — NSE + опромінені; 5 — опромінені + NSE; * — зміни вірогідні відносно значень у групі “Інтактні” (група 1), $p < 0,01$; # — зміни вірогідні відносно значень у групі “Опромінені” (група 3) $p < 0,05$

щурів. Показник вмісту нітрат-аніону був меншим від показника значень в опромінених тварин на 7-му добу, підвищеним — на 14-ту.

Відомо, що серед метаболітів NO саме нітрат-аніон є продуктом його спонтанного окислення за фізіологічних умов при нормальній оксигеназії. Показано кардіопротекторні та вазопротекторні властивості NO та його метаболітів у патофізіологічних умовах (за дії радіації у низьких дозах, старінні, гіпоксії тощо) [15, 16].

Феномен суттєвого зростання вмісту нітрат-аніону в плазмі крові опромінених щурів у разі попереднього введення NSE підтверджує його радіозахисні властивості, які реалізуються шляхом ініціації утворення стабільних метаболітів NO за умов оксидативного стресу.

Таким чином, отримані дані з визначення впливу NSE у достатньо низькій концентрації (10 мг/кг) за умов тотального одноразового опромінення щурів в дозі 6,0 Гр на стан про- та антиоксидантної систем переконливо вказують на його радіомодифікуючі властивості, механізм реалізації яких пов’язаний з окисним метаболізмом азоту.

Висновок. Попереднє введення NSE опроміненим щурам здатне запобігти розвитку процесів перекисного окислення ліпідів, а також ініціювати підвищення ефективності антиоксидантного захисту.

до збільшення його вмісту у порівнянні з даними в інтактних щурів на обох етапах спостереження, — на 7-му та 14-ту доби (група 3). Водночас визначено зменшення вмісту відносно даних у опромінених тварин через 7 діб після опромінення, та збільшення — на 14-ту добу. Найбільші за величиною значення вмісту нітрит-аніону зареєстровано на 7-му добу у разі попереднього введення NSE впродовж 7 діб перед опроміненням. Введення NSE після опромінення призводило до помірного підвищення відносно даних у інтактних

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой, В. А. Перекисное окисление и радиация / В. А. Барабой, В. Э. Орел, И. М. Карнаух. — К. : Наук. думка, 1991. — 256 с.
2. Котеров А. Н. Разноравненное изменение антиоксидантной активности в плазме (сыворотке) крови млекопитающих после воздействия радиации в большой и малой дозе / А. Н. Котеров, Г. И. Сидорович // Радиац. биол. Радиоэкология. — 2009. — Т. 49, № 6. — С. 671–680.
3. Мирзоев Э.Б. Интенсивность свободнорадикального перекисного окисления липидов, активность аденилаткиназы и проницаемость плазматической мембранны для ионов Ca²⁺ в клетках периферической крови овец, облученных в малых дозах / Э. Б. Мирзоев, В. О. Кобялко // Радиац. биол. Радиоэкология. — 2009. — Т. 49, № 3. — С. 261–267.
4. The interaction between acute oligomer Abeta (1–40) and stress severely impaired spatial learning and memory / H. J. Huang, K. C. Liang, Y. Y. Chang [et al.] // Neurobiol. Learn. Mem. — 2010. — Vol. 93, № 1. — P. 8–18.
5. Vitamin alleviates visceral lipid peroxidative injury in dogs during oral fluid resuscitation of burn shock / S. Hu, J. W. Che, C. M. Bao, [et al.] // Zhonghua Yi Xue Za Zhi — 2009. — Vol. 89, № 33. — P. 2364–2367.
6. Long-chain N-acylethanolamines inhibit peroxidation in rat liver mitochondria under acute hypoxic hypoxia / N. M. Gulaya, A. I. Kuzmenko, V. M. Margitich [et al.] // Chem. Phys. Lipids. — 1998. — Vol. 97, No 1. — P. 49–54.
7. Parinandi N. L. Effects of long-chain N-acylethanolamines on lipid peroxidation in cardiac mitochondria / N. L. Parinandi, H. H. Schmid // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 237, No 1–2. — P. 49–52.
8. Противовоспалительное действие N-стеароилэтаноламина на экспериментальную ожоговую рану у крыс / Н. М. Гула, А. А. Чумак, А. Г. Бердышев [и др.] // Укр. биохим. журн. — 2009. — № 2. — С.16–21.
9. Ефекти N-стеароїлэтаноламіну на систему антиоксидантного захисту в опроміненіх штурпів / Т. М. Горілько, Є. А. Гудзь, А. А. Чумак [та ін.] // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. — 2011. — К. : ДІА, 2011. — Вип. 16. — С. 284–291.
10. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
11. Влияние углекислоты на свободно-радикальные процессы в условиях искусственного гипобиоза у крыс / С. Д. Мельничук, А. И. Кузьменко, В. М. Маргитич [и др.] // Укр. биохим. журн. — 1998. — Т. 70, № 1. — С. 87–94.
12. Метод определения активности каталазы / М. Л. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С.16–18.
13. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David, J. Glogowski, [et al.] // Anal. Biochem. — 1982. — V. 126, № 1. — P. 131–138.
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
15. Вплив малих доз радіації на судинну реактивність та окисний метаболізм кисню і азоту в серцево-судинній системі / М. Н. Ткаченко, В. Ф. Сагач, А. В. Коцюрба [та ін.] // Журн. АМН України. — 2007. — Т. 13, № 1. — С. 20–32.
16. Gewaltic M. Vasoreception by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential / M. Gewaltic, G. Kojda // Cardiovasc. Res. — 2002. — Vol. 55, № 5. — P. 250–260.

Стаття надійшла до редакції 25.07.2012.

Л. П. Деревянко¹, Н. П. Атаманюк¹, Г. В. Косякова², Е. Ф. Мегедь²,
А. Г. Бердышев², А. Н. Яніна¹, В. В. Талько¹, А. А. Чумак¹, Н. М. Гула²

¹Государственное учреждение „Национальный научный центр радиационной
медицины Национальной академии медицинских наук Украины”,
ул. Мельникова, 53, г. Киев, 04050, Украина

²Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, г. Киев

ВЛИЯНИЕ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА НА СОСТОЯНИЕ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ У ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

Установлено, что введение N-стеароилэтаноламина (NSE) способно тормозить процессы перекисного окисления липидов. Предварительное введение NSE totally одноразово облученным в дозе 6,0 Гр крысам предотвращает повышение концентрации ТБК-активных продуктов в плазме крови, инициирует повышение эффективности антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: *N-стеароилэтаноламин, ионизирующее излучение, про- и антиоксидантная системы, крысы.*

L. P. Derevjanko¹, N. P. Atamaniuk¹, G.V. Kosiakova², O. Ph. Meged²,
A. G. Berdyshev², A. M. Yanina¹, V. V. Tal'ko¹, A. A. Chumak¹, N. M. Gula²

¹State Institution “National Research Center for Radiation Medicine
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,
Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

²A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

N-STEAROYLETHANOLAMINE EFFECTS IN THE PRO- AND ANTIOXIDANT SYSTEMS OF IRRADIATED RATS

N-stearoylethanolamine (NSE) can inhibit lipid peroxidation. Preliminary injection of NSE prevents increase of TBA-active plasma products in total single irradiated rats at the dose of 6.0 Gy, and initiates increase of effectiveness of antioxidant protection.

Key words: *N-stearoylethanolamine, pro- and antioxidant systems, ionizing radiation, rats.*