УДК 57.084.1–577.115–615.276

ПРОТИЗАПАЛЬНИЙ ВПЛИВ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНУ ОПІКОВУ ТРАВМУ В ЩУРІВ

Н. М. ГУЛА, А. А. ЧУМАК, А. Г. БЕРДИШЕВ, О. Ф. МЕГЕДЬ, Т. М. ГОРІДЬКО, Н. Л. КІНДРУК, Г. В. КОСЯКОВА, О. Д. ЖУКОВ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

Представлено результати вивчення біохімічних механізмів протизапального ефекту ендоканабіноїду N-стеароїлетаноламіну (NSE) на моделі експериментального опіку в щурів. Після нанесення термічного опіку шкіри III ступеню щури протягом 7 діб щоденно одержували водну суспензію NSE per os у дозі 10 мг/кг маси тіла або змащування опікової поверхні суспензією в концентрації 10 мг/мл води. Вперше показано здатність NSE прискорювати процес загоєння опіку шляхом інгібування продукції прозапальних цитокінів (TNFα, IL-6), нормалізації вмісту нітрит-аніону – стабільного метаболіту оксиду азоту – та активності конститутивної та індуцибельної NO-синтази, а також усунення дисбалансу між процесами ПОЛ та активністю ензимів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази) у плазмі крові, еритроцитах, печінці та селезінці щурів.

Визначені нами протизапальні властивості N-стеароїлетаноламіну – ендогенної стабільної сполуки з канабіміметичною дією – дають підстави для створення на його основі принципово нового лікарського засобу для корекції патологічних станів, які супроводжуються запальними процесами.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, запалення, цитокіни, оксид азоту, пероксидне окислення ліпідів.

Ендоканабіноїдна система, що складається з канабіноїдних рецепторів, їхніх лігандів та зв'язаних з ними шляхів передавання сигналу, відіграє значну роль у численних фізіологічних та патофізіологічних процесах, включаючи специфічне та неспецифічне запалення. Ендоканабіноїди – це великий клас біологічно активних ліпідних медіаторів, який складається з амідів, ефірів та етерифікованих похідних довголанцюжкових насичених та ненасичених жирних кислот, які можуть синтезуватись практично у всіх органах і тканинах теплокровних. Серед них окремо виділяється клас насичених та ненасичених N-ацилетаноламінів (NAE). Встановлено, що ненасичені NAE, анандамід та арахідоноїлгліцерол, зв'язуються зі специфічними CB1- та CB2-рецепторами, а насичені, до яких належить N-стеароїлетаноламін (NSE), які також характеризуються канабіміметичними властивостями, не активують CB-рецептори, але можуть взаємодіяти з ванілоїдними TRPV1-рецепторами та рецепторами активації пероксисом PPARα. Враховуючи той факт, що на частку анандаміду в більшості клітин припадає лише від 1 до 5% від загальної кількості NAE, вважається можливим існування для насичених NAE окремих місць зв'язування на плазматичній мембрані.

В останнє десятиріччя встановлено численні ефекти ендоканабіноїдів на різноманітні параметри імунної відповіді організму, що дає підстави для пошуку серед них речовин, придатних для лікувального впливу на патологічні процеси, що супроводжуються запаленням [1, 2].

Запалення є складним процесом, яким організм відповідає на інфекційні, алергічні та інші шкідливі агенти, і спрямоване на знешкодження їхньої дії, видалення зруйнованих клітинних структур та усунення пошкоджень. Гострі й хронічні запальні процеси, що супроводжуються надмірною активацією імунної системи, є характерними для великої кількості хвороб, найпоширеніші серед яких – ревматоїдні артрити, псоріаз та ін. Запалення також суттєво впливає на розвиток злоякісних новоутворень, діабету, атеросклерозу, розладів нервової системи (хвороби Альцгеймера) тощо. Тому контроль за запаленням різної етіології сьогодні є єдиною важливою стратегією клінічної корекції перебігу чи запобігання широкому діапазону хвороб.

Є дані, що свідчать про здатність ендоканабіноїду 2-арахідоноїлгліцеролу відігравати суттєву роль у стимуляції різноманітних запальних реакцій in vivo в людини та мишей [3] і, навпаки, інгібувати експресію циклоок-

сигенази-2 у клітинах мікроглії мишей in vitro у відповідь на різноманітні прозапальні стимули, оскільки є субстратом для цього прозапального ензиму [4]. Такий насичений NAE, як N-пальмітоїлетаноламін (PEA), чинить протизапальну дію за гострого запалення в щурів. Припускається, що PEA може відігравати ключову роль у запуску комплексної системної відповіді в разі запалення [5]. Проте відсутні дані щодо дії при запаленнях інших насичених NAE, зокрема NSE.

Опікова травма зазвичай супроводжується запальним процесом з активацією багатьох ланцюгів імунної відповіді, дисрегуляцією клітинного імунітету, альтерацією медіаторів імунної системи тощо. На даний час імуносупресивні та протизапальні властивості ендоканабіноїдів широко досліджуються, але в основному вони стосуються сполук з ланцюгами ненасичених жирних кислот та PEA. Такої інформації щодо NSE практично не існує.

Враховуючи вищезазначене, метою нашої роботи було вивчити вплив NSE на деякі біохімічні показники під час неспецифічного запалення на моделі експериментальної опікової рани в щурів.

Матеріали та методи

Досліди проводили на білих безпородних щурах з масою тіла 250–300 г.

Дослідження впливу NSE на рівень цитокінів TNFα та IL-6 у крові тварин за опіку було проведено на 3-х групах щурів: 1 – інтактні тварини (n = 11); 2 – контрольні тварини (n = 11) з експериментальною опіковою раною, яку під загальним нембуталовим наркозом спричиняли шляхом прикладання на депільовану шкіру спини протягом 15 сек нагрітого до температури 100 °С металевого циліндра, площа основи якого дорівнювала 12,56 см^2; 3 – щури (n = 11) з опіком, які отримували водну суспензію NSE per os в дозі 10 мг/кг маси тіла щоденно протягом 12 діб. Сироватку крові піддослідних тварин одержували на 2-, 5-, 9- та 12-ту добу після опіку. Кров забирали зі хвостової вени під загальним знеболюванням розчином пентабарбіталу натрію.

Інші дослідження проводили на щурах, поділених на 6 експериментальних груп. У першій групі (n = 12) щури лишалися інтактними. Тварини другої групи (n = 12) отримували щодня per os суспензію NSE в дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів. У щурів 3-, 4-, 5-, 6-ої груп викликали дозований опік III ступеня у спосіб, що описаний вище, серед них тварини третьої групи (n = 12) з опіками слугували за контроль (не одержували лікування); четвертій групі (n = 12) щодня вводили per os суспензію NSE в дозі 10 мг/кг; тваринам п'ятої групи (n = 12) місце опіку щоденно змащували суспензією NSE в концентрації 10 мг/мл води, а щурам 6-ї групи (n = 10) вводили NSE per os в дозі 10 мг/кг і змащували опікову рану суспензією NSE в концентрації 10 мг/мл води. Лікування тривало 7 днів. На 8-й день всіх тварин декапітували під нембуталовим наркозом, відбирали кров, печінку і селезінку. До крові додавали 10%-й розчин цитрату натрію (5 : 1) і розділяли на плазму та еритроцити центрифугуванням упродовж 15 хв при температурі 4 °С при 3000 об/хв. Одержані еритроцити за таких самих умов тричі відмивали від залишків плазми фізіологічним розчином. Із печінки та селезінки готували на холоду 10%-і гомогенати в фізіологічному розчині.

Для визначення вмісту цитокінів TNFα та IL-6 використовували набір реактивів Rat TNFα ELISA Cat. No.3R080A та Rat IL-6 ELISA Cat.No.3R035A (RapidBio Lab, США). Вимірювання проводили на пристрої BioRad 680 Microplate Reader (BioRad Laboratories Inc., США).

Вміст NO_2^- визначали спектрофотометрично методом Гріна за допомогою реактиву Гріса [6].

Сумарну активність NO-синтаз (cNOS-конститутивної та iNOS-індуцибельної) [1.14.13.39] у печінці щурів визначали методом [7] за кількістю утвореного після інкубації нітрит-аніону (NO_2^-) методом Гріна [6]. Інкубаційна суміш (pH 7,0) об'ємом 1 мл містила в мМ: KH_2PO_4 – 50, $MgCl_2$ – 1, $CaCl_2$ – 2, NADPH – 1, L-аргініну – 2,2 та 0,2 мл проби. Для визначення активності iNOS до складу інкубаційної суміші замість $CaCl_2$ для зв'язування ендогенного Ca^{2+} додавали EGTA до кінцевої концентрації 4 мМ. Активність cNOS розраховували як різницю активності сумарної NOS та iNOS.

Інтенсивність процесів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) оцінювали спектрофотометрично за визначенням накопичення ТБК-реагуючих продуктів методом, описаним в роботі [8] в нашій модифікації [9], кількість яких розраховували з використанням коефіцієнта молярного поглинання для малонового діальдегіду $1{,}56\times10^5$ $M^{-1}см^{-1}$.

Сумарну активність супероксиддисмутази (СОД) [1.15.1.1] в гомогенатах печінки щурів визначали за ступенем зниження відновлення нітросинього тетразолію у присутності NADH та феназинметасульфату за методом [10], ак-

тивність каталази [1.11.1.6] – за швидкістю розпаду пероксиду водню [11], активність глутатіонпероксидази [1.11.1.9] – за методом, який ґрунтується на визначенні швидкості окислення NADPH у реакції з H_2O_2 у присутності відновленого глутатіону [12]. Активність СОД у плазмі виражали в умовних одиницях за 1 хв на 1 мл плазми, а в еритроцитах, печінці та селезінці в умовних одиницях за 1 хв на 1 мг загального протеїну.

Вміст протеїну в досліджуваних тканинах розраховували загальновживаним методом Лоурі.

Статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента, вірогідними вважали дані при $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Відомо, що опікова травма супроводжується порушеннями метаболічних процесів не тільки в зоні ушкодження, але й у всьому організмі. Ці порушення обумовлено больовим стресом, специфічним токсиноутворенням та неспецифічною запальною реакцією.

Термічна деструкція тканин супроводжується генералізованою активацією мононуклеарів (макрофагів). Відповідною реакцією на це є вивільнення і масоване надходження у кровообіг цитокінів – важливих медіаторів запалення. Активація макрофагів у перші години/добу після опіку, що супроводжується надмірною продукцією прозапальних цитокінів (фактора некрозу пухлин TNFα, інтерлейкінів IL–1, IL-6 та ін.), належить до основних механізмів дисфункції імунітету й підвищення чутливості до сепсису за термічного опіку. Різноманітні цитокіни, зокрема IL–1, IL-6 та TNFα, розглядаються як маркери тяжкості опіку, які мають прогностичне значення [13, 14]. Серед цитокінів IL-6 є головний медіатор відповіді організму в період 2–21 днів після опіку [15].

За низьких концентрацій цитокіни стимулюють антимікробні функції організму і загоєння ран. Вони мобілізують запаси субстратів для виробництва енергії і активують гуморальний та клітинний імунітет. За високих концентрацій, навпаки, цитокіни викликають значні зміни в метаболізмі клітин, що призводить до пошкодження тканин. Найбільш важливе значення має TNFα як перший проксимальний медіатор, що запускає цитокіновий каскад. TNFα стимулює виділення інтерлейкінів, простагландинів, вільних радикалів кисню, оксиду азоту і т. ін., кожний з яких є важливим фактором на своїй ділянці каскаду. Внаслідок цього надмірна акумуляція у крові TNFα спричинює перехід локального запалення в генералізований сепсис й тяжку поліорганну недостатність [16].

Протягом експерименту спостерігали вірогідне підвищення вмісту TNFα у крові щурів (рис. 1) на 2-гу та 5-ту добу після опіку, що узгоджується з даними інших дослідників [17]. У наших дослідах під впливом NSE на 5-, 9- та 13-ту добу рівень TNFα в сироватці крові щурів, що зазнали опіку, був менший, ніж у інтактних і контрольних тварин (рис. 1, *3*). Максимальне зниження вмісту цього медіатора запалення під впливом NSE визначено на 9-ту добу. Такий характер впливу NSE на рівень TNFα можливо зумовлений супресорною дією NSE на Tx1-субпопуляцію Т-хелперів, які беруть участь в імунній реакції клітинного типу.

На рис. 2 показано динаміку впливу NSE на рівень IL-6 у крові щурів протягом 2–13 днів після опіку.

Як видно з рис. 2 (*2*) достовірне підвищення рівнів IL-6 у крові щурів контрольної групи спостерігається на 5-й день після опіку. В той самий час при застосуванні NSE вміст IL-6 у крові тварин за опіку (рис. 2, *3*) залишається на рівні його в інтактних тварин (рис. 2, *1*).

На 2-й день після опіку у крові тварин, яким застосовували NSE, відмічається незначне, але достовірне підвищення рівнів IL-6. Зва-

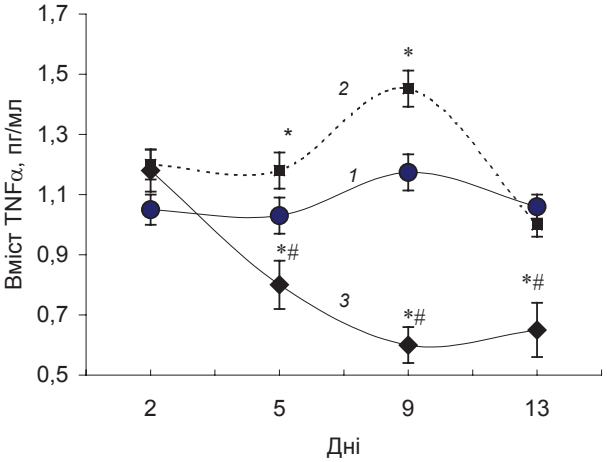

*Рис. 1. Зміни вмісту TNFα у сироватці крові щурів за експериментального опіку: 1– інтактні тварини; 2 – контроль (опік); 3 – щури з опіком, що отримували per os NSE в дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 12 днів. Тут і на рис. 2–8: * різниця вірогідна (P < 0,05) по відношенню до показників в інтактних тварин; # різниця вірогідна (P < 0,05) по відношенню до показників за опіку*

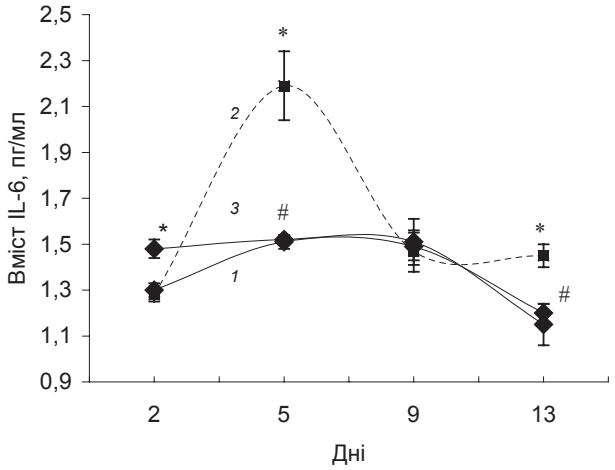

Рис. 2. Вплив NSE на вміст IL-6 у сироватці крові щурів за експериментального опіку: 1 – інтактні тварини; 2 – контроль (опік); 3 – щури з опіком, що протягом 12 днів отримували per os NSE в дозі 10 мг/кг маси тіла

жаючи на те, що IL-6 продукується переважно в гостру фазу запальної реакції популяцією Тх2–хелперів, які беруть участь в імунній реакції гуморального типу [18], підвищення його вмісту під впливом NSE в ранній період (на 2-й день) опікової травми можна розглядати як прояв імуномодулювальної дії NSE.

Відомо, що опік супроводжується активацією утворення деструктивних факторів – вільних радикалів кисню та оксиду азоту, які зумовлюють імунологічну перебудову організму, що характеризується зростаючою сенсибілізацією мікробними і тканинними антигенами з включенням Т-опосередкованої і Т-незалежної імунної відповіді, тобто формується так званий вторинний імунодефіцитний стан [19].

Опікова травма супроводжується інтоксикацією організму токсинами як екзогенного, так і ендогенного походження. Розвитку інтоксикації сприяє, зокрема, зниження знешкоджувальної функції печінки. Цей стан супроводжується експресією в печінці гена індуцибельної NO-синтази, в результаті чого генерується підвищена кількість NO. Наслідком реакції останнього з вільними радикалами кисню є утворення надзвичайно реакційної сполуки – пероксинітриту, який проявляє токсичну дію на клітини печінки.

Вплив NSE на активність індуцибельної та конститутивної NO-синтази в печінці щурів показано на рис. 3. Видно, що за опіку в печінці щурів достовірно підвищується активність індуцибельної NO-синтази (рис. 3, *А*; *3*) і зменшується активність конститутивної NO-синтази (рис. 3, *Б*; *3*). У щурів з опіком в умовах застосування NSE як per os у дозі 10 мг/кг, так і у вигляді суспензії з концентрацією 10 мг/мл активність індуцибельної NO-синтази залишається на рівні інтактних тварин (рис. 3, *А*; *4*, *5*). Застосування NSE, як per os, так за змащування опікової рани рівною мірою запобігає зниженню активності конститутивної NO-синтази в печінці щурів (рис. 3, *Б*; *4*, *5*).

На рис. 4 показано вплив NSE на вміст нітрит-аніону – стабільного метаболіту оксиду азоту у плазмі крові (*А*), еритроцитах (*Б*), печінці (*В*) та селезінці (*Г*) щурів за опіку: у плазмі крові, еритроцитах та печінці його рівень зростає (рис. 4, *А*, *Б*, *В*; *3*), а у селезінці – зменшується (рис. 4, *Г*; *3*). Це свідчить про порушення за опіку регуляції продукції оксиду азоту NO-синтазами, що описано в літературі [20, 22] і асоціюється з ушкодженням багатьох органів за цієї патології. При застосуванні

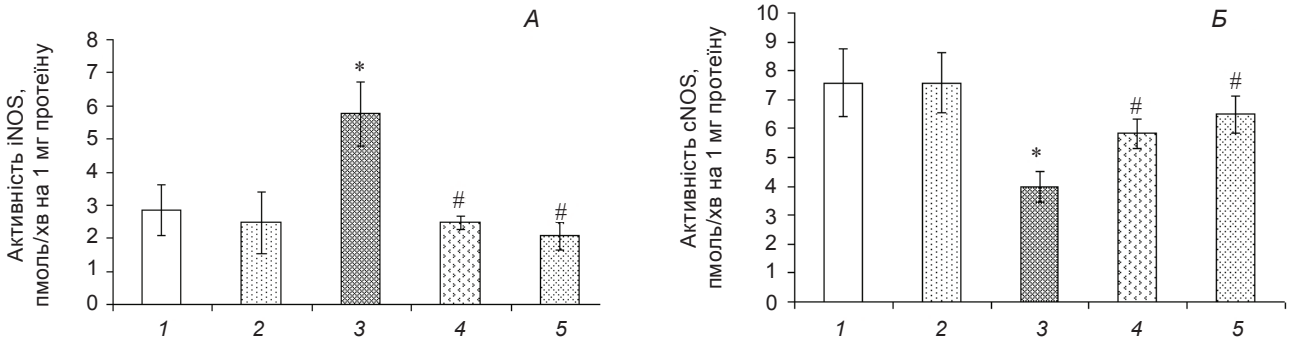

Рис. 3. Вплив NSE на активність iNOS (А) та cNOS (Б) у печінці щурів за експериментального опіку: 1 – інтактні тварини; 2 – інтактні тварини, що отримували per os NSE в дозі 10 мг/кг маси тіла; 3 – тварини з опіком; 4 – тварини з опіком, що отримували per os NSE в дозі 10 мг/кг маси тіла; 5 – тварини з опіком, яким опікову рану змащували суспензією NSE в концентрації 10 мг/мл води

NSE рівень нітрит-аніону у всіх досліджених тканинах за опіку залишається на рівні інтактних тварин. У плазмі, еритроцитах і селезінці ефект N-стеароїлетаноламіну не залежить від способу його застосування, а у печінці він є найбільш ефективним при введенні per os та разом зі змащуванням опікової рани (рис. 4, *Г*; *5*, *6* відповідно). Водночас введення суспензії NSE per os інтактним тваринам не впливає ні на активність NO-синтаз в печінці (рис. 3, *А*, *Б*; 2), ні на вміст нітріт-аніону в інших досліджених органах (рис. 4, *А*, *Б*, *В*, *Г*; *2*).

Таким чином, одержані дані (рис. 3, 4) свідчать про здатність NSE коригувати порушений за опіку стан системи оксиду азоту в організмі щурів, що сприяє загоєнню опікової рани.

Дисбаланс між радикалгенерувальною та антиоксидантною системами організму за опіку призводить до накопичення в органах і клітинах продуктів пероксидного окислення ліпідів [23]. Активація процесів ПОЛ зв'язана з трьома патофізіологічними факторами: стрес-реакцією, ішемічним/гіпоксичним станом чи реакцією запалення [24, 25]. Всі ці фактори, які індукують ПОЛ, характерні для стану післяопікової травми.

Із літературних джерел відомо, що після термічної травми максимальна активність процесів ПОЛ в організмі щурів спостерігається на 7-у–8-у добу, що, можливо, пов'язано з відсутністю адекватного ензиматичного захисту в цей період [26].

В умовах нашого експерименту в щурів з опіком на 8-му добу в еритроцитах, печінці та селезінці теж спостерігається підвищення вмісту продуктів пероксидного окислення

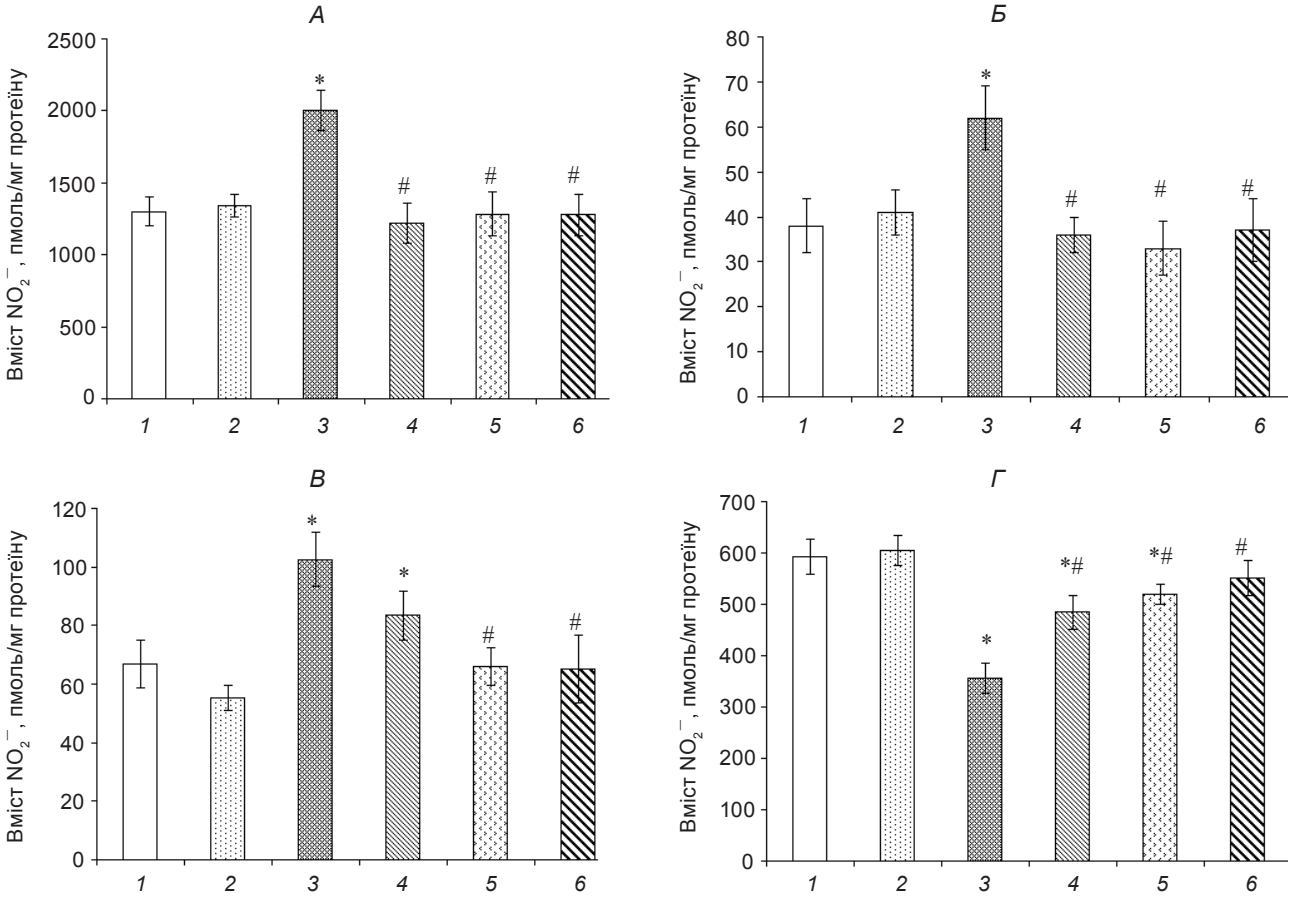

Рис. 4. Вплив NSE на вміст нітрит-аніону (NO_2^-) у плазмі (А), еритроцитах (Б), печінці (В) та селезінці (Г) щурів за опіку. Позначення: 1 – інтактні тварини; 2 – інтактні тварини, що отримували суспензію NSE per os у дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів; 3 – тварини з опіком; 4 – тварини, опікову рану яких змащували суспензією NSE в концентрації 10 мг/мл води протягом 7 днів; 5 – тварини з опіком, що отримували суспензію NSE per os в дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів; 6 – тварини, опікову рану яких змащували суспензією NSE в концентрації 10 мг/мл води з одночасним введенням суспензії NSE per os у дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів

ліпідів (рис. 5, *Б*, *В*, *Г*; *3*), а у плазмі (рис. 5, *А*; *3*) рівні ТБК-реагуючих продуктів не змінюються. В результаті лікування опікової рани за допомогою NSE на 8-му добу відбувається зменшення інтенсивності утворення продуктів ПОЛ у всіх досліджуваних тканинах, причому у плазмі (рис. 5, *А*; *4*), печінці (рис. 5, *В*; *4*) та селезінці (рис. 5, *Г*; *4*) найвірогідніше зменшення вмісту ТБК-реагуючих продуктів спостерігається в разі змащування NSE опікової рани, а в еритроцитах – за введення суспензії NSE per os (рис. 5, *Б*; *5*). При введенні NSE per os інтактним тваринам у дозі 10 мг/кг маси тіла спостерігається достовірне зменшення рівнів ТБК-реагуючих продуктів у плазмі крові (рис. 5, *А*; *2*) та селезінці (рис. 5, *Г*; *2*), що свідчить про антиоксидантну дію NSE в цих органах і в нормальних щурів.

Для селезінки – органу, де відбувається продукція та диференціювання лімфоцитів, а також захоплення й елімінація із кровотоку пошкоджених еритроцитів – особливо важливо збереження мембран клітин та ендотелію венозних синусів в оптимальному функціональному стані. Суттєва активація ПОЛ на 8-му добу після опікової травми в період, коли починають вироблятися антитіла і навантаження на селезінку зростає, може бути однією з причин імунодепресії під час опікової хвороби [26]. Дані на рис. 5, *Г* (*2*, *4*, *5*, *6*) свідчать про те, що NSE перешкоджає накопиченню токсичних продуктів ПОЛ у тканині селезінки, тим самим виявляє антиоксидантну дію.

Декомпенсація радикалгенеруючої та антиоксидантної систем за опіку призводить до утворення вільних радикалів, які відіграють роль «циркулюючих патологічних сигналів». Це може бути однією з причин розвитку генералізованого поліорганного ушкодження. Відомо, що організм має ензимні системи, які інгібують ПОЛ на етапі ініціації. Так, СОД інактивує супероксидний аніон, субстратами дії каталази та глутатіонпероксидази є пероксид водню та гідропероксиди ліпідів. Рівень активності внутрішньоклітинних ензиматичних антиоксидантних систем є генетично детермінованим, причому надлишкове накопичення у клітинах супероксидного радикала чи

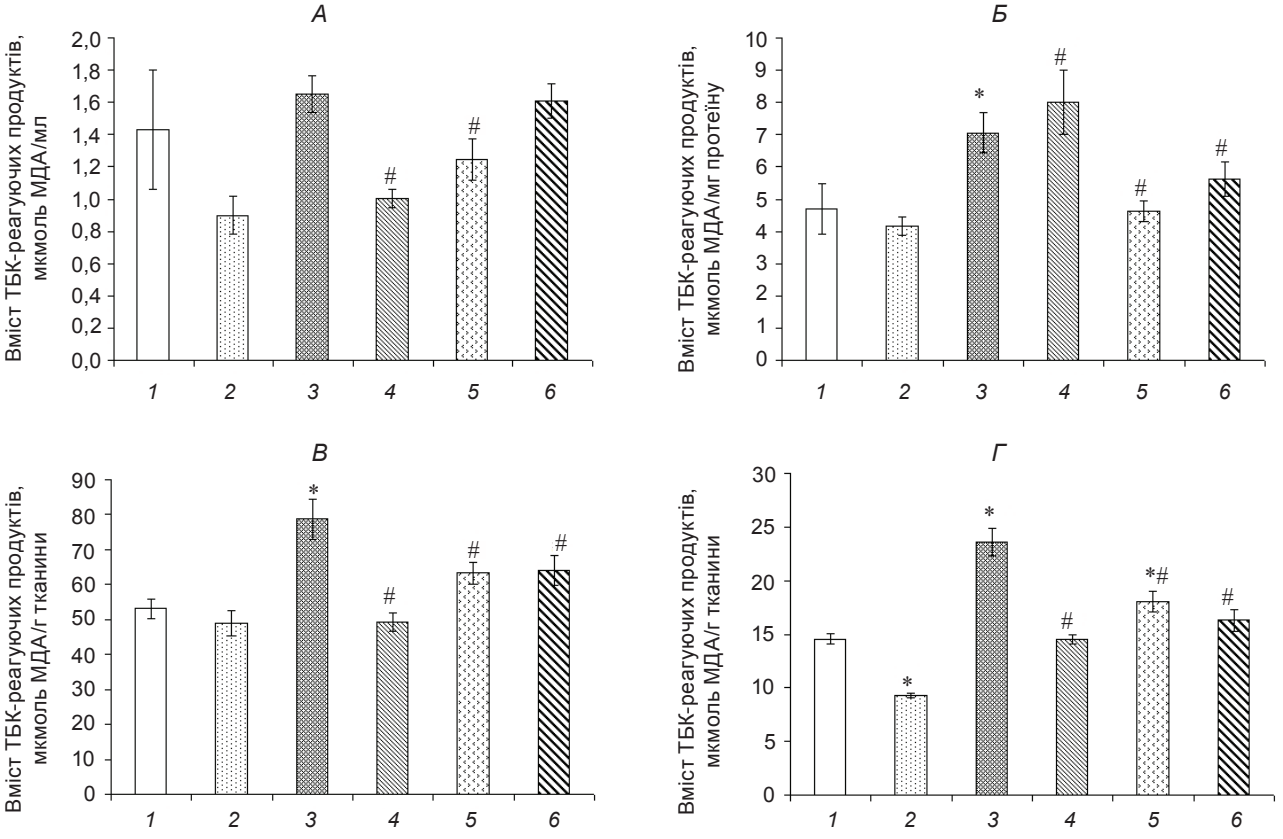

Рис. 5. Вплив NSE на вміст ТБК-реагуючих продуктів у плазмі (А), еритроцитах (Б), печінці (В) та селезінці (Г) щурів за опіку. Позначення див. на рис. 4

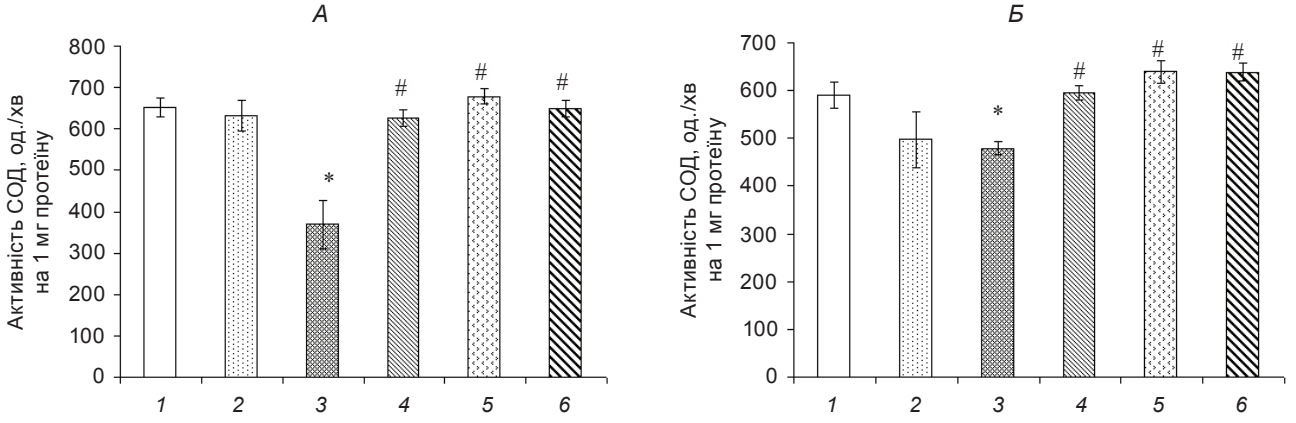

Рис. 6. Вплив NSE на активність супероксиддисмутази в плазмі (А) та еритроцитах (Б) щурів за опіку. Позначення див. на рис. 4

пероксиду водню супроводжується депресією ділянки геному, відповідального за активність ензимів антиоксидантного захисту.

СОД є антиоксидантним ензимом, який відіграє ключову роль у захисті клітин за оксидативного стресу. Відомо, що активність СОД у плазмі стійко зменшується після опіків внаслідок вичерпання активованої СОД [27]. В умовах нашого експерименту в щурів з опіком на фоні підвищеної активності процесів ПОЛ (рис. 5) спостерігається достовірне зниження активності СОД у плазмі та еритроцитах (рис. 6). Застосування NSE тваринам з опіковою травмою запобігає зниженню активності СОД за цією патологією (рис. 6, *А*, *Б*; *4–6*). Введення NSE per os нормальним щурам не впливає на активність СОД у плазмі та еритроцитах (рис. 6, *А*, *Б*; *2*). В печінці та селезінці ми не спостерігали достовірних змін в активності СОД у всіх групах піддослідних тварин (дані не представлено).

Відомо, що у процесі дисмутації супероксидного аніон-радикала утворюється пероксид водню, що відновлюється до H_2O переважно каталазою та глутатіонпероксидазою, причому в захисті клітин від окисного стресу, що спричинює H_2O_2 в таких концентраціях, провідну роль відіграє каталаза.

За умов нашого експерименту при опіку активність каталази достовірно зменшена у плазмі крові (рис. 7, *А*; *3*) та підвищена у печінці (рис. 7, *Б*; *3*) в порівнянні з інтактними тваринами. Застосування NSE тваринам з опіком як per os, так і в поєднанні зі змащуванням опікової рани запобігає зниженню активності каталази у плазмі (рис. 7, *А*; *5*, *6*) та підвищенню її активності в печінці (рис. 7, *Б*; *5*, *6*). У еритроцитах та селезінці достовірних змін в активності каталази у всіх групах тварин не спостерігається (дані не наведено).

На рис. 8 показано вплив NSE на активність глутатіонпероксидази (ГП) – одного з

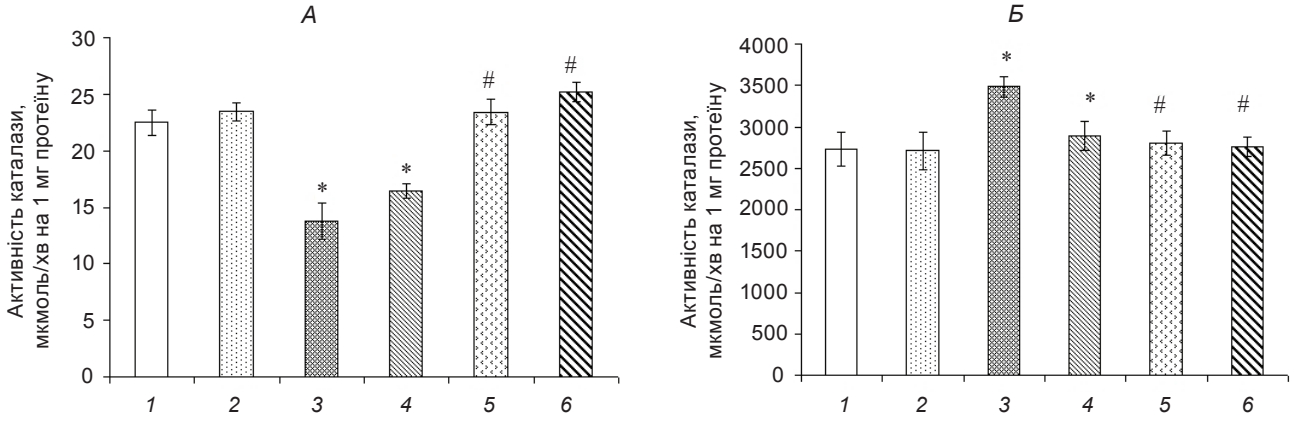

Рис. 7. Вплив NSE на активність каталази в плазмі (А) та печінці (Б) щурів за опіку. Позначення див. на рис. 4

ключових ензимів антиоксидантного захисту – у плазмі (*А*), еритроцитах (*Б*), печінці (*В*) та селезінці (Г) щурів за експериментального опіку.

Видно, що в щурів за опіку у плазмі крові відбувається вірогідне зростання активності ГП (рис. 8, *А*; *3*), а в еритроцитах, печінці та селезінці – зниження активності ГП відносно інтактних тварин (рис. 8, *Б*, *В*, *Г*; *3*), що свідчить про порушення системи антиоксидантного захисту в щурів за цієї патології. Слід зазначити, що зміни активності антиоксидантних ензимів залежать від інтенсивності утворення активних форм кисню (АФК): у випадку помірного зростання рівня АФК відбувається, як правило, активація ензимної ланки антиоксидантного захисту, при надмірному – пригнічення ензимної ланки радикального захисту клітин [28]. Достовірне зростання активності ГП у плазмі на 8-й день після опіку, на нашу думку, свідчить про помірну активацію вільнорадикальних процесів у крові щурів, що підтверджують також дані, які свідчать про тенденцію до підвищення вмісту у плазмі ТБК-реагуючих продуктів за опіку (рис. 5, *А*; 3) порівняно з інтактними тваринами.

Застосування NSE запобігає змінам активності глутатіонпероксидази за опіку як у плазмі (NSE за введення per os (рис. 8, *А*; *5*) та водночас зі змащуванням опікової рани (рис. 8, *А*; *6*) достовірно запобігає надмірній активації ГП), так і в еритроцитах та печінці (NSE запобігає зниженню активності ГП за всіх способах застосування (рис. 8, *Б*, *В*; *4–6*), а в селезінці – при змащуванні опікової рани та разом із введенням per os (рис. 8, *Г*; *4*, *6* відповідно).

Раніше нами в дослідах in vitro [9] було продемонстровано інгібувальний вплив NPE та NSE на неензиматичне Fe^{2+}-залежне вільнорадикальне окислення ліпідів у мітохондріях печінки щурів із гіпоксичною гіпоксією. Причому інгібувальний ефект NSE був більш виражений в порівнянні з NPE. Одним із можливих пояснень цього є те, що NSE має більш довгий вуглеводневий ланцюг, що дозволяє йому глибше проникати в мембрану, й тим самим суттєвіше модифікувати її властивості. Наші

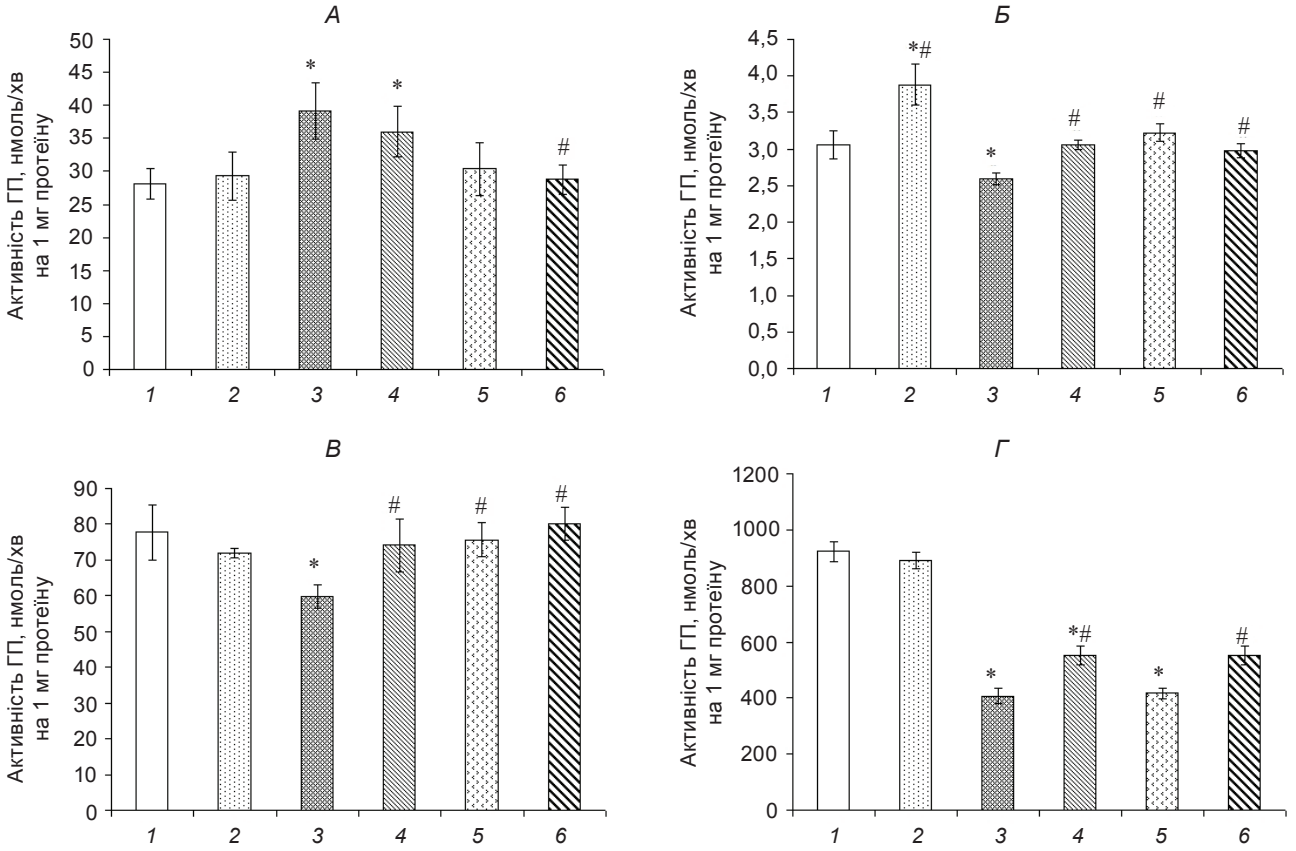

Рис. 8. Вплив NSE на активність глутатіонпероксидази (ГП) в плазмі (А), еритроцитах (Б), печінці (В) та селезінці (Г) щурів за опіку. Позначення див. на рис. 4

результати добре узгоджуються з цими попередніми даними і дозволяють припустити, що сприятливий ефект NSE на процес загоєння опікової рани в щурів, деякою мірою, можуть бути обумовлені інгібувальною дією на процеси ПОЛ, а такий антиоксидантний ефект є одним із проявів мембранопротекторних властивостей NSE. Проте, ми не виключаємо можливості зв'язування NSE з поки що невідомим рецептором. Про це можуть свідчити одержані нами дані щодо однакового впливу NSE на активність індуцибельної та конститутивної NO-синтази в печінці як при використанні per os, так і трансдермально (за цих умов кількість NSE, що потрапляє у кров та внутрішні органи, невелика) (рис. 3, *А*, *Б*; *4*, *5*), на вміст нітрит-аніону у плазмі, еритроцитах і селезінці (рис. 4, *А*, *Б*, *Г*; *4*, *5*), на вміст ТБК-реагуючих продуктів у плазмі, печінці та селезінці (рис. 5, *А*, *В*, *Г*; *4*, *5*), на активність СОД у плазмі та еритроцитах (рис. 6, *А*, *Б*; *4*, *5*), а також на активність ГП у еритроцитах та печінці щурів за опіку (рис. 8, *Б*, *В*; *4*, *5*).

Таким чином, застосування NSE прискорює загоєння експериментальної опікової рани в щурів шляхом зниження рівнів прозапальних цитокінів, стабілізування стану системи оксиду азоту, запобігання дисбалансу між утворенням продуктів пероксидного окислення ліпідів та антиоксидантною системою організму.

Результати даної роботи покладено в основу розроблення препарату з антизапальним та антиалергічним ефектом [29].

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ ОЖОГОВУЮ РАНУ У КРЫС

Н. М. Гулая, А. А. Чумак, А. Г. Бердышев, Е. Ф. Мегедь, Т. Н. Горидько, Н. Л. Киндрук, Г. В. Косякова, А. Д. Жуков

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

В работе представлены результаты исследования биохимических механизмов противовоспалительного действия эндоканнабиноида N-стеароилэтаноламина (NSE) на модели экспериментального ожога у крыс. После нанесения термического ожога кожи III степени крысы на протяжении 7 дней ежедневно получали водную суспензию NSE как per os в дозе 10 мг/кг массы тела, так и нанесением на ожоговую поверхность водной суспензии с концентрацией NSE 10 мг/мл. Впервые показано способность NSE ускорять процесс заживления ожоговой раны путем ингибирования продукции провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-6), нормализации содержания стабильного метаболита оксида азота — нитрит-аниона и активности конститутивной и индуцибельной NO-синтазы, а также устранения дисбаланса между процессами ПОЛ и активностью энзимов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы) в плазме, эритроцитах, печени и селезенке крыс.

Установленные нами противовоспалительные свойства NSE – эндогенного стабильного соединения с каннабимиметическим действием – дают основание для создания на его основе принципиально нового лекарственного средства для коррекции патологических состояний, сопровождаемых воспалительным процессом.

Ключевые слова: N-стеароилэтаноламин, воспаление, цитокины, оксид азота, пероксидное окисление липидов.

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF N-STEAROYLETHANOLAMINE ON EXPERIMENTAL BURN WOUND IN RATS

N. M. Gula, A. A. Chumak, A. G. Berdyshev, E. F. Meged, T. M. Goridko, N. L. Kindruk, G. V. Kosyakova, O. D. Zhukov

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

Summary

The biochemical mechanisms of anti-inflammatory effect of endocannabinoid congener N-stearoylethanolamine (NSE) was studied on the model of experimental burn in rats. The animals after the thermal burn of the skin received per os during 7 days the water suspension of NSE in a doze 10 mg/kg of body weight. In the other groups of rats the suspension was applied to the wound (the concentration of NSE was 10 mg/ml). It was shown for the first time that NSE accelerated the process of burn wound healing by the inhibition of proinflammatory cytokines (TNFα, IL-6) production. NSE caused the normalization of the iNOS and cNOS activity and of nitrite content in plasma, erythrocytes, liver and spleen of rats. NSE also modified the antioxidant enzymes (catalase,

superoxide dismutase and glutathione peroxidase) activity and diminished the level of lipid peroxidation. The discovered anti-inflammatory NSE properties suggest the possibility of its usage for burn treatment.

Key words: N-stearoylethanolamine, inflammation, cytokines, nitric oxide, lipids peroxidation.

1. *Marchalant Y., Brothers H. M., Wenka G. L.* // Biomed. Pharmacother. – 2008 – **62**, N 4. – P. 212–217.
2. *Croxford L. J., Yamamura T.* // J. Neuroimmunol. – 2005. – **166**. – P. 3–18.
3. *Sugiura T., Oka S., Gokoh M., Kishimoto S., Waku K.* // J. Pharmacol. Sci. – 2004. – **96**. – P. 367–375.
4. *Zhang J., Chen C.* // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**(33). – P. 22601–22611.
5. *Conti S., Costa B., Colleoni M. et al.* // J. Pharmacol. – 2002. – **135**. – P. 181–187.
6. *Green L. C., David A. W., Glogowski J. et al.* // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, N 1. – P. 131–138.
7. *Selter M., Knowles R. G., Monceda S.* // FEBS Lett. – 1991. – **291**. – P. 145–149.
8. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* / Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
9. *Gulaya N. M., Kuzmenko A. I., Margitich V. M.* // Chemistry and Physics of Lipids. – 1998. – **97**. – P. 49–54.
10. *Чевари С., Андял Т., Штренгер Я.* // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.
11. *Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* // Там же. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
12. *Переслегина И. А.* // Там же. – 1989. – № 11. – С. 20–23.
13. *Ueyama M., Maruyama I., Osame M. et al.* // J. Labor. Clin. Med. – 1992. – **120**, N 5. – P. 693–698.
14. *Endo S., Inada K., Yamada Y. et al.* // Burns. – 1993. – **19**, N 2. – P. 124–127.
15. *Yeh F. L., Lin W. L., Shen H. D. et al.* // Ibid. – 1999. – **25**, N 2. – P. 131–136.
16. *Кулинский В. И.* // Биохимия. – 2007. – **72**(6). – С. 733–746.
17. *Yeh F. L., Lin W. L., Shen H. D. et al.* // Burns. – 1997. – **23**, N 1. – P. 6–10.
18. *Coban Y. K., Aral M.* // Mediators Inflamm. – 2006. – **2006**, N 2. – P. 16492.
19. *Григорьева Т. Г.* // Международ. мед. журн. – 2002. – № 2. – С. 53–60.
20. *Rawlingson A.* // Burns. – 2003. – **29**, N 7. – P. 631–40.
21. *Hosnuter M., Gurel A., Babuccu O. et al.* // Ibid. – 2004. – **30**, N 2. – P. 121–125.
22. *Carter E. A., Derojas–Walker T., Tamir S. et al.* // Biochem. J. – 1994. – **304**. – P. 201–204.
23. *Бабская Ю. Е., Лавров В. А., Омонина Н. А.* // Хирургия. – 1985. – № 11. – С. 95–97.
24. *Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г.* Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам. – М., 1988. – 256 с.
25. *Петрович Ю. Н., Гуткин Д. В.* // Пат. физиол. – 1986. – № 5. – С. 85–92.
26. *Ринейская О. Н.* Перекисное окисление липидов, активность антиоксидантной защиты у крыс с ожоговой травмой / Автореф. дисс... канд.биол.наук. – Минск. – 1991.
27. *Saitoh D., Ookawara T., Fukuzuka K. et al.* // Burns. – 2001. – **27**. – P. 577–581.
28. *Чеснокова Н. П. , Михайлов А. В., Понукалина Е. В.* / Инфекционный процесс. – М.: «Академия Естествознания», 2006. – 153 с.
29. *Пат. 77278 UA* 6МПК А61К 31/13. Препарат для пригнічення алергічних реакцій та неспецифічного запалення, спосіб його одержання і спосіб його використання / Гула Н. М., Комісаренко С. В., Чумак А. А. та ін. / Опубл. 15.11.2006. Бюл. № 11.

Отримано 11.09.2008