

АНТИОКСИДАНТНІ ЕФЕКТИ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ У ТКАНИНІ СЕРЦЯ ТА ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБІЦИНУ

Є. А. ГУДЗЬ, Н. М. ГУЛА, Т. О. ХМЕЛЬ, Т. М. ГОРІДЬКО, А. Г. БЕРДИШЕВ

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

Досліджували вплив N-стеароїлетаноламіну (NSE) на порушення антиоксидантного захисту у тканині серця і плазмі крові щурів, спричинені введенням доксорубіцину. Показано, що застосування доксорубіцину призводить до зменшення активності ензимів антиоксидантного захисту клітин тканини серця, зокрема супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази. Введення NSE сприяє частковій нормалізації показників активності цих ензимів. Встановлено, що доксорубіцин призводить до підвищення рівня сечовини та креатиніну у плазмі крові піддослідних тварин. Введення NSE не впливає на рівень креатиніну та нормалізує рівень сечовини.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, доксорубіцин, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, каталаза, креатинін, сечовина.

Доксорубіцин (антибіотик антрациклінового ряду) – один із найефективніших протипухлинних препаратів, яким лікують рак молочної залози, лімфоми, саркоми м'яких тканин [1], але має обмежене застосування, в першу чергу через високу кардіотоксичність [2].

Введення доксорубіцину призводить до підвищення експресії індукцйбельної NO-синтази в міокарді [3], що, в свою чергу, спричиняє гіперпродукцію NO. Оксид азоту вступає в реакцію з супероксидним аніоном кисню та утворює пероксинітрит – потужний окисник, здатний окислювати та нітрозилувати протеїни, окислювати ліпіди [4].

Доксорубіцин зумовлює оксидативний стрес в пухлині і неуражених тканинах, негативно впливає на функцію мітохондріального дихального ланцюга, що призводить до загибелі клітин шляхом апоптозу [5–7].

У дослідях на щурах було показано, що доксорубіцин знижує у серці рівень високоенергетичних субстратів, зокрема аденозинтрифосфату та креатинфосфату. Низькі дози антибіотика внаслідок тривалого застосування мають більш виражений негативний ефект, ніж одноразове застосування еквівалентної дози [8].

Під час лікування доксорубіцином інколи спостерігаються симптоми нефротоксичності. Механізми ниркової недостатності спричинені введенням цитостатиків, включають в себе

пошкодження судин та структури нирки, що призводить до гемолітичного та уремічного синдромів. Нефротоксичність цитостатиків проявляється у підвищенні рівня креатиніну в сироватці крові [9], яке відбувається внаслідок зменшення рівня клубочкової фільтрації у нирках [10].

У зв'язку з високою токсичністю протипухлинних препаратів дуже важливим є пошук сполук, які б могли зменшувати побічні ефекти хіміотерапії.

Нашу увагу привернули природні ендоканабіноїди – похідні етаноламіну. Відомо, що довголанцюгові N-ацилетаноламіни (NAE) та їхні попередники – N-ацилфосфатидилетаноламіни (NAPE), накопичуються у тканинах живих організмів за патологічних станів. Пізніше було показано накопичення NAE в дегенеруючій ембріональній тканині курчат [11].

Існує багато даних про те, що під час розвитку неоплазми в організмі, ендоканабіноїди відіграють захисну роль в неуражених пухлиною тканинах. Агоністи канабіноїдних рецепторів першого типу (CB1) гальмують проліферацію ракових пухлин, ангиогенез та процес метастазування [12]. Відомі дані і про участь рецепторів другого типу (CB2) в опосередкуванні антипухлинних ефектів в організмі [13–16].

Раніше було показано, що N-стеароїлетаноламін (NSE) гальмує ріст і метастазування карциноми Льюїса у мишей, а також

попереджає низку токсичних проявів, що виникають у разі застосування цисплатину як хіміотерапевтичного агента [17].

Метою даної роботи було дослідити біохімічні порушення у тканині серця і плазмі крові, спричинені введенням доксорубіцину та здатність довголанцюгового N-стеароїлетаноламіну запобігати розвитку токсичних ефектів цього цитостатика.

Матеріали і методи

Досліди проводили на щурах-самцях з масою тіла 150–200 г. Тварин було поділено на 5 груп. «Інтактні» – група інтактних тварин ($n = 5$). «NSE» – група тварин, що одержували NSE *per os* у дозі 50 мг/кг протягом 7 діб ($n = 5$) починаючи з 6-ї доби експерименту. «Dox» – група тварин, яким робили три ін'єкції доксорубіцину внутрішньоочеревинно в дозі 2,5 мг/кг з інтервалом введення через добу ($n = 6$), починаючи з 6-ї доби експерименту. «Dox + NSE» – група тварин, що отримували NSE *per os* у дозі 50 мг/кг та три ін'єкції доксорубіцину внутрішньоочеревинно у дозі 2,5 мг/кг з інтервалом введення через добу ($n = 7$), починаючи з 6-ї доби експерименту. «NSE + Dox» – група тварин, яким вводили NSE *per os* у дозі 50 мг/кг протягом 7 діб, починаючи з 7-ї доби тваринам вводили внутрішньоочеревинно доксорубіцин у дозі 2,5 мг/кг з інтервалом введення через добу (три ін'єкції) ($n = 7$). На 12-ту добу тварин усіх груп декапітували, відповідно до правил поводження з лабораторними тваринами, вилучали серце та кров.

Тканину серця гомогенізували у фізіологічному розчині у співвідношенні: вагова частина розчину – вагова частина тканини (9 : 1). В результаті одержували 10% гомогенат. Визначення протеїну проводили за методом Лоурі [18].

У гомогенаті серця вимірювали активність каталази [19], глутатіонпероксидази [20], супероксиддисмутази [21]. У плазмі крові піддослідних тварин досліджували рівень сечовини за допомогою набору реактивів для визначення концентрації сечовини в біологічних рідинах (Філісіт – Діагностика, Україна) та креатиніну [22]. Рівень ТБК-продуктів визначали за кількістю малонового діальдегіду (МДА) за методом [23], NSE одержували як описано в [24]. Препарат доксорубіцину виробництва компанії «Артеріум» (Україна).

Статистичну обробку проводили у програмі Excel, достовірність результатів оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Було показано (рис. 1), що застосування доксорубіцину призводить до значного (більше ніж у 2 рази, порівняно із групою інтактних тварин) зменшення активності супероксиддисмутази у тканині серця піддослідних щурів. Введення NSE інтактним тваринам також дещо знижує активність супероксиддисмутази. У разі одночасного введення NSE і доксорубіцину активність супероксиддисмутази не відрізнялася від такої у групі тварин «NSE». Попереднє введення NSE не впливало на активність супероксиддисмутази тканин

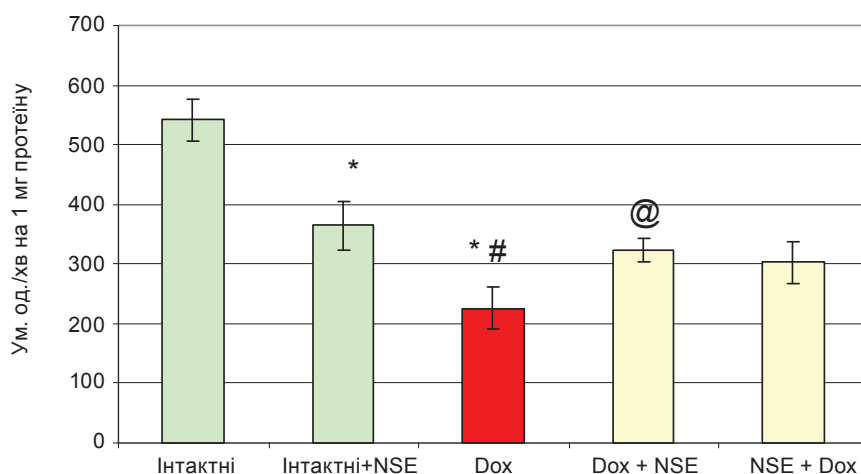


Рис. 1. Активність супероксиддисмутази у тканині серця піддослідних щурів ($M \pm m$, $n = 5-7$). * Вірогідно по відношенню до групи «Інтактні», # вірогідно по відношенню до групи «NSE», @ вірогідно по відношенню до групи «Dox». Примітка: $P \leq 0,05$

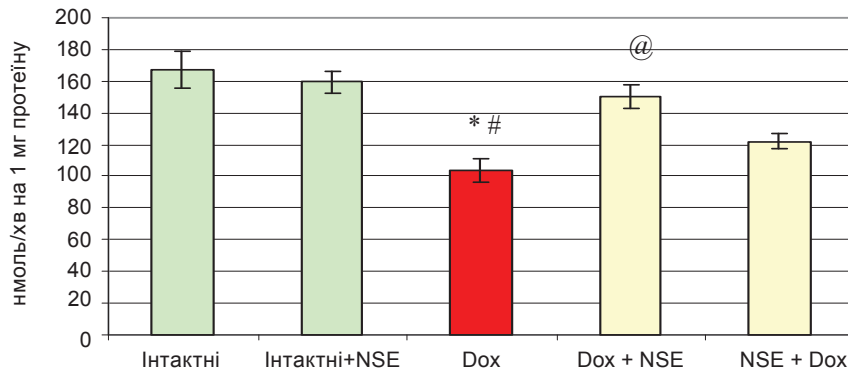


Рис. 2. Активність глутатіонпероксидази у тканині серця піддослідних щурів ($M \pm m$, $n = 5-7$). * Вірогідно по відношенню до групи «Інтактні», # вірогідно по відношенню до групи «NSE», @ вірогідно по відношенню до групи «Dox». Примітка: $P \leq 0,05$

серця щурів. Одержані результати свідчать на користь того, що введення NSE одночасно з доксорубіцином попереджає інгібуючий ефект доксорубіцину на активність супероксиддисмутази серця щурів.

Введення доксорубіцину (рис. 2) призводить до зменшення (на 25% порівняно із групою інтактних тварин) активності глутатіонпероксидази у тканині серця. Одночасне введення NSE і доксорубіцину повністю запобігає падінню активності глутатіонпероксидази, спричиненому доксорубіцином. Завчасне введення NSE піддослідним тваринам не змінює вплив доксорубіцину на активність глутатіонпероксидази тканин серця. Ці дані свідчать про здатність NSE зменшувати негативний ефект доксорубіцину, внаслідок запобігання падінню активності ферментів антиоксидантного захисту — супероксиддисму-

тази та глутатіонпероксидази у тканині серця щурів.

Також було досліджено вплив NSE на активність каталази. Введення NSE тваринам не впливало на активність каталази у тканині серця (рис. 3). Під дією доксорубіцину активність ферменту збільшувалась у два рази порівняно із групою інтактних тварин. Введення NSE тваринам, що одержували доксорубіцин, не призводило до зменшення активності каталази, що ймовірно, є компенсаторною відповіддю на зменшення активності супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази під дією доксорубіцину.

Неочікувані дані були одержані нами при визначенні продуктів пероксидного окислення ліпідів, ТБК-реагуючих сполук (рис. 4). Виявилося, що триразове введення доксорубіцину не змінювало рівень ТБК-реагуючих продуктів у міокарді. Ці сполуки

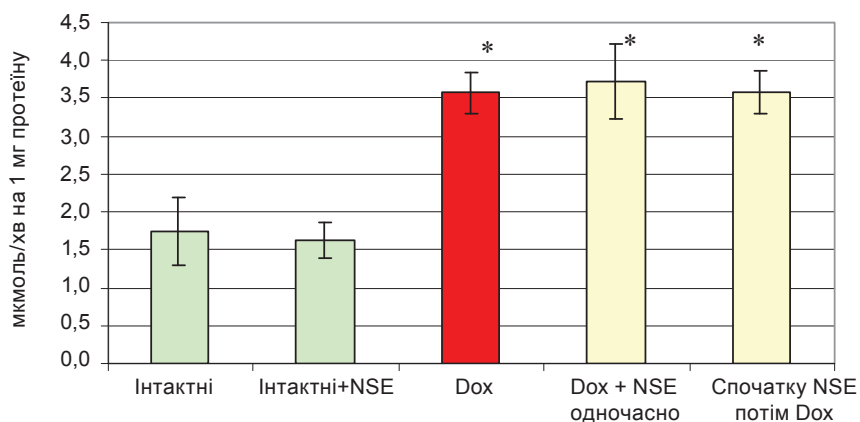


Рис. 3. Активність каталази у тканині серця піддослідних щурів ($M \pm m$, $n = 5-7$). * Вірогідно по відношенню до групи «Інтактні», ($M \pm m$, $n = 5-7$). Примітка: $P \leq 0,05$

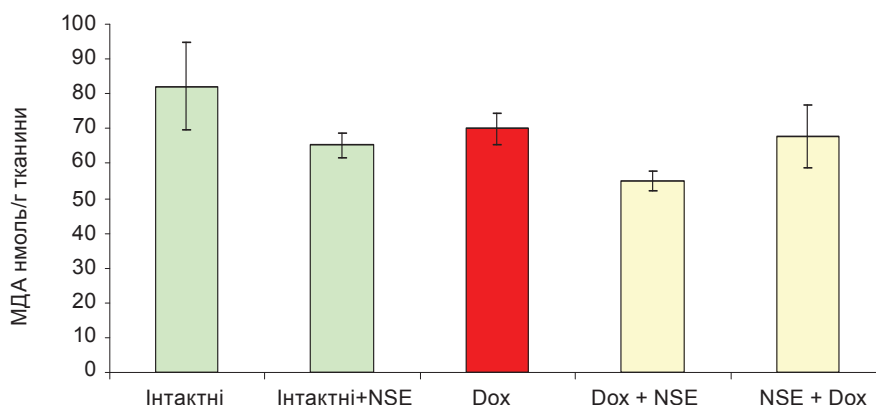


Рис. 4. Рівень пероксидного окислення ліпідів у тканині серця піддослідних щурів ($M \pm m$, $n = 5-7$)

відображають, з однієї сторони, активність утворення пероксинітриду, а з іншої – активність систем антиоксидантного захисту. Це дозволяє зробити припущення, що, не дивлячись на пригнічення активності супероксиддисмутази (рис. 1) та глутатіонпероксидази (рис. 2), висока активність каталази у щурів, які одержували доксорубіцин, захищає тканину міокарда від пошкодження і накопичення ТБК-реагуючих сполук.

Для того, щоб оцінити побічні ефекти доксорубіцину на нирки ми визначали вміст сечовини та креатиніну у плазмі крові. З даних літератури відомо, що накопичення креатиніну у плазмі крові може свідчити про ниркову недостатність, внаслідок зниження клубочкової фільтрації в нирках.

Введення доксорубіцину піддослідним щурам (рис. 5) призводить до зростання рівня креатиніну у плазмі крові по відношенню до показників групи інтактних тварин на 18%.

Введення NSE в даній серії експериментів не впливало на ефекти спричинені доксорубіцином. Це свідчить про те, що, очевидно, NSE не впливає на рівень клубочкової фільтрації креатиніну.

Показано також (рис. 6), що застосування доксорубіцину призводить до зростання рівня сечовини у плазмі крові тварин порівняно із групою інтактних тварин.

Підвищення рівня сечовини у плазмі крові може вказувати на порушення клубочкової фільтрації. Водночас потрібно враховувати той факт, що рівень сечовини може підвищуватися за рахунок катаболізму протеїну.

Поєднане введення NSE та доксорубіцину нормалізує рівень сечовини до показників групи інтактних тварин, що свідчить про зниження токсичного впливу доксорубіцину на функцію нирок у присутності NSE. Попереднє введення NSE не впливає на рівень сечовини у плазмі крові піддослідних щурів.

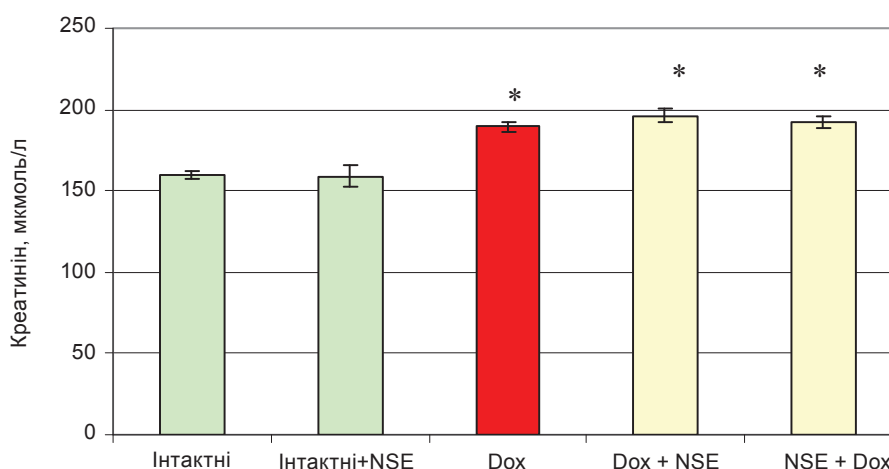


Рис. 5. Вміст креатиніну в плазмі крові піддослідних щурів ($M \pm m$, $n = 5-7$). * Вірогідно по відношенню до групи «Інтактні». Примітка: $P \leq 0,05$

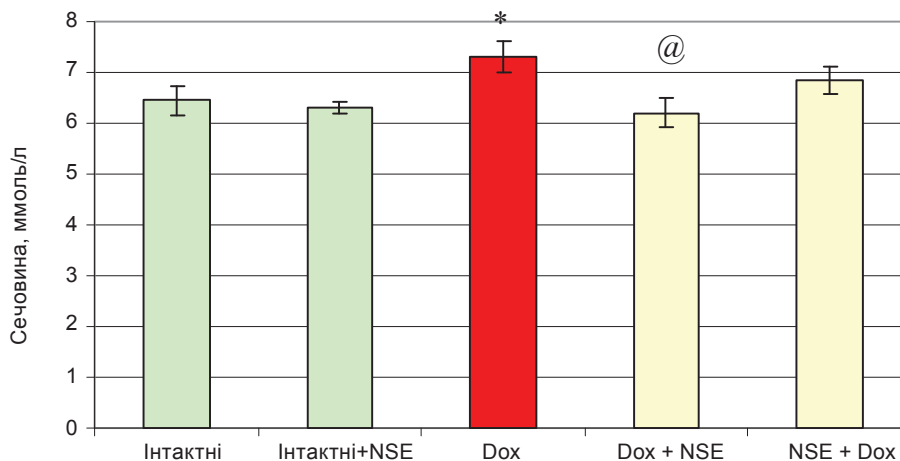


Рис. 6. Вміст сечовини у плазмі крові піддослідних щурів ($M \pm m$, $n = 5-7$). * Вірогідно по відношенню до групи «Інтактні», @ вірогідно по відношенню до групи «Dox». Примітка: $P < 0,05$

Таким чином, результати проведених нами експериментів свідчать, що доксорубіцин знижує активність двох ензимів антиоксидантного захисту тканин серця, глутатіонпероксидази та супероксиддисмутази. NSE в комплексі з доксорубіцином запобігає падінню активності цих ензимів. У той же час, NSE не знижує активність каталази у тканині серця щурів, підвищення якої спричинено доксорубіцином. Ці дані свідчать про здатність NSE нормалізувати функції антиоксидантних систем серця (супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази), при цьому не зменшуючи активність каталази. Дослідження продемонстрували підвищення рівня сечовини та креатиніну у плазмі крові щурів при введенні доксорубіцину, що можливо, відбувається внаслідок зниження клубочкової фільтрації у нирках цих кінцевих продуктів обміну. Введення NSE дозволяє суттєво знизити концентрацію сечовини у плазмі крові. Однак вміст креатиніну при цьому не знижується. Ймовірно, NSE частково відновлює функцію ниркових клубочків, які були ушкоджені доксорубіцином.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА В ТКАНИ СЕРДЦА И ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА

Е. А. Гудзь, Н. М. Гулая, Т. А. Хмель,
Т. Н. Горидько, А. Г. Бердышев

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

Исследовали влияние N-стеароилэтанол-амин (NSE) на нарушение антиоксидантной защиты в ткани сердца и плазме крови крыс, вызванное введением доксорубицина. Показано, что применение доксорубицина приводит к уменьшению активности энзимов антиоксидантной защиты клеток ткани сердца, в частности супероксиддисмутази и глутатионпероксидазы. Введение NSE способствует частичной нормализации показателей активности этих энзимов. Установлено, что доксорубицин приводит к повышению уровня мочевины и креатинина в плазме крови подопытных животных. Введение NSE не влияет на уровень креатинина и нормализует уровень мочевины.

Ключевые слова: N-стеароилэтанол-амин, доксорубицин, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза, креатинин, мочевина.

**ANTIOXIDATIVE EFFECT OF THE
N-STEAROYLETHANOLAMINE IN THE
HEART TISSUE AND BLOOD PLASMA
OF RATS UNDER DOXORUBICIN
TREATMENT**

*I. A. Goudz, N. M. Gula, T. O. Khmel,
T. M. Goridko, A. G. Berdushev*

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

S u m m a r y

The influence of N-stearoylethanolamine (NSE) on infringement antioxidative protection in the heart tissue and blood plasma of rats caused by doxorubicin treatment was investigated. It was shown that doxorubicin application leads to reduction of antioxidative protection enzymes activity in the heart tissue, superoxidedismutase, glutathioneperoxidase in particular. Application of the NSE promotes the partial normalization of these enzymes activity. It was shown that doxorubicin leads to urea and creatinine levels increase in blood plasma of experimental animals. NSE application does not influence creatinine level and normalizes the urea level.

Key words: N-stearoylethanolamine, doxorubicin, superoxidedismutase, glutathioneperoxidase, catalase, creatinine, urea.

1. *Young R. C., Ozols R. F., Myers C. E. // N. Engl. J. Med. – 1981. – 305. – P. 139–153.*
2. *Takemura G., Fujiwara H. // Prog. Cardiovasc. Dis. –2007. – 49, N 2. – P. 330–352.*
3. *Mukhopadhyay P., Rajesh M., Bátkai S. et al. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2009. – 296, N 5. – H.1466–H.1483.*
4. *Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. // Physiol. Rev. – 2007. – 87, N 1. – P. 315–424.*
5. *Bai P., Mabley J. G., Liaudet L. et al. // Oncol. Rep. – 2004. – 11, N 2. – P. 505–508.*
6. *Myers C. E., McGuire W. P., Liss R. H. et al. // Science. – 1977. – 197. – P. 165–167.*
7. *Tokarska-Schlattner M., Zaugg M., Zuppinger C. et al. // J. Mol. Cell Cardiol. – 2006. – 41, N 3. – P. 389–405.*
8. *Nicolay K., Aue W. P., Seelig J. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – 929, N1. – P. 5–13.*
9. *Kintzel P. E. // Drug. Saf. –2001. – 24, N 1. – P. 19–38.*
10. *Reinhold S. W., Reichle A., Leiminger S. et al. // M.C. Res. Notes. – 2011. – 4, N 2. – P. 4–24.*
11. *Kara J., Borovicka M., Liebl V. et al. // Neoplasma. – 1986. – 33, N 2. – P. 187–205.*
12. *Casanova M.L., Blazquez C., Martinez-Palacio J. et al. // J. Clin. Invest. – 2003. – 111, N 1.– P. 43–50.*
13. *Vignot S., Besse B., de la Motte Rouge T. et al. // Bull Cancer. – 2006. – 93, N 2.– P. 163–170.*
14. *Flygare J., Gustafsson K., Kimby E. et al. // FEBS Lett. – 2005. – 579, N 30.– P. 6885–6889.*
15. *Sarnataro D., Grimaldi C., Pisanti S. et al. // Ibid. – N 28.– P. 6343–6349.*
16. *Nithipatikom K., Endsley M.P., Isbell M.A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. –2005. – 332, N 4.– P. 1028–1033.*
17. *Гула Н. М., Хмель Т. О., Клімашевський В. М. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2006. – 78, № 1. – С. 135–142.*
18. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. // J. Biol. Chem. –1951. – 193, N 1. – P. 265–275.*
19. *Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г. // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.*
20. *Асатиани В. С. / Новые методы биохимической фотометрии. – 1965. – С. 543.*
21. *Чвари С., Андел Т., Штрэнгер Я. // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.*
22. *Тиц Н. А. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. – 1997. – С. 277–178.*
23. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. / Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – С. 252.*
24. *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 17.08.2011