ISSN 2304-8336

Національна академія медичних наук України
Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини»

ПРОБЛЕМИ РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ

17 ВИПУСК
2012

Generated by CamScanner from intsig.com

УДК 612.621:612.82:591.147.599.23:612.014.48

Л. П. Дерев'янко[1], Н. П. Атаманюк[1], Г. В. Косякова[2], О. Ф. Мегедь[2], А. Г. Бердишев[2], А. М. Яніна[1], В. В. Талько[1, *], А. А. Чумак[1], Н. М. Гула[2]

[1]Державна установа "Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України", 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050
[2]Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, м. Київ

ВПЛИВ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ НА СТАН ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ У ОПРОМІНЕНИХ ЩУРІВ

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

Ключові слова: *N-стеароїлетаноламін, іонізуюче випромінювання, про- і антиоксидантна системи, щури.*

Дію радіації поєднує з іншими стресорними впливами здатність викликати активацію вільнорадикального окислення в опроміненому організмі та порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Продуктами вільнорадикального 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., Мегедь О. Ф., Бердишев А. Г., Яніна А. М., Талько В. В., Чумак А. А., Гула Н. М., 2012

Generated by CamScanner from intsig.com

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

На початку 1980-х років в Інституті біохімії в клітинах нейробластоми миші С1300 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.

Generated by CamScanner from intsig.com

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 (pH 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°С, швидко охолоджували, додавали 1 мл 35% розчину трихлороцтової кислоти і центрифугували 5 хв при 1500 g. Екстинкцію супернатанту 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 $1{,}56 \cdot 10^5$ $М^{-1} \cdot см^{-1}$.

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 ex 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 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 ензимній реакції і розраховували за формулою:

$$\frac{(E0 - E1) \cdot V_0}{V_1 0{,}034 \cdot t \cdot P}, \text{ мкмоль} \cdot (\text{хв} \cdot \text{мг протеїну})^{-1},$$

де E1 – екстинкція дослідної проби; E0 — 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 забарвленого комплексу рожевого кольору солі діазонію, що утворюється при

Generated by CamScanner from intsig.com

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 доби 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-анінону 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

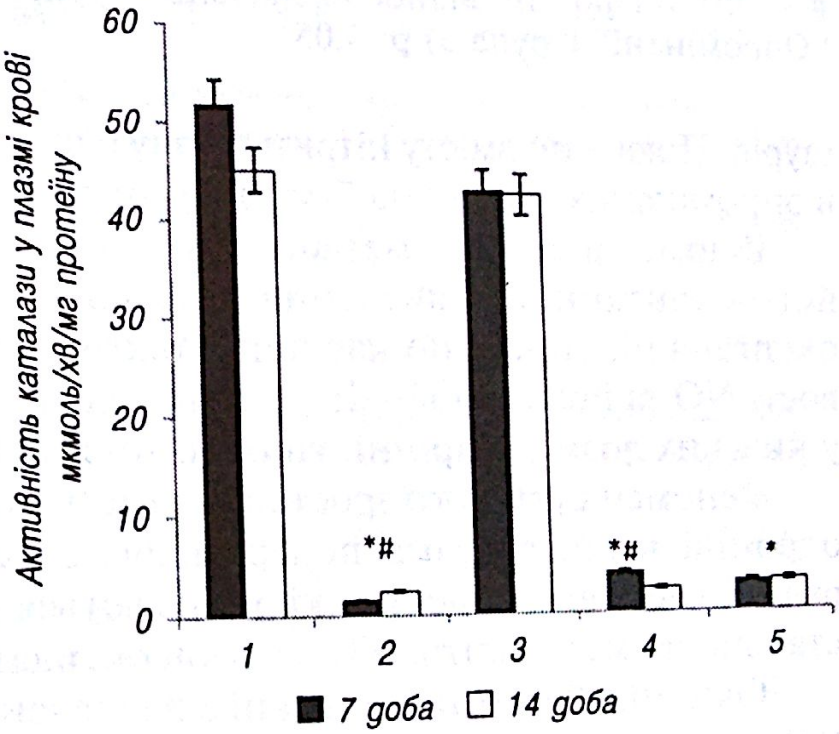

Рис. 2. Активність каталази в плазмі крові щурів: *1* — інтактні; *2* — опромінені; *3* — інтактні + NSE; *4* — NSE + опромінені; *5* — опромінені + NSE; * — зміни вірогідні відносно значень у групі "Інтактні" (група 1), $p<0,01$; # — зміни вірогідні відносно значень у групі "Опромінені" (група 3) $p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

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. Разнонаправленное 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 свободнордикального перекисного окисления липидов, активность аденилатциклазы и проницаемость плазматической мембраны 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-стеароилетаноламина 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-стеароїлетаноламіну на систему антиоксидантного захисту в опромінених щурів / Т. М. Горідько, 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. Vasorotection 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.

Generated by CamScanner from intsig.com

Л. П. Деревянко[1], Н. П. Атаманюк[1], Г. В. Косякова[2], Е. Ф. Мегедь[2], А. Г. Бердышев[2], А. Н. Янина[1], В. В. Талько[1], А. А. Чумак[1], Н. М. Гула[2]

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

[2]Институт 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 тотально 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. Derevjanko[1], N. P. Atamaniuk[1], G.V. Kosiakova[2], O. Ph. Meged'[2], A. G. Berdyshev[2], A. M. Yanina[1], V. V. Tal'ko[1], A. A. Chumak[1], N. M. Gula[2]

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

[2]A. 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.*

Generated by CamScanner from intsig.com