

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА

Бердишев Андрій Геннадійович

УДК 577.115.3:616-002

Бердишев

**ДІЯ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ НА РЯД БІОХІМІЧНИХ
ПРОЦЕСІВ ЗА ГІПЕРЧУТЛИВОСТІ НЕГАЙНОГО,
УПОВІЛЬНЕНОГО ТИПУ
ТА НЕСПЕЦИФІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2012

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біохімії ліпідів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
ГУЛА Надія Максимівна,
завідувач відділу біохімії ліпідів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
ПАРХОМЕНКО Юлія Михайлівна,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;

доктор медичних наук, професор
ОВСЯННІКОВА Людмила Михайлівна,
провідний науковий співробітник лабораторії
молекулярної біології ДУ «Науковий центр
радіаційної медицини НАМН України».

Захист відбудеться **20 лютого 2012 р. о 14 годині** на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ
(01601 Київ, вул. Леонтовича, 9).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАНУ (Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розіслано 20 січня 2012 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



О.В. Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Значне місце в світовій науковій літературі займає вивчення біологічної дії ендоканабіноїдів, що проявляють високу біологічну та фармакологічну активність, здатні модулювати багато функцій організму, зокрема, імунної системи людини й тварин, а також чинити протизапальну дію. Серед ендоканабіноїдів виділяється клас насичених та ненасичених N-ацилетаноламінів (NAEs). У тканинах ссавців при фізіологічних умовах NAEs знайдені в незначній кількості (близько 10^{-15} моль/г). Однак, за патологічних процесів вміст цих мінорних ліпідів значно зростає. Вони мають канабіміметичні властивості, і в концентраціях 10^{-6} — 10^{-9} М проявляють виражений протекторний вплив на організм за дії різних ушкоджуючих факторів [Shmid H. H. O. and Berdyshev E.V., 2002; Dalle Carbonare M. et al., 2008]. На сьогодні найбільш повно вивчені біологічні ефекти ненасичених NAEs, переважно N-арахідонолетаноламіну (тривіальна назва — «анандамід»).

Починаючи з 80-х років минулого сторіччя у відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України під керівництвом чл.-кор. НАНУ та АМНУ Н. М. Гулої проводиться багатопланове детальне вивчення біологічної ролі насичених NAE [Гулая Н.М. и др., 1988; Gulaya N.M. et al., 1988, 1989; Гула Н.М. та ін., 1997, 2001, 2005, 2007, 2009, 2010]. Зокрема, виявлено мембраностабілізуючі та антиоксидантні властивості деяких NAEs; відкрито їх кардіо- та гепатопротекторну дію. Показана можливість їх застосування в розчинах-консервантах для зменшення деструктивних змін та підвищення життєздатності ізольованих органів. Вперше доведено нейропротекторну дію N-стеароїлетаноламіну (NSE) та знайдено зменшення споживання наркотику у щурів-морфіністів, що отримували NSE. Вперше встановлено здатність N-пальмітоїлетаноламіну спрямовано та вибірково модулювати активності мембранозв'язаних Ca^{2+} -транспортуючих систем клітин. Вперше показана взаємодія NSE з сигнальною системою оксиду азоту. Отримано дані про здатність цього NAE модулювати утворення оксиду азоту за різних патологічних станів організму, зокрема здійснювати різноспрямований вплив на активність конститутивної та індукцйбельної ізоформ NO-синтази. Вперше описано, що NAE беруть участь в регуляції функції кори надниркових залоз. Встановлено, що NSE модулює рівень 11-оксикортикостероїдів і, тим самим, впливає на перебіг стресорної реакції організму.

Логічним розвитком цих досліджень стало вивчення біологічних ефектів NSE за умов алергічних і запальних процесів.

Гострі та хронічні запальні процеси, що супроводжуються надмірною активацією імунної системи, є характерними для великої кількості хвороб, серед яких ревматоїдні артрити, псоріаз, діабет, атеросклероз, бронхіальна астма, розлади нервової системи (хвороба Альцгеймера) тощо. Запальна компонента присутня також за різноманітних алергічних реакцій [Bertoni A. G. et al., 2010; Querfurth H. W. and Laferla F. M., 2010]. Згідно з даними ВООЗ, поширеність алергічних захворювань кожне десятиріччя повсюдно подвоюється. В Україні є не менше 10 млн хворих на алергічні захворювання. Проблему алергічних захворювань в Україні слід вважати однією з пріоритетних і відповідним чином шукати засоби впливу на

цю патологію [Пухлик Б. М., 2011]. Тому пошук природних сполук, здатних впливати на початкові етапи ініціації і розвитку алергічних та запальних процесів, є найважливішим завданням сучасної біології і медицини.

На відміну від всіх ненасичених NAEs і насиченого NAE 16:0 N-пальмітоїлетаноламіну, що реалізують свою дію переважно шляхом зв'язування з канабіноїдними (CB1, CB2), ванілоїдними TRPV-рецепторами, насичений NAE 18:0 NSE не зв'язується з цими рецепторами, але проявляє виражені канабіміметичні властивості. На сьогодні механізми, за якими реалізуються біологічні ефекти NSE, практично не вивчено.

Тому дослідження дії NSE на біохімічні процеси в організмі ссавців за алергічних реакцій і запальних процесах є актуальним, оскільки воно сприяє встановленню механізмів біологічних ефектів насичених NAEs, а також закладає засади для створення на їх основі фармакологічних препаратів для корекції і лікування різноманітних хвороб, які супроводжуються алергічними реакціями та запальними процесами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота проводилась в рамках: 1) наукової тематики відділу біохімії ліпідів Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України: проблема «Біохімія тварин та людини», тема 2.2.1.6 «Вивчення механізмів протекторної та адаптивної дії довголанцюжкових N-ацилетаноламінів (NAE) у ссавців», держ. рег. № 0104U003278, затвердженої Президією НАН України; 2) наукової теми Міністерства науки та освіти України „Обґрунтування застосування одного з N-ацилетаноламінів (умовна назва «Іксон») для лікування алергічного та неспецифічного запалення” (договір №М/117 — 2004).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити вплив NSE на біохімічні процеси в організмі ссавців під час розвитку реакцій гіперчутливості негайного, уповільненого типу та неспецифічного запалення. Для досягнення мети дослідження було поставлено наступні завдання:

1) вивчити дію NSE за анафілактичного шоку у морських свинок. Дослідити вплив різних доз NSE на вміст гістаміну, нітрит-аніону, кінцевих продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) і пероксидного окислення протеїнів (ПОП), активність конститутивної та індукційної NO-синтази та ключових ензимів антиоксидантного захисту (каталази, супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГП)) в серці, легенях, печінці та селезінці морських свинок за анафілаксії;

2) дослідити вплив NSE на інтенсивність реакції гіперчутливості уповільненого типу (РГУТ) на динітрохлорбензол (ДНХБ) у мишей. Вивчити вплив NSE на рівень нітрит-аніону, кінцевих продуктів ПОЛ та ПОП, на активність каталази та ГП в крові, тимусі та селезінці мишей за РГУТ;

3) дослідити дію NSE при неспецифічному запаленні у щурів, що спричинене термічним опіком шкіри III ступеня. Вивчити вплив NSE на процес загоєння експериментальної опікової рани у щурів. Вивчити вплив NSE на рівень прозапальних цитокінів (TNF α , IL-1 β , IL-6), на стан системи оксиду азоту (вміст нітрит-аніону (NO $_2^-$), активність конститутивної та індукційної NO-синтази),

антиоксидантної системи (вміст ТБК-реагуючих продуктів, продуктів ПОП та активність каталази, ГП, СОД), а також на вміст вільних амінокислот (АК) в організмі щурів в нормі та за умов неспецифічного запалення.

Об'єкт дослідження — біохімічні процеси при алергічних реакціях негайного, уповільненого типів та неспецифічного запалення.

Предмет дослідження — вплив NSE на біохімічні процеси, що відбуваються в організмі тварин за алергічних реакцій та неспецифічного запалення.

Методи дослідження: експериментальні моделі на тваринах (модель анафілактичного шоку у морських свинок; контактної гіперчутливості уповільненого типу на динітрохлорбензол у мишей; неспецифічного запалення, викликаного термічним опіком шкіри III ступеня у щурів); імуноензимний аналіз, флуориметричні, спектрофотометричні, статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше досліджено вплив NSE на біохімічні процеси, обумовлені розвитком в організмі ссавців алергічних реакцій та запальних процесів.

Експериментально встановлено, що NSE модулює деякі біохімічні процеси, що відбуваються при розвитку алергічних реакцій та неспецифічного запалення у ссавців. Це сприяє виживанню морських свинок за анафілаксії, пригнічує прояв реакції гіперчутливості уповільненого типу у мишей та прискорює загоєння опікової рани у щурів. Встановлено, що введення сенсibilізованим морським свинкам NSE протягом двох тижнів до провокації анафілактичного шоку запобігає зростанню рівню гістаміну в серці, нирках та селезінці. За цих умов NSE також запобігає збільшенню вмісту нітрит-аніону (NO_2^-) в серці, селезінці та нирках і зменшенню в печінці та легенях, зменшує підвищену за анафілаксії активність індукцибельної та конститутивної NO-синтази у серці морських свинок, нормалізує вміст ТБК-реагуючих продуктів та активність каталази, ГП й СОД в тканинах органів-мішеней.

Вперше встановлено, що введення NSE мишам, сенсibilізованим динітрохлорбензолом, у 10 разів пригнічує інтенсивність РГУТ, нормалізує вміст NO_2^- , продуктів ПОЛ та ПОП, а також активність антиоксидантних ензимів в плазмі, тимусі та селезінці тварин.

Вперше доведено, що застосування NSE прискорює загоєння експериментальної опікової рани в щурів шляхом зниження рівнів прозапальних цитокінів ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6), нормалізації стану системи оксиду азоту, усуває дисбаланс між утворенням продуктів ПОЛ та активністю антиоксидантних ензимів організму. Встановлено здатність NSE запобігати змінам вмісту вільних амінокислот в організмі щурів за неспецифічного запалення, викликаного опіком шкіри.

Практичне значення одержаних результатів. Встановлено здатність NSE чинити антиалергічну та протизапальну дію шляхом модуляції вмісту медіаторів запалення (гістаміну, прозапальних цитокінів, оксиду азоту) і запобігання дисбалансу в системі прооксиданти/антиоксиданти в організмі. Результати коригуючої дії NSE на біохімічні процеси за алергічних реакцій та неспецифічного запалення можуть бути застосовані для розробки фармакологічного препарату

нового покоління для пригнічення реакцій гіперчутливості негайного та уповільненого типу та лікування опікової травми.

Особистий внесок здобувача. Головна ідея та задачі дослідження були сформульовані разом із науковим керівником — членом-кореспондентом НАН та АМН України проф. Гулою Н.М. З нею разом був проведений аналіз власних експериментальних результатів, їх узагальнення та формулювання основних положень і висновків роботи. Автором самостійно проведений аналіз літературних джерел за темою дисертації, виконана більша частина експериментальних досліджень. Інтерпретацію, статистичний аналіз та графічне представлення одержаних даних зроблено автором особисто. Дослідження на моделях проведено з консультативною та практичною допомогою д.мед. н., проф. Чумака А. А., к. б. н. Мегедь О. Ф. та м. н. с. Кіндрук Н. Л. Визначення вмісту гістаміну у органах морської свинки за анафілактичного шоку проведено разом з к.б.н. Мегедь О.Ф. Визначення активності індубельної та конститутивної NO-синтази у печінці щурів за опіку проведено разом з к. б. н. Косяковою Г. В. Визначення активностей супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази проведено разом з к.б.н. Горідько Т. М. Порівняльний морфологічний аналіз зон термічного опіку шкіри щурів виконано в лабораторії патоморфології Національного інституту експериментальної хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова (зав. лабораторії — д. мед. н., проф. Гомоляко І. В.). Всі розділи дисертації написані автором самостійно.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, викладених в дисертації, висвітлено на таких наукових конференціях: 1) IX Український біохімічний з'їзд (Харків, Україна, 2006 р.); 2) Республіканська наукова конференція «Молекулярная медицина и биохимическая фармакология» (Гродно, Білорусь, 2007 р.); 3) 9-й з'їзд Всеукраїнського лікарського товариства (Вінниця, Україна, 2007р.); 4) XII конгрес Світової федерації українських лікарських товариств (Івано-Франківськ, Україна, 2008р.); 5) III Національний Астма-Конгрес (Київ, Україна, 2009 р.); 6) 7-а Парнасівська конференція (Ялта, Україна, 2009 р.); 7) X Український біохімічний з'їзд (Одеса, Україна, 2010); 8) IV Національний Астма-Конгрес (Київ, Україна, 2010 р.); 9) Загальноінститутські семінари та засідання Вченої Ради ІБХ НАНУ, 2005 — 2010 рр. Експериментальні результати неодноразово доповідались та обговорювались на наукових семінарах відділу біохімії ліпідів ІБХ НАНУ, 2004 — 2010 рр.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 4 статті – 2 статті в «Українському біохімічному журналі», 1 стаття в «Биомедицинской химии» (Москва, Росія), 1 стаття у «Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B Biomedical Chemistry» та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 160 сторінках друкованого тексту і складається з таких розділів: «Вступ», «Огляд літератури» (складається з 2 розділів, 6 підрозділів), «Експериментальна частина» (підрозділи — «Експериментальні моделі досліджень» та «Матеріали та методи дослідження»), «Результати та їх обговорення», «Заклучення», «Висновки», «Перелік цитованої літератури», який містить 312 посилань. Робота містить 29 рисунків та 2 таблиці.

Огляд літератури

Огляд літератури складається із двох розділів. Перший розділ присвячено характеристиці та біологічній дії насичених і ненасичених NAEs. У другому охарактеризовано біохімічні процеси, що відбуваються в організмі ссавців за реакцій гіперчутливості негайного, уповільненого типів та при неспецифічному запаленні за термічного опіку шкіри.

Методи дослідження

Експериментальні моделі досліджень. 1. Модель анафілактичного шоку.

Самці морських свинок з масою тіла 250 — 300 г були сенсibilізовані одноразовим підшкірним введенням 0,2 мл сироватки коней (виробництва ЗАТ "Біолік", Україна) у праву пахову ділянку. Після цього тварин поділили на три групи: сенсibilізований контроль (15 тварин) та групи, що отримували per os суспензію NSE у воді щоденно протягом двох тижнів: одна група отримувала 0,65 мг/кг (10 тварин,) інша — 65 мг/кг (22 тварини). Через 2 тижні після сенсibilізації у тварин провокували анафілаксію шляхом введення 1 мл кінської сироватки у печеристе тіло. Алергічну реакцію оцінювали за часом розвитку диспное, судом та смерті. Морських свинок, що виживали понад 20 хвилин, та інтактних (11 тварин) забивали шляхом повітряної емболії, а загиблих в стані анафілактичного шоку негайно розтинали. Для біохімічних досліджень забирали серце, легені, печінку, селезінку та нирки, які промивали у холодному фізіологічному розчині і одразу ж вміщували у рідкий азот.

2. Реакція гіперчутливості уповільненого типу. Статевозрілі безпородні миші масою 15-20 грамів були поділені на 5 груп. Крім першої групи — інтактних тварин (n=13), всі інші були сенсibilізовані ДНХБ шляхом нанесення однієї краплі 2 % розчину ДНХБ в ацетоні на шкіру черевця миші. Друга група сенсibilізованих мишей була контрольною (n=13). Тваринам 3-ї — 5-ї груп вводили NSE в дозах 10 (n=14), 25 (n=14) та 50 (n=14) мг/кг маси тіла перорально щодня, починаючи від дня сенсibilізації до нанесення провокуючої дози ДНХБ. Через 8 діб всі тварини, крім інтактних, отримували провокуючу дозу ДНХБ (по 1 краплі 0,5 % розчину ДНХБ на кожен бік правого вуха). Реакцію оцінювали через 24 години за процентом збільшення маси дослідного правого вуха в порівнянні з інтактним лівим.

3. Модель термічного опіку шкіри. Досліди по вивченню дії NSE за неспецифічного запалення, викликаного термічним опіком шкіри, проводили на білих безпородних щурах-самцях з масою тіла 250 — 300 г. Опікову рану викликали під загальним нембуталовим наркозом шляхом прикладання на депільовану шкіру спини протягом 15 с нагрітого до температури 100 °С металевого циліндра, площа основи якого дорівнювала 12,56 см². Дослідження впливу NSE на стан системи оксиду азоту, антиоксидантної системи та вміст вільних АК в організмі щурів за опіку проводилась на щурах-самцях, розподілених на 6 експериментальних груп. В першій групі щури лишалися інтактними (n=12). Тварини другої групи (n=12) отримували щодня per os суспензію NSE в дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів. У щурів 3 — 6-ї груп викликали дозований опік III ступеня способом, що описаний вище. Тварини третьої групи з опіками були контрольними (не одержували лікування) (n=12). Щурам четвертої групи (n=12) щодня вводили per os суспензію NSE в дозі 10 мг/кг. Тваринам п'ятої групи місце опіку щоденно змащували

суспензією NSE у концентрації 10 мг/мл (n=12), а щурам 6-ї групи (n=10) вводили NSE per os в дозі 10 мг/кг, а також змащували опікову рану суспензією NSE, що мала концентрацію 10 мг/мл. Лікування тривало 7 днів. На 8-й день всіх тварин декапітували під нембуталовим наркозом, відбирали кров, печінку і селезінку. До крові додавали 10 % розчин цитрату натрію (5:1) і розділяли на плазму та еритроцити центрифугуванням при 1500g, 15 хв при температурі 4 °С. Еритроцити тричі відмивали від залишків плазми фізіологічним розчином шляхом центрифугування протягом 15 хв, 1500g при 4 °С. З печінки та селезінки на холоді готували 10 % гомогенати у фізіологічному розчині. *Дослідження впливу NSE на рівень цитокінів TNF α , IL-6 та IL-1 β в крові тварин за опіку* було проведено на 4 групах щурів-самців. 1 група — інтактні тварини (n=5); 2-га — інтактні щури, що отримували суспензію NSE per os в дозі 10 мг/кг маси тіла щоденно протягом 12 діб (n=5). 3 група — контрольна (n=5) з експериментальною опіковою раною. Четверта група — щури з опіком (n=5), що отримували суспензію NSE per os в дозі 10 мг/кг маси тіла щоденно протягом 12 діб.

Біохімічні методи. *Вміст гістаміну* в гомогенатах досліджуваних тканин визначали за реакцією з ортофталевим альдегідом [Прошина Л. Я., 1983]. *Для визначення вмісту нітрит-аніону* використовували реакцію Гріса, яка полягає в утворенні забарвленого комплексу рожевого кольору солі діазонію, що утворюється при взаємодії NO₂⁻ з сульфаніламідом та N(1-нафтил)-етилендіаміном у кислому середовищі, метод Грін [Green L.C. et al., 1982]. *Сумарну активність NO-синтаз* в гомогенатах серця морських свинок та печінки щурів визначали за кількістю утвореного після інкубації нітрит-аніону (NO₂⁻), який визначали вищевказаним методом Гріна. Інкубаційна суміш, об'ємом 1 мл, містила 50 мМ KH₂PO₄-NaOH буфер (pH 7,0), 1 мМ MgCl₂, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ NADPH, 2,2 мМ L-аргініну та 0,2 мл проби, що містила 5-8 мг протеїну для серцевої тканини та 5-10 мг для печінки. Проби інкубували при 37 °С протягом 60 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл 35 % розчину сульфосаліцилової кислоти. У контрольні проби сульфосаліцилову кислоту додавали перед інкубацією. Після центрифугування за 3000 g протягом 15 хв у супернатантах визначали вміст нітрит-аніону. Для визначення активності iNOS до складу інкубаційної суміші замість CaCl₂ для зв'язування ендogenous Ca²⁺ додавали EGTA до кінцевої концентрації 4 мМ. Активність cNOS розраховували як різницю активностей сумарної NOS та iNOS. *Інтенсивність процесів пероксидного окислення протеїнів (ПОП)* оцінювали за вмістом 2,4-динітрофенілгідразонів (2,4-ДНФГ) — стабільних продуктів, що утворюються в результаті реакції взаємодії карбонільних груп окислених амінокислотних залишків протеїнів з 2,4-динітрофенілгідразином [Oliver C. N., 1987]. *Визначення інтенсивності процесів пероксидного окислення ліпідів* проводили за накопиченням кінцевих продуктів ПОЛ, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реагуючі продукти), за методом Ю. А. Владимірова та А. І. Арчакова [Владиміров Ю.А. и Арчаков А.И., 1972] з деякою модифікацією [Мельничук С. Д. та ін., 1988]. *Активність каталази* [КФ 1.11.1.6] визначали за швидкістю розпаду пероксиду водню за методом Корольок [Корольок М. Л. и др., 1988]. *Активність супероксиддисмутази (СОД)* [КФ 1.15.1.1] в гомогенатах тканин і плазмі крові визначали за методом, що ґрунтується

на відновленні нітросинього тетразолію супероксидними радикалами, які утворюються в реакції між феназинметасульфатом і NAD·H [Чевари С., 1991]. Утворення нітроформазау, продукту відновлення нітротетразолію, блокується СОД. Отже, за кількістю нітроформазау в пробі можна оцінити активність СОД.

Активність глутатіонпероксидази (ГП) [КФ 1.11.1.9] визначали за накопиченням у середовищі інкубації окисленого глутатіону [Переслегина І.А., 1989]. Для визначення вмісту цитокінів TNF α , IL-6 та IL-1 β в сироватці крові щурів використовували набір реактивів для твердофазного імуноензимного аналізу (ELISA) фірми Diaclone, Франція. Вимірювання проводили на планшетному аналізаторі STAT FAX 2100. Кількість вільних амінокислот (АК) у плазмі крові й гомогенаті печінки щурів після преципітації протеїнів сульфосаліциловою кислотою [Kedenburg С. Р., 1971] визначали на автоматичному аналізаторі амінокислот Т-339 (виробництво «Microtehnо», Прага). Дослідження морфологічних змін у зонах термічного ушкодження шкіри щурів проводили в забарвлених гематоксилін-еозином препаратах, виготовлених загальноприйнятим методом з блоків, фіксованих в 10 % нейтральному формаліні. Вміст протеїну визначали загальноновживаним методом Бредфорд [Bradford М. М., 1976]. Експериментальні дані було оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив NSE на перебіг анафілактичного шоку у морських свинок

З рис.1 видно, що NSE сприяє виживанню морських свинок за анафілактичного шоку. Найкращий ефект спостерігали, застосовуючи NSE в дозі 65 мг/кг маси тіла: близько 72 % морських свинок (16 з 22) вижили після анафілаксії.

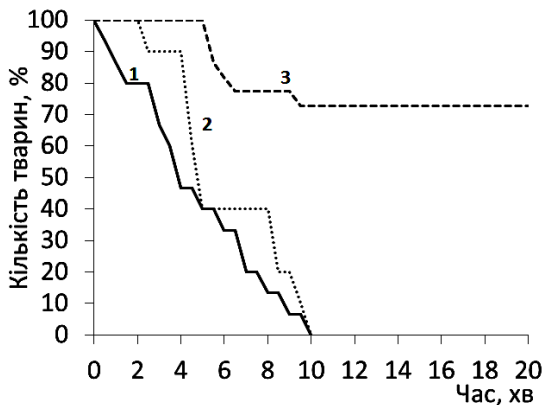


Рис. 1. Вплив NSE на тривалість життя морських свинок за анафілактичного шоку (% тварин від загальної кількості в групі).
 1 — контрольні тварини (стан анафілактичного шоку); 2 — попереднє введення NSE в дозі 0,65 мг/кг протягом 14 днів до провокації анафілактичного шоку; 3 — попереднє введення NSE в дозі 65 мг/кг протягом 14 днів до провокації анафілактичного шоку.

Вплив NSE на вміст гістаміну і стан системи оксиду азоту за анафілаксії

Анафілактичний шок — результат реакції антиген-антитіло, що супроводжується дегрануляцією ефекторних клітин — базофілів й мастоцитів. Дегрануляція спричиняє стрімке вивільнення біологічно активних сполук, серед яких важливу роль відіграють гістамін та оксид азоту. Ці медіатори впливають на проникність капілярів, артеріальний тиск, скоротливість гладкої мускулатури, частоту серцевих скорочень. В умовах нашого експерименту (табл. 1) у серці морських свинок контрольної групи за анафілактичного шоку вміст гістаміну й NO₂⁻

вірогідно збільшувався в порівнянні з таким у серці інтактних тварин, що узгоджується з літературними даними [Costa V. et al., 2002]. За умов попереднього введення NSE протягом 14 днів до провокації анафілактичного шоку вміст гістаміну й NO_2^- в серці морських свинок, незалежно від дози, був на рівні інтактних тварин.

Відзначені нами особливості зміни вмісту NO_2^- у серці морських свинок за анафілаксії й при введенні NSE, очевидно, були обумовлені його впливом на активність NO-синтаз. Як видно з даних табл. 1, активність обох ізоформ NO-синтаз за анафілаксії збільшена. Введення тваринам NSE до провокації анафілактичного шоку перешкоджало підвищенню активності обох ізоформ ензиму, однак відмінність статистично достовірна для дози 65 мг/кг.

Здатність деяких представників ненасичених NAE інгібувати індукцибельну NO-синтазу (iNOS) і активувати конститутивну NO-синтазу (cNOS) виявлена в дослідженнях механізмів їх гіпотензивної [Molina-Holgado F. et al., 2002] і проти-запальної дії [Stefano G. et al., 2003]. З табл.1 видно, що в серці морських свинок при анафілаксії гіперпродукція NO обумовлена активацією cNOS (вміст NO_2^- в порівнянні з інтактними тваринами збільшився на $94,96 \pm 1,02$, а у випадку iNOS – лише на $7,71 \pm 0,57$ пмоль·(хв·мг протеїну)⁻¹).

Введення тваринам NSE у дозі 65 мг/кг запобігало надмірній активації cNOS, у результаті чого вміст оксиду азоту зберігався практично на рівні норми (табл. 1). Це, у свою чергу, гальмувало розвиток анафілактичного шоку й сприяло виживанню тварин.

Таблиця 1

Вплив NSE на вміст гістаміну, NO_2^- та на активність NO-синтаз в серці морських свинок ($M \pm m$)

Параметр	Групи тварин			
	Інтактні (n=11)	Анафілаксія (контроль) (n=15)	NSE 0,65 мг/кг + анафілаксія (n=10)	NSE 65 мг/кг + анафілаксія (n=22)
Вміст гістаміну, нмоль/г тканини	1,80±0,16	2,90±0,34*	1,40±0,35#	2,03±0,18#
Вміст NO_2^- , пмоль/мг протеїну	318,12±28,02	446,69±39,36*	342,12±19,11#	343,22±19,37#
Активність cNOS, вміст NO_2^- , пмоль·(хв·мг протеїну) ⁻¹	46,35±4,50	140,31±6,26*	117,28±16,20*#	94,23±6,31*#
Активність iNOS, вміст NO_2^- , пмоль·(хв·мг протеїну) ⁻¹	0,5±0,12	8,21±1,12*	7,66±0,65*	5,21±0,43*#

* — зміни порівняно з інтактними вірогідні, $P < 0,05$; # — зміни порівняно з анафілаксією вірогідні, $P < 0,05$.

Як і у серці, за анафілаксії в тканинах інших досліджених нами органів — нирок та селезінки рівень гістаміну був достовірно вищий, ніж у інтактних тварин, а NSE запобігав цим змінам. В тканинах легень та печінки за анафілактичного шоку, навпаки, відбувалось достовірне зниження рівня гістаміну, а за дії NSE рівень

гістаміну коливався в межах його вмісту в інтактних тваринах. В тканинах легень і печінки за умов анафілактичного шоку вміст нітрит-аніону був у 3,88 та 1,71 рази нижчий, тоді як в серці і селезінці — достовірно вищий (у 1,40 і 1,56 рази відповідно) у порівнянні з таким у відповідних органах інтактних тварин. За введення NSE рівень NO_2^- в усіх органах морських свинок за анафілактичного шоку залишався на рівні інтактних тварин. В нирках достовірних змін вмісту нітрит-аніону за анафілаксії не відбувалось.

Вплив N-стеароїлетаноламіну на процеси пероксидного окислення ліпідів та на активність ензимів антиоксидантної системи за анафілаксії

Надмірна кількість оксиду азоту, що утворюється за анафілаксії, залучається в каскад вільнорадикальних реакцій. Взаємодія NO із супероксид-аніоном веде до утворення високо реакційно здатної сполуки – пероксинітриту, який ушкоджує різні клітинні системи. Відомо, що інтенсифікація вільнорадикального окиснення ліпідів і нагромадження токсичних продуктів ПОЛ при розвитку анафілактичного шоку веде до ушкодження різних органів (передусім серця й легень). Вивчення біологічних ефектів NAEs переконливо показало, що ці сполуки здатні знижувати інтенсивність ліпідної пероксидації, модулюючи ліпідний склад мембрани клітин [Гулая Н.М. и др., 1997; Gulaya N.M. et al., 1998]. Нами встановлено (табл. 2), що в серці морських свинок, що одержували NSE у дозі 65 мг/кг до провокації анафілактичного шоку, вміст ТБК-реагуючих продуктів за анафілаксії не змінювався – був на рівні інтактних тварин. Введення NSE у дозі 65 мг/кг протягом 14 днів до розвитку анафілаксії запобігає зниженню активності ензимів антиоксидантного захисту – каталази, ГП й СОД, що спостерігається у тварин контрольної групи (табл. 2).

В легенях та печінці NSE в дозі 65 мг/кг маси тіла також перешкодив підвищенню вмісту ТБК-реагуючих продуктів. В нирках та селезінці за анафілактичного шоку й за дії NSE достовірних змін вмісту ТБК-реагуючих продуктів не відбувалось. NSE за анафілаксії також перешкодив зниженню активності ГП й каталази в легенях, печінці й нирках і підвищенню активності ГП в селезінці. Також під дією NSE не відбувалось зниження активності СОД у легенях. В печінці морських свинок за анафілактичного шоку відбувалося достовірне підвищення активності СОД (з $150,11 \pm 10,08$ до $200,18 \pm 5,04$ од·(хв·мг протеїну)⁻¹), що, на нашу думку, має компенсаторний характер. За дії NSE під час анафілактичного шоку активність СОД в печінці ще підвищувалася і становила $250,12 \pm 10,09$ од·(хв·мг протеїну)⁻¹. В селезінці і нирках тварин всіх груп достовірних змін активності СОД не відбувалось.

Таким чином, нами вперше показана здатність NSE пригнічувати системну реакцію анафілаксії в морських свинок і сприяти їхньому виживанню. Це обумовлене здатністю NSE перешкоджати надлишковій генерації медіаторів анафілаксії – гістаміну й оксиду азоту, а також усувати дисбаланс між нагромадженням продуктів ПОЛ і активністю антиоксидантних ензимів в організмі морських свинок за анафілактичного шоку.

Таблиця 2

Вплив NSE на вміст ТБК-реагуючих продуктів та на активність антиоксидантних ензимів в серці морських свинок за анафілактичного шоку ($M \pm m$)

Параметр	Групи тварин			
	Інтактні (n=11)	Анафілаксія (контроль) (n=15)	NSE 0,65 мг/кг + анафілаксія (n=10)	NSE 65 мг/кг + анафілаксія (n=22)
Вміст ТБК-реагуючих продуктів, нмоль/г тканини	48,14±2,71	62,58±3,42*	54,66±6,71	43,02±3,34#
Активність ГП, вміст окисленого глутатіону, нмоль·(хв·мг протеїну) ⁻¹	647,25±55,19	353,75±33,09*	417,38±27,38*	598,62±59,21#
Активність каталази, розкладений H ₂ O ₂ , мкмоль·(хв·мг протеїну) ⁻¹	20,36±1,46	11,49±1,22*	12,37±0,73*	19,61±2,32#
Активність СОД, од·(хв·мг протеїну) ⁻¹	342,11±41,33	149,18±21,82*	196,29±32,41*	279,7±54,08#

* — зміни порівняно з інтактними вірогідні, $P < 0,05$; # — зміни порівняно з анафілаксією вірогідні, $P < 0,05$.

Вплив NSE на інтенсивність реакції гіперчутливості уповільненого типу (РГУТ).

З рис. 2 видно, що введення NSE призводить до гальмування розвитку РГУТ. Вірогідне пригнічення РГУТ у мишей спостерігалось за умов введення NSE у всіх застосованих дозах та максимально (у 10 разів) — в дозі 50 мг/кг маси тіла.

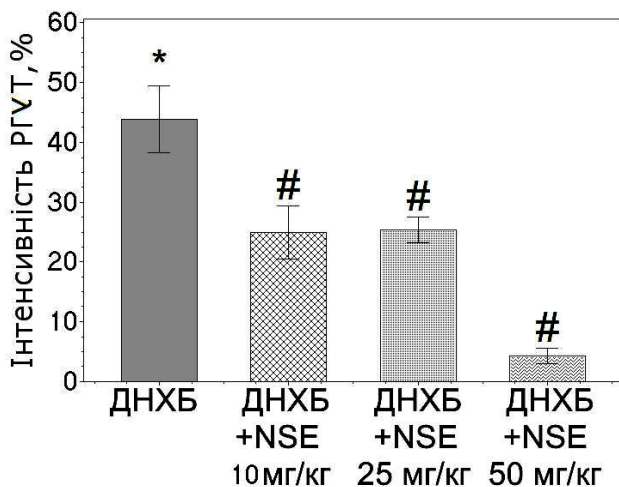


Рис. 2. Вплив NSE на інтенсивність прояву РГУТ у мишей.

* — різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно до значення у інтактних тварин
— різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно до значення у контрольних тварин (ДНХБ)

Вплив N-стеароїлетаноламіну на вміст нітрит-аніону та на ряд показників, що характеризують стан антиоксидантної системи мишей за РГУТ. Відомо, що РГУТ як на мікробні агенти, так і на хімічні, такі як ДНХБ, супроводжується активацією макрофагів гамма-інтерфероном та фактором некрозу пухлин, що діють синергічно. TNF α запускає продукцію NO, а IFN γ активує цей процес. Разом з прозапальними цитокінами і хемокінами утворений NO сприяє міграції ефекторних клітин (Т-клітин, макрофагів, нейтрофілів) до місця запалення. Оксид азоту, як відомо, контролює не тільки системний тиск крові, але також і місцевий кровоплин в периферичних органах, таких як шкіра. NO-опосередкована вазодилатація сприяє трансендотеліальній міграції клітин до місця запалення [Roychowdhury S., Svensson C. K., 2005]. Також алергічні реакції супроводжуються активацією процесів вільнорадикального окислення ліпідів та протеїнів, що призводить до пошкодження мембран імунокомпетентних клітин та зниження неспецифічної резистентності організму [Burton G. J. et al., 2011].

З табл. 3 видно, що в плазмі крові мишей за РГУТ NSE перешкоджає підвищенню вмісту як стабільного метаболіту оксиду азоту — нітрит-аніону, так і ТБК-реагуючих продуктів і продуктів ПОП (2,4-ДНФГ). За умов введення NSE не відбувалось зниження активності каталази та підвищення активності ГП за РГУТ. В інших органах і тканинах – тимусі, еритроцитах та селезінці за умов введення NSE змін у цих показниках не спостерігалось. Найвищий ефект NSE чинив за умов введення у дозі 50 мг/кг маси тіла.

Отже, нашими дослідженнями вперше встановлено, що NSE за контактної гіперчутливості на динітрохлорбензол у мишей пригнічує прояв алергічної реакції, перешкоджаючи змінам вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту — нітрит-аніону, накопиченню продуктів пероксидного окислення ліпідів та протеїнів, а також модулюючи активність антиоксидантних ензимів у плазмі, тимусі та селезінці тварин на початкових етапах розвитку запального процесу.

Вплив NSE на процес загоєння опікової рани. Вже наступного дня опікова рана у нелікованих тварин мала вигляд суцільного пухиря з рідиною, тоді як рани, які змащували NSE, були покриті струпом і їх загоєння відбувалося швидше в порівнянні з раною у контрольних тварин. Порівняльне дослідження морфологічних змін у зонах термічного ушкодження шкіри показало, що за умов введення NSE виявляється більш слабка запальна реакція, більш виражені ознаки фібротизації ушкодженої поверхні, слабша судинна реакція. Дія NSE проявляється впливом на швидкість проходження стадій запалення й загоєння. NSE у щурів з термічним опіком шкіри суттєво прискорює загоєння опікової рани як за введення per os в дозі 10 мг/кг маси тіла, так і за змащування опікової рани суспензією концентрації 10 мг/мл.

Таблиця 3

Вплив NSE на вміст NO_2^- , ТБК-реагуючих продуктів, 2,4-динітрофенілгідрозонів, та на активність каталази й глутатіонпероксидази в плазмі крові мишей ($M \pm m$; $n=13-14$)

Групи тварин	Вміст NO_2^- , $\mu\text{моль/мл}$	Вміст ТБК-реагуючих продуктів, нмоль/мл	Вміст 2,4-ДФГ, нмоль/мл	Активність каталази, кількість розкладеного H_2O_2 , $\text{мкмоль} \cdot (\text{хв} \cdot \text{мл})^{-1}$	Активність ГП, окислений глутатіон, $\text{нмоль} \cdot (\text{хв} \cdot \text{мл})^{-1}$
Інтактні	318,67±17,48	31,46±3,65	21,98±3,08	11,45±1,18	21,87±0,99
ДНХБ	471,89±20,86*	125,90±12,09*	31,59±0,56*	6,18±0,65*	30,20±2,55*
ДНХБ +NSE 10 мг/кг	386,70±19,95#	57,85±21,31#	10,50±2,1*#	11,20±0,31#	31,01±3,87*
ДНХБ +NSE 25 мг/кг	295,56±28,76#	94,24±2,97#	12,88±0,5*#	15,38±2,09#	21,52±1,27#
ДНХБ +NSE 50 мг/кг	298,52±22,77#	55,82±8,30#	9,10±0,7*#	14,90±0,82#	15,79±3,93#

Примітки: 1. * — різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно до значення у інтактних тварин. 2. # — різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно до значення у контрольних тварин (ДНХБ).

Вплив NSE на стан системи оксиду азоту та антиоксидантної системи організму щурів за опіку. Опікова травма супроводжується не тільки первинним ушкодженням шкіри, але й метаболічними порушеннями в усьому організмі. Опік супроводжується активацією утворення деструктивних факторів — вільних радикалів кисню та оксиду азоту та посиленою продукцією прозапальних цитокінів; він зумовлює імунологічну перебудову організму, що характеризується зростаючою сенсibiliзацією мікробними і тканинними антигенами з включенням Т-опосередкованої і Т-незалежної імунної відповіді, формується так званий вторинний імунодефіцитний стан [Григорьева Т. Г., 2002]. За великої опікової травми відбувається інтоксикація організму токсинами як екзогенного, так і ендogenous походження. Розвитку інтоксикації сприяє зниження знешкоджуючої функції печінки. Цей стан супроводжується експресією в печінці гена iNOS, в результаті чого генерується підвищена кількість NO. Наслідком реакції NO з вільними радикалами кисню є утворення пероксинітриту, що проявляє токсичну дію на клітини печінки. Вплив NSE на активність iNOS та cNOS у печінці щурів за опіку показано на рис. 3.

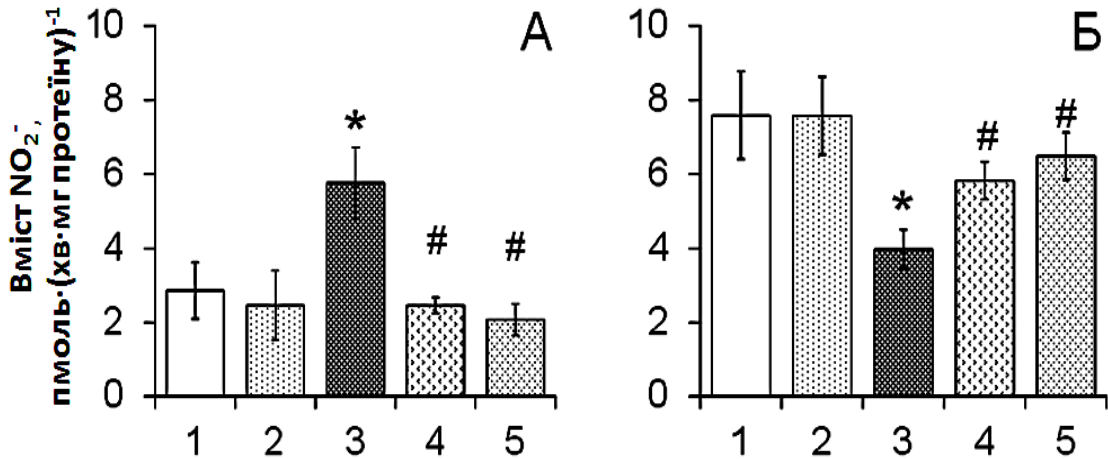


Рис. 3. Вплив NSE на активність iNOS (А) та cNOS (Б) в печінці щурів.

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 NSE в дозі 10 мг/кг маси тіла per os; 5—тварини з опіком, яким опікову рану змащували суспензією NSE концентрації 10 мг/мл.

* — різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно до значення в інтактних тварин.

— різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно до значення за опіку

З рис. 3 видно, що у щурів з опіком за умов застосування NSE як per os в дозі 10 мг/кг, так і для змащування опіку суспензією з концентрацією 10 мг/кг, активність як iNOS, так і cNOS залишалася на рівні інтактних тварин.

За опіку в печінці (табл. 4), у плазмі крові та еритроцитах (дані в авторефераті не наведено) спостерігалось вірогідне зростання, а в селезінці — зменшення вмісту NO₂⁻. Це свідчить про порушення регуляції продукції оксиду азоту NO-синтазами за опіку, що описано в літературі [Rawlingson A., 2003; Hosnuter M., 2004] і асоціюється з ушкодженням багатьох органів. Введення щурам з опіковою травмою водної суспензії NSE запобігало змінам рівня NO₂⁻ в печінці (табл. 4). Водночас введення суспензії NSE per os інтактним тваринам не впливає на всі досліджені показники. Цей факт, на нашу думку, є ще одним свідченням адаптогенних властивостей NAEs, які проявляють свої біологічні ефекти тільки за умов певних патологічних процесів.

Дисбаланс між радикалгенеруючою та антиоксидантною системою організму за опіку призводить до накопичення в органах і клітинах продуктів пероксидного окислення ліпідів [Norton J.W., 2003]. Активація процесів ПОЛ пов'язана з трьома патофізіологічними факторами: стрес-реакцією, ішемічним/гіпоксичним станом та реакцією запалення [Negre-Salvayre A., et al., 2010]. Ці фактори, що індукують ПОЛ, характерні для стану після опікової травми. За умов нашого експерименту у щурів з опіком на 8-му добу в печінці (табл. 4), еритроцитах та селезінці теж спостерігається підвищення вмісту продуктів ПОЛ (дані в авторефераті не наведено), а в плазмі рівні ТБК-реагуючих продуктів не змінюються. В результаті лікування опікової рани за допомогою NSE на 8-му добу відбувалось зменшення інтенсивності утворення продуктів ПОЛ у всіх досліджуваних тканинах. У плазмі, печінці (табл. 4) та селезінці найбільш вірогідне зменшення вмісту ТБК-реагуючих

продуктів спостерігається при застосуванні NSE шляхом змащування опікової рани, а в еритроцитах — за введення суспензії NSE per os.

Таблиця 4

Вплив NSE на вміст NO_2^- , ТБК-реагуючих продуктів та на активність каталази та глутатіонпероксидази в печінці щурів ($M \pm m$; $n=13-14$)

Групи тварин	Вміст NO_2^- , $\frac{\text{нмоль}}{\text{мг протеїну}}$	Вміст ТБК- реагуючих продуктів, $\frac{\text{нмоль}}{\text{г тканини}}$	Активність каталази, кількість розкладеного H_2O_2 , $\frac{\text{нмоль}}{\text{хв} \cdot \text{мг протеїну}}$	Активність ГП, вміст окисленого глутатіону, $\frac{\text{нмоль}}{\text{хв} \cdot \text{мг протеїну}}$
Інтактні	70,93±12,56	53,08±2,68	2730,44±210,35	77,78±7,70
Інтактні +NSE 10 мг/кг per os	55,32±4,35	49,02±3,59	2713,66±225,96	72,02±1,26
Опік	114,52±9,48*	78,68±5,75*	3483,73±127,89*	59,72±3,20*
Опік +NSE 10 мг/мл (змащування опіку)	103,73±10,72*	49,19±2,62#	2891,02±172,05#	74,10±7,36#
Опік +NSE 10 мг/кг per os	65,97±10,85#	63,34±3,10*#	2803,21±143,49#	75,61±4,77#
Опік +NSE 10 мг/мл (змащування опіку) +NSE 10 мг/кг per os	65,11±11,49#	63,99±4,37*	2758,77±118,46#	80,21±4,65#

Примітки: 1. * — різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно до значення у інтактних тварин 2. # — різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно до значення за опіку

Відомо, що в процесі дисмутації супероксидного аніон-радикалу утворюється пероксид водню, який відновлюється до H_2O каталазою та ГП. За умов нашого експерименту при опіку активність каталази достовірно зменшена у плазмі крові (кількість розкладеного H_2O_2 зменшилась з $22,48 \pm 1,11$ до $13,77 \pm 1,58$ нмоль/хв/мг протеїну) та підвищена у печінці (табл. 4) в порівнянні з інтактними тваринами. Введення NSE тваринам з опіком як per os, так і в поєднанні зі змащуванням опікової рани запобігає зниженню активності каталази у плазмі та підвищенню її активності в печінці (табл. 4). В селезінці достовірних змін в активності каталази в усіх групах тварин не спостерігається (дані в авторефераті не наведено). Застосування NSE достовірно запобігає надмірній активації ГП за опіку в плазмі при введенні per os та одночасно зі змащуванням опікової рани. В еритроцитах (дані в авторефераті не наведено) та печінці (табл. 4) NSE гальмує зниження активності ГП при всіх способах застосування, а в селезінці — при змащуванні опікової рани та разом із введенням per os (дані в авторефераті не наведено).

Отже, NSE при неспецифічному запаленні здатен усувати дисбаланс в системі оксиду азоту та прооксиданти/антиоксиданти в організмі щурів, що сприяє загоєнню опікової рани.

Вплив NSE на вміст прозапальних цитокінів в сироватці крові щурів за неспецифічного запалення, викликаного термічним опіком шкіри. Термічна деструкція тканин супроводжується генералізованою активацією мононуклеарів (макрофагів). При цьому відбувається вивільнення і надходження в кровообіг цитокінів, важливих медіаторів запалення. Надмірна активація макрофагів у перші години/добу після опіку, що супроводжується посиленою продукцією прозапальних цитокінів (TNF α , IL-1 β , IL-6 та ін.), належить до основних механізмів регуляції імунітету й підвищення чутливості до сепсису за термічного опіку. Різноманітні цитокіни, зокрема IL-1 β , IL-6 та TNF α , розглядаються як маркери тяжкості опіку, які мають прогностичне значення [Yeh F. L. et al., 1999]. На рис. 4 показано динаміка змін вмісту TNF α (А), IL-6 (Б) та IL-1 β (В) в крові щурів протягом 2 — 13 днів після опіку.

З рис.4 видно, що при неспецифічному запаленні за опіку в щурів відбувається збільшення продукції прозапальних цитокінів TNF α , IL-6 та IL-1 β , рівні яких протягом 2-13 днів залишаються достовірно вищими, ніж в інтактних тварин. Введення NSE per os щурам з опіком в дозі 10 мг/кг забезпечує значне зниження рівнів цих медіаторів запалення. Так, вміст TNF α в крові щурів за дії NSE залишається завжди достовірно нижчим, ніж у контрольних тварин протягом 2-13 днів після опіку (на 9-й день — майже в 2 рази, коли спостерігається найвищий вміст TNF α у щурів з опіком) і навіть нижчим, ніж у інтактних щурів на 2-й та 5-й день досліджу. Зниження вмісту IL-6 за дії NSE відбувається з 5-го дня після опіку, коли концентрація цього цитокіну в щурів з опіком максимальна (у 2,4 рази вища за інтактних тварин, за дії NSE — у 1,25). Введення NSE щурам з опіковою травмою призводить до достовірного зменшення вмісту IL-1 β в крові відносно його значень у контрольних щурів, починаючи вже з 2-го дня після опіку (рис.4, В).

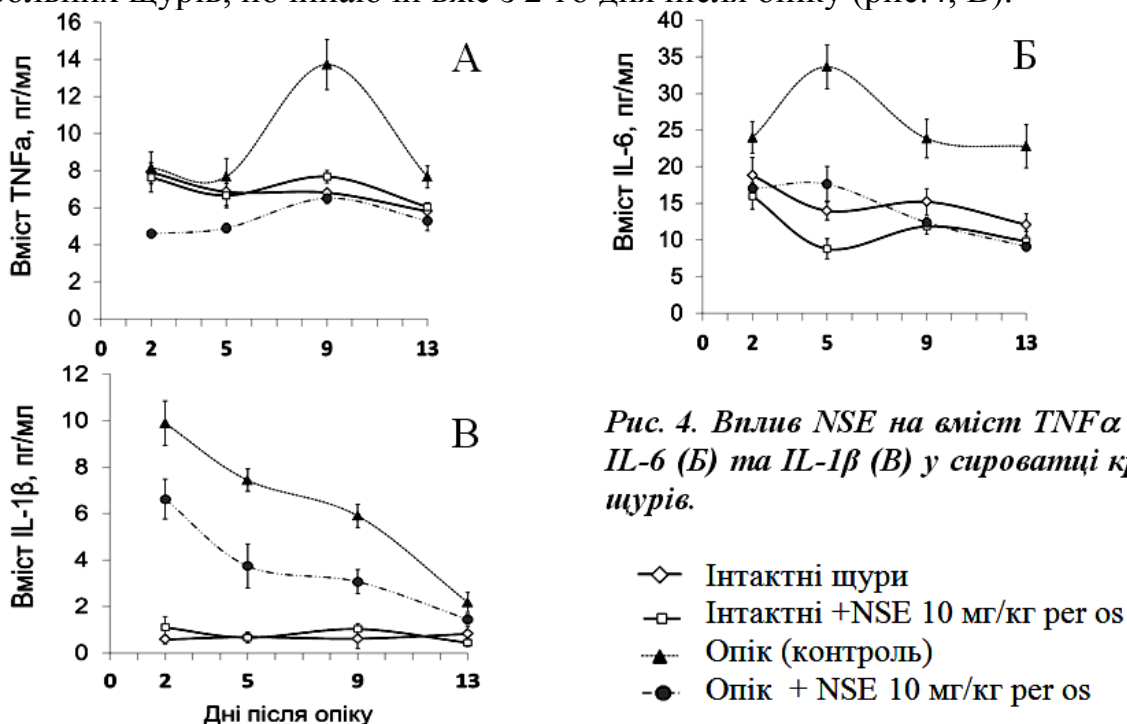


Рис. 4. Вплив NSE на вміст TNF α (А), IL-6 (Б) та IL-1 β (В) у сироватці крові щурів.

- ◇ Інтактні щури
- Інтактні +NSE 10 мг/кг per os
- ▲ Опік (контроль)
- Опік + NSE 10 мг/кг per os

Вплив NSE на вміст вільних амінокислот за експериментального опіку у щурів. Зміни в концентрації вільних амінокислот (АК) є одним з ранніх біохімічних зрушень, які відбуваються в організмі після великого опіку. В літературі описано значні зміни складу АК у плазмі крові пацієнтів при опіках, що супроводжуються запаленням [Wannemacher R. W., 1977; Groves A. C. et al., 1978].

З рис. 5 видно, що за опіку в умовах нашого експерименту сума АК вірогідно знижується у плазмі крові (рис. 5; А, 3) і підвищується у печінці щурів (рис.5; Б, 3), що узгоджується з даними інших дослідників [Stinnett J. D. et al., 1982]. Застосування NSE сприяє тому, що сума АК як у плазмі крові, так і в печінці на 8-й день після опіку в більшості випадків перебуває на рівні інтактних тварин (рис.5; А, Б; 4 — 6). Отже, NSE в усіх застосованих нами способах введення запобігає змінам суми АК у плазмі крові та в печінці щурів. За дії NSE у тварин з опіком не спостерігалось підвищення відношення Phe/Tyr (служить індикатором множинної системної дисфункції органів за різних патологій) та Gly/Val (маркер дефіциту протеїну) в плазмі крові і печінці. Також введення NSE попереджало зниження відношення Fisher ($[(\text{Ile}+\text{Leu}+\text{Val})/(\text{Phe}+\text{Tyr})]$ – показник, що завжди знижується за дисфункції печінки різного генезу) в плазмі крові та печінці щурів з опіком.

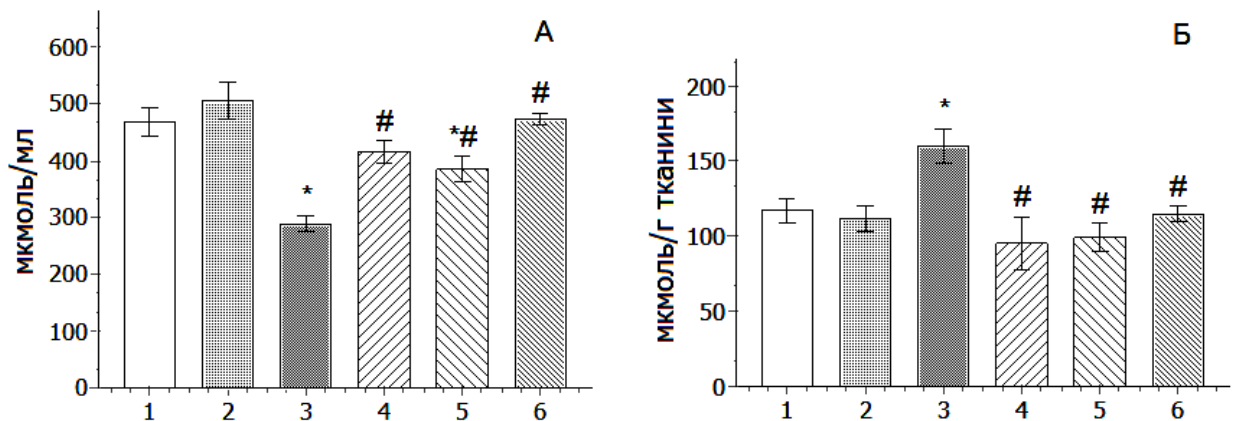


Рис. 5. Вплив NSE на суму вільних амінокислот в плазмі крові (А) та печінці (Б) щурів за експериментального опіку. 1 — інтактні тварини; 2 — щури, що отримували суспензію NSE per os в дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів; 3 — тварини з опіком; 4 — тварини з опіком, що отримували суспензію NSE per os в дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів; 5 — тварини, опікову рану яких змащували суспензією NSE концентрації 10 мг/мл протягом 7 днів; 6 — тварини, опікову рану яких змащували суспензією NSE концентрації 10 мг/мл з одночасним введенням суспензії NSE per os в дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів.

* — різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно значення в інтактних тварин;

— різниця вірогідна ($P < 0,05$) відносно значення за опіку.

Таким чином, NSE здатний інгібувати продукцію прозапальних цитокінів ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6), нормалізувати вміст NO_2^- й активності cNOS та iNOS, а також усувати дисбаланс між процесами ПОЛ та активністю ензимів антиоксидантного захисту (СОД, каталази й ГП) у плазмі, еритроцитах, печінці й селезінці щурів за неспецифічного запалення. Ці результати дозволяють вперше охарактеризувати NSE

як сполуку з адаптогенними і захисними властивостями, яка прискорює процеси загоєння опікової рани і знижує рівень вираженості біохімічних зрушень за опікової хвороби.

Висновки

В результаті проведених досліджень вперше показана здатність насиченого NAE 18:0 N-стеароїлетаноламіну (NSE) впливати на деякі біохімічні процеси, що відбуваються на початкових етапах розвитку алергічних реакцій та неспецифічного запалення у тварин, що лежить в основі його антиалергічної та протизапальної дії. Отримані дані роблять вагомий внесок у розуміння біохімічних механізмів дії NSE і закладають основу для створення принципово нового лікарського засобу для пригнічення алергічних реакцій і запальних процесів.

1. На моделях алергічних реакції негайного (анафілактичний шок), уповільненого (контактна гіперчутливість на гаптен) типів та неспецифічного запалення (термічний опік шкіри), що супроводжуються вивільненням прозапальних медіаторів, порушеннями в системі оксиду азоту та антиоксидантної рівноваги, показана здатність NSE гальмувати ці патологічні процеси.

2. В основі регуляторної дії NSE лежить його вплив на вміст гістаміну, прозапальних цитокінів TNF α , IL-1 β , IL-6, а також модуляція систем оксиду азоту та антиоксидантного захисту організму.

3. Вперше встановлено, що введення сенсibilізованим морським свинкам перорально суспензії NSE в дозі 65 мг/кг протягом двох тижнів до провокації анафілактичного шоку запобігає зростанню рівню гістаміну в серці, нирках та селезінці, нормалізує рівень оксиду азоту (запобігає збільшенню вмісту NO $_2^-$ у серці, селезінці та нирках і зменшенню в печінці та легенях), зменшує підвищену за анафілаксії активність індуцибельної та конститутивної NO-синтази у серці морських свинок, нормалізує вміст ТБК-реагуючих продуктів та активність глутатіонпероксидази, каталази й супероксиддисмутази в тканинах органів-мішеней.

4. Вперше встановлено, що пероральне введення NSE в дозі 10-50 мг/кг мишам, сенсibilізованим динітрохлорбензолом, нормалізує вміст стабільного метаболіту оксиду азоту — нітрит-аніону, продуктів пероксидного окислення ліпідів та протеїнів, а також активність антиоксидантних ензимів в плазмі, тимусі та селезінці тварин.

5. Вперше експериментально доведено, що застосування суспензії NSE перорально в дозі 65 мг/кг та трансдермально (10 мг/мл) прискорює загоєння експериментальної опікової рани в щурів шляхом зниження рівнів прозапальних цитокінів (TNF α , IL-1 β , IL-6), нормалізації стану системи оксиду азоту, усунення дисбалансу між утворенням продуктів пероксидного окислення ліпідів й протеїнів та антиоксидантною системою організму.

6. Вперше встановлено здатність NSE запобігати змінам вмісту вільних амінокислот в організмі щурів під впливом неспецифічного запалення, обумовленого опіковою травмою шкіри.

Список робіт за темою дисертації

1. Імуносупресивні властивості N-стеароїлетаноламіну — стабільної сполуки з канабіміметичною дією / Н. М. Гула, А. А. Чумак, О. Ф. Мегедь, Т. М. Горідько, Н. Л. Кіндрук, А. Г. Бердишев // Укр. біохім. журн. — 2008. — Т. 80, №1. — С.46—47.
2. Протизапальний ефект N-стеароїлетаноламіну на експериментальну опікову травму у 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 // Укр. біохім. журн. — 2009. — Т. 81, №2. — С.107—116.
3. Кардиопротекторный эффект N-стеароилэтанолamina при анафилактическом шоке у морских свинок / Н. М. Гулая, А. Г. Бердышев, А. А. Чумак, О. Ф. Мегедь, Н. Л. Киндрук, Т.Н.Горидько // Биомедицинская химия — 2009. — вып. 6. — С. 743—749.
4. The effect of N-stearoylethanolamine on free amino acid levels in plasma and liver of rats with an experimental burn / A.G. Berdyshev, N. M. Gulaya, A.A. Chumak, N. L. Kindruk // Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B Biomedical Chemistry. — 2011. — V. 5, №1. — P. 44 — 50.
5. Вплив N-стеароїлетаноламіну на інтенсивність алергічної реакції негайного типу / О. Ф. Мегедь, А. А. Чумак, Н. Л. Кіндрук, А. Г. Бердишев, Т. М. Горідько, Н. А. Стогній // Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду (Харків, 24 — 27 жовтня 2006 р.) . — 2006. — Т. 1. — С.149.
6. Влияние N-стеароилэтанолamina на интенсивность аллергических реакций гиперчувствительности замедленного типа и на процесс заживления ожоговой раны / Н. М. Гула, А. А. Чумак, Е. Ф. Мегедь, А. Д. Жуков, Т. Н. Горидько, Н. Л. Киндрук, А. Г. Бердышев, Г. В. Косякова // Молекулярная медицина и биохимическая фармакология. Материалы Республиканской научной конференции, (Гродно, 28-29 июля 2007 г.). — Гродно : Национальная академия наук Беларуси, ГУ НПЦ “Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси” (Гродненский филиал). — 2007. — С. 269 — 271.
7. Вплив N-стеароїлетаноламіну на біохімічні механізми алергічної реакції негайного типу / Н. М. Гула, О. Ф. Мегедь, А. А. Чумак, Н. Л. Кіндрук, А. Г. Бердишев, Т. М. Горідько, Н. А. Стогній // Матеріали ІХ з'їзду ВУЛТ , (Вінниця, 12 травня 2007 р.). Українські медичні вісті. — 2007, — Т. 7, №1 — 2. — С. 279 — 280.
8. Імуносупресивний вплив стабільного канабіміметика N-стеароїлетаноламіну / Н. М. Гула, А. А. Чумак, Т. М. Горідько, Н. Л. Кіндрук, А. Г. Бердишев // XII конгрес Світової федерації українських лікарських товариств, (Івано-Франківськ , 25 — 28 вересня 2008 р.). Тези доповідей. — 2008. — С. 283.
9. Gula N. Endocannabinoid congener N-stearoylethanolamine regulation of inflammatory processes / N. Gula, A. Berdyshev, A. Chumak // Abstract VII Parnas conference, (Yalta, october 3 — 7 2009). Укр. біохім. журн. — 2009. — Т.81, №4 (спец.випуск). — С. 16.
10. N-стеароїлетаноламін — перспективна сполука для створення фармпрепаратів з антиалергійними властивостями / Н. М. Гула, А. А. Чумак,

Н. Л. Кіндрок, А. Г. Бердишев, Т. М. Горідько, Н. А. Стогній // Тези доповідей III Національного Астма- Конгресу (Київ, 6 — 7 жовтня 2009 р.). Астма та алергія. — 2009, №1 — 2. — С. 183 — 184.

11. Протекторні властивості N-стеароїлетаноламіну за експериментального опіку у щурів / А. Г. Бердишев, Н. М. Гула, А. А. Чумак, Н. Л. Кіндрок, О. Д. Жуков // Матеріали X Українського біохімічного з'їзду 13-17 вересня 2010 р., м. Одеса. Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, №4 (додаток 2). — С. 46.

12. Вплив N-стеароїлетаноламіну на процеси пероксидного окислення ліпідів і білків та на активність ферментів антиоксидантної системи за анафілаксії / А. Г. Бердишев, Н. М. Гула, А. А. Чумак, Н. Л. Кіндрок, Т. М. Горідько, Н. А. Стогній // Тези доп. науково-практичної конференції «Сучасні проблеми діагностики та лікування бронхіальної астми» IV Національного Астма-Конгресу (Київ, 8-19 жовтня 2010 р.). Астма та алергія. — 2010. — №1—2. — С. 82—83.

Анотація

Бердишев А. Г. Дія N-стеароїлетаноламіну на ряд біохімічних процесів за гіперчутливості негайного, уповільненого типу та неспецифічного запалення. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2012.

В представленій роботі вперше показана здатність насиченого N-ацил-етаноламіну N-стеароїлетаноламіну (NSE) впливати на ряд біохімічних процесів, що відбуваються на початкових етапах розвитку алергічних реакцій (негайного та уповільненого типів), а також неспецифічного запалення у тварин. Антиалергічний та протизапальний ефект NSE реалізується через модуляцію вмісту гістаміну та пригнічення продукції прозапальних цитокінів TNF α , IL-1 β , IL-6 на самому початку розвитку патологічного процесу. Результати проведених експериментів свідчать, що за дії NSE не відбувається значних змін в системі оксиду азоту, дисбаланс якої спостерігається за всіх досліджуваних патологій і є одним з вирішальних факторів виникнення і посилення патологічних зрушень в організмі. Також NSE перешкоджає виникненню дисбалансу в системі прооксиданти/антиоксиданти, модулюючи активність основних антиоксидантних ензимів — каталази, супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази й гальмуючи утворення продуктів пероксидного окислення ліпідів і протеїнів. Все це блокує подальший розвиток численних патологічних процесів, що спостерігаються за алергічних і запальних реакцій. Зокрема, за дії NSE не відбувається тих змін в складі вільних амінокислот, що спостерігаються у тварин після опікової травми.

Отримані дані дозволяють припустити, що фармакологічні препарати, створені на основі насичених N-ацилетаноламінів, можуть знайти широке застосування для корекції і лікування різноманітних хвороб, які супроводжуються алергічними реакціями та запальними процесами.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, алергічні реакції, запалення, оксид азоту, перекисне окислення ліпідів та протеїнів, антиоксидантна система, цитокіни, вільні амінокислоти.

Аннотация

Бердышев А. Г. Действие N-стеароилэтаноламина на ряд биохимических процессов при гиперчувствительности немедленного, замедленного типа и неспецифического воспаления. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04. – биохимия. Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 2012.

В представленной работе впервые показана способность насыщенного N-ацилэтаноламина N-стеароилэтаноламина (NSE) влиять на ряд биохимических процессов, происходящих на начальных этапах развития аллергических реакций (немедленного и замедленного типов), а также неспецифического воспаления у животных. Антиаллергический и противовоспалительный эффект NSE реализуется через модуляцию содержания гистамина и ингибирование продукции провоспалительных цитокинов $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ на начальных этапах развития патологического процесса. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что при действии NSE не происходит значительных изменений в системе оксида азота, дисбаланс в которой наблюдается при всех исследованных патологических процессах и является одним из решающих факторов возникновения и развития патологических нарушений в организме. Также NSE препятствует возникновению дисбаланса в системе про-/антиоксиданты, модулируя активность основных антиоксидантных ферментов – каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, а также тормозя образование продуктов перекисного окисления липидов и протеинов. Такое действие NSE блокирует дальнейшее развитие многочисленных патологических процессов, которые наблюдаются при аллергических и воспалительных реакциях. В частности, при действии NSE не происходит тех нарушений в содержании свободных аминокислот, которые наблюдаются у животных после ожоговой травмы.

Полученные результаты позволяют предположить, что фармакологические препараты, созданные на основе насыщенных N-ацилэтаноламинов, могут найти широкое применение для коррекции и лечения разнообразных болезней, сопровождающихся аллергическими реакциями и воспалительными процессами.

Ключевые слова: N-стеароилэтаноламин, аллергические реакции, воспаление, оксид азота, перекисное окисление липидов и протеинов, антиоксидантная система, цитокины, свободные аминокислоты.

Summary

Berdyshev A. G. The effects of N-stearoylethanolamine on some biochemical processes under the immediate hypersensitivity, delayed-type hypersensitivity and nonspecific inflammation. – Manuscript.

The thesis for PhD scientific degree in biology by speciality 03.00.04 – biochemistry. O.V. Palladin Institute of Biochemistry of Ukraine NAS, Kyiv, 2012.

The dissertation is devoted to the study of biochemical mechanisms of N-stearoylethanolamine (NSE) influence on the processes of allergic responses of immediate and delayed type (anaphylactic shock in guinea pigs and contact hypersensitivity to 2,4-dinitrochlorobenzene in mice) and non-specific inflammation (experimental burn in rats).

It was found that under anaphylactic shock, NSE prevented the growth of histamine level in the heart, kidneys and spleen. At the same time NSE prevented the decrease of the level of stable metabolite of nitrogen oxide — nitrite-anion in the liver and to a lesser degree in the lungs. NSE also decreased the activity of both inducible and constitutive NO-synthases. NSE normalized the content of TBA-reactive products in the lungs and decreased it in the heart; it diminished the decline of activity of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase. The effects of NSE were dose depended. About 70% of animals which received NSE in a dose 65 mg/kg of body weight had no fatal outcome after the induction of anaphylactic shock. NSE suppressed the delayed type hypersensitivity response and normalized NO_2^- content in the blood plasma of mice but only at the dose of 50 mg/kg of weight. NSE diminished the content of NO in the thymus of sensitized mice.

The biochemical mechanisms of anti-inflammatory effect of NSE were studied on the model of experimental burn in rats. We have demonstrated here for the first time that the endogenous cannabinoid congener, N-stearoylethanolamine, accelerated thermal wound healing in rats. After application of a thermal skin burn (stage III) animals received perorally an aqueous suspension of NSE (10 mg/kg of body weight) during 7 days or they were treated with the aqueous NSE suspension (10 mg/ml) applied onto the burn wound, or the rats received a combined treatment. For the first time it was shown that NSE accelerated the process of burn wound healing by the inhibition of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-6, IL-1 β) production. NSE caused the normalization of the inducible NO synthase and constitutive NO synthase 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. It has been originally demonstrated for the first time, that the treatment of burned rats with NSE prevented the decrease in total amino acids (AA) concentration in blood plasma and the increase in hepatic AA concentration due to modulation of concentrations of glycogenic AA. In burned animals the ratio of plasma and liver homogenate Phe/Tyr and Gly/Val increased while the Fischer ratio ($[\text{Ile}+\text{Leu}+\text{Val}]/[\text{Phe}+\text{Tyr}]$) decreased, and after the treatment with NSE these parameters remained at the level of intact animals. These data demonstrates that NSE possessed adaptogenic properties, and it was involved to the organism response to the burn. This prevented changes of blood plasma and hepatic pools of free AA of NSE-treated rats with the burn wound compared with untreated animals.

Our results suggest that pharmacological preparations based on N-stearoylethanolamine may be widely used for correction and treatment of various pathologies including allergy and burns.

Key word: N-stearoylethanolamine, allergic reactions, inflammation, nitric oxide, lipid peroxidation, protein peroxidation, antioxidant system, cytokines, free amino acids.