

УДК 577.346:577.123.3

ВПЛИВ РИБОКСИНУ НА ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМІВ В ТИМОЦИТАХ ЩУРІВ В УМОВАХ ПРОМЕНЕВОГО УРАЖЕННЯ

В. В. ПОЛЯКОВА, Н. Г. РАКША, Л. П. ДРАГАН, Т. Р. АНДРІЙЧУК

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: litika@ukr.net

Показано, що порушення окислювального гомеостазу в лімфоцитах тимуса щурів в умовах радіаційного впливу у дозах 1,0 та 7,78 Гр пов'язано з накопиченням продуктів пероксидного окислення ліпідів на фоні зниження функціональних можливостей антиоксидантного захисту. Попереднє введення препарату рибоксину сприяло нормалізації балансу в прооксидантно-антиоксидантній системі (в ранні терміни після опромінення) і супроводжувалось зниженням утворення продуктів ліпопероксидації та активацією антиоксидантної ензимної системи лімфоцитів тимуса.

Ключові слова: лімфоцити тимуса, рентгенівське опромінення, прооксидантно-антиоксидантна система, рибоксин.

Дія іонізуючої радіації, що супроводжується утворенням вільних радикалів, ініціацією вільнорадикальних ланцюгових реакцій, сприяє інтенсифікації окислювального метаболізму та накопиченню продуктів вільнорадикальної модифікації клітинних компонентів. Процесам пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) відводиться одне з ключових місць в ініціації внутрішньоклітинних регуляторних механізмів, які визначають можливість виживання або загибелі клітин за дії стресорних чинників, зокрема іонізуючого випромінювання [1]. Ступінь прояву руйнівної дії вільнорадикального окислення у тканинах залежить від потенційних можливостей щодо мобілізації антиоксидантного захисту, порушення функціонування якого на фоні гіперпродукції активних кисневих метаболітів, супроводжується розвитком оксидативного стресу. Посилення процесів окислювальної деструкції з надмірним накопиченням вільнорадикальних продуктів призводить до структурних і метаболічних порушень у клітинах та їхньої загибелі [2, 3].

Оскільки оксидативний стрес супроводжує різні патологічні стани, це зумовлює потребу пошуку засобів, спрямованих на запобігання порушень окисного метаболізму, здатних корегувати процеси його протікання в організмі та окремих тканинах, зокрема лімфоїдних, які відіграють важливу роль у загальному імунному статусі, підтримці гомеостазу в цілому. Особливий інтерес становлять препарати природного походження, що здатні

підвищувати загальну неспецифічну резистентність організму. Для модифікації променевих ефектів ми застосовували інозин (фармакологічний препарат рибоксин) – природний метаболіт, що бере безпосередню участь у синтезі нуклеотидів, коензимів, стимулює енергозабезпечення і синтетичні реакції в клітинах, та сприяє нормалізації обміну речовин при різних патологічних станах [4].

Матеріали і методи

Дослідження проведено на щурах-самцях 3-х місячного віку з масою тіла 150–170 г, що утримувались в стандартних умовах віварію. Експериментальні дослідження проводили згідно Правил Європейської конвенції по захисту ссавців, що використовуються в наукових цілях. Препарат рибоксин у вигляді 2%-го розчину вводили за 15 хв до опромінення внутрішньочеревинно з розрахунку 150 мг препарату на 1 кг маси тварини. Опромінення тварин проводили на рентгенівській установці РУМ-17 у дозах 1,0 та 7,78 Гр за таких умов: фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірнофокусна відстань 50 см, напруга 200 кВ, сила струму 5 мА для 1,0 Гр і 10 мА для 7,78 Гр, потужність доз у повітрі 17,2 та 34 Р/хв відповідно. Тварин декапітували через 30 хв та 3 год після дії променевого чинника. Лімфоцити тимуса виділяли за методом [5]. Інтенсивність процесів вільнорадикального окислення ліпідів оцінювали за накопиченням малонового діальдегіду (МДА), антиокислювальну активність – за активністю ензимів антиокси-

дантного захисту супероксиддисмутази (СОД, 1.15.1.1) [6] і каталази (1.11.1.6) [7]. Активність СОД виражали в умовних одиницях, розраховуючи ступінь інгібування ензимом швидкості реакції відновлення нітросинього тетразолію (НСТ), що оцінювалось по зміні екстинкції гідрозинтетразолію при λ 540 нм. Статистичну обробку проводили використовуючи критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

Показано, що радіація викликає активацію окислювальних процесів, про це свідчить підвищення рівня ТБК-активних продуктів в лімфоїдних клітинах тимуса в умовах опромінення щурів у дозах 1,0 та 7,78 Гр (таблиця). Введення тваринам рибоксину до їхнього опромінення вірогідно знижує вміст МДА – одного із кінцевих продуктів пероксидного окислення ліпідів у порівнянні з контрольною та опроміненою групами тварин (у дозі 1,0 Гр). Використання рибоксину обумовлене спроможністю, встановленою в попередніх дослідженнях, підвищувати життєздатність та метаболічну активність лімфоцитів тимуса опромінених щурів, стабілізувати структуру хроматину, нормалізувати ряд радіаційно-індукованих метаболічних порушень в досліджуваних клітинах [8, 9]. Профілактичне введення рибоксину обумовлювало захист тварин за дії іонізуючої

радіації в широкому діапазоні доз як гострого, так і хронічного опромінення [10, 11]. Реалізація захисного ефекту препарату можлива за рахунок підвищення загальної резистентності організму і визначається здатністю рибоксину впливати на перебіг обмінних процесів, у тому числі і за дії променевого фактора.

Одержані результати по впливу рибоксину на окислювальні процеси в лімфоїдних клітинах тимуса тварин, які зазнали променевого ураження, вказують на те, що введення препарату до опромінення тварин у дозі 7,78 Гр (яка вважається летальною для даного виду тварин) сприяє зниженню кількості продуктів пероксидації ліпідів відносно показника у тварин, яким вводили рибоксин, залишаючи її дещо збільшеною порівняно з контрольними величинами. В подальшому вміст МДА суттєво знижується відносно показників опромінених груп.

Інтенсифікація ліпопероксидації викликає утворення в організмі стану окислативного стресу з накопиченням активних кисневих метаболітів (АКМ) та продуктів окисної модифікації, що є небезпечним для функціонування клітини. Нагромадженню АКМ та розвитку вільнорадикального окислення протистоїть складна багаторівнева система захисту з узгодженою роботою всіх компонентів на рівні попередження утворення радикалів та окис-

Показники прооксидантно-антиоксидантного стану в тимоцитах щурів при опроміненні та на фоні введення рибоксину ($M \pm m$, $n = 6$)

Групи тварин	Вміст ТБК-активних продуктів, нмоль/10 ⁷ кл.	Активність СОД, ум. од.	Активність каталази, мкмоль Н ₂ О ₂ /хв·10 ⁷ кл.
Контроль	0,62 ± 0,05	1,487 ± 0,070	2,888 ± 0,090
Контроль + рибоксин	0,93 ± 0,08*	1,625 ± 0,050*	1,871 ± 0,050*
<i>30 хв після опромінення</i>			
1,0 Гр	0,83 ± 0,09*	1,949 ± 0,160*	0,613 ± 0,020*
1,0 Гр + рибоксин	0,46 ± 0,05***,#	0,974 ± 0,110***,#	2,154 ± 0,070***,#
7,78 Гр	0,76 ± 0,04*	1,113 ± 0,070*	1,232 ± 0,050*
7,78 Гр + рибоксин	0,77 ± 0,02***	1,52 ± 0,14#	2,722 ± 0,080***,#
<i>3 год після опромінення</i>			
1,0 Гр	0,75 ± 0,05*	1,622 ± 0,050*	1,466 ± 0,060*
1,0 Гр + рибоксин	0,53 ± 0,03***,#	1,57 ± 0,08	1,813 ± 0,090***,#
7,78 Гр	1,00 ± 0,04*,#	1,694 ± 0,110*	3,858 ± 0,110*
7,78 Гр + рибоксин	0,64 ± 0,08**	1,636 ± 0,07*	2,237 ± 0,07***,#

Примітка: * достовірно відносно контролю; ** достовірно відносно контролю на фоні введення рибоксину; # достовірно відносно відповідних опромінених груп $P \leq 0,05$

них метаболітів, їхнього знешкодження, обриву вільнорадикальних ланцюгових реакцій та усунення ушкоджень. У цей процес залучається багато регуляторних систем як цілого організму (гормональна та медіаторна ланки), так і внутрішньоклітинні механізми.

Важливою компонентою антиоксидантного захисту клітин є спеціалізовані ензимні системи, зокрема супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіонзалежні пероксидази і трансферази, дія яких направлена на інактивацію O_2^- , H_2O_2 та органічних гідропероксидів.

В умовах експерименту встановлено підвищення активності супероксиддисмутази в тимоцитах щурів через 30 хв після рентгенівського опромінення у дозі 1,0 Гр на 31% порівняно з контрольним показником, що свідчить про залучення ензиматичної системи захисту для підтримання окисно-антиоксидантного гомеостазу у відповідь на посилену генерацію активних форм кисню. За радіаційного впливу у дозі 7,78 Гр активність СОД знижується на 34% (порівняно з контролем) ймовірно за рахунок деструктивних змін ензиму, спричинених надлишковим радіаційним навантаженням. Інактивація супероксиддисмутази може бути обумовлена накопиченням продукту реакції дисмутації O_2^- пероксиду водню, а також сполук, що можуть взаємодіяти з іонами металів в активному центрі ензиму або впливати на ступінь їхньої відновленості [12]. Безпосереднім агентом, що інактивує ензим, є високореакційний гідроксильний радикал, радіаційноспричинена генерація якого може підсилюватися утворенням у реакціях Фентона і Габера-Вейса за умови надлишку супероксиду.

Активність СОД у тимоцитах щурів в умовах променевого ураження у дозах 1,0 та 7,78 Гр встановлена через 3 год після опромінення тварин. Відповідно до результатів, наведених в таблиці, дія радіації у дозі 1,0 Гр викликає зростання супероксиддисмутази активності на 9% порівняно з контролем. У разі опромінення піддослідних тварин у дозі 7,78 Гр спостерігається активація супероксиддисмутази на 14%. Активність СОД прямо пов'язана з інтенсивністю ПОЛ і залежить від накопичення продуктів останнього. З одного боку, АОС активізується як адаптаційно-компенсаторна відповідь внаслідок інтенсифікації пероксидації. З іншого боку, нагромадження токсичних пероксидних продуктів викликає пригнічення активності СОД та інших ензимів антиоксидантного захисту.

Регуляція активності СОД здійснюється всією багатокомпонентною редокс-системою клітини. Інтермедіати окисно-відновного метаболізму (NADPH-залежні редокс-ланцюги мітохондрій, ендоплазматичного ретикулуму), які є генераторами O_2^- , можуть виконувати подвійну роль: активувати синтез ензиму в умовах зростання концентрації донорів електронів або пригнічувати його активність у разі накопичення акцепторів. Відмічено нормалізуючий вплив рибоксину на структурний та функціональний стан відповідних внутрішньоклітинних систем, на перебіг енергетичних та метаболічних реакцій в клітинах, що зазнають відчутного ушкодження через розвиток оксидативного стресу [13, 14].

Внаслідок проведених нами досліджень встановлено корегуючий вплив рибоксину на активність одного з найважливіших компонентів ензиматичної ланки антиоксидантного захисту. Так, в умовах дії рентгенівського випромінювання у дозі 1,0 Гр на фоні попереднього введення рибоксину спостерігається наближення активності супероксиддисмутази до фізіологічних значень через 3 год після дії чинників. Зростання зниженої за радіаційного впливу в летальній дозі активності СОД (на 37% відносно показника в опроміненіх тварин) зареєстровано у лімфоїдних клітинах тимусу через 30 хв після дії факторів.

Враховуючи той факт, що активність антиоксидантних ензимів знаходиться під контролем нейрогуморальних механізмів — збільшення рівня нейромедіаторів, вивільнення гормонів, зокрема, інсуліну, що активно впливає на біосинтез та розпад супероксиддисмутази [15], а також, що рибоксин стимулює продукцію інсуліну [4], можна припустити участь даного шляху регуляції активності СОД за введення рибоксину. Разом з тим, згідно з результатами роботи [14], введення рибоксину сприяє збереженню у клітинах сталого рівня відновленого глутатіону (ВГ), який за рахунок відновлення атомів Cu^{2+} в активному центрі ензиму призводить до зростання активності СОД. З іншого боку, підвищення активності СОД в умовах ефективної утилізації O_2^- , захищає від окислення внутрішньоклітинний ВГ, який опосередковано (через ензимні системи) або безпосередньо здатен знешкоджувати активні радикали, зокрема за рахунок прямої взаємодії з гідроксильним та супероксиданіон-радикалами.

Спрямована інактивація активних метаболітів кисню та продуктів радикальної мо-

дифікації, що забезпечує відповідний захист від окисної деструкції, залежить від координованої роботи СОД, системи глутатіону і каталази.

Збалансована дія зазначених ензимів і її значущість в регуляції розвитку оксидативного стресу відзначається експериментами [16] по впливу гіперактивації СОД на інгібування синтезу антиоксидантних ензимів, що створює передумови для подальшої ініціації вільнорадикальних ланцюгових реакцій.

Встановлено, що під впливом опромінення активність каталази в тимоцитах тварин значно знижується відносно контрольних показників (таблиця) майже у всіх досліджуваних груп тварин. Підвищення активності каталази на 34% (відносно контролю) спостерігалось через 3 год після дії на тварин рентгенівського випромінювання у дозі 7,78 Гр, що свідчить про посилене утворення в лімфоїдних тканинах пероксиду водню, надмірну активацію вільнорадикальних реакцій, пов'язану з нагромадженням ліпопероксидних продуктів.

Введення рибоксину піддослідним тваринам в умовах експерименту загалом сприяло стимуляції активності ензиму в порівнянні з показником у опроміненних груп. Так, активність каталази через 30 хв значно зростала (в 3,5, та в 2 рази) у разі опромінення (1,0 та 7,78 Гр відповідно). Здатність препарату впливати на окисний гомеостаз клітин показана за інших патологій. Згідно з даними, наведеними в роботах [4, 17, 18], застосування рибоксину сприяє зростанню рівня ВГ та активації СОД при одночасному зниженні інтенсивності процесів вільнорадикального окислення ліпідів. До того ж, один з продуктів метаболізму рибоксину – сечова кислота, проявляє виражені антиоксидантні властивості: її утворення можна розглядати як своєрідний компенсаторний механізм під час розвитку у клітинах оксидативного стресу, оскільки ця сполука здатна попереджати розгалуження вільнорадикальних реакцій, інгібуючи таким чином процеси пероксидного окислення ліпідів [19].

Отже, рентгенівське опромінення щурів у дозах 1,0 та 7,78 Гр призводить до активації вільнорадикального окислення і підсилення процесів ПОЛ в лімфоцитах тимуса тварин,

що проявляється в інтенсифікації утворення кінцевих продуктів пероксидного окислення ліпідів, пригніченні та дисбалансі в активації ензимів антиоксидантного захисту. Застосування препарату рибоксину сприяє зниженню вихідних рівнів ТБК-активних продуктів та нормалізації активності супероксиддисмутази і каталази на ранніх термінах променевого ураження.

Таким чином, дія рентгенівського випромінювання порушує рівновагу в прооксидантно-антиоксидантній системі лімфоїдних клітин тимуса щурів, що проявляється інтенсифікацією процесів пероксидного окислення ліпідів і зниженням потужності антиоксидантного захисту. Використання рибоксину до опромінення щурів активує функцію основних антиоксидантних ензимів, знижує прояви системного оксидативного стресу.

ВЛИЯНИЕ РИБОКСИНА НА ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ЭНЗИМОВ В ТИМОЦИТАХ КРЫС ПРИ ЛУЧЕВОМ ПОРАЖЕНИИ

В. В. Полякова, Н. Г. Ракша, Л. П. Драган, Т. Р. Андрійчук

Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: litika@ukr.net

Показано, что нарушение окислительного гомеостаза в лимфоцитах тимуса крыс при радиационном поражении в дозах 1,0 и 7,78 Гр связано с накоплением продуктов пероксидного окисления липидов на фоне снижения функциональных возможностей антиоксидантной защиты. Введение рибоксина способствует нормализации баланса в прооксидантно-антиоксидантной системе (на ранних сроках после облучения животных) и сопровождается снижением образования продуктов липопероксидации, а также активацией антиоксидантной энзиматической системы лимфоцитов тимуса.

Ключевые слова: лимфоциты тимуса, рентгеновское облучение, прооксидантно-антиоксидантная система, рибоксин.

INFLUENCE OF RIBOXINE ON PROCESSES OF LIPID PEROXIDATION AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN RATS' THYMOCYTES UNDER RADIATION INJURY

V. V. Polyakova, N. G. Raksha, L. P. Dragan, T. R. Andriichuk

Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: litika@ukr.net

S u m m a r y

The disorders of oxidative homeostasis with accumulation of lipid peroxidation products upon depletion of functional capacity of antioxidant defense in thymus lymphocytes after irradiation in doses of 1.0 and 7.78 Gy were shown. The riboxine injection leads to normalization of balance in prooxidant-antioxidant system (with a decrease of formation of lipid peroxidation and activation of antioxidant enzyme system) in early terms after X-ray exposure.

Key words: thymus lymphocytes, X-ray irradiation, prooxidant-antioxidant system, riboxine.

1. *Finkel T.* // IUBMB Life. – 2001. – **52**, N 1–2. – P. 3–6.
2. *Барабой В. А., Сутковой Д. А.* Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – Киев: Наук. думка, 1997. – 420 с.
3. *Дубинина Е. Е.* // Вопр. мед. химии. – 2001. – **47**, № 6. – С. 561–581.
4. *Григорьева М. Б.* // Хим.-фарм. журн. – 1982. – № 4. – С. 387–422.
5. *Лимфоциты: Методы* / За ред. Клаус Д. – М.: Мир, 1990. – 395 с.
6. *Чевари С., Чаба И., Секей И.* // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 578–681.
7. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др.* // Лабор. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
8. *Ракша Н. Г., Андрійчук Т. Р., Цудзевич Б. О. та ін.* // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 2. – С. 41–45.
9. *Радіаційно-індукована структурно-метаболична модифікація ентероцитів та лімфоїдних клітин.* / Під ред. М. Є. Кучеренка. – Київ, 2006. – 202 с.
10. *Легеза В. И., Абдуль Ю. А., Антушевич А. Е. и др.* // Радиц. биология. Радиоэкология. – 1993. – **33**, № 2(5). – С. 658–664.
11. *Bing Hou, Zhi-Wei Xu, Chao-Wen Yang et al.* // J. Radiat. Res. – 2007. – **48**. – P. 57–62.
12. *Fec J. A., Di Corieto P. E.* // Ibid. – 1973. – **12**, N 124. – P. 4893.
13. *Lewandowski E. D., Johnston D. L., Roberts R.* // Circulation Res. – 1991. – **68**, N 4. – P. 578–587.
14. *Николаева Л. Ф., Черпаченко Н. М., Соколова Р. И.* // Кардиология. – 1971. – № 5. – С. 11–114.
15. *Комов В. П., Иванова Е. Ю.* // Вопр. мед. химии. – 1983. – **XXIX**, № 5. – С. 79–83.
16. *Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меншиков Е. Б.* Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. – М.: МАИК Наука/ Интерпериодика, 2001. – 343 с.
17. *Рудык Б. И., Швед Н. И., Блинова Н. Г. и др.* // Врачебное дело. – 1989. – **965**, № 8. – С. 14–15.
18. *Шлемкевич М. П., Тимочко М. Ф., Федорович И. П.* // Всес. симп. “Герiatricческие средства: экспериментальный поиск и клиническое использование”: Тезисы и рефераты докладов. – Киев, 1999. – С. 200–201.
19. *Becker V. F., Reinholz N., Ozcelik T. et al.* // Pflugers Arch. – 1989. – **415**. – P. 127–135.

Получено 19.10.2009