

Альохіна С. М.,

канд. біол. наук, ст. н. с.,

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини
Національної академії медичних наук України», м. Київ, Україна

Грицук О. І.,

д-р мед. наук, професор, Гомельський державний
медичний університет, м. Гомель, Беларусь

Клепко А. В.,

канд. біол. наук, ст. н. с.,

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини
Національної академії медичних наук України», м. Київ, Україна

Ватліцова О. С.,

канд. біол. наук, ст. н. с.,

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини
Національної академії медичних наук України», м. Київ, Україна

Дрозд І. П.,

д-р біол. наук,

Національної академії наук України, м. Київ, Україна

Липська А. І.,

д-р біол. наук, Інститут ядерних досліджень

Національної академії наук України, м. Київ, Україна

Талько В. В.,

д-р мед. наук, професор, ДУ «Національний науковий
центр радіаційної медицини Національної
академії медичних наук України», м. Київ, Україна

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ІНКОРПОРОВАНОГО ^{131}I *IN UTERO*

В експериментальному дослідженні з визначення стану антиоксидантної активності сироватки крові в опромінених in utero внаслідок інкорпорації ^{131}I щурів лінії Вістар застосовано простий, доступний і високоінформативний метод. В цьому методі використовується реакція автоокиснення адреналіну у лужному середовищі, котра є супероксид-генеруючою та супероксид-детекторуючою системою, що дозволяє визначати анти- та прооксидантні властивості біологічного матеріалу. Показано, що сироватці інтактних щурів притаманні антиоксидантні властивості. Внаслідок опромінення за умов даного експерименту відбувається виснаження антиоксидантної здатності та посилення проантиоксидантних властивостей сироватки опромінених тварин.

Ключові слова: ^{131}I ; щури; опромінення in utero сироватка крові; антиоксидантна активність.

Іонізуючу радіацію поєднує з іншими стресорними впливами здатність викликати активацію вільнорадикального окислення в опроміненому організмі та порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу [1]. Стан про-антиоксидантної системи є одним з основних індикаторів впливу іонізуючого випромінювання в комбінації з іншими пошкоджуючими факторами на організм [2; 3]. Показано, що стрес-реакція призводить до оксидативного стресу, накопичення продуктів пероксидного окислення ліпідів, змін активності антиокислювальних ферментів. Серед них провідне місце належить супероксиддисмутазі (СОД); її активність як основного антиокиснювального фер-

мента досліджено за умов різних видів, режимів та доз іонізуючої радіації [4; 5]. Охарактеризувати стан антиоксидантних резервів організму, його фізіологічної багатокomпонентної антиоксидантної системи за умов стрес-реакції можна шляхом встановлення антиоксидантної активності (АОА) завдяки розробленому для її визначення доступним методом у крові [6], а також у сльозовій рідині [7]. В цьому методі було використано реакцію автоокиснення адреналіну у лужному середовищі, котра є супероксид-генеруючою та супероксид-детекторуючою системою, що дозволяє визначати анти- та прооксидантні властивості біологічного матеріалу.

Мету проведеного експериментального дослідження складало визначення антиоксидантної активності сироватки крові щурів лінії Вістар, опромінених внутрішньоутробно ^{131}I .

Матеріал та методи дослідження. Створено модель внутрішньоутробного опромінення щурів лінії Вістар шляхом одноразового перорального введення вагітним самкам водний розчин Na^{131}I активністю 27,5 кБк на 12–14-ту добу гестації, що формувало дозу на щито-подібну залозу плоду $0,72 \pm 0,06$ Гр. Опромінення щурів *in utero*, розрахунки дози опромінення плоду здійснено в Інституті ядерних досліджень НАН України [8]. Дослідження антиоксидантної активності сироватки проведено у 12 щурів-самців 12-тижневого віку, розподілених на 2 групи (по 6 тварин в кожній): контрольну (народжені від інтактних тварин), дослідну (опромінені *in utero*). Після проведення декапітації тварин відразу відбирали кров та інкубували її при кімнатній температурі впродовж 30 хв. Після цього кров центрифугували при 1000 g 15 хв, а потім відбирали сироватку крові для подальших досліджень.

Антиоксидантну активність (АОА) сироватки крові визначали за її здатністю впливати на швидкість реакції автоокиснення адреналіну у лужному середовищі і оцінювали згідно описаної методики [7]. Вимірювання проводили в тест-системі: до вимірювальної кювети вносили 2 мл 0,2 М карбонатного буфера, рН 10,55, додавали 0,1 мл 0,1 %-го розчину адреналіна гідрохлориду (0,26 мМ), перемішували і починали реєстрацію автоокиснення адреналіну при кімнатній температурі (22°C) та довжині хвилі 347 нм (контрольна проба). Вимірювання оптичної щільності проводили кожні 15 с впродовж 105 с на спектрофотометрі «Specoll-211» (Німеччина). Зміни оптичної щільності за 1 хв оцінювали як швидкість реакції автоокиснення адреналіну U дослідній пробі до внесення адреналіну додавали 0,1 мл сироватки. Швидкість окиснення адреналіну було визначено таким чином: побудовано кінетичну криву, що відображує швидкість окиснення адреналіну (V) в контрольній пробі ($\lambda = 347$ нм); розраховано швидкість процесу як відношення зміни оптичної щільності до часу ($\Delta E/t$), де ΔE – зміна оптичної щільності, тобто $\Delta E = E_t - E_0$, де E_0 – оптична щільність розчину одразу після додавання адреналіну, E_t – оптична щільність розчину через 105 с після додавання адреналіну, t – час у хв. Розрахована швидкість автоокиснення адреналіну в контролі складала $0,0416 \pm 0,013$ опт. од./хв. Ця величина (її приймали за 100 %) підтримувалася та коригувалася в процесі всіх

досліджень додаванням HCl або NaOH . Швидкість автоокиснення адреналіну у дослідній пробі вимірювали у присутності сироватки. Відсоток інгібування або активації за присутності сироватки розраховували за формулою:

$$[1 - (\Delta E_{\text{дослід}} / \Delta E_{\text{контроль}})] \cdot 100 \%, \quad (1)$$

де $\Delta E_{\text{дослід}}$ та $\Delta E_{\text{контроль}}$ – швидкості автоокиснення адреналіну відповідно за присутності та відсутності сироватки.

Здатність сироватки до інгібування реакції оцінювали як антиоксидантну, а до активації реакції – як прооксидантну. Антиоксидантну та прооксидантну активність сироватки виражали в умовних одиницях (у. о.). 1 у. о. – це 1 % інгібування реакції (-1 у. о.) або 1 % активації (+1 у. о.) у перерахунку на 1 мл сироватки (питома активність сироватки)..

Отримані результати порівнювали з даними визначення активності супероксиддисмутази (СОД) (ЕС 1.15.1.1) у сироватці крові згідно методу, що базується на здатності СОД конкурувати з барвником нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніон-радикали [8]. В ході реакції НСТ відновлюється з утворенням гідрозинтетразолію, що характеризується максимумом поглинання при 540 нм. В присутності СОД ступінь відновлення НСТ зменшується. В ході вимірювання активності СОД до 0,2 мл отриманої сироватки крові додавали 1 мл реагенту I (0,15 М фосфатний буфер (рН 7,8), 0,2 мМ ЕДТА, 0,7 мМ нітросиній тетразолій, 0,75 мМ феназинметасульфат). Добре перемішували та вимірювали екстинкцію проби при довжині хвилі 540 нм (E_1). Після цього додавали 0,035 мл реагенту II (1 мМ тріс-ЕДТА буфер (рН 8,0), 1 мМ НАД·Н), інкубували 10 хв при кімнатній температурі та знову вимірювали екстинкцію проби (E_2). Дослідження здійснювали на спектрофотометрі «Specoll-211» (Німеччина). Активність ферменту розраховували за нижченаведеною формулою (1.1) та виражали в у.о.

$$A = \frac{E_2 - E_1}{E_2} \times 100\%, \quad (2)$$

Утримання тварин та проведення досліджень виконувалися у відповідності до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006).

Статистична обробка отриманих даних проводилася з використанням t-критерію Стьюдента [10].

Величини швидкості (V) автоокиснення адреналіну за присутності сироватки кожної тварини, результати розрахованої питомої анти- або прооксидантної активності сироватки (у.о./мл сироватки) надані у таблиці 1.

Таблиця 1

Показники швидкості автоокиснення адреналіну та питомої активності сироватки крові опромінених *in utero* щурів

Контроль			Дослід	
№ тварини	$V = \Delta E/t$	Питома активність, (у.о./мл сироватки)	№ тварини	Питома активність, (у.о./мл сироватки)
1	0,033	- 344,6	7	+ 632,4
2	0,021	- 301,4	8	+ 775,4
3	0,026	- 298,5	9	+ 532,1
4	0,041	- 243,8	10	+ 411,3
5	0,034	- 342,2	11	+ 211,2
6	0,045	- 259,4	12	+ 314,6
M ± m, n = 6 - 298,3 ± 45,7			M ± m, n = 6 + 399,6 ± 112,3	

Отримані результати свідчать, що сироватка інтактних щурів має антиокиснювальну здатність, в той час як сироватка опромінених щурів характеризується виснаженням антиоксидантних властивостей та збільшенням кількості речовин, що мають прооксидантну властивість. Це, в певній мірі, підтверджується зниженням активності СОД у сироватці крові досліджуваних тварин: $52,66 \pm 2,48$ у.о. у контролі, $45,15 \pm 2,39$ у.о. у досліді (в опромінених *in utero* тварин), ($p < 0,05$).

Висновок. В дослідженні стану антиоксидантної активності сироватки крові в експерименті в опромінених *in utero* внаслідок інкорпорації ^{131}I тварин застосовано просту, доступну і високоінформативну методику. Показано, що сироватці інтактних щурів притаманні антиоксидантні властивості. Внаслідок опромінення за умов даного експерименту відбувається виснаження антиоксидантної здатності та посилення проантиоксидантних властивостей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В. А. Перекисное окисление и радиация / В. А. Барабой, В. Э. Орел, И. М. Карнаух. – К. : Наук. думка, 1991. – 256 с.
2. Барабой В. А. Фізіологія, біохімія і психологія стресу / В. А. Барабой, А. Г. Резніков. Монографія. – Київ : Інтерсервіс, 2013. – 314 с.
3. Липська А. І. Индекс реакції-відповіді організму на дію іонізуючого випромінювання за показниками пероксидного окиснення у тварин / А. І. Липська, Я. І. Серкіз, М. І. Мойсеєнко // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології : зб. наук. праць / НЦРМ АМН України. – К. : ДІА, 2006. – Вип. 12. – С. 209–218.
4. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / Барабой В. А. – К. : Книга плюс, 2006 – 462 с.
5. 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 // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 6. – С. 671–680.
6. Сирота Т. В. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений. Патент Российской Федерации. № патента 2144674. G01N33/52, G01N33/68. № заявки 99103192/14. Дата подачи заявки 24.02.1999. Дата публикации 20.01.2000.
7. Грицук А. И. Оценка состояния антиоксидантной активности слезной жидкости / А. И. Грицук, Т. В. Сирота, Л. В. Дравица, Е. А. Крэддок // Биомедицинская химия. – 2006. – Т. 52, вып. 6. – С. 601–607.
8. Дрозд І. П. Дозоутворення у лабораторних щурів за перорального надходження ^{131}I з блокуванням та без блокування щитоподібної залози стабільним йодом / І. П. Дрозд, О. А. Сова, Е. А. Шитюк // Наукові праці : науково-методичний журнал. – Вип. 198. Т. 210. Техногенна безпека. – Миколаїв : Вид. ЧДУ ім. Петра Могили, 2013. – С. 23–30.
9. Bannister J. V. Assays for superoxide dismutase / J. V. Bannister, L. Calabrese // Methods of Biochemical Analysis. – 1987. – Vol. 32. – P. 279–312.
10. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – 2-е изд. – К. : МОРИОН, 2001. – 408 с.

С. М. Алехина,

ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев, Украина

А. И. Грицук,

Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

А. В. Клепко, О. С. Ватлицова,

ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев, Украина

И. П. Дрозд, А. И. Липская,

Институт ядерных исследований Национальной академии наук Украины, г. Киев, Украина

В. В. Талько,

ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев, Украина

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ^{131}I IN UTERO

В экспериментальном исследовании по определению состояния антиоксидантной активности сыворотки крови у облученных *in utero* вследствие инкорпорации ^{131}I крыс линии Вистар применен простой, доступный и высокоинформативный метод. В этом методе используется реакция автоокиснения адреналина в щелочной среде, которая является супероксид-генерирующей и супероксид-детекторной системой, позволяющей определять анти- и прооксидантные свойства биологического материала. Показано, что сыворотке интактных крыс присущи антиоксидантными свойствами. В результате облучения в условиях данного эксперимента происходит истощение антиоксидантной способности и усиление проантиоксидантных свойств сыворотки крови облученных животных.

Ключевые слова: ^{131}I ; крысы; облучение *in utero*; сыворотка крови; антиоксидантная активность.

A. M. Alokina,

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

A. I. Gritsuk,

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

A. V. Klepko, O. S. Vatlitsova,

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

I. P. Drozd, A. I. Lypska,

Institute for Nuclear Research of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

V. V. Tal'ko,

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BLOOD SERUM OF WISTAR RATS EXPOSED ¹³¹I IN UTERO

In a pilot study to determine the status of antioxidant activity in the blood serum exposed in utero due to the incorporation of ¹³¹I Wistar rats used a simple, accessible and highly informative method. This method uses autooxide adrenaline reaction in an alkaline medium, which is a superoxide-generating and superoxide detection system allowing to determine the anti- and pro-oxidant properties of the biological material. It was shown that serum intact rats inherent antioxidant properties. As a result of exposure to the conditions of this experiment, depletion of antioxidant capacity and increased serum proantioxydant properties of irradiated animals.

Keywords: ¹³¹I; rats; in utero exposure, blood serum, antioxidant activity.

© Альохіна С. М., Грицук О. І., Клепко А. В., Ватліцова О. С.,
Дрозд І. П., Липська А. І., Талько В. В., 2016

Дата надходження статті до редколегії 05.07.2016