УДК: 577.12:636.087.24

СТАН ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ Й АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЗАХИСТУ У ЩУРІВ ПРИ ЗГОДОВУВАННІ ДРІЖДЖІВ *PHAFFIA RHODOZYMA*

М. І. Колісник, Н. І. Борецька, Л. І. Сологуб

Інститут біології тварин УААН

У статті наведено дані про вплив біомаси каротиновмісних дріжджів P.rhodozyta на показники процесів пероксидного окислення ліпідів та білків і активність ферментів системи антиоксидантного захисту в печінці, головному мозку та міокарді щурів. Встановлено, що введення у раціон тварин біомаси дріжджів P.rhodozyta проявляє антиоксидантну дію: у печінці, серці та головному мозку знижується рівень дієнових кон'югатів та карбонільних груп білків, підвищується активність супероксиддисмутази у міокарді та глютатіонпероксидази у головному мозку щурів.

Ключові слова: ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗА, КАРОТИНОЇДИ, КАТАЛАЗА, АСТАКСАНТИН.

В організмі тварин у результаті окисно-відновних реакцій постійно проходить генерація активних форм кисню, які викликають окисну модифікацію внутрішньоклітинних біополімерів: білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, вуглеводів. Фізіологічний нормальний рівень вільнорадикальних процесів і перекисного окислення макромолекул забезпечує регулювання ліпідного складу і проникності мембран, проліферації, фагоцитозу, синтезу білків [1, 2]. Однак під дією екстремальних факторів різної природи (забруднення довкілля, іонізуючі та інші види випромінювань, токсичні речовини, запальні процеси, деякі лікарські препарати) в організмі посилюються окиснювальні процеси, порушується збалансованість антиоксидантної та прооксидантної систем, внаслідок чого розвивається оксидативний стрес, який є однією із головних патогенетичних ланок радіаційних пошкоджень, онкозахворювань, серцево-судинної і бронхолегеневої патологій, алергічних захворювань, хімічних інтоксикацій, деструктивних змін мозку. Процеси старіння й апоптозу клітин також проходять на фоні окиснювального стресу [3].

Підвищення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів у організмах тварин і людини в даний час розглядають, як порушення метаболізму, яке вимагає корекції і на котре можна впливати, використовуючи антиоксиданти. Застосування синтетичних антиоксидантів обмежується високою ймовірністю появи небажаних побічних ефектів [4]. З огляду на це актуальним є пошук і використання природних антиоксидантів, які можна використовувати, як кормові добавки, що позитивно впливають на продуктивність тварин і якість одержуваної продукції.

Важливе місце серед сполук з антиоксидантними й антирадикальними властивостями належить каротиноїдам. Каротиноїди є важливим компонентом неферментативної системи антиоксидантного захисту. Особливої уваги заслуговує каротиноїд астаксантин, антиоксидант, який є ефективнішим у 10–12 раз ніж ß-каротин. Астаксантин у невеликих кількостях міститься у деяких видів риб, ракоподібних та водоростей. Дослідження вчених США, Японії та Канади свідчать про пряму залежність між рівнем споживання астаксантину і зниженням рівня онкологічних та серцево-судинних захворювань. Одним із джерел астаксантину є дріжджі *P.rhodozyma*, проте дикі штами цих дріжджів не використовуються, оскільки вони нагромаджують порівняно невисокі концентрації каротиноїдів. Нами проведено селекцію цих дріжджів і виділено високопродуктивний штам, який синтезує 20 мг каротиноїдів на грам сухої маси. Дія біомаси селекціонованого штаму на організм тварин не з'ясована.

Метою даної роботи було вивчити вплив β-каротину та біомаси селекціонованого штаму дріжджів *P.rhodozyma* IBM Y-5021 на процеси вільнорадикального окиснення в різних органах щурів при додаванні їх до стандартного раціону.

Матеріали і методи

Досліди проводили на самцях білих щурів лінії Вістар із початковою масою тіла 120–130 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному раціоні. Дослідження виконували згідно з етичним кодексом МОЗ України. Тварини були поділені на 3 групи (по 4 тварини): 1 — контрольна група; 2 — щури, яким згодовували біомасу дріжджів *P.rhodozyma* (2 % від маси раціону), вміст каротиноїдів у якій становив 20 мг/г сухої біомаси; 3 — тварини, яким згодовували β-каротин у дозі 40 мг/100 г комбікорму (кількість еквівалентна вмісту каротиноїдів у біомасі дріжджів, що споживали щури 2 групи). Через 19 днів проводили забій тварин та відбір зразків печінки, головного мозку і серця для досліджень. У вказаних органах визначали вміст карбонільних груп білків та тіобарбітуратактивних продуктів [6], дієнових кон'югатів [7], гідроперекисів ліпідів [8], активність каталази [9], глутатіонпероксидази (ГПО) [10] та супероксиддисмутази (СОД) [11].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили, використовуючи t-критерій Стьюдента.

Результати й обговорення

Якость біомаркерій вільнорадикального окиснення у дослідженнях найчастіше визначають кількість первинних (гідроперекисів та дієнових кон'югатів) та вторинних (альдегідів) продуктів перекисного окиснення ліпідів [6]. У таблиці 1 наведено результати визначення вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів у досліджуваних органах щурів. Одержані результати показують, що введення β-каротину та біомаси дріжджів *P.rhodozyma* у раціон щурів суттєво не впливає на вміст ТБК-активних продуктів і гідропероксидів ліпідів у печінці, головному мозку та серці: різниці в цих показниках у досліджуваних тканинах органів невірогідні ($p \leq 0,5$). Проте вміст дієнових кон'югатів у печінці, головному мозку та серці щурів при згодовуванні біомаси дріжджів знижується відповідно на 25,2; 13,6 і 13,0 % ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,5$), а при додаванні до раціону β-каротину — на 6,4; 17,3 та 27,6 % ($p \leq 0,5$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$). Зниження під дією β-каротину та біомаси каротино-синтезуючих дріжджів вмісту первинних продуктів ПОЛ у досліджуваних органах щурів може свідчити, що наявні в дріжджах каротиноїди пригнічують вільнорадикальне окиснення ліпідів на початковій стадії, нейтралізуючи ініціатори ліпопероксидації

Для оцінки ступеня окисного ушкодження різних компонентів клітини за умов оксидативного стресу визначають ступінь окисненості білків. Встановлено, що модифікація білкових молекул (ОМБ) за дії АФК приводить до утворення додаткових карбонільних груп у бічних ланцюгах амінокислот. Вважається, що деструкція білків є надійнішим маркером окиснювальних пошкоджень тканин, ніж ПОЛ, оскільки продукти ОМБ стабільніші, порівняно з пероксидами ліпідів, які швидко метаболізуються під дією пероксидаз та низькомолекулярних антиоксидантів. Відомо, що відновлення окиснених білків практично не відбувається. Вони стають мішенню для дії специфічних нейтральних та лужних протеаз, активність яких залежить від багатьох факторів, зокрема від наявності ксенобіотиків, віку та ін. [3]. Результати наших досліджень показують, що у тканинах щурів виявлено низький вміст карбонільних груп білків. Він зменшується у такій послідовності: головний мозок→печінка→серце і становить у тварин контрольної групи відповідно 6,78; 5,20 і 2,46 нмоль• $мг^{-1}$білка. У тварин, яким згодовували біомасу дріжджів *P.rhodozyma* кількість 2,4-динітрофенілгідразонів знижується порівняно з контролем у тканинах печінки на 17,5 %, а головного мозку — на 8 % ($p \leq 0,05$). При додаванні до раціону β-каротину вміст сполук окисної модифікації білків у головному мозку щурів був вищим на 8,3 % ($p \leq 0,05$), що може вказувати на деяку прооксидантну дію β-каротину за цих умов.

Таблиця 1

Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у організмі щурів, (M±m, n=4)

Групи	ТБК-активні продукти, нмоль•г$^{-1}$	Дієнові кон'югати, нмоль•г$^{-1}$	Гідропероксиди ліпідів, ОЕ•г$^{-1}$
Печінка			
I - контрольна	18,41±1,70	89,87±3,13	16,35±1,62
II+*P .rhodozyma*	19,35±1,00	67,21±3,45*	14,33±1,45
III + β-каротин	18,25±1,32	84,12±2,48	14,16±1,42
Головний мозок			
I - контрольна	26,71±2,04	83,43±2,59	13,33±1,17
II+*P .rhodozyma*	23,35±1,38	72,10±2,06*	11,17±1,33
III + β-каротин	29,85±1,74	69,01±4,33*	10,95±2,49
Серце			
I - контрольна	23,93±0,66	113,04±8,79	11,03±1,48
II+*P .rhodozyma*	22,74±3,01	98,36±7,98	11,10±2,18
III + β-каротин	23,17±0,98	81,88±4,91*	10,35±1,12

Примітка:* — різниця достовірна відносно тварин контрольної групи (P ≤ 0,05–0,001)

Таблиця 2

Вміст карбонільних груп білків у печінці, головному мозку та серці щурів при згодовуванні їм біомаси дріжджів *P. rhodozyma* та β-каротину, нмоль• мг$^{-1}$білка (M±m, n=4)

Групи	Печінка	Головний мозок	Серце
I - контрольна	5,20±0,21	6,78±0,14	2,46±0,14
II + *P.rhodozyma*	4,29±0,23*	6,25±0,21*	2,50±0,16
III + β-каротин	5,36±0,17	7,41±0,17*	2,64±0,22

Примітка:* — різниця достовірна відносно тварин контрольної групи (P ≤ 0,05–0,001)

У механізмах регуляції вільнорадикальних та пероксидних процесів ключову роль відіграють антиоксидантні ферменти, які взаємодоповнюють один одного: СОД, каталаза та ГПО. Накопичення продуктів ПОЛ та ОМБ в тканинах у значній мірі залежить від активності ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту. Найпотужнішим ферментом першої ланки антиоксидантного захисту є СОД. Тому різниці в активності цього ферменту характеризують глибину тканинного ураження та порушення метаболізму, зумовлених оксидативним стресом [3]. Відомо, що активність ферментів-антиоксидантів і співвідношення їх активностей визначається тканинними особливостями. Результати наших досліджень показують (табл. 3), що найвищу активність ферментів-антиоксидантів виявлено у печінці (за виключенням СОД, активність якої є більшою у серці). Найнижчу активність досліджуваних ензимів виявлено у головному мозку, що може свідчити про те, що в захисті цих тканин від окиснювального пошкодження важливе значення мають низькомолекулярні антиоксиданти, в тому числі і каротиноїди.

Таблиця 3

Вплив біомаси дріжджів *P. rhodozyma* та β-каротину на активність ферментів системи антиоксидантного захисту у досліджуваних органах щурів, (M±m, n=4)

Групи тварин	Каталаза,	СОД,	ГПО,

	мкмольH_2O_2•хв.$^{-1}$• мг$^{-1}$білка	ум. Од.•мг$^{-1}$білка	нмольGSH•хв.$^{-1}$• мг$^{-1}$білка
Печінка			
I — контрольна	120±1,9	4,71±0,20	366±12,7
II — *P.rhodozyma*	125±2,9	4,66±0,10	375±14,1
III — β-каротин	118±3,6	4,33±0,22	362±14,4
Головний мозок			
I — контрольна	4,27±0,46	0,64±0,02	101,5±2,3
II — *P.rhodozyma*	4,57±0,40	0,66±0,03	116,6±4,7*
III — β-каротин	4,55±0,36	0,63±0,02	103,0±3,7
Серце			
I — контрольна	15,3±1,6	5,64±0,23	108,5±9,1
II — *P.rhodozyma*	17,0±1,0	6,84±0,15*	109,1±2,8
III — β-каротин	14,4±0,5	5,69±0,25	104,1±3,9

Примітка:* — різниця достовірна відносно тварин контрольної групи ($P \leq 0,05–0,001$)

Аналіз даних активності ферментів системи антиоксидантного захисту показує, що у серці щурів, яким згодовували біомасу дріжджів *P. rhodozyma* зростає активність СОД на 21 %, а в головному мозку тварин цієї групи підвищується активність глютатіонпероксидази на 15 % ($p \leq 0,05$).

З даних літератури, відомо [2], що промоторні ділянки генів досліджуваних нами ферментів містять послідовності нуклеотидів для зв'язування факторів транскрипції AP-1, NF-KB. За умов окиснювального стресу може відбуватися не тільки підсилення транскрипції, а й пригнічення транскрипційних факторів [1], тобто мобілізація захисних систем клітини послаблюється. Також відомо, що астаксантин, виділений з водоростей, проявляє сильну антиоксидантну дію та впливає на активацію фактора транскрипції NF-KB та інших прозапальних медіаторів [12]. Одержані нами результати можуть свідчити, що наявні в біомасі дріжджів каротиноїди не тільки пригнічують вільнорадикальне окиснення ліпідів та білків на початковій стадії, нейтралізуючи ініціатори цих процесів, але можуть впливати на активацію ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту.

Висновки

Додавання до раціону щурів біомаси каротиносинтезуючих дріжджів *P.rhodozyma* проявляє антиоксидантний вплив: у печінці, серці та головному мозку дослідних тварин знижується рівень дієнових кон'югатів та карбонільних груп білків, підвищується активність супероксиддисмутази у міокарді та глютатіонпероксидази — у головному мозку.

M. I. Kolisnyk, N. I. Boretska, L. I. Solohub

FREE RADICAL OXIDATION AND ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEM OF RATS BY FEEDING YEASTS *PHAFFIA RHODOZYMA*

S u m m a r y

The influence of carotenoproducing yeasts *P. rhodozyma* biomass on lipid and protein peroxidation and antioxidative enzymes activity in liver, brain and myocardium of rats was studied. It was established that the addition of yeast *P. rhodozyma* biomass shows antioxidative action. The level of diene conjugate and carbonyl groups decreases in tissue of liver, brain and myocardium. Activity of superoxide dismutase increases in myocardium.

The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine.

1. *Турпаев К. Т.* Активные формы кислорода и регуляция экспресии генов // Биохимия. — 2002. — 67, Вып. 3. — С. 339–352.

2. *Дубинина Е. Е.* Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса // Вопросы мед. хим. — 2001. — 76, №6. — С.136–141.

3. *Карімов І. З.* Окислительная модификация белков и перекисное окисление липидов в развитии метаболической интоксикации при патологии // Лабор. діагностика. — 2005. — №1. — С.7–13

4. Корекція ентеросорбцією порушень окиснювальних процесів при токсичному ураженні печінки. / Гонський Я. І., Баган О. П., Кліщ І. М. та ін.// Укр. биохим. журн. — 1994. — 47, № 6. — С. 561–581.

5. *Miki W.* Biological function and activities of animal carotenoids // Pure Appl. Chem. — 1991. — 63, № 1. — P.141–146.

6. *Лущак В. І., Багнюкова Т. В., Лущак О. В.* Показники оксидативного стресу. 1. Тіобарбітуративні продукти і карбонільні групи білків // Укр..біохім.журн. — 2004. — 76, №6. — С.136–141.

7. *Романова Л. А., Стальная И. Д.* Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С.63–64

8. А. с. №1084681 СССР, МКИ G №33/48 Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / Мирончик В. В. (СССР). — №3468369//28–13; Заявлено 08.07.82; Опуб. 07.04.84, Оф.бюл. №13–2 с.

9. Метод определения активности каталазы. / Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. // Лаб. дело. — 1988. — №1. — С.16–18.

10. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. — 1986. — №12. — С.724–727.

11. *Чвари С., Чаба И., Секей Й.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процесах клетки и метод определения ее в биологических материалах.// Лаб. дело. — 1985. — №11. — С.678–681.

12. *Lee S. J., Bai S. K., Lee K. S* Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing NF-kappa B activation // Mol. Cells. — 2003. — 16 (1). — P.97–105.