УДК 577.12:636.087.24

СТАН СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У КЛІТИНАХ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ЗГОДОВУВАННІ БІОМАСИ ДРІЖДЖІВ *PHAFFIA RHODOZYMA*

М. І. Колісник, В. В. Влізло

Інститут біології тварин УААН

У статті наведено дані про вплив згодовування біомаси каротиновмісних дріжджів Phaffia rhodozyma та β-каротину на показники процесів пероксидного окислення ліпідів і активність ферментів системи антиоксидантного захисту у клітинах кісткового мозку щурів. Встановлено, що при введенні у раціон тварин біомаси дріжджів P. rhodozyma у клітинах кісткового мозку знижується активність супероксиддисмутази і каталази та зменшується нагромадження первинних і вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Згодовування щурам β-каротину появляє неоднозначну дію: у клітинах гранулоцитарно-моноцитарного ряду знижуться вміст тіобарбітуратактивних сполук, але підвищується концентрація дієнових кон'югатів і активність глютатіонпероксидази у еритроїдному ряді клітин.

Ключові слова: КІСТКОВИЙ МОЗОК, ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗА, КАТАЛАЗА, ß-КАРОТИН, ДРІЖДЖІ *PHAFFIA RHODOZYMA*

В організмі тварин у результаті окисно-відновних реакцій відбувається постійна генерація активних метаболітів кисню (АМК), які проявляють широкий спектр фізіологічної дії та відіграють важливу роль у підтриманні гомеостазу організму. За нормальних фізіологічних умов утворені АМК знешкоджуються системою антиоксидантного захисту, що забезпечує збалансоване протікання окиснювальних та антиокиснювальних процесів у організмі [1, 2]. За дії шкідливих факторів різної природи в організмі посилюються вільно радикальні процеси, збалансованість антиоксидантної та прооксидантної систем порушується, внаслідок чого розвивається оксидативний стрес [3]. Інтенсифікація вільнорадикальних процесів є однією із провідних патогенетичних ланок багатьох захворювань [3]. В умовах недостатньої активності эндогенної антиоксидантної системи ефективним способом захисту клітин від пошкоджуючої дії АМК є введення у раціон тварин антиоксидантів. Це зумовлює потребу пошуку препаратів з антиоксидантними властивостями, які послаблюють токсичну дію вільних радикалів. До сполук з антиоксидантними властивостями належать каротиноїди [4].

Одним із джерел каротиноїдів є дріжджі *P. rhodozyma*, біомасу яких використовують як кормову добавку до раціону тварин для посилення пігментації м'яса форелі та жовтка яєць у птиці. Кормова цінність біомаси цих дріжджів зумовлена їх здатністю синтезувати широкий спектр каротиноїдів, значну частку котрих (до 80 %) складає астаксантин, який проявляє сильнішу, ніж β-каротин антиоксидантну дію [5]. В Україні традиційними кормовими дріжджами є *Saccharomyces cerevisiae* і *Candida tropicalis*, які каротиноїдів не синтезують. На відміну від них *P. rhodozyma* є джерелом не тільки протеїну але і багатьох інших біологічно активних речовин у тому числі каротиноїдів. Дія біомаси дріжджів *P.rhodozyma* на організм ссавців та можливість їх використання з метою корекції вільнорадикальних процесів не з'ясована. Метою даної роботи було вивчити вплив згодовування біомаси дріжджів *P. rhodozyma* IBM Y-5021 на стан системи антиоксидантного захисту у клітинах кісткового мозку щурів.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були самці білих щурів лінії Вістар з початковою масою тіла 120-130 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному раціоні. Тварини були поділені на 3 групи (по 4 тварини у кожній): 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 під легким ефірним наркозом. Кістковий мозок виділяли шляхом аспірації стегнових та гомілкових кісток і розділяли його клітини у системі фікол-верографін [6]. У клітинах гранулоцитарно-моноцитарного та еритроїдного рядів визначали вміст тіобарбітуратактивних продуктів [7], дієнових кон'югатів [8] та активність каталази [9], глутатіонпероксидази (ГПО) [10] і супероксиддисмутази (СОД) [11].

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

Результати й обговорення

Відомо, що кістковий мозок, який має ряд функціональних і метаболічних особливостей, вважають одним з найчутливіших до пошкоджуючої дії процесів вільно радикального окиснення. Дослідження вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) свідчить, що клітини кісткового мозку червоного і білого рядів відрізняються за рівнем нагромадження цих сполук (табл. 1). У клітинах еритроїдного ряду (ЕР) кількість дієнових кон'югатів була на 28 % ($p<0,001$) менша, ніж у клітинах гранулоцитарно-моноцитарного ряду (ГМР). Вміст кінцевих продуктів ПОЛ, ТБК-позитивних продуктів, був також на 14 % ($p<0,01$) меншим у клітинах ЕР, порівняно з таким у клітинах ГМР. У клітинах ЕР виявлена нижча активність ферментів системи антиоксидантного захисту, ніж у ГМР (табл. 2). Так, показники активності СОД у клітинах білого ряду перевищують такі у клітинах червоного ряду у 1,8 рази ($p<0,001$), каталази - у 1,3 рази ($p<0,05$), а ГПО – у 1,2 рази.

Таблиця 1

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у клітинах кісткового мозку щурів (M±m, n=4)

Групи	*Дієнові кон'югати, нмоль•г$^{-1}$*	*ТБК-позитивні продукти, нмоль•г$^{-1}$*
ЕР		
I - контрольна	*86,8 ± 2,24*	*6,0 ± 0,19*
II+P .rhodozyma	*73,9 ± 4,00**	*4,6 ± 0,25**
III + β-каротин	*96,6 ± 2,47*$^{*,+}$	*6,3 ± 0,34*$^{+}$
ГМР		
I - контрольна	*120,8 ± 8,12*	*7,0 ± 0,15*
II+P .rhodozyma	*85,0 ± 3,32**	*5,7 ± 0,54**
III + β-каротин	*111,5 ± 6,49*$^{+}$	*5,8 ± 0,38**

Примітки: *— різниця достовірна відносно тварин контрольної групи ($p<0,05$-$0,001$);
$^{+}$— різниця достовірна відносно тварин другої групи ($p<0,05$-$0,001$).

При згодовуванні тваринам біомаси каротиносинтезувальних дріжджів щурам у клітинах кісткового мозку виявлено зменшення вмісту продуктів ПОЛ. Так, рівень дієнових кон'югатів у клітинах червоного і білого рядів у щурів 2-ої групи був меншим на 14,8 % ($p<0,05$) і 29,6 % ($p<0,001$), а вміст ТБК-позитивних продуктів - на 22,0 % ($p<0,01$) і 18,2 % ($p<0,01$), відповідно.

Дещо іншу картину виявлено при дослідженні дії β-каротину на ці процеси. Як видно з наведених у табл. 1 даних, при введенні у раціон щурів β-каротину зміни вмісту продуктів ПОЛ не є однозначними у різних ростках клітин кісткового мозку. Так, рівень дієнових кон'югатів у клітинах ЕР був більшим на 11,3 % ($p<0,05$), а у клітинах ГМР був меншим вміст дієнових кон'югатів і ТБК-позитивних сполук (7,7 %, $p<0,5$ та 12,8 %, $p<0,05$, відповідно).

Введення біомаси дріжджів у раціон щурів приводить до зниження активності СОД та каталази у клітинах ЕР - на 28,7 % (p<0,01) та 15,8 % (p<0,05), а у ГМР - на 25,2 % (p<0,01) та 24,4 % (p<0,01), відповідно. Активність ГПО за цих умов у клітинах обох вірогідно не змінюється. Слід відзначити, що зниження активності СОД та каталази у кістковому мозку щурів 2-ої групи спостерігається на фоні гальмування процесів утворення як первинних, так і вторинних продуктів ПОЛ у клітинах обох рядів кісткового мозку. Зниження ферментної активності у клітинах кісткового мозку тварин, яким згодовували біомасу дріжджів, можна пояснити впливом каротиноїдів на інтенсивність утворення вільних радикалів, що приводить до інгібування утворення субстратів для цих ензимів.

Додавання β-каротину до раціону щурів суттєво не впливає на активність СОД і каталази у клітинах еритроїдного ряду, але зумовлює підвищення активності ГПО на 24,3 % (p<0,01).

Таблиця 2

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

Групи тварин	*СОД, ум. Од.•мг$^{-1}$ білка*	*Каталаза, мкмольH$_2$O$_2$•хв.$^{-1}$• мг$^{-1}$білка*	*ГПО, нмольGSH•хв.$^{-1}$• мг$^{-1}$білка*
ЕР			
I - контрольна	*2,5 ± 0,09*	*23,4 ± 1,25*	*17,3 ± 1,22*
II -P .rhodozyma	*1,8 ± 0,12**	*19,7 ± 0,82**	*19,5 ± 1,44*
III - β-каротин	*2,4 ± 0,09*$^{+}$	*23,6 ± 2,12*	*21,5 ± 1,48**
ГМР			
I - контрольна	*4,5 ± 0,22*	*30,7 ± 1,58*	*20,5 ± 1,82*
II -P.rhodozyma	*3,4 ± 0,16**	*23,2 ± 1,25**	*22,9 ± 1,72*
III - β-каротин	*3,8 ± 0,28*	*30,8 ± 1,84*$^{+}$	*20,0 ± 2,37*

Примітки: *— різниця достовірна відносно тварин контрольної групи (p<0,05-0,001);
$^{+}$— різниця достовірна відносно тварин другої групи (p<0,05-0,001).

Аналіз одержаних результатів показує, що у клітинах кісткового мозку щурів, яким згодовували біомасу дріжджів *P. rhodozyma*, виявлено нижчий рівень продуктів пероксидного окиснення ліпідів ніж у тварин, яких утримували на раціонах з добавкою β-каротину. Так, вміст дієнових кон'югатів у клітинах ЕР щурів 2-ої групи (порівняно з таким у тварин 3-ої групи) був меншим на 30,7 % (p<0,01), а у клітинах ГМР - на 31,2 % (p<0,05). Вміст ТБК-позитивних продуктів у ЕР був нижчим на 35,3 % (p<0,01) у щурів 2-ої групи, ніж у тварин, яким згодовували β-каротин. Слід відзначити, що при згодовуванні тваринам біомаси дріжджів виявили нижчу активність СОД у клітинах ЕР на 31,5 % (p<0,01), а у клітинах ГМР – каталази на 32,8 % (p<0,05) при меншому вмісті продуктів пероксидного окиснення ліпідів у цих клітинах.

Таким чином, аналіз отриманих даних дозволяє зробити висновок, що біомаса дріжджів *P. rhodozyma* позитивно впливає на активність антиоксидантної системи у клітинах кісткового мозку червоного і білого рядів. Введений у раціон щурів β-каротин може діяти не тільки як анти- але і як прооксидант, що зумовлено дозою препарату, наявністю низькомолекулярних антиоксидантів, активністю ферментів системи антиоксидантного захисту, специфікою метаболізму у клітинах [13]. Одним із важливих факторів, який впливає на вільнорадикальні процеси у клітинах кісткового мозку, є висока концентрація іонів заліза, які сприяють генерації гідроксильних радикалів. Експериментальні дані свідчать, що за наявності іонів металів змінної валентності, каротиноїди можуть як зменшувати, так і збільшувати вихід вільних радикалів, залежно від потенціалу окиснення каротиноїду та природи радикалу. Найвищу прооксидантну активність в реакції Фентона проявляв β-каротин, який має найнижчий потенціал окиснення серед інших каротиноїдів [12]. Окиснені форми каротиноїдов – ксантофіли, до яких відноситься астаксантин, не проявляють прооксидантних властивостей [13].

Коригуюча дія біомаси дріжджів на перекисні процеси, очевидно, зумовлена комплексом факторів, зокрема і наявністю каротиноїду астаксантину, який проявляє значно вищу антиоксидантну дію, ніж β-каротин [5]. На антиоксидантні властивості біомаси дріжджів *P. rhodozyma,* окрім каротиноїдів, можуть впливати й інші біологічно активні речовини клітин. Так, у цих дріжджів виявлено сильний антиоксидант фафіаол, який за хімічною будовою є 2,4-диметокси-6-гептадецилфенолом. Антиоксидантна активність фафіаола у моделях з еритроцитарними мембранами була такою ж, як і у α-токоферолу [14]. Захисну дію від пошкодження вільними радикалами можуть компоненти клітинної стінки дріжджів, оскільки встановлено, що олігосахариди можуть захищати клітини печінки мишей від ушкодження ТХМ [15].

Висновки

При згодовуванні щурам біомаси каротиносинтезувальних дріжджів *P. rhodozyma* у клітинах кісткового мозку еритроїдного і гранулоцитарно-моноцитарного рядів знижується: концентрація дієнових кон'югатів і тіобарбітуратактивних сполук. Введення у раціон щурів β-каротину проявляє неоднозначну дію: приводить до зменшення вмісту дієнових кон'югатів та ТБК-позитивних сполук у клітинах білого ряду, але підвищує рівень дієнових кон'югатів і активність глютатіонпероксидази у червоному ряді клітин.

M. I. Kolisnyk, V. V. Vlizlo

STATE OF ANTIOXIDATIVE SYSTEM IN RAT'S BONE MARROW CELLS DURING FEEDING WITH YEASTS *PHAFFIA RHODOZYMA* BIOMASS.

S u m m a r y

The influence of β-carotene and carotenoproducing yeasts *P. rhodozyma* biomass on lipid peroxidation and antioxidative enzymes activity in rats' bone marrow was studied. It was established that the addition of yeast *P. rhodozyma* biomass decreases superoxide dismutase and catalase activity and diminishes accumulation of primary and secondary products of lipid peroxidation in bone marrow cells. Feeding with β-carotene makes an ambiguous impact. Thus concentration of TBA-reactive substances decreases in white blood cells but level of diene conjugate and gluthathione peroxidase activity increases in red blood cells.

The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine.
М. И. Колиснык, В. В. Влизло

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ СКАРМЛИВАНИИ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ *PHAFFIA RHODOZYMA*

А н н о т а ц и я

Исследовано влияние биомассы каротиносинтезирующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и β-каротина на показатели процессов перекисного окисления липидов и активность ферментов системы антиокислительной защиты у клетках костного мозга крыс. Установлено, что введение у рацион животных биомассы дрожжей *P. rhodozyma* снижает активность супероксиддисмутазы, каталазы и уменьшает накопление первиичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов у клетках костного мозга. Скармливание крысам β-каротина оказывает различное действие: у клетках гранулоцитарно-моноцитарного ряда снижает концентрацию тиобарбитуратактивных соединений, но повышает содержание диеновых коньюгатов и активность глутатионпероксидазы в эритроидном ряде клеток.

1. *Турпаев К. Т.* Активные формы кислорода и регуляция экспресии генов [Текст] / К. Т. Турпаев. // 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 [Текст] / Е. Е. Дубинина. // Вопросы мед. хим. – 2001. – 76, №6. – С.136-141.

3. *Гуніна Л. М.* Оксидативний стрес і його роль в канцерогенезі [Текст] / Л. М. Гуніна, С. А. Олійник. // Фізіол. журн. – 2006. – Т. 52, № 4. – С. 78-89.

4. *Куртяк Б.М.,* Янович В.Г. Жиророзчинні вітаміни у ветеринарній медицині і тваринництві [Текст] / Б.М. Курток, В. Г. Янович – Львів: Тріада плюс, 2004. – 426 с. – 500 пр. – ISBN -966-7596-39-7.

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

6. *Сибирная Н. А.* Метод фракционирования клеток костного мозга в градиенте смесей фикола и верографина [Текст] / Н. А. Сибирная, Б. Ф. Сухомлинов, М. В. Хмиль. // Лаб. дело. – 1991. – №4. – С. 24 – 25.

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

8. *Романова Л. А.* Современные методы в биохимии [Текст] моногр. / Л. А. Романова, И. Д. Стальная; за ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С.63 – 64.

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

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

11. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процесах клетки и метод определения ее в биологических матеріалах [Текст] / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей. // Лаб. дело. – 1985. – №11. – С.678 – 681.

12. *Поляков Н. Э.* Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексообразование [Текст] / Н. Э. Поляков, Т. В. Лешина. // Успехи химии. – 2006. – Т.75, № 12. – С. 1175 – 1192.

13. *Martin H. D.* Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions [Текст] / H. D. Martin, C. Ruck, M. Schmidt, S. Sell, S. Beutner, B. Mayer, R. Walsh. // Pure Appl. Chem. – 1999. – Vol. 71, №. 12. – P. 2253 – 2262.

14. *Jinno S.* Phaffiaol, a new antioxidant isolated from a yeast *Phaffia rhodozyma* [Текст] / S. Jinno, K. Hata, N. Shimidzu, T. Okita // J. Antibiot. – 1998. – Vol. 73, №5. – P.508 – 511.

15. *Yang Y.* Protective effects of chitosan oligosaccharide and its derivatives against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice [Текст] / Y.Yang, W. Liu, B. Han, B. Liu, C. Fu // Hepatol. Res. – 2006. – Vol.35, №3. – P.178 – 184.