

АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНИХ ФЕРМЕНТІВ В РАНЬОМУ ПОСТНАТАЛЬНОМУ ОНТОГЕНЕЗИ ПОРОСЯТ ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ КОМПЛЕКСНИХ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК ЕСЕНЦІЙНИХ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

С. О. Шаповалов

Інститут тваринництва НААН України, м. Харків

Проведено комплексне вивчення компонентів антиоксидантної системи. Отримані дані показують різке зниження рівня внутрішньоклітинного GSH, зміна співвідношення між відновленої і окисленої його формами. Наслідком порушення роботи АОС за умов розвитку природної мікроцитарної анемії в ранньому постнатальному онтогенезі поросят є посилення вільнорадикального окислення ліпідних і білкових компонентів еритроцитарної мембрани, що виражається в зміні проникності і сорбційної здатності еритроцитів. Результати дослідження свідчать про те, що для корекції метаболічних порушень необхідна введення полі ядерних комплексів есенційних мікроелементів для підвищення антиоксидантного статусу організму поросят у ранньому постнатальному онтогенезі.

Ключові слова: АНТИОКСИДАНТИ, ГЛУТАТІОН, ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНІ ФЕРМЕНТИ, МІКРОЕЛЕМЕНТИ, ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, ПОРОСЯТА

Аутоокислення в клітині гальмується антиоксидантною системою [4, 8]. Ця система включає біоантиоксиданти, інгібуючі окислення на початковій стадії утворення вільних радикалів ліпідів (токоферол) або активних форм кисню (супероксиддисмутаза) [6]. Антирадикальне інгібування здійснюється ланцюгом: глутатіон (ерготіонеїн–сірковмісних бетаїн) — аскорбат–токоферол, що транспортує електрони (у складі атомів водню) від піридиннуклеотидів (НАДН і НАД Н) проти вільних радикалів. Таким чином забезпечується стаціонарний вкрай низький рівень вільнорадикальних станів ліпідів та біополімерів в клітині [14]. Поряд з ланцюгом біоантиокислювачі, представленої переважно вітамінами антиоксидантної дії, в системі інгібування вільнорадикального окислення в живій клітині беруть участь ферменти, що здійснюють окислювально-відновну перетворення глутатіону і аскорбату [1, 7]. У регуляції вільнорадикального ушкодження одне із найважливіше місць займає система глутатіону. Відновлений глутатіон (ВГ), як один з головних компонентів системи антиоксидантного захисту (АОЗ), здатний реагувати з вільними радикалами, інгібувати перекисне окислення ліпідів. У системі захисту клітин від надлишку активних форм кисню функції ВГ найчастіше здійснюються за допомогою ферментативного ланки, представленого спектром глутатіон-залежних ферментів [2, 3]. Функція обох механізмів, за допомогою яких діє антиоксидантна система, здійснюється як ланцюгом біоантиоксидантів, так і групою антиперекисних ферментів, і залежить від загального фонду атомів водню (НАДН і НАД Н). Тіолові біоантиоксиданти — цистеїн або ерготіонеїн (глутатіон) — у фізіологічній антиоксидантній системі переважно виконують роль відновників окисленої форми аскорбату за рахунок передачі відновлювальних еквівалентів від фонду НАДН + НАДН. До антиоксидантів непрямої дії відноситься рибофлавін, що є компонентом глутатіонредуктази [5, 15]. Глутатіонпероксидаза (ГП) каталізує реакцію окислення глутатіону і відповідно дезактивацію пероксиду водню, а також розкладає гідроперокси ліпідів з малим розміром молекул [16]. Зворотне відновлення глутатіону відбувається за

участю глутатіонредуктази (ГР). Глутатіон-S-трансфераза (ГТ), використовуючи відновлений глутатіон, відновлює гідрофобні гідропероксидів з великим об'ємом молекул гідропероксиду полінасичених жирних кислот, мононуклеотидов та інших токсичних продуктів перекисного окислення ліпідів.

Метою цього дослідження було вивчення тіол сульфідного статусу еритроцитів та оцінка активності глутатіонзалежних ферментів в еритроцитах поросят в ранньому постнатальному онтогенезі за умов введення препарату «Біотам».

Матеріали і методи

Було сформовано 2 групи клінічно здорових поросят за принципом аналогів. Було сформовано 2 групи клінічно здорових поросят за принципом пар-аналогів (вік, маса, стать) по 6 голів у кожній. Всі групи перебували на підсосі в однакових умовах утримання. Тварин дослідної групи фарбували стійким червоним барвником та щоденно вводили на 2, 7, 21, 30-ту добу 20 мг на 1 кг маси тіла препарат «Біотам», що містить композицію мікроелементів, у якій знаходяться індивідуальні комплекси металів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} з N-2,3-диметилфенілантраніловою (мефенаміною) кислотою. Вміст мікроелементів у 1 грамі: Zn^{2+} — 17 мг, Cu^{2+} — 3,7 мг, Co^{2+} — 0,35 мг, Cr^{3+} — 0,3 мг, Fe^{3+} — 14,5 мг, Mn^{2+} — 4 мг, N-2,3-диметилфенілантранілової кислоти — 412 мг, глюконат кальцію — 180 мг, та крохмаль, цукор, аеросил до 1 г.

Таким чином дослідній групі було додатково уведено протягом досліду 500 мг препарату на кожну голову.

Вивчали 5 показників системи глутатіону крові, які вважаємо достатніми для оцінювання стану ферментативного тіол-антиоксидантного захисту й моніторингу здійснення антиоксидантної функції в організмі. В еритроцитах визначали концентрацію відновленого (GSH) та окисненого (GSSH) глутатіону і активність трьох ферментів його метаболізму: глутатіонпероксидази (ГПО) К.Ф.11.1.9, глутатіонредуктази (ГР) К.Ф.1.6.4.2, глутатіонтрансферази (ГТ) К.Ф.2.5.18. Визначення вмісту глутатіону в тканинах проводили за Штурманом Ц.М. сектроскопічно з утворенням забарвленого комплексу «аллоксан-305» [9]. Вміст глутатіону в тканинах виражали в мг%. Визначення форм глутатіону в крові проводили за методом Вудварда і Фрі, описаному Петрунькіною А. М. [10]. Вміст глутатіону в еритроцитах виражали в мг/мл. Глутатіонпероксидазну активність в тканинах оцінювали спектрофотометрично [11] при $\lambda = 340$ нм ($37^\circ C$) у спряженій системі з гідроперекисом кумолу як субстрату. Активність виражали в U/годину/мг білка, або нМ окисненого NADPH/хв/мкг гемоглобіну еритроцитів. Глутатіонредуктазну активність в еритроцитах визначали спектрофотометрично [12] при $\lambda=340$ нм ($37^\circ C$) з окисленим глутатіоном як субстратом. Активність ферменту виражали в нМ окисненого NADP/хв×мг гемоглобіну еритроцитів. Глутатіонтрансферазну активність в еритроцитах визначали спектрофотометрично [13]. Кінетику утворення кон'югованого GSH вимірювали при $\lambda=340$ нм ($25^\circ C$) по утворенню кон'югатів GSH з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ). Активність виражали в мкМ ХДНБ/хв/1 мг гемоглобіну еритроцитів.

Результати й обговорення

У результаті застосування моделі природного стресового еритропоезу (розвиток мікроцитарної анемії) та його корекція мікроелементною композицією на основі органічних поліядерних комплексів було показано (табл. 1), що активність ГПО в контрольній групі знижується майже у 2 рази, але на 35 добу підвищується на 60 %. Підвищення ГПО з 14 по 35 добу відбувається на 21 %. Аналогічна картина спостерігається щодо активності ГР, яка знижується на 14 добу на 80 %, а на 35 добу підвищується на 60 %, збільшення активності ГР

з 14 по 35 добу відбувається на 28 %. В той ж час активність ГТР протягом дослідю постійно збільшується: так з 7 по 14 добу на 14 %, з 7 по 35 добу на 26 %, а з 14 по 35 добу на 60 %.

Таблиця 1

Вміст глутатіону в крові за умов використання препарату «Біотам», мг%

Назва ферменту	Доба визначення		
	7	14	35
	<i>Контроль</i>		
Глутатіонпероксидаза, нМ NADPH/хв./мкгHb RBS	2,14 ± 0,14	1,09 ± 0,15	2,71 ± 0,07
Глутатіонредуктаза, нМ NADPH/хв./мг Hb RBS	1,11 ± 0,09	0,62 ± 0,04	1,54 ± 0,13
Глутатіонтрансфераза, мМ ДХНБ/хв./мг Hb RBS	17,31 ± 2,14	20,15 ± 1,16	23,41 ± 1,07
	<i>Дослід</i>		
Глутатіонпероксидаза, нМ NADPH/хв./мкгHb RBS	2,28 ± 1,19	2,01 ± 0,04*	4,39 ± 0,15*
Глутатіонредуктаза, нМ NADPH/хв./мг Hb RBS	1,28 ± 0,12	0,94 ± 0,02*	1,98 ± 0,07*
Глутатіонтрансфераза, мМ ДХНБ/хв./мг Hb RBS	23,75 ± 1,95*	24,32 ± 2,19*	26,31 ± 1,31*

Примітка: * P ≤ 0,05 відносно контрольної групи

У дослідній групі активність ГПО на 14 добу знизилася на 13 %, а до 35 доби піднялася на 50 %. Активність ГР мала таку ж тенденцію, що і ГПО, але до 35 доби піднялась на 35 %. Одночасно з цим спостерігалася тенденція до підвищення активності ГПО та ГР в дослідній групі в порівнянні з контрольною. Активність обох ферментів ГПО та ГР з 14 по 35 добу підвищилася на 50 %. Відомо, що активність ГПО лімітується доступністю відновленого глутатіону, кількість якого залежить від вмісту НАДФН і, отже, від роботи пентозофосфатного циклу. Активність ГТР поступово підвищувалася протягом дослідю. Так на 14 добу її активність була вищою на 2 %, а на 35 на 10 %. В порівнянні активності ГПО контрольної та дослідної групи можна констатувати, що протягом дослідю на 7, 17 та 35 добу активність була вищою в 2 рази, активність ГР на 7, 17 та 35 добу була вищою відповідно на 14 %, 34 %, 22 %. Проте, активність ГТР 7, 17 та 35 була вищою відповідно на 27 %, 17 %, 11 %, але мала тенденцію в порівнянні досліджуваних груп до зниження.

Подальші дослідження були направлені на визначення умісту відновленого та окисненого глутатіону в еритроцитах крові поросят в умовах напруженого (стресового) еритропоезу (табл. 2). У порівняльному аспекті вмісту глутатіону в цільній крові та еритроцитах було показано наступне: рівень загального глутатіону був вищим в еритроцитах на 7, 14, 35 добу в 2,26, 2,80, 2,30 разів відповідно, рівень відновленого глутатіону був вищим в еритроцитах на 7, 14, 35 добу в 2,40, 2,84, 2,76 разів відповідно, рівень окисненого глутатіону був вищим в еритроцитах на 7, 14, 35 добу в 1,64, 2,64, 1,02 разів відповідно, рівень тіолдисульфідного статусу глутатіону був вищим в еритроцитах на 7, 14, 35 добу в 1,46, 1,08, 2,71 раза відповідно (P ≤ 0,05). За умов характеристики тіолдисульфідної системи (як білкових, так і низькомолекулярних її компоненти) показано, що вона в ранньому постнатальному онтогенезі поросят реагує на прояву мікроцитарних анемії зміною свого окислювально-відновного стану, який можна характеризувати співвідношенням концентрації HS-i-SS-груп (HS / SS), або тіолдисульфідним співвідношенням (ТДС).

Вміст глутатіону в крові за умов використання препарату «Біотам», мг%

Пул глутатіону	Контрольна група			Дослідна група		
	7 доба	14 доба	35 доба	7 доба	14 доба	35 доба
	<i>Еритроцити</i>					
Загальний	43,70±2,15	43,68±0,98	23,92±3,17	56,87±2,11*	46,53±1,12*	38,20±2,64*
Відновний	38,12±2,35	35,11±4,16	21,12±3,14	52,11±4,17*	41,15±1,18*	36,18±2,25*
Окиснений	5,58±0,09	8,57±2,10	2,8±0,02	4,76±0,07*	5,38±1,01	2,02±0,01*
ТДС (HS/SS)	6,83±1,04	4,10±0,08	7,54±2,4	10,95±0,08*	7,65±0,07*	17,91±1,4*

Примітка: * $P \leq 0,05$ відносно контрольної групи.

Чим більше вихідна величина ТДС, тобто чим більше буферна ємність цієї системи, тим вище рівень резистентності організму. Таким чином було показано, що в крові вона на 35 добу в еритроцитах дещо збільшується. Можливо на 35 добу формується регуляторні механізми, здатні накопичувати в еритроцитах відновлену форму глутатіону завдяки активації глутатіонсинтетази. В той же час у плазмі як депо міжклітинної та між рідинної речовини на 35 добу ТДС залишається достатньо низькою. Що стосується впливу препарату, то показано, що в дослідній групі вже на 7 добу рівень окисного глутатіону зменшується на 17 %, на 14 добу на 60 %, а на 35 добу на 38 %. Таким чином в еритроцитах більш активно накопичується саме відновна форма глутатіону — більше на 41 % в порівнянні з 7 добою. Рівень ТДС в еритроцитах крові поросят підвищувався на 7, 14, 35 добу на 37 %, 56 %, 47 % відповідно ($P \leq 0,05$). Якщо ТДС може служити інтегральним показником адаптивних можливостей організму, або показником його неспецифічної резистентності, то можна припустити, що введення препарату в ранньому постнатальному онтогенезі обумовлює його адаптогенні та імуномодельюючі властивості.

Падіння рівня внутрішньоклітинного GSH відбувалося як контрольній та к дослідній групі незважаючи на те, що активність глутатіонредуктази, що здійснює регенерацію GSH за рахунок відновлення його окисленої форми, була в ці періоди підвищеної. Можливо, в еритроцитах напруженого еритропоезу витрати GSH на захист SH-груп білків, участь у детоксикації продуктів переокисного окиснення ліпідів, а також H_2O_2 , превалює в порівнянні з тією кількістю, яка регенерується в ході глутатіонредуктазної реакції і утворюється при його біосинтезі. На користь посиленої використання GSH в клітинах свідчать дані про істотне підвищення активності ферментів метаболізму глутатіону — ГП і ГТ — на 35-ту добу досліду. У цілому в дослідній групі простежується активізація глутатіонової ланки захисту ліпідів еритроцитарних клітин від пероксидації.

Висновки

У даній роботі проведено комплексне вивчення компонентів антиоксидантної системи. Отримані дані показують різке зниження рівня внутрішньоклітинного GSH, зміна співвідношення між відновленої і окисленої його формами. Наслідком порушення роботи АОС за умов розвитку природної мікроцитарної анемії в ранньому постнатальному онтогенезі поросят є посилення вільнорадикального окислення ліпідних і білкових компонентів еритроцитарної мембрани, що виражається в зміні проникності і сорбційної здатності еритроцитів. Результати дослідження свідчать про те, що для корекції метаболічних порушень необхідна введення полі ядерних комплексів есенційних мікроелементів для підвищення антиоксидантного статусу організму поросят в ранньому постнатальному онтогенезі. Аналіз отриманих даних показав, що для повноцінної реалізації

основних функцій системи глутатіону, таких як підтримка тіолдисульфідної рівноваги, антиоксидантного захисту і кон'югація ендogenous метаболітів необхідно наступні чинники: достатній рівень відновленого глутатіону; адекватна активність ферментів антиоксидантного захисту; наявність енергетичних ресурсів для здійснення рециркулювання відновленого глутатіону і процесів кон'югації.

C. O. Shapovalov

THE ACTIVITY GLUTATHIONE-DEPENDENT ENZYMES IN EARLY ONTOGENESIS OF PIGLETS AT INTRODUCTION OF COMPLEX ORGANIC COMPOUNDS OF ESSENTIAL TRACE ELEMENTS

S u m m a r y

The complex study of components of the antioxidant system is conducted. Finding show the fall-off of level of GSH, change of ratio between its recovered and oxidized by his forms. By investigation of violation of work of AOC at terms development of natural anaemia in early ontogenesis of piglets strengthening of free-radical oxidization of protein components membranes which are expressed in the change of permeability and sorbent ability of erythrocytes. Research results testify that for the correction of metabolic violations introduction of complexes of essential trace elements is needed for the increase of antioxidant status of organism of piglets in early postnatal ontogenesis

C.O. Шаповалов

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПОРОСЯТ ПРИ ВВЕДЕНИИ КОМПЛЕКСНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ЭСЕНЦИЙНЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Проведено комплексное изучение компонентов антиоксидантной системы. Полученные данные показывают резкое снижение уровня внутриклеточного GSH, изменение соотношения между восстановленной и окисленной его формами. Следствием нарушения работы АОС при условиях развития естественной микроцитарной анемии в раннем постнатальном онтогенезе поросят отмечено усиление свободнорадикального окисления липидных и белковых компонентов эритроцитарной мембраны, которые выражаются в изменении проницаемости и сорбционной способности эритроцитов. Результаты исследования свидетельствуют о том, что для коррекции метаболических нарушений необходимо введение комплексных соединений эссенциальных микроэлементов для повышения антиоксидантного статуса организма поросят в раннем онтогенезе.

1. *Зенков Н. К.* Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н. К. Зенков, Е. Б. Меньшикова // *Успехи современной биологии.* — 2004. — Т.113. — № 1. — С. 286–296.

2. *Ковальчук В. И.* Коррекция липидного состава мембран эритроцитов антиоксидантами у детей с острыми гнойными заболеваниями / В. И. Ковальчук, Б. И. Мацкевич // *Система транспорта кислорода.* — 2004. — № 1. — С. 55–61.

3. *Козлов Ю. П.* Биоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии / Ю. П. Козлов, В. Е. Каган. — Черноголовка : Буква, 2006. — 76 с.

4. *Меньшикова Е. Б.* Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты \ Е. Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков с соавт. — М. : Фирма «Слова», 2006. — 556 с.

5. *Чернов Н. Н.* Глутатионредуктаза / Н. Н. Чернов // Белки и пептиды : В 2-х т. ; под ред. В. Т. Иванова, В. М. Липкина. — М. : Наука, 1995. — С.78–83.
6. *Колесниченко Л. С.* Система глутатиона эритроцитов и плазмы в патологии : 3 съезд биохим. Общества : тезисы. / Колесниченко Л. С., Кулинский В. И. — С-Пб, 2002. — С. 178.
7. *Кулинский В. И.* Молекулярные механизмы действия гормонов. Рецепторы. Нейромедиаторы. Системы со вторыми посредниками / Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Биохимия. — 2005. — Т. 70. — № 1. — С. 33–50.
8. *Николадзе М. Г.* Диагностика и профилактика анемии и иммунной недостаточности у поросят : автореферат диссертации кандидата вет.наук. / Николадзе М. Г. — Витебск, 2002. — 19 с.
9. *Штурман Ц. М.* Метод определения глутатиона / Штурман Ц. М., Артюх В. П. // Укр. биохим. журн. — 1970. — Т. 42, № 6. — С. 747–751.
10. *Петрунькина А. М.* Практическая биохимия / Петрунькина А. М. — Л. : Медгиз, 1961. — С.152–154.
11. *Надиров Н. К.* Влияние витамина Е из отходов переработки хлопкового масла на глутатионпероксидазную активность систему крыс / Надиров Н. К., Ленская Е. Н., Айдарханов Б. Б. // Прикладная биохимия и микробиология. — 1986. — Т.21, № 6. — С.834–839.
12. *Панченко Л. Ф.* Повышение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы крыс при введении фенобарбитала / Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Коон Я. М. и др. // Фармакол. и токсикол. — 1975. — Т. 28, N3. — С. 334–337.
13. *Younes M.* Glutathione-S-transferase activity in rat liver: effect of some factors in fluent cling the metabolism of xenobiotics / Younes M., Schlichting R., Siegers C.-P. // Pharmacol. Res. Commun. — 1990. — N 2. — P.115–129.
14. *Arthur J. R.* Functional indicators of iodine and selenium status / J. R. Arthur // Proc. Nutr. Soc. — 1999. — № 58 — P. 507–512.
15. *Hayes J. D.* Glutathionetransferases / Hayes J. D., Flanagan J. U., Josef I. R. // Annu. Rev. Pharmacology. Toxicology. — 2005. — Vol.45. — P.51–88.
16. *Hayes J. D.* Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-coordinately regulated defense against oxidative stress / J. D. Hayes, L. I. McClellan // Free Radars. 1999. — Vol. 31. — P. 273–300.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення ВРХ, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. наук І. В. Вудмаска.