

УДК 636.92:636:612

РОЛЬ Н.В., аспірантка

ЦЕХМІСТРЕНКО С.І., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ПОКАЗНИКИ АКТИВНОСТІ ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНИХ ЕНЗИМІВ У ТКАНИНАХ МОЗКУ КРОЛІВ

У тканинах мозку кролів новозеландської породи вивчали вміст відновленого глутатіону, активність ферментів глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази. Встановлено динаміку змін вмісту відновленого глутатіону, активностей глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази в тканинах мозку кролів новозеландської породи у віці 1, 15, 30, 45, 60, 75 та 90 діб. Відмічено зростання активності глутатіон-S-трансферази у 2,4 рази, у той час як активність глутатіонредуктази у 90-добовому віці знизилась у 5 разів. Найвищий вміст відновленого глутатіону в тканинах мозку кролів був у 75-добовому віці – $1,99 \pm 0,01$ ммоль/г. Виявлені зміни показників свідчать про активну участь глутатіонової системи у формуванні адаптивної відповіді організму на дію різних стресових чинників у різному віці.

Ключові слова: антиоксидантна система, відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, мозок, кролі.

Постановка проблеми. Кролівництво – перспективна галузь сільського господарства, яка забезпечує населення дієтичним м'ясом. В умовах високоінтенсивної промислової технології ведення галузі практично неможливо уникнути впливу стресових чинників, таких як відлучення, зміна типу годівлі. В патогенезі стресу лежить гіперпродукція активних форм кисню (АФК) біоенергетичними і нейрохімічними системами головного мозку. Мозок займає перше місце серед тканин за кількістю споживаного кисню на одиницю ваги; цей рівень такий великий, що перетворення в супероксидний радикал тільки 0,1 % метаболізованого нейронами кисню може виявитись токсичним для нього. Таким чином, антиоксидантна система мозку має порівняно невеликий запас міцності і дефіцит її компонентів дуже небезпечний для функціональної активності нейронів [1, 5].

Особливе значення при антиоксидантному захисті належить глутатіоновій антиоксидантній системі. Компонентами цієї системи є метаболіт глутатіон та ферментативна ланка, а саме: глутатіонпероксидаза (ГПО), глутатіонтрансфераза (ГТ) та глутатіонредуктаза (ГР). Відновлена форма глутатіону (ВГ) за участю НАДФ·Н під впливом ГПО взаємодіє з вільними радикалами та інактивує токсичну дію вільних радикалів внаслідок окиснення глутатіону. Відновлюється окиснений глутатіон під впливом ГР, яка індукується за умов оксидативного стресу [6, 7].

Корекція активності глутатіонзалежної ензимної системи відкриває нові перспективи у вирішенні проблеми підвищення адаптивних і компенсаторних можливостей організму, відновлення гомеостазу в життєво важливих біохімічних системах в умовах патології, розширення меж адекватності сприйняття того чи іншого несприятливого фактора впливу на організм.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Порівняно мало вивчені вікові та статеві особливості стану антиоксидантної системи кролів. Аналіз даних літератури свідчить про те, що рівень GSH, активності ГПО, ГР, Г-S-T – ензимів синтезу і катаболізму GSH можуть використовуватись як критерії оцінки впливу на організм оксидативного стресу [2, 10, 11].

Мета роботи – вивчення змін активності глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази та рівня відновленого глутатіону в тканинах мозку кролів новозеландської породи у різні вікові періоди.

Матеріал та методи досліджень. Експериментальні дослідження виконані на кролях новозеландської породи. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики, законодавчих норм і вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Матеріалом для досліджень був гомогенат з тканин мозку кролів. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали за рівнем утворення тіонітрофенольного аніону в результаті взаємодії HS-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс,2-нітробензойною кислотою

(ДТНБК) [9]. Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутілу за допомогою кольорової реакції з ДТНБК, внаслідок чого утворюється забарвлений продукт – тіо-нітрофенольний аніон [4]. Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) визначали за зниженням вмісту НАДФ·Н за температури 37 °С протягом 1 хвилини [3]. Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення кон'югату за реакції з 1-хлор-2,4-динітробензолом [8].

Одержані результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Office Excel з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідно різними вважалися результати за $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. У ході дослідження встановлено, що найвищий вміст відновленого глутатіону в тканинах мозку кролів був у 75-добовому віці – $1,99 \pm 0,01$ ммоль/г (рис. 1).

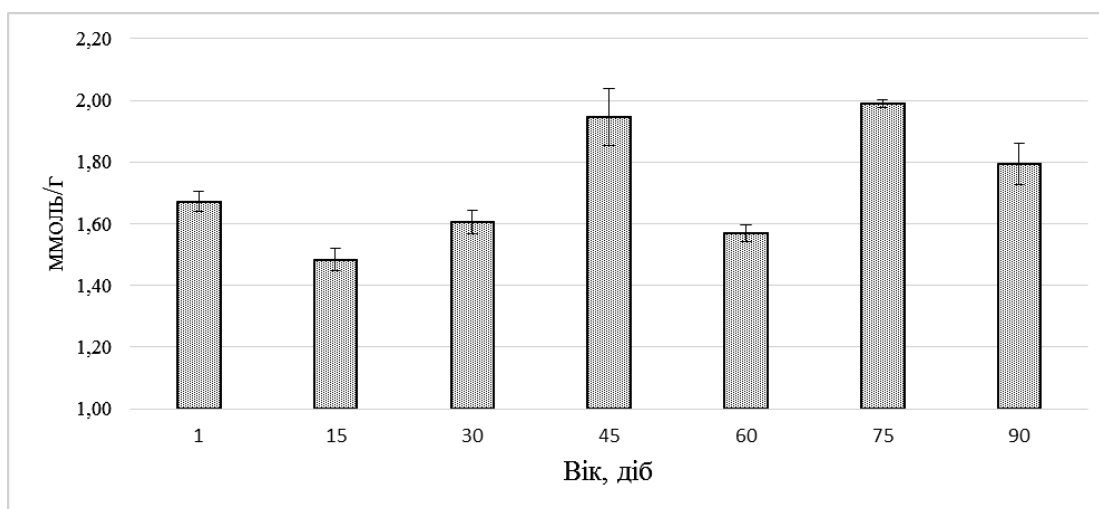


Рис. 1. Динаміка вмісту відновленого глутатіону у мозку кролів новозеландської породи ($M \pm m$, $n=5$, ммоль/г).

Примітка: тут і далі в таблиці 1* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – порівняно з попереднім віком.

Відновлений глутатіон є основним компонентом глутатіонової ланки антиоксидантної системи, який швидко мобілізується за підвищення вмісту пероксидів та відновлює їх у реакції, що супроводжується утворенням окисненого глутатіону (GSSG), який токсичний для клітин. Вміст GSH в середині клітини залежить від збалансованості швидкості таких протилежно спрямованих процесів, як синтез *de novo* за участю γ -глутаміл-цистеїнсинтетази і виведення у позаклітинний простір та регенерацію за рахунок відновлення GSSG і використання у нейтралізації H_2O_2 .

Таблиця 1 – Активність глутатіонзалежних ензимів у мозку кролів різного віку ($M \pm m$, $n=5$)

Вік, діб	Глутатіонзалежні ензими		
	ГПО, ммоль/хв·г	ГР, мкмольНАДФ·Н/хв·г	Глутатіон-S-трансфераза, мкмоль/хв·г
1	24,59 \pm 0,366***	4,38 \pm 0,947	38,48 \pm 3,449
15	23,46 \pm 0,226	3,07 \pm 0,846*	43,34 \pm 5,420
30	23,68 \pm 0,548	2,88 \pm 0,233	59,14 \pm 9,022*
45	24,43 \pm 0,098*	2,14 \pm 0,485***	61,98 \pm 11,504
60	24,22 \pm 0,278	1,60 \pm 0,211	76,16 \pm 7,964
75	24,29 \pm 0,391	1,52 \pm 0,276**	83,85 \pm 12,577***
90	24,48 \pm 0,151	0,88 \pm 0,192	91,55 \pm 1,402**

Глутатіонпероксидаза відновлює органічні гідропероксиди – до гідросполук та H_2O_2 до води, а також перериває ланцюгові реакції внутрішньоклітинного переокиснення. Високий рівень активності ГПО можливий лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного GSH, який виконує роль не лише субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для

постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, що окислюються у процесі глутатіонпероксидазної реакції.

Активність ГПО в тканинах мозку кролів знижувалась у 15- і 30-денному віці та становила $23,46 \pm 0,23$ і $23,68 \pm 0,55$ ммоль/хв·г відповідно. Не виключено, що поступове зниження глутатіонпероксидазної активності у цей період зумовлене вичерпанням доступного пулу GSH та накопиченням продуктів ліпопероксидації. Починаючи з 45-ї доби активність ГПО зростала і у 90-добовому віці майже сягнула початкового рівня.

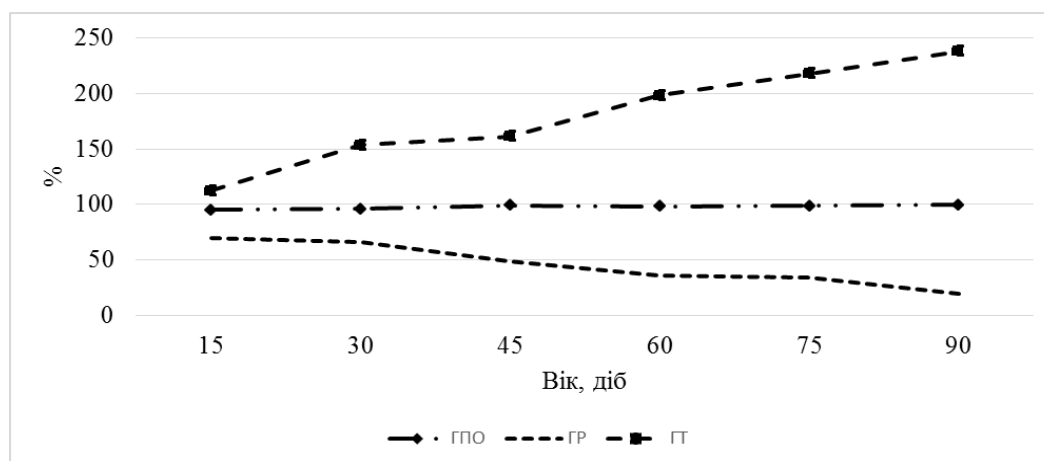


Рис. 2. Активність глутатіонзалежних ензимів у мозку кролів новозеландської породи порівняно з показниками в однодобовому віці ($M \pm m$, $n=5$, %).

Відмічено зниження активності глутатіонредуктази у 90-добовому віці майже у 5 разів порівняно з показниками однодобових кроленят. Найбільш ймовірною причиною зниження активності ферменту з віком є недостатня регенерація НАДФ у пентозофосфатному шляху окиснення глюкози. Нормальне функціонування у клітині НАДФ-Н-залежної глутатіонредуктази є дуже важливим для запобігання окисному ушкодженню мітохондрій, які неспроможні синтезувати глутатіон *de novo* і тому залежать від інтенсивності відновлення глутатіонредуктазою окисненого глутатіону та його надходження з цитозолу крізь зовнішню мітохондріальну мембрану.

Відмічено зростання активності глутатіонтрансферази протягом всього періоду дослідження. У 45-добовому віці активність ГТ збільшилась у 1,6 рази, а у 90-добовому майже у 2,4 рази. Підвищення ензимної активності ГТ може свідчити про активацію процесів знешкодження продуктів пероксидного окиснення ліпідів та є компенсаторним процесом, спрямованим на інактивацію реакційних метаболітів ендогенної природи. Глутатіонтрансфераза, використовуючи GSH, який запобігає токсичній дії радикальних форм кисню та електрофільних метаболітів, забезпечує значну частину реакцій кон'югації.

Висновки та перспективи подальших досліджень. За результатами досліджень були отримані дані з динаміки змін основних компонентів глутатіонової ланки системи антиоксидантного захисту в організмі кролів новозеландської породи різного віку. Відмічено зростання активності глутатіон-S-трансферази у 2,4 рази, у той час як знижувалась активність глутатіонредуктази. Одержані результати свідчать, що ферментативна ланка глутатіонової системи бере безпосередню участь у формуванні адаптивної відповіді організму на дію різних стресових чинників. Корекція активності глутатіонзалежної ензимної системи відкриває нові перспективи у вирішенні проблеми підвищення адаптивних і компенсаторних можливостей організму, відновлення гомеостазу в життєво важливих біохімічних системах в умовах стресу, розширення меж адекватності сприйняття того чи іншого несприятливого фактора впливу на організм. Дослідження ролі глутатіону в біохімічних механізмах розвитку патології дозволить намітити напрями пошуків нових засобів, що регулюють рівень відновленого глутатіону й на цій основі підвищити ефективність промислового вирощування кролів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аджиев Д.Д. Исследование продуктов перекисного окисления липидов, неферментативной и ферментативной антиоксидантной системы в возрастной динамике самцов кроликов / Д.Д. Аджиев // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14, № 4. – С. 674–684.

2. Искра Р.Я. Активність антиоксидантної системи в організмі кролика за дії сполук хрому / Р.Я. Искра // Біологічні студії / *Studia biologica*. – 2012. – Т. 6, № 1. – С. 77–86.
3. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич та ін. За ред. В.В. Влізла. – Львів: Сполом, 2012. – 762 с.
4. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // *Лаб. дело*. – 1986. – № 12. – С. 724–727.
5. Родинський О.Г. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи структур головного мозку щурів різного віку з експериментальним цукровим діабетом / О.Г. Родинський, В.А. Гузь, Л.В. Гузь // *Експерим. та клінічна фізіологія і біохімія*. – 2010. – № 3. – С. 12–17.
6. Руденко В.В. Вікові особливості зміни активності глутатіон-S-трансферази в мозку щурів при іммобілізаційному стресі / В.В. Руденко // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: «Біологія»*. – 2007. – Вип. 6, № 788. – С. 157–164.
7. Салига Ю. Глутатионова система еритроцитів щурів, інтоксикованих хлорпірифосом / Ю. Салига, В. Росаловський, Р. Федяков // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. – 2012. – Вип. 60. – С. 99–104.
8. Habig W.H. Glutathin-S-trnferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jacoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249, № 22. – P. 7130–7139.
9. Hissin P.J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / P.J. Hissin, R.A. Hilf // *Analyt. Biochem.* – 1976. – Vol. 74. – P. 214–226.
10. Shyder I. Seasonal changes in antioxidant system enzyme activity and products of lipid peroxidation in blood of different age rabbits spontaneously infested with *Psoroptes cuniculi* / I. Shyder, I. Yuskiv // *Тваринництво України*. – 2015. – № 4. – С. 32–35.
11. Vu H.V. Catalase and glutathione peroxidase expression in bovine corpus luteum during the estrous cycle and their modulation by prostaglandin F2 α and H $_2$ O $_2$ / H.V. Vu, T.J. Acosta // *Anim. Reprod.* – 2014. – Vol. 11, № 2. – P. 74–84.

REFERENCES

1. Adzhyev D.D. Yssledovanye produktov perekysnoho okyslenyya lypydov, nefermentatyvnoy y fermentatyvnoy antyoksydantnoy systemy v vozrastnoy dynamyke samtsov krolykov / D.D. Adzhyev // *Vestnyk VOHyS*. – 2010. – Т. 14, № 4. – С. 674–684.
2. Iskra R.Ya. Aktyvnist' antyoksydantnoy systemy v orhanizmi krolyka za diyi spolum khromu / R.Ya. Iskra // *Biologichni studiyi / Studia biologica*. – 2012. – Т. 6, № 1. – С. 77–86.
3. Laboratorni metody doslidzhen' u biologiyi, tvarynnystviti ta veterynarniy medytsyni / V.V. Vlizla, R.S. Fedoruk, I.B. Ratych ta in.; za red. V.V. Vlizla. – L'viv: Spolom, 2012. – 762 s.
4. Moin V.M. Prostoy i spetsificheskyy metod opredeleniya aktivnosti glutatyonperoksidazy v eritrotsitah / V.M. Moin // *Lab. delo*. – 1986. – № 12. – С. 724–727.
5. Rodyn'skyy O. H. Stan prooksydantno-antyoksydantnoy systemy struktur holovnoho mozku shchuriv riznoho viku z eksperymental'nym tsukrovym diabetom / O.H. Rodyn'skyy, V.A. Huz', L.V. Huz' // *Ekspyrym. ta klinichna fiziologhiya i biokhimiya*. – 2010. – № 3. – С. 12–17.
6. Rudenko V.V. Vikovi osoblyvosti zminy aktyvnosti hlutation-S-transferazy v mozku shchuriv pry immobilizatsiyomu stresi / V.V. Rudenko // *Visnyk Kharkivs'koho natsional'noho universytetu imeni V.N. Karazina. Seriya: «Biologhiya»*. – 2007. – Vyp. 6, № 788. – С. 157–164.
7. Salyha Yu. Hlutationova systema erytotsytiv shchuriv, intoksykovanykh khlorpiryfosom / Yu. Salyha, V. Rosalov'skyy, R. Fedyakov // *Visnyk L'viv's'koho universytetu. Seriya biologichna*. – 2012. – Vol. 60. – С. 99–104.
8. Habig W.H. Glutathin-S-trnferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jacoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249, № 22. – P. 7130–7139.
9. Hissin P.J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / P.J. Hissin, R.A. Hilf // *Analyt. Biochem.* 1976. – Vol. 74. – P. 214–226.
10. Shyder I. Seasonal changes in antioxidant system enzyme activity and products of lipid peroxidation in blood of different age rabbits spontaneously infested with *Psoroptes cuniculi* / I. Shyder, I. Yuskiv // *Tvarynnystvvo Ukrainy*. – 2015. – № 4. – С. 32–35.
11. Vu H.V. Catalase and glutathione peroxidase expression in bovine corpus luteum during the estrous cycle and their modulation by prostaglandin F2 α and H $_2$ O $_2$ / H.V. Vu, T.J. Acosta // *Anim. Reprod.* – 2014. – Vol. 11, № 2. – P. 74–84.

Показатели активности глутатионзависимых энзимов в тканях мозга кроликов

Н.В. Роль, С.И. Цехмистренко

В тканях мозга кроликов новозеландской породы изучали содержание восстановленного глутатиона, активность ферментов глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Установлено динамику изменений содержания восстановленного глутатиона, активностей глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в тканях мозга кроликов новозеландской породы в возрасте 1, 15, 30, 45, 60, 75 и 90 суток. Отмечено рост активности глутатион-S-трансферазы в 2,4 раза, в то время как активность глутатионредуктазы в 90-суточном возрасте снизилась в 5 раз. Высокое содержание восстановленного глутатиона в тканях мозга кроликов было в 75-суточном возрасте – 1,99±0,01 ммоль/г. Выявленные изменения показателей свидетельствуют об активном участии глутатионовой системы в формировании адаптивного ответа организма на действие различных стрессовых факторов в разном возрасте.

Ключевые слова: антиоксидантная система, восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза, мозг, кролики.

Надійшла 15.10.2015 р.