

СТАН ФЕРМЕНТАТИВНОЇ ЛАНКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ПЕРЕПЕЛІВ ЗА УМОВ ГІПОКСИЧНОГО СТРЕСУ

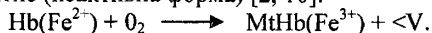
Досліджено особливості функціонування ферментативної ланки антиоксидантної системи печінки перепела за умов впливу нітрату натрію. Доведено, що реакцією на дію нітрит-іонів є підвищення вмісту в гомогенатах печінки продуктів ліпопероксидації та зростання ферментивної активності, а з часом дії чинника – зниженням їх активності та виснаження вмісту відновленого глутатіону.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень

На сьогодні актуальним є вивчення впливу метгемоглобінутворюючих сполук на докільця та організм людини та тварин. Внесення в ґрунт великої кількості мінеральних добрив, існування на території України близько 3000 фільтруючих накопичувачів стічних вод спричинило виникнення значних зон забруднення підземних вод нітратами і нітриатами [6, 8, 16].

В процесі еволюції тварин виробились механізми знешкодження (дезінтоксикації) отруйних речовин, головним чином, у печінці, де метаболізується біля 2/3 від загальної їх кількості [5]. При надмірному надходженні нітратів та нітритів в організм розвивається метгемоглобінемія, гемічна гіпоксія та токсичний гепатоз [9, 13]. Окисники

(нітрити і нітрати, фериціанід, аміннітрат, нітробензол, тіосульфат) спричиняють окиснення двовалентного заліза гемоглобіну крові, міоглобіну серцевого і скелетних м'язів та цитохромоксидази нервової тканини у тривалентне (неактивна форма) [2, 10]:



Прискорення процесів вільнорадикального окиснення ліпідів (ВРО) призводить до змін ліпопротеїдних зв'язків мембран, порушення внутрішньоклітинного метаболізму та зниження активності ферментів ендоплазматичного ретикулуму печінки, зокрема флавінових, які відновлюють нітро- та азосполуки до аміносполук, що виявляється ендогенною інтоксикацією та порушенням захисних сил організму. В межах фізіологічної норми ВРО утримує система антиоксидантного захисту (АОЗ) організму [3, 9, 10, 11]. Взаємодію між антиоксидантною системою та генерацією вільних радикалів у організмі можна представити у вигляді своєрідних терезів із дуже точним регулюванням та високою чутливістю. В зв'язку з цим, доцільно дослідити стан рівноваги між активністю вільнорадикальних процесів і функціональним станом системи антиоксидантного захисту.

Мета та завдання

Дослідити закономірності функціонування антиоксидантної системи печінки перепела за умов впливу нітрату натрію.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на перепелах (*Coturnix coturnix*) родини фазанових, ряду курячих породи фараон, м'ясного напрямку продуктивності. Із добового молодняку було сформовано 2 групи по 100 голів у кожній. Птиця 1 групи – інтактна; згодовували стандартний комбікорм. З метою моделювання експериментального оксидативного стресу птиці 2-ої групи з 3 по 70 добу дослідження з водою впоювали нітрат натрію в дозі 0,5 г/кг маси тіла за $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ [6]. Умови утримання перепелів були однаковими і відповідали зоотехнічним нормам.

Для проведення біохімічних досліджень матеріал відбирали у птиці від 7- до 70-добового віку з інтервалом в 1 тиждень, в один і той же час для виключення добових коливань фізіолого-біохімічних параметрів. Печінку відбирали відразу після декапітації під легким ефірним наркозом. Печінку подрібнювали в гомогенаторі Поттера-Ельвегейма з тефлоновим товкачиком. До 100 мг гомогенату печінки додавали 6 мл фізіологічного розчину. Отриману фракцію гомогенату центрифугували (3000 об./хв.). Стан системи АОЗ оцінювали за вмістом відновленого глутатіону (GSH) [1] та активністю ферментів: супероксиддисмутази (СОД) [12], каталази (КАТ) [4], глутатіонпероксидази (ГПО) [7], глутатіонредуктази (ГР) [14].

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень

Одним зі шляхів токсичної дії солей азотистої кислоти є зміна концентрацій радикальних метаболітів O_2 , OH , NO_2 , які негативно впливають, взаємодіючи з SH-групами білків, відновними формами коферментів, а також з поліненасиченими жирними кислотами [2, 5, 10]. Останні, як відомо, є субстратом для процесів ПОЛ. Згідно з результатами попередніх досліджень, введення в організм перепелів нітрату натрію в дозі 0,5 г/кг маси тіла супроводжується зменшенням кількості гемоглобіну та прогресуючою метгемоглобінемією [13], активацією ПОЛ, що проявляється різким збільшенням вмісту в печінці ДК, ГПЛІ, ТБК-активних продуктів на 21-, 35–42-, 63–70-ту добу експерименту [11].

Токсичні продукти, що утворюються внаслідок цих процесів, проявляють ендogenous інтоксикацію та призводять до змін захисно-компенсаторних сил, зокрема ферментативної ланки антиоксидантної системи.

Накопичення значної кількості супероксидного аніон-радикалу, внаслідок окиснення оксигемоглобіну та розвитку гіпоксичного стресу, спричиняє підвищення активності СОД (рис. 1) вже на 7- та 14-ту добу (проти контрольних показників у 1,8 та 1,4 раза відповідно).

Підвищення активності ензиму є відповіддю на накопичення кількості ДК, що засвідчує негативний кореляційний зв'язок ($r = -0,96$). Надмірне утворення пероксиду Гідрогену внаслідок зниження активності КАТ під впливом нітратів та нітритів у період з 7-ої по 35-ту добу експерименту (з максимумом на 21-шу добу досліді на 26,7 %) спричиняє пригнічення СОД-активності на 21-шу добу (на 21,3 %). Між активністю супероксидисмутази і каталази протягом дослідного періоду (7–70 доба) відзначено негативний кореляційний зв'язок з $r = -0,69$. Зміна активності СОД і КАТ за умов впливу нітрату натрію в печінці має різнонаправлений характер.

При оцінюванні значення даних змін, необхідно мати на увазі, що ефективність захисту клітини від активних форм Оксигену визначається не стільки абсолютною величиною активності ферменту, скільки співвідношенням активності СОД і каталази, а також СОД і ГПО [9, 15]. При порівнянні активності ферментів СОД/КАТ відмічено, що ефективність захисту клітини від активних форм Оксигену у печінці перепелів другої групи була недостатньою протягом усього дослідного періоду з максимумом на 21- та 49-ту добу експерименту.

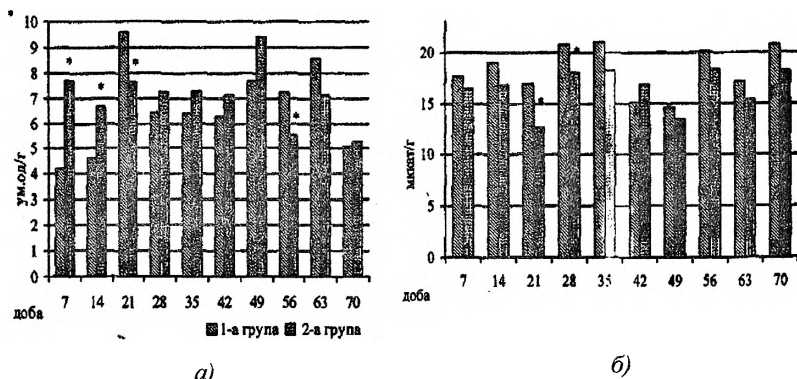


Рис. 1. Активність супероксиддисмутази (а) та каталази (б) в печінці перепела за умов впливу нітрату натрію ($M \pm m$; $n = 5$)

Примітка: Тут і надалі різниця вірогідна: * – $p < 0,05$, порівняно з 1 групою

Зниження активності каталази в еритроцитах відмічено при отруєнні тварин нітритом натрію [3, 10, 16]. Токсична дія NaNO_3 та NaNO_2 може бути пов'язана безпосередньо з процесом окиснення феруму гемму і наслідком цього гемічною гіпоксією, так і з процесом радикального пошкодження білкових і клітинних структур у результаті процесів ліпопероксидації [5, 10]. В період із 7-ої по 21-шу добу інактивація H_2O_2 та органічних гідроперексидів здійснюється глутатіонзалежними пероксидазами (табл. 1) за рахунок окиснення GSH з утворенням кон'югованої форми глутатіону (GSSG).

Висока ГПО-активність на початкових стадіях експерименту змінюється її пригніченням. Зростання активності ГПО на 56-ту добу експерименту (на 20,6%), ймовірно, є компенсаторною реакцією на різку зміну активності СОД та пригнічення каталазної активності [9, 10]. Різонаправлений вплив нітратів на активність СОД і ГПО обумовлюють зміну співвідношення активності цих ферментів протягом дослідження. З 7-ої по 28-ту добу активність ГПО по відношенню до СОД є високою, що і утримує співвідношення даних ферментів на сталому рівні, порівняно з показниками інтактної птиці. Протягом наступних трьох тижнів співвідношення СОД/ГПО змінюється у бік переважання активності СОД. Наслідком чого, ймовірно, є зниження ефективності захисту клітин печінки від активних форм Оксигену. Найбільш високим співвідношення СОД/ГПО є на 49-ту добу дослідження (зросло на 48% проти показників інтактної птиці). На 56-ту добу експерименту коефіцієнт СОД/ГПО є меншим за одиницю і різниця даних співвідношень у дослідній групі проти

контрольної становить 36 %. Співвідношення СОД/ГПО у період з 56-ої по 70-ту добу є низьким і різниця недостовірна, відносно контролю.

Таблиця 1. Активність глутатіонзалежних ферментів і вміст відновленого глутатіону та SH-груп білка у печінці перепела за умов впливу нітрату натрію ($M \pm m$; $n = 5$)

Вік, доба	ГПО, мкмоль/хв-мг білка		ГР, мкмоль NADP- H ₂ /хв. мг білка		GSH, ммоль/г	
	група					
	1	2	1	2	1	2
7	2,26±0,13	3,60±0,27*	4,98±0,40	5,24±0,44	0,75±0,05	0,65±0,03
14	4,19±0,34	5,91±0,40*	3,88±0,17	4,34±0,19	0,58±0,05	0,47±0,04
21	4,65±0,29	5,78±0,29*	4,34±0,29	3,19±0,19*	0,64±0,03	0,44±0,04*
28	4,22±0,37	4,82±0,40	4,25±0,35	2,83±0,15*	0,56±0,05	0,43±0,03
35	5,93±0,31	5,36±0,34	5,93±0,35	3,97±0,29*	0,63±0,02	0,45±0,01*
42	5,69±0,40	4,89±0,26	6,52±0,42	4,73±0,24*	0,64±0,03	0,53±0,03*
49	6,88±0,31	5,66±0,47	7,42±0,46	5,90±0,39*	0,76±0,02	0,50±0,04*
56	5,04±0,42	6,08±0,52	4,74±0,13	4,54±0,40	0,62±0,04	0,42±0,03*
63	6,64±0,38	4,85±0,33*	6,80±0,44	5,04±0,38*	0,65±0,05	0,53±0,03*
70	4,83±0,37	4,97±0,44	7,93±0,59	5,61±0,28*	0,68±0,03	0,54±0,02*

Нуклеофільна тіолова група GSH ферментативним чи неферментативним шляхом взаємодіє з екзогенними ксенобіотиками та різними ендотоксинами, які мають електрофільні центри. При цьому в печінці утворюються кон'югати глутатіону, які в нирках після ферментативного відщеплення глутамінової кислоти і гліцину, а також N-ацетилювання залишку цистеїну, перетворюються у меркаптурові кислоти, які виділяються із сечею [3, 5]. Ураження щурів нітритом натрію призводить до зниження вмісту GSH у сироватці крові та печінці на 70 % [10, 13]. На початковому етапі експерименту достовірно зниження вмісту GSH у печінці перепелів відбувається на 21-шу (на 31 %) та максимально – на 35-ту і 49-ту добу (у 1,6 раза) відносно показників інтактної птиці. Передбачають, що між вмістом відновленого та окисненого глутатіону існує рівновага, дисульфіді змішаного типу розглядають як форму запасу низькомолекулярних тіолів, які можуть бути використані у випадку різкого зниження вмісту відновленого глутатіону [9].

Зворотне відновлення GSSG відбувається в реакції з ГР, активність якої залежить від NADPH*, а відповідно, і від роботи ферментів

гексозомонофосфатного шунта [3]. На початкових етапах експерименту активність ГР незначно зростає, а після 21-денного навантаження нітратом натрію пригнічується (на 26,5 % проти показників інтактної птиці). Протягом наступних двох тижнів активність ферменту знизилась ще на 6,5 %, що відповідає максимальному пригніченню активності відносно інтактної птиці. У період із 42-ої по 56-ту добу експерименту активність ГР зростає і на 56-ту добу становить $4,54 \pm 0,40$ мкмоль $\text{NADP} \cdot \text{H}_2 / \text{хв} \cdot \text{мг}$ білка, що відповідає активності ферменту в печінці птиці контрольної групи. З розвитком процесу активність ферменту знижується і на 70-ту добу становить $5,61 \pm 0,28$ мкмоль $\text{NADP} \cdot \text{H}_2 / \text{хв} \cdot \text{мг}$ білка (на 29 % нижче показників інтактної птиці).

Отже, науково обґрунтоване використання кормових добавок у годівлі птиці позитивно впливає на продуктивність, відтворювальну функцію, харчову і біологічну цінність одержуваної продукції.

Висновки

1. Токсична дія нітрату натрію при тривалому навантаженні, вірогідно, пов'язана як безпосередньо з процесом окиснення феруму гему і внаслідок цього гемічною гіпоксією, так і з утворенням значної кількості АФО та процесами радикального пошкодження клітинних структур у результаті інтенсифікації процесів ліпопероксидації. Підтвердженням цього є підвищення вмісту в гомогенатах печінки продуктів ПОЛ (ДЖ, ГПЛ, ТБК-активних продуктів).

2. Реакцією на дію нітрит-іонів є зміни у функціональній активності антиоксидантній системі печінки перепелів. На початкових етапах експерименту активності СОД та ГПО (7–21 доба) зростає, з часом дії чинника відмічено пригнічення активності антиоксидантних ферментів та зниження вмісту відновленого глутатіону.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження слід зосередити на пошуку та розробленні оптимальних варіантів ефективної профілактики та корекції токсичних уражень організму.

Література

1. *Горячковский О.М.* Определение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах крови / Клиническая биохимия: Справочное пособие. – Одеса: Астропринт, 1998. – С. 370–372.
2. *Денисенко С.В., Костенко В.А.* Изменения продукции активных форм кислорода в семенниках белых крыс в условиях хронической интоксикации нитратом натрия // Современ. проблемы токсикологии. – 2002. –

- № 4. – С. 44–45.
3. Кармолиев Р.Х. Биохимические процессы при свободнорадикальном окислении и антиоксидантной защите. Профилактика окислительного стресса у животных: обзор // С.-х биология / Серия: Биология животных. – 2002. – № 2. – С. 19–28.
 4. Королюк М.А., Иванова А.И., Майорова И.Т. Метод определения активности каталазы / Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
 5. Ксенобиотики и обезвреживающая функция печени / П.П. Загорский, С.П. Калашников, И.А. Рубанова, Е.М. Хватова // Медицинские проблемы экологии. – Нижний Новгород, 1992. – С. 29–37.
 6. Методичні рекомендації з профілактики та лікування тварин при отруєнні нітритами та нітратами / Г.О. Хмельницький, М.Ф. Панько, Д.М. Вовк та ін. – Харків, 2001. – 58 с.
 7. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724–727.
 8. Новожицька Ю. Щодо державного моніторингу залишкових кількостей токсикантів у продуктах тваринного походження // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 4. – С. 27–28.
 9. Роль антиоксидантной системы в патогенезе токсического гепатита / М.М. Корда, Я.И. Гонский, Л.С. Фира, И.Н. Клищ // Пат. физиолог. и эксперим. мед. – 1996. – № 2. – С. 43–46.
 10. Фіра Л.С., Гонський Я.І. Метаболічні порушення в організмі тварин, отруєних нітритом натрію // Мед. хімія. – 2003. – № 3. – С. 64–67.
 11. Цехмістренко С.І., Пономаренко Н.В., Чубар О.М. Вільнорадикальні процеси та антиоксидантний статус у тканинах травних залоз перепелів у постнатальному періоді онтогенезу та їх корекція зерном амаранту / Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78. – № 2. – С. 71–76.
 12. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль СОД в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–781.
 13. Чубар О.М. Індуковане метгемоглобіном пероксидне окиснення ліпідів у тканинах печінки перепела // Наук. вісник Львів, нац. акад. вет. мед. ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2005. – Т. 7. – № 2. – Ч. 2. – С. 154–157.
 14. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19–21.
 15. Semsei I, Rao G., Richardson A. Changes In the expression of superoxide dismutase and catalase as function of age and dielary restriction // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1989. – Vol. 164. – № 11. – Pp. 620–625.
 16. Sohr O.S., Fiala E.S. Analysis of nitrite/nitrate in biological fluids-denitrification of 2-nitropropane in F344 rats // Anal. BioChem. – 2000. – Vol. 279. – № 2. – Pp. 202–208.