

УДК: 612.398.192:542.49.612.112

Н. Салига, канд. біол. наук, Р. Іскра, д-р біол. наук
Інститут біології тварин НААН України, Львів

ВПЛИВ L-ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ НА ДЕЯКІ БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ НІТРИТУ НАТРІЮ

Досліджено вплив різних доз L-глутамінової кислоти на активність антиоксидантних ензимів та окремих біохімічних показників крові щурів за дії нітритру натрію. Показано, що введення нітритру натрію приводить до зниження активності антиоксидантних ензимів та вмісту гемоглобіну і глюкози у крові тварин. Встановлено, що введення щурам L-глутамінової кислоти призводить до менш виражених змін досліджуваних показників стосовно контрольної групи тварин.

Ключові слова: щури, L-глутамінова кислота, нітрит натрію, антиоксидантні ензими, інтоксикація.

Вступ. В організм людини нітрати та нітрити поступають разом з водою, продуктами харчування та лікарськими препаратами. Деструктивний вплив нітритів та нітратів на організм зумовлений ініціацією вільнорадикальних процесів та пероксидного окиснення ліпідів, що призводить до пошкодження клітинних мембран, зниження активності імунної системи, змін антиоксидантної системи, активації окиснювальної модифікації протеїнів. Існують думки, що нітрити здатні інгібувати активність пероксидаз, внаслідок чого швидкість нейтралізації активних форм Оксигену знижується [4]. Нітрити окислюють двохвалентний Ферум гемоглобіну у трьохвалентний. При цьому утворюється метгемоглобін, який не здатен переносити Оксиген до тканин і органів. Це приводить до порушення нормального дихання клітин організму, тобто гіпоксії. Найбільша небезпека підвищеного вмісту нітратів і нітритів в організмі полягає у тому, що вони переходять в N-нітросполуки, які володіють мутагенною дією та мають високу гепато- та нефротоксичність. Існують публікації [10], де висловлюється припущення здатності нітритів інгібувати не лише гемоглобін, але й інші гемовмістні протеїни, у цьому числі, цитохроми електронтранспортного ланцюга мітохондрій.

В останні роки все більший інтерес викликають речовини, які здатні запобігти або усунути пошкодження спричинені вільними радикалами та захистити організм від наслідків вільнорадикального окиснення. До таких речовин належать амінокислоти, яким властива мала токсичність, висока фармакологічна і терапевтична активність, широкий спектр дії як лікарських засобів [13, 14]. Особливе місце займає L-глутамінова кислота, яка володіє вираженою антиоксидантною, мембраностабілізуючою та антигіпоксичною активністю [5, 8]. Ця кислота бере участь у протеїновому і вуглеводному обміні, стимулює окислювальні процеси, перешкоджає зниженню окисно-відновного потенціалу, підвищує стійкість організму до гіпоксії, покращує обмін речовин, впливає на процеси гліколізу в тканинах, проявляє гепатопротекторну дію [2, 12].

Мета роботи полягала у дослідженні впливу різних доз L-глутамінової кислоти на активність окремих антиоксидантних ензимів та біохімічних показників у крові щурів за умов введення нітритру натрію.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проведено на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220 г. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики, законодавчих норм та 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 Націона-

льним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Було сформовано 4 групи тварин-аналогів (3 дослідних і 1 контрольна). Тваринам першої дослідної групи вводили внутрішньоочередово одноразово нітрит натрію з розрахунку 50 мг/кг (вибрана дозоздатна викликати гіпоксію середнього ступеня важкості), тваринам другої дослідної групи – нітрит натрію з розрахунку 50 мг/кг, після чого розчин L-Glu у дозі 500 мг/кг. Тваринам третьої дослідної групи вводили нітрит натрію з розрахунку 50 мг/кг, після чого розчин L-Glu у дозі 750 мг/кг. Дози L-глутамінової кислоти були вибрані на основі попередніх досліджень, враховуючи сукупність досліджених біохімічних показників та найбільшу ефективність у боротьбі з оксидативним стресом. Щурам контрольної групи вводили відповідну кількість фізрозчину. Через добу тварин всіх груп за анестезії ефіром декапітували.

В еритроцитах крові визначали глутатіонредуктазну активність (ГР) (КФ 1.6.4.2) за швидкістю окислення NADPH при $\lambda = 340$ нм [1]; глутатіонтрансферазну активність (ГТ) (КФ 2.5.1.18) за швидкістю утворення конюгату глутатіону і 1-хлор-2,4-дінитробензолу [7]; активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) (КФ 1.1.1.49) визначали спектрофотометричним методом, що базується на використанні спряжених систем окиснення або відновлення нікотинамідних коензимів [3]; концентрацію глюкози визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів "Філісіт-Діагностика" (Україна); концентрацію гемоглобіну визначали гемоглобін-ціанідним методом [6]; концентрацію загального протеїну визначали за методом Лоурі [11]. Одержані цифрові дані обробляли статистично. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Як показали результати досліджень, інтоксикація нітритом натрію супроводжувалась зниженням активності антиоксидантних ензимів у крові щурів. Глутатіонредуктазна активність (Рис.1) була нижчою у тварин усіх дослідних груп, але слід відзначити вірогідне зниження цього показника лише у щурів першої та другої дослідних груп відповідно на 38,2%, 23,8% порівняно до тварин контрольної групи. Зниження активності цього ензиму є несприятливим для організму, оскільки глутатіонредуктаза відновлює окислений глутатіон, який є необхідним для функціонування іншого ензиму – глутатіонпероксидази, яка відновлює пероксид гідрогену і пероксиди протеїнів, нуклеїнових кислот і ліпідів. Причиною зниження глутатіонредуктазної активності може бути виснаження антиоксидантної системи через певний час після дії токсиканта. Можна припустити, що іншою причиною може бути виснаження пула НАДФН в умовах розвитку гіпоксії та виснаження енергетичних ресурсів системи захисту клітини.

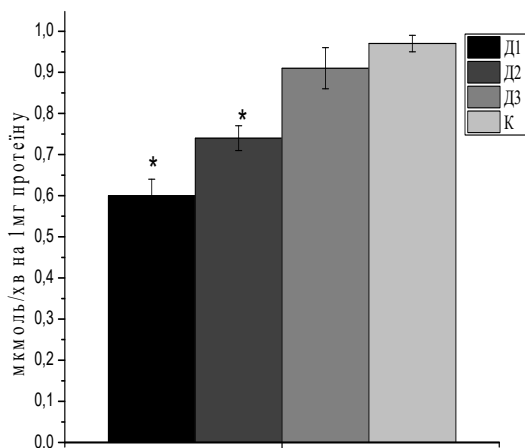


Рис.1. Глутатионредуктазна активність в еритроцитах крові щурів

В цьому і наст. рис.: *-вірогідно ($p < 0,05$) відносно контролю

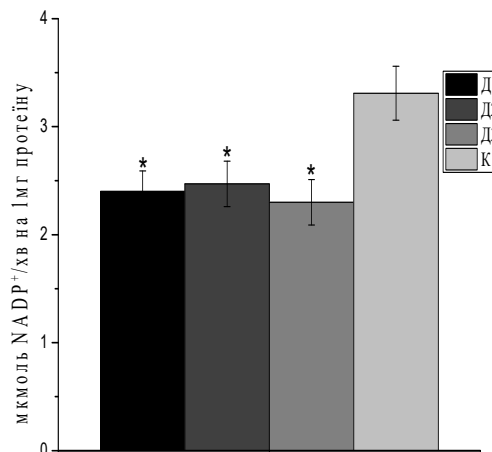


Рис.2. Активність Г-6-ФДГ в еритроцитах крові щурів

Це припущення узгоджується з результатами досліджень активності Г-6-ФДГ, ензиму пентозофосфатного гліколізу. Основна функція цього ензиму полягає у відновленні НАДФ до НАДФН, що необхідний для переходу окисленого глутатіону у відновлену форму. Пентозофосфатний гліколіз забезпечує клітину енергією. Зниження активності Г-6-ФДГ приводить до зниження енергетичних запасів клітини. Наші результати показали вірогідно нижчу активність Г-6-ФДГ в усіх дослідних групах тварин відповідно на 27,5 %, 25,4% та 30,6% порівняно з контролем (Рис.2). Можна припустити, що подібні зміни відбуваються внаслідок пошкодження ензиму вільними радикалами, які активно продукуються за дії нітритру натрію. Відповідно порушується процес відновлення НАДФ, і, як наслідок, дефіцит відновленого НАДФН для ензиму ГР. Окрім цього, зниження активності Г-6-ФДГ і ГР приводить до порушення нормальної концентрації відновленого глутатіону, оскільки ці ензими відповідають за відновлення цього трипептиду.

ГТ каталізує незворотній процес кон'югації відновленого глутатіону з електрофільними чужорідними сполуками [9]. Цей процес є початковою стадією синтезу меркаптурових кислот – продуктів деградації глутатионовокон'югату, який пошкоджує ДНК. Як видно з результатів досліджень (Рис.3) глутатионтрансферазна активність була вірогідно нижчою майже у 2 рази у тварин першої дослідної групи, якій вводили нітрит натрію у дозі 50 мг/кг порівняно з тваринами контрольної групи. Що стосується тварин другої та третьої дослідних груп, які тримували L-глутамінову кислоту у різних дозах, глутатионтрансферазна активність виходила практично на рівень контрольних значень. Додавання L-глутамінової кислоти, яка відіграє ключову роль у циклі трикарбонних кислот ймовірно сприяло посиленому утворенню АТФ, яка необхідна для енергозабезпечення всіх процесів кон'югації.

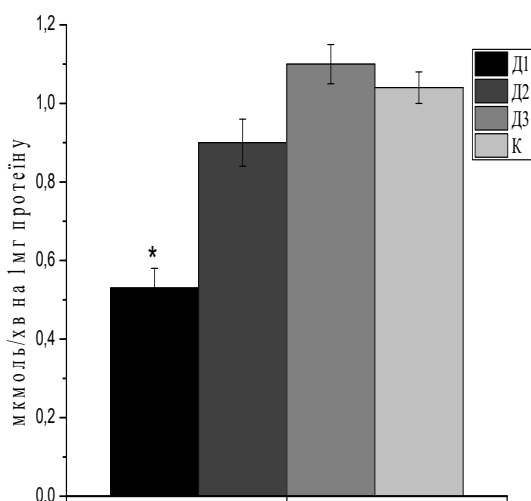


Рис.3. Глутатионтрансферазна активність в еритроцитах крові щурів

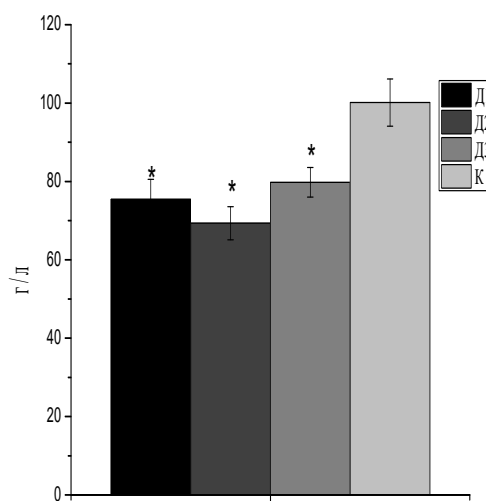


Рис.4. Вміст загального гемоглобіну в еритроцитах крові щурів

Першою ланкою, яка зазнає пошкодження при дії нітрит-іонів є гемоглобін. Вміст загального гемоглобіну у наших дослідженнях вірогідно знижувався у всіх дослідних груп тварин стосовно контролю відповідно (Рис.4).

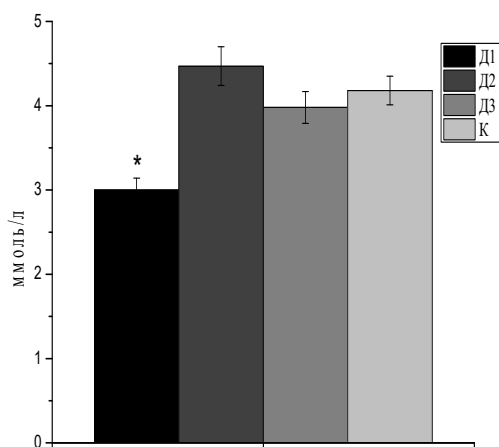


Рис.5. Вміст глюкози в плазмі крові щурів

Глюкоза є енергетичним субстратом у клітинах, а проміжні продукти катаболізму цього моносахариду впливають на Оксиген-транспортні властивості гемоглобіну. Вміст глюкози у плазмі крові тварин першої дослідної групи був вірогідно нижчим порівняно до контрольної групи тварин (Рис.5). Зниження вмісту глюкози в тканинах можна пояснити участю у низці метаболічних процесів, що активуються за дії ксенобіотиків. Концентрація загального протеїну була нижчою у тварин першої дослідної групи відповідно на 37,1% порівняно з контролем (Рис.6). Можна припустити, що зниження протеїну відбувається внаслідок гіпоксії, яку викликає нітрит натрію. Слід відмітити, що у тварин другої та третьої дослідних груп, що додатково отримували L-Glu цей показник виходив на рівень контрольних значень.

Таким чином, з'ясовано, що інтоксикація тварин нітритом натрію у дозі 50 мг/кг супроводжувалась зниженням активності антиоксидантних ензимів та окремих біохімічних показників крові щурів. Всі ці зрушення вказують на виснаження організму в умовах інтоксикації нітритом натрію. Тварини, які окрім нітриту натрію отримували L-глутамінову кислоту відрізнялися меншими різницями у порівнянні з контрольною групою, а по деяких показниках виходили на рівень контрольних значень. Більш вигідно відрізнялась дослідна група, яка отримувала вищу дозу L-Glu. Аналіз отриманих нами результатів дозволяє говорити про те, що L-Glu сприяє нейтралізації шкідливої дії нітритів, що потрапили в організм.

Висновки. Встановлено, що при дії нітриту натрію в організмі щурів знижується активність досліджуваних ензимів антиоксидантного захисту та загальний вміст протеїну, гемоглобіну та глюкози. Виявлено, що введення ураженим щурам різних доз L-глутамінової кислоти приводило до таких змін: глутатіонтрансферазна активність, вміст глюкози та загального протеїну був майже на рівні контрольних значень у тварин обох дослідних груп, яким вводили різні дози L-глутамінової кислоти, а глутатіонредуктазна активність лише у тварин третьої дослідної групи.

Список використаних джерел

1. Путилина Е. Ф. Определения активности глутатионредуктазы / Путилина Е. Ф. // Методы биологических исследований. – М.: Ин. Лит, 1982. – С. 181-183.

Можна припустити що зниження рівня гемоглобіну може бути пов'язано з пригнічення еритропоетичної функції кісткового мозку внаслідок прояву токсичної дії нітриту натрію та трансформацією гемоглобіну в метгемоглобін.

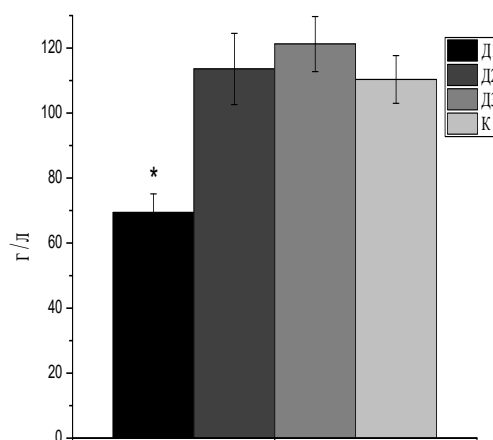


Рис.6. Концентрація загального протеїну в плазмі крові щурів

2. Салига Н.О. Активність глутатионової ланки антиоксидантного захисту та інтенсивність процесів пероксидного окислення ліпідів у тканинах щурів за дії L-глутамінової кислоти / Н.О. Салига // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 85, №4. – С.40-47. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem_2013_85_4_7

3. Снитинский В.В., Янович В.Г. Исследование углеводно-энергетического обмена у сельскохозяйственных животных: методические рекомендации. – Львов, 1984. – 28 с.

4. Шугалей И.В. Влияние интоксикации нитритом натрия на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессы пероксидации в эритроцитах мышей / И.В. Шугалей, С.Н. Львов, И.В. Целинский // Український біохімічний журнал. – 1992. – № 2. – С. 111-114.

5. Brosnan J.T. Glutamate: a truly functional amino acid / J.T.Brosnan, M.E.Brosnan // Amino Acids. – 2012. – Vol. 25. – P. 207-218. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

6. Drabkin D. The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in the comparison with those of other species / D. Drabkin // J. Biol. Chem. – 1946. – Vol. 164. – P.703. Available from: <http://www.jbc.org/>

7. Habig W.H. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J.Pabst, W.B.Jakoby // J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249. – P.7130-7139. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

8. Hansen A.M. Glutamate joins the ranks of immunomodulators / A.M. Hansen, R.R. Caspi // Nature medicine. – 2010. – Vol. 16, №8. – P. 856-858. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

9. Hayes J. D. Glutathione transferases / J. D. Hayes, J. U. Flanagan, I. R. Jowsey // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – Vol. 45. – P. 51-88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. Jensen F.B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective / F.B. Jensen // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1787, № 7. – P. 841-848. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Lowry O.H. Protein measurement with folinphenol reagent / O.H.Lowry, H. J. Rosebrough, A. L.Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Roth E. Non nutritive effects of glutamine / E. Roth // J.Nutr. – 2008. – Vol.138. – P. 2025-2031. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health / G.Wu // Adv.Nutr. – 2010. – Vol.1, № 1. – P. 31-37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

14. Wu G. Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond / G. Wu, F.W. Bazer, Z. Dai, D.Li, J.Wang, Z. Wu // Annu Rev Anim Biosci. – 2014. – Vol. 2. – P. 387-417. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

References

1. Putilina E.F. [Determining the activity of glutathione reductase. Methods of biological studies]. – M.: In.Lit, 1982:181-3. Russian.

2. Salyha N. O. [Activity of the glutathione system of antioxidant defense in rat under the action of L-glutamic acid]. Ukrainian Biochem. Journal. 2013; 85(4):40-7. Ukrainian.

3. Snitinsky V.V., Yanovich V.G. [Study of carbohydrate and energy metabolism in farm animals: guidelines]. Lviv; 1984. 28 p. Russian.

4. Shugaley I.V., Lvov S.N., Tselinsky I.V., Baev V.I. [Effect of sodium nitrite in toxication on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation].

tion processes in red blood cells of mice]. Ukrainian Biochem. Journal.1992; 4:111-4.Ukrainian.

5. Brosnan J.T., Brosnan M.E. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*. 2013 Sep;45(3):413-8. doi: 10.1007/s00726-012-1280-4.

6. Drabkin D. The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in the comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.* 1946;164:703.

7. Habig W.H. Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:7130-39.

8. Hansen A.M., Caspi R.R. Glutamate joins the ranks of immunomodulators. *Nat. Med.* 2010;16(8): 856-8. doi: 10.1038/nm0810-856.

9. Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45: 51-88. PubMed PMID: 15822171.

10. Jensen F.B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(7): 841-8. doi: 10.1016/j.bbabo.2009.02.010.

11. Lowry O.H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1): 265-75. PubMed PMID:14907713.

12. Roth E. Non nutritive effects of glutamine. *J.Nutr.* 2008;138(10):2025S-2031S. PubMed PMID:18806119.

13. Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv.Nutr.* 2010;1(1):31-7. doi: 10.3945/an.110.1008.

14. Wu G., Bazer F.W., Dai Z., Li D., Wang J., Wu Z. Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. *Annu Rev Anim Biosci.* 2014;2:387-417. doi: 10.1146/annurev-animal-022513-114113.

Надійшла до редколегії 18.05.16

Н. Салыга, канд. биол. наук, Р.Искра, д-р биол. наук
Институт биологии животных НААН, Львов, Украина

ВЛИЯНИЕ L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ НИТРИТА НАТРИЯ

Исследовано влияние разных доз L-глутаминовой кислоты на активность антиоксидантных ферментов и отдельных биохимических показателей крови крыс при действии нитрита натрия. Показано, что введение нитрита натрия приводит к снижению активности антиоксидантных ферментов и содержания гемоглобина и глюкозы в крови животных. Установлено, что введение крысам L-глутаминовой кислоты приводит к менее выраженным изменениям исследуемых показателей по сравнению с контрольной группой животных.

Ключевые слова: крысы, L-глутаминовая кислота, нитрит натрия, антиоксидантные ферменты, интоксикация.

N. Salyha, PhD, R.Iskra, DSc
Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, Ukraine

EFFECT OF L-GLUTAMIC ACID ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RAT BLOOD UNDER THE ACTION OF SODIUM NITRITE

The effect of different doses of L-glutamic acid on activity of antioxidant enzymes and some blood biochemical parameters in rats under the influence of sodium nitrite was studied. It was shown that administration of sodium nitrite leads to decreased activity of antioxidant enzymes and hemoglobin and glucose content in the blood of animals. It was established, that changes of studied parameters were less expressed in rats administered of L-glutamic acid compared to the control group of animals.

Key words: rats, L-glutamic acid, sodium nitrite, antioxidant enzymes, intoxication.

УДК 578.1

Л. Дудар, асп., В. Поліщук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ГІСТОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ЦИРКОВІРУС-АСОЦІЙОВАНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ, УРАЖЕНИХ ЦИРКОВІРУСОМ 2-ГО ТИПУ

Аналіз патоморфологічних змін органів свиней, уражених цирковірусом свиней 2 типу показав, що найбільше відхилень спостерігається в органах імунної системи, а саме лімфоеузлах та селезінці. Таким чином, для встановлення діагнозу як цирковірус-асоційованого синдрому є необхідним, крім підтвердження критеріїв специфічних клінічних ознак, проведення гістологічних досліджень мікроскопічних уражень, пов'язаних з ЦВС-2 (виснаження лімфоїдної тканини та/або заміна лімфоцитів сполучною тканиною).

Ключові слова: цирковірус-асоційований синдром свиней, гістологічний аналіз, цирковірус свиней 2-го типу.

Вступ. Вперше захворювання, асоційоване з цирковірусом свиней 2 типу було описано у 1997 році і названо синдромом мультисистемного виснаження поросят (Porcine Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS) [1, 2]. Однак, наявність збудника в матеріалі тварин не обов'язково свідчить про розвиток клінічних проявів [3]. Тому, для встановлення діагнозу як цирковірус-асоційованого синдрому необхідним є підтвердження таких критеріїв: наявності специфічних клінічних ознак (втрата ваги, виснаження, респіраторні проблеми), мікроскопічних уражень, пов'язаних з ЦВС-2 (виснаження лімфоїдної тканини, і/або заміна лімфоцитів сполучною тканиною) та антигену ЦВС-2 за імуногістохімічного дослідження або ДНК вірусу за молекулярно-генетичного дослідження [3]. Таким чином, визначення захворювання як цирковірус-асоційованого синдрому свиней може бути здійснене за субклінічного перебігу, коли в матеріалі виявлено збудника та характерні патологічні зміни або за клінічного перебігу при таких проявах як мультисистемне захворювання з втратою ваги, високий рівень смертності, респіраторні дисфункції,

дерматити, нефропатії, кишкові розлади та проблеми репродукції (абортів, муміфікація плодів, народження нежиттєздатного потомства) [3]. Наразі, синдроми, асоційовані з цирковірусом 2 типу, описано серед свиней усіх без виключення країн світу, де здійснюють промислове вирощування цих тварин. В той же час, найбільше вірус поширений в Німеччині, Пн. Ірландії, Данії, Швеції, Швейцарії, а також в США, Канаді, Китаї, Індії [4, 5, 6]. Причому не виявлено кореляції між розвитком тих чи інших клінічних синдромів та географічними особливостями поширення вказаного збудника.

Мета. Таким чином, метою дослідження був гістологічний аналіз зразків тканин та органів свиней з 109 господарств 22 областей України, уражених цирковірусом свиней 2 типу.

Матеріали та методи. Для виділення вірусу використовували матеріал тварин, віком від 35 до 120 днів, у яких було зареєстровано зовнішні ознаки цирковірус-асоційованих синдромів.

Приготування гістологічних зразків. Фіксування досліджуваних зразків тканин органів проводили занурен-