

КОРМОВИРОБНИЦТВО, ЖИВЛЕННЯ, СЕЛЕКЦІЯ ТА РОЗВЕДЕННЯ ТВАРИН

PRODUCING OF FEEDSTUFFS, NOURISHMENT, SELECTION AND ANIMAL BREEDING

УДК.577.118

Антоняк Г.Л., доктор біол. наук, професор¹, Скаб О.Б., асистент²
©(halyna_antonyak@yahoo.com)

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, м. Львів

²Львівський національний аграрний університет, м. Дубляни

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ «Е-СЕЛЕН» ТА БІОМАСИ ДРІЖДЖІВ *PHAFFIA RHODOZYMA* НА ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН В ЕРИТРОЦИТАХ КРОЛИКІВ ЗА УМОВ ПЕРОРАЛЬНОГО НАДХОДЖЕННЯ КАЛІЮ БІХРОМАТУ

Проводили дослідження впливу хрому (VI) в формі калію біхромату, препарату “Е-селен” та біомаси каротиногенних дріжджів *Phaffia rhodozyma* на піруваткіназу, лактатдегідрогеназу та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу активність в еритроцитах кролів тримісячного віку. Установлено, що надходження $K_2Cr_2O_7$ в дозі 5 мг/кг маси впродовж 14 діб зумовлює інгібування каталітичної активності зазначених ензимів у клітинах крові тварин. Застосування препарату „Е-селен” та дріжджів *Phaffia rhodozyma* на тлі інтоксикації кролів біхроматом сприяє нормалізації піруваткіназної та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності еритроцитів і підвищує ці показники порівняно зі значеннями, установленими в клітинах тварин, яким вводили лише $K_2Cr_2O_7$. Вплив зазначених чинників на метаболічну активність еритроцитів може бути однією з важливих ланок у механізмах коригувальної дії препарату “Е-селен” та дріжджів *Phaffia rhodozyma* в організмі тварин, які зазнають впливу шестивалентного хрому.

Ключові слова: хром (VI), еритроцит, енергетичний обмін, піруваткіназа, лактатдегідрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, селен, вітамін Е, *Phaffia rhodozyma*.

Вступ. Сполуки шестивалентного хрому (Cr (VI)) – широко розповсюджені забрудники техногенного походження. Із компонентів навколишнього середовища вони можуть надходити в організм тварин і людини через травний тракт, дихальну систему, шкіру. В усіх випадках це призводить до токсичних ефектів, пов'язаних із порушенням обміну речовин та функціональної активності клітин [8; 11; 15; 22]. Токсична дія цих сполук проявляється в ураженні печінки, нирок, шлунково-кишкового тракту, серцево-судинної та нервової систем. Попри те, що в низці досліджень установлений інгібувальний вплив хромат- і біхромат-аніонів на еритропоез [2; 16; 23], особливості впливу шестивалентного хрому на метаболізм у клітинах крові тварин і людини нині з'ясовані недостатньою мірою.

Як відомо, зрілі еритроцити ссавців характеризуються відсутністю мітохондрій та кисеньзалежних енергетичних процесів і отримують енергію лише шляхом анаеробного розщеплення глюкози [9]. Тому інтенсивність гліколізу та пов'язаного з ним пентозофосфатного шляху перетворення моносахаридів визначає функціональну активність еритроцитів і, перш за все, здатність гемоглобіну до транспорту молекул кисню [1; 14]. Метаболічний зв'язок між цими процесами реалізується через проміжні та кінцеві продукти енергетичного обміну і відновлені форми нікотинамідних коферментів (NADH, NADPH), концентрації яких регулюються активністю ензимів гліколізу та пентозофосфатного шунта. Отже, зміни метаболічної активності в еритроцитах можуть опосередковувати вплив різноманітних чинників, зокрема забрудників навколишнього середовища, на кисень-транспортну функцію крові.

Метою роботи було дослідити динаміку ензимів енергетичного обміну (піруваткіназа, лактатдегідрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа) в еритроцитах кролів за умов перорального введення хрому (VI) у формі калію біхромату і з'ясувати можливість корекції внутрішньоклітинних метаболічних порушень застосуванням препарату “Е-селен” та біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma*, продуцентів каротиноїду астаксантину [18; 20].

Матеріал і методи. Дослідження проводили на 20 кролях-самцях породи «шампань» тримісячного віку, утримуваних за умов віварію, яким згодовували стандартний раціон з необмеженим доступом до води. Тварин, яких використовували під час досліджень, поділили на 4 групи: контрольну (К) і 3 дослідні (Д1-Д3), по 5 особин у кожній. Кролям усіх трьох дослідних груп (Д1-Д3) вводили в шлунок розчин $K_2Cr_2O_7$ в дозі 5 мг/кг маси щодоби впродовж 14-ти діб. Тваринам групи Д2 за 1 годину перед першим введенням $K_2Cr_2O_7$ вводили комерційний препарат “Е-селен” (ЗАТ “Ніта-Фарм”) одноразовою внутрішньом'язовою ін'єкцією, згідно з рекомендованою в інструкції дозою (0,04 мл/кг маси). Кроликам групи Д3 водночас із введенням $K_2Cr_2O_7$ вводили в шлунок суспензію біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* (штам IBM Y-5021) в дозі, яка відповідала 1% від щодобової маси корму (зазначений штам був наданий для досліджень лабораторією біотехнології мікроорганізмів Інституту біології тварин НААН). Тваринам контрольної групи вводили перорально фізіологічний розчин у відповідному об'ємі. Всі експериментальні процедури та

евтаназію тварин проводили з дотриманням правил поводження з експериментальними тваринами.

Матеріалом досліджень була периферична кров, яку отримували під час декапітації тварин контрольної і дослідних груп. З крові виділяли еритроцити центрифугуванням при 3000 g і трикратним відмиванням від плазми фізіологічним розчином [7]. Для дослідження активності ензимів використовували гемолізати, приготовлені шляхом заморожування-відтаювання водних суспензій еритроцитів. У гемолізатах визначали піруваткіназу (ПК), лактатдегідрогеназу (ЛДГ) і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу (Г-6-ФДГ) активність за допомогою загальноприйнятих спектрофотометричних методів із використанням нікотинамідних коензимів: NADH (під час визначення активності ПК і ЛДГ) і NADP (під час визначення активності Г-6-ФДГ) [4]. Активність ензимів обчислювали, враховуючи швидкість відновлення або окиснення молекул нікотинамідного коензиму за 1 хв. у перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка в гемолізатах визначали методом Лоурі і співавторів (1951). Отримані результати опрацьовували статистично.

Результати дослідження. Результати експериментів свідчать, що в еритроцитах кролів, яким упродовж на 14 діб вводили калію біхромат, відбувається пригнічення активності гліколізу і пентозофосфатного шунта (табл. 1). Зокрема, піруваткіназна активність еритроцитів тварин групи Д1 зменшується на 63% ($p < 0,001$), а глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна – на 62,5% ($p < 0,001$). Однак рівень інгібування лактатдегідрогенази в клітинах кролів групи Д1 менший, порівняно з іншими досліджуваними ензимами, і становить лише 15% ($p < 0,05$). Такий ефект може зумовлюватись низькою чутливістю молекул ЛДГ до інгібувального впливу біхромату, на що вказують і результати досліджень інших авторів [21]. Разом із тим, значне пригнічення піруваткінази (ключового ензиму гліколізу) та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази – ензиму, який визначає рівень перетворення глюкозо-6-фосфату пентозофосфатним шляхом, можуть зумовлювати зміни функціональної активності еритроцитів тварин, інтоксикованих шестивалентним хромом. Зокрема, у попередніх дослідженнях встановлено, що у таких тварин відбувається дестабілізація плазматичних мембран та зниження їхньої стійкості до гемолізу в кислотному середовищі [9].

З огляду на шкідливі ефекти хрому (VI) важливе значення має метаболічна корекція внутрішньоклітинних порушень застосуванням відповідних протекторів, насамперед із антиоксидантною активністю. У цьому аспекті привертає увагу препарат “Е-селен”, обидва компоненти якого (вітамін Е і мікроелемент селен) є потужними антиоксидантами [5; 12; 19]. Із даних, отриманих під час досліджень впливу препарату “Е-селен”, як коригувального чинника, випливає, що введення препарату сприяє нормалізації піруваткіназної та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності еритроцитів і підвищує ці показники порівняно зі значеннями, притаманними клітинам кролів групи Д1, інтоксикованих введенням $K_2Cr_2O_7$ ($p < 0,001$) (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив $K_2Cr_2O_7$, препарату “Е-селен” та біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на активність ензимів енергетичного обміну в еритроцитах кролів (M±m, n=5)

Показник	Групи тварин, умови досліджень			
	Контроль	Д1 ($K_2Cr_2O_7$)	Д2 ($K_2Cr_2O_7$ + “Е-селен”)	Д3 ($K_2Cr_2O_7$ + <i>P. rhodozyma</i>)
Піруваткіназа, нмоль NADH/хв. на 1 мг білка	20,54±1,70	7,58±0,44***	16,32±1,24###	13,85±1,97”
ЛДГ, нмоль NADH/хв. на 1 мг білка	174,0±5,20	151,0±7,02*	158,6±9,3	170,5±11,5
Г-6-ФДГ, нмоль NADP/хв. на 1 мг білка	36,20±2,11	13,57±0,80***	31,85±2,74###	29,17±2,30””””

Примітка: 1) *, *** – вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$);

2) #, ### – вірогідність різниць у показниках між групою кролів, яким вводили $K_2Cr_2O_7$ і препарат “Е-селен”, та групою тварин, яким вводили $K_2Cr_2O_7$ впродовж 14-ти діб (# – $p < 0,05$, ### – $p < 0,001$);

3) ”, ”””” – вірогідність різниць у показниках між групою кролів, яким вводили $K_2Cr_2O_7$ і біомасу дріжджів *P. rhodozyma*, та групою тварин, яким вводили $K_2Cr_2O_7$ впродовж 14-ти діб (” – $p < 0,05$, ”””” – $p < 0,001$).

Подібні ефекти встановлені в дослідженнях впливу внутрішньошлункового введення біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на активність ензимів у клітинах тварин, інтоксикованих біхроматом. Наведені в табл. 1 результати свідчать, що в еритроцитах кролів, яким вводили дріжджі водночас із $K_2Cr_2O_7$, відбувається наближення ензимної активності до контрольних значень і, водночас, активація піруваткінази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази порівняно з групою тварин, яким вводили лише $K_2Cr_2O_7$ ($p < 0,05-0,001$).

Із отриманих результатів можна зробити висновок, що застосування препарату “Е-селен” і біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* сприяє коригуванню активності ензимів гліколізу і пентозофосфатного шунта в еритроцитах за умов надходження в організм тварин шестивалентного хрому. Аналізуючи встановлені ефекти, необхідно враховувати те, що селен і вітамін Е крім антиоксидантної активності виявляють стимуляційний вплив на процес еритропоезу в організмі тварин [1; 5; 12; 17; 19]. Тому нормалізація ензимної активності у кролів групи Д2 певною мірою може зумовлюватись збільшенням інтенсивності надходження в кровообіг молодих еритроїдних клітин, яким притаманний високий вміст молекул ензимів та активний метаболізм. Коригувальний вплив біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* можна пояснити, з одного боку, здатністю цих мікроорганізмів до відновлення шестивалентного хрому [6], а з іншого – до синтезу каротиноїду астаксантину, який є потужним

антиоксидантом і зменшує рівень пошкодження еритроцитів активними формами кисню [3; 18; 20]. Водночас відома здатність каротиноїдів регулювати процес еритропоезу [12; 13], що сприяє коригувальній дії каротиногенних дріжджів *Phaffia rhodozyma* в організмі тварин, інтоксикованих введенням калію біхромату.

Висновки. Надходження $K_2Cr_2O_7$ в організм кролів зумовлює інгібування піруваткінази, лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази активності в еритроцитах. Застосування препарату “Е-селен” та біомаси каротиногенних дріжджів *Phaffia rhodozyma* на тлі інтоксикації тварин біхроматом сприятливо впливає на метаболічну активність у клітинах крові, зумовлює активацію ензимів енергетичного обміну порівняно зі значеннями, притаманними тваринам, яким вводили лише $K_2Cr_2O_7$. Установлені коригувальні ефекти можуть зумовлюватись стимуляційним впливом препарату “Е-селен” на еритропоез та антиоксидантною дією “Е-селену” і синтезованого дріжджами *Phaffia rhodozyma* астаксантину. Водночас важливе значення у коригувальній дії *P. rhodozyma* має здатність зазначеного штаму мікроорганізмів до відновлення шестивалентного хрому, а отже, детоксикації біхромату в травному тракті тварин.

Література

1. Антоняк Г.Л. Морфологічно-біохімічні аспекти еритропоезу в онтогенезі тварин // Біологія тварин. – 1999. – Т. 1, № 1. – С.30–45.
2. Антоняк Г.Л. Вплив шестивалентного хрому на гематологічні показники в організмі щурів / Г.Л. Антоняк, О.Б. Скаб, Н.Є. Панас // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – 2010. – Вип. 11, № 2-3. – С. 11–14.
3. Антоняк Г.Л. Вплив препарату «Е-Селен» і біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на стан антиоксидантної системи в клітинах щурів за експериментального афлатоксикозу / Г.Л. Антоняк, Р.О. Федяков // Матеріали міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Формування стратегії науково-технічного, екологічного і соціально-економічного розвитку суспільства» 6-7 грудня 2012 р. Ч. 2. – Тернопіль: Крок, 2012. – С. 61–63.
4. Астауров Б.Л. Методы биологии развития. – М., 1974. – С. 346–433.
5. Жилищич Ю.В. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів в еритроцитах щурів, яким вводили вітамін Е на тлі токсикації катіонами кадмію / Ю.В. Жилищич, Г.Л. Антоняк // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – 2010. – Вип. 11, № 2-3. – С. 287–290.
6. Нечай Г.І. Редукція хрому та каротиносинтезувальна активність резистентних до селеніту мутантів дріжджів *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) / Г.І. Нечай, Г.П. Кшемінська, Г.В. Колісник, М. Гжондка, М.В. Гончар // *Biopolymers and Cell*. – 2009. – Vol. 25, N 4. – P. 266–271.
7. Северин С.Е. Практикум по биохимии / С.Е. Северин, Г.А. Соловйов // Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.

8. Скаб О.Б. Вплив інгаляційного надходження шестивалентного Хрому на активність ензимів енергетичного обміну в еритроцитах білих щурів / О.Б. Скаб, Г.Л. Антоняк // Науковий вісник ЛНУВА ім. С. Гжицького. – 2012. – Т. 14, № 2(52). – С. 144–147.
9. Скаб О.Б. Вплив Cr (VI) на стійкість еритроцитів щурів до гемолізу / О.Б. Скаб, Г.Л. Антоняк // Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Стан природних ресурсів, перспективи їх збереження та відновлення», м. Трускавець. – 11–13 жовтня 2012 р.
10. Ataullakhanov F.I. What determines the intracellular ATP concentration / F.I. Ataullakhanov, V.M. Vitvitsky // Biosci. Rep. – 2002. – Vol. 22, N 5-6. – P. 501–511.
11. Athavale P. EPIDERM Occupational dermatitis related to chromium and cobalt: experience of dermatologists (EPIDERM) and occupational physicians (OPRA) in the UK over an 11-year period (1993–2004) / P. Athavale, K. Shum, Y. Chen et al. // Br. J. Dermatol. – 2007. – Vol. 157, N 3. – P. 518–522.
12. Chan A.C. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia / A.C. Chan, C.K. Chow, D. Chiu // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1999. – Vol. 222, N 3. – P. 274–282.
13. Cusick S.E. Short-term effects of vitamin A and antimalarial treatment on erythropoiesis in severely anemic Zanzibari preschool children / S.E. Cusick, J.M. Tielsch, M. Ramsan et al. // Am. J. Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 82, N 2. – P. 406–412.
14. De Rosa M.C. Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: new insights in gas transport and metabolic modulation / M.C. De Rosa, C.C. Alinovi, A. Galtieri et al. // IUBMB Life. – 2008. – Vol. 60, N 2. – P. 87–93.
15. Ding S.Z. Epithelial-mesenchymal transition during oncogenic transformation induced by hexavalent chromium involves reactive oxygen species-dependent mechanism in lung epithelial cells / S.Z. Ding, Y.X. Yang, X.L. Li et al. // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2013. – Vol. 269, N 1. – P. 61–71.
16. Gochfeld M. A. Research agenda for environmental health aspects of chromium / M. Gochfeld, C. Witmer // Environ. Health Perspect. – 1991. – Vol. 92. – P. 141–144.
17. Jilani T. Does vitamin E have a role in treatment and prevention of anemia? / T. Jilani, M.P. Iqbal // Pak. J. Pharm. Sci. – 2011. – Vol. 24, N 2. – P. 237–242.
18. Johnson E.A. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey // Int. Microbiol. – 2003. – Vol. 6, N 3. – P. 169–174.
19. Marković S.D. Effects of acute in vivo cisplatin and selenium treatment on hematological and oxidative stress parameters in red blood cells of rats / S.D. Marković, D.S. Djačić, D.M. Cvetković et al. // Biol. Trace Elem. Res. – 2011. – Vol. 142, N 3. – P. 660–670.
20. Schmidt I. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) / I. Schmidt, H. Schewe, S. Gassel et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 89, N 3. – P. 555–571.

21. Soudani N. Nephrotoxicity induced by chromium (VI) in adult rats and their progeny / N. Soudani, M. Sefi, H. Bouaziz et al. // Hum. Exp. Toxicol. – 2011. – Vol. 30, N 9. – P. 1233–1245.

22. Thompson C.M. Assessment of the mode of action underlying development of rodent small intestinal tumors following oral exposure to hexavalent chromium and relevance to humans / C.M. Thompson, D.M. Proctor, M. Suh et al. // Crit. Rev. Toxicol. – 2013. – Vol. 43, N 3. – P. 244–274.

23. Washington D.C. NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health). Biological effects of exposure // In: Criteria for a Recommended Standard: Occupational Exposure to Chromium(VI) / U.S. Department of Health, Education, and Welfare, 1975. – P. 23–121.

Summary

H.L. Antonyak¹, O.B. Skab²

¹*Ivan Franko Lviv National University, Lviv, Ukraine*

²*Lviv National Agrarian University, Dubliany, Ukraine*

EFFECTS OF "E-SELENIUM" AND YEASTS *PHAFFIA RHODOZYMA* BIOMASS ON ENERGY METABOLISM IN ERYTHROCYTES OF RABBIT UNDER ORAL INTAKE OF POTASSIUM DICHROMATE

The effects of chromium (VI) in the form of potassium dichromate, the preparation "E-selenium" and yeasts Phaffia rhodozyma biomass on pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in rabbit erythrocytes were studied. It was established that peroral intake of K₂Cr₂O₇ in a dose 5 mg / kg for 14 days lead to inhibition of catalytic activity of these enzymes in red blood cells of animals. Using the preparation "E-selenium" and yeasts Phaffia rhodozyma in the conditions of intoxication of rabbits with dichromate promoted the normalization pyruvate kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in red blood cells and increased these indices compared to the values in animals treated with K₂Cr₂O₇. The effects of these factors on metabolic activity of red blood cells can represent one of the important links in the mechanisms of "E-selenium" and Phaffia rhodozyma yeasts corrective action in organism of animals exposed to hexavalent chromium.

Key words: *chromium (VI), red blood cell, energy metabolism, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, selenium, vitamin E, Phaffia rhodozyma yeasts.*

Рецензент – д.с.-г.н., професор Буцяк В.І.