

**СТАН ГЛУТАТІОНОВОЇ ЛАНКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ
У КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ОКСИДАЦІЙНОГО СТРЕСУ ТА ЗА ДІЇ
ЛІПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ «БУТАСЕЛМЕВІТ»**

Т. В. МАРТИШУК, аспірант лабораторії імунології,
О. І. ВІЩУР, доктор ветеринарних наук, професор,
завідувач лабораторії імунології

Інститут біології тварин НААН, м. Львів

Б. В. ГУТИЙ, доктор ветеринарних наук,
професор кафедри фармакології та токсикології,
**Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького, м. Львів**
E-mail: bvh@ukr.net

Анотація. У статті наведено результати досліджень впливу розробленого комплексного ліпосомального препарату «Бутаселмевіт» на активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту у крові щурів за умов змодельованого оксидативного стресу, спричиненого застосуванням тетрахлорметану. Доведено, що внутрішньом'язова ін'єкція щурам дослідних груп 50%-го олійного розчину тетрахлорметану у дозі 0,25мл на 100г маси тіла тварини зумовлює антигенне навантаження на організм і призводить до пригнічення активності глутатіонової системи антиоксидантного захисту організму щурів. На це вказує низька активність глутатіонпероксидази та низький рівень відновленого глутатіону у крові щурів.

Для підвищення активності системи антиоксидантного захисту за розвитку оксидативного стресу доцільно застосовувати ліпосомальний препарат «Бутаселмевіт», який містить бутафосфан, селен, метіонін, розторопшу пляmistу та вітаміни. Установлено, що парентеральне введення щурам за розвитку оксидативного стресу ліпосомального препарату «Бутаселмевіт» призводить до підвищення активності глутатіонпероксидази та рівня відновленого глутатіону у крові щурів дослідної групи.

Зазначені результати досліджень вказують про антиоксидантні властивості нового ліпосомального препарату «Бутаселмевіт».

Ключові слова: оксидативний стрес, щурі, тетрахлорметан, глутатіонпероксидаза, відновлений глутатіон, ліпосомальний препарат «Бутаселмевіт».

Актуальність. Інтенсивність вільнорадикального перекисного окиснення в організмі залежить від концентрації кисню в тканинах, а також від активності ензимних і неензимних систем [4]. Останнім часом виділено спеціальні органели (пероксисоми), у яких зосереджені специфічні ензимні системи вільнорадикального перекисного окиснення [2]. Крім того, виявлено біологічно активні речовини (біоантиоксиданти), які в невеликих концентраціях гальмують вільнорадикальні процеси внаслідок впливу на одну або декілька ланок системи утворення активних форм кисню та реактивують антиоксидантні ензими [6]. Пероксисоми та біоантиоксиданти складають антиоксидантну систему захисту організму. Ця система регулює інтенсивність радикалоутворення та знешкоджує продукти пероксидації [4]. Основним завданням антиоксидантної системи є підтримання балансу між інтенсивністю радикалоутворення та потребами організму у фізіолого-біохімічних кількостях радикалів кисню та їхніх похідних. Вона також бере участь у синтезі біологічно активних речовин, що регулюють проникність клітинних мембран [6].

Для підвищення адаптаційної здатності й імунобіологічної реактивності організму, посилення протеїнсинтезувальної та ензимної функції у тварин в останні роки з успіхом використовують нові комплексні препарати [7, 9, 10]. Окремими авторами встановлено стимулювальний вплив розторопші плямистої, вітамінів, Селену та бутафосфану на активність антиоксидантної та гепатопротекторної дії у тварин [2, 4]. Однак комплексне застосування зазначених препаратів на функцію печінки та захисні системи організму на сьогодні в науковій літературі висвітлене недостатньо.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Рівень перекисного окиснення визначається, з одного боку, процесами утворення вільних радикалів та перекисів, а з іншого – станом ендогенних систем антиоксидантного захисту, тому характеристика антиоксидантної системи в організмі тварин має практичне значення [1]. Відомо, що система антиоксидантного захисту контролює реакції утворення вільних радикалів і гальмує всі їхні етапи активації, починаючи від ініціалізації та закінчуючи проміжними та кінцевими продуктами ПОЛ [3, 4].

Функціональну основу системи антиоксидантного захисту формує глутатіонова система, складовими елементами якої є власне глутатіон і ензими, що каталізують реакції його зворотного перетворення (окиснення ↔ відновлення). До цих ензимів відносять глутатіонпероксидазу, глутатіонредуктазу. Участь глутатіону і зв'язаних з ним систем у процесах біотрансформації та детоксикації токсинів можна розглядати як один з елементів загальних механізмів, що визначають стійкість організму до негативної дії токсинів. Аналіз даних літератури свідчить про те, що рівень GSH, активності

глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази – ензимів синтезу і катаболізму GSH - можна використовуватись як критерії оцінки негативної дії токсинів різної хімічної природи [8].

Метою наших досліджень було дослідити вплив оксидативного стресу стан глутатіонової ланки антиоксидантної системи у крові щурів за дії ліпосомального препарату «Бутаселмевіт».

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводили на білих статевозрілих молодих щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 180-200г, яких утримували на стандартному раціоні інститутського віварію Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Протягом усього експерименту щурів утримували на збалансованому раціоні, що містив усі необхідні компоненти, питну воду тварини отримували без обмежень із скляних поїлок об'ємом 0,2л.

Тварин було поділено на три групи по 20 тварин у кожній: 1-а група (К) – інтактні тварини; 2-а група (Д₁) – щурі, ураженні тетрахлорметаном; 3-я група (Д₂) – щурі, ураженні тетрахлорметаном та ліковані ліпосомальним препаратом «Бутаселмевіт». Токсичне ураження щурів викликали внутрішньом'язевим введенням 50%-го тетрахлорметану у дозі 0,25мл на 100г маси тіла тварини на першу і третю добу досліджень. Тваринам дослідної групи Д₂ на першу і третю доби досліджень за годину після введення тетрахлорметану додатково вводили ліпосомальний препарат у дозі 2мл на 1кг маси тіла тварини. До складу цього препарату входять такі речовини: бутафосфан, селен, метіонін, розторопша ін'єкційна та вітаміни А, Е і Д₃.

Кров для біохімічних досліджень забирали під ефірним наркозом з яремної вени на другу, п'яту, десятую та п'ятнадцяту добу експерименту. Глутатіонпероксидазну активність (ГП) визначали за швидкістю окиснення глутатіону в присутності гідроперекису третинного бутілу та вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах крові [5].

Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

Аналізували результати досліджень за допомогою пакета програм Statistica 6.0. Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Результати вважали вірогідними за $P \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Розвиток оксидативного стресу у щурів, спричинений внутрішньом'язевим введенням тетрахлорметану, супроводжувався пригніченням активності глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Так, у щурів дослідної групи Д₁ спостерігали зниження активності глутатіонпероксидази, ензиму, який забезпечує захист мембран клітин

від руйнівної дії пероксидних радикалів. Цей ензим каталізує розпад перекису водню і окиснює глутатіон. Установлено, що на другу добу досліду активність глутатіонпероксидази у крові дослідної групи щурів була найнижчою, де відносно контрольної групи вона знизилася на 61%. У подальшому активність досліджуваного ензиму у крові щурів за умов розвитку оксидативного стресу дещо зростала, однак, порівнюючи з контрольною групою щурів, вона була нижчою на 53%. На 10-у і 14-у добу досліду активність глутатіонпероксидази у крові щурів дослідної групи коливалась у межах $0,135 \pm 0,014$ - $0,147 \pm 0,017$ нмоль GSH/хв×мг білка.

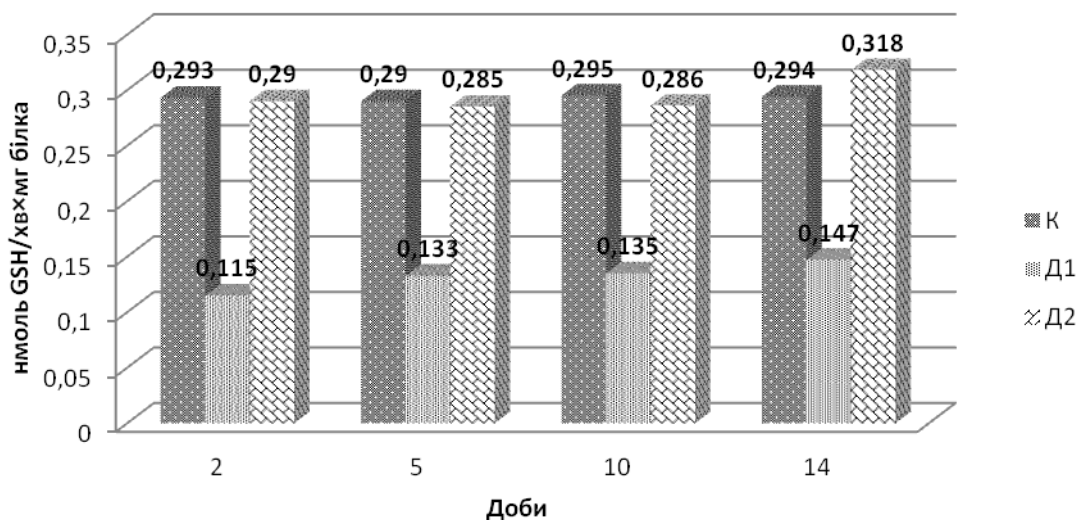


Рис. 1. Активність глутатіонпероксидази у сироватці крові щурів за умов оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату «Бутаселмевіт»

Глутатіон відновлений є основним сірковмісним антиоксидантом в організмі тварин. Він захищає сульфгідрильні групи глобіну, мембрани еритроцитів, двовалентне залізо від дії окиснювачів. Він є центральним компонентом системи антиоксидантного захисту майже всіх клітин і органів. Його антиоксидантна дія пов'язана з перенесенням сульфгідрильних груп [4]. За розвитку оксидативного стресу рівень відновленого глутатіону у крові дослідної групи щурів на другу добу досліду знизився на 50% відносно контролю. Найнижчим рівень відновленого глутатіону був у крові дослідної групи щурів на п'яту добу досліду, де відповідно коливався у межах $0,255 \pm 0,014$ мкмоль/мл. На 10-у і 14-у добу досліду рівень досліджуваного показника порівняно з контролем був нижчим на 45% і 47%.

Незначне підвищення активності глутатіонпероксидази та рівня відновленого глутатіону в останні доби досліду, можливо, зумовлене

тим, що відбувається посилене утворення радикальних метаболітів і збільшується вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів внаслідок токсичної дії тетрахлорметану. За таких умов включається захисна реакція організму тварин на цю патологію і активується система антиоксидантного захисту організму.

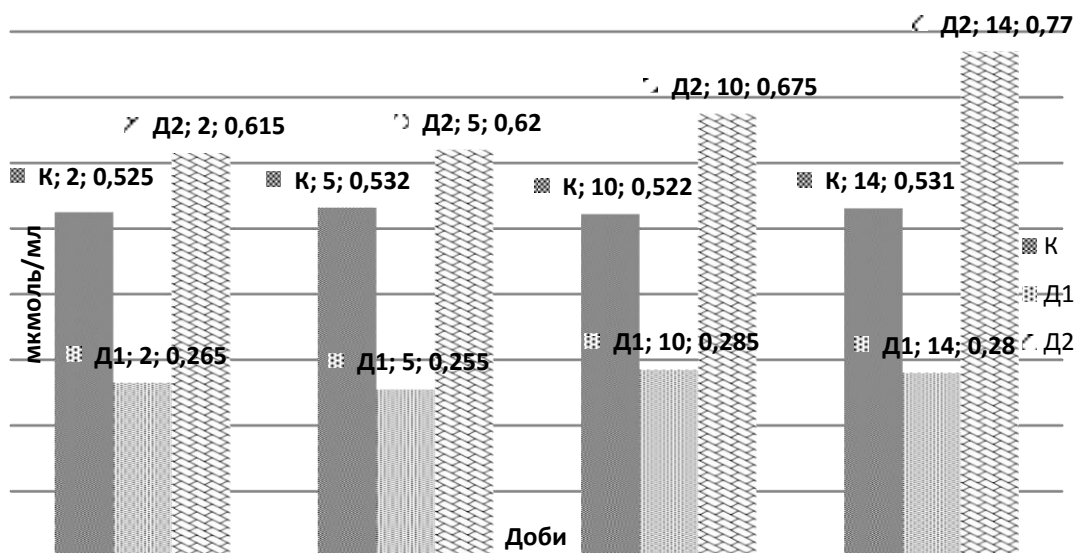


Рис. 2. Рівень відновленого глутатіону у крові щурів за умов оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату «Бутаселмевіт»

У цілому одержані нами результати досліджень вказують на те, що розвиток оксидативного стресу призводить до порушення рівноваги у комплексі «система антиоксидантного захисту – перекисне окиснення ліпідів».

Для боротьби з проявами токсичного ураження печінки в останні роки все частіше застосовують препарати-антиоксиданти для корекції системи антиоксидантного захисту та знешкодження продуктів вільнорадикального окиснення. Пошук діючих речовин з антиоксидантними властивостями – досить перспективний напрям досліджень, хоча і вимагає врахування проблеми сумісності природних і синтетичних антиоксидантів. Визначальними факторами антиоксидантної дії препарату є загальна чисельність речовин-антиоксидантів у його складі, якісний антиоксидантний спектр (наявність вітамінів, вітаміноподібних речовин, мікроелементів-металів), а також загальний кількісний вміст речовин з антиоксидантними властивостями.

Унаслідок дії ліпосомального препарату «Бутаселмевіт» у крові щурів дослідної групи Д₂ за розвитку оксидативного стресу на другу добу досліді встановлено вірогідне підвищення активності глутатіонпероксидази до $0,290 \pm 0,015$ нмоль GSH/хв*мг білка та рівня

відновленого глутатіону до $0,615 \pm 0,033$ мкмоль/мл, де відносно тварин першої дослідної групи вони зросли на 60% і 132%. На п'яту добу досліді активність глутатіонпероксидази у сироватці крові дослідної групи D₂ дещо знизилася відносно попередньої доби, однак порівняно із хворими щурами, яких не лікували, була вищою на 114%

На десяту добу досліді рівень відновленого глутатіону у крові щурів дослідної групи, яким вводили ліпосомальний препарат, коливався у межах $0,675 \pm 0,023$ мкмоль/мл, що у 2,4 разу був вищим за показники тварин дослідної групи D₁. У зазначений період досліді активність глутатіонпероксидази у сироватці крові щурів дослідної групи D₂ коливалася у межах $0,286 \pm 0,022$ нмоль GSH/хв*мг білка.

На чотирнадцяту добу досліді рівень відновленого глутатіону та активність глутатіонпероксидази у крові щурів, яким застосовували ліпосомальний препарат, були найвищими.

Отже, ліпосомальний препарат «Бутаселмевіт» у разі застосування щурам за розвитку оксидативного стресу пригнічував процеси перекисного окиснення ліпідів та активізував систему антиоксидантного захисту, на що вказує високий рівень відновленого глутатіону й активність глутатіонпероксидази. Це, можливо, пов'язано з тим, що до складу препарату входять такі два сильні антиоксиданти, як вітамін Е та селен, які посилюють дію один одного і тим самим пригнічують радикалоутворення та процеси перекисного окиснення ліпідів. Також варто зазначити антиоксидантні властивості розторопші плямистої, яка згідно з даними літератури також має антиоксидантні властивості. До її складу входять вітаміни групи В, А, Е, К, попередники вітаміну Д, каротиноїди, макроелементи – калій, кальцій, магній, ферум та мікроелементи – купрум, цинк, марганець, йод. Сумарна дія зазначених біологічно важливих елементів має високу гепатопротекторну та антиоксидантну дії.

Отже, ліпосомальний препарат «Бутаселмевіт» запобігає розвитку оксидативного стресу за токсичної дії тетрахлорметану.

Висновки і перспективи. Проведена серія досліджень дозволила встановити суттєве порушення окисно-антиоксидантної рівноваги у тварин за умов оксидативного стресу, яке характеризується насамперед пригніченням ензимної та неензимної ланки системи антиоксидантного захисту організму щурів. Так, встановлено, що моделювання стресової реакції у щурів дослідної групи призводить до вірогідного зниження рівня відновленого глутатіону й активності глутатіонпероксидази на другу та п'яту добу експерименту.

У разі застосування ліпосомального препарату «Бутаселмевіт» щурам за умов оксидативного стресу протягом досліджень у крові настає активізація глутатіонової ланки антиоксидантної системи, на що вказує збільшення рівня відновленого глутатіону та активності глутатіонпероксидази у крові цих тварин. На 14-у добу досліді рівень

відновленого глутатіону й активність глутатіонпероксидази у крові дослідної групи Д₂ були найвищими. Зазначені результати досліджень вказують про антиоксидантні властивості нового ліпосомального препарату «Бутаселмевіт».

Перспективою подальших розвідок є вивчення показників імунної системи організму щурів за розвитку оксидативного стресу та дії ліпосомального препарату.

Список використаних джерел

1. Абрагамович О. О. Процеси ліпідної пероксидації при хронічних ураженнях печінки / О. О. Абрагамович, О. І. Грабовська, О. І. Терлецька // Медична хімія. – 2000. – Т. 2, №1. – С. 5-8.
2. Антоняк Г. Л. Утворення активних форм кисню та система антиоксидантного захисту в організмі тварин / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, Л. І. Сологуб // Біологія тварин. – 2000. – Т. 2, №2. – С. 34-43.
3. Барабой В. А. Перекисное окисление липидов и стресс / В. А. Барабой, И. И. Брехман, В. Г. Головитин // СПб.: Наука, 1992. – 268 с.
4. Бєленічев І. Ф. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І. Ф. Бєленічев, Є. Л. Левицький, С. І. Коваленко // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – №3. – С. 29-31.
5. Влізла В. В. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. Львів : Сполом, 2012. 764 с.
6. Гутий Б. В. Вплив хлориду кадмію на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів та стан системи антиоксидантного захисту організму щурів. / Б. В. Гутий // Вісник Сумського національного аграрного університету. – Суми, 2012. випуск 7(31) – С. 31-34;
7. Скрипник І. М. Гепатопротекторні засоби в сучасній гепатології // Consilium Medicum Ukraine. - 2007. - №1(5). - С. 11-15.
8. Шаповал Г. С. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активних форм кислорода / Г. С. Шаповал, В. Ф. Громова // Український біохімічний журнал. – 2003. – Т. 75, №2. – С. 5-11.
9. Lee J. Y. The preventive inhibition of chondroitin sulfate against the CCl4-induced oxidative stress of subcellular level / J. Y Lee, J. H. Lee, H. J. Kim [et al.] // Arch. Pharm. Res. - 2004. - Vol. 27, №3. - P.340-345.
10. Saba A. B., Oyagbemi A. A., Azeez O. I. Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and haemotoxicity by aqueous leaf extract of *Cnidioscolus aconitifolius* in rats. Nig. J. Physiol. Sci. - 2010 - 25, 139-147

References

1. Abragamovich, O. O., Grabovska, O. I., Terletska, O. I. (2000). Protsesi lipidnoyi peroksidatsiyi pri hronichnih urazhennyah pechinki. Medichna himiya. 2 (1), 5-8. (in Ukrainian).
2. Antonyak, G. L., Babich, N. O., Sologub, L. I. (2000). Utvorenniya aktivnih form kisnyu ta sistema antioksidantnogo zahistu v organizmi tvarin. Biologiya tvarin. 2 (2), 34-43. (in Ukrainian).
3. Baraboy, V. A., Brehman, I. I., Golovitin, V. G. (1992). Perekisnoe okislenie lipidov i stress. SPb.: Nauka, 268.
4. Belenichev, I. F., Levitskiy, E. L., Kovalenko, S. I. (2002) Antioksidantna sistema zahistu organizmu (oglyad). Sovremennye problemy toksikologii. 3, 29-31. (in Russian)
5. Vlizlo, V. V. (2012) Laboratorni metody` doslidzhen` u biologiyi, tvary`nny`chtvi ta vetery`narnij medy`cy`ni : dovidny`k / V. V. Vlizlo, R. S. Fedoruk, I. B. Ratych ta in.; za red. V. V. Vlizla. L`viv : Spolom, 764 (in Ukrainian).

6. Gutiy, B. V. (2012). Vpliv hloridu kadmiyu na intensivnist protsesiv perekisnogo okisnennya lipidiv ta stan sistemi antioksidantnogo zahistu organizmu shchuriv. Visnik Sumskogo natsionalnogo agrarnogo universitetu. 7(31), 31-34;

7. Skry`pny`k, I. M. (2007) Hepatoprotetorni zasoby` v suchasnij gepatologii//Consilium Medicumllkraina. 1(5), 11-15. (in Ukrainian).

8. Shapoval, G. S., Gromovaya, V. F., 2003. Mehanizmy antioksidantnoy zashchity organizma pri deystvii aktivnyh form kisloroda [The mechanisms of antioxidant defense in the action of reactive oxygen species] Ukr. biohim. zhurn. – T. 75, №2. – S. 5-13. (In Russian).

9. Lee, J. Y., Lee, J. H., Kim, H. J. (2004). The preventive inhibition of chondroitin sulfate against the CCl4-induced oxidative stress of subcellular level. Arch.Pharm.Res. 27 (3), 340-345.

10. Saba, A. B., Oyagbemi, A. A., Azeez, O. I. (2010). Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and haemotoxicity by aqueous leaf extract of Cnidocolus aconitifolius in rats. Nig. J. Physiol. Sci. 25, 139-147

СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНОВОГО ЗВЕНА АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА «БУТАСЕЛМЕВИТ»

Т. В. Мартышук, О. И. Вищур, Б. В. Гутый

Аннотация. В статье приведены результаты исследований влияния разработанного комплексного липосомального препарата «Бутаселмевит» на активность глутатионовой системы антиоксидантной защиты в крови крыс в условиях смоделированного оксидативного стресса, вызванного применением тетрахлорметана. Доказано, что инъекция крысам подопытных групп 50%-ого масляного раствора тетрахлорэтана в дозе 0,25мл на 100г массы тела животного вызывает антигенную нагрузку на организм и приводит к подавлению активности глутатионовой системы антиоксидантной защиты организма крыс. На это указывает низкая активность глутатионпероксидазы и низкий уровень восстановленного глутатиона в крови крыс.

Для повышения активности системы антиоксидантной защиты при развитии оксидативного стресса целесообразно применять липосомальный препарат «Бутаселмевит», который содержит бутафосфан, селен, метионин, расторопшу пятнистую и витамины. Установлено, что парентеральное введение крысам при развитии оксидативного стресса липосомального препарата «Бутаселмевит» приводит к повышению активности глутатионпероксидазы и уровня восстановленного глутатиона в крови крыс подопытной группы.

Указанные результаты исследований указывают на антиоксидантные свойства нового липосомального препарата «Бутаселмевит».

Ключевые слова: оксидативный стресс, крысы, тетрахлорметан, глутатионпероксидаза, восстановленный глутатион, липосомальный препарат «Бутаселмевит».

STATE OF GLUTATHIONIC LINK OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN BLOOD OF RATS UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS AND FOR THE ACTION OF LIPOSOMAL DRUG «BUTASELMEVIT»

T. Martyshuk, O. Vishchur, B. Gutyj

Abstract. *The article contains the results of search of the influence of the developed complex liposomal drug «Butaselmevit» on the activity of glutathione system of antioxidant protection in the blood of rats under condition of simulated oxidative stress, caused by the use of carbon tetrachloride.*

It is proved that intramuscular injection to rats of experimental group 50% of oil solution tetrachloromethane at a dose of 0.25 ml per 100 g of body weight of animal, causes antigenic load on the body and leads to inhibition of the activity of glutathione system of antioxidant protection of the rats body. This indicates the low activity of glutathione peroxidase and the low level of restored glutathione in the blood of rats.

To enhance the system activity of antioxidant protection for the development of oxidative stress it is advisable to use the liposomal drug «Butaselmevit», which in its structure contains butafosfan, selenium, methionine, milk thistle and vitamins.

It was set up that parenteral injection to rats for the development of oxidative stress of liposomal drug «Butaselmevit» leads to increase activity of glutathione peroxidase and restored glutathione levels in the blood of rats from the experimental group.

The indicated research results show the antioxidant properties of the new liposomal drug «Butaselmevit.»

Keywords: oxidative stress, rats, carbon tetrachloride, glutathione peroxidase, restored glutathione, liposomal drug «Butaselmevit».