

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 бутилу 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).

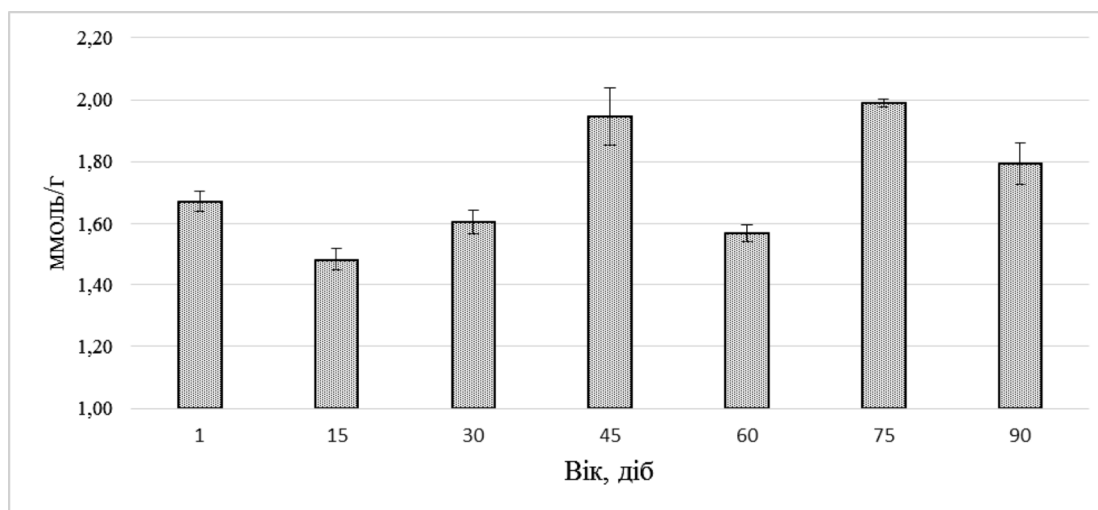


Рис. 1. Динаміка вмісту відновленого глутатіону у мозку кролів новозеландської породи ( $M \pm m$ ,  $n=5$ , ммоль/г).

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  $\gamma$ -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.

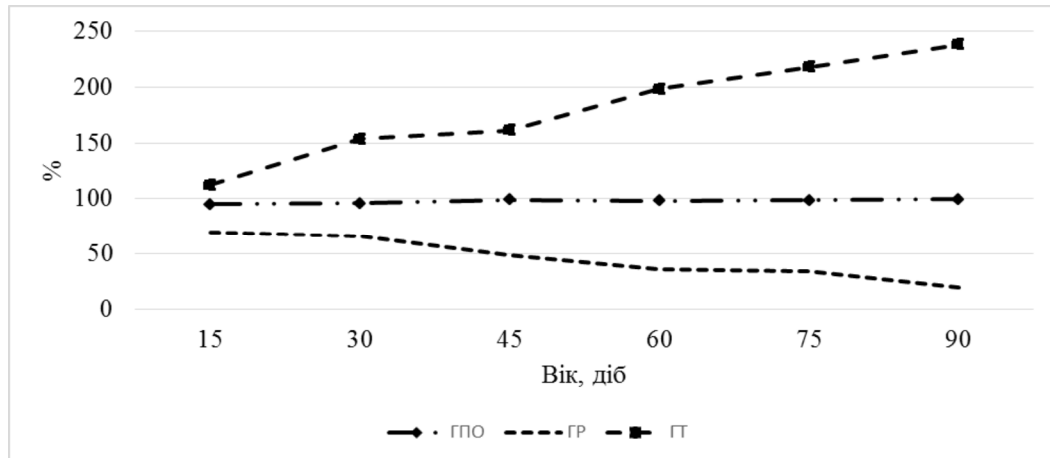


Рис. 2. Активність глутатіонзалежних ензимів у мозку кролів новозеландської породи порівняно з показниками в однодобовому віці ( $M \pm m$ ,  $n=5$ , %).

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 $\alpha$  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 oksylenyya 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, tvarynyystvi ta veterynarniy medytsyni / V.V. Vlizla, R.S. Fedoruk, I.B. Ratysh ta in.; za red. V.V. Vlizla. – L'viv: Spolom, 2012. – 762 s.
4. Moyn V.M. Prostoy i spetsificheskyy metod opredeleniya aktivnosti glutathionperoksidazy v eritrotsitah / V.M. Moyn // *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' // *Eksperyem. ta klinichna fiziologiya 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: «Biologiya»*. – 2007. – Vyp. 6, № 788. – С. 157–164.
7. Salyha Yu. Hlutationova systema erytrotsytyv 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 // *Tvarynyystvo 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 $\alpha$  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.*