

УДК: 612.398.192:577.112.384:612.015.1

Функціонування антиоксидантної системи щурів за дії L-глутамінової кислоти та цистеїну на фоні експериментального стресу Н.О.Салига

*Інститут біології тварин НААН (Львів, Україна)
ynosyt@yahoo.com*

Вивчено вплив L-глутамінової кислоти (L-Glu), цистеїну (L-Cys) та L-Glu у комплексі з L-Cys на активність окремих антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази та каталази) та інтенсивність пероксидних процесів у крові щурів за дії стресу. Встановлено, що застосування L-Glu, L-Cys та L-Glu у комплексі з L-Cys після дії стресу приводило до змін активності окремих ензимів антиоксидантного захисту та інтенсивності пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ). Показано, що у тварин, які зазнавали дії стресу без застосування вищезгаданих амінокислот, активність каталази та супероксиддисмутази знижувалась та зростав вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів порівняно до тварин контрольної групи. Додаткове введення L-Glu та L-Glu у комплексі з Cys за дії стресу дозволило організму вийти на рівень контрольних значень, що відобразилось на показниках активності супероксиддисмутази та каталази, а також вмісті гідропероксидів ліпідів і ТБК-активних продуктів.

Ключові слова: *L-глутамінова кислота, цистеїн, супероксиддисмутаза, каталаза, гідропероксили ліпідів, ТБК-активні продукти.*

Функционирования антиоксидантной системы крыс при действии L-глутаминовой кислоты и цистеина на фоне экспериментального стресса Н.О.Салыга

Изучено влияние L-глутаминовой кислоты (L-Glu), цистеина (L-Cys) и L-Glu в комплексе с L-Cys на активность отдельных антиоксидантных энзимов (супероксиддисмутаза и каталаза) и интенсивность пероксидных процессов в крови крыс при действии стресса. Установлено, что применение L-Glu, L-Cys и L-Glu в комплексе с L-Cys после воздействия стресса приводило к изменениям активности отдельных ферментов антиоксидантной защиты и интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ). Показано, что у животных, подвергавшихся воздействию стресса без применения вышеупомянутых аминокислот, активность каталазы и супероксиддисмутаза снижалась и возрастало содержание продуктов пероксидного окисления липидов по сравнению с животными контрольной группы. Дополнительное введение L-Glu и L-Glu в комплексе с Cys при действии стресса позволило организму выйти на уровень контрольных значений, что отразилось на показателях активности супероксиддисмутаза и каталаза, а также содержания гидропероксидов липидов и ТБК-активных продуктов.

Ключевые слова: *L-глутаминовая кислота, цистеин, супероксиддисмутаза, каталаза, гидропероксиды липидов, ТБК-активные продукты.*

Functioning of antioxidant system of rats at the action of L-glutamic acid and cysteine at experimental stress N.O.Salyha

The effect of L-glutamic acid (L-Glu), cysteine (L-Cys) and L-Glu in combination with L-Cys on the activity of some antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) and intensity of peroxide processes in the blood of rats at stress has been studied. It has been found that application of L-Glu, L-Cys and L-Glu in combination with L-Cys at stress leads to changes in activity of some antioxidant enzymes and intensity of lipid peroxidation (LPO). It has been shown that in animals stressed without use of these amino acids activity of catalase and superoxide dismutase decreased and content of lipid peroxidation products increased compared to animals of the control group. Additional introduction of L-Glu and L-Glu in combination with Cys at stress has allowed for the organism reach a level of control values, that was manifested in the indices of activity of superoxide dismutase and catalase and content of lipid hydroperoxides and TBA-active products.

Key words: *L-glutamic acid, cysteine, superoxide dismutase, catalase, hydroperoxides, TBA-active products.*

Вступ

Виявлення біологічно активних речовин, які б сприяли більш швидкій адаптації організму в стресових умовах, є особливо актуальним. При стресі запускається цілий комплекс біохімічних реакцій. Це зумовлено реакцією адаптації організму до екстремальних умов. Зокрема, за дії стресу підвищується рівень основного обміну та збільшується розпад білків організму. Швидке відновлення організму після стресової реакції зумовлене швидкою мобілізацією систем антиоксидантного захисту (Гаврилюк та ін., 2005). А вищий рівень антиоксидантів є одним з основних чинників, які сприяють у боротьбі з оксидативним стресом. L-Glu та її солі мають широкий спектр фармакологічної активності, володіють антигіпоксичною та дезінтоксикаційною дією (Hansen, Caspi, 2010; Li et al., 2007; Roth, 2008). Крім того, L-Glu має нормалізуючий вплив на функцію мітохондрій при екстремальних впливах на організм. Відомо, що ряд похідних нейроамінокислот, зокрема, L-Glu мають виражену антиоксидантну та мембраностабілізуючу дію завдяки пригніченню пероксидного окиснення ліпідів (Галимская, Демидова, 2009; Newsholme et al., 2003). Ензими, залучені у метаболізм L-Glu, займають центральне місце у амінокислотному обміні (Brosnan, Brosnan, 2012). Під час захворювань і стресів організм використовує велику кількість L-Glu. Застосування цієї амінокислоти допомагає зменшити потреби м'язової тканини у людини, оскільки вона проявляє сильну антикатаболітичну дію (Manso et al., 2012; Wu, 2010). Розуміння залежності між показниками пероксидного окиснення ліпідів і активністю антиоксидантних ензимів у різних тканинах і клітинах дозволить цілеспрямовано діяти на внутрішньоклітинні процеси. Це дозволить пом'якшити наслідки оксидативного стресу і попередити його розвиток.

L-Glu у комплексі з цистеїном і гліцином входить до складу трипептиду глутатіону, який бере активну участь у функціонуванні системи антиоксидантного захисту. Введення тваринам амінокислот з яких складається глутатіон, може частково або повністю попередити розвиток окислювального стресу за дії різних шкідливих чинників.

У зв'язку з вищесказаним, метою нашої роботи було з'ясування впливу високих доз L-Glu, L-Cys та L-Glu у комплексі з L-Cys на показники пероксидного окиснення та активність окремих ензимів антиоксидантного захисту за умов гострого стресу.

Об'єкти та методи дослідження

Дослід проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200–220 г, які були розділені на 5 груп по 10 тварин у групі (чотири дослідні та одна контрольна). Тваринам першої дослідної групи вводили внутрішньочеревинно адреналін у дозі 10 мкг/100 г маси тіла, тваринам другої, третьої та четвертої дослідних груп вводили адреналін у дозі 10 мкг/100г маси тіла, після чого щурам другої групи – розчин L-Glu у дозі 750 мг/кг, щурам третьої групи – розчин L-Cys у дозі 300 мг/кг та L-Glu у дозі 750 мг/кг, щурам четвертої групи – розчин L-Cys у дозі 300 мг/кг. Щурам контрольної групи вводили відповідну кількість фіз. розчину. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Через 24 години тварин всіх груп за анестезії ефіром декапітували. 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 Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

В еритроцитах крові визначали активність супероксиддисмутази СОД (КФ 1.15.1.1) за методом, який ґрунтується на відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами (Чевари и др., 1991) та активність каталази (КФ 1.11.1.6) – за зменшенням інтенсивності забарвлення утвореного комплексу H_2O_2 з солями молібдену (Влізло та ін., 2012). У плазмі крові визначали концентрацію гідропероксидів ліпідів (Миرونчик, 1984), вміст ТБК-активних продуктів (Коробейникова, 1989).

Одержані цифрові дані обробляли статистично. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

Ензими – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіонзалежні пероксидази та трансферази забезпечують одну з перших ліній захисту клітин від агресивної дії вільних радикалів. СОД відіграє важливу роль у захисті клітин від дії супероксид-аніон радикала, стабілізує клітинні мембрани, що запобігає процесам ПОЛ та знижує рівень O_2^- . Реакції дисмутації супероксид-аніон-радикала і розкладання перекису водню екзотермічні, а ензими СОД і каталаза, які каналізують ці реакції, не

потребують кофакторів. Це робить їх активність незалежною від функціонування інших клітинних структур. При оксидативному стресі рівень вільнорадикальних продуктів підвищується. Це, в свою чергу, приводить до активації відповідних генів, які кодують антиоксидантні ферменти, зокрема СОД.

Результати проведених досліджень показали (рис. 1), що активність СОД у досліджуваних еритроцитах крові була вірогідно нижчою у тварин першої дослідної групи, яка зазнавала дії стресу без застосування L-Glu та L-Cys, порівняно з тваринами контрольної групи. У тварин другої, третьої та четвертої дослідних груп активність СОД виходила на рівень контрольних значень, що свідчить про ефективне знешкодження супероксид аніон-радикала за впливу вищезгаданих амінокислот. Це узгоджується з думкою авторів (Меньщикова и др., 2006) про регулюючий вплив на активність СОД глутатіону, цистеїну, а також опосередковано ферментів глутатіонового обміну.

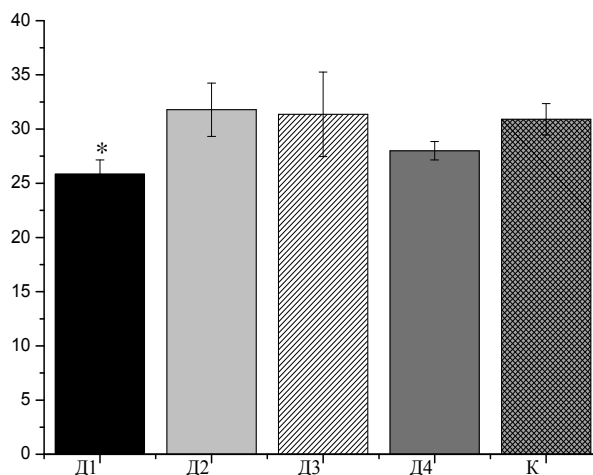


Рис. 1. Активність СОД в еритроцитах крові щурів за дії стресу (%/мл)

В цьому і наступних рис.: * – різниця вірогідна відносно тварин контрольної групи $p < 0,05$;

^ – різниця вірогідна відносно тварин першої дослідної групи $p < 0,05$.

Винятково важливим моментом ефективності ферментної ланки антиоксидантної системи є збалансованість активності СОД, каталази і пероксидази. Активність каталази та СОД корелюють між собою, що може бути пов'язано з переключенням потоку електронів з одного ланцюга транспорту на інший. У цих умовах СОД і каталаза діють як ланки однієї системи утилізації кисню, розміщені в різних ділянках клітини. Каталазна активність визначається майже у всіх тваринних клітинах і органах. Для розщеплення великої кількості перекису водню вимагається мала кількість ферменту.

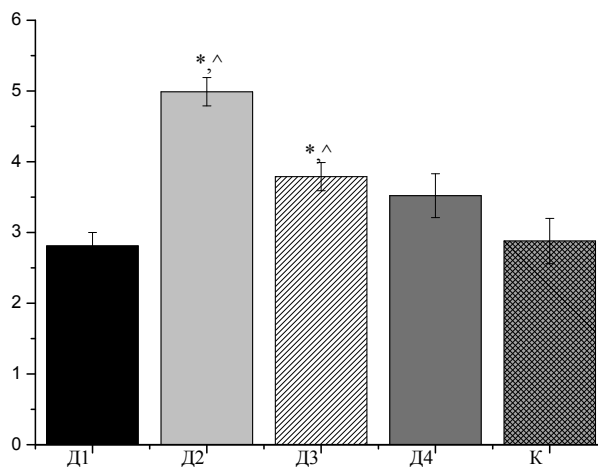


Рис. 2. Активність каталази в еритроцитах крові щурів за дії стресу (мМоль/хв мг протеїну)

Як видно з рис. 2, каталаза має іншу динаміку змін. Активність цього ферменту вірогідно зростає у тварин другої та третьої дослідних груп, які отримували відповідно L-Glu та L-Glu у комплексі з Cys. Слід зазначити більші зміни цього показника у тварин другої дослідної групи. Також відмічено зростання активності каталази у тварин четвертої дослідної групи, хоча ці дані не були вірогідні. Варто відмітити, що дані амінокислоти, які застосовувались після дії стресу, не лише сприяли виведенню даного показника на рівень контрольних значень, але були вищими, таким чином повністю нівелювали дію стресу. Крім того, не варто нехтувати тим фактом, що НАДФН є молекулою, яка стабілізує структуру каталази, тому, ймовірно, що після введення L-Glu висока каталазна активність обумовлена достатньою кількістю НАДФН.

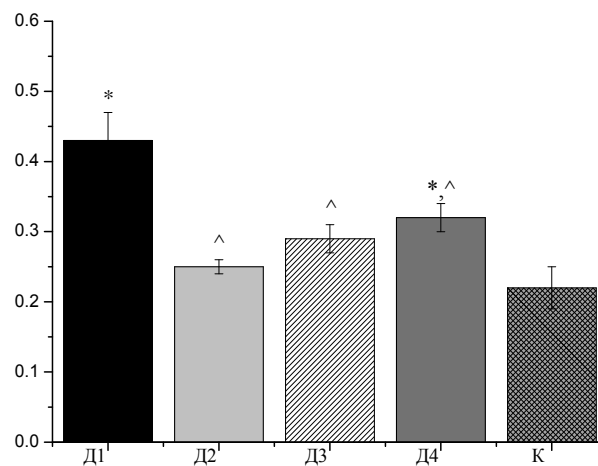


Рис. 3. Вміст гідропероксидів ліпідів в еритроцитах крові щурів за дії стресу (ОЕ/мл)

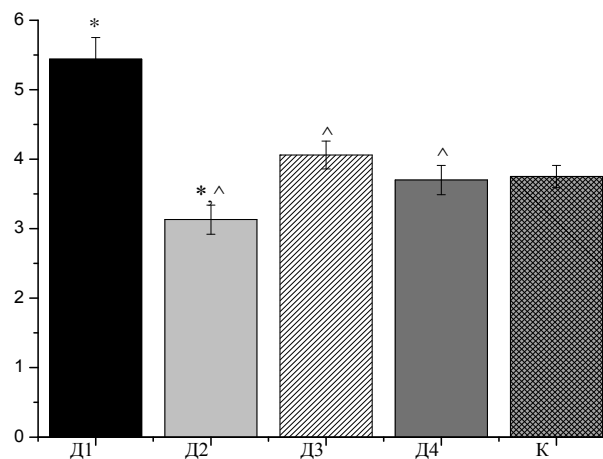


Рис. 4. Вміст ТБК-активних продуктів в еритроцитах крові щурів за дії стресу (ммоль/год мл)

При стресі зростає рівень активних форм кисню, підвищується інтенсивність ПОЛ, а токсична дія вільнорадикальних продуктів призводить до структурних та метаболічних порушень у клітинах. (Гаврилюк та ін., 2005). Застосування L-Glu та L-Glu у комплексі з Cys призводить до пригнічення окисних процесів в еритроцитах крові щурів, що проявляється у зниженні вмісту продуктів ПОЛ. Так, результати досліджень показали (рис. 3), що вміст гідропероксидів ліпідів був вірогідно більшим у тварин першої дослідної групи. Слід зазначити вірогідне збільшення цього показника у тварин четвертої дослідної групи, яка отримувала L-Cys. Що стосується тварин другої дослідної групи, які отримували додатково L-Glu, вміст гідропероксидів був на одному рівні з тваринами контрольної групи. У тварин третьої дослідної групи цей показник був незначно вищим порівняно до контролю. Це

можна пояснити властивостями L-Glu, яка володіє антиоксидантною та мембраностабілізуючою дією завдяки пригніченню пероксидного окислення ліпідів.

З наведених на рис. 4 даних видно, що вміст ТБК-активних продуктів в еритроцитах крові тварин першої дослідної групи був вірогідно вищий, порівняно з тваринами контрольної групи. Причиною підвищення рівня ПОЛ у крові щурів першої дослідної групи може бути як посилення генерації активних кисневих метаболітів, так і недостатня ефективність антиоксидантів. Слід відмітити, що різниця у вмісті ТБК-активних продуктів у тварин цієї групи була схожою до різниці у вмісті гідропероксидів. Вірогідне зниження цього показника спостерігалось у тварин другої дослідної групи, які отримували L-Glu. Аналізуючи ці дані, можна припустити що додаткове споживання L-Glu щурами пригнічує синтез ТБК-активних продуктів при стресі.

Таким чином, нами з'ясовано, що антиоксидантні властивості L-Glu сприяють пригніченню процесів пероксидного окислення ліпідів у тварин другої та третьої дослідних груп. У свою чергу, в еритроцитах крові підвищується каталазна активність, і виходить на рівень контрольних значень супероксиддисмутазна активність у тварин другої, третьої та четвертої дослідних груп порівняно до контролю.

Список літератури

- Влізло В.В., Федорук Р.С., Ратич І.Б. та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. – Львів: СПОЛОМ, 2012. – 761с. /Vlizlo V.V., Fedoruk R.S., Ratykh I.B. ta in. // Laboratorni metody doslidzhen' u biologii, tvarynnyctvi ta veterynarniy medytsyni. – L'viv.: SPOLOM, 2012. – 761s./
- Гаврилюк С.О., Чекман І.С., Горчакова Н.О. та ін. Роль оксидативного стресу в патогенезі атеросклерозу та ішемічної хвороби серця // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т.77, №2. – С. 16–23. /Gavrylyuk S.O., Chekman I.S., Gorchakova N.O. ta in. Rol' oksydatyvnogo stresu v patogenezi ateroskleroza ta ishemichnoi hvoroby sertsya // Ukr. biokhim. zhurn. – 2005. – Т.77, №2. – С. 16–23./
- Галимская Е.В., Демидова М.А. Обзор препаратов нейроаминокислот // Врач и аспирант. – 2009. – №6 (33). – С. 457–461. /Galimskaya Ye.V., Demidova M.A. Obzor preparatov neyroaminokislot // Vrach i aspirant. – 2009. – №6 (33). – С. 457–461./
- Коробейникова Э.Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // Лаб. дело. – 1989. – №7. – С. 8–10. /Korobeynikova E.N. Modifikatsiya opredeleniya POL v reaktsii s TBK // Lab. delo. – 1989. – №7. – С. 8–10./
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма«Слово», 2006. – 556с. /Men'shchikova Ye.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. i dr. Okislitel'nyy stress. Prooksidanty i antioksidanty. – M.: Firma«Slovo», 2006. – 556s./
- Мирончик В.В. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях. Авторское свидетельство №1084681 СССР, МКИ G № 33/48. (СССР). №3468369/2813; заявл. 08.07.82; опубл. 07.04.84. Бюл. №13. /Mironchik V.V. Sposob opredeleniya gidroperekisey lipidov v biologicheskikh tkanyakh. Avtorskoye svidetel'stvo №1084681 SSSR, MKI G №33/48. (SSSR). – №3468369/2813; zayavl. 08.07.82; opubl. 07.04.84. Byul. №13./
- Чевари С., Андял Т., Штиренгер Д. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте // Лаб. дело. – 1991. – Т.10. – С. 9–13. /Chevari S., Andyal T., Shtirenger D. Opredeleniye antioksidantnykh parametrov krovi i ikh diagnosticheskoye znacheniyе v preklonnom vozraste // Lab. delo. – 1991. – Т.10. – С. 9–13./
- Brosnan J.T., Brosnan M.E. Glutamate: a truly functional aminoacid // AminoAcids. – 2012. – Vol.25. – P. 207–218.
- Hansen A.M., Caspi R.R. Glutamate joins the ranks of immunomodulators // Nat.Med. – 2010. – Vol.16. – №8. – P. 856–858.
- Li P., Yin Y.L., Li D. et al. Amino acids and immune function // Br. J. Nutr. – 2007. – Vol.98 (2). – P. 237–252.
- Manso H.E., Filho H.C., Carvalho L.E. et al. Glutamine and glutamate supplementation raise milk glutamine concentrations in lactating gilts // J. Anim. Sci. Biotechnol. – 2012. – Vol.3. – P. 1–7.
- Newsholme P., Procopio J., Lima M.M. et al. Glutamine and glutamate: their central role in cell metabolism and function // Cell Biochem. Funct. – 2003. – Vol.21. – P. 1–9.
- Roth E. Nonnutritive effects of glutamine // J. Nutr. – 2008. – Vol.138. – P. 2025–2031.
- Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health // Adv.Nutr. – 2010. – Vol.1 (1). – P. 31–37.

Представлено: Є.І.Федорович / Presented by: Ye.I.Fedorovich

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 01.03.2013