УДК 577.12.–152.–161:591

МЕХАНІЗМИ ПІДТРИМКИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ РІВНОВАГИ В ТКАНИНАХ ПЕЧІНКИ ГУСЕЙ В УМОВАХ ГІПО- І ГІПЕРОКСІЇ

О. О. ДАНЧЕНКО[1], Ю. П. ПАЩЕНКО[1], Н. М. ДАНЧЕНКО[2], Л. М. ЗДОРОВЦЕВА[1]

[1]Мелітопольський державний педагогічний університет імені Богдана Хмельницького, Україна;
[2]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: danchenko.ea@mail.ru

Проаналізовано механізми підтримки прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у тканинах печінки гусей в умовах гіпо- і гіпероксії під час переходу від ембріонального до постнатального розвитку. Доведено, що формування адаптивної відповіді за цих умов відбувається шляхом запуску механізмів, які, по-перше, активують синтез антиоксидантів протеїнової природи, по-друге, знижують ненасиченість жирних кислот ліпідів печінки, що суттєво підвищує їхню резистентність до активних форм оксигену і, по-третє, збільшують ефективність функціонування системи антиоксидантного захисту за рахунок підвищення узгодженості дії її компонентів.

Ключові слова: ліпопероксидація, прооксидантно-антиоксидантна рівновага, активні форми оксигену, гіпо- і гіпероксія, ненасиченість жирних кислот, рівень узгодженості.

Ліпопероксидація – нормальний фізіологічний процес, що відіграє важливу роль у функціонуванні біохімічних систем клітини. За певного його рівня здійснюється біосинтез простагландинів, стероїдних гормонів, лейкотрієнів, тромбоксанів і регулюється активність мембранозв'язаних ензимів, проникність мембран, швидкість поділу клітин, стан окислювального фосфорилювання [1]. Проте, надмірна інтенсифікація пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) призводить до перебудови мембран, ушкодження нуклеїнових кислот і порушення синтезу протеїну, роз'єднання процесів окислення-фосфорилювання, виснаження ресурсів тканинних антиоксидантів [2].

Відомо, що після виведення птахів, у період адаптації до нових умов існування в кисневому середовищі [3] відбуваються значні метаболічні зрушення, пов'язані зі зміною маси тіла, гормонального статусу, інтенсифікацією процесів ПОЛ.

У підтримці гомеостазу на всіх етапах онтогенезу птиці важлива роль належить системі антиоксидантного захисту (АОЗ). Вона забезпечує інактивацію продуктів ПОЛ, запобігає їхньому накопиченню у тканинах та сприяє відновленню окислених сполук [4].

Раніше нами було досліджено онтогенетичні особливості функціонування системи АОЗ тканин гусей і механізми формування адаптивної відповіді за дії різних антропогенних чинників [5–8]. Значний об'єм інформації дозволяє провести її всебічне статистичне опрацювання з використанням сучасних методів багатовимірного статистичного аналізу, результати якого надають можливість на більш високому рівні узагальнити уявлення про механізми функціонування системи АОЗ гусей в онтогенезі та за дії антропогенних чинників.

Метою роботи було визначення головних механізмів підтримки прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у тканинах печінки гусей в умовах переходу від гіпоксії кінця ембріогенезу до гіпероксії початку атмосферного дихання.

Матеріали і методи

Для інкубації відбирали яйця гусей італійської породи із середньою масою (134,2 ± 8,4) г. Дослідження системи АОЗ в ембріогенезі проводили у фізіологічно обґрунтовані терміни: 15 діб – замикання алантоїсу, наявність сформованої печінки, 22 доби – перехід від протеїнового типу живлення до жовткового, 28 діб – перенесення ембріонів на виведення. У постнатальному періоді дослідження обмежували 14-добовим віком (ранній постнатальний період онтогенезу). Об'єктом дослідження були тканини печінки. Після декапітації пташенят під ефірним наркозом, виділені тканини промивали в фізіологічному розчині та гомогенізували

в 50 мМ фосфатному буфері (pH = 7,4). Ліпідні екстракти одержували за методом E. G. Bligh та W. J. Dyer [9] із рекомендаціями F. B. Palmer [10]. Жирнокислотний склад (ЖКС) визначали методом газорідинної хроматографії. Ненасиченість жирних кислот (ЖК) розраховували як сумарну еквівалентну концентрацію ненасичених жирних кислот (НЖК) відносно подвійних зв'язків [6].

Інтенсивність ПОЛ у тканинах пташенят оцінювали за вмістом продуктів пероксидації, які реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою – ТБК-активних продуктів [11]. Визначення цих продуктів проводили в гомогенатах тканин ($ТБКАП_{вих}$) та за ініціації Fe^{2+} ПОЛ ($ТБКАП_{інк}$).

Активність антиоксидантних ензимів і вміст вітамінів визначали за відомими методами: супероксиддисмутазну (СОД-активність – 1.15.1.1.) [12], каталазну (КАТ-активність – 1.11.1.6) [13], глутатіонпероксидазну (ГПО-активність – 1.11.1.9) [14], вміст вітамінів А, Е і β-каротину – спектрофотометричними методами [15].

Для інтегральної оцінки стану системи АОЗ застосовано коефіцієнт антиоксидантної активності ($K_{АОА}$), який розраховували як відношення вихідного ПОЛ (без ініціації Fe^{2+}) до індукованого Fe^{2+} ПОЛ, оскільки в гомогенатах тканин міститься не тільки субстрат пероксидації, а й компоненти АОЗ, здатні гальмувати пероксидацію ліпідів [7].

Рівень узгодженості для К-сукупності біохімічних показників (К – кількість показників), яка характеризує стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у тканинах птиці, розраховували за формулою:

$$W_K = \frac{N_\Sigma}{N_K} \cdot 100\%,$$

де W_K – рівень узгодженості біохімічних показників для К-сукупності, %; N_Σ – загальна кількість щільних парних кореляційних зв'язків у досліді (прийнято вважати щільними зв'язки, для яких коефіцієнт кореляції $r > 0{,}50$); N_K – максимально можлива для К-сукупності показників кількість парних кореляційних зв'язків, яка відповідно до положень комбінаторики визначається за формулою сполучень:

$$N_K = C_K^2 = \frac{K!}{2!\cdot(K-2)!}.$$

Математична обробка експериментальних даних здійснювалася відомими методами математичної статистики, у томі числі кореляційного, регресійного та дисперсійного аналізів. При цьому використовували пакет комп'ютерної програми SPSS–10,0 і програми MS Excel 2000.

Результати та обговорення

Для факторного аналізу використано наведені в табл. 1 дані з експериментальних досліджень із з'ясування онтогенетичних особливостей перебігу процесів ПОЛ та функціонування системи АОЗ у тканинах печінки гусей в ембріональному і ранньому постнатальному періодах [7, 8].

Результати проведеного факторного аналізу комплексу з 11 показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в тканинах печінки гусей свідчать, що в ембріональному і ранньому постнатальному періодах онтогенезу вплив цих показників на антиоксидантний статус цих тканин знижується в ряду: «СОД – КАТ – ненасиченість ЖК – протеїн – вітамін А – ГПО – ТБКАП – вітамін Е – ліпіди – вміст НЖК – β-каротин» (табл. 2).

За результатами оцінки частки внеску (d, %) кожного фактора в інтегральний показник стану прооксидантно-антиоксидантної рівноваги ($K_{АОА}$) в цих тканинах, саме перші п'ять із них на 74,5% визначають рівень $K_{АОА}$, при цьому вирішальний вплив на антиоксидантний статус мають активність антиоксидантних ензимів СОД і КАТ, що узгоджується з найвищим рівнем СОД- і, особливо, КАТ-активності саме в печінці [5].

Наступну позицію за впливом на $K_{АОА}$ займають ненасиченість ЖК і вміст протеїну, дія яких якісно протилежна, але кількісно адекватна. Саме ненасиченість ЖК, а не сумарний вміст НЖК контролює антиоксидантну активність печінки. Ненасиченість ЖК віддзеркалює здатність тканин до ліпопероксидації і є індексом окислення ліпідів тканин. І хоча в роботі [16] доведено, що у природних ліпідно-протеїнових надмолекулярних комплексах окислення поліненасичених ЖК із різним ступенем ненасиченості може носити більш складний і менш передбачуваний характер, ніж у гомогенних системах, проведене нами порівняння змін ненасиченості ЖК і $K_{АОА}$ ліпідів печінки гусенят свідчить про наявність між цими показниками тісного негативного кореляційного зв'язку (рисунок).

Що стосується сумарного вмісту НЖК, який поєднує різні за рівнем ненасиченості й, відповідно, здатністю до ліпопероксидації ЖК, то цей показник, як і очікувалось, посів одну

Таблиця 1. Зміни показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги тканин печінки гусей (M ± m, n = 6)

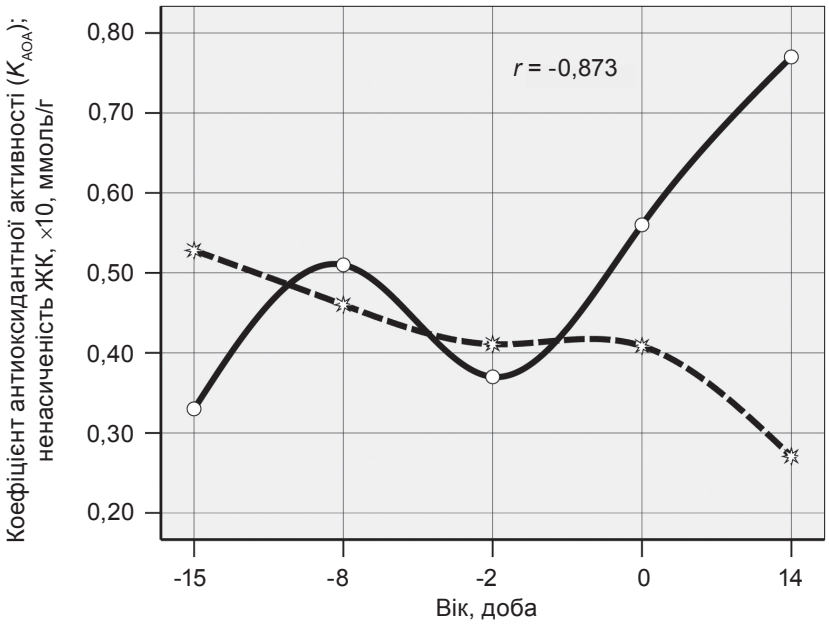
Показники	Вік гусенят, доба				
	Ембріогенез			Постнатальний онтогенез	
	15 (-15)	22 (- 8)	28 (- 2)	1 (0)	14
Ліпіди, мг/г	14,0 ± 0,6	77,3 ± 3,4	242,4 ± 11,3	172,9 ± 8,5	29,1 ± 1,3
ТБКАП$_{вих.}$, нмоль/г	98,3 ± 5,1	133,9 ± 6,3	166,3 ± 6,3	147,0 ± 2,5	19,5 ± 1,2
$K_{АОА}$	0,33	0,51	0,37	0,56	0,77
Сумарний вміст НЖК, %	58,44 ± 1,56	76,62 ± 1,87	74,15 ± 2,05	76,27 ± 1,80	55,36 ± 1,38
Ненасиченість ЖК ліпідів, ммоль/г	5,28	4,60	4,11	4,08	2,71
Протеїн, мг/г	163,5 ± 7,4	175,2 ± 8,2	193,6 ± 9,9	202,72 ± 11,7	240,37 ± 13,2
Ензими					
СОД, ум. од./ (хв·г)	8,42 ± 0,37	9,25 ± 0,48	8,93 ± 0,34	11,42 ± 0,93	22,51 ± 1,34
КАТ, $\times 10^{-5}$, нкат/г	9,70 ± 0,49	14,50 ± 0,75	18,71 ± 1,14	21,80 ± 1,14	45,73 ± 1,86
ГПО, $\times 10^{4}$, мкмоль/(хв·г)	2,62 ± 0,13	6,85 ± 0,28	8,18 ± 0,45	9,60 ± 0,13	9,44 ± 0,41
Вітаміни					
Е, мкг/г	31,07 ± 1,29	77,32 ± 4,29	128,32 ± 6,27	69,01 ± 2,11	38,05 ± 1,14
А, мкг/г	5,47 ± 0,25	12,35 ± 0,59	19,95 ± 0,74	20,31 ± 0,57	30,34 ± 0,49
β-каротин, мкг/г	5,14 ± 0,30	16,14 ± 1,03	22,07 ± 1,23	20,73 ± 1,07	15,36 ± 0,70

Примітка. Вміст ліпідів, ТБКАП$_{вих.}$, протеїну, вітамінів та активність ензимів розраховано на 1 г тканин печінки.

Таблиця 2. Результати факторного аналізу впливу на $K_{АОА}$ комплексу показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги тканин печінки гусей

Фактори	Характеристики			Ранг впливу факторів
	r	*D*	d, %	
Ліпіди	-0,280	0,078	1,53	9
ТБКАП$_{вих.}$	-0,678	0,460	8,99	7
Сумарний вміст НЖК	-0,277	0,077	1,50	10
Ненасиченість ЖК ліпідів	-0,873	0,762	14,88	3
Протеїн	0,873	0,762	14,88	4
СОД	0,912	0,832	16,25	1
КАТ	0,905	0,819	16,00	2
ГПО	0,696	0,484	9,45	6
Вітамін Е	-0,352	0,124	2,42	8
Вітамін А	0,811	0,658	12,85	5
β-каротин	0,252	0,064	1,25	11
Спільність впливу факторів	–	5,120	100	–

Примітка: *r* – коефіцієнт кореляції, *D* – коефіцієнт детермінації, d – частка впливу факторів.



Динаміка $K_{АОА}$ (——) і ненасиченості жирних кислот ліпідів (– –) печінки гусей

з останніх позицій за впливом на $K_{АОА}$ тканин печінки. Аналіз динаміки змін ЖКС упродовж дослідженого періоду, в якому відбувається перехід від гіпоксії кінця ембріонального періоду до гіпероксії початку атмосферного дихання [17], свідчить, що зміни ЖКС цих тканин у другій половині ембріонального періоду спрямовані на зниження рівня ненасиченості ЖК: у добових гусенят рівень ненасиченості ЖК ліпідів печінки на 22,7% нижчий за відповідний вихідний показник. Таким чином, реалізується один із біохімічних механізмів генетично запрограмованої адаптації пташенят до умов постнатального розвитку. Адже на тлі переходу від гіпоксії кінця ембріонального періоду до гіпероксії початку атмосферного дихання зниження рівня ненасиченості субстрату пероксидації забезпечує підтримку прооксидантно-антиоксидантної рівноваги.

Привертає увагу значний вплив на $K_{АОА}$ вмісту вітаміну А (табл. 2), що, всупереч традиційному уявленню про низьку антиоксидантну дію вітаміну А, зумовлену його швидким окисленням, підтверджує потужний опосередкований антиоксидантний вплив ретинолу в гусей. Один із можливих механізмів такого впливу – інгібування індуцибельної NO-синтази [18]. Водночас вперше Г. В. Петровою і Г. В. Донченком [19] встановлено, що статус вітаміну Е як головного тканинного антиоксиданту в печінці не підтверджується: за впливом на антиоксидантну активність цих тканин α-токоферол посідає одне з останніх місць і, таким чином, посилює сумніви про необмежену здатність вітаміну Е запобігати оксидативному стресу.

Ще одним шляхом посилення потужності системи АОЗ є підвищення рівня узгодженості її компонентів. На думку деяких дослідників [20], причиною окислювального стресу є не продукція АФО, а порушення балансу між їх генерацією і знешкодженням. І повноцінне функціонування системи АОЗ забезпечується узгодженістю дії всіх її компонентів.

Розвиток пташиного ембріона можна розглядати як функціонування закритої системи, проте в межах цієї закритої системи з четвертого тижня ембріогенезу встановлено зниження парціального тиску кисню [17]. Кореляційний аналіз комплексу досліджених показників печінки свідчить про те, що ступінь їхньої узгодженості в період ембріогенезу дуже високий (77,8%). Наступна гіпероксія напочатку атмосферного дихання супроводжується подальшим підвищенням рівня узгодженості досліджених показників до 97,2%. Отже, посилення узгодженості показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, є ще одним додатковим механізмом формування адаптивної відповіді на зміну факторів зовнішнього середовища.

Таким чином, підтримка прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в тканинах печінки гусей в умовах гіпо- і гіпероксії під час переходу від ембріонального до постнатального розвитку відбувається шляхом запуску низ-

ки адаптаційних механізмів, які, по-перше, активізують синтез антиоксидантів протеїнової природи, по-друге, збільшують ефективність функціонування системи АОЗ шляхом зниження ненасиченості ЖК ліпідів печінки, а, можливо, й просторової модифікації ліпідного бішару клітинних мембран і, по-третє, посилюють антиоксидантний потенціал тканин печінки за рахунок підвищення узгодженості показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги.

МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖКИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ ГУСЕЙ В УСЛОВИЯХ ГИПО- И ГИПЕРОКСИИ

Е. А. Данченко[1], Ю. П. Пащенко[1], Н. Н. Данченко[2], Л. Н. Здоровцева[1]

[1]Мелитопольский государственный педагогический университет имени Богдана Хмельницкого, Украина;
[2]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: danchenko.ea@mail.ru

Проанализированы механизмы поддержки прооксидантно-антиоксидантного равновесия в тканях печени гусей в условиях гипо- и гипероксии при переходе от эмбрионального к постнатальному развитию. Доказано, что формирование адаптивного ответа в этих условиях происходит путем запуска механизмов, которые, во-первых, активизируют синтез антиоксидантов протеиновой природы, во-вторых, снижают ненасыщенность жирных кислот липидов печени, что существенно повышает их устойчивость к активным формам оксигена и, в-третьих, увеличивают эффективность функционирования системы антиоксидантной защиты за счет повышения уровня согласованности действия ее компонентов.

Ключевые слова: липопероксидация, прооксидантно-антиоксидантное равновесие, активные формы оксигена, гипо- и гипероксия, ненасыщенность жирных кислот, уровень согласованности.

MECHANISMS OF SUPPORT PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN THE LIVER TISSUES OF GEESE IN HYPO- AND HYPEROXIA

O. O. Danchenko[1], J. P. Paschenko[1], N. M. Danchenko[2], L. M. Zdorovtseva[1]

[1] Bogdan Khmelnitsky Melitopol State Pedagogical University, Ukraine;
[2]Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: danchenko.ea@mail.ru

Summary

The mechanisms of support of the prooxidant-antioxidant balance in the liver tissues of geese in hypo- and hyperoxia during the transition from embryonic to postnatal development. It is proved that the formation of adaptive response to these conditions by running the neuro-humoral mechanisms that are, first, to stimulate the synthesis of antioxidants of protein nature, and secondly, to reduce the unsaturation of fatty acids in the lipids of the liver, which greatly increases their resistance to the active forms of oxygenation and thirdly, to increase the efficiency of the antioxidant defense system by improving the consistency of its components performance.

Key words: lipids peroxidation, prooxidant-antioxidant balance, reactive oxygenation, hypo- and hyperoxia, unsaturated fatty acids, the level of consistency.

1. *Скулачёв В. П.* // Биохимия. – 1999. – **64**, вып. 12. – С. 1679–1688.
2. *Мхітарян Л. С.* Окислювальний стрес: механізми розвитку і роль в патології / Л. С. Мхітарян, О. Б. Кучменко. – К. : НПУ ім. М.П. Драгоманова, 2004. – 223 с.
3. *Цехмістренко С. І., Пономаренко Н. В., Чубар О. М.* // // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 2. – С.71–76.
4. *Muller F. L., Song W., Liu Y., Chaudhuri A.* // Free Radic. Biol. Med. – 2006. – **40**(11). – P. 1993–2004.
5. *Данченко О. О., Калитка В. В.* // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 4. – С. 120–124.
6. *Данченко О. О., Калитка В. В., Колесник Д. М.* // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 3. – С. 124–129.

7. *Данченко О. О.* Антиоксидантний статус свійських гусеподібних за різного антропогенного навантаження. Автореф. дис. ... докт. с.-г. наук. – К., 2010. – 44 с.
8. *Данченко О. О.* // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького. – 2009. – **11**, № 3(42), ч. 3. – С. 26–34.
9. *Bligh E. G., Dyer W. J.* // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – **37**. – P. 911–917.
10. *Palmer F. B. St. C.* // Biochim. Biophys. Acta. – 1971. – **231**, N 1. – P. 134–144.
11. *Владимиров Ю. А.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 272 с.
12. *Макаревич О. П., Голиков П. П.* // Лаб. дело. – 1983. – № 6. – С. 24–28.
13. *Королюк М. А., Иванова М. И., Майорова И. Т., Токарев В. Е.* // Там же. – 1988. – № 1. – С. 18.
14. *Гаврилова А. Р., Хмара Н. В.* // Там же. – 1986. – № 12. – С. 721–724.
15. *Антонов Б. И.* Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микробиологические / Б. И. Антонов, Т. Ф. Яковлева, В. И. Дерябина. – М. : Агропромиздат, 1991. – 278 с.
16. *Наглер Л. Г., Ланкин В. З., Козаченко А. И., Гуревич С. М.* // Биохимия. – 2003. – **68**, вып. 2. – С. 243–249.
17. *Rahn H., Paganelli C. V., Ar A.* // J. Exp. Zool. Suppl.– 1987. – N 1. – P. 165–172.
18. *Lee H., Mark Headley B., Masanori I.* // J. Immunol. – 2008. – **181**. – P. 5189–5193.
19. *Петрова Г. В., Донченко Г. В.* // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 3. – С. 94–101.
20. *Андреев А. Ю., Кушнарев Ю. А., Старков А. А.* // Биохимия. – 2005. – **70**, вып. 2. – С. 246–264.

Получено 21.06.2012