

АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ЩУРІВ ЗА ДІЇ L-ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ

Н. О. САЛИГА

Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна;
e-mail: ynosyt@yahoo.com

Дані щодо впливу глютамінової кислоти (L-Glu), яка є однією з трьох амінокислот-попередників глютаміону на організм тварин є доволі суперечливими, тому дослідження у цьому напрямі залишаються актуальними. Метою наших досліджень було з'ясувати як впливає додаткове введення L-Glu на активність глютамінової ланки антиоксидантного захисту та на вміст продуктів перексидного окислення ліпідів у різних органах і тканинах щурів. Досліджено вплив додаткового введення до раціону L-Glu (285 і 715 мг/кг) на активність антиоксидантних ензимів та інтенсивність перексидних процесів у різних тканинах щурів. Показано, що в печінці, селезінці та нирках щурів, які отримували 715 мг/кг L-Glu зростає вміст GSH та активність глютаміонпероксидази. У тканинах тварин, які отримували L-Glu виявлено зниження вмісту гідропероксидів ліпідів та ТБК-активних продуктів. Показано, що збагачення раціону щурів L-Glu протягом 30 днів приводило до змін активності глютамінової ланки антиоксидантного захисту та інтенсивності перексидного окислення ліпідів. Істотніші зміни цих показників спостерігали в тварин, які отримували 715 мг/кг L-Glu до раціону.

Ключові слова: L-глютамінова кислота, глютаміонпероксидаза, відновлений глютаміон, глютаміонредуктаза, гідропероксиди, ТБК-активні продукти.

Відновлений глютаміон (GSH) є одним із найважливіших фізіологічних антиоксидантів. Основними факторами, що визначають синтез GSH є наявність L-Glu, цистеїну і гліцину та активність ензимів глютаміонцистеїнлігази та глютаміонсинтетази [1, 2]. Нормальний перебіг низки фізіологічних та біохімічних процесів відбувається завдяки наявності у GSH глютамінового залишку і реактивної SH-групи. Але найважливішою функцією цього трипептиду є його участь у процесах детоксикації ксенобіотиків [3], які можуть потрапляти в організм з їжею, напоями, крізь шкіру або через органи дихання [4].

Метаболізм ксенобіотиків в організмі, в основному, відбувається в печінці. GSH має вільну SH-групу, яка як сильний нуклеофіл зв'язує електрофіли, а гідрофобні центри GSH нековалентно з'єднуються з ліпофільними сполуками, що запобігає їх зануренню в ліпідний шар мембран [5]. Взаємодія GSH із ксенобіотиками може здійснюватись трьома різними способами: 1) шляхом кон'югації субстрату з GSH; 2) внаслідок нуклеофільного заміщення; 3) завдяки відновленню органічних пероксидів до спиртів [6]. Тривала дія ксенобіотиків на організм призводить до надмірної генерації вільних радикалів і до виснаження субстратів кон'югації, насамперед GSH [7, 8].

GSH виявляє не тільки антиоксидантні та детоксикаційні властивості. Амінокислоти, що входять в цей трипептид, беруть участь у найважливіших метаболічних процесах організму [9, 10]. Зокрема, глютамінова кислота, що задіяна у протеїновому і вуглеводному обміні, підвищує стійкість організму до гіпоксії, стимулює окислювальні процеси, перешкоджає зниженню окисно-відновного потенціалу, покращує обмін речовин, впливає на процеси гліколізу в тканинах, проявляє гепатопротекторну дію та ін. [11–13]. Метаболічні процеси, що відбуваються в організмі тварин внаслідок стресів і захворювань призводять до використання великої кількості L-Glu [14]. L-Glu виконує роль пластичного (проліферація та ріст) та енергетичного матеріалу для організму [15].

Не менш актуальним є вивчення впливу L-Glu на організм тварин у контексті використання глютаміну натрію. Глютаміат натрію (E621 за номенклатурою харчових добавок) – найрозповсюдженіша харчова добавка, що широко використовується в промисловому виробництві продуктів харчування. Щорічно у світі виробляється і споживається близько 3 млн. тонн цієї речовини. Глютаміат натрію містять практично усі приправи промислового виробництва. На сьогодні залишається дискусійним питання про участь глютама-

ту натрію в розвитку деяких захворювань та симптомах, що їх супроводжують. Думки вчених розділилися: деякі вважають, що ця харчова добавка зумовлює порушення обміну речовин, алергічні реакції, ожиріння, а дехто, що вживання глутамату натрію (навіть у великих дозах) не шкодить організму людини.

Враховуючи це, метою наших досліджень було з'ясувати як впливає додаткове введення L-Glu на активність глутатіонової ланки антиоксидантного захисту та вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у різних органах і тканинах щурів.

Матеріали та методи

Досліди проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 200–220 г, яких було розділено на 3 групи по 10 тварин у кожній (дві дослідні та одна контрольна). Тривалість дослідного періоду – 1 місяць. Тваринам дослідних груп вводили водний розчин L-глутамінової кислоти в дозі 285 мг/кг (Д1) та 715 мг/кг (Д2) один раз на добу, перорально. Ці дози визначали з розрахунку до кількості протеїну, який тварина отримувала з кормом. Таким чином, тварини першої дослідної групи отримували додатково 10% глутамінової кислоти від вмісту протеїну в кормі (285 мг/кг), тварини другої дослідної групи отримували додатково 25% глутамінової кислоти від вмісту протеїну в кормі (715 мг/кг). Щурам контрольної групи упродовж 30 днів перорально вводили відповідну кількість дистильованої води. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Після закінчення дослідів тварин всіх груп за анестезії ефіром декапітували. Для аналізу відбирали зразки тканин печінки, нирок, легень, селезінки та скелетних м'язів. 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).

Активність глутатіонпероксидази (ГПО, 1.11.1.9) визначали за швидкістю окислення GSH до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу. Глутатіон визначали по утворенню забарвленого продукту – тіонітрофенільного аніона [16]. Кількість його прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною

кислотою. Гомогенат тканин (0,2 мл) інкубували на водяній бані при 37 °С протягом 10 хв із додаванням 0,83 мл трис-НСІ буфера рН 8,5, який містив 6 мМ розчин ЕДТА і 12 мМ розчин азиду натрію. На цьому буфері готували 4,8 мМ розчин GSH. Потім додавали 0,05 мл 20 мМ розчину гідропероксиду бутилу і знову інкубували протягом 5 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 0,4 мл 10%-го розчину ТХО, після чого центрифугували при 7150 g протягом 10 хв. Далі до 0,1 мл супернатанту додавали 5 мл 0,1 М трис-НСІ буфера (рН 8,5), 0,1 мл реактиву Еллмана. Через 5 хв вимірювали абсорбцію при λ 412 нм. Активність ензиму виражали в нмоль GSH/хв-мг протеїну.

Активність глутатіонредуктази (ГР, 1.6.4.2) визначали в реакційному середовищі, яке містило 2,5 мл 0,15 М фосфатного буфера, рН 7,4; 0,2 мл окисленого глутатіону (7,5 мМ), 0,1 мл гомогенату тканин, 0,1 мл NADPH (1,2 мМ). Активність ензиму визначали за зниженням вмісту NADPH при 37 °С протягом 1 хв на спектрофотометрі при λ 340 нм. Активність ГР виражали в мкмоль окисленого NADP/хв-мг протеїну [17].

Вміст GSH визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніона завдяки взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [18]. З метою визначення вмісту GSH готували контрольну та дослідні проби. У контрольні проби додавали 3 мл осаджуючого реактиву (льодяна метафосфорна кислота 6,68 г, трилон Б 0,8 г та 120 г хлориду натрію, розчиненого в 400 мл дистильованої води) та 2 мл дистильованої води. У дослідні проби додавали 2 мл гомогенату тканин і 3 мл осаджуючого реактиву. Витримували 5 хв за кімнатної температури і центрифугували при 1360 g, потім надосадову рідину відфільтровували. Після чого знову формували дослідні та контрольні проби, в які вносили 2 мл центрифугату, 8 мл 0,3 М Na₂HPO₄ і 0,1 мл реактиву Еллмана. Через 5 хв вимірювали на спектрофотометрі (λ 420 нм). Вміст GSH виражали у ммоль GSH/г тканини.

Вміст гідропероксидів ліпідів у гомогенаті тканини визначали методом [19]. Вимірювання величини абсорбції проводили після додавання тіоціанату амонію при λ 480 нм. Контрольну пробу ставили як дослідну, але замість гомогенату тканини додавали відповідну кількість бідистильованої води. Вміст гідропероксидів ліпідів у біологічному матеріалі виражали в величинах абсорбції при 480 нм на 1 г тканини.

Концентрацію ТБК-активних продуктів у гомогенатах тканин визначали за методом

[20]. Концентрацію ТБК-активних продуктів у зразку виражали в нмоль МДА на 1 г тканини.

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

Результати та обговорення

Ключова роль у захисті клітини від оксидативного стресу належить системі глутатіону [21–24]. Результати проведених досліджень показали (рис. 1), що вміст GSH у тканинах печінки та нирок щурів другої групи вірогідно зростає у порівнянні з тваринами першої та контрольної груп. У тканинах селезінки тварин другої групи вміст GSH має тенденцію до зростання. В інших органах і тканинах щурів вміст GSH знаходиться на одному рівні з тваринами контрольної групи. Оскільки, за фізіологічних умов високий внутрішньоклітинний вміст GSH забезпечується регенерацією окисленого глутатіону під дією глутатіонредуктази, можна припустити, що зростання вмісту цього трипептиду відбувається завдяки його синтезу *de novo* за участю γ -глутаміл-цистеїнсинтетази і, очевидно, субстратом для цього є L-Glu. Зростання рівня GSH у печінці є цілком закономірним. Оскільки це головний орган, де синтезується GSH (близько 90%). Зростання цього трипептиду в тканині нирок, вочевидь, може бути пов'язане з розщепленням його надлишку за відсутності потреби

організму. Адже відомо, що нирки мають високу γ -глутамілтранспептидазну активність.

Відомо, що глутатіонпероксидаза – ензим, що відновлює H_2O_2 до води, а органічні гідропероксидази – до гідросполук [25]. Результати наших досліджень (рис. 2) свідчать про підвищену активність ГПО у тканинах нирок, селезінки та печінки (друга група), а також м'язів (перша група) щурів порівняно з її активністю у тканинах тварин контрольної групи. Це узгоджується з думкою про те, що тривала активація ГПО можлива лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного GSH, який є не лише субстратом реакцій, але й виконує роль фактора, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, що окислюються у процесі глутатіонпероксидазної реакції [26].

Як видно з рис. 3, глутатіонредуктазна активність практично на одному рівні з контролем у всіх досліджуваних тканинах. Вірогідне зниження активності ГР у тканині селезінки тварин другої групи порівняно з контрольною можна пояснити тим, що каталітична активність ГР залежить від стану її SH-груп і за фізіологічних концентрацій GSH сприяє зниженню активності цього ензиму. Це також можна пов'язати з активацією антиоксидантних ензимів, зокрема ГПО, функціонування якої тісно пов'язане з активністю ГР та уповільненням інтенсивності пероксидних

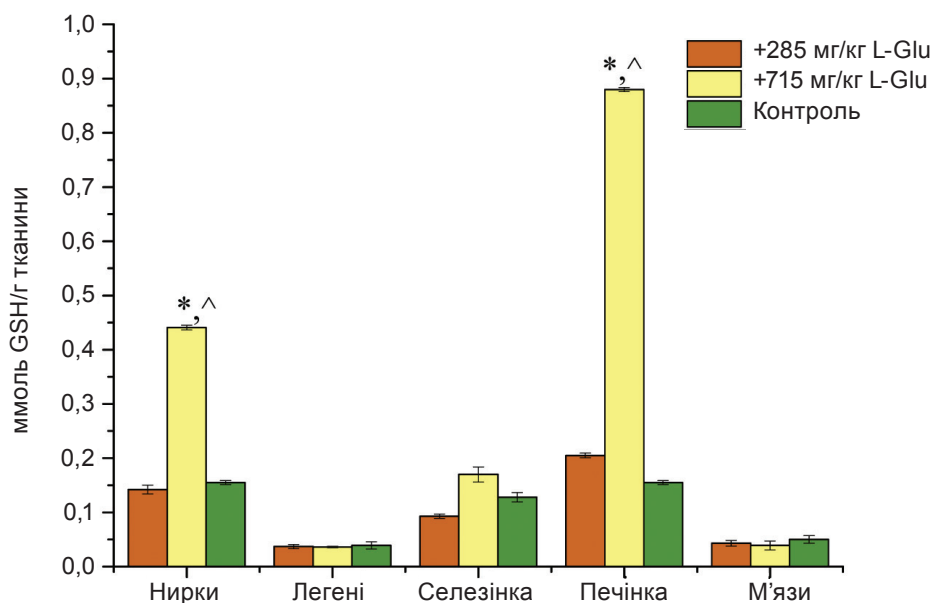


Рис. 1. Вміст відновленого глутатіону в тканинах щурів за дії глутамінової кислоти (L-Glu). Тут і на рис. 2–5 * різниця вірогідна відносно тварин контрольної групи ($P < 0,05$); ^ різниця вірогідна відносно тварин першої дослідної групи ($P < 0,05$)

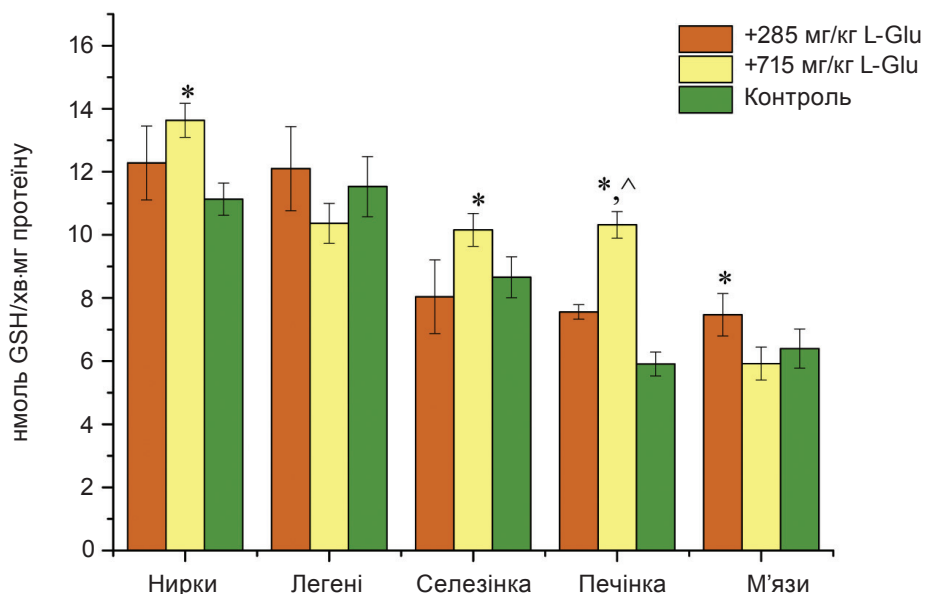


Рис. 2. Активність глутатіонпероксидази в тканинах щурів за дії глютамінової кислоти (L-Glu)

процесів. Функціонування ГР та ензимів, що лімітують швидкість пентозофосфатного шляху — глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та 6-фосфоглюконатдегідрогенази в багатьох тканинах тісно взаємопов'язані. Слід відмітити вірогідне зростання цього показника у тканині нирок тварин першої групи.

Тривале (30 діб) надходження до організму щурів L-Glu призводить до пригнічення окисних процесів у клітинах тканин, що виявляється у зниженні продуктів ПОЛ (ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів). Це можна пояснити властивостями L-Glu, що

має антиоксидантну та мембраностабілізуючу дію завдяки пригніченню пероксидного окислення ліпідів, а також стабілізує мембрани гепатоцитів за рахунок зниження активності цитолітичних ензимів [27, 28]. У свою чергу, підвищується активність ензимів антиоксидантної системи, які беруть участь у знешкодженні реакційноздатних продуктів окислення. Також встановлено (рис. 4), що у тканинах печінки та м'язів обох дослідних груп знижується вміст гідропероксидів ліпідів. Вірогідне зниження цього показника також спостерігається у тканинах селезінки тва-

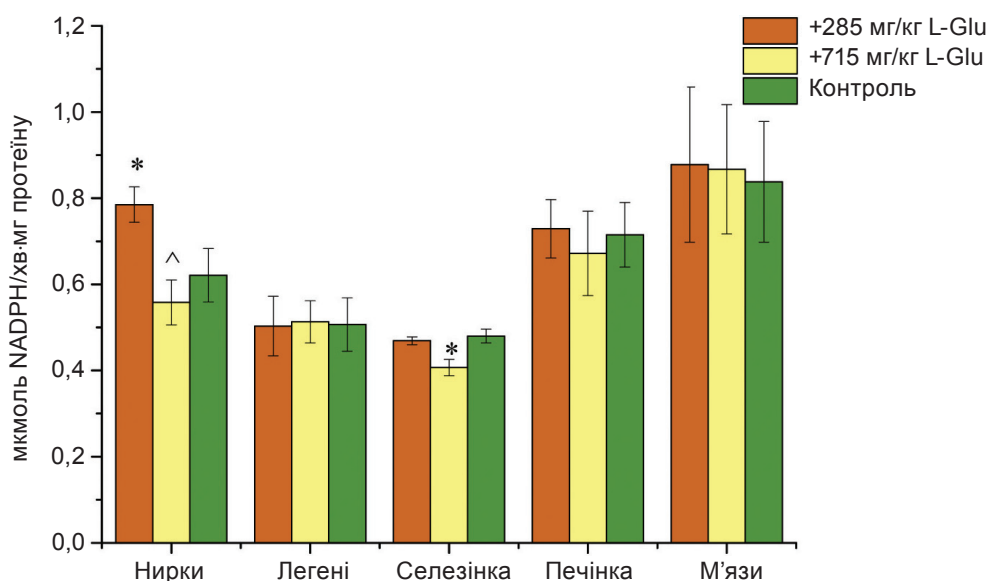


Рис. 3. Активність глутатіонредуктази в тканинах щурів за дії глютамінової кислоти (L-Glu)

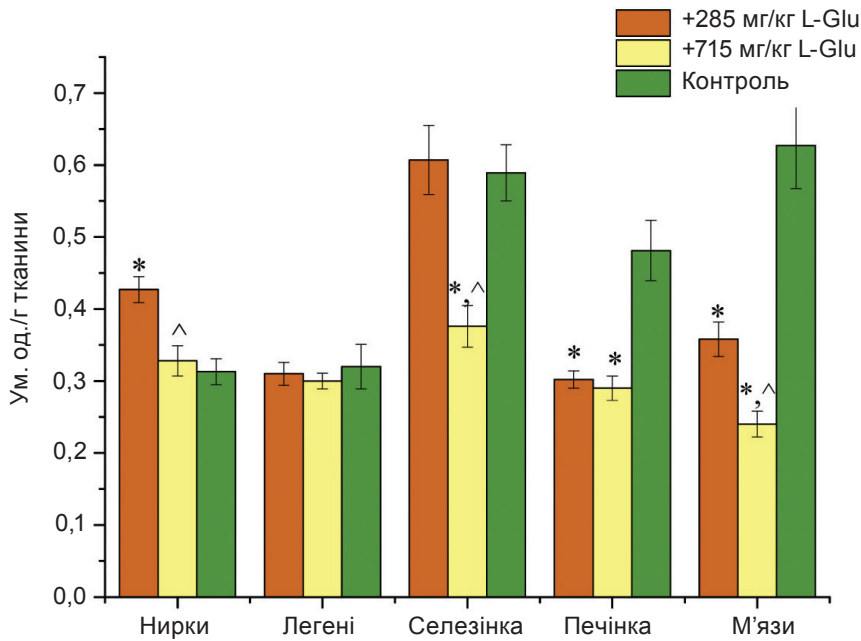


Рис. 4. Вміст гідропероксидів ліпідів у тканинах щурів за дії глутамінової кислоти (L-Glu)

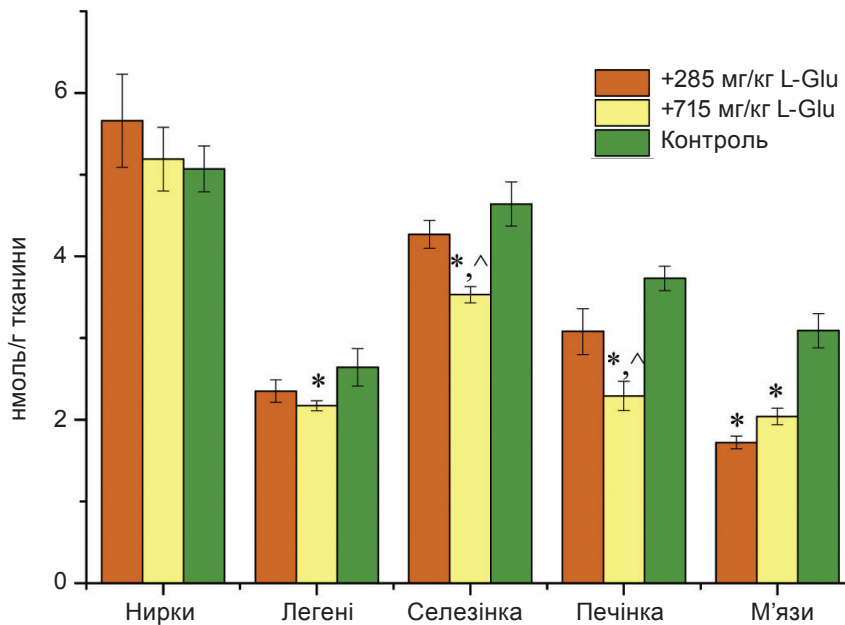


Рис. 5. Вміст ТБК-активних продуктів у тканинах щурів за дії глутамінової кислоти (L-Glu)

рин другої групи у порівнянні з контрольною групою. Причини зростання вмісту гідропероксидів ліпідів у тканині нирок тварин першої групи невідомі.

З наведених на рис. 5 даних видно, що вміст ТБК-активних продуктів у легенях, печінці, селезінці тварин другої дослідної групи та у м'язах тварин двох дослідних груп

є вірогідно нижчим порівняно із тваринами контрольної групи. Слід відмітити, що різниця вмісту ТБК-активних продуктів у тканинах дослідних тварин і контрольної групи схожа з різницею вмісту в них гідропероксидів. Аналізуючи ці дані, можна припустити, що додаткове споживання L-Glu щурами пригнічує синтез ТБК-активних продуктів. Особливо

це виявляється у більшості органів і тканин щурів другої групи, які отримували додатково до корму 25% L-Glu.

Пригнічення процесів пероксидного окислення ліпідів за дії L-Glu можна пояснити підвищенням активності антиоксидантних ензимів, зокрема глутатіонзалежних. Антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням гідрпероксидів і ТБК-активних продуктів [29]. Важлива роль у цих процесах відводиться GSH, який здатний інактивувати вільні радикали і контролювати інтенсивність окислювально-відновних процесів.

Таким чином, з'ясовано, що додаткове збагачення раціону щурів L-Glu (на 285 і 715 мг/кг відповідно) протягом 30 діб призводить до змін активності глутатіонової ланки антиоксидантного захисту та інтенсивності пероксидного окислення ліпідів у більшості тварин. Встановлено зростання ГПО, GSH і зниження ТБК-активних продуктів та гідрпероксидів ліпідів. Логічним буде припустити, що L-Glu слугує субстратом для синтезу GSH *de novo*. Найвираженіше це спостерігається у тканинах печінки, де в основному і відбувається синтез цього трипептиду. Антиоксидантні властивості L-Glu сприяють пригніченню процесів пероксидного окислення ліпідів. У свою чергу, підвищується активність ензимів системи антиоксидантного захисту, які беруть участь у знешкодженні реакційноздатних продуктів окислення. Істотніші зміни цих показників були у тварин другої групи, які отримували додатково 715 мг/кг L-Glu до раціону.

Під час дослідження фізіологічної ролі системи глутатіону очевидну значимість набуває проблема, пов'язана з вивченням участі різних джерел глутатіону та його розподілу в підтримці глутатіонового гомеостазу. Важливими є дослідження механізмів регуляції рівня відновленого глутатіону в клітинах, тканинах і органах, особливо в умовах, які сприяють його виснаженню, оскільки глутатіон — речовина, яка бере участь в ензиматичних і неензиматичних реакціях дезінтоксикації від молекулярного до тканинного і системного рівнів. Результати нашої роботи роблять свій внесок у вирішення вищезгаданих питань.

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Н. О. Салыга

Институт биологии животных
НААН, Львов, Украина;
e-mail: ynosyt@yahoo.com

Данные о влиянии глутаминовой кислоты (L-Glu), которая является одной из трех аминокислот-предшественников глутатиона, на организм животных довольно противоречивы, поэтому исследования в этом направлении остаются актуальными. Целью наших исследований было выяснить как влияет дополнительное введение L-Glu на активность глутатионового звена антиоксидантной защиты и на содержание продуктов пероксидного окисления липидов в различных органах и тканях крыс. Исследовано влияние дополнительного введения в рацион L-Glu (285 и 715 мг/кг) на активность антиоксидантных энзимов и интенсивность пероксидных процессов в различных тканях крыс. Показано, что в печени, селезенке и почках крыс, получавших дополнительно 715 мг/кг L-Glu возрастает содержание GSH и активность глутатионпероксидазы. Установлено снижение содержания гидропероксидов липидов и ТБК-активных продуктов в тканях животных, которые дополнительно получали L-Glu. Показано, что обогащение рациона крыс L-Glu в течении 30 дней приводит к изменениям активности глутатионового звена антиоксидантной защиты и интенсивности пероксидного окисления липидов. Более существенные изменения данных показателей наблюдали у животных, получавших дополнительно 715 мг/кг L-Glu к рациону.

Ключевые слова: L-глутаминовая кислота, восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, гидропероксиды, ТБК-активные продукты.

ACTIVITY OF THE GLUTATHIONE SYSTEM OF ANTIOXIDANT DEFENSE IN RATS UNDER THE ACTION OF L-GLUTAMIC ACID

N. O. Salyha

Institute of Animal Biology, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine;
e-mail: ynosyt@yahoo.com

The data on the effects of glutamic acid (L-Glu), which is one of three amino acid - precursors of glutathione on animals organism is quite controversial because research in this area remain relevant. The aim of our research was to find out what impact the additional introduction of L-Glu on the activity glutathione system of antioxidant defence and the content of lipid peroxidation products in various organs and tissues of rats. The effect of additional (285 and 715 mg/kg, respectively) introduction to the diet of L-Glu on the activity of antioxidant enzymes and intensity of peroxidation processes in various tissues of rats was studied. It is shown that in the liver, spleen and kidneys of rats which received additional 715 mg/kg of L-Glu content of reduced glutathione and glutathione peroxidase activity increased. A decrease of the content of lipid hydroperoxides and TBA-active products in tissues of animals which received additional 285 and 715 mg/kg of L-Glu into the diet was found. We have also found that the enrichment of rat's diet by L-Glu during 30 days resulted in a change of glutathione part of antioxidant system and intensity of lipid peroxidation. More intensive changes in these indices were observed in animals which received additional 715 mg/kg of L-Glu into the diet.

Key words: L-glutamic acid, glutathione peroxidase, glutathione reduced, glutathione reductase, hydroperoxides, TBA-active products.

1. *Shelly C. Lu* // Mol. Aspects Med. – 2009. – 30, N 1–2. – P. 42–59.
2. *Мазо В. К.* // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 1998. – № 1. – С. 47–52.
3. *Forman H. J., Zhang H., Rinna A.* // Mol. Aspects Med. – 2009. – 30, N 1–2. – P. 1–12.
4. *Salyha Y.* // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2010. – 54. – P. 3–14.
5. *Townsend D. M., Tew K. D., Tapiero H.* // Biomed. Pharmacother. – 2003. – 57, N 3–4. – P. 145–155.
6. *Lo W. J., Chiou Y. C., Hsu Y. T. et al.* // Bioconjug. Chem. – 2007. – 18, N 1. – P. 109–120.
7. *Салига Ю., Росаловський В., Федяков Р.* // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2012. – 60. – С. 99–104.
8. *Yuan L., Kaplowitz N.* // Mol. Aspects Med. – 2009. – 30, N 1–2. – P. 29–41.
9. *Smith R. J.* // J Parenter Enteral Nutr. – 1990. – 14. – P. 40–44.
10. *Newsholme P., Procopio J., Lima M. M. et al.* // Cell Biochem. Funct. – 2003. – 21. – P. 1–9.
11. *Newsholme P.* // J. Nutr. – 2001 – 131. – P. 2515–2522.
12. *Roth E.* // J. Nutr. – 2008. – 138. – P. 2025–2031.
13. *Hansen A. M., Caspi R. R.* // Nat. Med. – 2010. – 16, N 8. – P. 856–858.
14. *Platt S. R.* // Vet. J. – 2007. – 173, N 2. – P. 278–286.
15. *Ivanov A., Pellegrino C., Rama S. et al.* // J. Physiol. – 2006 – 572, N 3, – P. 789–798.
16. *Моин В. М.* // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724–727.
17. *Путилина Ф. Е.* Методы биохимических исследований / Под. ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
18. *Ellman G. L.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – 82, N 1. – P. 70–77.
19. *А. с. № 1084681 СССР, МКИ G №33/48.* Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / Мирончик В. В. (СССР). – № 3468369/28-13; Заявлено 08.07.82; Опубл. 07.04.84, Оф. бюл. № 13 – 2 с.
20. *Коробейникова Э. Н.* // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8–9.
21. *Колесниченко Л. С., Кулинский В. И.* // Успехи совр. биол. – 1989. – 107, № 2. – С. 179–194.
22. *Saez G. T., Bannister W. H., Bannister J. V.* / In: Vina J, ed. Glutathione: Metabolism and physiological functions. – Boca Raton, FL, USA: CRC Press, – 1990. – P. 237–254.
23. *Cacciatore I., Cornacchia C., Pinnen F. et al.* // Molecules. – 2010. – 15, N 3. – P. 1242–1264.
24. *Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Саприн А. Н.* // Успехи биол. химии. – 2008. – 48. – С. 319–358.
25. *Cand F., Verdetti J.* // Free Radic. Biol. Med. – 1989. – 7, N 1. – P. 59–63.
26. *Кулинский В. И., Колесниченко Л. С.* // Успехи совр. биол. – 1993. – 113. – С. 107–121.

27. Керимов Б. Ф. // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, № 1. – С. 108–113.
28. Stadtman E. R. Levine R. L. // Amino Acids. – 2003. – 25. – P. 207–218.
29. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. и др. // Итоги науки и техники. Биофизика. – 1992. – 29. – С. 3–250.

Отримано 17.01.2013