

АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС ГУСЕЙ В УМОВАХ ГІПО- І ГІПЕРОКСІЇ

Данченко О.О., д.с.-г.н., доцент, Здоровцева Л.М., здобувач, Пашенко Ю.П., здобувач
Мелітопольський державний педагогічний університет імені Богдана Хмельницького

Встановлено специфічність функціонування системи антиоксидантного захисту в морфологічно близьких м'язових тканинах гусей, що характеризуються різним рівнем споживання кисню в умовах гіпо- і гіпероксії під час переходу від ембріогенезу до постнатального періоду. Доведено, що характер функціонування системи антиоксидантного захисту м'язових тканин залежить від рівня споживання кисню цими тканинами. Серед досліджених м'язових тканин найбільшого негативного впливу в умовах гіпо- і гіпероксії зазнає міокард. Формування адаптивної відповіді на оксидативний стрес у серцевих м'язах відбувається за рахунок активізації глутатіонпероксидази та ресурсів вітаміну Е і β-каротину. Одночасно здатність міокарду до ліпопероксидації послаблюється шляхом зниження рівня ненасиченості жирних кислот. Апробовано новий підхід до оцінки стану прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за рівнем узгодженості її показників.

Ключові слова: пероксидне окиснення ліпідів, система антиоксидантного захисту, гіпо- і гіпероксія, постнатальна адаптація, рівень узгодженості.

Данченко Е.А., Здоровцева Л.Н., Пашенко Ю.П. АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ГУСЕЙ В УСЛОВИЯХ ГИПО- И ГИПЕРОКСИИ / Мелитопольский государственный педагогический университет имени Богдана Хмельницкого, Украина.

Установлена специфичность функционирования системы антиоксидантной защиты в морфологически близких мышечных тканях гусей, характеризующихся различным уровнем потребления кислорода в условиях гипо- и гипероксии во время перехода от эмбриогенеза к постнатальному периоду. Показано, что характер функционирования системы антиоксидантной защиты мышечных тканей зависит от уровня потребления кислорода этими тканями. Наибольшее отрицательное влияние гипо- и гипероксия оказывает на миокард. Формирование адаптивного ответа на оксидативный стресс в сердечных мышцах происходит за счет активизации глутатионпероксидазы и ресурсов витаминов Е и β-каротина. Одновременно склонность миокарда к липопероксидации уменьшается путем снижения уровня ненасыщенности жирных кислот. Апробирован новый подход к оценке состояния прооксидантно-антиоксидантного равновесия по уровню согласованности его показателей.

Ключевые слова: пероксидное окисление липидов, система антиоксидантной защиты, гипо- и гипероксия, постнатальная адаптация, уровень согласованности.

Danchenko E.A., Zdorovtseva L.N., Pashenko U.P. ANTIOXIDANT STATUS OF GEESSE UNDER HYPO- AND HYPEROXIA / Melitopol State Pedagogical University named after Bogdan Khmelnytsky, Ukraine.

Established the specificity of the functioning of antioxidant-term protection in the morphologically similar muscle geese, char-forming different levels of oxygen consumption under conditions of hypo- and hyperoxia during the transition from embryogenesis to postnatal period. Show, but that the functioning of the antioxidant defense system we-muscular tissues depends on the level of oxygen consumption by these tissues. The greatest negative impact of hypo- and hyperoxia has on the myocardium. Formation of an adaptive response to oxidative stress in cardiac muscle by activating glutathione and vitamins E and resource β-carotene. At the same time a tendency to attack lipoperok-sidtsii reduced decline in unsaturated fatty acids. Up robirovan new approach to assessing the state of prooxidant-antioxidant balance in terms of consistency of its performance.

Key words: lipid peroxidation, antioxidant defense system, hypo- and hyperoxia, postnatal adaptation, the level of consistency.

ВСТУП

На всіх етапах розвитку організму птиці системі антиоксидантного захисту (АОЗ) належить важлива роль у підтримці гомеостазу. Вона забезпечує інактивацію продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), запобігає їхньому нагромадженню та сприяє відновленню окислених сполук, що утворюються в цей період життя [1, 2].

Питання про кореляції між кількістю кисню і швидкістю протікання процесів ПОЛ

досліджувалося і залишається достатньо дискусійним [2]. Відомо, що утворення вільних радикалів відбувається особливо інтенсивно в клітинах ендотелію, де вміст кисню найбільш високий, хоча є дані про можливість перебігу ліпопероксидації при досить низьких рівнях pO_2 в тканинах.

У ряді робіт останніх років доведено зв'язок показників енергетичного обміну і стану прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі птиці [3]. Проте тканнна специфічність функціонування системи АОЗ у зв'язку зі специфікою енергозабезпечення цих тканин у найбільш складні періоди онтогенезу, на тлі гіпо- і гіпероксичного стану їх організму, досліджено недостатньо.

Згідно з морфофункціональною класифікацією виділяються три типи м'язової тканини – скелетна, серцева і гладка. Клітини цих м'язів, окрім різної локалізації і форми волокон, ще відрізняються швидкістю скорочень, можливістю залишатися в скороченому стані та здатністю до регуляції скорочень. З енергетичної точки зору вони характеризуються різним рівнем споживання кисню, що, безумовно, визначає не тільки інтенсивність перебігу основних шляхів утилізації кисню, але й особливості процесів ліпопероксидації і функціонування системи АОЗ у цих тканинах [4].

Метою роботи було з'ясування біохімічних механізмів підтримки прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в м'язових тканинах гусей в умовах гіпо- і гіпероксії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для інкубації відбирались яйця гусей (*Anser*) італійської породи з середньою масою ($134,2 \pm 8,4$) г. Дослідження системи АОЗ в ембріогенезі проводили в фізіологічно обґрунтовані терміни: 15 діб – замикання алантоїсу, наявність сформованої печінки, 22 доби – перехід від білкового типу живлення до жовткового, 28 діб – перенесення ембріонів на виведення. У постнатальному періоді дослідження обмежували 14-добовим віком (ранній постнатальний період онтогенезу) [5]. Об'єктом дослідження були м'язові тканини серця, шлунку і скелетних м'язів. Виділені після декапітації 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.I. Dyer [6] із рекомендаціями F.V. Palmer [7]. Жирнокислотний склад (ЖКС) визначали методом газорідинної хроматографії. Ненасиченість жирних кислот розраховували як сумарну еквівалентну концентрацію ненасичених жирних кислот (НЖК) відносно подвійних зв'язків [8].

Інтенсивність ПОЛ у тканинах пташенят оцінювали за вмістом продуктів пероксидації, які реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою – ТБК-активних продуктів (ТБКАП) [9]. Визначення цих продуктів проводили в гомогенатах тканин (ТБКАП) та за ініціації Fe^{2+} ПОЛ (ТБКАП_{інк}).

Активність антиоксидантних ферментів і вміст вітамінів визначали за відомими методиками: СОД-активності (КФ 1.15.1.1.) [10], КАТ-активності (КФ 1.11.1.6) [11], ГПО-активності (КФ 1.11.1.9) [12]. Вміст вітамінів А, Е і β -каротину в тканинах визначали спектрофотометричним методом [13].

Математична обробка експериментальних даних здійснювалася методами математичної статистики, у тому числі кореляційного, регресійного і дисперсійного аналізів, з використанням пакетів комп'ютерних програм MS Excel 2000 та SPSS-13.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що в тканинах серця і скелетних м'язів добових гусенят ЖКС ліпідів достовірно не відрізняється як за сумарним вмістом НЖК, так і за рівнем ненасиченості ЖК (табл. 1, 2). Упродовж досліду ліпіди міокарду характеризувались достатньо стабільним рівнем ненасиченості їхнього жирнокислотного складу. Зміни ЖКС цих

тканин у другій половині ембріонального періоду спрямовані на зниження рівня ненасиченості ЖК: у добових гусенят рівень ненасиченості ЖК ліпідів міокарду на 10,2 % нижчий порівняно з відповідним вихідним показником.

Таблиця 1 – Жирнокислотний склад ліпідів міокарду в дослідженому періоді онтогенезу (ω – масова частка, %; N – ненасиченість ЖК, мМоль/г) ($M \pm m, n = 6$)

Шифр кислоти	Вік, доба					
	15 ембр.		I		15	
	ω	N	ω	N	ω	N
16:0	32,34 ± 1,42	-	26,39 ± 1,52	-	22,56 ± 1,15	-
16:1	3,77 ± 0,11	0,148	2,23 ± 0,09	0,009	2,39 ± 0,05	0,009
18:0	16,80 ± 0,33	-	12,94 ± 0,42	-	14,26 ± 0,43	-
18:1	19,39 ± 1,03	0,688	35,25 ± 1,14	1,250	28,47 ± 0,94	1,010
18:2	3,87 ± 0,07	0,276	10,51 ± 0,03	0,750	11,77 ± 0,03	0,840
18:3	0,33 ± 0,00	0,036	0,20 ± 0,00	0,022	5,23 ± 0,02	0,564
20:4	10,28 ± 0,23	1,353	8,60 ± 0,12	1,131	8,57 ± 0,07	1,128
22:5	5,26 ± 0,11	0,797	1,31 ± 0,03	0,198	0,79 ± 0,00	0,120
22:6	2,94 ± 0,09	0,538	0,47 ± 0,00	0,086	1,73 ± 0,01	0,316
Вміст НЖК	46,35	3,84	59,13	3,45	60,12	3,99

Таблиця 2 – Жирнокислотний склад ліпідів скелетних м'язів у дослідженому періоді (ω – масова частка, %; N – ненасиченість ЖК, мМоль/г) ($M \pm m, n = 6$)

Шифр кислоти	Вік, доба					
	15 ембр.		I		15	
	ω	N	ω	N	ω	N
16:0	30,11 ± 0,42	-	23,50 ± 0,52	-	24,58 ± 1,15	-
16:1	3,21 ± 0,11	0,126	3,66 ± 0,09	0,144	4,61 ± 0,05	0,181
18:0	15,71 ± 0,23	-	14,88 ± 0,34	-	11,46 ± 0,43	-
18:1	24,62 ± 0,43	0,873	28,20 ± 0,54	1,000	32,72 ± 0,51	1,160
18:2	7,40 ± 0,27	0,529	14,75 ± 0,28	1,054	15,22 ± 0,41	1,087
18:3	0,10 ± 0,00	0,011	0,44 ± 0,00	0,047	3,52 ± 0,02	0,380
20:4	10,76 ± 0,23	1,416	8,90 ± 0,12	1,171	4,19 ± 0,07	0,551
22:5	2,92 ± 0,07	0,442	2,26 ± 0,03	0,342	0,80 ± 0,01	0,121
22:6	1,40 ± 0,09	0,256	0,57 ± 0,00	0,104	0,92 ± 0,01	0,168
Вміст НЖК	51,23	3,65	59,50	3,87	62,84	3,65

Зниження ненасиченості ЖК відбувалось за рахунок підвищення моно- і дієнових кислот (олеїнової, лінолевої) при одночасному зменшенні вмісту довголанцюгових ПНЖК (у першу чергу докозапентаєнової (ДПК) і докозагексаєнової (ДГК)). 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 ліпопероксидації сприяє гальмуванню ПОЛ.

Формування адаптивної відповіді організму гусенят на умови постнатального розвитку супроводжувалось підвищенням рівня ненасиченості ЖК ліпідів міокарду на 15,7 %, головним чином, за рахунок зростання вмісту ліноленової і докозагексаєнової кислот у цей період онтогенезу.

У скелетних м'язах 15-добових ембріонів також встановлено мінімальний за весь період дослідження вміст НЖК і впродовж дослідження відбулось його зростання на 22,7 % за рахунок підвищення вмісту олеїнової, лінолевої і ліноленової кислот.

Як і в міокарді, у скелетних м'язах максимальний вміст поліненасичених жирних кислот (ДПК і ДГК) і мінімальний вміст моно-, ди- і триєнових кислот (олеїнової, лінолевої і ліноленової) спостерігався на початку дослідження. Ненасиченість ЖК ліпідів скелетних м'язів є ще більш сталим показником порівняно з відповідним показником міокарду: упродовж дослідження зміни ненасиченості ЖК скелетних м'язів відбувались у межах 5,8 %. Така стабільність ненасиченості ЖК ліпідів, на тлі фізіологічної напруги в організмі птиці, ймовірно, можлива за більш сталого парціального тиску кисню в цих тканинах.

Найвищий вміст кінцевих продуктів ліпопероксидації в посмугованих м'язах встановлено для 15-добових ембріонів гусенят (рис. 1).

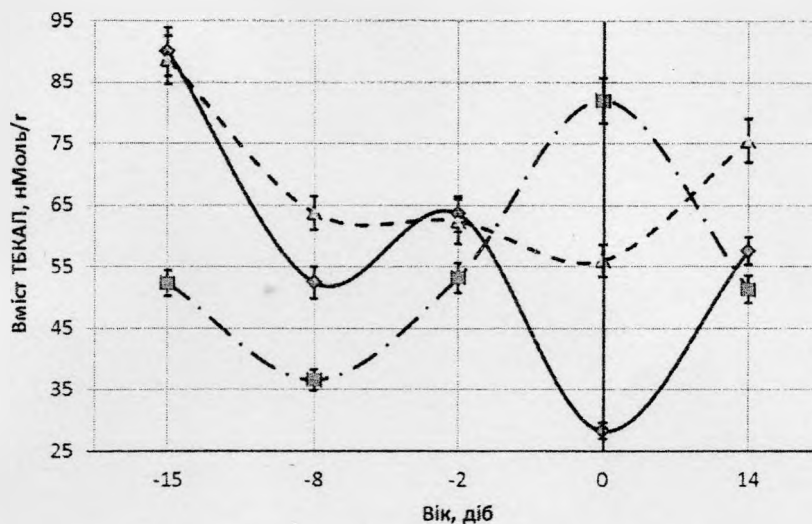


Рис. 1. Зміни вмісту ТБКАП у тканинах:

— — серця; - · - · — шлунку; — — скелетних м'язів.

Гладкі м'язи шлунку ембріонів цього віку характеризувались у 1,7 разу нижчим вмістом ТБКАП. Накльовування шкаралупи ембріонами супроводжувалось достовірним підвищенням цього показника в тканинах серця і шлунку на тлі стабілізації його рівня в скелетних м'язах. Таким чином, у посмугованих м'язах інтенсифікація процесів пероксидного окиснення наприкінці ембріонального періоду адекватна рівню споживання ними кисню.

Перехід до постнатального існування супроводжувався активізацією процесів ПОЛ у м'язах шлунку, стабілізацією – у скелетних м'язах, зниженням вмісту ТБКАП у 2,2 разу – у серцевому м'язі. Такі різноспрямовані зміни цього показника в 1-добових гусенят у досліджених тканинах фізіологічно зумовлені, адже найбільша напруга про-антиоксидантної рівноваги в тканинах серця спостерігається в 28-добових ембріонів після накльовування шкаралупи і переходу на легеневе дихання, а в шлунку – вже після вилуплення на тлі запуску шлунково-кишкового тракту. Під час постнатальної адаптації вміст вторинних продуктів ПОЛ наближається до середнього рівня цього

показника в усіх м'язових тканинах. Результати статистичного аналізу свідчать, що для м'язових тканин специфічність перебігу процесів ліпопероксидації в більшій мірі визначається характером змін, аніж загальним рівнем цього показника. Для скелетних м'язів специфічність динаміки ТБКАП проявляється в її більш сталому характері, що підтверджується у 2,0 рази нижчим, порівняно з міокардом, коефіцієнтом варіації.

При високому рівні ненасиченості ЖК ліпідів прооксидантно-антиоксидантна рівновага в серцевих м'язах повинна утримуватись за достатньої активності системи АОЗ і, в першу чергу, антиоксидантних ферментів ще на ранніх етапах розвитку організму гусей. Дійсно, у міокарді 15-добових ембріонів встановлено найвищий за період дослідження рівень СОД-активності (рис. 2). Усі досліджені м'язові тканини характеризувались високим вихідним рівнем СОД-активності, проте для скелетних м'язів цей показник достовірно поступався. Перехід до атмосферного дихання супроводжувався зниженням рівня СОД-активності в усіх м'язових тканинах. Встановлено подібний характер змін цього показника в усіх досліджених тканинах. Зниження середнього рівня і стабільності СОД-активності в досліджених тканинах відбувається в порядку: *міокард – шлунок – скелетні м'язи*.

Порівняльний аналіз КАТ-активності свідчить про подібний характер динаміки цього показника в усіх досліджених тканинах (рис. 3). За середнім рівнем КАТ-активність міокарду і шлунку дуже близька і значно перевищує рівень цього показника для скелетних м'язів.

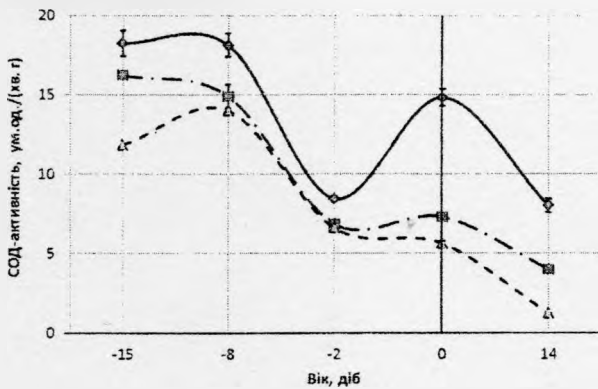


Рис. 2. Динаміка СОД-активності в досліджених тканинах:

— — серця; - - - - шлунку; - · - · - скелетних м'язів.

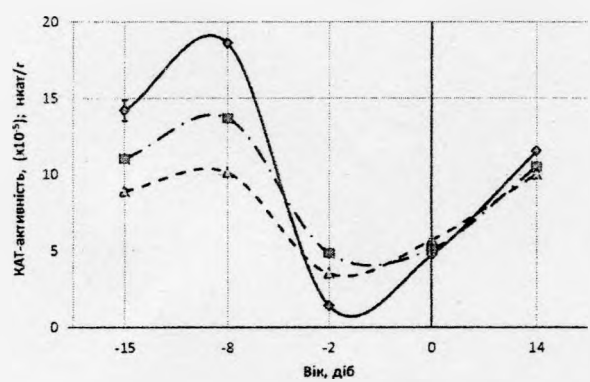


Рис. 3. Динаміка КАТ-активності в досліджених тканинах:

— — серця; - - - - шлунку; - · - · - скелетних м'язів.

На відміну від СОД і КАТ вихідна ГПО-активність в усіх досліджених тканинах характеризується мінімальним для даних тканин рівнем, який суттєво поступається відповідному середньому значенню цього показника (рис. 4).

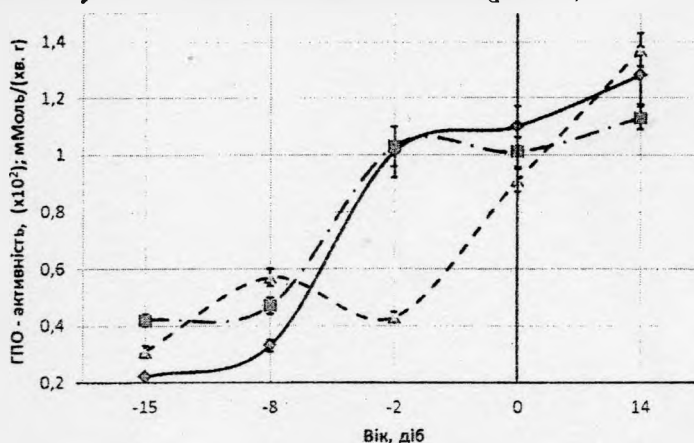


Рис. 4. Динаміка ГПО-активності в досліджених тканинах:

— — серця; - - - - шлунку; - · - · - скелетних м'язів.

Монотонне зростання ГПО-активності, що тривало впродовж усього досліджу в тканинах серця і шлунку, гальмувалось під час переходу гусячих ембріонів до постнатального розвитку за інтенсифікації процесів ПОЛ, а в скелетних м'язах – з 22-ої до 28-ої доби на тлі стабільного рівня ліпопероксидації, що може бути ознакою прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в тканинах скелетних м'язів у цей період.

Різке падіння вмісту вітаміну Е і β -каротину наприкінці ембріогенезу (рис. 5, 6) свідчить про суттєвий внесок компонентів неферментативного захисту в цей період. Найвищим рівнем витрачання вітаміну Е і β -каротину в останні дві доби ембріогенезу характеризуються найбільш чутливі до кисню серцеві м'язи, що зумовлено типом метаболізму і специфікою їхнього енергозабезпечення.

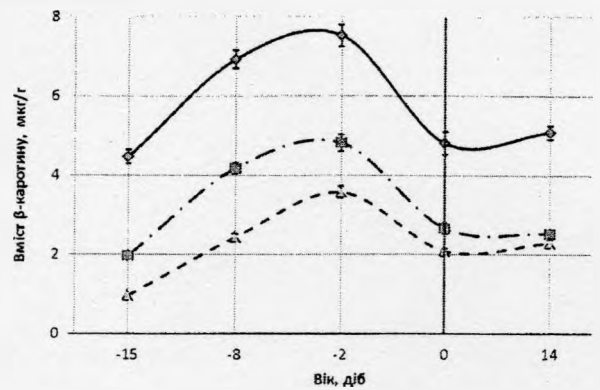
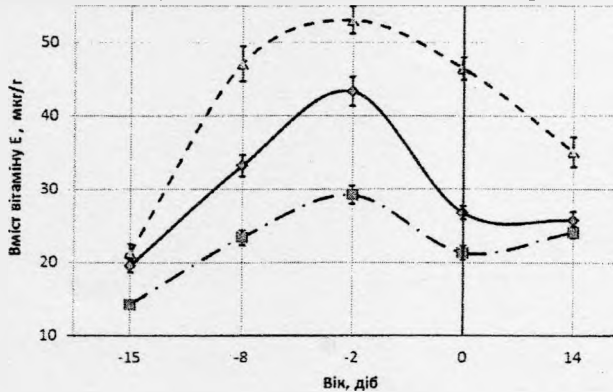


Рис. 5. Динаміка вмісту вітаміну Е в досліджених тканинах:

Рис. 6. Динаміка вмісту β -каротину в досліджених тканинах:

— — серця; - · - - шлунку; — — скелетних м'язів.

Вміст вітаміну А в тканинах серця був у 5,8 разу більший, ніж у тканинах шлунку та в 10,4 разу – ніж у скелетних м'язах (рис. 7). Найбільш суттєві зміни цього показника в усіх досліджених тканинах спостерігались в ембріональному періоді. Іntenсифікація процесів ПОЛ у тканинах серця і шлунку, пов'язана з переходом ембріонів до атмосферного дихання, не спричинила достовірного зниження вмісту вітаміну А в цих тканинах.

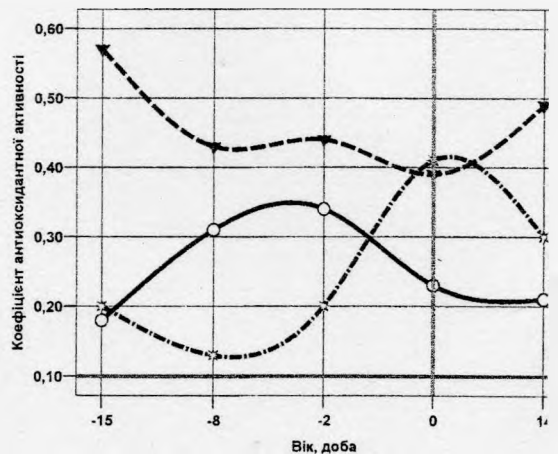
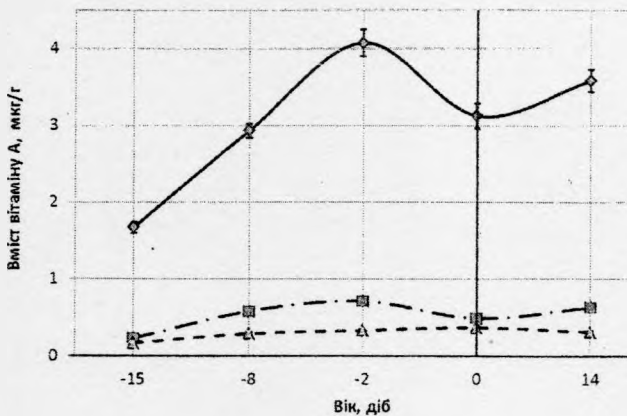


Рис. 7. Динаміка вмісту вітаміну А в досліджених тканинах:

Рис. 8. Динаміка K_{AOA} в досліджених тканинах:

— — серця; - · - - шлунку; — — скелетних м'язів.

Аналіз K_{AOA} , що застосовується нами для інтегральної оцінки стану прооксидантно-антиоксидантної рівноваги (рис. 8), свідчить про найвищу здатність скелетних м'язів до гальмування ліпопероксидації. Причому за вихідним значенням K_{AOA} , його середнім рівнем і коефіцієнтом варіації систему АОЗ скелетних м'язів можна охарактеризувати як найбільш потужну.

ВИСНОВКИ

1. Характер функціонування системи АОЗ м'язових тканин залежить від рівня споживання кисню цими тканинами.
2. Серед досліджених м'язових тканин найбільшого негативного впливу при переході від гіпо- до гіпероксії кінця ембріонального періоду зазнає міокард, що позначається в першу чергу дезактивацією СОД.
3. Мобілізація системи АОЗ серцевих м'язів наприкінці ембріогенезу відбувається за рахунок ГПО, та ресурсів низькомолекулярних антиоксидантів (вітаміну Е і β -каротину). Одночасно здатність міокарду до ліпопероксидації послаблюється зниженням на 10,2 % рівня ненасиченості жирних кислот ліпідів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреев А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.А. Кушнарев, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70, вып. 2. – С. 246 – 264.
2. Мхітарян Л.С. Окислювальний стрес: Механізми розв. і роль в патології / Ред.: Г.В. Донченко. – К., 2004. – 222 с.
3. Ростова Н.С. Корреляции: структура и изменчивость / Н.С. Ростова. – С.-Пб.: изд. С.-Петербур. ун-та, 2002. – 308 с.
4. Шаронов Б.П. Антиокислительные свойства и деградация белков сыворотки активными формами кислорода, генерируемыми стимулированными нейтронами / Б.П. Шаронов, Н.Ю. Говорова, С.Н. Лызлова // Биохимия. – 1988. – Т. 53, вып. 5. – С. 816 – 825.
5. Іонов І.А. Фізіологічний статус птиці в ембріогенезі та постнатальному онтогенезі в залежності від її А-, Е- та К-вітамінної забезпеченості : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. с.-г. наук : спец. 03.00.13 "Фізіологія людини і тварин" / І.А. Іонов. – Харків, 1997. – 32 с.
6. Bligh E.G. A rapid method of total lipids extraction and purification / E.G. Bligh, W.I. Dyer // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – V. 37. – P. 911 – 917.
7. Palmer F.B. St. C. The extraction of acidic phospholipids in organic solvent mixtures containing water / F.B. St. C. Palmer // Biochim. Biophys. Acta. : Lipids and Lipid Metabolism – 1971. – V. 231. – № 1. – P. 134 – 144.
8. Данченко О.О. Онтогенетичні особливості змін жирнокислотного складу ліпідів печінки гусей як головного субстрату пероксидації / О.О. Данченко, В.В. Калитка, Д.М. Колесник // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75, № 3. – С. 124 – 129.
9. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука. 1972. – 272 с.
10. Макаревич О.П. Определение активности супероксиддисмутазы / О.П. Макаревич, П.П. Голиков // Лаб. Дело. – 1983. – № 6. – С. 24 – 28.
11. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, М.И. Иванова, И.Т. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. Дело. – 1988. – № 1. – С.18.
13. Гаврилова А.Р. Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов / А.Р. Гаврилова, Н.В. Хмара // Лаб. Дело. – 1986. – № 12. – С. 721 – 724.
14. Антонов Б.И. Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микробиологические / Б.И. Антонов, Т.Ф. Яковлева, В.И. Дерябина. – М. : Агропромиздат, 1991. – 278 с.