

**ФАКТОРИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У КРОВІ
ТА ПЕЧІНЦІ ФАЗАНІВ ПІД ЧАС ОНТОГЕНЕЗУ**

В. В. КАЛИТКА, О. А. ЄРЕМЕНКО

*Мелітопольський державний педагогічний університет, Україна;
e-mail: nina@melitopol.net*

Впервые исследовано изменение активности антиоксидантных ферментов, содержания ТБК-активных продуктов и липофильных биоантиоксидантов у фазанов в период с их односуточного до 60-дневного возраста. Показано, что недостаточно сформированная ферментативная система антиоксидантной защиты в тканях суточных фазанов является причиной и следствием высокой интенсивности в них процессов перекисаации. Компенсаторное возрастание активности антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ) в ранний период постнатального онтогенеза сопровождается быстрым истощением пула основных липофильных биоантиоксидантов, которое, в свою очередь, провоцирует ингибирование ферментативных реакций антиоксидантной защиты. Это приводит к снижению адаптационной способности диких птиц в условиях искусственного разведения.

*К л ю ч е в ы е с л о в а: фазан (*Phasianus colchicus*), антиоксидантная защита, процессы перекисаации, антиоксидантные ферменты, витамины.*

Оксидативний стрес, який виникає в організмі внаслідок порушення прооксидантно—антиоксидантної рівноваги розглядають останнім часом як один із ключових факторів загального адаптаційного синдрому [1]. Тому для оцінки адаптаційних можливостей організму диких птахів в умовах штучного розведення важливо знати особливості перебігу процесів перекисації у функціонально важливих органах і тканинах тварин у віковому аспекті. З іншого боку, однією з причин порушення структурно-функціональних властивостей біомембран, модифікації мембранозв'язаних ферментів і структур DNA є надмірна інтенсифікація вільнорадикальних процесів перекисації внаслідок суттєвого дисбалансу між продукцією вільних радикалів (активних форм кисню, азоту, продуктів окислення ліпідів) і антиоксидантним захистом (АОЗ) [2], який представлено системою антиоксидантних ферментів і тканинних біоантиоксидантів.

Нами показано, що для свійських птахів характерними є періоди напруги системи АОЗ та інтенсифікації процесів ліпоперекисації, що пов'язано з перебудовою фізіологічних функцій організму та дією несприятливих факторів середовища [3–5].

Метою даного дослідження було з'ясування особливостей ферментативної та неферментативної систем АОЗ у тканинах печінки і крові фазанів за постнатального онтогенезу на тлі ліпоперекисації різної інтенсивності.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на фазанах звичайних (*Phasianus colchicus*). Була сформована група фазанів в однодобовому віці кількістю 200 голів з середньою масою тіла $20,29 \pm 0,38$ г. Птахів утримували у приміщенні на долівці з глибокою підстилкою і вигулом у світлий час доби [6]. Використовували корми із вмістом обмінної енергії 286,5 ккал в 100г корму (1–30 днів), 287,5 ккал (30–60 днів) та протеїну 21,8% (1–30 днів), 21,9% (30–60 днів). Доступ до води і корму був вільний. У віці 1, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 діб птахів (5–9 голів) декапітували під ефірним наркозом, збирали кров (плазму, сироватку) та виділяли печінку. З гепаринізованої крові після центрифугування одержали плазму та еритроцитарну масу [7]. Печінку для визначення ліпідів, інтенсивності процесів перекисації та вітамінів заморожували в рідкому азоті і зберігали при температурі -20°C . Інтенсивність перекисного окислення ліпідів у тканинах печінки та плазмі крові визначали за вмістом продуктів перекисації, які реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) [8]. Вміст загальних ліпідів визначали гравіметричним методом після екстрагування їх хлороформом та випарювання розчинника [9]. У тканинах печінки та в сироватці крові визначали вміст вітаміну Е за реакцією із залізопіридиловим реактивом, β -каротину — фотометрією гексанового екстракту із тканин при $\lambda = 440$ нм, вітаміну А — спектрофотометрично за поглинання комплексу з трихлористою сурмою при $\lambda = 590$ нм [10].

Печінку гомогенізували в 50 мМ фосфатному буферному розчині (рН 7,4), до якого додавали 0,154 М розчин хлористого натрію у співвідношенні 1 : 9 (маса : об'єм). Оцінювали антиоксидантну дію ферментів за відомими методами: активність каталази (КАТ, 1.11.1.6) – за ступенем розкладу каталазою пероксиду водню, залишок якого визначали в реакції з молібдатом амонію і виражали в нмоль/хв на 1 мг білка (печінка) та пмоль/хв на 1 мг білка (кров) [11]; активність глутатіонпероксидази (ГП, 1.11.1.9) – за зменшенням концентрації глутатіону відновленого, який визначали в реакції з нітропрусидом натрію і виражали в мкмоль/хв на 1 мг білка [12]; активність супероксиддисмутази (СОД, 1.15.1.1) – за ступенем гальмування відновлення нітросинього тетразолію за присутності NADH та феназинметасульфату і виражали в од/хв на 1 мг білка [13]. Вміст білка в досліджуваних тканинах визначали методом Лоурі [14].

Використовували реактиви фірм «Reanal» (Угорщина), «Реагент» (Україна), інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації ч.д.а. і х.ч.

Результати дослідження опрацьовано статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента [15].

Результати та обговорення

Початок постнатального онтогенезу у птахів супроводжується переходом від гіпоксії в кінці ембріонального розвитку до відносної гіпероксії у шойно виведених пташенят, що може бути однією із причин підвищеного утворення вільних радикалів [16] та інтенсифікації процесів пероксидації перш за все ліпідних структур [1].

Нами встановлено, що вміст ТБК-активних продуктів як у тканинах печінки, так і у крові добових фазанів був найвищим (рис. 1, 2) порівняно з іншими віковими періодами. Це деякою мірою можливо пояснити підвищеним вмістом у тканинах ліпідів (рис. 3), які є голов-

ним субстратом пероксидації. Так, між вмістом ТБК-активних продуктів і ліпідів у печінці існує статистично значущий позитивний кореляційний зв'язок з $r = 0,62$.

Висока інтенсивність процесів пероксидації у тканинах однодобових пташенят спостерігається на тлі найвищого рівня основних тканинних біоантиоксидантів (β -каротину, вітамінів А і Е) і обумовлена, ймовірно, недостатньою сформованістю ферментативної ланки АОЗ.

Активність найважливіших антиоксидантних ферментів (СОД, КАТ, ГП) у тканинах добових фазанів низька (табл. 1). Особливо це стосується СОД, яка є ключовим ферментом антиоксидантного захисту. Недостатня утилізація супероксидних радикалів з боку СОД спричинює утворення активних форм азоту і ліпідів, які викликають інтенсифікацію процесів ліпопероксидації, ушкодження мітохондріальних ферментних комплексів, зокрема СОД, порушення синтезу гемових груп КАТ [17].

Протягом першої декади постнатального онтогенезу відбувається зростання активності СОД у тканинах печінки в 1,3 раза, а в еритроцитах – в 2,3 раза (табл. 1), що супроводжується зменшенням вмісту ТБК-активних продуктів у тканинах печінки в 1,3 раза, а у плазмі крові – в 2,5 раза (рис. 1, 2). Ці дані свідчать про наявність тісного зв'язку між інтенсивністю процесів пероксидації в досліджуваних тканинах і активністю СОД.

Друга декада життя фазанів характеризується тенденцією до стабілізації активності СОД в печінці і подальшим вірогідним ($p \pm 0,05$) зростанням її в еритроцитах (в 1,1 раза порівняно з 10-денним віком). Проте зміни в інтенсивності пероксидації в цей період протилежно спрямовані і характеризуються стабілізацією вмісту ТБК-активних продуктів у крові і зменшенням їхнього рівня в печінці (в 1,8 раза порівняно з 10-денним віком). Очевидно, з віком роль СОД

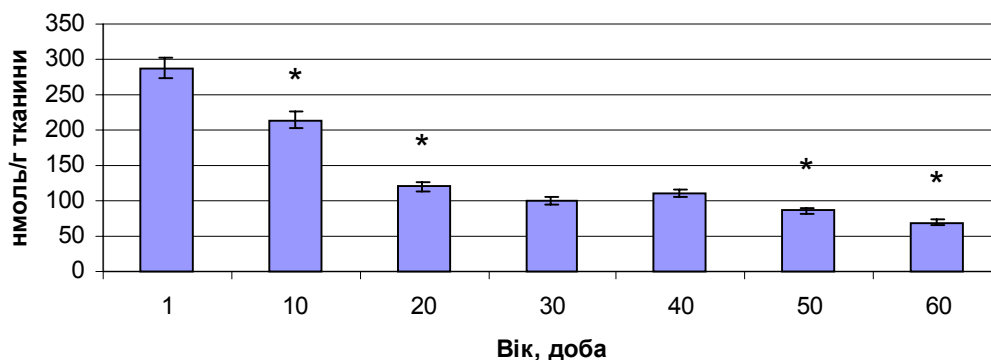


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у тканинах печінки фазанів в онтогенезі. Тут і на рис. 2, 3: * зміни показника стосовно попереднього етапу дослідження вірогідні, $p \pm 0,05$ ($M \pm m$, $n = 5$).

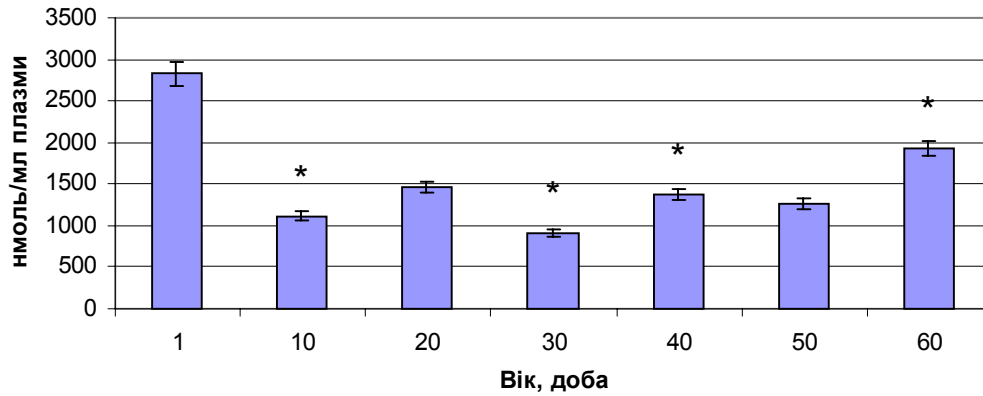


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові фазанів в онтогенезі.

Т а б л и ц я 1. Активність антиоксидантних ферментів у тканинах фазанів в онтогенезі ($M \pm m, n = 5$)

Вік, доба	Каталаза		Супероксиддисмугаза		Глутатіонпероксидаза	
	У печінці, нмоль/хв на 1 мг білка	У сироватці, пмоль/хв на 1 мг білка	У печінці, од/хв на 1 мг білка	В еритроцитах, од/хв на 1 мг білка	У печінці, мкмоль/хв на 1 мг білка	У плазмі, мкмоль/хв на 1 мг білка
1	17,73 ± 0,68	85,26 ± 2,10	0,488 ± 0,007	1,12 ± 0,12	458,34 ± 14,21	54,09 ± 4,40
10	5,62 ± 0,17*	122,43 ± 16,75*	0,632 ± 0,061*	2,59 ± 0,14*	280,89 ± 26,50*	42,24 ± 2,52*
20	11,34 ± 0,76* ^a	93,64 ± 4,51*	0,584 ± 0,050	2,83 ± 0,09* ^a	376,28 ± 21,30*	77,54 ± 8,25*
30	6,21 ± 0,39*	64,87 ± 2,83*	0,441 ± 0,003*	1,75 ± 0,21*	546,25 ± 17,72* ^a	153,29 ± 18,91 ^a
40	5,74 ± 0,34	57,01 ± 1,79*	0,308 ± 0,001*	1,66 ± 0,14	147,37 ± 5,34*	103,74 ± 3,37*
50	5,52 ± 0,27	41,45 ± 3,56*	0,425 ± 0,012* ^a	1,37 ± 0,06*	266,84 ± 12,46*	120,64 ± 9,75*
60	11,86 ± 0,81* ^a	22,29 ± 2,30* ^a	0,379 ± 0,002* ^a	1,30 ± 0,04 ^a	269,34 ± 9,72* ^a	76,30 ± 1,66 ^a

Тут і в таблиці 2: * різниця вірогідна порівняно з попереднім періодом, $p \pm 0,05$; ^a різниця вірогідна порівняно з першою добою, $p \pm 0,05$.

в стабілізації вільнорадикальних процесів у тканинах послаблюється.

У ранній період онтогенезу (перша декада) активність КАТ у сироватці крові фазанів підвищується в 1,4 раза, що є реакцією на високу інтенсивність ліпопероксидації в однодобових птахів. У той саме час у тканинах печінки спо-

стерігається зниження її активності в 3,1 раза (табл. 1). Така тканинна специфічність у зміні активності КАТ пов'язана зі звільненням мембранозв'язаної каталази гепатоцитів внаслідок ушкодження мембран вільними радикалами і продуктами пероксидації і збільшенням її рухливої фракції в геодинамічній системі [18]. Це підтвер-

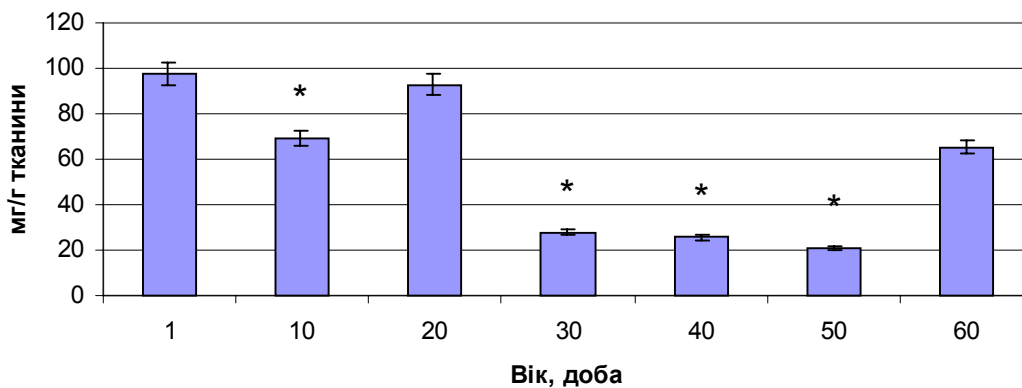


Рис. 3. Вміст ліпідів у тканинах печінки фазанів в онтогенезі.

Таблиця 2. Вміст основних компонентів неферментативної системи антиоксидантного захисту організму фазанів в онтогенезі ($M \pm m$, $n = 5$)

Вік, доба	В печінці, мкг/г:			В крові, мкг/мл:		
	β -каротин	вітамін А	вітамін Е	β -каротин	вітамін А	вітамін Е
1	23,39 \pm 1,06	13,30 \pm 0,11	152,91 \pm 5,54	16,71 \pm 0,55	70,32 \pm 4,91	95,78 \pm 7,44
10	19,53 \pm 0,47*	7,61 \pm 0,35*	92,27 \pm 2,18*	3,82 \pm 0,03*	64,39 \pm 2,40*	46,32 \pm 4,81*
20	14,39 \pm 1,51*	9,04 \pm 1,19*	72,98 \pm 1,50*	4,62 \pm 0,14	6,28 \pm 0,24*	27,84 \pm 2,70*
30	4,76 \pm 0,12*	12,30 \pm 0,16* ^a	47,36 \pm 2,14*	5,89 \pm 0,12*	9,02 \pm 0,29*	15,70 \pm 1,33*
40	3,03 \pm 0,29*	6,61 \pm 0,35*	24,50 \pm 0,38*	4,54 \pm 0,13*	3,66 \pm 0,07*	15,10 \pm 1,04
50	3,09 \pm 0,16	12,39 \pm 0,19* ^a	18,26 \pm 0,96*	7,71 \pm 0,01*	2,58 \pm 0,16*	4,08 \pm 0,69*
60	1,69 \pm 0,04*	27,14 \pm 1,24* ^a	57,83 \pm 2,31* ^a	4,02 \pm 0,48*	2,04 \pm 0,17*	8,78 \pm 0,22*

джується також зростанням у 2 рази активності КАТ у тканинах печінки протягом другої декади на тлі зниження у 1,8 раза вмісту ТБК-активних продуктів в цьому органі.

Активність ГП у тканинах печінки фазанів протягом першої декади життя знижується в 1,6 раза, що пов'язано з ушкодженням мембран гепатоцитів продуктами пероксидації в однодобових птахів. У 20-денних фазанів, порівняно з 10-денними, активність ГП у тканинах печінки та у плазмі крові зростає в 1,3 і 1,8 раза на тлі зниження інтенсивності процесів ліпопероксидації.

Висока інтенсивність пероксидних процесів у ранній період постнатального онтогенезу обумовлює залучення основних тканинних біоантиоксидантів (β -каротину, вітамінів А і Е) до реакцій АОЗ, про що свідчить значне зменшення їхнього вмісту в печінці та плазмі крові 20-денних фазанів порівняно з однодобовими (табл. 2).

Підвищення вмісту ретинолу в печінці фазанів протягом другої і третьої декад досліджу, яке спостерігається водночас зі зниженням вмісту β -каротину, ймовірно обумовлено активацією β -каротин-15,15'-діоксигенази, яка бере участь у дисиміляції поліенового ланцюга β -каротину з утворенням двох молекул ретинолу [19]. Характерно, що поряд зі зростанням в 1,6 раза вмісту вітаміну А у тканинах печінки 30-денних фазанів, порівняно з 10-денними, спостерігається зниження в 7,1 раза його вмісту у плазмі крові. Відомо, що вітамін А депонується в печінці переважно у вигляді пальмітату, а у плазмі крові функціонує вільний ретинол, який менш стійкий до пероксидації і це може бути основною причиною зменшення його концентрації у плазмі.

У період з 30-ї по 50-у добу інтенсивність процесів ліпопероксидації у тканинах печінки стабілізується на низькому рівні (рис. 1), чому відповідають незначні зміни вмісту ліпідів (рис. 3).

Падіння активності СОД у тканинах фазанів

протягом другого місяця досліджу відбувається на тлі зниження активності КАТ, особливо в сироватці крові (табл. 1). Деяке зростання активності СОД (печінка) і ГП (печінка, кров) у 50-денному віці і активності КАТ (печінка) в 60-денному є компенсаторною реакцією на фізіологічний стрес, пов'язаний з початком ювенального линняння у птахів.

На 60-у добу дослідження активність СОД у тканинах печінки в 1,3 раза і КАТ у печінці в 1,5 раза, а в сироватці в 3,8 раза менша порівняно з цими показниками у тканинах добових фазанів. І тільки в еритроцитах активність цього ферменту перевищує на 16% його активність у добових птахів. Протягом усього досліджу між активністю зазначених ферментів ми спостерігали статистично вірогідний позитивний кореляційний зв'язок з $r = 0,70$ для крові, але він був відсутній для печінки.

Визначена тканинна специфічність зміни активності СОД і КАТ свідчить про більшу ступінь ушкодження продуктами пероксидації біомембран клітин крові, порівняно із клітинами печінки, що узгоджується з інтенсивністю ліпопероксидації в цих тканинах.

Зменшення активності СОД і КАТ у тканинах фазанів протягом третьої декади досліджу компенсується вірогідним зростанням активності ГП у тканинах печінки в 1,45 раза, а у плазмі крові – в 1,98 раза (табл. 1). Це свідчить про зростання ролі ГП в регуляції вільнорадикальних процесів у тканинах фазанів у період інтенсивного органогенезу. Різде зниження активності цього ферменту протягом четвертої декади досліджу може бути пов'язано зі значною інтенсифікацією процесів ліпопероксидації в усіх досліджуваних тканинах.

В цілому протягом усього досліджу кореляційні зв'язки СОД – ГП і КАТ – ГП були негативними, а порівняно із СОД – КАТ – слабо вираженими. Особливо це підтверджується для

пари СОД – ГП, де коефіцієнт лінійної кореляції наближається до нуля.

Між інтенсивністю процесів пероксидації і активністю основних ферментів АОЗ існує задовільний кореляційний зв'язок: позитивний для пар ТБК-активні продукти – СОД ($r = 0,51$) і ТБК-активні продукти – КАТ ($r = 0,53$) у тканинах печінки і негативний у випадку ТБК-активні продукти – ГП ($r = -0,54$) у плазмі крові. Отже, інтенсифікація вільнорадикальних процесів пероксидації спричинює компенсаторне зростання активності СОД і КАТ та пригнічення активності ГП.

Однією із причин зниження активності антиоксидантних ферментів протягом другого місяця досліду може бути вичерпання пулу основних компонентів неферментативної системи АОЗ. Відомо, що нестача вітаміну Е обумовлює конформаційні зміни мембранозв'язаних ферментів, порушує регуляцію синтезу гемових груп КАТ, пригнічує активність СОД і ГП у тканинах печінки та крові тварин [20]. У нашому дослідженні вміст вітаміну Е у печінці фазанів на 50-у добу зменшується у 8,4 раза, а у плазмі крові у 23,5 раза порівняно з таким показником у птиці однодобового віку (табл. 2). Протягом усього досліду між концентрацією вітаміну Е та активністю антиоксидантних ферментів у тканинах печінки ми визначали прямий кореляційний зв'язок, найбільш виявлений для пари Е – КАТ ($r = 0,79$) і менше для пар Е – СОД ($r = 0,54$) і Е – ГП ($r = 0,46$).

Відомо, що у свійських курей в період постнатального розвитку спостерігається накопичення вітаміну Е в печінці на тлі значного зростання інтенсивності ліпопероксидації [3]. Для фазанів також встановлено тісний позитивний кореляційний зв'язок між інтенсивністю процесів пероксидації та Е-вітамінною забезпеченістю їх: $r = 0,90$ (печінка), $r = 0,71$ (кров). Але в даному випадку зниження вмісту вітаміну Е у тканинах у постнатальний період розвитку відбувається синхронно з гальмуванням процесів пероксидації, а Е-гіповітаміноз, який спостерігається у 50-денних фазанів, обумовлений, ймовірно, недостатнім надходженням цього вітаміну з кормом.

Протягом другого місяця досліду вміст β -каротину у тканинах печінки знижується в 2,8 раза, а вітаміну А підвищується в 2,2 раза (табл. 2). Ці зміни пояснюються відновленням у 30-денних птахів механізмів біотрансформації β -каротину до ретинолу, а, з іншого боку, можуть бути пов'язані з недостатнім надходженням β -каротину із кормом за умов штучного розведення цих птахів. Така тенденція у зміні А-вітамінної забезпеченості фазанів у постнатальний

період розвитку призводить до збільшення в 2,0 рази вмісту вітаміну А і зменшення в 13,8 раза вмісту β -каротину у тканинах печінки 60-денних птахів, порівняно з однодобовими.

Слід відзначити, що між інтенсивністю процесів пероксидації і забезпеченістю тканин β -каротином існує тісний кореляційний зв'язок з $r = 0,93$ (печінка) і $r = 0,78$ (кров), тоді як кореляція між вмістом ТБК-активних продуктів і вітаміну А порівняно слабка: $r = -0,31$ (печінка), $r = 0,50$ (кров).

Дефіцит вітаміну А у тканинах фазанів викликає значне інгібування активності КАТ у крові ($r = 0,71$) та компенсаторне зростання активності ГП в крові ($r = -0,69$) і СОД в печінці ($r = -0,33$), що узгоджується з даними для інших біологічних об'єктів [21].

Таким чином, висока інтенсивність вільнорадикальних процесів ліпопероксидації у тканинах добових фазанів є причиною і наслідком недостатньої сформованості ферментативної системи АОЗ. Компенсаторне зростання активності антиоксидантних ферментів (СОД, КАТ) у ранній період постнатального онтогенезу супроводжується швидким вичерпанням пулу основних ліпофільних біоантиоксидантів, що, у свою чергу, проковує інгібування ферментативних реакцій АОЗ. Це призводить до зниження адаптаційної здатності диких птахів в умовах штучного розведення.

THE FACTORS OF ANTIOXIDANT DEFENCE IN THE BLOOD AND LIVER OF PHEASANTS IN CONDITIONS OF ONTOGENESIS

V. V. Kalitka, O. A. Eremenko

Melitopol State Pedagogical University, Ukraine;
e-mail: nina@melitopol.net.

S u m m a r y

The changes in activity of antioxidant enzymes of LPO products and lipophilic bioantioxidants of pheasants during the period from 1 day up to 60-day age was investigated for the first time. It is shown, that insufficiently generated enzymatic antioxidant systems is a cause and result of high intensity of processes of free-radical LPO in 1-day pheasants tissues. The compensated increase of antioxidant enzymes (SOD, CAT) activity during the early period of postnatal ontogenesis does not prevent from the fast exhaustion of a pool of the main lipophilic bioantioxidants that in its turn provokes the inhibition of antioxidant system enzymes reactions. This results in the decrease of adaptability of wild birds in conditions of artificial breeding.

К e y w o r d s: pheasants (*Phasianus colchicus*), antioxidant defence, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, vitamin.

1. Зозуля Ю. А., Барабой В. А., Сутковой Д. А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. М.: Знание. 2000. 344 с.
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford: University Press. 1999. 936 p.
3. Калитка В. В., Донченко Г. В. // Укр. биохим. журн. 1995. **67**, № 2. С. 80–85.
4. Колесніков М. О., Калитка В. В. // Укр. біохім. журн. 2002. **74**, № 2. С. 123–127.
5. Данченко О. О., Калитка В. В. // Там само. С. 69–72.
6. Рахманов А. И., Бессарабов Б. Ф. Фазановые: содержание и разведение. М.: Агропромиздат, 1991. 176 с.
7. Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микологические. Справочник / Под ред. Б. И. Антонова. М.: Агропромиздат. 1991. 278 с.
8. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах М.: Наука. 1972. 252 с.
9. Методы исследования липидов в организме и тканях животных. Метод. указания. Львов. 1983. 22 с.
10. Двинская Л. М. Жирорастворимые витамины и методы их определения в биологических субстратах. Боровск. 1979. 89 с.
11. Королюк М. А., Иванова А. И., Майорова И. Т., Токарев В. Е. // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
12. Гаврилова О. Г., Хмара П. Ф. // Там же. 1986. № 12. С. 712–723.
13. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. // Там же. 1983. № 10. С. 30–33.
14. Lowry O. N., Rosenbrough N. V., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. **193**, № 1. P. 265–275.
15. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 352 с.
16. McCord I. M. // N. Engl. J. Med. 1985. **312**. P. 159–164.
17. Brown G. C. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. **1411**. P. 351–369.
18. Кашулина А. П., Сотникова Е. И. // Медицинская консультация. 1996. № 2. С. 20–25.
19. Гомбоева С. Б., Гесслер Н. Н., Шумаев К. Б. и др. // Биохимия. 1998. **63**, № 2. С. 224–229.
20. Дудник Д. Б., Тихадзе А. К. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1981. **91**, № 4. С. 452–455.
21. Koul A., Khanduja K., Koul J. et al. // J. Clin. Biochem. Nutr. 1989. **6**, N 1. P. 21–23.

Отримано 04.03.2004