

**ВПЛИВ ЛІКОПЕНУ НА АКТИВНІСТЬ ГЛІКОЗИДАЗ АПІКАЛЬНОЇ
МЕМБРАНИ АБСОРБЦІЙНИХ ЕНТЕРОЦИТІВ КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ
В ОНТОГЕНЕЗИ**

*А.О. Бугай, кандидат ветеринарних наук, докторант**

Досліджено кінетичні параметри α -глюкозидази та сахароза- α -глюкозидази апікальної мембрани абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів в онтогенезі за впливу лікопену. Дія лікопену на глікозидази щитінкової облямівки ентероцитів порожньої кишки характеризується підвищенням V_{max} , зниженням уявної K_m та незначним впливом субстрату на уявну K_i . Отримані дані передбачають інтенсифікацію процесів пристінкового травлення вуглеводів за впливу лікопену та розширюють уявлення про механізм його дії.

***Ключові слова:** курчата-бройлери, абсорбційні ентероцити, плазмолема, α -глюкозидаза, сахароза- α -глюкозидаза, ферментативна кінетика, константа Міхаеліса.*

Енергетичне забезпечення життєвих функцій сільськогосподарської птиці залежить від інтенсивності надходження до їх організму вуглеводів. Лімітуючим фактором у цьому процесі є активність мембранозв'язаних глікозидаз, які забезпечують субстратом транспортери моносахаридів і опосередковано активують панкреатичну α -амілазу шляхом зменшення вмісту дисахаридів у порожнині тонкої кишки. Основними глікозидазами апікальної мембрани (АМ) ентероцитів порожньої кишки є α -глюкозидаза (КФ 3.2.1.20, α -D-глюкозид глюкогідролаза) і сахароза- α -глюкозидаза (КФ 3.2.1.48, сахароза- α -D-глюкогідролаза), яка входить до складу двох комплексів – мальтаза-глюкоамілаза (МГАМ) та сахароза-ізомальтаза (СИ),м і є мішенню ряду регуляторних агентів, у т.ч. й аліментарних [1–4].

* Науковий консультант – академік НААН України, доктор біологічних наук, професор М.І. Цвіліховський

Лікопен – один з біологічно найактивніших каротиноїдів, тому інтенсивно досліджується його вплив на організм людини і тварин з перспективою практичного застосування. Проте нині майже не встановлені механізми дії лікопену на тканинному, клітинному і молекулярному рівнях. Особливо це стосується однієї з перших мішеней впливу лікопену – абсорбційних ентероцитів порожньої кишки. Результати проведених нами раніше досліджень показали інтенсифікацію енергетичних процесів в організмі курчат-бройлерів і підвищення функціонального стану слизової оболонки порожньої кишки за дії лікопену [5–7]. Це наводить на думку про можливість певних змін у функціонуванні α -глюкозидази і сахароза- α -глюкозидази плазмолем кишкових епітеліоцитів курчат-бройлерів за впливу лікопену, що потребує подальших досліджень для розкриття окремих ланок у механізмі дії цієї речовини на організм сільськогосподарської птиці.

Мета роботи – дослідити кінетичні параметри α -глюкозидази і сахароза- α -глюкозидази апікальної мембрани абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів в онтогенетичному аспекті за дії лікопену.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводили на кафедрі терапії і клінічної діагностики Національного університету біоресурсів і природокористування України та на кафедрі фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин Дніпропетровського державного аграрного університету в травні-липні 2009 р.

Для дослідження використовували курчат-бройлерів кросу Конкурент-3 14-, 21-, 28-, 35- і 42 – добового віку. Птицю утримували в клітках з 1-добового віку на збалансованому за поживними речовинами раціоні, який змінювався згідно з технологічним графіком.

Курчатам дослідної групи, починаючи з 5-добового віку, щодоби перорально вводили розчин лікопену в соняшниковій олії (кількість від 0,1 до 0,5 мл) у встановленій оптимальній дозі. Курчатам контрольної групи аналогічним шляхом вводили соняшкову олію. Лікопен отримували методом екстракції органічними розчинниками рослинної сировини (плодів фізалісу і

томату). Екстракт концентрували і очищували від супутніх каротиноїдів (каротини, фітоїн, фітофлуїн тощо) на колонці з оксидом алюмінію в системі “гептан-бензол” у співвідношенні 9:1 (за об’ємом). Очищена фракція лікопену мала червоний колір і максимум поглинання світла в гексані при λ 446, 470 і 506 нм.

Отримання абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів проводили хімічним (ЕГТА/цитрат) методом [8]. Для цього порожню кишку відділяли від брижі, визначали її загальну довжину, знаходили середину, від неї відміряли рівновіддалені точки у краніальному та каудальному напрямках і відрізали її третину. Потім її розрізали на фрагменти по 2-3 см та розтинали вздовж. Підготовлені відрізки порожньої кишки інкубували 20 хв у розчині такого складу (мМ): NaCl – 80; KH_2PO_4 – 3; тріс-НСl – 20; манніт – 37; ЕГТО – 0,1; натрію цитрат – 27; сироватковий альбумін – 1 мг/мл при 37°C , рН 7,4 (співвідношення середовище інкубації:кишечник – 2 мл/г). Після завершення інкубації ізольовані клітини середовища осаджували центрифугуванням впродовж 3 хв при 500 g з дворазовим промиванням розчином інкубації. Життєздатність отриманих абсорбційних ентероцитів була не нижче 95 %.

Апікальні мембрани (АМ) абсорбційних ентероцитів отримували диференційним центрифугуванням [9]. Суспензію ізольованих абсорбційних ентероцитів гомогенізували за допомогою ножового гомогенізатора MPW-302 (Польща) при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об/хв впродовж 30 с у середовищі такого складу (мМ): 100 манніт, 2 Нерес-тріс, рН = 7,1. Співвідношення об’єм середовища:маса суспензії клітин становило 100/15. Ступінь гомогенізації контролювали за допомогою світлової мікроскопії в мазках пофарбованих за Романовським-Гімза, при збільшенні у 1000 разів. Критерієм якості гомогенізації були: наявність незруйнованих клітин (недостатня гомогенізація) чи відсутність вираженого осаду при центрифугуванні (10 тис.g) гомогенату (надмірна гомогенізація). З метою осадження субклітинних органел та грубих мембранних фракцій гомогенат центрифугували при 10 тис.g упродовж 15 хв. Для отримання осаду АМ

одержаний супернатант центрифугували при 30 тис. g впродовж 30 хв. Осади мембранних фракцій ресуспендували в розчині такого складу (мМ): 300 манніт, 20 Нерес-тріс, 0,1 MgSO₄, рН = 7,4.

У мембранних препаратах визначали вміст загального білка за методом Лоурі [10], мальтазну та сахаразну активність АМ абсорбційних ентероцитів – за методом Далквіста [11], детекцію вивільненої в результаті реакції глюкози – фотометрично (при λ 525 нм) з використанням глюкозооксидази.

При дослідженні кінетичних параметрів глікозидаз визначали максимальну швидкість ферментативної реакції (V_{\max}) та розраховували уявну константу Міхаеліса (K_m) за рівнянням Міхаеліса-Ментен. Уявну константу інгібування ферменту субстратом (K_i) визначали за методом Діксона з використанням, як інгібітора, додаткової кількості субстрату в кількості від 50 до 250 мМ.

При статистичній обробці результатів досліджень застосували пакети програм Excel-97 і Statistica 6.0. Значення показника коефіцієнта кореляції r дорівнювало 0,9-0,99.

Результати досліджень. Активність мальтази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів знижувалась більше ніж у 2,0 рази ($p < 0,05$) з 14-ї до 42-ї доби їх вирощування. При цьому відмічається період підвищення V_{\max} α -глюкозидази з 14-ї до 21-ї діб вирощування курчат-бройлерів на 14% ($p < 0,05$) і період поступового зниження цього показника з 21-ї до 42-ї доби – в 2,3 рази ($p < 0,05$) (табл. 1). Найбільш виражене зниження активності α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів встановлено з 28-ї до 35-ї доби – у 1,8 рази ($p < 0,05$), що вказує на зниження інтенсивності засвоєння аліментарних вуглеводів.

Ймовірно, описана динаміка активності α -глюкозидази перебуває в причинно-наслідкових відношеннях зі зниженням метаболічного статусу курчат-бройлерів, описаних у попередніх наших роботах [5–8].

Проведені нами дослідження вказують на інтенсифікацію процесів пристінкового травлення вуглеводів у порожній кишці курчат-бройлерів за дії лікопену. Так, в АМ абсорбційних ентероцитів 14-добових курчат-бройлерів

дослідної групи, порівняно з контрольною, встановлено підвищення V_{\max} α -глюкозидази на 15% ($p < 0,05$). Вікова динаміка мальтазної активності АМ абсорбційних ентероцитів курчат-бройлерів дослідної групи, як і контрольної, характеризувалася зниженням у 2,14 раза ($p < 0,05$). При цьому встановлено період підвищення показника активності α -глюкозидази в період з 14-ї до 28-ї доби вирощування курчат-бройлерів на 20% та зниження активності цього ферменту з 28-ї доби у 2,6 раза ($p < 0,05$). Слід зазначити, що впродовж всього періоду вирощування активність α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів була вищою в досліді: максимально – в 1,5 раза ($p < 0,05$) у 28-добової птиці та мінімально - на 7% ($p < 0,05$) у 42-добових курчат. Це вказує на ефективніший гідроліз мальтози і забезпечення відповідних транспортерів глюкозою за дії лікопену.

1. Максимальна швидкість активності мальтази та сахарози в АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів впродовж їх вирощування за дії лікопену, $\text{нмоль} \times (\text{с} \times \text{мг})^{-1}$, $M \pm m$, $n=4$

Вік, діб	V_{\max} мальтази		V_{\max} сахарози	
	контроль	дослід	контроль	дослід
14	111,80±2,06	128,48±4,70*	12,65±0,12	17,23±0,05*
21	127,38±2,74	141,60±3,17*	12,58±0,06	17,95±0,06*
28	103,53±2,58	154,30±2,93*	12,75±0,09	15,23±0,05*
35	67,40±2,44	77,88±2,54*	11,65±0,06	13,90±0,04*
42	56,40±2,30	60,05±1,36*	11,30±0,07	13,19±0,04*

* $p < 0,05$ - дані вірогідні між показниками контрольної і дослідної груп курчат-бройлерів одного віку

Вікова динаміка показника V_{\max} сахароза- α -глюкозидази, іншого мембранозв'язанного ферменту АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів, мала аналогічний характер, що і описаний для α -глюкозидази, проте менш виражений. Так, активність сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів знижувалася від 14-ї до 42-ї доби їх вирощування на 11% ($p < 0,05$) (див. табл. 1) і не мала періодів зростання. Найвираженіше зменшення V_{\max} сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів курчат-бройлерів встановлено з 28-ї до 35-ї доби їх вирощування – на 9% ($p < 0,05$).

Використання лікопену призводило до підвищення порівняно з контролем V_{\max} сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки 14-добових курчат-бройлерів на 36% ($p < 0,05$). Максимальна активність сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів курчат-бройлерів дослідної групи, як і в контролі, характеризувалася зниженням у 1,3 раза ($p < 0,05$). При цьому встановлено період підвищення цього показника – з 14-ї до 21-ї доби вирощування на 4% ($p < 0,05$) та період подальшого його зниження до 42-ї доби вирощування птиці в 1,4 раза ($p < 0,05$). Впродовж всього періоду вирощування курчат-бройлерів, V_{\max} сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів була вищою в досліді: максимально – в 1,4 раза ($p < 0,05$) у 21-добової птиці та мінімально – на 17% ($p < 0,05$) у 42-добових курчат.

Одержані дані характеризують такі особливості впливу лікопену на V_{\max} мембранозв'язаних глікозидаз АМ абсорбційних ентероцитів. По-перше, це підвищення вказаного показника як для α -глюкозидази, так і для сахароза- α -глюкозидази порівняно з контролем. По-друге, онтогенетична динаміка V_{\max} сахароза- α -глюкозидази значною мірою подібна до вікової динаміки максимальної активності α -глюкозидази, чого не встановлено в контролі.

Особливу увагу необхідно приділити підвищенню активності сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів дослідної групи, порівняно з контролем, що вказує на зростання експресії комплексу СІ в ракурсі трофічної специфіки цієї птиці. Відомо, що основним вуглеводом кормів курей є крохмаль, тоді як вміст сахарози в них дуже незначний. Тому, комплекс СІ не відіграє важливої ролі в процесах травлення вуглеводів у курей. У той же час, у роботах багатьох дослідників показано експресію СІ АМ лише в диференційованих зрілих ентероцитах, причому паралельно з іншими ферментами, наприклад, фосфоліпаза А/лізофосфоліпаза, лужна фосфатаза, лактаза, набір яких зумовлює високу спеціалізацію та диференціацію абсорбційних ентероцитів [1, 15–18]. Очевидно, одним з цих ферментів є і комплекс МГАМ, оскільки вище вказувалась значна схожість онтогенетичної динаміки активності мальтази і сахарози АМ абсорбційних

ентероцитів курчат-бройлерів за дії лікопену. Вказані факти, на нашу думку, є ключовими щодо формування гіпотетичних уявлень про механізм дії лікопену на генетичний апарат клітин у період їх фізіологічної діяльності на прикладі ентоцитів порожньої кишки курчат-бройлерів.

За даними багатьох дослідників основним фактором, який впливає на онтогенетичну програму експресії СІ та інших ферментів диференційованих абсорбційних ентоцитів, є взаємодія комплексу промоторних елементів з такими факторами транскрипції, як Cdx1 і Cdx2, GATA-4 та HNF-1 α [15–19]. Також доведено, що HNF-1 α відіграє визначальну роль в експресії альбуміну, ферментів вуглеводного метаболізму, біосинтезу ліпідів і підвищення інтенсивності транспорту глюкози в гепатоцитах [20]. Слід зазначити, що раніше проведені нами дослідження щодо впливу лікопену на показники функціонального стану печінки показали схожі результати [5–8]. Тому, можна припустити, що лікопен або утворені в ентоцитах його метаболіти, можуть взаємодіяти з HNF-1 α , що сприятиме посиленню транскрипції ряду ферментів абсорбційних клітин.

Існує думка, що філогенетично СІ та МГАМ є продуктами одного гена-попередника, оскільки вказані ензими транскрибуються у вигляді єдиного комплексу мальтаза-ізомальтаза [1]. При подальшій модифікації утворюються дві основні глікозидази абсорбційних ентоцитів. Тому ми вважаємо, що співвідношення між активністю α -глюкозидази і сахароза- α -глюкозидази може характеризувати баланс і взаємозв'язок у синтезі СІ та МГАМ.

Так, вікова динаміка індексу V_{\max} α -глюкозидази / V_{\max} сахароза- α -глюкозидази в АМ абсорбційних ентоцитів порожньої кишки курчат-бройлерів характеризувалася зниженням у 1,8 раза ($p < 0,05$) що вказує на відносно більше зниження експресії α -глюкозидази порівняно з сахароза- α -глюкозидазою (рис. 1). Зважаючи на трофічну специфіку курей, відмічений феномен підтверджує вікове зниження функціонального статусу порожньої кишки курчат-бройлерів. При цьому встановлено період підвищення індексу V_{\max} α -глюкозидази / V_{\max} сахароза- α -глюкозидази від 14-ї до 21-ї доби

вирощування курчат-бройлерів на 13% ($p < 0,05$) і період зниження цього показника від 21-ї до 42-ї доби в 1,6 раза ($p < 0,05$).

За дії лікопену в АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки 14-добових курчат-бройлерів дослідної групи порівняно з контролем встановлено зниження співвідношення активності α -глюкозидази та сахароза- α -глюкозидази на 16% ($p < 0,05$). Абсолютні показники V_{\max} як α -глюкозидази, так і сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів дослідної групи цього віку вказують на переважну експресію α -глюкозидази та інтенсивніші процеси пристінкового гідролізу дисахаридів.

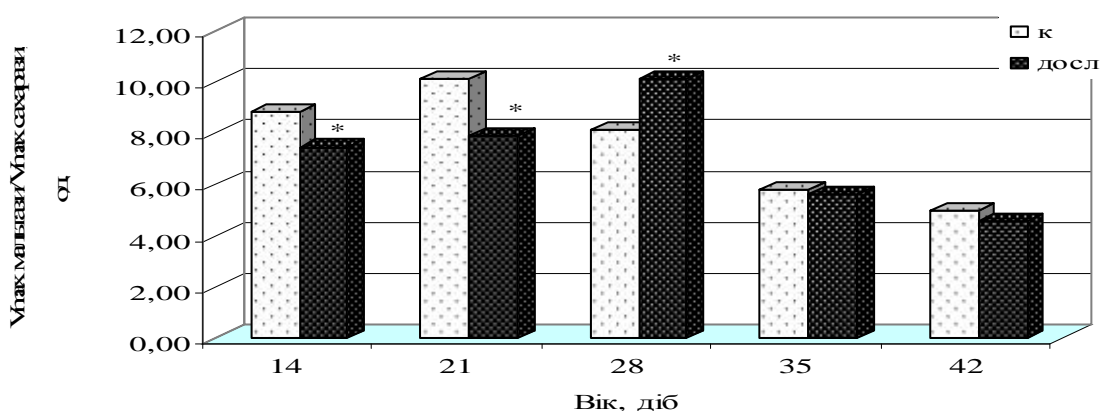


Рис 1. Співвідношення між V_{\max} α -глюкозидази і V_{\max} сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів впродовж їх вирощування за дії лікопену.

* $p < 0,05$ - дані вірогідні між показниками контрольної і дослідної груп курчат-бройлерів одного віку

Вікова динаміка індексу V_{\max} α -глюкозидази / V_{\max} сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів за дії лікопену характеризувалася зниженням у 1,6 раза ($p < 0,05$). Встановлено, що в період від 14-ї до 28-ї доби підвищувався цей показник у 1,4 раза ($p < 0,05$), а від 28-ї до 42-ї доби – знижувався у 2,2 раза ($p < 0,05$). Слід зазначити, що з різним ступенем вірогідності цей коефіцієнт був нижчим за контроль, що вказує на значну частку експресії сахароза- α -глюкозидази і передбачає вищий ступінь диференціації абсорбційних ентероцитів.

K_m є одним з найважливіших ензиматичних характеристик, оскільки відображає міру спорідненості субстрату та ферменту. Оскільки нині немає даних щодо наявності ізозимів α -глюкозидази і сахароза- α -глюкозидази, то

основними факторами, які зумовлюють величину K_m , є концентрація субстрату і продукту реакції, взаємодія ферменту з мембранними ліпідами і білками, локальні зміни рН тощо.

Дія лікопену призводить до певних змін кінетики мальтазної та сахаразної реакцій в АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки 14-добових курчат-бройлерів (рис. 2).

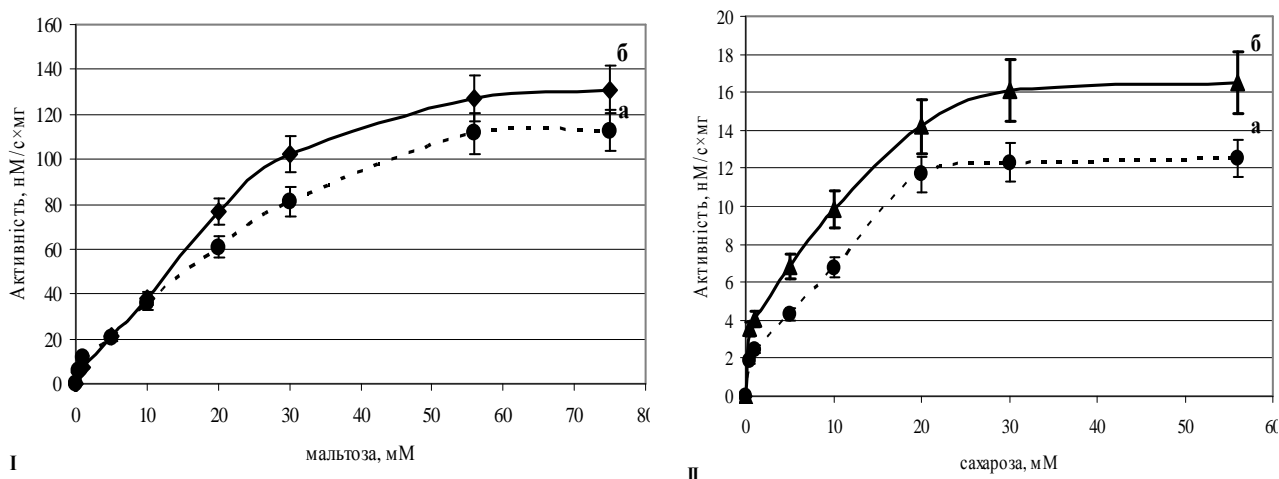


Рис. 2. Кінетика гідролізу мальтози α -глюкозидазою (I) і сахарози сахараза- α -глюкозидазою (II) АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки 14-добових курчат-бройлерів за дії лікопену: а – контрольна група, б – дослідна група.

Характерною особливістю дії лікопену на кінетичні параметри мальтази та сахарози АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів є зменшення уявної K_m на 8-60%, що вказує на досягнення максимальної швидкості ферментативної реакції за нижчих концентрацій субстрату. Поряд зі встановленими вищими порівняно з контролем значеннями V_{max} , отримані дані підтверджують передбачення щодо інтенсифікації процесів пристінкового травлення дисахаридів у порожній кишці курчат-бройлерів за дії лікопену.

Вікова динаміка уявної K_m α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів характеризується зниженням від 14-ї до 42-ї діб їх вирощування у 2,7 раза ($p < 0,05$) (рис. 3). При цьому відмічено період підвищення цього показника з 14-ї до 28-ї діб – на 15% ($p < 0,05$) і період різкого зниження – з 28-ї до 42-ї доби – у 3,1 раза ($p < 0,05$). цю тенденцію можна

вважати компенсаторною, з огляду на онтогенетичне зниження V_{\max} α -глюкозидази, що запобігає різкому зменшенню забезпечення глюкозних транспортерів АМ абсорбційних ентероцитів субстратом. Ми не виключаємо значний вплив вікових змін активності панкреатичної α -амілази, яка забезпечує глікозидази АМ ентероцитів відповідними субстратами, на встановлену онтогенетичну динаміку активності α -глюкозидази АМ.

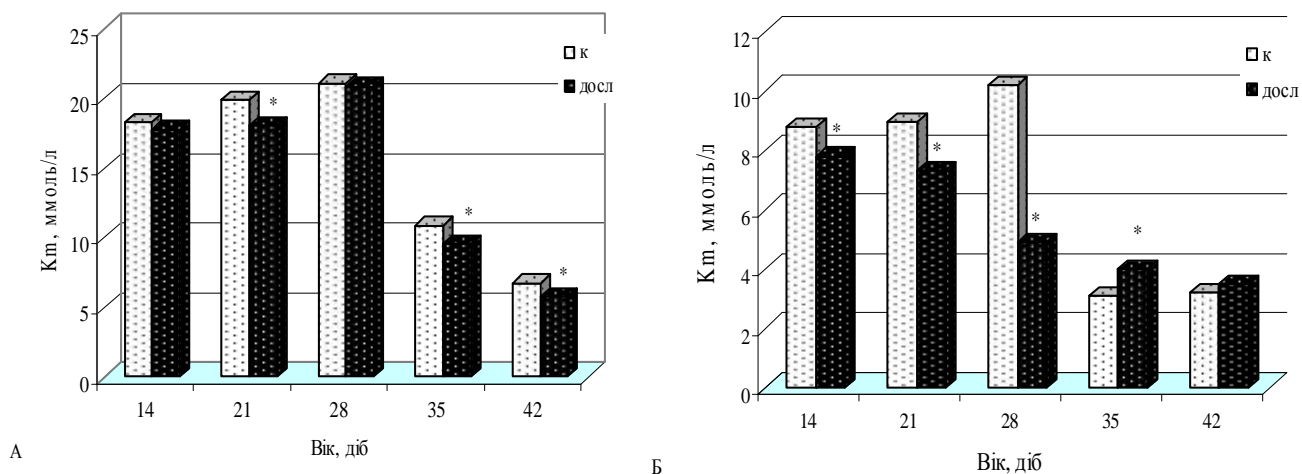


Рис 3. Динаміка уявної K_m для реакцій, які каталізують α -глюкозидаза (А) і сахароза- α -глюкозидаза (Б) АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів впродовж їх вирощування за дії лікопену.

Примітка: * - $P < 0,05$ - дані вірогідні між показниками контрольної і дослідної груп курчат-бройлерів одного віку

Використання лікопену 14-добовим курчатам-бройлерам не призводило до вірогідних змін уявної K_m α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порівняно з контролем. Вікова динаміка цього показника аналогічна контролю: зниження від 14-ї до 42-ї доби у 2,9 раза ($p < 0,05$), зростання – від 14-ї до 28-ї дб – у 1,24 раза ($p < 0,05$) і період значного зниження – від 28-ї до 42-ї дб - у 3,6 раза ($p < 0,05$). Тобто, впродовж всього періоду дослідження, уявна K_m α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів курчат-бройлерів за дії лікопену нижча за контроль з різним ступенем вірогідності.

Онтогенетична динаміка уявної K_m сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів подібна до динаміки уявної K_m α -глюкозидази і характеризується зниженням від 14-ї до 42-ї доби їх вирощування у 2,7 раза ($p < 0,05$) (див. рис. 3). При цьому також

встановлено зростання показника – від 14-ї до 28-ї доби – на 17% ($p < 0,05$) і значне його зниження від 28-ї до 42-ї доби – у 3,2 рази ($p < 0,05$), що аналогічно відміченій динаміці α -глюкозидази. Ми вважаємо, що описана тенденція зумовлена дією факторів, які впливають на просторову конформацію мембранозв'язаних глікозидаз, особливо таких, як зміни локального рН на поверхні плазмолем та (або) зміни її ліпідного складу.

За дії лікопену встановлено зниження уявної K_m сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки 14-добових курчат-бройлерів порівняно з контролем на 11% ($p < 0,05$). Вікова динаміка цього показника також характеризується зниженням від 14-ї до 42-ї доби вирощування птиці – у 2,2 рази ($p < 0,05$). При цьому уявна K_m сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів знижується вже з 14-ї доби і не відмічається періоду підвищення цього показника. Чітке пояснення отриманих нами результатів потребує подальших досліджень.

Досить показовим кінетичним параметром ферментів є уявна константа інгібування (K_i) субстратом. Найчастіше цей параметр, який характеризує їх асоціативну взаємодію з іншими ензимами, відображає інтенсивність тих чи інших ферментативних процесів на певному метаболічному шляху.

Вікова динаміка уявної K_i α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів характеризується поступовим зниженням від 14-ї до 42-ї доби вирощування у 1,3 рази (табл. 2). Це може бути зумовлено зменшенням інтенсивності утворення мальтози в амілазній реакції, що підтверджується віковим зниженням функціонального стану порожньої кишки курчат-бройлерів.

Застосування лікопену призводить до збільшення на 17% ($p < 0,05$) уявної K_i α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки 14-добових курчат-бройлерів дослідної групи порівняно з контролем, що підтверджує наше передбачення щодо стимуляції лікопеном травних процесів на поверхні плазмолем абсорбційних ентероцитів.

Вікова динаміка уявної K_i α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів також характеризується зниженням від 14-ї до 42-ї доби вирощування курчат-бройлерів у 1,5 раза, внаслідок чого різниця цього показника між контролем та дослідом стає невірною.

2. Уявна константа інгібування (K_i) субстратом мальтазної і сахаразної реакцій в АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів впродовж їх вирощування за дії лікопену, мм, $M \pm m$, $n=4$.

Вік, діб	K_i α -глюкозидази		K_i сахараза- α -глюкозидази	
	контроль	дослід	контроль	дослід
14	75,30±3,62	88,48±3,88*	93,55±3,79	93,43±3,48
21	71,63±3,07	81,15±3,92	88,25±3,75	72,35±3,89*
28	70,08±3,45	61,80±3,85	89,10±4,47	65,30±2,45*
35	57,93±2,38	59,75±3,67	81,80±3,53	64,10±2,51*
42	57,25±3,07	59,00±2,55	59,45±3,53	65,90±3,84

* $p < 0,05$ - дані вірогідні між показниками контрольної і дослідної груп курчат-бройлерів одного віку

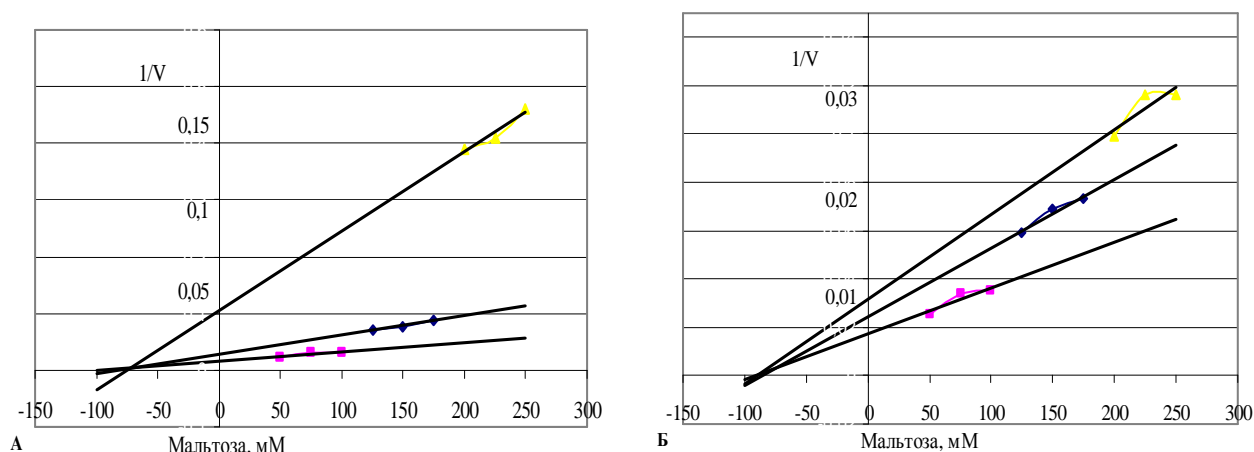


Рис. 4. Визначення уявної K_i мальтозою α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки 14-добових курчат-бройлерів. Значення типового експерименту.

А – показник контрольної групи. $K_i=77,2$ мМ.

Б – показник дослідної групи. $K_i= 87,4$ мМ

Вікова динаміка уявної K_i сахараза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів характеризувалася від 14-ї до 42-ї діб вирощування зниженням у 1,6 раза ($p < 0,05$). Оскільки сахароза не є продуктом амілазної реакції, отримані дані, ймовірно, можуть свідчити про зниження трансмембранного переносу моносахаридів.

За дії лікопену не встановлено вірогідних змін уявної K_i сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки 14-добових курчат-бройлерів. Проте динаміка цього показника у курчат від 14-ї до 42-ї доби характеризувалася більш вираженим зниженням, ніж в контролі, і дорівнювала 1,42 раза ($p < 0,05$). При цьому уявна K_i сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів дослідної групи є нижчою за контроль з 21-ї до 35-ї діб вирощування на 18-27% ($p < 0,05$). Відмічений феномен потребує подальших детальних досліджень, особливо з огляду на вказане підвищення K_i α -глюкозидази.

Висновки. Вікова динаміка кінетичних параметрів α -глюкозидази і сахароза- α -глюкозидази АМ абсорбційних ентероцитів курчат-бройлерів характеризується зниженням V_{max} з одночасним підвищенням спорідненості відповідних ферментів і субстратів, а також зниженням уявної K_i .

Застосування лікопену курчатам-бройлерам не впливає на загальну тенденцію вікової динаміки кінетичних параметрів α -глюкозидази і сахароза- α -глюкозидази, проте призводить до підвищення V_{max} , зниження K_m і відсутності значних змін K_i .

На основі отриманих результатів передбачається інтенсифікація процесів пристінкового травлення вуглеводів у порожній кишці курчат-бройлерів. Ці дані, разом з результатами наших попередніх досліджень, дають змогу розширити уявлення про механізм дії лікопену і ставлять перспективні завдання щодо досліджень механізму дії лікопену на промоторні елементи і фактори експресії.

Список літератури

1. Galang, G. Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications / G. Galang// Comp. Biochem. Physiol. B. – 1989. – 94. – P. 1-11.

2. Gupta, S. Effect of Na⁺ ions on pH-dependent conformational changes in brush border sucrase-isomaltase in mice intestine / S. Gupta, S. Mahmood, H. Khan et al. // Indian. J. Biochem. Biophys. – 2008. – 45. – P. 399-403.
3. James, P. Epidermal growth factor selectively increases maltase and sucrase activities in neonatal piglet intestine / P. James., M. Smith, D. Tivey et al. // J. Physiol. – 1987. – 393. – P. 583-594.
4. Kaushal, N. Modulations in the intestinal disaccharide hydrolases and membrane dynamics: effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs aspirin and nimesulide / N. Kaushal, S. Sanyal // Mol. Cell. Biochem. – 2007. – 294. – P. 107-115.
5. Бугай, А. Вплив лікопену на гематологічні показники курчат-бройлерів / А. Бугай, М. Цвіліховський // Науковий вісник ЛНАВМтБТ ім. С.З. Гжицького. – 2009. – Т. 11, 4 (39), Ч. 2. – С. 22-29.
6. Бугай, А. Вплив лікопену на біохімічні показники крові та ріст курчат-бройлерів / А. Бугай // Науковий вісник ЛНАВМтБТ ім. С.З. Гжицького. – 2008. – Т. 10, 3 (38), Ч. 2. – С. 14-19.
7. Бугай, А. Фосфоліпідний склад печінки курчат-бройлерів за дії лікопену / А. Бугай // Науковий вісник БДАУ. – 2009. – 60, Ч. 2. – С. 14-19.
8. Бугай, А. Отримання апікальних та базолатеральних мембран абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів для вивчення транспортних властивостей плазмолемі / А. Бугай // Науковий вісник ЛНАВМтБТ ім. С.З. Гжицького. – 2009. – Т. 12, 5 (40), Ч. 2. – С. 27-33.
9. Бугай, А. Отримання ізольованих абсорбційних ентероцитів порожньої кишки курчат-бройлерів для вивчення транспортних властивостей плазмолемі / А. Бугай, М. Цвіліховський // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: Збірник наукових праць ХДЗВА. – 2009. – 20, Ч. 2, Т. 2. – С. 57-67.
10. Lowry, O. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. Lowry, N. Rosenbrough, J. Randal // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.

11. Dahlquist, A. Method for assay of intestinal disaccharidases / A. Dahlquist // *Anal. Biochem.* – 1964. – 7. – P. 18-25.
12. Barfull, A. Ontogenetic expression and regulation of Na⁺-D-glucose cotransporter in jejunum of domestic chicken / A. Barfull, C. Garriga, M. Mitjans // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2002. - V. 282 (3). – P. 559-564.
13. Uni, Z., Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus / Z. Uni, R. Platin, D. Sklan // *J. Comp. Physiol.* – 1998. – V. 168 (4). – P. 241-247.
14. Mizuno, K. Demonstration of sucrase-isomaltase complex in chick intestine // K. Mizuno, S. Moriuchi, N. Hosoya // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 1982. – 28. – P. 599-608.
15. Taylor, J. Comparison of intestinal phospholipase A/lysophospholipase and sucrase-isomaltase genes suggest a common structure for enterocyte-specific promoters / J. Taylor, W. Boll, T. Levy et al. // *DNA Cell Biol.* – 1997. – V. 16 – P. 1419-1428.
16. Van Wering, H. Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4 / H. Van Wering, T. Bosse, A. Musters // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2004. – 287. – P. 899-909.
17. Alkhoury, F. Differential regulation of intestinal alkaline phosphatase gene expression by Cdx1 and Cdx2 / F. Alkhoury, M. Malo, M. Mozumder et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2005. – 289. – P. 285-290.
18. Boudreau, F. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene / F. Boudreau, E. Rings, H. van Wering et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – 277 – P. 31909-31917.
19. Armendariz, A. Hepatic nuclear factor 1-alpha: inflammation, genetics, and atherosclerosis / A. Armendariz, R. Krauss // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2009. – 20. – P. 106-111.

20. Wobser H., Dominant-negative suppression of HNF-1 α results in mitochondrial dysfunction, INS-1 cell apoptosis, and increased sensitivity to ceramide-, but not to high glucose-induced cell death / H. Wobser, H. Düßmann, D. Kögel et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – 277. – P. 6413-6421.

ВЛИЯНИЕ ЛИКОПЕНА НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ АПИКАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ АБСОРБЦИОННЫХ ЭНТЕРОЦИТОВ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

А.А. Бугай, кандидат ветеринарных наук

Исследованы кинетические параметры α -глюкозидазы и сахараза- α -глюкозидазы апикальной мембраны абсорбционных энтероцитов тощей кишки цыплят-бройлеров в онтогенезе под влиянием ликопена. Действие ликопена на гликозидазы щёточной каймы энтероцитов тощей кишки характеризуется увеличением V_{max} , снижением кажущейся K_m и незначительным изменением кажущейся K_i субстратом. Полученные данные предполагают интенсификацию пристеночного пищеварения углеводов под воздействием ликопена и расширяют представления о механизме его действия.

Ключевые слова: *цыплята-бройлеры, абсорбционные энтероциты, плазмалемма, α -глюкозидаза, сахараза- α -глюкозидаза, ферментативная кинетика, константа Михаэлиса.*

LYCOPENE INFLUENCE TO BRUSH BORDER GLYCOSIDASES OF BROILER CHICKEN JEJUNAL ABSORPTIVE ENTEROCYTES DURING ONTOGENESIS

A. Bugay

SUMMARY

Kinetic parameters of α -glucosidase and sucrose α -glucosidase of brush border of broiler chicken jejunal absorptive enterocytes in ontogenesis under influence of lycopene were researched. Its action to brush border glycosidases are characterized by V_{max} increasing, K_m decreasing and non-significal changes K_i by substrates.

These researches suggest the intensification of membrane digestion by lycopene and make more knowledge about its mechanism of action.

Key words: broiler chicken, absorptive cells, plasma membrane, α -glucosidase and sucrose α -glucosidase, enzyme kinetics, Michaelis constant.