

ГЛУТАТІОН-ЗАЛЕЖНІ ЕНЗИМИ СЛІПОЇ КИШКИ ТА ПЕЧІНКИ МОРСЬКОЇ СВИНКИ ПРИ ГОСТРОМУ ОХРАТОКСИКОЗІ

О.М. ФЕДЕЦЬ, кандидат сільськогосподарських наук

Р.С. ДАНКОВИЧ, кандидат ветеринарних наук

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С.З. Гжицького, м. Львів*

Встановлено зміни концентрації GSH та активності GST, GPx і GR у слизовій оболонці сліпої кишки та в печінці морської свинки при гострому охратоксикозі. У печінці дослідних тварин вміст GSH та активність ензимів зменшились внаслідок дегенеративних змін тканини від дії токсину. У сліпій кишці показники глутатіонової системи зросли.

Ключові слова: *охратоксин, сліпа кишка, печінка, морська свинка, GSH, GST, GPx, GR.*

Перші охратоксини були описані майже півсторіччя тому [17]. До сьогодні опубліковано багато експериментальних та оглядових робіт, в яких розкриті наслідки дії на організм цього токсину. Зокрема встановлені шляхи його перетворення та виведення з організму. Сучасні дослідження спрямовані на з'ясування дії на рівні клітини та можливих механізмів знешкодження цього ксенобіотика. Охратоксини є також цікавими з огляду їх впливу на слизову оболонку шлунково-кишкового тракту у всіх його відділах, оскільки детально встановлені усі ланки їх обміну в організмі. Тому вони можуть бути використані як засіб для вивчення можливих змін у слизовій оболонці, зокрема сліпої кишки.

Метою досліджень було вивчення впливу охратоксину А (ОТА) на GSH-залежні ензими слизової оболонки сліпої кишки та печінки морської свинки

(*Cavia porcellus*).

Матеріал і методика. Дослід проводили на самках морських свинок віком 6 місяців. Тваринам дослідної групи кожного ранку 5 днів перорально вводили розчинений у NaHCO_3 ОТА у дозі 1,62 мг/кг живої маси. При заборі відбирали сліпу кишку та печінку. Сліпу кишку, промивали охолодженим фізіологічним розчином до повного очищення від її вмісту. Слизову оболонку знімали пластинкою з органічного скла. Тканини подрібнювали на гомогенізаторі Поттера-Елвегейма в 5 мМ трис-НСІ буфері (рН=7,0), який містив 5 мМ Na_2EDTA і 1 мМ фенолметилсульфанілфториду, гомогенат відцентифугували при 10 000 g. В супернатанті визначали концентрацію GSH [5], активність GPx [15], GR [6] і GST [9] та концентрацію білка [13]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням t-критерію Стьюдента [10].

Результати досліджень. Концентрація GSH у печінці морських свинок які одержували ОТА була на 21-25% меншою, ніж у контролі (таблиця). Ці дані, з виснаження GSH у тканині печінки, підтримують концепцію, що GSH залучений в апоптичний процес [2].

Вміст GSH та активність GST, GPx і GR у слизовій оболонці сліпої кишки та у печінці морської свинки при гострому охратокзикозі ($M \pm m$, n=3).

Показники	Печінка		Сліпа кишка	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
GSH, нмоль/мг білка	25,54±0,85	20,23±1,26 p<0,05	15,34±1,01	24,06±3,18 p>0,05
GSH, мкмоль/г тканини	3,62±0,12	2,73±0,17 p<0,02	0,74±0,05	0,98±0,12 p>0,05
GST, нмоль/хв×мг білка	675,5±52,15	545,5±31,55 p>0,05	20,98±1,35	33,89±2,69 p<0,02
GPx, нмоль GSH/хв×мг білка	6,65±0,89	4,40±0,65 p>0,05	-	-
GR, нмоль NADPH/хв×мг білка	25,26±1,74	18,98±1,15 p<0,05	17,49±1,52	31,54±2,92 p<0,02

Активність GST у печінці дослідних тварин під впливом ОТА знизилась на 20%. Хоча відмінності статистично не вірогідні, проте вони узгоджуються з даними літератури і загальною динамікою змін концентрації GSH та інших показників.

За даними вестернблот аналізу, в первинних гепатоцитах щура під впливом ОТА в дозі 3 та 6 мкМ знижується експресія ізоензимів GSTP1, GSTM1 та GSTA5 [7].

Хоча печінка морської свинки не використовує Se у зменшенні органічних пероксидів і GSTA2, головний чином, діє як не-Se залежна пероксидаза у печінці [11], при окисному стресі клітина включає усі можливі механізми для запобігання пошкоджень, зокрема і Se-залежну GPx.

Активність GPx в печінці морських свинок під впливом ОТА знизилась на 34%. Як і у випадку з GST різниця статистично не вірогідна. Проте ці дані узгоджуються з літературними, згідно з якими різниця в активності GPx подібна — контроль і дослід відповідно 5,32 і 3,41 U [1]. Менша активність GPx, як компонента системи антиоксидантного захисту, підтверджує наявність в печінці окисного стресу, спричиненого ОТА, який проявляє стимулюючий ефект на перекисне окиснення ліпідів. Однак цей процес є дозозалежним. Показано, що низький вміст ОТА у кормі не стимулює перекисне окиснення ліпідів. Іншим поясненням пониження ензиматичної активності може бути погіршення синтезу білка, як добре відомий ефект ОТА [3].

GR перетворює окиснену форму глутатіону (GSSG) в GSH [8]. Багато GSH залучено в утворення кон'югатів та виведення їх з клітини, тому мало залишається для GPx і, отже, мало буде GSSG, що є субстратом для GR. Активність цього ензиму у печінці дослідних морських свинок була менша на 25%.

У інших видів тварин дія ОТА на показники GSH та GSH-залежних ензимів подібна. У печінці мишей [2] концентрація GSH під впливом ОТА знизилась з 38 до 20 нмоль/мг. Рівні антиоксидантних ензимів були також значно нижчими в мишей оброблених ОТА, ніж у контролі.

При згодовуванні мишам ОТА в дозі 1,5 та 3 мг/кг живої маси, концентрація GSH знизилась із 74,63 до 34,18 та 42,45 мкг/100 мг тканини, активність GST з 51,82 до 41,33 і 24,26 U/г білка, GPx з 0,41 до 0,27 і 0,15 U/г білка, GR з 3,13 до 2,43 і 1,69 U/г білка [8].

Використання протягом семи тижнів кормів, забруднених низьким рівнем ОТА призвело до подібних змін у гомогенаті печінки поросят: GSH контроль $1,82 \pm 0,70$ ОТА $0,99 \pm 0,24$ мкмоль/г білка, GPx контроль $2,02 \pm 0,73$ ОТА $0,88 \pm 0,17$ U/г білка [3].

Вищенаведені результати власних досліджень та літературні дані свідчать про зниження у печінці дослідних тварин активності GSH-залежних ензимів та концентрації самого GSH. В той же час ці показники мали б зростати, оскільки для виведення ксенобіотиків потрібна вища активність GST, для знешкодження пероксидів потрібна GPx, активніша GR необхідна для відновлення GSSG у GSH, без якого GST та GPx не виконуватимуть свої функції. Причиною існуючих знижених показників є ураження токсином самих гепатоцитів. Некротичні зміни у печінці собак при охратоксикозі були встановлені ще у дослідях G.M.Szscech [16].

У первинних гепатоцитах щура концентрація GSH під впливом ОТА в дозі 1,5 мкМ зростає на 35%, а вже коли доза ОТА була 3 та 6 мкМ, то показник знизився відповідно на 20 і 45% [7].

За даними F.Atroshi et al. у печінці мишей під впливом ОТА спостерігається апоптоз. На його ранні стадії можуть вплинути породжені ОТА активні форми кисню та окисно-відновний стан у клітині [2]. Останній включає GSH-залежні ензими, які нейтралізують токсичну дію при малих дозах, що спостерігалось у наведених у таблиці показниках сліпої кишки.

Тому, на противагу печінці, виявлена динаміка зростання концентрації GSH та активності GSH-залежних ензимів у слизовій оболонці сліпої кишки дослідних морських свинок. Із усього ОТА, що перорально потрапляє в організм, одна частина всмоктується і потрапляє у тканини, а інша у печінці частково перетворюється у менш токсичні гідроксипохідні або кон'югати. З

печінки вони потрапляють в нирки і виводяться з сечею, або знову потрапляють в просвіт кишки, де разом із ОТА, який не засвоївся у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту, піддаються мікробній деградації у нетоксичну α -форму. І лише незначна частина ОТА, який згодували тварині, буде всмоктуватись слизовою оболонкою товстих кишок та саме тут проявляти свою цитотоксичну дію. Проте ця кількість ОТА, при дозі 1,62 мг/кг живої маси протягом 5 днів, настільки незначна, що вона лише викликає стимулюючий ефект на глутатіонову систему клітин. Тобто слизова оболонка сліпої кишки завдяки своїм захисним механізмам уникає загибелі клітин та подальшій структурній деградації. На противагу печінці тут збільшується концентрація GSH на 32-57% та статистично вірогідно зростає активність GST і GR на 62 і 80%.

Активність Se-залежної GPx у слизовій оболонці сліпої кишки морської свинки не виявлена. Lawrence & Burk не виявили активності Se-залежної GPx також і у печінці морської свинки [12]. Проте інші дослідники таку активність GPx у печінці встановили – 4,60 U/г сирової тканини [14], 57,04 U/г білка [4]. Оскільки активність GSH-залежних ензимів у печінці вища, ніж у сліпій кишці, то, можливо, активність GPx у слизовій оболонці морської свинки настільки низька, що необхідні інші чутливіші методи для її виявлення.

Висновки

1. У печінці морських свинок при гострому охратоксикозі зменшується концентрація GSH і активність GST, GPx та GR, що є наслідком деструктивних змін тканини.

2. У сліпій кишці дослідних тварин через коротку дію токсину завдяки глутатіоновій системі (показники якої на противагу печінковій тканині зростають) запускається захисний механізм, який, можливо, не допускає дегенеративних змін.

Список літератури

1. Abdel-Wahhab M.A. et al. // J.Pineal Res. - 2005. - V.38. - P.130-135.
2. Atroshi F. et al. // J.Pharm.Pharmaceut.Sci. - 2000. - V.3, N.3. - P.281-291.

3. Balogh K. et al. // Acta Vet.Hung. - 2007. - V.55, N.4. - P.463-470.
4. Bertinato J. et al. // Nutr.J. - 2007. - V.6. - P.7-15.
5. Beutler E. et al. // J.Lab.&Clin.Med., 1963. - V.61, N.5. - P. 882-888.
6. Carlberg I., Mannervik B. // J.Biol.Chem., 1975. - V.250, N.14. - P. 5475-5480.
7. Cavin C. et al. // Toxicol. Sciences.- 2007. - V.96, N.1. - P.30-39.
8. Chakraborty D., Verma R. // Int.J.Occ.Med.Env.H. - 2010. - V.23, N.1. - P.63-73.
9. Habig W.H. et al. // J.Biol.Chem., 1974. - V.249. - P. 7130-7139.
10. <http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>
11. Kamei-Hayashi K. et al. // J.Biochem. - 1993. - V.114. - P.835-841.
12. Lawrence R.A., Burk F. // J.Nutr. - 1978. - V.108. - P.211-215.
13. Lowry O.H. et al. // J.Biol.Chem. - 1951. - V.193,N.1. - P.265-275.
14. Oshino R. et al. // J.Biochem. - 1990. - V.107. - P.105-110.
15. Pirie A. // Biochem.J. - 1965. - V.96. - P. 244-253.
16. Szscech G.M. et al. // Vet.Pathol. - 1973. - V.10. - P.219-231.
17. Van der Merwe K.J. et al. // J.Chem.Soc.Perkin 1. - 1965. - V. - P.7083-7088.

ГЛУТАТИОН – ЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ СЛЕПОЙ КИШКИ И ПЕЧЕНИ МОРСКОЙ СВИНКИ ПРИ ОСТРОМ ОХРАТОКСИКОЗЕ.

О.М. Федэць, Р.С. Данкович

Установлены изменения концентрации GSH и активности GST, GPx и GR в слизистой оболочке слепой кишки и в печени морской свинки при остром охратоксикозе. В печени опытных животных содержание GSH и активность ферментов уменьшились вследствие дегенеративных изменений ткани от действия токсина. В слепой кишке показатели глутатионовой системы возросли.

Ключевые слова: охратоксин, слепая кишка, печень, морская свинка, GSH, GST, GPx, GR.

The changes in the concentration of GSH and activity of GST, GPx and GR in the mucosa of cecum and in the liver of guinea pig with acute ochratoxicosis have been detected. In liver the content of GSH and activity of enzymes decreased due to degenerative changes. The components of GSH system increased in cecum.

Key words: ochratoxin, cecum, liver, guinea pig, GSH, GST, GPx, GR.