

ВПЛИВ L-ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ НА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛУТАТІОНУ ТА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПЕРОКСИДНИХ ПРОЦЕСІВ У ЩУРІВ

Н. Салига, Ю. Салига

*Інститут біології тварин НААН України
вул. Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: unosyt@yahoo.com*

Вивчено вплив додаткового (10% і 25% відповідно) введення до раціону L-глутамінової кислоти (L-Glu) на активність антиоксидантних ензимів та інтенсивність пероксидних процесів у тканинах мозку й серця щурів. Встановлено, що збагачення раціону щурів L-Glu протягом 30 діб призводило до змін активності глутатіонової ланки антиоксидантного захисту й інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів. Показано, що додаткове введення тваринам L-Glu призводить до підвищення глутатіонпероксидазної активності, вмісту відновленого глутатіону та зниження вмісту гідропероксидів ліпідів і ТБК-активних продуктів у тканинах серця, порівняно з контрольною групою тварин. Вагоміші зміни даних показників спостерігались у тварин другої дослідної групи, які отримували додатково 25% L-Glu до раціону.

Ключові слова: L-глутамінова кислота, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, відновлений глутатіон, гідропероксили ліпідів, ТБК-активні продукти.

Найважливішими регуляторними метаболітами захисно-адаптивних систем організму є або самі амінокислоти, або їхні похідні. Амінокислоти можуть бути не тільки пластичним матеріалом для біосинтезу різних білків організму, що визначають його специфічність, але і, включаючись у регуляторні й антиоксидантні системи, визначати його неспецифічну резистентність.

Глутамінова кислота займає одне з провідних місць в обміні речовин, тому що здатна зв'язувати неорганічний Нітроген, переносячи його на інші амінокислоти за рахунок реакції переамінування. L-Glu є однією з основних енергетичних складових усіх тканин [10]. Ензими, залучені у метаболізм цієї амінокислоти, займають центральне місце в амінокислотному обміні. Слід зазначити, що реакції синтезу глутамінової кислоти і глутаміну є одним із важливих механізмів знешкодження надлишків аміаку в організмі [8, 9, 11]. L-Glu має надзвичайно широку біологічну активність і має важливе значення в адаптації організму до пошкоджуючих впливів, перш за все, за рахунок спряження енергетичного обміну з пластичним. У той же час L-Glu є імуномодулятором, який стимулює лімфоїдну систему організму, кровотворення у кістковому мозку при анемії [6]. Вона нормалізує порушені функції ендокринної системи, відновлює функцію мітохондрій при екстремальних впливах на організм, модулює експресію цитохрому P-450 шляхом вироблення гормону росту.

Крім того, глутамінова кислота використовується як сировина для антиоксиданту – глутатіону (який синтезується з глутамінової кислоти, цистеїну і гліцину). Протягом останніх років дедалі більший інтерес приділяється функції глутатіону, який, завдяки своїй унікальній будові, виконує численні функції в більшості живих організмів. Він є досить потужним відновником. У результаті цього відновлена форма глутатіону (γ -глутамілцистеніл-гліцин) ефективно розщеплює пероксили, що утворюються як за нормальних умов, так і за умов оксидативного стресу [2, 5, 12]. Амінокислоти, що входять до складу

глутатіону, можуть бути попередниками інших потужних антиоксидантних субстратів. Так, глутамінова кислота є ефективним стимулятором біосинтезу аргініну і сечовини в печінці. Метаболізуючись в орнітин, глутамінова кислота слугує попередником поліамінів. Введення експериментальним тваринам глутатіону або компонентів, з яких складається цей трипептид, зокрема, глутамінової кислоти, – частково або повністю запобігає розвитку окисного стресу під впливом ксенобіотиків.

Викладене дає підстави зробити висновок, що глутамінова кислота може розглядатись як адаптоген широкого спектра дії та що зміни її обміну тісно пов'язані зі зміною рівня глутатіону в тканинах, а отже, з антиоксидантними і детоксикаційними ресурсами.

У зв'язку з вищесказаним метою нашої роботи було дослідити стан ензимів глутатіонової ланки системи антиоксидантного захисту і вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у тканинах мозку та серця щурів за умов додаткового введення L-глутамінової кислоти до раціону.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200–220 г, які були розділені 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) відповідно (1 раз на добу, перорально). Застосовані дози визначали з розрахунку кількості сирого протеїну, який тварина отримувала з кормом. Таким чином, тварини першої дослідної групи отримували додатково 10% глутамінової кислоти від вмісту білка в кормі, тварини другої дослідної групи отримували додатково 25% глутамінової кислоти від вмісту білка в кормі. Щурам контрольної групи упродовж 30-ти днів перорально вводили відповідну кількість дистильованої води. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Після закінчення дослідів тварин усіх груп за анестезії ефіром декапітували. Для аналізу відбирали зразки тканин головного мозку та серця. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики, законодавчих норм і 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).

У тканинах мозку та серця визначали вміст ТБК-активних продуктів [4], концентрацію гідропероксидів ліпідів, вміст відновленого глутатіону, глутатіонпероксидазну активність, глутатіонредуктазну активність [1].

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

Результати і їхнє обговорення

Однією з важливих систем інактивації вільних радикалів є відновлений глутатіон (GSH) і комплекс ензимів – глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонтрансферази (ГТ) та глутатіонредуктази (ГР). Глутатіон (L-Глутаміл, L-Цистеїн, Гліцин) — трипептид, присутній у всіх клітинах тварин і людини. Внутрішньоклітинний пул глутатіону включає в себе його відновлену й окислену форми, змішані дисульфіди, тіоефіри [2, 3, 14]. Завдяки наявності глутамільного зв'язку та реактивної сульфгідрильної групи глутатіон бере участь у численних реакціях метаболізму, забезпечуючи тим самим нормальний перебіг ряду фізіологічних і біохімічних процесів. GSH синтезується в печінці, звідки транспортується в різні органи і тканини [7, 13, 15]. Дослідженнями виявлено (рис. 1), що у щурів першої

та другої дослідних груп вміст відновленого глутатіону достовірно зростав у тканинах серця (на 27 та 69% відповідно), виявляв тенденцію до збільшення у тканинах мозку тварин другої дослідної групи та майже не змінювався у тварин першої дослідної групи, порівняно з контролем.

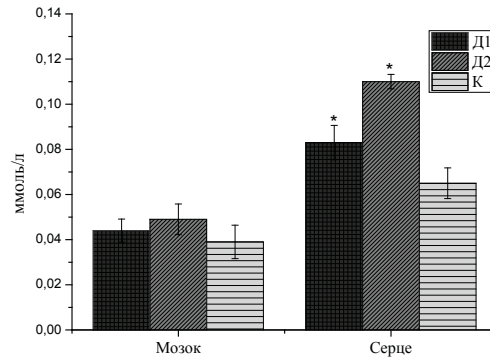


Рис. 1. Вміст відновленого глутатіону у тканинах щурів за дії L-Glu. Рис. 1–5: * різниця вірогідна щодо тварин контрольної групи ($p < 0,05$).

Можна припустити, що дане зростання вмісту цього трипептиду відбувалося за рахунок його синтезу *de novo* за участю ферменту γ -глутаміл-цистеїнсинтетази і, очевидно, субстратом для цього виступала L-Glu. Додаткове введення L-Glu призводило не лише до підвищення порівняно з контролем вмісту GSH, а й також до посилення глутатіонпероксидазної активності.

Результати досліджень показали, що функціональна активність системи антиоксидантного захисту в організмі щурів змінюється під впливом L-Glu. Інактивація перекису водню в клітинах відбувається за допомогою ГПО, яка є Se-вмісним ферментом, близько 70% її локалізовано в цитоплазмі та близько 30% – в мітохондріях усіх клітин ссавців. Так, активність ГПО у тканинах серця другої дослідної групи, яка отримувала додатково 25% L-Glu, була вірогідно вищою стосовно тварин контрольної групи (рис. 2). Спостерігається кореляція між вмістом відновленого глутатіону й активністю ГПО, оскільки вони пов'язані між собою. Це свідчить про те, що високий рівень внутрішньоклітинного GSH приводить до активації ГПО.

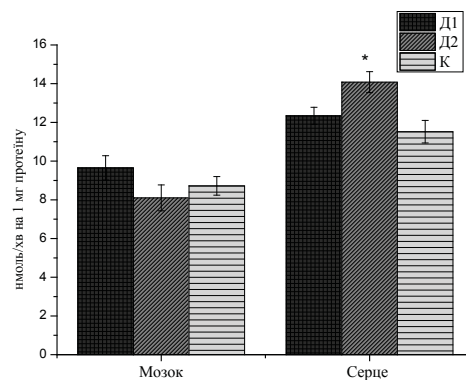


Рис. 2. Активність глутатіонпероксидази у тканинах щурів за дії L-Glu.

Глутатіонредуктаза каталізує відновлення окисленої дисульфідної форми глутатіону (GSSG) у відновлену сульфгідрильну форму GSH за рахунок НАДФН⁺H⁺, який є донором

протонів. ГР в основному локалізована в цитозолі, але міститься і в мітохондріях, ядрах та мікросомах. Нормальне функціонування у клітині NADPH-залежної глутатіонредуктази є дуже важливим для запобігання окисному ушкодженню мітохондрій, оскільки вони не містять каталази, неспроможні синтезувати GSH de novo і тому залежать від відновлення глутатіонредуктазою окисленого глутатіону та його надходження з цитозолу через зовнішню мітохондріальну мембрану.

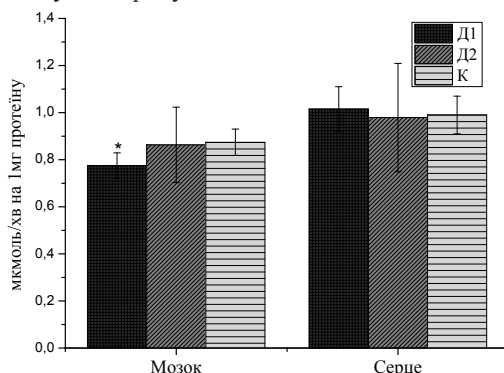


Рис. 3. Активність глутатіонредуктази у тканинах щурів за дії L-Gly.

Із результатів наших досліджень видно (рис. 3), що активність ГР у тканинах серця тварин обох дослідних груп не зазнавала жодних змін, порівняно з контролем. Причиною цього може бути високий рівень GSH, при якому не відбувалася активація ГР. Як відомо, каталітична активність ГР залежить від стану її SH-груп і при фізіологічних концентраціях відновлений глутатіон виявляє інгібуєчий вплив на цей ензим. Варто відзначити зниження цього показника у тканинах мозку тварин першої дослідної групи, порівняно з контролем.

Антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації та закінчуючи утворенням гідропероксидів і ТБК-активних продуктів. Основний механізм контролю цих реакцій пов'язаний із ланцюгом оборотних окисно-відновних реакцій іонів металів, глутатіону, аскорбату, токоферолу й інших речовин. Відомо, що глутамінова кислота має виражену антиоксидантну та мембраностабілізуючу дію завдяки пригніченню пероксидного окиснення ліпідів [13]. Це узгоджується з нашими даними, згідно з якими вірогідно знижується вміст гідропероксидів ліпідів у тканинах серця обох дослідних груп, порівняно з контролем.

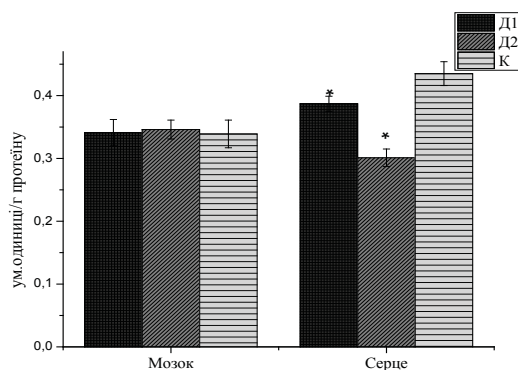


Рис. 4. Вміст гідропероксидів ліпідів у тканинах щурів за дії L-Gly.

Ймовірно, це також пов'язано з функціонуванням ферментативної редокс-системи глутатіону, яка забезпечує детоксикацію перекисів, органічних гідроперекисів, інактивацію вільних радикалів.

З наведених на рис. 5 даних видно, що вміст ТБК-активних продуктів у тварин другої дослідної групи у тканинах серця був вірогідно нижчим, порівняно з контролем. Слід відзначити тенденцію до зниження цього показника у тканинах мозку та серця тварин першої дослідної групи. Ці дані свідчать, що глютамінова кислота здатна пригнічувати ПОЛ, зокрема, синтез ТБК-активних продуктів шляхом активації антиоксидантної системи захисту.

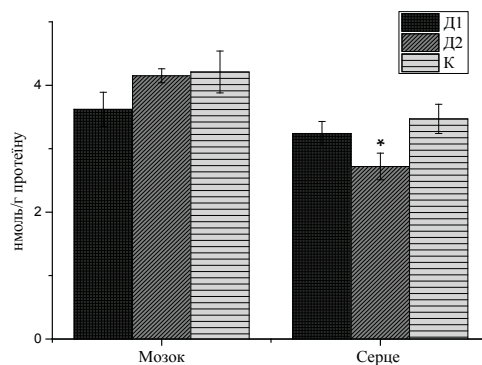


Рис. 5. Вміст ТБК-активних продуктів у тканинах щурів за дії L-Glu.

Аналіз результатів досліджень показав, що додаткове введення до раціону щурів L-Glu призвело до змін активності глутатіонової ланки антиоксидантного захисту й інтенсивності пероксидного окислення ліпідів, а саме зростанню активності ГПО, GSH і зниженню вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у тканинах серця. Вагоміші зміни даних показників спостерігались у тварин другої дослідної групи, яка отримувала додатково 25% L-Glu до раціону.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Влізло В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б. та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. Львів: СПОЛОМ, 2012. 761 с.
2. Коржов В. И., Жадан В. Н., Коржов М. В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // Журнал АМН України. 2007. Т. 13. № 1. С. 3–20.
3. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Обмен глутатиона // Успехи биол. химии. 1990. Т. 31. С. 157–179.
4. Коробейникова Э. Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // Лаб. дело. 1989. № 7. С. 8–10.
5. Мазо В. К. Глутатион как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 1998. № 1. С. 47–52.
6. Hansen A. M., Caspi R. R. Glutamate joins the ranks of immunomodulators // Nat. Med. 2010. Vol. 16. N 8. P. 856–858.
7. Kirstein C. L., Coopersmith R., Bridges R. J., Leon M. Glutathione levels in olfactory and non-olfactory neural structures of rats // Mol. Aspects. Med. 2009. Vol. 30. N 1–2. P. 99–110.

8. *Newsholme P., Procopio J., Lima M. M. et al.* Glutamine and glutamate: their central role in cell metabolism and function // *Cell Biochem. Funct.* 2003. Vol. 21. P. 1–9.
9. *Newsholme P., Lima M., Procopio J. et al.* Glutamine and glutamate as vital metabolites // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003. Vol. 36. P. 153–163.
10. *Platt S. R.* The role of glutamate in central nervous system health and disease // *Vet. J.* 2007. Vol. 173(2). P. 278–286.
11. *Roth E.* Nonnutritive effects of glutamine // *J. Nutr.* 2008. Vol. 138. P. 2025–2031.
12. *Salyha Y.* Biological effects assessment of chlorpyrifos and home aspects of its neurotoxicity // *Visnyk of Lviv University. Biology series.* 2010. № 54. P. 3–14.
13. *Stadtman E. R., Levine R. L.* Free radical-mediated oxidation of free aminoacids and aminoacid residues in proteins // *Amino Acids.* 2003. Vol. 25. P. 207–218.
14. *Townsend D. M., Tew K. D., Tapiero H.* The importance of glutathione in human disease // *Biomed Pharmacother.* 2003. Vol. 57. N 3–4. P. 145–155.
15. *Yuan L., Kaplowitz N.* Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity // *Mol. Aspects. Med.* 2009. Vol. 30. N 1–2. P. 29–41.

Стаття: надійшла до редакції 04.02.13

доопрацьована 08.05.13

прийнята до друку 27.05.13

EFFECT OF L-GLUTAMIC ACID ON THE ACTIVITY OF GLUTATHIONE METABOLISM ENZYMES AND INTENSITY OF PEROXIDATION PROCESSES IN RATS

N. Salyha, Yu. Salyha

*Institute of Animal Biology NAAS of Ukraine
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: ynosyt@yahoo.com*

The effect of additional (10% and 25% respectively) administration of L-glutamic acid (L-Glu) into the diet of rats on the activity of antioxidant enzymes and intensity of peroxidation processes in tissues of brain and heart was studied. We found that the rat's diet enrichment by L-Glu during 30 days resulted in a change of glutathione part of antioxidant system and intensity of lipid peroxidation processes. It is shown that additional L-Glu levels leads to increasing of glutathione peroxidase activity and the content of reduced glutathione and to reduction of lipid hydroperoxides and TBA-active products in heart tissues compared with the control group of animals. More intensive changes in these indices were observed in animals of the second experimental group which received additional 25% of L-Glu into the diet.

Keywords: L-glutamic acid, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione reduced, lipids hydroperoxides, TBA-active products.

**ВЛИЯНИЕ L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ
ЭНЗИМОВ МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАТИОНА И ИНТЕНСИВНОСТЬ
ПЕРОКСИДНЫХ ПРОЦЕССОВ У КРЫС**

Н. Салыга, Ю. Салыга

*Институт биологии животных НААН Украины
ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина
e-mail: ynosyt@yahoo.com*

Исследовано влияние дополнительного (10% і 25% соответственно) введения к рациону L-глутаминовой кислоты (L-Glu) на активность антиоксидантных ферментов и интенсивность пероксидных процессов в тканях мозга и сердца крыс. Установлено, что обогащение рациона крыс L-Glu в течение 30 дней приводило к изменениям активности глутатионного звена антиоксидантной защиты и интенсивности перекисного окисления липидов. Показано, что дополнительное введение животным L-Glu приводит к повышению глутатионпероксидазной активности, содержанию восстановленного глутатиона и снижению содержания гидропероксидов липидов и ТБК-активных продуктов в тканях сердца, по сравнению с контрольной группой животных. Более существенные изменения данных показателей наблюдались у животных второй опытной группы, получавших дополнительно 25% L-Glu к рациону.

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