

## Вікові зміни активності ферментів антиоксидантної системи в еритроїдних клітинах свиней на ранніх стадіях постнатального розвитку

*Исследовали возрастную динамику изменений активности ферментов энергетического обмена и антиоксидантной системы в популяциях «молодых», «зрелых» и «старых» клеток периферической крови новорожденных, 1-, 3-, 5- и 10-суточных свиней. Установлено существенное повышение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах животных на протяжении первых трех суток после рождения. С 5-х по 10-е сутки после рождения в эритроцитах наблюдается повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-Н-зависимой глутатионредуктазы. Возрастные изменения активности исследуемых ферментов особенно характерны для «молодых» клеток. Полагают, что этот механизм является важным для стабилизации мембранных структур эритроцитов в периоде ранней постнатальной адаптации животных.*

### Вступ

Для з'ясування механізмів неонатальної адаптації тварин важливе значення мають дослідження функціональних характеристик еритроцитів, оскільки від стану метаболізму в даних клітинах залежить ступінь забезпечення киснем периферичних тканин, а киснево-транспортна функція крові значною мірою визначається стабільністю плазматичних мембран еритроцитів [1]. Однак за умов низького вмісту в тканинах новонароджених тварин високоненасичених сполук ліпідної природи, які попереджують накопичення продуктів вільнорадикального окислення [14], при високому парціальному тиску в клітинах крові можуть нагромаджуватися високореактивні похідні молекул кисню - супероксидний ( $O_2^-$ ) і гідроксильний ( $OH\cdot$ ) радикали, а також перекис водню ( $H_2O_2$ ). При підвищенні концентрації названих похідних кисню в клітинах активуються процеси вільнорадикального окислення ліпідів і посилюється гемоліз еритроцитів [7]. Стабільність плазматичних мембран таких залежить від рівня енергетичного обміну та стану антиоксидантної системи, активність якої модулюється оксидативним стресом [15]. У зв'язку з відсутністю в літературі даних про характер адаптивних змін у названих ферментних системах еритроцитів новонароджених свиней, які характеризуються відсутністю фетального гемоглобіну [9], ми дослідили потенціальну активність антиоксидантних і функціонально зв'язаних із ними ферментів енергетичного обміну в різновікових популяціях еритроїдних клітин периферичної крові свиней на ранніх стадіях постнатального розвитку.

## Методика

Матеріалом для досліджень була гепаринізована кров, яку одержували пункцією передньої порожнистої вени від новонароджених, 1-, 3-, 5- і 10-добових свиней. Еритроцити тричі промивали 0,85 %-м NaCl з наступним центрифугуванням при 3000 g протягом 10 хв. Різновікові популяції еритроїдних клітин отримували в результаті фракціонування суспензії еритроцитів у градієнті густини сахарози [6]. Застосований метод дає можливість виділити 7 фракцій клітин, які розділяються в градієнті густини дисахариду в порядку зменшення їх питомої густини. На основі фізико-хімічних характеристик і морфологічного аналізу еритроїдні клітини верхніх фракцій об'єднували в популяцію «молодих» еритроцитів, у середніх фракціях містилися «зрілі» клітини, а в нижніх - «старі» в функціональному відношенні еритроцити. В гемолізатах, які отримували заморожуванням в рідкому азоті і розморожуванням водних суспензій еритроїдних клітин, досліджували потенціальну активність супероксиддисмутази (НФ 1.15.1.11), глутатіонпероксидази (НФ 1.11.1.9.), глутатіонредуктази (НФ 1.6.4.2), піруваткінази (НФ 2.7.1.40) і глюкозо-фосфатдегідрогенази (НФ 1.1.1.49). Для визначення активності супероксиддисмутази застосовували метод, який базується на інгібуванні ферментом процесу відновлення нітросинього тетразолію в присутності НАД·Н і феназинметасульфату [3]. Активність глутатіонпероксидази визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5'-дитіобіс/2-нітробензойною кислотою [4]. Рівень каталітичної активності глутатіонредуктази, піруваткінази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази досліджували спектрофотометрично з використанням спряжених систем окислення та відновлення нікотинамідних коферментів [2, 8]. Концентрації компонентів в інкубаційних сумішах були такими (в моль/л): - для визначення активності глутатіонредуктази:  $2 \cdot 10^{-3}$  окисленого глутатіону,  $2,5 \cdot 10^{-4}$  НАДФ·Н ( $5 \cdot 10^{-5}$  НАД·Н),  $8 \cdot 10^{-5}$  ЕДТА; - для визначення активності піруваткінази:  $1 \cdot 10^{-5}$  фосфоенолопірувату,  $1 \cdot 10^{-3}$  АТФ  $1 \cdot 10^{-2}$  KCl,  $5 \cdot 10^{-3}$  MgCl<sub>2</sub>,  $5 \cdot 10^{-5}$  НАД·Н і 0,3 МО лактатдегідрогенази (НФ 1.1.1.27); - для визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази:  $1 \cdot 10^{-3}$  глюкозо-6-фосфату,  $5 \cdot 10^{-4}$  НАДФ,  $5 \cdot 10^{-3}$  MgSO<sub>4</sub>. Отримані результати опрацьовували статистично.

## Результати та їх обговорення

Встановлено, що в ранній період постнатального розвитку в еритроцитах периферичної крові свиней відбувається значна активація ферментів антиоксидантної системи. Так, вірогідне підвищення активності супероксиддисмутази спостерігається в нефракціонованих клітинах 3-добових тварин, а активність глутатіонпероксидази в еритроцитах підвищується протягом 1-ї доби постнатального життя (табл. 1). Очевидно, посилення детоксикації перекисних сполук у тканинах тварин після народження має істотне значення для стабілізації мембранних структур еритроїдних клітин у період адаптації тварин до підвищеної

Таблиця 1. Вікова динаміка активності ферментів у нефракціонованих еритроїдних клітинах поросят

Вік тварин	Нефракціоновані	
	Активність	Стандартне відхилення
Новонароджені	8,74	± 1,0
1-добові	10,54	± 0,9
3-добові	17,87	± 2,4
5-добові	19,66	± 1,9
10-добові	16,74	± 2,3
Глутатіонпероксидаза		
Новонароджені	25,66	± 2,8
1-добові	37,80	± 2,1
3-добові	42,70	± 2,9
5-добові	38,48	± 2,8
10-добові	34,00	± 3,7
Глутатіонредуктаза		
Новонароджені	40,32	± 3,8
1-добові	38,70	± 3,8
3-добові	20,35	± 2,0
5-добові	17,36	± 2,1
10-добові	14,14	± 1,8
Піруваткіназа		
Новонароджені	6,67	± 0,8
1-добові	7,81	± 0,9
3-добові	6,97	± 0,8
5-добові	8,67	± 0,9
10-добові	12,37	± 1,1

Примітка. Тут і в табл. 2

концентрації кисню обхідний для каталітичного відновлення функціонуванням глутатіонпероксидази в еритроїдних клітинах є відновлення НАДФ·Н [5]. Встановлено, що активність глутатіонредуктази змінюється і лише в останній період життя тварин на істотно збільшується після народження поросят

Таблиця 1. Вікова динаміка змін активності ферментів антиоксидантної системи в еритроїдних клітинах поросят (M±m, n=5)

Вік тварин	Популяції еритроцитів							
	Нефракціоновані		«Молоді»		«Зрілі»		«Старі»	
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг білка								
Новонароджені	8,74	± 1,09	10,71	± 1,20	7,48	± 0,68	2,89	± 0,41
1-добові	10,54	± 0,94	12,20	± 1,10	8,43	± 0,45	2,67	± 0,23
3-добові	17,87	± 2,42*	19,23	± 2,80	11,22	± 1,29	4,03	± 0,38*
5-добові	19,66	± 1,90	23,27	± 2,27	16,10	± 2,03	8,84	± 0,79*
10-добові	16,74	± 2,30	19,60	± 1,18	17,49	± 1,50	10,83	± 2,10
Глутатіонпероксидаза, нмоль глутатіону/хв-мг білка								
Новонароджені	25,66	± 2,84	26,53	± 2,70	26,99	± 2,73	18,64	± 1,60
1-добові	37,80	± 2,15*	42,10	± 4,30*	40,80	± 3,70*	19,76	± 2,10
3-добові	42,70	± 2,90	40,35	± 3,70	35,70	± 2,90	19,57	± 1,85
5-добові	38,48	± 2,80	35,06	± 3,12	36,80	± 3,40	22,20	± 2,50
10-добові	34,00	± 3,25	30,81	± 2,57	36,00	± 3,52	25,60	± 2,30
Глутатіонредуктаза (I), нмоль НАД·Н/хв-мг білка								
Новонароджені	40,32	± 3,80	42,90	± 3,30	28,50	± 3,12	18,30	± 1,90
1-добові	38,70	± 3,82	40,55	± 3,35	25,95	± 3,24	13,88	± 1,10
3-добові	20,35	± 2,01*	30,27	± 2,16*	23,25	± 2,60	8,04	± 1,10*
5-добові	17,36	± 2,13	27,17	± 2,50	19,38	± 1,25	8,13	± 0,95
10-добові	14,14	± 1,90	19,66	± 1,20	17,53	± 1,80	7,72	± 1,30
Глутатіонредуктаза (II), нмоль НАД·Н/хв-мг білка								
Новонароджені	6,67	± 0,85	6,14	± 0,69	7,05	± 0,80	3,56	± 0,21
1-добові	7,81	± 0,67	6,34	± 0,58	8,59	± 0,77	3,34	± 0,17
3-добові	6,97	± 0,32	8,50	± 0,72*	10,69	± 0,85	3,80	± 0,20
5-добові	8,67	± 0,72	9,08	± 0,95	12,24	± 1,15	4,31	± 0,25
10-добові	12,37	± 1,17	11,35	± 1,55	12,69	± 0,98	5,79	± 0,48

Примітка. Тут і в табл. 2 \* P<0,05 - вірогідність відмінностей між віковими групами.

концентрації кисню в периферичній крові [16]. За таких умов необхідний для каталітичної активності глутатіонпероксидази високий рівень відновленого глутатіону в еритроцитах забезпечується функціонуванням глутатіонредуктази, кофакторами якої в цих клітинах є відновлені форми нікотинамідних коферментів НАД·Н і НАДФ·Н [5]. Встановлено, що інтенсивність окислення останнього в глутатіонредуктазній реакції в еритроцитах свиней з віком не змінюється і лише в нефракціонованих клітинах 10-добових тварин вона істотно збільшується (див. табл. 1). У той же час у ранній період після народження рівень відновленої форми глутатіону в еритроїдних

клітинах, очевидно, підтримується завдяки використанню глутатіонредуктазою відновних еквівалентів НАД·Н. Про це свідчить висока швидкість окислення цього коферменту в клітинах крові свиней в період від народження до 3-добового віку (див. табл. 1). Відомо, що рівень відновлених форм нікотинамідних коферментів в еритроцитах значною мірою регулюється активністю реакцій гліколізу і пентозофосфатного шунту. Таким шляхом реалізується метаболічний зв'язок між інтенсивністю енергетичного обміну і антиоксидантним статусом цих клітин. Раніше показано, що більше ніж 90 % глюкози, яка поступає в еритроцити свавців, розщеплюється в гліколітичному шляху і лише 2-7 % моносахариду метаболізується через пентозофосфатний шунт [10]. Подібні співвідношення між інтенсивністю вказаних метаболічних процесів спостерігались і в наших дослідженнях. Так, активність лімітуючого ферменту гліколізу піруваткінази в нефракціонованих еритроцитах свиней значно перевищувала активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази - ферменту пентозофосфатного шунту (табл. 2).

Особливо низькою активністю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази характеризуються еритроцити новонароджених свиней. Проте на більш пізніх стадіях досліджень активність ферменту поступово підвищується і у 10-добових тварин вона досягає рівня, характерного для дорослих свиней (в наших дослідженнях цей показник становив 10,46 нмоль/хв·мг білка ± 0,72 нмоль/хв·мг білка). Разом з тим в еритроцитах 10-добових свиней істотно знижується активність піруваткінази. Можливо, це свідчить про більш інтенсивне перетворення субстратів гліколізу в 2,3-дифосфогліцерат - регулятор киснево-транспортної функції гемоглобіну [11].

Для більш повної характеристики метаболічних процесів, які забезпечують неонатальну адаптацію у тварин на рівні еритроїдних клітин, проводилися дослідження активності вказаних ферментів у різновікових популяціях еритроцитів крові свиней. При цьому до уваги брали положення, що еритроцити свиней можна виявити в популяції «зрілих» клітин після перших 5-7 діб їх перебування у руслі крові [12]. Тому результати, які характеризують активність ферментів у різновікових популяціях клітин, інтерпретувалися таким чином, що у крові 1-добових і старших тварин у верхніх фракціях градієнту густини сахарози містяться, в основному, «молоді» еритроцити, які надійшли в циркуляцію після народження, а в середніх і нижніх фракціях - клітини, які утворилися в період пренатального розвитку. В той же час у новонароджених свиней всі фракції містять головним чином клітини крові, які утворилися в пренатальний період розвитку.

Виявлено, що в ретикулярній фракції крові поросят активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази істотно збільшується протягом перших 3-х діб після народження і підтримується на високому рівні до 10-добового віку тварин (див. табл. 1, 2). У той же час у «молодих» клітинах новонароджених свиней питома активність цих ферментів є низькою. Це може вказувати на

Таблиця 2. Зміна активності поросят залежно від віку

Вік тварин	Нефракціоновані	
	Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа	Піруваткіназа
Новонароджені	35,9 ± 0,5	3,53 ± 0,1
1-добові	40,7 ± 0,5	5,02 ± 0,1
3-добові	37,9 ± 0,5	4,92 ± 0,1
5-добові	35,9 ± 0,5	5,67 ± 0,1
10-добові	27,1 ± 0,5	10,02 ± 0,1

те, що рівень каталітичної активності ферментів у даній популяції характеризується певними особливостями, які можуть бути пов'язані з тим, що появились у цій популяції процесі свого формування. Ці процеси безпечно розвиваються, що синтез молекул ферментів в процесі диференціації клітин корисний такого припущення оксиддисмутази, глутатіонпероксидази істотно не відрізняються від новонароджених поросят (див. таблицю 2). Оскільки ці фракції містять нові молекули ферментів, то в них істотно збільшується внутрішньоклітинна активність ферментів.

Роль субстратного зв'язку між активністю глутатіонпероксидази і НАД·Н як донатора електронів для «зрілих» еритроцитів свиней зменшення її в клі-

Таблиця 2. Зміна активності ферментів енергетичного обміну в еритроїдних клітинах поросят залежно від віку ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Вік тварин	Популяції еритроцитів							
	Нефракціоновані		«Молоді»		«Зрілі»		«Старі»	
Піруваткіназа, нмоль НАД·Н/хв·мг білка								
Новонароджені	35,9	$\pm 2,09$	39,5	$\pm 3,09$	28,5	$\pm 2,70$	22,3	$\pm 2,56$
1-добові	40,7	$\pm 3,20$	42,5	$\pm 3,70$	33,4	$\pm 3,40$	25,7	$\pm 2,30$
3-добові	37,9	$\pm 2,50$	40,7	$\pm 2,80$	36,4	$\pm 3,20$	26,5	$\pm 2,15$
5-добові	35,9	$\pm 2,10$	35,3	$\pm 2,00$	34,5	$\pm 3,20$	24,7	$\pm 2,30$
10-добові	27,1	$\pm 1,80^*$	28,5	$\pm 1,70^*$	30,2	$\pm 2,70$	22,3	$\pm 1,90$
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, нмоль НАД·Н/хв·мг білка								
Новонароджені	3,53	$\pm 0,37$	3,22	$\pm 0,43$	3,80	$\pm 0,25$	3,25	$\pm 0,11$
1-добові	5,02	$\pm 0,54$	6,63	$\pm 0,62^*$	7,04	$\pm 0,92^*$	3,39	$\pm 0,17$
3-добові	4,92	$\pm 0,58$	7,62	$\pm 0,95$	7,29	$\pm 0,66$	3,28	$\pm 0,40$
5-добові	5,67	$\pm 0,62$	11,10	$\pm 1,07$	9,42	$\pm 0,85$	3,46	$\pm 0,44$
10-добові	10,02	$\pm 0,80^*$	10,70	$\pm 1,40$	14,90	$\pm 1,50^*$	5,75	$\pm 0,60^*$

те, що рівень каталітичної активності та концентрація молекул ферментів у даній популяції клітин детермінуються генетично зумовленими особливостями метаболізму фетальних клітин, тоді як еритроцити, що появились у циркуляції після народження тварин, очевидно, в процесі свого формування знаходяться під впливом факторів, які забезпечують розвиток у них адаптивних метаболічних реакцій. Відомо, що синтез молекул глюкозо-6-фосфатдегідрогенази не припиняється в процесі диференціації еритроїдних клітин у кістковому мозку [13]. На користь такого припущення свідчить і те, що рівень активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази істотно не відрізняється в «молодих» і «зрілих» клітинах новонароджених поросят (див. табл. 1, 2). Разом з тим певною віковою особливістю клітин червоної крові свиней є підвищення активності вказаних ферментів у «зрілих» еритроцитах поросят 3-10-добового віку. Оскільки ці фракції містять значну частину фетальних клітин, а синтез нових молекул ферментів у них не відбувається, то, очевидно, в регуляції їх метаболічної активності основну роль відіграють внутрішньоклітинні фактори. В той же час в популяції «старих» еритроцитів активність антиоксидантних ферментів є низькою (див. табл. 1).

Роль субстратного механізму є важливою і в регуляції каталітичної активності глутатіонредуктази у різновікових популяціях клітин. Підтвердженням цього є висока здатність ферменту використовувати НАД·Н як донатор водню в каталізованій ним реакції у «молодих» і «зрілих» еритроцитах новонароджених і 1-добових свиней та значне зниження її в клітинах 3-10-добових тварин (див. табл. 1). У той

же час рівень окислення НАДФ·Н названим ферментом був значно нижчий і істотно не змінювався протягом усього періоду досліджень.

Таким чином, встановлено, що популяції «старих» еритроцитів новонароджених і 1-добових свиней характеризуються низьким рівнем активності антиоксидантних ферментів. Головним чином це зв'язано з активністю супероксиддисмутази, що може зумовлювати гемоліз «старих» клітин при переході тварин від пренатального до постнатального життя. Разом з тим у клітинах крові у 3-10-добових свиней активність ферменту суттєво підвищується, що є важливим фактором для стабілізації еритроцитарних мембран у період постнатальної адаптації.

V.V.Snitinsky, G.L.Antonyak, V.I.Bershady

#### AGE CHANGES OF ANTIOXYDATIVE SYSTEM ENZYMES ACTIVITY IN PIG ERYTHROID CELLS AT EARLY STAGES OF POSTNATAL DEVELOPMENT

The age changes of energy metabolism and antioxidative system enzymes activity in «young», «mature» and «old» erythroid cells of 0-, 1-, 3-, 5-, 10-days old piglets were studied. The essential increase of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in pig erythrocytes during three days of postnatal life was established. The rise of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH-dependent glutathione reductase activities was observed in piglets erythrocytes in the period from 5 to 10 days after birth. The discovered changes of enzymatic activity were particularly characteristic of the «young» cells. It is supposed that this mechanism is essential in erythrocyte membrane structures stabilization in the period of early postnatal adaptation of animals.

Institute of Animal Physiology and Biochemistry,  
Ukrainian Agrarian Academy of Sciences, Lviv

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойтлер Э. Нарушение метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия. - М., 1981. - 255 с.
2. Власова С.И., Шабунина Е.И., Переслгина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. - 1990. - № 8. - С. 19-21.
3. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Там же. - 1983. - № 10. - С. 30-33.
4. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Там же. - 1986. - № 12. - С. 724-727.
5. Нормальное кроветворение и его регуляция / Под ред. Н.А.Федорова. - М.: Медицина, 1976. - 543 с.
6. Сизова И.А., Каменская В.В., Феденков В.И. Безаппаратурный способ фракционирования красных клеток крови в градиенте плотности сахарозы // Изв. Сиб. отд. АН СССР. - 1980. - 3, № 15. - С. 119-122.
7. Bochev P. Clinical aspects of the free radical pathology // Sci. Works Higher Med. Inst. Pleven. - 1989. - 11, № 1. - P. 62-64.
8. Chapman C., Hennessey M.A., Waltersdorf A.N. Erythrocyte metabolism // J.Clin. Invest. - 1962. 41, № 6. - P. 1249-1256.
9. Glauser S.C., Glauser E.M. A comparison of the hemoglobins occurring in fetal and adult pigs // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. - 1971. - 137, № 4. - P. 1449-1451.
10. Jacobasch G., Minakami S., Rapoport S.M. Glycolysis of the erythrocytes - In: Cellular and molecular biology of erythrocytes / Ed. H.Yoshikawa, S.M.Rapoport. Baltimore-London-Tokyo: Univ. Park. Press, 1974. - P. 55-92.
11. Jelkman W., Bauer C. Regulation of red cell DPG metabolism in fetuses and adults // Acta biol. et med. germ. - 1981. - 40, № 4-6. - P. 661-664.
12. Kim H.D., Luthra M.G. Pig reticulocytes. III. Glucose permeability in naturally occurring reticulocytes and red cells from newborn piglets // J.Gen. Physiol. - 1977. - 70. - P. 171-185.

13. Nijhof W., Wierenga P.A. of glycolytic enzymes du P. 607-613.
14. Novak A., Fieldec I., Or und Feten // Arch. Tier
15. Sommer R.G. Oxidativ - P. 158-160.
16. Urfer F., Bard H., Four cells on tissue oxygenati hypercapnia // Pediat. I

Ін-т фізіології і біохімії  
тварин УААН, Львів

13. Nijhof W., Wierenga P.K., Staal G.E.J., Jansen G. Changes in activities and isozyme patterns of glycolytic enzymes during erythroid differentiation in vitro // *Blood*. - 1984. - 64, № 3. - P. 607-613.
14. Novak A., Fielder I., Otto E. Vergleich von Organen und muskulatur von neugeborenen Ferkeln und Feten // *Arch. Tiercz. Berlin*. - 1987. - 30. S. 241-248.
15. Sommer R.G. Oxidativer stress und freie radiale // *Therapeutikon*. - 1991. - 5, № 4. - P. 158-160.
16. Urfer F., Bard H., Fouron J., Van Amerigen M. The effect of high or low oxygen affinity red cells on tissue oxygenation and myocardial function in hypoxic newborn lambs with or without hypercapnia // *Pediat. Res*. - 1983. - 17. - P. 567-572.

Ін-т фізіології і біохімії  
тварин УААН, Львів

Матеріал надійшов  
до редакції 27.01.94