

# КОРРЕКЦИЯ БИОПОЛИМЕРОМ ИЗ ТКАНЕЙ РАПАНЫ СОСТОЯНИЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА ОРГАНИЗМА КРЫС ПРИ НЕСБАЛАНСИРОВАННОМ ПИТАНИИ

Ю.В. Никитченко<sup>1</sup>, В.Н. Дзюба<sup>1</sup>, Т.Н. Овсянникова<sup>1</sup>, О.Е. Битютская<sup>2</sup>, В.В. Бондарь<sup>1</sup>,  
А.А. Шеремет<sup>1</sup>, А.С. Попович<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

<sup>2</sup>Южный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии, г. Керчь, Украина

## РЕЗЮМЕ

Исследованы особенности изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса в гепатоцитах и сыворотке крови крыс, вызванного несбалансированным питанием, и возможности его коррекции путем дополнения рациона пищевой добавкой (биополимер из тканей рапаны (БР)). Обнаружено, что использованная пищевая добавка в условиях *in vitro* проявляет значительную антирадикальную активность. Показано, что применение БР на фоне несбалансированного рациона приводит к нормализации содержания гидроперекисей липидов в крови и достоверному снижению уровня этих продуктов ПОЛ в гепатоцитах крыс, к замедлению снижения глутатионпероксидазной активности в гепатоцитах и нормализации супероксиддисмутазной активности в крови подопытных животных.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** прооксидантно-антиоксидантный баланс, несбалансированное питание, биополимер из тканей рапаны, крысы

Питание является одним из важнейших факторов, определяющих устойчивость организма к неблагоприятным условиям среды проживания. Проведенные ранее нами исследования свидетельствуют, что несбалансированная по содержанию животных белков и витаминов антиоксидантного ряда диета приводит к увеличению уровня продуктов свободнорадикального повреждения липидов и белков в печени и крови молодых и старых крыс, которое обусловлено активацией генерации активных форм кислорода и снижением активности ряда антиоксидантных ферментов [1, 2]. Такое нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях подопытных животных может быть основной причиной возникновения и развития ряда патологий, в связи с чем и требует антиоксидантной коррекции.

Известно, что введение пищевой добавки из аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa*) в несбалансированный рацион подопытных крыс снижало уровень гидроперекисей липидов (ГПЛ) в микросомах и митохондриях печени и в плазме крови до уровня контрольных животных [1-3]. Вместе с тем, эта пищевая добавка не восстанавливала у подопытных крыс сниженную активность селензависимой глутатионпероксидазы (ГП) в митохондриях и постмитохондриальной фракции печени.

В связи с вышеизложенным для эффективной коррекции прооксидантно-антиокси-дантного баланса в тканях крыс,

получавших несбалансированный рацион питания, представлялся целесообразным поиск новых пищевых добавок, применение которых позволит увеличить активность эндогенной ферментативной антиоксидантной системы организма и, особенно, активность селензависимой ГП. Известно, что пищевая добавка биополимер из тканей рапаны (БР) характеризуется полноценным составом аминокислот, разнообразным составом углеводов и липидов, а также наличием жизненно важных минеральных веществ [4]. Изучение антиоксидантных свойств этой добавки представлялось нам перспективным, поскольку ранее нами было показано [4], что биополимер из тканей мидии, полученный таким же образом, как и из тканей рапаны, способен повышать активность ряда антиоксидантных ферментов печени крыс после гипертермии.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы «Вплив аліментарних факторів-модуляторів рівню активних форм кисню та азоту на функцію біомембран при старінні» (№ государственной регистрации 0106U001581), которая выполняется в НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина МОН Украины.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование состояния прооксидантно-антиоксидантной системы в сыворотке крови и гепатоцитах было проведено на 2-месячных крысах-самцах линии Вистар и

выполнено с соблюдением правил Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальные животные 1-месячного возраста были разделены на контрольную и 2 подопытных группы по 6 животных в каждой. Контрольные крысы получали в течение 30 дней стандартный рацион питания. Подопытные животные обеих групп в течение 30 дней содержались на несбалансированном по содержанию белков животного происхождения и витаминов антиоксидантного ряда рационе, описанном в работе [2]. Крысам одной из подопытных групп на протяжении всего эксперимента к рациону добавляли пищевую добавку БР в дозе 60 мг на 100 г веса тела.

Гепатоциты получали неферментативным методом как описано [5]. Жизнеспособность клеток после выделения составляла не меньше 80-85% (тест с окрашиванием трипановым синим). Для получения сыворотки кровь собирали во время декапитации, отстаивали 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 3 тыс. об./мин в течение 15 мин. Сыворотку крови отбирали и хранили на льду до использования в опыте.

Измерение содержания ГПЛ в гепатоцитах проводили по методу Ohkawa et al. [6], а в сыворотке крови – по методу Asakawa et al. [7]. Спектр поглощения окрашенного продукта регистрировали на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия) и измеряли разность экстинкций при 535 и 520 нм. Содержание ГПЛ определяли в эквивалентных количествах малонового диальдегида (МДА) с учетом коэффициента молярной экстинкции  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Содержание шиффовых оснований (ШО) в гепатоцитах определяли флуориметрически после их экстракции (хлороформ : метанол = 1:2) из суспензии [8]. Результаты выражали в относительных единицах, считая интенсивность флуоресценции 1 мкг хининсульфата в 1 мл 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> равной 1950 единицам [8].

Измерение антиокислительной активности (АОА) биополимера из тканей рапаны проводили на модели желточных липопропротеидов [9]. Определение антирадикальной активности (АРА) (перехват  $\cdot\text{OH}$ -радикалов) проводили с дезоксирибозой оду [10].

Супероксиддисмутазную активность (СОД) (КФ 1.15.1.1) сыворотки крови определяли спектрофотометрически [11] при 560 нм на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS и рассчитывали в единицах

экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986). Экспе-

активности на 1 мл сыворотки крови. Содержание ферментативно-активного церулоплазмينا (КФ 1.16.3.1) определяли в сыворотке крови как описано в работе [12]. Окрашенные образцы спектрофотометрировали при 530 нм, содержание церулоплазмينا выражали в нмоль/мл сыворотки крови. Глутатионпероксидазную активность (КФ 1.11.1.9) определяли в гепатоцитах и сыворотке крови спектрофотометрически при 340 нм [13] и выражали в нмоль NADPH/мин на  $10^6$  клеток или на 1 мл сыворотки с учетом коэффициента молярной экстинкции  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Глутатион-S-трансферазную активность (ГТ) (КФ 2.5.1.18) измеряли в гепатоцитах спектрофотометрически при 340 нм [14] и рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции  $9,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Глутатионредуктазную активность (ГР) (КФ 1.6.4.2) в гепатоцитах измеряли спектрофотометрически по уменьшению уровня NADPH [15] и выражали в нмоль NADPH/ мин на  $10^6$  клеток с использованием коэффициента молярной экстинкции  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Статистическая обработка результатов проведена с помощью компьютерного пакета программ «Statistika V.6» с использованием t-критерия Стьюдента. Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилки. Достоверно различающимися считались результаты при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные в таблице 1 данные исследования АОА и АРА биополимера из тканей рапаны в условиях *in vitro* свидетельствуют, что АОА водного раствора БР была существенно ниже, чем активность пищевой добавки из аронии черноплодной и известного антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола [16]. Так,  $\alpha$ -токоферол в концентрации 0,005 мг/мл реакционной среды ингибировал накопление МДА в суспензии желточных липопропротеидов на  $31,2 \pm 6,1\%$  [16], а пищевая добавка БР только в концентрации 5,0 мг/мл снижала этот показатель на 26,8% (табл. 1).

Таблица 1

### Антиокислительная и антирадикальная (перехват $\cdot\text{OH}$ -радикалов) активности биополимера из тканей рапаны (%; $M \pm sd$ ; $n=4$ )

Концентрация, мг/мл	АОА	АРА
0,2	–	24,0 $\pm$ 2,1

0,4	–	40,3±2,1
0,6	9,8±2,8	–
0,8	–	59,0±1,3
1,2	17,9±2,2	–
2,5	22,8±4,3	77,3±1,2
5,0	26,8±2,4	81,7±2,2

Вместе с тем, при изучении АРА БР было установлено, что способность этой пищевой добавки перехватывать один из наиболее реакционноспособных метаболитов кислорода (ОН-радикал) была одного порядка со способностью известного перехватчика этих радикалов – маннита [16].

Таким образом, полученные в опытах *in vitro* данные свидетельствуют, что БР проявляет определенную антиокислительную активность и выраженную антирадикальную активность.

Проведенные исследования защитного

действия БР в условиях *in vivo* позволили установить, что содержание животных в течение 30 дней на несбалансированной диете приводило к двукратному возрастанию уровня ГПЛ в гепатоцитах крыс, а дополнение несбалансированного рациона в течение всего эксперимента пищевой добавкой вызывало снижение накопления этих продуктов в 1,5 раза (табл. 2). Содержание конечных продуктов свободнорадикального окисления липидов (ШО) в ответ на несбалансированное питание возрастало в 2 раза относительно их уровня при использовании стандартного рациона, а при использовании пищевой добавки несколько снижалось (на 21%,  $P > 0,05$ ) относительно несбалансированного рациона, оставаясь при этом значительно выше, чем у контрольных крыс (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние несбалансированной диеты и пищевой добавки БР на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в гепатоцитах крыс ( $M \pm sd$ ;  $n=4-5$ )**

Измеряемый параметр	Варианты опыта		
	Контроль	Диета	Диета + БР
ГПЛ, нмоль МДА/ $10^6$ клеток	0,647±0,157	1,375±0,132*	0,931±0,116**
ШО, усл. ед./ $10^6$ клеток	17,65±1,78	35,73±6,78*	28,25±3,31*
Общая ГП активность, нмоль NADPH/мин· $10^6$ клеток	117,50±13,16	32,30±4,41*	48,90±7,02*
Селензависимая ГП активность, нмоль NADPH/мин· $10^6$ клеток	55,51±10,29	3,45±0,76*	9,70±2,30***
Селеннезависимая ГП активность, нмоль NADPH/мин· $10^6$ клеток	62,05±4,52	28,96±3,85*	37,42±4,91*
ГТ, нмоль ХНБ/мин· $10^6$ клеток	7,33±0,72	15,20±3,31*	19,81±4,36*
ГР, нмоль NADPH/мин· $10^6$ клеток	35,1±1,9	32,3±3,9	44,6±9,2

\* -  $P < 0,05$  относительно контроля; \*\* -  $P < 0,05$  относительно группы «Диета».

В гепатоцитах крыс селензависимая ГП активность в ответ на несбалансированную диету снижалась в 16 раз (табл. 2). Применение БР приводило к увеличению уровня исследованной активности в 2,8 раза относительно несбалансированной диеты, но при этом уровень этой активности оставался существенно ниже, чем при использовании стандартного рациона. Общая (селензависимая + селеннезависимая) ГП активность, которую измеряли с гидроперекисью кумола, в гепатоцитах животных, содержащихся на несбалансированном рационе, снижалась менее выражено, чем селензависимая активность (в 3,6 раз относительно стандартного рациона). Введение в рацион пищевой добавки не приводило к достоверному возрастанию общей ГП активности. Установленные особенности изменения общей ГП активности могут быть связаны с тем фактом, что в ответ на использование несбалансированного рациона и применение на его фоне пищевой добавки изменения селеннезависимой ГП активности были менее выраженными, чем селензависимой (табл. 2).

При изучении влияния несбалансированного питания и пищевой добавки на активность других антиоксидантных ферментов в гепатоцитах крыс было обнаружено, что в ответ на несбалансированный рацион активность ГТ достоверно возрастала, а добавка к рациону БР не вызывала дальнейших изменений этой активности (табл. 2). Активность ГР практически не изменялась ни у одной из подопытных групп животных (табл. 2).

Исследование состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса крови крыс позволило установить, что в ответ на несбалансированное питание содержание ГПЛ достоверно возрастало относительно уровня у животных со стандартным питанием (на 34%) (табл. 3). При этом содержание ферментативно-активного церулоплазмينا не изменялось, а активности селензависимой ГП и СОД снижались на 48% и 23% соответственно. Введение в рацион БР не приводило к нормализации ГП активности, но снижало содержание ГПЛ и повышало активность СОД до уровня контроля (табл. 3).

В целом, полученные данные

свидетельствуют, что использованная пищевая добавка (биополимер из тканей рапаны), которая проявляла в условиях *in vitro* значительную антирадикальную активность, может быть использована для коррекции изменений прооксидантно-антиоксидантного баланса при несбалансированном питании, так как при введении крысам на фоне

несбалансированного рациона она приводит к нормализации содержания гидроперекисей липидов в крови и достоверному снижению уровня этих продуктов ПОЛ в печени крыс, к менее выраженному снижению глутатионпероксидазной активности в печени и нормализации супероксиддисмутазной активности в крови подопытных крыс.

Таблица 3

**Влияние несбалансированной диеты и пищевой добавки БР на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в сыворотке крови крыс (M±sd; n=6)**

Измеряемый параметр	Варианты опыта		
	Контроль	Диета	Диета + БР
ГПД, нмоль МДА/мл	3,51±0,19	4,69±0,25*	3,53±0,18**
ГП активность, мкмоль NADPH/мин·мл	2,33±0,18	1,22±0,14*	1,36±0,13*
Церулоплазмин, нмоль/мл	1,17±0,06	1,58±0,23	1,50±0,23
Супероксиддисмутаза, усл. ед./мл	111,7±4,5	86,6±6,8*	110,8±6,7**

\* - P < 0,05 относительно контроля; \*\* - P < 0,05 относительно группы «Диета».

## ВЫВОДЫ

1. В условиях *in vitro* биополимер из тканей рапаны проявляет определенную антиокислительную активность и выраженную антирадикальную активность, соизмеримую с активностью известного перехватчика <sup>•</sup>ОН-радикалов – маннитола.
2. Введение биополимера из тканей рапаны на фоне несбалансированной диеты приводит к существенному снижению содержания гидроперекисей липидов в гепатоцитах и нормализации этого показателя в сыворотке крови крыс.
3. При исследовании показателей, характеризующих состояние ферментативной антиоксидантной системы печени и кро-

ви крыс, установлено, что в ответ на введение биополимера из тканей рапаны на фоне несбалансированного питания наблюдается замедление снижения глутатионпероксидазной активности в гепатоцитах и нормализация супероксиддисмутазной активности в сыворотке крови.

Представляется целесообразным дальнейший поиск новых средств более эффективной коррекции изменений активности ферментативной антиоксидантной системы организма и, особенно, глутатионпероксидазы, возникающих при несбалансированном по содержанию животных белков и витаминов антиоксидантного ряда питания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tkachenko V., Nikitchenko Y., Tovstiak V. // *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Lublin-Polonia*. - 2004. - Vol. XVII. - № 2. - P. 289-291.
2. Никитченко Ю.В., Падалко В.И., др. // *Радиац. Биол. Радиоэкология*. - 2008. - Т.48, №2. - С.171-176.
3. Ткаченко В.М., Никитченко Ю.В., Товстяк В.В. // *Біологія тварин*. - 2004. - Т.6, № 1-2. - С. 196-202.
4. Декларац. пат. 60504 UA, А 7 А61К35/36. Біополімер з тканин молюсків, спосіб його виділення та біологічні властивості: О.Є. Бігютська, Т.М. Овсянникова, А.Г. Губанова та ін. (Україна). - № 2002108573; Заявл. 29.10.02; Опубл. 15.10.03, Бюл. № 10. - 9 с.
5. Kravchenko L., Petrenko A., Fuller B. // *Cell Biol. Int.* - 2002. - Vol. 26. - P. 1003-1006.
6. Ohkawa H., Ohahi N., Jadi K. // *Anal. Biochem.* - 1979. - Vol. 95. - № 2. - P. 351-358.
7. Asakawa T., Matsushita S. // *Lipids*. - 1980. - Vol. 15. - № 3. - P. 137-140.
8. Flercher B.L., Dillard C.J., Tappel A.Y. // *Anal. Biochem.* - 1973. - Vol. 52. - P. 1-9.
9. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. и др. // *Лаб. дело*. - 1988. - № 5. - С. 59-62.
10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Aruoma O.I. // *Anal. Biochem.* - 1987. - Vol. 165. - № 1. - P. 215-219.
11. Beavchamp C., Fridovich I. // *Anal. Biochem.* - 1971. - Vol. 44. - № 1. - P. 276-287.
12. Ravin H.A. // *Lancet*. - 1956. - Vol. 1. - P. 7267-7271.
13. Paglia D.E., Valentine W.N. // *J. Lab. Clin. Med.* - 1967. - Vol. 70. - P. 158-169.
14. Younes M., Schlichting R., Siegers C.P. // *Pharmacol. Res. Commun.* - 1980. - Vol. 2. - № 2. - P. 115-128.
15. Герасимов А.М., Королева Л.А., Брусев А.С. и др. // *Вопр. мед. химии*. - 1976. - Т.22, № 1. - С. 89-94.
16. Прооксидантно-антиоксидантний баланс та структурно-функціональний стан біомембран при застосуванні незбалансованих дієт: Звіт про НДР / НДІ біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. - № ДР 0106U001581. - X., 2006. - 37 с.

# КОРЕКЦІЯ БІОПОЛІМЕРОМ ІЗ ТКАНИН РАПАНИ СТАНУ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСУ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ ПРИ НЕЗБАЛАНСОВАНОМУ ХАРЧУВАННІ

*Ю.В. Нікітченко<sup>1</sup>, В.М. Дзюба<sup>1</sup>, Т.М. Овсяннікова<sup>1</sup>, О.Є. Бітютська<sup>2</sup>, В.В. Бондар<sup>1</sup>,  
Г.О. Шеремет<sup>1</sup>, А.С. Попович<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна

<sup>2</sup>Південний науково-дослідний інститут морського рибного господарства та океанографії, м. Керчь, Україна

---

## РЕЗЮМЕ

Досліджено особливості зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу в гепатоцитах і сироватці крові щурів, яка викликана незбалансованим харчуванням, та можливості її корекції шляхом доповнення раціону харчовою домішкою (біополімер із тканин рапани (БР)). Встановлено, що використана харчова домішка в умовах *in vitro* виявляє значну антирадикальну активність. Показано, що застосування БР на тлі незбалансованого раціону приводить до нормалізації вмісту гідроперекисів ліпідів у крові та вірогідного зниження рівня цих продуктів ПОЛ у гепатоцитах щурів, до уповільнення зниження глутатіонпероксидазної активності в гепатоцитах і нормалізації супероксиддисмутазної активності в крові піддослідних тварин.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** прооксидантно-антиоксидантний баланс, незбалансоване харчування, біополімер із тканин рапани, щури

## CORRECTION BY BIOPOLYMER FROM RAPANA TISSUES THE CHANGE OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE STATE OF RAT ORGANISM UNDER UNBALANCED NUTRITION

*Yu.V. Nikitchenko<sup>1</sup>, V.N. Dzyuba<sup>1</sup>, T.N. Ovsyannikova<sup>1</sup>, O.Ye. Bityutskaya<sup>2</sup>, V.V. Bondar<sup>1</sup>,  
A.A. Sheremet<sup>1</sup>, A.S. Popovich<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>South Scientific-research institute of marine fish industry and oceanography, Kerch, Ukraine

---

## SUMMARY

The peculiarities of change of prooxidant-antioxidant balance in rat hepatocytes and blood serum under unbalanced nutrition and possibilities of its correction by means of supplement of ration by food addition (biopolymer from rapana tissues (BR)) were investigated. It was found out that the used food addition in conditions *in vitro* had revealed significant antiradical activity. It is shown that the use of BR against the background of unbalanced ration led to normalization of lipid hydroperoxides content in blood and significant decrease of the level of these LPO products in rat hepatocytes, to the slowing of glutathione peroxidase activity decrease in hepatocytes and normalization of superoxide dismutase activity in blood of experimental animals.

**KEY WORDS:** prooxidant-antioxidant balance, unbalanced nutrition, biopolymer from rapana tissues, rats