

ГАММА-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗА В ТКАНЯХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ У КРОЛЬЧАТ

Игнатьев Николай Георгиевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Агрохимия и экология»

Терентьева Майя Генриховна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Биотехнологии и переработка сельскохозяйственной продукции»
428003 Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. Карла Маркса, 29; тел. 89278659031;
e-mail: maiya-7777@mail.ru

Ключевые слова: ферменты, гамма-глутамилтрансфераза, фазы питания, двенадцатиперстная кишка, крольчата

Приведены результаты исследований по изучению закономерностей возрастных изменений активности фермента гамма-глутамилтрансферазы в тканях слизистого и мышечного слоев проксимальной, медиальной и дистальной частей слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у разновозрастных крольчат. Выявлены неравномерность, гетерохронность и фазность возрастных изменений активности гамма-глутамилтрансферазы. Наиболее интенсивные процессы белкового обмена в тканях слизистого слоя двенадцатиперстной кишки происходят у крольчат в первые сутки жизни, а в тканях мышечного слоя – у крольчат более зрелого возраста.

Введение

Гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ) КФ 2.3.2.1 – фермент класса трансфераз. Катализирует перенос гамма-глутаминовой группы глутатиона (GSH) и других гамма-глутамилпептидов на пептиды или отдельные аминокислоты (метионин, цистеин и др.). Практически ГГТ содержится во всех тканях организма и биологических жидкостях. Является показателем состояния белкового обмена в тканях органов [1]. В научной литературе имеется ряд работ, в которых освещены закономерности возрастных изменений ГГТ в тканях органов пищеварения у продуктивных животных [2,3,4,5,6]. Определение закономерностей становления ферментных систем в тканях органов у животных, в том числе и индикаторов белкового обмена как трансферазы, позволяет раскрывать внутренние механизмы формирования, роста и развития тканей органов, органов и организма в целом на молекулярном уровне, оценить на молекулярном уровне влияние кормовых добавок, биологически активных веществ и лекарственных препаратов на структуры и функции изучаемых органов.

Целью нашей работы стало определение закономерностей становления ферментной системы гамма-глутамилтрансферазы в

тканях слизистого и мышечного слоев проксимальной, медиальной и дистальной частей двенадцатиперстной кишки у растущих крольчат. Подобных работ в научной литературе не обнаружено.

Объекты и методы исследований

Исследования проведены с использованием крольчат породы серый великан в возрасте 1, 6, 12, 18, 24, 30, 45, 60, 90 и 120 суток, выращенных в условиях личного хозяйства Чувашской Республики с соблюдением необходимых ветеринарно-санитарных правил и норм кормления в весенне-летний сезон, по 5 голов в каждом возрасте.

Крольчат натошак вводили в состояние общего наркоза. Эвтаназию и все манипуляции выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [7].

Извлеченную двенадцатиперстную кишку очищали от содержимого, промывали с холодным физиологическим раствором, разделяли на проксимальную, медиальную и дистальную части и замораживали их отдельно в жидком азоте сосуда Дюара. В лабораторных условиях части (пробы) кишки отделяли на слизистую и мышечную слои, ткани гомогенизировали в гомогенизаторе. В гомогенатах определяли активность фермен-

та ГТТ колOMETрированием (КФК-2) и одновременно спектрофотометрированием ((UV-1800) с использованием набора реагентов компании ОАО «Витал Девелопмен Корпорэйшн» (СПб). Расчет активности фермента провели по калибровочному графику.

Результаты исследований

Полученные в ходе исследований данные обобщены в таблице 1.

У односуточных крольчат (табл.), питающихся молозивом, в тканях слизистого слоя проксимальной части двенадцатиперстной кишки определяются относительно высокие величины ГТТ – $538,3 \pm 32,3$. В молозивно-молочную фазу питания у шестисуточных крольчат они примерно такие же высокие – $523,5 \pm 27,1$. Очевидно, в первых фазах питания крольчат активность белкового обмена с участием гамма-глутамилтрансферазы высокая.

В течение последующих шести суток жизни у 12-суточных крольчат в первую фазу молочного питания активность ГТТ существенно падает, на 37,3%, $p \leq 0,001$, до $328,5 \pm 18,5$. На уровне 12-суточных она обнаруживается и у 18-суточных – $336,0 \pm 17,9$. Весьма вероятно, что в первой и во второй фазах молочного питания крольчат процессы белкового обмена в тканях слизистого слоя проксимальной части кишки, связанные с гамма-глутамилтрансферазой, замедляются.

К 24-суточному возрасту, в третьей фазе молочного питания, активность фермента в тканях слизистого слоя продолжает достоверно уменьшаться, на 38,5%, $p \leq 0,001$,

до $206,7 \pm 16,4$. Такой же уровень ГТТ в тканях слизистого слоя обнаруживается у месячных ($213,6 \pm 13,2$), 45-суточных ($194,8 \pm 11,9$) и двухмесячных ($196,9 \pm 14,3$). По-видимому, с включением в рацион питания крольчат зеленого травяного корма участие фермента в процессах белкового обмена в тканях слизистого слоя снижается.

В течение последующего месяца, к трехмесячному возрасту крольчат, активность ГТТ увеличивается существенно, в 1,5 раза, $p \leq 0,01$, до $299,3 \pm 22,8$ и на таком же уровне в тканях слизистого слоя проксимальной части изучаемой кишки она определяется и у четырехмесячных, $292,7 \pm 28,4$. Полагаем, что у крольчат, находящихся на откорме, с повышением в рационе комбикормов, с увеличением всасывания массы аминокислот, белковый обмен в тканях слизистого слоя проксимальной части слизистой оболочки значительно возрастает, что отражается на активности ферментосинтезирующих систем в них.

По нашим данным, наиболее интенсивные изменения активности ГТТ в тканях слизистого слоя проксимальной части кишки выявляются с 6 по 12 сутки (падает на 37,3%), с 18 по 24 сутки (уменьшается на 38,5%) жизни крольчат и с двухмесячного по трехмесячный (увеличивается в 1,5 раза) возраст.

В тканях мышечного слоя проксимальной части двенадцатиперстной кишки у крольчат в фазах молозивного и молозивно-молочного питания, или у одно- и шестисуточных, активность ГТТ относительно невысо-

Таблица 1

Активность ГТТ в тканях двенадцатиперстной кишки у крольчат

Часть кишки	Возраст, сут									
	1	6	12	18	24	30	45	60	90	120
Проксим. слизистая	538,3 ±32,3	523,5 ±27,1	328,5 ±18,5	336,0 ±17,9	206,7 ±16,4	213,6 ±13,2	194,8 ±11,9	196,9 ±14,3	299,3 ±22,8	292,7 ±28,4
Проксим. мышечная	208,8 ±16,5	228,5 ±13,2	385,9 ±21,7	323,8 ±19,6	179,4 ±14,2	284,2 ±18,3	234,5 ±23,3	246,6 ±17,6	226,6 ±15,9	269,3 ±21,1
Медиал. слизистая	563,8 ±27,2	520,5 ±32,2	512,2 ±21,5	521,4 ±22,3	242,8 ±16,7	255,1 ±19,1	171,7 ±12,3	169,4 ±15,2	246,6 ±16,7	260,5 ±18,4
Медиал. мышечная	263,9 ±21,1	272,0 ±13,7	252,2 ±19,2	374,6 ±26,6	346,8 ±18,6	303,3 ±22,5	336,0 ±20,4	270,1 ±14,3	218,4 ±18,5	226,3 ±16,7
Дист. слизистая	430,1 ±33,2	425,9 ±28,8	331,3 ±29,1	324,2 ±18,9	326,0 ±21,6	262,6 ±17,7	245,8 ±15,2	211,2 ±12,5	355,8 ±27,1	356,0 ±31,3
Дист. мышечная	318,4 ±19,9	323,1 ±23,3	242,8 ±12,8	254,8 ±15,7	245,6 ±17,2	223,4 ±16,2	254,3 ±13,5	352,5 ±19,8	324,7 ±27,7	312,7 ±19,7

кая и определяется на уровне таких величин, как $208,8 \pm 16,5$ и $228,5 \pm 13,2$. Очевидно, в эти фазы питания крольчат в тканях проксимальной части кишки процессы белкового обмена с участием гамма-глутамилтрансферазы замедлены, двигательная активность проксимальной части кишки невысокая, в совокупности создаются условия для более длительного и глубокого усвоения компонентов молозива.

В течение последующих шести суток жизни крольчат, у 12-суточных, в тканях мышечного слоя активность фермента существенно возрастает, в 1,7 раза, $p \leq 0,001$, до $385,9 \pm 21,7$ и на таком относительно высоком уровне она сохраняется и 18-суточных – $323,8 \pm 19,6$. Увеличение активности фермента, вероятно, связано с возрастанием во второй и третьей фазах молочного питания объема поступающего молока в двенадцатиперстную кишку, с повышением обменных процессов в тканях мышечного слоя и увеличением двигательной активности проксимальной части кишки.

К 24-суточному возрасту крольчат активность ГТТ резко падает, до $179,4 \pm 14,2$, на 44,6%, $p \leq 0,001$. Временное снижение активности ГТТ в тканях мышечного слоя в начале переходной фазы с молочного на растительное питание, возможно, связано с временной перестройкой клеток мышечного слоя с началом усвоения компонентов растительного корма и замедлением обменных процессов в них с участием ГТТ.

В последующем, к месячному возрасту, активность исследуемого фермента в тканях мышечного слоя проксимальной части кишки существенно повышается, в 1,6 раза, $p \leq 0,01$, до $284,2 \pm 18,3$ и на этом относительно высоком уровне она сохраняется у более физиологически зрелых крольчат. Высокая активность гамма-глутамилтрансферазы в тканях мышечного слоя проксимальной части у физиологически более зрелых крольчат, по нашим представлениям, отражает повышенную активность процессов формирования мышечного слоя для усиления двигательной функции и обеспечения оптимизации прохождения растительных компонентов корма в двенадцатиперстную кишку.

Результаты свидетельствуют, что высокая интенсивность возрастных изменений ак-

тивности ГТТ в тканях мышечного слоя проксимальной части слизистой оболочки кишки обнаруживается в следующие промежутки жизни крольчат: с 6 по 12 сутки (возрастает в 1,7 раза), с 18 по 24 сутки (падает на 44,6%) и с 24 по 30 сутки (повышается в 1,6 раза).

В тканях слизистого слоя медиальной части двенадцатиперстной кишки активность ГТТ на одинаковом, относительно высоком уровне, определяется у одно-, шести-, двенадцати- и восемнадцатисуточных крольчат, соответственно $563,8 \pm 27,2$, $520,2 \pm 32,2$, $512,2 \pm 21,5$ и $521,4 \pm 22,3$. Возможно, в молозивной, молозивно-молочной, первой и второй молочной фазах питания крольчат происходит усиленное формирование структуры слизистого слоя медиальной части кишки с участием исследуемого фермента.

В течение последующих шести суток жизни, к 24-суточному возрасту, активность фермента значительно (на 53,5%, $p \leq 0,001$, до $242,8 \pm 16,7$) снижается. На этом же уровне активность ГТТ выявляется и у месячных – $255,1 \pm 19,1$. К 45-суточному возрасту крольчат она продолжает достоверно уменьшаться, на 30,4%, $p \leq 0,01$, до $171,7 \pm 12,3$, и у двухмесячных она сохраняется на предыдущем уровне, $169,4 \pm 15,2$. Относительно низкая активность гамма-глутамилтрансферазы в тканях слизистого слоя медиальной части кишки в фазах молочно-растительного, в первой и второй фазах растительного питания, как нам кажется, связана с замедленной перестройкой структур слизистого слоя медиальной части кишки в связи с уменьшением роли этой части кишки в процессах усвоения новых компонентов корма.

Через месяц, у трехмесячных, активность фермента снова достоверно возрастает, до $246,6 \pm 16,7$, в 1,4 раза, $p \leq 0,05$, а у четырехмесячных уровень фермента существенно не изменяется, составляет $260,5 \pm 18,4$. Не существенное повышение активности исследуемого фермента в более зрелые возрастные сроки также дают основание полагать, что усиленное структурно-функциональное формирование слизистого слоя медиальной части кишки у крольчат происходит в течение более ранних фаз питания.

Высокая интенсивность возрастных изменений активности ГТТ в тканях слизистого слоя медиальной части слизистой оболочки

кишки у крольчат отмечается лишь с 6 по 12 сутки их жизни (снижается на 53,5%). Возрастные изменения активности фермента умеренные с 30 по 45 сутки жизни (уменьшается на 30,4%) и с двухмесячного по трехмесячный возраст (возрастает в 1,4 раза).

В тканях мышечного слоя медиальной части двенадцатиперстной кишки активность ГТТ у одно-, шести- и двенадцатисуточных крольчат определяются примерно одинаковыми и относительно низкими величинами, соответственно $263,9 \pm 21,1$, $272,0 \pm 13,7$ и $232,2 \pm 19,2$. Такие результаты исследований приводят нас к предположению, что в течение первых фаз питания у крольчат интенсивность процессов обмена белка с участием исследуемого фермента в тканях мышечного слоя слизистой оболочки медиальной части двенадцатиперстной кишки относительно низкая, структурно-функциональное развитие мышечного слоя в этот промежуток жизни крольчат происходит медленно, двигательная активность медиальной части не высокая, и в этих условиях обеспечивается более глубокое и длительное усвоение нутриентов пищи.

К 18-суточному возрасту крольчат величина фермента в мышечном слое существенно повышается, в 1,5 раза, $p \leq 0,01$, до $374,6 \pm 26,6$. Далее на таком относительно высоком уровне она определяется у 24-суточных, месячных и 45-суточных, соответственно $346,8 \pm 18,6$, $303,3 \pm 22,5$ и $336,0 \pm 20,4$. Очевидно, с возрастом крольчат интенсивность структурно-химического совершенствования мышечного слоя медиальной части кишки существенно повышается и возрастает его роль в передвижении химуса по кишке.

У двухмесячных активность ГТТ достоверно ниже, чем у 45-суточных, на 19,6%, $p \leq 0,05$, и составляет $270,9 \pm 14,3$. В течение последующих месяцев жизни крольчат активность фермента в тканях мышечного слоя медиальной части двенадцатиперстной кишки остается на таком же уровне или на уровне двухмесячных. Весьма вероятно, что формирование мышечного слоя медиальной части кишки, судя по активности ГТТ, в основном завершается к двухмесячному возрасту.

Высокая интенсивность возрастных изменений активности ГТТ в тканях мышечного слоя медиальной части двенадцатиперстной

кишки выявляется лишь с 12 по 18 сутки жизни крольчат (возрастает в 1,5 раза). Достоверное возрастное изменение активности фермента отмечается с 45 по 60-суточный возраст (уменьшается на 19,6%).

В тканях слизистого слоя дистальной части двенадцатиперстной кишки активность ГТТ у одно- и шестисуточных крольчат определяется максимальными величинами, соответственно $430,1 \pm 33,2$ и $425,9 \pm 28,8$. Вероятно, в тканях слизистого слоя дистальной части, как и в тканях слизистого слоя проксимальной и медиальной частей кишки у крольчат, белковый обмен с участием гамма-глутамилтрансферазы наивысший в первые фазы их постнатальной жизни.

К 12-суточному возрасту крольчат уровень фермента в тканях слизистого слоя дистальной части достоверно снижается, на 22,2%, $p \leq 0,05$, до $331,3 \pm 20,1$. В последующем у крольчат 18- и 24-суточных уровень фермента не изменяется, определяется соответственно величинами $324,2 \pm 19,9$ и $326,0 \pm 21,6$. Повторное достоверное снижение активности ГТТ отмечается у месячных, на 19,5%, $p \leq 0,05$, до $242,6 \pm 17,7$. Такая же величина фермента обнаруживается у 45-суточных ($245,8 \pm 15,2$) и двухмесячных ($221,2 \pm 12,5$). По-видимому, волнообразное снижение активности гамма-глутамилтрансферазы в тканях слизистого слоя дистальной части кишки от двенадцатисуточного по двухмесячный возраст отражает снижение активности белкового обмена с участием исследуемого фермента, зависит от тонкого структурно-функционального приспособления слизистого слоя дистальной части кишки, как и других частей, к усвоению разнообразных компонентов поступающего корма в этот промежуток жизни крольчат.

У более физиологически зрелых, у трех- и четырехмесячных крольчат, активность фермента существенно выше, чем у крольчат предыдущего возраста, в 1,6, $p \leq 0,01$ и 1,7 раза, $p \leq 0,01$, определяется соответственно на уровне $355,8 \pm 27,1$ и $369,4 \pm 31,3$. Можно допустить, что интенсивное структурно-химическое формирование слизистого слоя дистальной части кишки у взрослых крольчат продолжается, однако в меньшей степени, чем у новорожденных.

Интенсивность возрастных изменений активности ГТТ в тканях слизистого слоя дис-

тальной части двенадцатиперстной кишки у крольчат наиболее выражена с двухмесячного по трехмесячный возраст (увеличивается в 1,6 раза). Достоверные возрастные изменения активности фермента обнаруживаются с 6 по 12 сутки (снижается на 22,2%) и с 24 по 30 сутки (падает на 19,5%) жизни крольчат.

В тканях мышечного слоя дистальной части двенадцатиперстной кишки активность ГТТ у одно- и шестисуточных крольчат характеризуется более высокими величинами, соответственно $318,4 \pm 19,9$ и $323,1 \pm 23,3$. Таким образом, в отличие от предыдущих частей, белковый обмен здесь с участием гамма-глутамилтрансферазы в ранние фазы питания крольчат находится на высоком уровне, следовательно, интенсивное формирование мышечной активности этой части кишки начинается раньше, чем других частей двенадцатиперстной кишки.

У 12-суточных крольчат активность ГТТ определяется на уровне $242,8 \pm 12,8$. Эта величина ниже, чем у 6-суточных на 24,9%, $p \leq 0,05$. Такой же уровень фермента обнаруживается у 18- ($254,8 \pm 15,7$) и 24-суточных ($245,6 \pm 17,2$), месячных ($223,4 \pm 16,2$), а также 45-суточных ($254,3 \pm 13,5$). Полученные результаты, вероятно, отражают временное замедление структурно-функционального совершенствования мышечного слоя дистальной части кишки с 12- по 45-суточный возраст.

В последующем, к двухмесячному возрасту, активность ГТТ возрастает существенно, в 1,4 раза, $p \leq 0,01$, до $352,5 \pm 19,8$. У трех- и четырехмесячных крольчат в тканях мышечного слоя дистальной части двенадцатиперстной кишки активность фермента сохраняется на уровне двухмесячных. Возможно, интенсивность формирования мышечного слоя дистальной части кишки у физиологически зрелых крольчат снова возрастает для повышения ее двигательной функции.

Выраженные возрастные изменения активности ГТТ в тканях мышечного слоя дистальной части слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки определяются с 6 по 12 сутки (снижается на 24,9%) и с 45-суточного по двухмесячный возраст (повышается в 1,4 раза).

Выводы

1. Крольчата рождаются с относительно высокой активностью гамма-глутамилтрансферазы в тканях слизистого слоя и низкой – в

тканях мышечного слоя проксимальной, медиальной и дистальной частей двенадцатиперстной кишки.

2. Возрастные изменения активности гамма-глутамилтрансферазы происходит пофазно. В тканях слизистого и мышечного слоев она более интенсивно изменяется в первую, третью фазу молочного и во вторую фазу растительного питания.

3. Активность гамма-глутамилтрансферазы стабилизируется в тканях слизистого слоя проксимальной, медиальной и дистальной частей с трехмесячного, а мышечного слоя – в тканях проксимальной части с месячного, а медиальной и дистальной частей – с двухмесячного возраста.

Библиографический список

1. Биссвангер, Х. Практическая энзимология / Х. Биссвангер // Изд-во «Бином. Лаборатория Знаний». – М., 2010. – 328 с.
2. Игнатьев, Н.Г. Глутамилтрансфераза в тканях толстого кишечника у молодняка свиней / Н.Г. Игнатьев, М.Г. Терентьева // Ученые записки КГБВМ. – Казань, 2014. – Т. 119.-С.-267-271.
3. Терентьева, М.Г. Активность γ -глутамилтрансферазы в тканях желудка у поросят / М.Г. Терентьева, Н.Г. Игнатьев // Аграрный вестник Урала. – 2011. – №9(88). – С. 33-39.
4. Терентьева, М.Г. Активность Г-Глутамилтрансферазы в тканях печени при добавлении в рацион свиней БВМД / М.Г. Терентьева / Maetrialy v111 miedzynarodowej naukowopraktycznej konferencji «Nauka i innowacja – 2012» / М.Г. Терентьева / Przemysli Nauka i Studia. -2012. – S. 96-98.
5. Терентьева, М.Г. Глутамилтрансфераза в тканях толстого кишечника у молодняка свиней / М.Г. Терентьева, Н.Г. Игнатьев / Ученые Записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – Казань. - 2014. –Т. 219. – С.267-271.
6. Терентьева, М.Г. Уровень γ -глутамилтрансферазы в тканях поджелудочной железы у поросят при включении в рацион свиней БВМД / М.Г. Терентьева, Н.Г. Игнатьев // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. - №12 (86) –С. 76 -78.
7. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных // Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР №775 от 12.03.1977.