

Розділ 7

БІОХІМІЯ І ФІЗІОЛОГІЯ

УДК 636.4:612.8

АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНОВОЇ ЛАНКИ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У СВИНЕЙ ЗА ДІЇ ТЕХНОЛОГІЧНОГО СТРЕСУ

Данчук О.В., к.вет.н., доцент, докторант (olexdan@ukr.net)

Карповський В.І., д.вет.н., професор,

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ,

Анотація. Активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази у гемолізатах еритроцитів свиней сильних типів ВНД у період відносного спокою достовірно не відрізняється, натомість у свиней слабого типу ВНД достовірно нижче від показників тварин сильних типів ВНД. Дія стресового фактора сприяє зниженню активності глутатіонної ланки антиоксидантного захисту у тварин всіх типів ВНД. У тварин сильних типів ВНД активність ензимів у гемолізатах еритроцитів протягом 5 діб після дії стресового фактора повертається до норми, а у тварин слабого типу ВНД вірогідно не змінюється. У тварин сильних типів ВНД, не залежно від фізіологічного стану, глутатіонова ланка системи антиоксидантного захисту збалансована. Дія стресового фактора сприяє зростанню індексу збалансованості глутатіонної системи антиоксидантного захисту у свиней слабого типу ВНД, що свідчить про незбалансованість системи антиоксидантного захисту. Отже, у свиней слабого типу ВНД встановлено низький рівень активності глутатіонної ланки антиоксидантного захисту, що свідчить про низьку адаптаційну здатність і стресостійкість тварин.

Ключові слова: глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, вища нервова діяльність, свині, стрес.

Актуальність проблеми. Однією із умов існування живого організму є забезпечення фізіологічної рівноваги внутрішнього середовища, зокрема, збалансованість утворення вільних радикалів та їх утилізація [1]. У системі антиоксидантного захисту важливу роль відіграє глутатіонова ланка системи антиоксидантного захисту (відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонредуктаза(ГР)), яка сприяє збереженню гомеостазу. ГП – каталізує відновлення перекисів ліпідів у відповідні спирти та відновлює пероксид гідрогену до води. ГР –відновлює дисульфідний зв'язок окисленого глутатіону GSSG до його сульфгідрильної форми GSH [2]. Відновлення глутатіону відбувається за рахунок енергії НАДФ-Н. В еритроцитах до 10% споживаної глюкози використовується на відновлення глутатіону глутатіонредуктази [3].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Відлучення свиноматок від поросят, перегруповання, зміна режиму годівлі і складу раціону призводить до розвитку стресу із активізацією пероксидного окиснення ліпідів, зниженням активності системи антиоксидантного захисту (САЗ), що обумовлює зменшення продуктивності і резистентності тварин [3, 4]. Інтенсивність вільнорадикального окиснення визначається не лише швидкістю утворення вільних радикалів, але і функціональним станом САЗ, що залежить від типологічних особливостей нервової системи [3-6].

Мета і завдання дослідження – дослідити активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази у гемолізатах еритроцитів свиней за дії технологічного стресу.

Матеріали і методи дослідження. Робота виконувалась на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Експериментальні дослідження проводилися на свинофермі ТОВ СП «Нібулон» філія «Мрія» с. Сокіл Кам'янець- Подільського району Хмельницької області. Для проведення даного експерименту було підібрано 40 підсисних поросят великої білої породи. До двомісячного віку поросята утримувались під свиноматками у типових приміщеннях. У 60-ти денному віці проводили відлучення,

вакцинацію проти бешихи та формували групи на дорощування. У 90-добовому віці проведено ревакцинацію тварин. На 180-ту добу досліджень тварин переводили в літній табір та проводили перерозподіл груп. Тварини в сформованих групах утримувались на сухому концентратному типі годівлі, доступ до води – вільний.

У 5-ти місячному віці у всіх тварин визначали силу, врівноваженість і рухливість нервових процесів модифікованої методикою розробленою на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології тварин НУБіП України [7]. На підставі аналізу отриманого матеріалу було сформовано 4 групи, по 10 тварин у кожній: I група - сильний врівноважений рухливий тип (СВР); II група - сильний врівноважений інертний тип (СВІ); III група - сильний неуврівноважений тип ВНД (СН); IV група - слабкий тип вищої нервової діяльності (С). У 30, 60, 61, 65, 90, 91, 95, 120, 150, 180, 181, 185 та 210-ти добовому віці у всіх тварин брали кров. У гемолізатах еритроцитів крові визначали: активність глутатіонредуктази за принципом, що фермент за участю відновлених форм піридиннуклеотидів переводить окислену форму глутатіону у відновлену, за ступенем зростання якого в середовищі інкубації розраховується активність ферменту; глутатіонпероксидази за методом Моїна В.М. [8]. Розраховували індекс збалансованості глутатінової ланки системи антиоксидантного захисту (ГП/ГР).

Результати дослідження. Проведені дослідження свідчать, що активність ГП та ГР у гемолізаті еритроцитів свиней сильних типів ВНД у період відносного спокою достовірно не відрізняється. Натомість у свиней слабого типу активність ензимів глутатінової ланки системи АОЗ у період відносного спокою достовірно нижче від такої у тварин сильних типів ВНД. Зокрема, активність ГП у еритроцитах свиней слабого типу у 60-, 90- та 180-добовому віці нижче на 13,9 % ($p<0,05$), 13,1 % ($p<0,01$) та 16 % ($p<0,05$) від такої у тварин СВР типу ВНД, а активність ГР із 2-х до 6-місячного віку була нижчою відповідно на 9-30 % ($p<0,05-0,001$) від показників тварин СВР типу ВНД (табл. 1).

Після відлучення проходить зниження активності ГП та ГР у поросят всіх типів ВНД. Однак, якщо у тварин сильних типів ВНД активність ензимів знижувалась на 10-15 %, то у тварин слабого типу у 1,2-1,3 раза ($p<0,001$). Слід також зазначити, що активність ферментів глутатінової ланки САЗ у еритроцитах поросят сильних типів ВНД через 5 діб після відлучення зростає і вірогідно не різниться із такою до стресу. Тоді, як у тварин слабого типу ВНД за даний період вірогідно не змінюється та залишається на 30-32 % нижчою ($p<0,001$) від показників тварин сильних типів ВНД.

Таблиця 1

Активність глутатінової ланки системи антиоксидантного захисту в еритроцитах свиней ($M\pm m$, $n=5$)

Вік, діб	Тип ВНД			
	СВР	СВІ	СН	С
Активність глутатіонпероксидази (мкмоль відновленого глутатіону/л×хв.×10 ³)				
30	24,05±1,2	23,46±1,28	24,91±1,2	23,06±1,13
60	30,66±1,84	29,54±1,5	30,12±1,11	26,4±1,38*
61	27,34±1,67	26,63±0,71	25,47±0,73	18,84±0,48***
65	28,08±1,37	26,76±0,32	27,64±1,01	19,77±0,77***
90	26,5±0,73	25,21±1,86	25,89±1,54	23,02±1,16**
91	26,35±1,31	24,04±1,14	23,75±1,23	19,48±0,89***
95	25,84±2,02	24,06±1,55	24,63±1,79	20,4±1,37*
120	24,1±1,73	24,91±1,38	24,47±1,29	22,7±1,85
150	20,66±1,03	20,02±1,54	21,33±1,01	19,49±0,85
180	22,04±1,3	20,88±1,22	20,94±1,49	18,52±0,92*
181	18,62±1,15	17,55±0,43	17,13±0,56	15,3±1,02*
185	22,32±0,77	19,34±1,29*	20,62±0,36*	14,88±1,1***
210	24,86±1,68	24,64±1,49	25,02±1,06	22,1±1,1
Активність глутатіонредуктази (мкмоль окисненого глутатіону/л×хв)				
30	206,4±7,0	205,8±6,0	215,3±8,2	189,8±7,2
60	206,6±9,5	200,5±8,8	194,5±5,2	172,0±7,2**
61	186,3±7,1	171,2±7,6	168,5±9,6	135,7±1,8***
65	210,5±4,2	183,8±6,7**	193,0±3,0**	142,7±5,7***
90	204,6±7,0	206,5±7,1	213,9±6,2	167,9±8,5***
91	192,3±9,6	191,0±9,4	187,0±4,7	161,2±4,9***
95	231,7±10,1	217,4±7,7	224,8±6,4	163,6±3,8***
120	244,7±3,7	242,4±4,1	245,6±2,3	218,7±6,8***

150	243,2±9,8	244,3±10,0	245,9±7,3	212,7±4,9***
180	237,7±4,4	245,8±6,7	242,1±7,7	215,8±8,1**
181	204,7±7,3	190,1±7,3	184,4±8,7*	140,2±6,3***
185	268,5±6,6	238,6±3,8*	251,8±4,3	136,4±4,7***
210	298,1±6,4	301,3±6,5	306,6±6,0	204,6±6,3***

Примітка. Достовірні різниці: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$.

Дія біологічного подразника (ревакцинація) у меншій мірі впливає на активність ензимів глутатіонової системи АОЗ ніж стрес-відлучення. Так активність ензимів у еритроцитах свиней сильних типів ВНД достовірно не змінюється, однак у поросят слабого типу ВНД активність ГП знижується на 15,4 % ($p<0,01$).

Технологічний стрес (переведення тварин у літній табір та перегрупування) сприяв зниженню активності ГП у еритроцитах кров свиней сильних типів ВНД на 16-18 % ($p<0,05$) та ГР на 14-24 % ($p<0,05-0,001$), натомість у тварин слабого типу ВНД активність ензимів знижувалась на 35 % ($p<0,001$). Очевидно, зниження активності ферментів проходить через прискорення старіння еритроцитів в наслідок активізації ПОЛ. Уже через 5 діб після дії технологічного подразника у еритроцитах крові свиней сильних типів ВНД активність ензимів достовірно зростала, а у тварин слабого типу ВНД достовірно не змінюється і навіть показує тенденцію щодо зниження.

Таблиця 2

Індекс збалансованості глутатіонової ланки системи антиоксидантного захисту у свиней ($M\pm m, n=5$)

Вік, діб	Тип ВНД			
	СВР	СВІ	СН	С
30	0,117±0,008	0,114±0,007	0,117±0,008	0,122±0,008
60	0,151±0,016	0,150±0,014	0,155±0,008	0,155±0,012
61	0,147±0,008	0,157±0,009	0,153±0,011	0,139±0,003
65	0,134±0,008	0,146±0,006	0,144±0,006	0,140±0,009
90	0,130±0,005	0,122±0,005	0,122±0,010	0,137±0,005
91	0,139±0,012	0,128±0,011	0,127±0,007	0,122±0,008
95	0,113±0,013	0,111±0,009	0,110±0,008	0,125±0,010
120	0,098±0,007	0,103±0,006	0,100±0,005	0,104±0,008
150	0,085±0,004	0,083±0,008	0,087±0,004	0,092±0,005
180	0,093±0,006	0,085±0,006	0,087±0,007	0,086±0,006
181	0,091±0,005	0,093±0,005	0,094±0,007	0,109±0,004*
185	0,083±0,001	0,081±0,005	0,082±0,001	0,109±0,007***
210	0,084±0,006	0,082±0,005	0,082±0,003	0,109±0,007**

Примітка. Достовірні різниці: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$.

Проведені дослідження показали, що індекс збалансованості глутатіонової ланки САЗ (ГП/ГР) протягом першого півроку життя свиней знижується майже на третину ($p<0,001$), тоді, як у тварин слабого типу ВНД відмічено лине тенденцію щодо його зниження (у межах 12 %). Не залежно від етіології стресу показник ГП/ГР у свиней сильних типів ВНД достовірно не змінюється, що свідчить про збалансованість глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Натомість у свиней слабого типу ВНД технологічний стрес (переведення тварин у літній табір та перегрупування тварин) сприяв зростанню індексу ГП/ГР протягом доби на 26,7 % ($p<0,001$), в наслідок чого даний показник вище на 14,7 % ($p<0,05$) від такого у тварин сильних типів ВНД.

Отже, у свиней слабого типу ВНД встановлено низький рівень активності глутатіонової ланки антиоксидантного захисту, що свідчить про низьку адаптаційну здатність і стресостійкість тварин.

Висновки

1. Активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази у гемолізатах еритроцитів свиней сильних типів в період відносного спокою достовірно не відрізняється, натомість у свиней слабого типу достовірно нижче від показників тварин сильних типів ВНД.

2. Дія стресового фактора сприяє зниженню активності глутатіонової ланки антиоксидантного захисту у тварин всіх типів ВНД. Якщо у тварин сильних типів активність ензимів протягом 5 діб після дії стресового фактора повертається до норми, то у тварин слабого типу ВНД вірогідно не змінюється.

3. Не залежно від етіології стресу індекс збалансованості глутатіонової ланки системи антиоксидантного захисту у свиней сильних типів ВНД достовірно не змінюється, натомість у свиней

слабкого типу ВНД достовірно зростає, що свідчить про незбалансованість системи антиоксидантного захисту.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробці нових, сучасних методів корекції активності системи антиоксидантного захисту із урахуванням типологічних особливостей нервової системи.

Літератури

1. Raha S. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing / S. Raha, B. H. Robinson // Trends Biochem. Sci. — 2000. — Vol. 25, No. 10. — P. 502–508.
2. Данчук В.В. Оксидативний стрес — патологія чи адаптація? / В.В. Данчук, О.В. Данчук, Н.Л. Цепко // Тваринництво України. 2004, №4. С. 21-23.
3. Данчук О.В. Активність ферментативної системи антиоксидантного захисту у еритроцитах свиней різних типів вищої нервової діяльності / О.В. Данчук // Міжвідомчий тематичний науковий збірник Інституту свинарства і АПВ НААН. — Випуск 67. Полтава, 2015. С. 149-152.
4. Данчук О.В. Індекси інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів у свиней за дії стресового фактора / О.В. Данчук, В.І. Карповський, В.В. Данчук // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Жицького, Том 18. № 1 (65). Частина 2. - 2016. С. 48-52.
5. Карповський В. І. Типи вищої нервової діяльності великої рогатої худоби та характер адаптаційних реакцій на дію зовнішніх подразників: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 03.00.13, 16.00.02 / В. І. Карповський; Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. — К., 2011. — 42 с.
6. Карповський П. В. Кортико-вегетативні взаємини в регуляції фізіологічних функцій організму свиней / П. В. Карповський, В. В. Карповський, А. В. Трокоз, А. О. Ландсман, В. М. Скрипкіна, Р. В. Постой, Д. І. Криворучко, В. О. Трокоз, В. І. Карповський // Біологія тварин. - 2015. - 17, № 2. - С. 65-73
7. Патент на корисну модель № 70344 Україна. А01К 67/00, А61Д 99/00. Спосіб визначення типів вищої нервової діяльності свиней / В. О. Трокоз, В. І. Карповський; А. В. Трокоз, В. В. Пузир, А. П. Василів. — Заявник і власник НУБіП України, № u201113008. — Заявл. 04.11.2011, опубл. 11.06.2012, бюл. №11, Патент на корисну модель №78853. А01К 67/00, А61Д 99/00.
8. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Мн.: Белорусь. 2002, Т.2. 463 с.

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНОВОГО ЗВЕНА СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У СВИНЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СТРЕССА

А.В. Данчук, В.И. Карповский

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев.

Аннотация. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в гемолизатах эритроцитов свиней сильных типов ВНД в период относительного покоя достоверно не отличается, зато у свиней слабого типа ВНД ниже показателей животных сильных типов ВНД. Действие стрессового фактора способствует снижению активности глутатионного звена антиоксидантной защиты у животных всех типов ВНД. У животных сильных типов ВНД активность ферментов в гемолизатах эритроцитов в течение 5 суток после действия стрессового фактора возвращается к норме, а у животных слабого типа достоверно не изменяется. У животных сильных типов ВНД, независимо от физиологического состояния, глутатионовое звено системы антиоксидантной защиты сбалансировано. Действие стрессового фактора способствует росту индекса сбалансированности глутатионовой системы антиоксидантной защиты у свиней слабого типа ВНД, что свидетельствует о несбалансированности системы антиоксидантной защиты. Итак, у свиней слабого типа ВНД установлен низкий уровень активности глутатионного звена антиоксидантной защиты, что свидетельствует о низкой адаптационной способности и стрессоустойчивости животных.

Ключевые слова: глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, высшая нервная деятельность, свиньи, стресс.

ACTIVITY GLUTATHIONE LINK OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN PIGS OF TECHNOLOGICAL STRESS

O.V. Danchuk, V. I. Karpovsky

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. The activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase in erythrocytes of pigs severe types of HNA in the period of relative calm were not significantly different, whereas pigs weak type HNA significantly lower than strong indicators of animal types HNA. Action stressors glutathione reduces

the activity level of antioxidant protection in animals of all types of HNA. Animals severe types of HNA enzyme activity in erythrocytes within 5 days after exposure to stressors returns to normal and the animals weak type HNA likely not change. Animals severe types of HNA, regardless of the physiological state, glutathione link antioxidant defense system balanced. Action stressors contributes index glutathione balance of antioxidant protection in pigs HNA weak type, indicating the imbalance of antioxidant protection. So, swine weak type HNA set to low-level activity glutathione antioxidant, indicating that the low adaptive capacity and stress animals.

Key words: glutathione peroxidase, glutathione reductase, higher nervous activity, pigs, stress.

УДК 612.014: 576.3:602.018.26.9

РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ЯДЕРНОГО БІЛКА Ki-67 МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ З ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ СОБАКИ ЗА РІЗНИХ ПАСАЖІВ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO

Кладницька Л. В., к. вет. н., доцент,

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Анотація. Визначено рівень експресії ядерного білка Ki-67 стовбуровими клітинами з жирової тканини собаки за різних і пізніх пасажів культивування, що характеризується високими показниками маркера проліферації – $299,3 \pm 0,77$ та $250,7 \pm 12^*$ балів відповідно. Швидкість формування моношару зі збільшенням кількості пасажів знижується, що засвідчує достовірне зниження рівня експресії у культурі клітин Ki 67 на 17%. Встановлено достовірні обернені кореляційні зв'язки кількості пасажів культури стовбурових клітин з жирової тканини з експресією маркерів проліферації $r = -0,78^*$ ($p < 0,05$). Досліджено достовірний вплив процесу культивування культури стовбурових клітин з жирової тканини собаки in vitro на їх проліферативну активність – $\eta^2 = 0,83^*$.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, собаки, жирова тканина, проліферативна активність, Ki 67.

Актуальність проблеми. Відомо, що стовбурові і ракові клітини не підпадають під ефект Хейфліка, за яким кількість поділів соматичних клітин обмежена. У процесі культивування відбувається вплив на культуру клітин різних факторів, зокрема, хімічних реагентів за пасажування та культивування, перебування клітин поза межами організму, часу, тобто кількості мітотичних циклів. Ядерний білок Ki-67 експресується на стадіях клітинного циклу в G1, S, G2 і M-фазах, окрім G0, і використовується в якості маркера клітинної проліферації [4, 6].

Отже, дослідження антигену Ki-67 на різних етапах культивування стовбурових клітин дасть можливість охарактеризувати біологічні особливості культури за різних пасажів культивування.

Завдання дослідження. Дослідити проліферативну активність мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини собаки на різних пасажах культивування.

Матеріал і методи дослідження. Робота виконувалась на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Усі дослідження на тваринах були проведені з дотриманням закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986). У стерильних умовах під час планових операцій (оваріогістероектомія, ушивання грижі) у собак віком до 12-ти місяців відбирали 10-20 г жирової тканини. Зі зразків жирової тканини шляхом культивування у CO₂ інкубаторі отримували культуру стовбурових клітин [1, 2, 5]. Процес формування моношару клітин здійснювали візуально за допомогою мікроскопа Axiovert 40.

Для дослідження експресії маркера проліферації Ki 67 клітини отриманої культури IV та X-го пасажів висаджували на покривні скельця у чашках Петрі та культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37°C, 5 % вмісту CO₂ у середовищі DMEM (Sigma) з додаванням 10-