УДК 616-002.3-039.71

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И ФОРМИРОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ НА УРОВНЕ МЕМБРАН ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Овчаренко С.В., Ковалёва А.А., Кучма И.Ю., Лахман С.М., Волянский А.Ю., Волков А.А.
ГП «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины», г. Харьков

Весьма важной и по-прежнему актуальной для биологии и медицины остается проблема стресса и его влияния на различные функциональные системы организма. Стресс нам представляется фактором, оказывающим выраженное повреждающее действие на органы и системы макроорганизма, ведущим к разбалансировке гомеостаза и развитию заболеваний. С другой стороны стресс необходимо рассматривать и как способ экстренного повышения резистентности организма к действию экстремальных факторов различного генеза.

Важным проявлением стресс-реакции и адаптационной перестройки является фенотипическое ускорение во времени регуляторных механизмов, участвующих в поддержании оптимального уровня интенсивности обменных процессов в различных органах и ситемах. При этом, несомненно, должны существовать органоспецифические особенности мобилизации различных механизмов защиты при стрессе и реализации стресс-реакции на уровне отдельных органов и тканей.

Механизмы и последствия стресс-реакции в организме зависят не только от метаболических возможностей различных тканей, но и от возраста индивидуума. При этом возрастной аспект проявляется свободнорадикальной деструкцией липидных компонентов тканей, достаточно широко озвученный в доступной литературе, он нуждается в существенном переосмыслении касательно закономерностей стресс-реакций на различных этапах онтогенеза в динамике, что позволит существенно углубить представления о возрастных особенностях механизмов адаптации к экстремальным стресс-индуцирующим воздействиям.

Одной из таких стресс-реакций является рабдомиолиз – синдром, который развивается вследствии повреждения скелетных мышц, сопровождается разрушением свободного миоглобина и элиминацией в межклеточную жидкость и кровь продуктов его распада. Среди многих компонентов миоглобина именно гем характеризуется выраженными прооксидантными свойствами. На наш взгляд гем способен инициировать оксидативный стресс.

В более молодом возрасте в числе причин заболеваний, ведущих к острому некрозу скелетных мышц, могут быть наследственные нарушения. Другие причины (травма, инфекция) способны вызвать рабдомиолиз в любом возрасте.

В столь острой ситуации все живое давно бы оказалось на грани вымирания, если бы не обладало мощными системами адаптации к экзогенным факторам, способностью поддерживать свою «химическую чистоту» на определенном уровне, позволяющем обеспечивать функционирование биохимических систем в рамках возрастной нормы.

В последнее десятилетие становится очевидным факт, что при взаимодействии организма с различными негативными факторами внешней среды одним из показателей стационарных химических превращений в клетках и тканях живого организма может служить морфофункциональная полноценность мембранных структур.

Защита тканей от окислительного стресса обеспечивается специальной антиоксидантной системой, задачей которой является предохранение клеток, тканей и органов от избыточного образования свободнорадикальных молекул (низкомолекулярные антиоксиданты и белки-ферменты). В числе последних супероксиддисмутаза (СОД), превращающая супероксид-анион в пероксид водорода. Пероксид водорода, характеризуется выраженной гидрофобностью в сравнении с кислородом он легко элиминирует из клетки, в противном же случае подвергается воздействию каталазы и пероксидазы, в результате чего превращается в воду.

Таким образом, наличие в эукариотической клетке антиоксидантных ферментов и кислородных радикалов в итоге приводит к появлению нерадикальных соединений – пероксид водорода↓ или воды. Образующиеся соединения уже не представляют непосредственной угрозы для существования клетки, потому как пероксид водорода инертен, а кислород сам по себе является слабым окислителем. Гидроксид-радикал также представляет собой один из факторов окислительной модификации многих клеточных структур (может окислять молекулы белков и липидов). Особенно активно он атакует мембранные липиды, содержащие ненасыщенные двойные связи. Реализуется весьма распространенный функциональный организменный процесс – перекисное окисление липидов (ПОЛ) – приводящий к образованию липидных гидроперекисей и изменению свойств клеточных мембран.

Формирование защитных реакций при оксидативном стрессе в возрастном аспекте изучен недостаточно, результаты исследований трактуются неоднозначно и даже противоречиво. Целью данной работы определено изучение показателей системы антиоксидантной защиты у подопытных животных одно- и трехмесячного возраста при экспериментальном рабдомиолизе.

Материалы и методы исследований. Исследования выполнены с использованием белых крыс одномесячного и трехмесячного возраста. Перекисное окисление липидов и активность каталазы исследовали в гомогенатах тканей печени и сердца.

Контрольным животным вводили физический раствор. В качестве инициатора оксидативного стресса использовался 50 % глицерол, антиоксидантом выступал токоферол.

Интенсивность ПОЛ определяли по скорости накопления малонового диальдегида (МДА). Это соединение представляет собой конечный продукт пероксидного оксиления липидов, который при взаимодействии с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) образует окрашенный в розовый цвет триметиновый комплекс с максимумом поглощения при 530-532 нм. Таким образом, окраска исследуемого раствора прямо коррелирует с концентрацией малонового диальдегида. Определение МДА по цветной реакции с ТБК является лишь одним из методов изучения ПОЛ в биологических системах, однако именно скорость спонтанного и аскорбатзависимого неферментативного ПОЛ в гомогенатах тканей наиболее четко отражается в содержании МДА в исходном гомогенате. Для повышения интенсивности ПОЛ используется соль Мора и аскорбиновая кислота. С целью определения активности каталазы применён метод, основанный на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдата аммония стойкий окрашенный комплекс. Интенсивность окраски раствора в динамике опыта измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм.

Результаты исследования обрабатывались общепринятым статистическим методом Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты эксперимента по определеню активности каталазы (н моль МДА (мл.час)) у одномесячных животных представлены в табл. 1:

Таблица 1 – Уровень активности каталазы в гомогенатах печени и сердца на фоне введения глицерола

Наименование субстрата н.моль МДА, мл/час	*Печень*		*Сердце*	
	контроль	*опыт*	*контроль*	*опыт*
Глицерол через 4 часа	36,9 s=5,66	67,6 s=15,13*	17,67 s=2.67	58,2 s=23,08*
Глицерол через 24 часа	31,55 s=3,48	48,02 s=10,28*	18,7 s=3,08	39,53 s=16,09*

Примечание: **p<0,05, S – стандартное отклонение по выборке*

Уровни интенсивности ПОЛ в гомогенатах печени экспериментальных животных иллюстрирует табл.2

Таблица 2 – Уровни интенсивности ПОЛ в гомогенатах печени эксперементальных животных

Уровни интенсивности ПОЛ, н.моль МДА, мл/час	*Группы глицерола (через 4 часа)*		*Группы глицерола (через 24 часа)*		*Группы токоферола (через 6 часов)*		*Группы токоферола (через 26 часов)*		
	контроль	*опыт*	*контроль*	*опыт*	*контроль*	*опыт*	*контроль*		*опыт*
Одномесячные животные									
Спонтанный уровень ПОЛ	162,09 s=46,47	308,39, s=106,52*	107,56 s=49,39	228,18 s=101,67*	-	-	-		-
Аскорбатзави-симый. уровень ПОЛ	166,8, s=1,96	283,38, s=41,64*	102,89, s=37,08	151,9, s=23,92	-	-	-		-
Исходный уровень ПОЛ	23,08, s=3,52	44,7, s=15,36*	16, s=1,3	38,57, s=18,31*	-	-	-		-
Трехмесячные животные									
Спонтанный уровень ПОЛ	100,24, s=38,22	188,28 s=75,62*	206,86 s=85,84	163,98 s=45,55	100,24, s=38,22	171,38 s=37,95*	206,86 s=85,84	274,36 s=77,81	
Аскорбатзави-симый. уровень ПОЛ	102,32 s=40,39	152,98 s=39,16	164,53 s=58,1	171,04 s=45,8	102,32 s=40,39	138,24 s=59,7	164,53 s=58,1	240,13 s=93,23	
Исходный уровень ПОЛ	17,24 s=7,59	29,96 s=5,98*	21,9 s=7,69	24,39 s=6,16	17,24 s=7,59	24,82 s=9,83	21,9 s=7,69	33,08 s=10,37	

Примечание: **p<0,05, S – стандартное отклонение по выборке.*

Уровни интенсивности ПОЛ (н моль МДА(мл.час)), полученные при проведении опытов с гомогенатами сердца экспериментальных трехмесячных животных, представлены в табл. 3

Таблица 3 – Уровни интенсивности ПОЛ (н моль МДА(мл.час)), полученные при проведении опытов с гомогенатами сердца экспериментальных трехмесячных животных

Уровни интенсивности ПОЛ н.моль МДА, мл/час	*Группы глицерола (через 4 часа)*		*Группы глицерола (через 24 часа)*		*Группы токоферола (через 6 часов)*		*Группы токоферола (через 26 часов)*	
	контроль	*опыт*	*контроль*	*опыт*	*контроль*	*опыт*	*контроль*	*опыт*
Спонтанный уровень ПОЛ	159,17 s=21,3	197,51 s=45,3	187,01 s=42,68	169,33 s=39,99	159,17 s=21,3	237,07 s=49,51*	187,01 s=42,68	246,4 s=40,56
Аскорб.-зав. Уровень ПОЛ	136,38 s=62,17	211,03 s=54,75	149,12 s=25,13	184,77 s=46,06	136,38 s=62,17	151,56 s=51,58	149,12 s=25,13	218,08 s=42,57*
Исходный уровень ПОЛ	20,17 s=4,43	40,26 s=7,59	25,35 s=1,76	27,13 s=6,01	20,17 s=4,43	25,68 s=8,91	25,35 s=1,76	36; s=8,35*

Примечание:**p<0,05, S – стандартное отклонение по выборке.*

Из представленных данных следует, что после введения глицерола экспериментальным животным одномесячного возраста активность каталазы в сердце и печени резко возросла. Исследование интенсивности ПОЛ у одномесячных животных подтвердило резкое возрастание интенсивности уровней спонтанного и исходного ПОЛ в гомогенатах печени. Значительно повысился уровень интенсивности аскорбатзависимого ПОЛ через 4 часа, тогда как тогда как у трехмесячных животных было зафиксировано повышение спонтанного и исходного уровней ПОЛ в печени крыс уже через 4 часа. Зафиксировано повышение уровня интенсивности спонтанного ПОЛ в сердце трехмесячных животных, которым вводили токоферол через 6 часов, и повышение уровня интенсивности исходного и аскорбатзависимого ПОЛ в группе животных, которым вводили токоферол через 26 часов. Отмечено также повышение уровня спонтанного ПОЛ в печени трехмесячных животных при введении токоферола через 6 часов.

Выводы. Проведенные эксперименты показали, что глицерол является сильным стимулятором окислительного стресса и способен вызвать рабдомиолиз у животных. Согласно полученным результатам, токоферол в ряде случаев также способен оказывать прооксидантные свойства. Описаное явление в данном конкретном случае, может быть связано с некоторыми генетическими аномалиями, с одной стороны, и дозировкой препарата, с другой. Однако, проблема прооксидантного действия токоферола требует более глубокого изучения.

Список литературы

1. Агол, В.И. Генетически запрограммированная смерь клеток / Соровский образовательный журнал 1996г. №6, С. 20-24. ***2.*** Арчаков, А.И. Оксигенация биологических мембран. – М., Наука, 1975, –54с. ***3.*** Бабийчук, В.Г. Перекисное окисление липидов при экстремальном охлажде-

нии крыс - 2007. №1, с.112 **4.** Владимиров, Ю.А. Биологические мембраны и мембраноактивные соединения/ Ташкент, ФАН, 1985 – е14-28. **5.** Строев, Б.А. Биологическая химия. – М.,Высшая школа, 1986, С. 450-451. **6.** Строев, Б.А., Макарова, В.Г. Практикум по биологической химии. М., Высшая школа, 1986, с.213. **7.** Stadtman, E.R. Levine, R.L. Protein oxidation// Annu. N.Y. Acad. Sci 2000. Vol.97. P. 191-207/

OXIDATIVE STRESS AND DEFENSE REACTIONS FORMATION OF ANIMALS AT THE LEVEL OF MEMBRANES OF EUKARYOTIC CELLS

Ovcharenko, S.V., Kovalova A.A., Kuchma I.J., Lachman S.M., Volyanskaya A.Y., Volkov A.A.
GU «Institute of Microbiology and Immunology named after I.I. Mechnikov of AMS of Ukraine»

The degree of influence of glycerol on the development and course of oxidative stress in experimental animals of different ages is determined. Investigation of catalase activity and levels of LPO conducted by comparing the impact of glycerol with tocopherol. The necessity and possibility of further in-depth study of stress reactions eukaryotic cells in model experiments with a certain patology are showed.

УДК 619:636.082.453.5:612.014.466

ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНА САНАЦІЯ ЕНДОМЕТРІЯ КОРІВ ПРЕПАРАТОМ «УТЕРОСАН» – ШЛЯХ ДО ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ШТУЧНОГО ОСІМЕНІННЯ

Павленко М.П., Чечьоткіна Н.П., Павленко Л.М., Явніков Н.В., Макеєв В.Ф., Олійник О.В.
ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Ефективність штучного осіменіння в скотарстві ще недостатня, про що свідчить значний відсоток самиць, які запліднюються лише після декількох осіменінь або залишаються яловими. Зниження ефективності осіменіння корів обумовлюється, насамперед, загибеллю зародків на ранніх стадіях ембріогенезу та під час імплантації. У цей період зовнішні екстремальні фактори можуть порушувати процеси взаємозв'язку ембріона з материньским організмом і, як наслідок, призводити до аборту. Однією з головних причин порушень імплантації та ранньої ембріональної смертності є мікробний фактор, тобто інфікування матки мікрофлорою сперми, а також нестерильними інструментами та внаслідок недотримання операторами правил асептики і антисептики при проведені штучному осіменінні [1, 2, 3]. Мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності, поряд з прямою згубною дією на ендометрій і зародок, можуть стимулювати утворення простагландину $F_2\alpha$, який проявляє лютеолітичну дію, у зв'язку з чим мікробний фактор слід розглядати як одну із суттевих причин абортів і перегулів корів.

В якості засобів санації матки використовують антибіотики та інші антимікробні засоби. Проте їх ефективність не завжди задовільна.

Для оптимізації умов імплантації ембріонів, нами запропоновано лікувальний препарат «Утеросан» і спосіб передімплантаційної санації ендометрія, який базується на введенні сануючого препарату у порожнину матки після осіменіння корови на (6-8) годину, тобто у той період, коли спермії знаходяться у яйцепроводі і є недосяжними для прямого контакту із сануючим препаратом. Діючою речовиною препарату «Утеросан» є: йод, диметилсульфоксид та новокаїн.

Метою наших досліджень було вивчення ефективності штучного осіменіння корів при застосуванні нового препарату для предімплантаційної санації ендометрія.

Матеріали і методи. Дослід з визначення дози препарату для введення у матку проводили на 15 коровах АФ «Борисфен» Дніпропетровської області. Було сформовано 3 групи по 5 голів в кожній, жива вага дослідних корів становила – 400-450 кг, 450-550 кг і 550-700 кг відповідно. Масу тіла визначали шляхом зважування тварин. Введення препарату коровам у матку проводили за допомогою модифікованого пристрою для вимивання ембріонів. Фізрозчин вводили в дозах від 40 до 70 $см^3$. Пристрій являє собою двоканальний катетер зі зворотнім током рідини, на кінці катетера знаходиться силіконова пробка, яка щільно закриває шийку матки і попереджує витікання рідини. Після наповнення матки виміряною кількістю фізрозчина, яке контролювали ректально-гінекологічним дослідженням, надлишок його через гумову трубку витікав у мірний циліндр, що фіксувався.

Охоту в корів визначали візуальним способом за рефлексом нерухомості. Оптимальний час осіменіння визначали за станом дозрівання фолікула ректальним дослідженням яєчників. Корів осіменяли при наявності зрілого флюктуючого фолікула з застосуванням сперми, замороженої за французькою технологією.

Клінічні дослідження з визначення ефективності препарату «Утеросан» були проведені в трьох тваринницьких господарствах України. Ефективність запропонованого способу передімплантаційної санації ендометрія вивчена на 120 коровах, з яких 60 були дослідними, а 60 – контрольні.

Оцінку ефективності санації матки визначали шляхом порівняння рівня запліднюваності тварин дослідної і контрольних груп.

Результати досліджень. Дослідним тваринам вводили, в залежності від їхної ваги, від 40 до 70 мл фізрозчину, надлишок становив від 1 до 8 мл, табл. 1.

Таблиця 1 − Визначення дози препарату «Утеросан» для санації матки в залежності від ваги корів

Група, n – 5	*Жива вага, кг, M±m*	*Кількість введеного фіз.розчину, $см^3$*	*Залишилося в матці, $см^3$, M±m*	*Надлишок фізрозчину, $см^3$, M±m*
1	420±6,5	40	38,4±0,51	1,6±0,25
2	504±7,1	55	49,6±0,65	5,4±0,45
3	644±8,4	70	63,2±0,44	6,6±0,54

За результатами досліджень встановлено, що доза сануючого препарату повинна становити від 40 $см^3$ до 65 $см^3$, у залежності від живої ваги корів.

Час введення сануючого препарату після одноразового осіменіння визначали на 5 дослідних коровах. З метою встановлення терміну знаходження живих сперміїв у матці через 2, 4, 6, 8 і 10 годин після осіменіння проводили промивання матки ізотонічним розчином (2,8 %) цитрату натрія. Дослідженням встановлено, що у промивній рідині матки живих сперміїв не знаходили