

Замазій А.А., кандидат ветеринарних наук

Полтавська державна аграрна академія

Камбур М.Д., доктор ветеринарних наук

Сумський національний аграрний університет

**ПРОЦЕСИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ
У НОВОНАРОДЖЕНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНО АКТИВНИХ,
ГІПОКСИЧНИХ ТЕЛЯТ ТА КОРІВ-ПОРОДІЛЬ**

Рецензент – кандидат ветеринарних наук С.О. Кравченко

Результати проведених досліджень свідчать, що стани гіпоксії новонароджених телят супроводжуються активацією процесів перекисного окиснення ліпідів, які переважають в гемолізаті еритроцитів. Активність каталази залежно від ступеня гіпоксії знижується в середньому в 1,69 рази ($p < 0,01$), підвищується вміст гідроперекисів ліпідів малонового діальдегіду. Відносний вміст гідроперекисів підвищується ймовірно, співвідношення МДА/ліпіди збільшується в 2,10 рази. Отримані результати вказують на зменшення частоти захворювань серед новонароджених і зниження перинатальної смертності.

Ключові слова: перекисне окиснення, гемолізат, каталаза, активність, малоновий діальдегід, ліпіди.

Постановка проблеми. Відповідь організму на постійно змінні умови зовнішнього середовища існування заснована на його здатності активувати потужні системи захисту з метою підтримки сталості структури і функції – гомеостазу і енантіостазу. Виникаюче при цьому періодичне зміщення метаболічної рівноваги індукує багатокomпонентну відповідь, спрямовану на подолання виникаючого дисбалансу. Ясно, що крім швидкореалізуємої компенсаторної відповіді, при наявності сигналу, що перевищує термінові захисні можливості клітини, процес продовжується у часі і йде іншими метаболічними шляхами, але з тією ж метою досягнення енантіостазу. В цьому плані важливе значення мають процеси перекисного окиснення ліпідів.

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв’язання даної проблеми. Гіпоксія плода і новонародженого займає ведуче місце в структурі перинатальної захворюваності і смертності. Важливою умовою зменшення частоти захворювань серед новонароджених і зниження перинатальної смертності є своєчасна діагностика гіпоксії.

Запропоновані різноманітні способи діагностики гіпоксії плода і новонароджених, однак існуючі методи не виявляють початкових ознак гіпоксії на рівні клітинних мембран. Відомо, що явища гіпоксії і метаболічні зсуви тісним чином пов’язані із структурно-функціональними змінами клітинних мембран, серед яких велике значення мають перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) і антиокислювальна активність (АОА).

Мета і завдання досліджень. Дослідити процеси перекисного окиснення ліпідів у новонароджених функціонально активних і гіпоксичних телят та корів-породіль.

Матеріали і методи досліджень. У досліді вивчали процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в організмі телят залежно від їх функціонального стану після народження та у корів – матерів.

Для виконання поставленого завдання були відібрані 4 групи телят по 3 голови в кожній: група функціонально активних новонароджених телят та три групи телят, що народились з ознаками гіпоксії (I – телята, що народились у стані асфіксії, або з наявним меконієм у навколоплідної рідини, II – телята, які після народження мали спонтанне неадекватне дихання, III – телята, які після народження мали спонтанні, адекватні дихальні рухи).

Визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів у телят проводили після їх народження, для цього проводили відбір проб крові з судин пуповини (після народження). У корів відбір проб крові проводили з молочної підшкірної вени після отелення.

Продукти перекисного окиснення ліпідів визначали в гемолізатах еритроцитів і плазмі крові з використанням методичних рекомендацій «Дослідження пероксидної окисдації ліпідів та антиоксидантного захисту організму

в клінічній практиці» Інституту патології крові та трансфузійної медицини АМН України (м. Львів, 2002 р.).

Результати досліджень. Результати наших досліджень свідчать про суттєві відмінності вмісту ацилгідропериксидів в крові новонароджених телят, залежно від їх фізіологічного стану при народженні. У функціонально активних телят вміст гідроперексидів ліпідів, які мають важливе значення для оцінки активації процесів перекисного окиснення в плазмі крові, становив $0,46 \pm 0,017$ од. Залежно від ступеня гіпоксичного ураження телят даний показник значно зростає. Так, у гіпоксичних телят першої групи вміст ацилгідроперексидів в плазмі крові був вищим у 2,63 рази ($p < 0,001$), ніж у функціонально активних телят (табл. 1).

1. Показники ПОЛ в крові новонароджених функціонально активних телят та тих, що народились з ознаками гіпоксії (М $\pm$ т, n=3, після народження)

Показники	Група функціональноактивних телят (контроль)	Дослідні групи телят, що народились з ознаками гіпоксії			У середньому
		I	II	III	
Активність каталази, мкат/л	$59,31 \pm 1,92$	$35,07 \pm 1,91^{\square}$	$45,19 \pm 0,31$	$52,29 \pm 0,52$	$44,18 \pm 0,91^{\blacksquare}$
Вміст гідроперексидів ліпідів, (ΔD_{233} на 1 мл плазми крові)	$0,46 \pm 0,017$	$1,21 \pm 0,045^{\square}$	$0,87 \pm 0,012$	$0,70 \pm 0,017$	$0,92 \pm 0,025^{\blacksquare}$
Пероксидна резистентність еритроцитів, %	$2,89 \pm 0,11$	$6,39 \pm 0,54^{\blacklozenge}$	$5,06 \pm 0,19^{\blacksquare}$	$3,41 \pm 0,09$	$4,98 \pm 0,27^{\blacksquare}$
Загальні ліпіди, г/л	$2,81 \pm 0,02$	$2,62 \pm 0,009$	$2,75 \pm 0,009$	$2,85 \pm 0,015$	$2,74 \pm 0,011$
АОА (ум.од.)	$1,14 \pm 0,026$	$0,69 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,015$	$1,08 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,022$
Вміст малонового диальдегіду, нмоль/л.	$0,28 \pm 0,013$	$0,69 \pm 0,007^{\blacksquare}$	$0,58 \pm 0,012$	$0,45 \pm 0,015$	$0,57 \pm 0,011$
Відносний вміст ацилгідроперексидів (ΔD_{233} на 1 мг ліпідів)	$0,16 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,011^{\blacklozenge}$	$0,32 \pm 0,014^{\blacklozenge}$	$0,25 \pm 0,009^{\blacksquare}$	$0,34 \pm 0,011$
Коефіцієнт МДА/ліпіди, нмоль/мг	$0,10 \pm 0,001$	$0,26 \pm 0,0012^{\blacksquare}$	$0,21 \pm 0,0011$	$0,16 \pm 0,0009$	$0,21 \pm 0,0011$

Примітка: $^{\square} p < 0,05$; $^{\blacksquare} p < 0,01$; $^{\blacklozenge} p < 0,001$ у порівнянні з групою функціонально активних телят

У плазмі крові телят двох останніх дослідних груп (II та III) гідроперексидів виявлено в 1,89–1,52 рази ($p < 0,001$) більше, ніж в плазмі крові функціонально активних новонароджених телят. У телят другої – третьої групи вміст

ацилгідроперекісів у плазмі крові був у 1,39–1,73 рази нижчим у порівнянні з даним показником телят першої групи ($p < 0,001$), але залишався вище, ніж у плазмі крові функціонально активних телят.

Про активність процесів ПОЛ свідчить відносний вміст ацилгідроперекісів, які утворюються на 1 мг ліпідів. Так, у функціонально активних телят даний показник становив $0,16 \pm 0,01$. Він був значно більшим у телят першої групи (в 2,88 рази, $p < 0,001$), що свідчить про вищий рівень процесів перекисного окиснення ліпідів. У телят другої та третьої групи даний показник був нижчим у порівнянні з тваринами першої групи (в 1,44–1,84 рази, $p < 0,001$), але залишався вищим, ніж у функціонально активних телят (в 2,00–1,56 рази, $p < 0,001$). Загальних ліпідів виявлено в крові функціонально активних телят більше, ніж у крові гіпоксичних телят.

Важливим показником процесу активації ліпідної пероксидації є активність каталази. Результати наших досліджень свідчать про зниження активності даного ферменту у крові гіпоксичних телят. Так, якщо в сироватці крові функціонально активних новонароджених телят активність каталази становила $59,31 \pm 1,92$ мкат/л., то в сироватці крові гіпоксичних телят першої групи вона була в 1,69 рази нижче ($p < 0,001$). У сироватці крові гіпоксичних телят другої та третьої групи активність каталази була вищою у порівнянні з першою групою (в 1,29–1,13 рази, $p < 0,05$). В той же час вона залишалася в 1,31 ($p < 0,05$) та в 1,13 рази нижчою у телят другої та третьої групи у порівнянні з її активністю у сироватці крові функціонально активних новонароджених телят.

Проведені нами дослідження також виявили відмінності перекисної резистентності еритроцитів (ПРЕ) у піддослідних телят. У функціонально активних телят перекисна резистентність еритроцитів становила $2,89 \pm 0,11\%$, тоді як за дії гіпоксичного фактору цей показник виявився нижчим: у телят першої групи в 2,21 рази ($p < 0,001$), другої – в 1,75 рази ($p < 0,001$) та третьої – в 1,18 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з функціонально активними телятами. Вважають, що величина перекисного гемолізу еритроцитів в значній мірі залежить від забезпечення організму вітаміном Е. Виходячи з цього, можливо припус-

тити недостатню забезпеченість вітаміном Е організму телят дослідних груп. У той же час, нестача вітаміну Е супроводжується активацією процесів ПОЛ в організмі, яка викликає зміни жирнокислотного складу та підвищення в'язкості клітинних мембран.

Одним із продуктів, який утворюється в процесі пероксидації ліпідів, є малоновий діальдегід. Даний метаболіт визнають основним показником вмісту перекисів, що утворились в процесі ПОЛ (вторинний продукт перекисного окиснення ліпідів).

Встановлено, що під впливом гіпоксії вміст продуктів ПОЛ в крові телят дослідних груп (перша–третя) виявлявся вірогідно вищим, ніж у функціонально активних телят. Про активацію ПОЛ в організмі телят даних груп свідчить коефіцієнт МДА/ліпіди, який у функціонально активних телят становив $0,01 \pm 0,0001$, що в 2,60, 2,10, і 1,6 рази вище, ніж у телят, що народились з ознаками гіпоксії ($p < 0,001$).

Поряд з цим, у телят першої групи вміст кон'югованих кетонів у плазмі крові виявився в 2,06 рази вищим, ніж у телят, що народились функціонально активними ($p < 0,001$). Вміст даних продуктів ПОЛ в плазмі крові телят двох останніх груп був незначно нижчим, ніж у телят першої групи. В той же час, вміст кон'югованих кетонів у плазмі крові телят другої та третьої групи був в 1,94 – 1,49 рази нижчим, ніж у телят контрольної групи ($p < 0,01$). Подібну картину нами встановлено за вмістом дієнкетонів в плазмі крові телят (рис. 1).

У телят першої – третьої групи їх вміст у плазмі крові після народження був в 2,06, 1,87 та 1,38 рази вищим, ніж у телят, що народились функціонально активними ($p < 0,001$). Вміст кінцевих молекулярних продуктів ПОЛ найбільш значним був у плазмі крові телят першої групи: в 2,53 рази ($p < 0,001$) більшим, ніж у телят контрольної групи.

Поряд з цим, необхідно підкреслити, що процеси перекисного окиснення ліпідів в еритроцитах крові телят усіх груп виявилися значно активнішими (рис. 2). Навіть у телят контрольної групи вміст кон'югованих дієнів, дієнкетонів та шифових основ в гемолізатах еритроцитів на перше дослі-

дження після народження був значно вищим, ніж у плазмі крові (відповідно, у 3,79, 4,57 та 6,67 рази, $p < 0,001$).

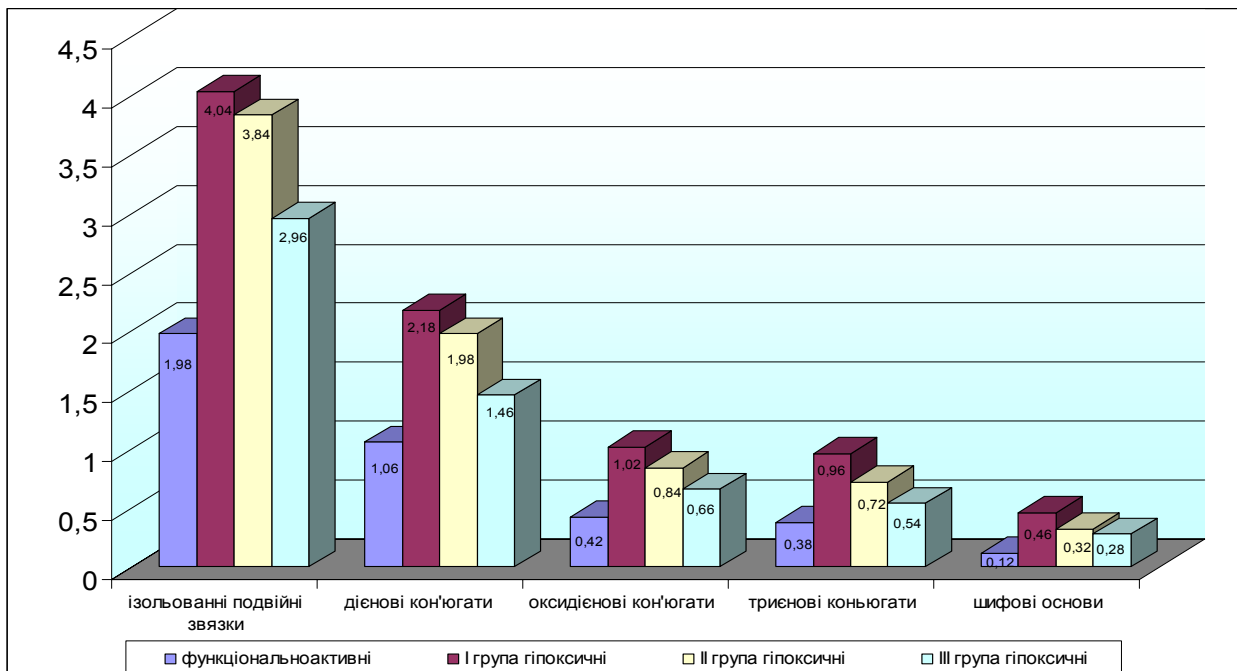


Рис. 1. Вміст продуктів ПОЛ та ізолюваних подвійних зв'язків у плазмі крові новонароджених телят (після народження).

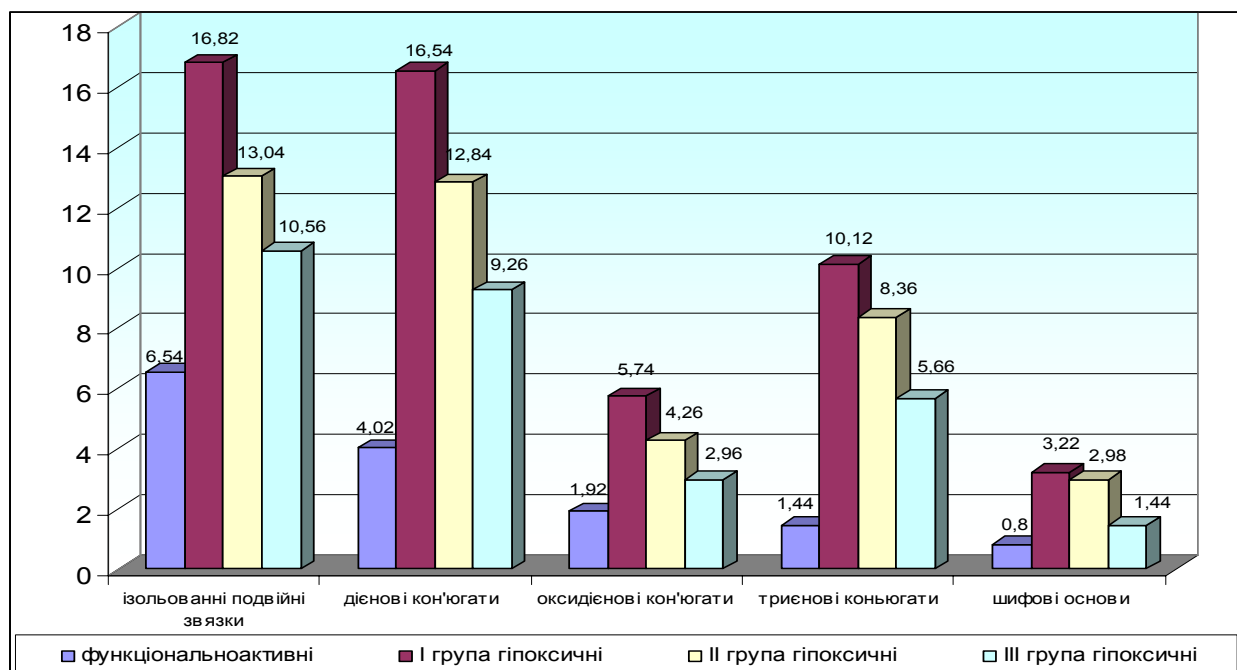


Рис. 2. Вміст продуктів ПОЛ та ізолюваних подвійних зв'язків у гемолізаті еритроцитів новонароджених телят (після народження).

Вміст дієнових кон'югатів у гемолізатах еритроцитів новонароджених телят першої групи виявився вищим (в 4,11 рази, $p < 0,001$), ніж у телят контрольної групи. Оксидієнових кон'югатів та кінцевих молекулярних продуктів

ПОЛ виявлено тут в 2,99–4,03 рази більше, ніж у телят, що народились функціонально активними (контроль). У тварин другої та третьої групи вміст вищезазначених продуктів пероксидної оксидації ліпідів в еритроцитах був нижчим, ніж у телят першої групи, однак він виявився вірогідно вищим, ніж у телят контрольної групи.

Вміст кінцевих продуктів ПОЛ в гемолізатах еритроцитів трьох дослідних груп телят був вищим, ніж у телят контрольної групи (у 4,03, 3,68 і 1,80 рази, $p < 0,001$).

Проведені нами дослідження виявили також активування ПОЛ в крові корів–матерів, що народили телят з ознаками гіпоксії. Відомо, що неускладнена вагітність тварин, як фізіологічний стан, пов'язаний з великими енергетичними витратами на біосинтетичні процеси, потребує більшої кількості оксигену і тому характеризується інтенсифікацією клітинного дихання та, як наслідок, є оксидативним стресом. Весь період тільності корів, як відзначалося в огляді літератури, супроводжується активізацією ПОЛ.

У той же час, розвиток плоду, який ускладнений гіпоксією, характеризується значним дисбалансом в системі про/антиоксиданти, підвищеним рівнем ПОЛ.

Вплив такого агресивного внутрішньоутробного оточення (вільні радикали, токсичні продукти ПОЛ) на плід, що формується, не міг не позначитися на функціонуванні цілого ряду метаболічних систем, у тому числі і системи антиоксидантного захисту (табл. 2).

Нами встановлено, що активність каталази у корів, що народили функціонально активних телят, відповідала $45,34 \pm 1,11$ мкат/л. У корів, від яких отримані телята з ознаками гіпоксії, даний показник відразу після отелу виявився в 1,66 рази вище ($p < 0,01$). На п'яту добу після отелу активність даного ферменту в крові корів гіпоксичних телят залишалась в 1,52 рази вище, ніж у крові корів функціонально активних новонароджених телят ($p < 0,01$). Вміст гідроперекисів ліпідів (ΔD_{233} на 1 мл плазми крові) в крові корів контрольної групи після отелу та на 5-у добу після неї виявився в 2,94 – 3,1 рази нижчим,

ніж у корів, від яких отримані телята з ознаками гіпоксії. Це суттєво вплинуло на відносний вміст ацилгідроперекисів (ΔD_{233} на 1 мг ліпідів) у крові корів, які народили телят з ознаками гіпоксії. Параметри даного показника виявились у крові корів дослідної групи у 3,1 разу вищим ($p < 0,001$).

2. Показники ПОЛ крові корів, що народили функціонально активних телят та телят з ознаками гіпоксії ($M \pm m$, $n=3$, після отелу)

Показники	Група корів			
	функціонально активних телят		телят, що народились з ознаками гіпоксії	
	1-а доба	5-а доба	1-а доба	5-а доба
Активність каталази, мкат/л	45,34 $\pm$ 1,11	51,56 $\pm$ 1,02	75,20 $\pm$ 1,84**	78,33 $\pm$ 1,91**
Вміст гідроперекисів ліпідів (ΔD_{233} на 1 мл плазми крові)	0,32 $\pm$ 0,08	0,30 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,23***	0,93 $\pm$ 0,23***
Відносний вміст ацилгідроперекисів (ΔD_{233} на 1 мг ліпідів)	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,08***	0,31 $\pm$ 0,08***
Загальні ліпіди, г/л	3,22 $\pm$ 0,79	2,96 $\pm$ 0,73	3,01 $\pm$ 0,74	3,06 $\pm$ 0,75
Вміст малонового діальдегіду, нмоль/л	0,24 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,15***	1,20 $\pm$ 0,29***
Пероксидна резистентність еритроцитів, %	0,84 $\pm$ 0,12	0,92 $\pm$ 0,23	1,12 $\pm$ 0,27*	1,08 $\pm$ 0,27
АОА (ум.од.)	1,57 $\pm$ 0,38	1,62 $\pm$ 0,39	0,86 $\pm$ 0,21	0,94 $\pm$ 0,23
Коефіцієнт МДА/ліпіди, нмоль/мг	0,07 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,05**	0,39 $\pm$ 0,09**

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з групою функціонально активних телят

Вміст малонового діальдегіду в крові корів дослідної групи після отелу становив 0,60 $\pm$ 0,15 нмоль/л, що в 2,5 разу вище, ніж його вміст у крові корів контрольної групи ($p < 0,001$). Нами також встановлено вірогідне підвищення коефіцієнту МДА/ліпіди в крові корів до 0,60 $\pm$ 0,15 – 1,20 $\pm$ 0,29 нмоль/мг після отелу та на 5-у добу після неї.

Виявлені нами зміни у процесах ліпідного переокиснення свідчать про наявність зсуву внутрішньоутробного програмування роботи систем, що контролюють базові складові цього процесу, а саме представлення субстрату (вільних жирних кислот) та активність антиоксидантної системи захисту організму. Процеси перекисного окиснення інтенсивніше перебігали в організмі корів, що народили телят з ознаками гіпоксії. У них вміст ізольованих подвійних зв'язків в екстрагованих ліпідах як після отелу, так і на 5-у добу після отелу був вищим, ніж у корів, що народили функціонально активних телят.

Відносний вміст молекулярних продуктів ПОЛ в гемолізатах еритроцитів також переважав у цих корів.

Після отелу відносний вміст первинних продуктів ПОЛ в плазмі крові корів–породіль функціонально активних телят становив $0,44 \pm 0,11$, а в гемолізаті еритроцитів – $0,57 \pm 0,14$. На 5–у добу після отелу у них спостерігалось незначне підвищення відносного вмісту первинних продуктів ПОЛ, як у плазмі крові, так і у гемолізатах еритроцитів.

Відносний вміст первинних продуктів ПОЛ у гемолізатах еритроцитів корів, які народили телят з ознаками гіпоксії (після отелу – 5–а доба), відповідно становив $0,87 \pm 0,21$ та $0,84 \pm 0,20$. В крові корів – породіль функціонально активних новонароджених телят їх відносний вміст був в 1,53–1,42 рази нижчим. Відносний вміст вторинних продуктів ПОЛ (E_{278}/E_{220}) в плазмі крові корів контрольної групи після отелу та на 5–у добу після неї виявлено на рівні $0,26 \pm 0,06$ – $0,57 \pm 0,14$, а у корів дослідної групи відповідно – $0,19 \pm 0,05$ та $0,27 \pm 0,07$.

Висновки:

1. Встановлено, що процеси ПОЛ під дією гіпоксії активуються.
2. Процеси перекисної оксидзації ліпідів переважають у гемолізатах еритроцитів.
3. Гіпоксія новонароджених телят характеризується виснаженням АОА (АОА у телят, що народились функціонально активними, був у 1,60, 1,27 ($p < 0,01$) та 1,06 рази вище, ніж телят дослідних груп).
4. Активність каталази в крові у корів, що народили телят з ознаками гіпоксії, після пологів була в 1,66 рази ($p < 0,01$) вищою, ніж у корів-матерів функціонально активних телят;
5. Вміст гідропероксидів у їх крові після пологів та на 5-у добу після неї був у 2,94–3,10 рази вищим, ніж у корів, що народили функціонально активних телят, вищим (у 3,1 рази) у них був ($p < 0,001$) відносний вміст гідропероксидів, а коефіцієнт МДА/ліпіди був в 2,86–2,29 рази вищим, ніж у корів першої групи у відповідні періоди ($p < 0,001$).

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Пренатальный гипоксический стресс: физиологические и биохимические последствия, коррекция регуляторными пептидами / Н.А. Соколова, Б.В. Маслова, А.С. Маклакова, И.П. Ашмарин // Успехи физиологической науки. – 2002. – Т. 33. – № 2. – С.56 – 67.
2. Бабінцева А.Г. Патогенетичні засади метаболічної корекції гіпоксичного синдрому у недоношених дітей в ранньому неонатальному періоді / А.Г. Бабінцева, Ю.Д. Годованець // Современная педиатрия. – 2005. – № 2 (7). – С. 161 – 165.
3. Сазонова Т.Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма / Т.Г. Сазонова, Ю.В. Архипенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 3. – С. 2 – 16.
4. Каталаза и глутатионпероксидаза: качественно различная корреляция со скоростью потребления кислорода / Х.К. Мурадов, Н.А.Ушко, Т.Г. Мозжулина [и др.] // Український біохімічний журнал. – 2004. – Т. 76. – № 3. – С. 36 – 41.
5. Афонина Г.Б. Липиды, свободные радикалы и иммунный ответ / Г.Б. Афонина, Л.А. Куюн. – К.: Изд-во НАН Украины, 2000. – 286 с.