

КЛЮЧЕВЫЕ СТРЕСС-ГОРМОНЫ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА РАЗНОГО ВОЗРАСТА

И.П. Степанова, Я.С. Макарова, В.В. Русаков, Л.И. Сукач

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России

Автор, ответственный за переписку:

Макарова Янина Станиславовна, кандидат биологических наук, ассистент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Омск, Россия (644099, г. Омск, ул. Ленина, 12, тел. (3812) 95-70-12, makarova-yanina@mail.ru

Резюме

Цель. Для научного обоснования профилактических мероприятий, направленных на минимизацию пагубного воздействия стресс-факторов, требуется изучение процессов свободнорадикального окисления биомолекул с позиции физиологических механизмов развития стресс-реакций в животном организме. Целью исследования явилось изучение и корреляция показателей про- и антиоксидантной систем и уровня стресс-гормонов крови (АКТГ и кортизол) крупного рогатого скота разного возраста (1-, 3-, 6-, 9- и 12-месячные телки черно-пестрой породы) для коррекции условий содержания и эксплуатации. **Материалы и методы.** Научные исследования проводились на базе ЗАО «Рассвет» Любинского района Омской области на пяти группах клинически здоровых телок черно-пестрой породы по 10 голов каждая, в возрасте 1-, 3-, 6-, 9- и 12-месяцев с аналогичными показателями массы тела. Концентрация супероксиддисмутазы (СОД) эритроцитов крови определялась колориметрическим, глутатионредуктазы – кинетическим методом с помощью коммерческих реактивов фирмы «Randox» (Англия) на автоматическом биохимическом анализаторе «Autolab» AMS PM4000 (производитель «LIVIA» Италия). Концентрация восстановленного глутатиона эритроцитов крови определялась по реакции глутатиона с избытком аллоксана. Определение количества малонового диальдегида проводилось по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Количественное определение уровня АКТГ и кортизола в сыворотке крови проводилось с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (тест Biomerica ELISA, США) на иммуноферментном анализаторе «Elisys Quattro» (производитель Human GmbH Германия). **Результаты.** В результате исследования не выявлено повышение уровня ключевых стресс-гормонов, хотя можно отметить, что наблюдается тенденция к волнообразному изменению уровня АКТГ. Концентрация кортизола сыворотки крови 1-, 3-, 6-, 9-месячных телок примерно одинакова, к 12-му месяцу постнатальной жизни повышается. Интенсивность свободнорадикального окисления, оцененная по содержанию малонового диальдегида в изучаемых возрастных группах животных находится на одном уровне с 1-го по 9-й месяцы. Концентрация глутатиона (неферментативное звено антиоксидантной системы) в эритроцитах крови у 1- и 6-месячных животных выше, чем у 3-, 9- и 12-месячных, основные показатели ферментативного звена антиоксидантной системы – глутатионредуктазы и супероксиддисмутазы находятся в возрастном диапазоне с 1-го по 12-й месяцы примерно на одном уровне. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее уязвимым периодом для действия стресс-факторов является 3-х и 6-ти месячный возраст, когда осуществляется перевод животных на новые условия содержания, причем до 3-х месячного возраста низкий

уровень свободнорадикального окисления поддерживается в основном за счет повышения концентрации в крови глутатионредуктазы, а с 6-ти месячного возраста значительный вклад вносит глутатион. Впервые проведено сравнение показателей антиоксидантного статуса крови крупного рогатого скота разного возраста с уровнем стресс-гормонов (АКТГ и кортизол).

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза, глутатион, малоновый диальдегид, адренкортикотропный гормон, кортизол, крупный рогатый скот.

Введение

По мере роста и развития животного организма происходят определенные изменения всех жизненно важных реакций [1]. Перестройка нейрогуморальных регуляторных систем происходит в зависимости от природы и длительности действия стрессирующих факторов, возрастных, видовых и индивидуальных особенностей организма [2]. В постнатальном онтогенезе выделяют периоды напряжения физиологических адаптационных систем, в частности, перевод животных на новые условия содержания и кормления, что инициирует развитие стресс-реакции, а как следствие выброс стресс-гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Стресс-реакция вызывает незамедлительное и заметное увеличение продукции адренкортикотропного гормона (АКТГ) передней долей гипофиза, приводящее к резкому увеличению секреции кортизола корой надпочечников. Кортизол, в свою очередь, инициирует серию метаболических эффектов, направленных на уменьшение повреждающего действия стрессора [3, 4].

При мобилизации функций органов и тканей, в частности, происходит интенсификация свободнорадикального окисления биополимеров и изменение функционального состояния антиоксидантной системы [5, 6]. Системы, участвующие в образовании свободных радикалов, в частности активных форм кислорода: супероксид-анион радикал, гидропероксидный радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород и пероксид водорода, условно объединяют в понятие «прооксидантная система» [7].

Активные формы кислорода, реагируя с полиненасыщенными жирными кислотами, не только повреждают их структурную и функциональную целостность, но и генерируют целый ряд жирно-кислотных радикалов, которые в последствии реагируют с другими липидами, протеинами и нуклеиновыми кислотами, запуская тем самым каскад переноса электронов, что, в конце концов, приводит к повреждению этих структур – от повышения проницаемости мембран до лизиса клетки [8, 9].

Актуальность данной проблемы повышается в связи с интенсификацией животноводства и увеличением стрессовой нагрузки, в то время как сведений об активности стресс-гормонов недостаточно, а данные об их взаимосвязи с функционированием про- и антиоксидантной систем крови крупного рогатого скота разного возраста отсутствуют. Целью исследования явилось изучение и корреляция показателей про- и антиоксидантной систем и уровня стресс-гормонов крови крупного рогатого скота разного возраста для коррекции условий содержания и эксплуатации. Впервые проведено сравнение показателей антиоксидантного статуса крови крупного рогатого скота разного возраста с уровнем стресс-гормонов (АКТГ и кортизол).

Материал и методы

Научные исследования проводились на базе ЗАО «Рассвет» Любинского района Омской области на пяти группах клинически здоровых телок черно-пестрой породы по 10 голов каждая, в возрасте 1-, 3-, 6-, 9- и 12-месяцев с аналогичными показателями массы тела. В период иссле-

дований животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Кормление осуществлялось по принятым в хозяйстве рационам. Исследования крови проводились в лабораториях кафедр Омского государственного аграрного университета и Омской государственной медицинской академии.

Концентрация супероксиддисмутазы (СОД) эритроцитов крови определялась колориметрическим, глутатионредуктазы – кинетическим методом с помощью коммерческих реактивов фирмы «Randox» (Англия) на автоматическом биохимическом анализаторе «Autolab» AMS PM4000 (производитель «LIVIA» Италия). Концентрация восстановленного глутатиона эритроцитов крови определялась по реакции глутатиона с избытком аллоксана [10]. Определение количества малонового диальдегида проводилось по реакции с тиобарбитуровой кислотой [11].

Количественное определение уровня АКТГ и кортизола в сыворотке крови проводилось с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (тест Biomerica ELISA, США) на иммуноферментном анализаторе «Elisys Quattro» (производитель Human GmbH Германия).

Для статистической обработки данных использовали непараметрические методы анализа (программа StatSoft STATISTICA for Windows 6.0). Статистический анализ данных производился с использованием параметрических и непараметрических критериев. Полученные результаты представлены как M – среднее значение, S – стандартное отклонение, Me – медиана, Q_1 – 25-ый процентиль, Q_3 – 75-ый процентиль, min – минимальное значение, max – максимальное значение. Для выявления связи между количественными признаками определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

Секреция глюкокортикоидов, в том числе кортизола, корой надпочечников зависит от уровня АКТГ, вырабатываемого кортикотропными клетками гипофиза.

Кортизол и АКТГ имеют разнообразные физиологические эффекты. Так, кортизол влияет на метаболизм углеводов, белков и жиров, вызывая повышение уровня глюкозы в крови, стимулируя образование углеводов из аминокислот, снижая синтез белков и увеличивая распад жиров. АКТГ ускоряет выработку стероидных гормонов и обеспечивает поддержание массы надпочечников на стационарном уровне [12].

В постнатальном онтогенезе выделяют переходные стадии, которые можно рассматривать как периоды «физиологического стресса» [4]. К таким периодам можно отнести 3-х и 6-ти месячный возраст животных, когда осуществляется их перевод на новые условия содержания.

По результатам исследования не выявлено значительного повышения уровня ключевых стресс-гормонов (АКТГ и кортизола), хотя наблюдается тенденция к волнообразному изменению уровня АКТГ. Высокая вариабельность значений этого показателя в 3-х месячном возрасте косвенно указывает на индивидуальные особенности реагирования животных на стресс-факторы (рис. 1).

Концентрация кортизола сыворотки крови 1-, 3-, 6-, 9-месячных телок примерно одинакова. К 12-му месяцу постнатальной жизни повышается (рис. 2).

Важно отметить, что уровень кортизола у взрослых животных зависит от физиологического состояния, так у коров он во многом определяется периодом стельности, что подтверждается исследованиями, проведенными в этом же хозяйстве на животных с аналогичной технологией содержания. Концентрация кортизола в крови телок в первые 9 месяцев постнатальной жизни сопоставима со значениями этого показателя у коров на 30-е сутки после отела [13].

Одним из основных продуктов перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид (МДА), образующийся в результате обусловленного свободными радикалами разрыва полиненасыщенных жирных кислот [14].

Интенсивность свободнорадикального окисления, оцененная по содержанию малонового диальдегида в изучаемых

возрастных группах животных находится на одном уровне с 1-го по 9-й месяцы (табл. 1).

Для предотвращения окислительной модификации липидов, белков, нуклеиновых кислот, в клетках имеется универсальная биологическая система естественной детоксикации – антиоксидантная система – комплекс реакций, встречающихся во всех живых организмах от растений до высших животных и человека [15].

Согласованное действие неферментативного (глутатион) и ферментативного (супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза) звеньев антиоксидантной системы обеспечивает неспецифическую резистентность организма, его адаптивные возможности к воздействию разнообразных по своей природе патогенных факторов [16].

Концентрация глутатиона (неферментативное звено антиоксидантной системы) в эритроцитах крови у 1- и 6-месячных животных выше, чем у 3-, 9- и 12-месячных (табл. 1).

Основные показатели ферментативного звена антиоксидантной системы – глутатионредуктаза и супероксиддисмутаза

находятся в возрастном диапазоне с 1-го по 12-й месяцы примерно на одном уровне (табл.1).

Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о том, что до 3-х месячного возраста низкий уровень свободнорадикального окисления поддерживается в основном за счет повышения концентрации в крови глутатионредуктазы, а с 6-ти месячного возраста значительный вклад вносит глутатион. В сравнение с взрослыми животными периода сухостоя и послеотельного периода содержание восстановленного глутатиона примерно одинаково со значениями этого показателя у 9-ти и 12-ти месячных телок [17].

Между уровнем изучаемых гормонов и показателями свободнорадикальных процессов выявлена положительная корреляция в парах: АКТГ – малоновый диальдегид (группа 3-месячных телок); кортизол – глутатион (группа 12-месячных телок); кортизол – глутатионредуктаза (группа 1, 6, 9-месячных телок) (табл. 2).

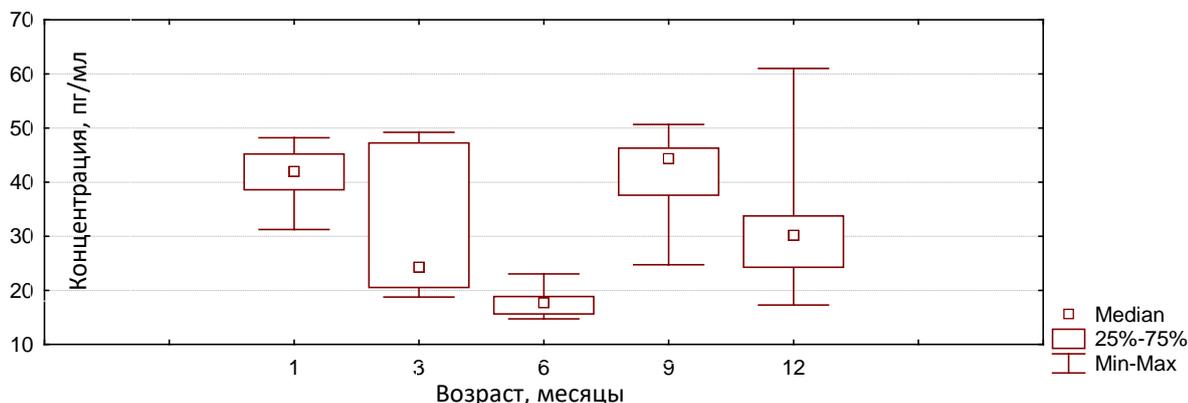


Рисунок 1. Содержание АКТГ в сыворотке крови телок разного возраста

Примечание: Median – медиана, 25% – 25-ый процентиль (Q1), 75% – 75-ый процентиль (Q3), Min – минимальное значение, Max – максимальное значение.

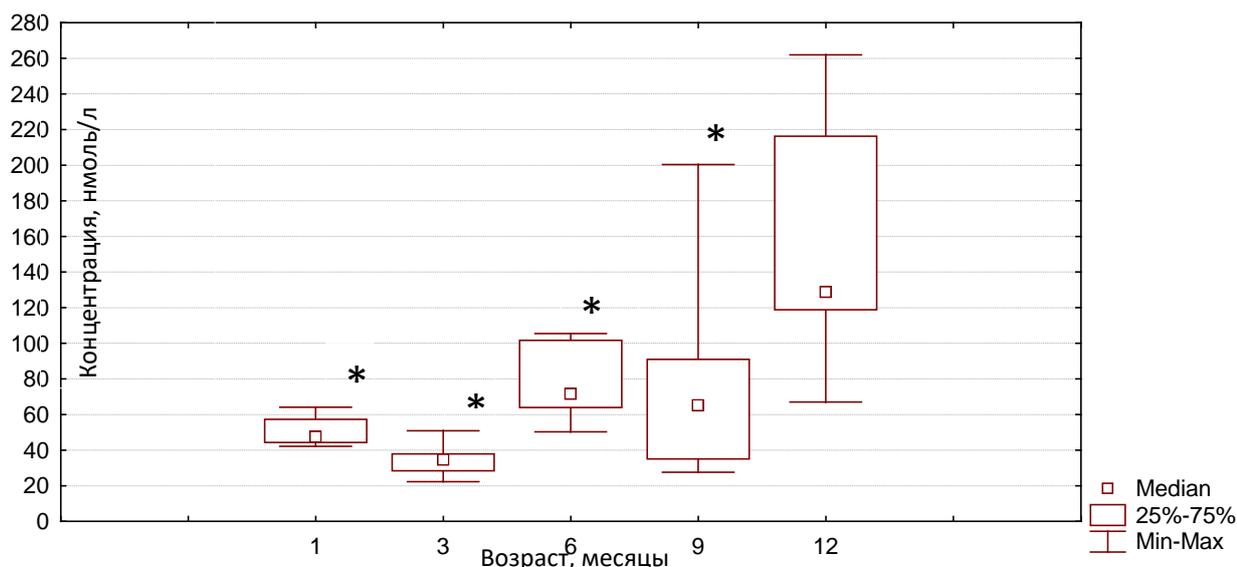


Рисунок 2. Содержание кортизола в сыворотке крови телок разного возраста

Примечание: Median – медиана, 25% – 25-ый процентиль (Q1), 75% – 75-ый процентиль (Q3), Min – минимальное значение, Max – максимальное значение.

Таблица 1. Показатели стандартной формы тестирования про- и антиоксидантной систем крови телок разного возраста

Показатель	Группа телок, n = 10				
	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев (контроль)
Малоновый диальдегид, ммоль /л					
M	0,29	0,28	0,24	0,31	0,21
S	0,03	0,02	0,06	0,03	0,07
Me	0,29	0,29	0,25	0,31	0,23
Q1	0,27	0,26	0,18	0,27	0,21
Q3	0,30	0,30	0,28	0,33	0,24
min	0,25	0,24	0,17	0,25	0,00
max	0,35	0,31	0,33	0,38	0,27
Глутатион, ммоль /л					
M	0,49*	0,20	0,90*	0,15	0,20
S	0,11	0,01	0,11	0,03	0,07
Me	0,50	0,20	0,90	0,15	0,20
Q1	0,40	0,19	0,82	0,14	0,19
Q3	0,50	0,20	1,02	0,16	0,23
min	0,30	0,18	0,79	0,12	0,00
max	0,70	0,24	1,14	0,25	0,27
Супероксиддисмутаза, у.е./мл эр.					
M	57,40	57,06	54,51	56,48	57,09
S	8,82	30,95	13,42	11,40	36,29
Me	56,00	51,12	50,28	53,15	56,72
Q1	52,00	29,15	45,11	48,21	26,19
Q3	61,00	77,80	64,19	69,16	75,80
min	44,00	25,12	38,01	42,05	18,95
max	77,00	116,4	80,16	76,12	135,4
Глутатионредуктаза, ммоль/чл					
M	0,05	0,05	0,04	0,03	0,03
S	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01
Me	0,05	0,05	0,04	0,03	0,03
Q1	0,04	0,04	0,03	0,02	0,02
Q3	0,06	0,06	0,05	0,04	0,04
min	0,03	0,03	0,004	0,02	0,03

max	0,07	0,07	0,10	0,06	0,05
Примечание: * – достоверность различий по сравнению с контролем (p < 0,05)					

Таблица 2. Корреляция АКТГ и кортизола с показателями стандартной формы тестирования свободнорадикальных процессов крови телок разного возраста

Коэффициент корреляции Спирмена, r _s	Группа телок, n = 10				
	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев (контроль)
АКТГ – малоновый диальдегид	-0,242	0,732*	0,607	-0,309	-0,428
АКТГ – глутатион	0,327	0,347	0,522	-0,342	0,398
АКТГ – СОД	-0,457	-0,721*	-0,377	-0,625	-0,511
АКТГ – глутатионредуктаза	-0,271	-0,622	0,427	0,528	0,115
Кортизол – малоновый диальдегид	-0,264	-0,237	-0,503	-0,533	0,555
Кортизол – глутатион	-0,272	-0,287	-0,325	-0,622	0,672*
Кортизол – СОД	0,273	0,386	0,055	0,081	0,167
Кортизол – глутатионредуктаза	0,658*	0,592	0,715*	0,692*	-0,364
Примечание: * – значимость коэффициента корреляции (p < 0,05)					

Обсуждение

Знание механизмов и эффектов взаимодействия антиоксидантной системы с содержанием ключевых стресс-гормонов, позволяющих судить о переходе стресса из необходимого звена адаптации в неспецифический механизм патогенеза заболеваний предоставит возможность своевременно осуществлять научно-обоснованную корректировку условий содержания и кормления молодняка крупного рогатого скота.

Полученные результаты указывают на нестабильность прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови молодняка в период интенсивного роста, развития опорно-двигательного аппарата и органов пищеварительной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты. Вестник РАМН. 1998, 7: 43-51. Vladimirov Ju.A. Svobodnye radikaly i antioksidanty. Vestnik RAMN. 1998, 7: 43-51. [In Russian].
2. Галочкин, В.А., Галочкина В.П., Остренко К.С. Разработка теоретических основ и создание антистрессовых препаратов нового поколения для животноводства. С.-х. биология. 2009, 2: 43-46 (doi: 10.153105/agrobiology.2009.2.255rus, 10.153105/agrobiology.2009.2.255eng). Galochkin, V.A., Galochkina V.P., Ostrenko K.S. Razrabotka teoreticheskikh osnov i sozdanie antistressovykh preparatov novogo pokolenija dlja

В ходе исследования выявлено, что наиболее уязвимым периодом для действия стресс-факторов является 3-х месячный возраст, когда осуществляется перевод животных на новые условия кормления и содержания.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что до 3-х месячного возраста низкий уровень свободнорадикального окисления поддерживается в основном за счет повышения концентрации в крови глутатионредуктазы, а с 6-ти месячного возраста значительный вклад вносит глутатион.

zhivotnovodstva. S.-h. biologija. 2009, 2: 43-46 (doi: 10.153105/agrobiology.2009.2.255rus, 10.153105/agrobiology.2009.2.255eng). [In Russian].

3. Кармалиев Р.Х. Биохимические процессы при свободнорадикальном окислении и антиоксидантной защите. Профилактика окислительного стресса у животных. С.-х. биология. 2002, 2: 19-28. Karmaliev R.H. Biohimicheskie processy pri svobodnoradikal'nom okislenii i antioksidantnoj zashhite. Profilaktika okislitel'nogo stressa u zhivotnyh. S.-h. biologija. 2002, 2: 19-28. [In Russian].

4. Макарова Я.С., Степанова И.П. Про- и антиоксидантная системы крови крупного рогатого скота при различных физиологических состояниях. Зоотехния. 2010, 2: 21-22.
Makarova Ja.S., Stepanova I.P. Pro- i antioksidantnaja sistemy krovi krupnogo rogatogo skota pri razlichnyh fiziologicheskikh sostojanijah. Zootehnija. 2010, 2: 21-22. [In Russian].
5. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина. Концепция долговременной адаптации. М., 1993.
Meerson F.Z. Adaptacionnaja medicina. Konceptija dolgovremennoj adaptacii. M., 1993. [In Russian].
6. Мурадова, Л.В., Сиротина М.В. Уровень кортизола как показатель стрессового состояния животных. Труды Международного Форума по проблемам науки, техники и образования. М., Академия наук о земле, 2008, 2: 78-80.
Muradova, L.V., Sirotina M.V. Uroven' kortizola kak pokazatel' stressovogo sostojanija zhivotnyh. Trudy Mezhdunarodnogo Forumu po problemam nauki, tehniki i obrazovanija. M., Akademija nauk o zemle, 2008, 2: 78-80. [In Russian].
7. Патюков А.Г., Степанова И.П., Макарова Я.С., Атавина О.В. Взаимосвязь содержания стресс-гормонов крови с показателями свободнорадикального окисления биомолекул у телок черно-пестрой породы. Зоотехния, 2012, 10: 21-22.
Patjukov A.G., Stepanova I.P., Makarova Ja.S., Atavina O.V. Vzaimosvjaz' soderzhanija stress-gormonov krovi s pokazateljami svobodnoradikal'nogo okislenija biomolekul u telok cherno-pestroj породы. Zootehnija, 2012, 10: 21-22. [In Russian].
8. Патюков А.Г., Степанова И.П., Макарова Я.С., Мугак В.В. Содержание кортизола и адренокортикотропного гормона в крови крупного рогатого скота при разных физиологических состояниях. Зоотехния. 2014, 4: 28-29.
Patjukov A.G., Stepanova I.P., Makarova Ja.S., Mugak V.V. Soderzhanie kortizola i adrenokortikotropnogo gormona v krovi krupnogo rogatogo skota pri raznyh fiziologicheskikh sostojanijah. Zootehnija. 2014, 4: 28-29. [In Russian].
9. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. В кн.: Современные методы в биохимии. М., Медицина, 1977, С. 66-68.
Stal'naja I.D., Garishvili T.G. Metod opredelenija malonovogo dial'degida s pomoshh'ju tiobarbiturovoj kisloty. V kn.: Sovremennye metody v biohimii. M., Medicina, 1977, S. 66-68. [In Russian].
10. Тиунов Л.А. Механизмы естественной детоксикации и антиоксидантной защиты. Вестник РАМН. 1995, 3: 9-12.
Tiunov L.A. Mehanizmy estestvennoj detoksikacii i antioksidantnoj zashhity. Vestnik RAMN. 1995, 3: 9-12. [In Russian].
11. Штутман Ц.М., Артюх В.П. Вплив вітаміну Е й селену на включення гліцину-2-C₁₄ та формиату-C₁₄ у глутатіон печінки щурів. Український біохімічний журнал. 1970, 42 (6), С. 747-751.
Shtutman C.M., Artjuh V.P. Vpliv vitaminu E j selenu na vkljuchenija glicinu-2-C₁₄ ta formiatu-C₁₄ u glutation pechinki shhuriv. Ukrainskij biohimicheskij zhurnal. 1970, 42 (6), C. 747-751.
12. Bartosz, G. Total antioxidant capacity. Adv. Clin. Chem. 2013, 37: 219-292 (ISBN: 968-0-88330-566-9).
13. Cohen S., Hamrick N. Stable individual differences in physiological response to stressors: implications for stress-elicited changes in immune related health // Brain, Behavior, and Immunity. 2003, 2: 407-414 (doi: 10.1258/ps/79.9.1311).
14. Francis G. High density lipoprotein oxidation: in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. Biochem. Biophys. Acta. 2011, 14: 217-235 (doi: 10.1111/j.1839-0291.2012.02083.x).
15. Inanami O., Okada N., Sato N., Shiga A., Kuwabara M. Lipid peroxidation and antioxidant of sera in new born calves nanami. Mag. Res. Med. 1995, 6: 249-251 (doi: 10.1257/s00404-012-2660-6).
16. Rose R.C., Bode A.M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. J. FASEB. 1993, 7: 1135-1142 (doi: 10.1019/S1782731114000585).
17. Young I.S. Measurement of total antioxidant capacity. J. Clin. Pathol. 2001, 54 (5): 336 (doi: 10.1027/s00259-014-5646-2).