

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ, БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ ТВАРИН

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL AND BIOTECHNOLOGICAL WAYS OF ANIMAL PRODUCTIVITY INCREASING

УДК 661.185.1:599.323.4:612.35:57.015.2

Акимішин М.М., Кузьміна Н.В., Сачко Р.Г., Остапів Д.Д. ©

E-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

Інститут біології тварин НААН, м Львів

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНАХ КОРІВ ЗА НОРМИ ТА ПАТОЛОГІЇ

Вивчали активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту у тканинах яєчників та ендометрії за різних фізіологічних станів статевої залози і при гіпофункції. Дослідження провели на 39 коровах 5–8-річного віку масою тіла 450–500 кг української молочної чорно-рябої породи. Після забою корів відбирали яєчники та матку (верхню третину рогу), оцінювали фізіологічний стан статевих залоз і готували гомогенати з тканин яєчника і ендометрію. У гомогенатах вивчали активність супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) і каталази (КАТ). Встановлено, що активність СОД в тканинах яєчника і ендометрію знаходиться в межах, відповідно, 8,8 - 26,3 і 11,7 - 17,6 МО/мг білка, ГПО - 0,38 - 0,83 і 0,40 - 0,49 та КАТ - 0,97 - 1,19 і 0,63 - 0,76 мкмоль/ хв×мг білка. Активність ензимів антиоксидантного захисту в тканинах яєчника і ендометрію залежить від фізіологічного стану статевої залози. Високі значення активності СОД і КАТ характерні для статевих залоз «раннього» та «пізнього жовтого тіла», а активність ГПО - «фолікулярного росту». При гіпофункції яєчника в тканині статевої залози статистично вірогідно нижчі величини значень активності СОД і ГПО ($p < 0,001$) і КАТ. Подібна відмінність активності ензимів антиоксидантного захисту виявлена в ендометрії корів залежно від фізіологічного стану яєчника. За гіпофункції яєчника в ендометрії понижена активність СОД, КАТ і проявляється тенденція до підвищення ГПО.

Ключові слова: ензими, антиоксидантний захист, яєчник, матка, ендометрій, корова.

УДК 661. 185.1: 599.323.4:612.35: 57.015.2

Акымышин М.М., Кузьмина Н.В., Сачко Р.Г., Остапів Д.Д.
Институт биологии животных НААН, г. Львов

АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНАХ КОРОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Изучали активность ферментативного звена антиоксидантной защиты в тканях яичников и эндометрия при разных физиологических состояниях половой железы и ее гипофункции. Исследования провели на 39 коровах 5–8-летнего возраста массой тела 450–500 кг украинской молочной черно-пестрой породы. После забоя коров отбирали яичники и матку (верхнюю треть рога), оценивали физиологическое состояние половых желез и готовили гомогенаты из тканей яичника и эндометрия. В гомогенатах изучали активность супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГПО) и каталазы (КАТ). Установлено, что активность СОД в тканях яичника и эндометрия находятся в границах, соответственно, 8,8 - 26,3 и 11,7 - 17,6 МО/мг белка, ГПО - 0,38 - 0,83 и 0,40 - 0,49 та КАТ - 0,97 - 1,19 и 0,63 - 0,76 мкмоль/ мин×мг белка. Активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях яичника и эндометрия зависят от физиологического состояния половой железы. Высокие значения активности СОД і КАТ характерны для яичников «раннего» та «позднего желтого тела», а активность ГПО - «фолликулярного роста». При гипофункции яичника в ткани половой железы статистически ниже величины значений активности СОД, ГПО ($p < 0,001$) и КАТ. Похожие различия активности ферментов антиоксидантной защиты выявлены в эндометрии коров в зависимости от физиологического состояния яичника. При гипофункции яичника в эндометрии понижена активность СОД, КАТ и проявляется тенденция к повышению ГПО.

Ключевые слова: ферменты, антиоксидантная защита, яичник, матка, эндометрий, корова.

UDC 661. 185.1: 599.323.4:612.35: 57.015.2

Акымышын М.М., Кузьмина Н.В., Сачко Р.Г., Остапів Д.Д.
Institute of animal biology NAAS, Lviv

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT DEFENCE ENZYMES IN REPRODUCTIVE COW ORGANS WITH AND WITHOUT PATHOLOGIES

Activity of antioxidant defense enzymatic link in cow ovarian tissues and endometrium at normal physiological state and hypofunction was studied. Studies were carried out on 5–9 year old 39 cows with mass 450–500 kg of Ukrainian milk black and white breed. After cow slaughter, ovaries and uterus (top third of horn),

gonade physiological state was examined and homogenates from ovarian tissues and endometrium was prepared. In homogenates activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPO) and catalase (CAT) were determined. It is set that SOD activity in ovarian tissues and endometrium is within, correspondingly, 8,8 – 26,3 i 11,7 – 17,6 UI/mg of protein, GPO – 0,38 – 0,83 and 0,40 – 0,49, CAT – 0,97 – 1,19 and 0,63 – 0,76 $\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}$ of protein. Activity of antioxidant defense enzymes in ovarian tissues and endometrium depends on physiological state of gonade. Ovarian tissues at physiological states of “early” and “late corpora lutea” characterize by increased indexes of SOD and CAT, and GPO activity for “follicular growth”. At ovary hypofunction in gonade tissues and endometrium are low indexes of antioxidant defense enzymes activity SOD and GPO ($p < 0,001$) and CAT. Similar difference between antioxidant defense enzymes activity is determined in cow endometrium in connection with ovarian physiological state. At ovarian hypofunction in endometrium activity of CAT and SOD is lower, and GPO’s activity is tendentious higher.

Key words: *enzymes, antioxidant defense, ovary, uterus, endometrium, cow.*

Вступ. Доведено, що рівень утворення активних форм кисню й активність системи антиоксидантного захисту (АОЗ; ензиматичної та неензиматичної) впливає на функціонування репродуктивних органів самок - яєчника, яйцепроводів, матки, дозрівання та запліднення ооцитів і розвиток плода [1, 2]. При цьому виявлено, що окремі компоненти ензиматичної системи антиоксидантного захисту неоднозначно впливають на відтворну функцію самок. Так, від мишей, у яких відсутні глутатіонпероксидаза (ГПО 1) [3] чи каталаза (КАТ) [4], отримано потомство. Однак, видалення повністю гена ГПО4 [5] призводить до ембріональної смертності, а видалення ядерної [6] чи мітохондріальної форм [7] не порушує відтворну функцію самок. Подібні результати отримані при дослідженні супероксиддисмутази (СОД) [8]. Виявлено, що за відсутності цитозольної СОД самки мишей субфертильні, у яєчниках зменшується кількість передовуляторних фолікулів і жовтих тіл. За відсутності мітохондріальної СОД самки втрачають здатність до статевого дозрівання. Зниження відтворної функції спостерігається й при дефіциті низькомолекулярних антиоксидантів: відновленої форми глутатіону і аскорбінової кислоти [9]. Понижений вміст вказаних сполук у яєчниках призводить до збільшення числа атретичних фолікулів. У самок сільськогосподарських тварин нагромадження продуктів перекисного окиснення і активність ензиматичної системи залежить від стадії статевого циклу та певної патології яєчників [10]. Зокрема, активність церулоплазміну і КАТ високі в період утворення і функціонування жовтого тіла і вагітності.

Оскільки активність ензиматичної системи АОЗ впливає на фізіологічні процеси в репродуктивних органах самок тварин вивчали активність супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази в яєчниках і ендометрії корів впродовж статевого циклу та за патології.

Матеріал і методи. Дослідження провели на 39 коровах 5–8-річного віку масою тіла 450–500 кг української молочної чорно-рябої породи, які належали сільськогосподарсько-виробничому кооперативу «Урожай» Луцького району Волинської області. Стан яєчників корів оцінювали ректальним дослідженням. Забій та відбір матеріалу проводили на м'ясопереробному підприємстві (м. Пустомити). Після забою відбирали яєчники та матку (верхню третину рогу). Яєчники повторно оцінювали за фізіологічним станом і ділили на групи: з «раннім жовтим тілом», діаметр 10 - 20 мм, колір червоний або брунатний (РЖТ); з «пізнім жовтим тілом», діаметр 5–15 мм, колір жовтий (ПЖТ); «фолікулярного росту», без жовтого тіла (ФР) [8]. Крім того, відбирали статеві залози з патологією: гіпофункцією – за відсутністю статевих циклів у корів, у яєчниках - поодинокі антральні фолікули діаметром до 4 мм, тканина пружна. Яєчники промивали 0,9 % розчином натрію хлориду, з фолікулів аспірували антральну рідину. Аналогічно, ріг матки розрізали, промивали 0,9 % розчином натрію хлориду і відпрепарували ендометрій. З тканини статевої залози і ендометрію готували гомогенат: подрібнювали, додавали охолоджений до 0 - 4°C 0,25 М розчин сахарози (1:1 - вага : об'єм) і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера. Гомогенат центрифугували при 3000 об/хв, надосадову рідину відбирали і вивчали активність ензимів антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази (СОД) - за кількістю нітроформазану, що утворюється в реакції між феназинметасульфатом та НАДН (МО/мг білка) [11], каталази (КАТ) методом Королюк М.А. та ін (мкмоль/хв×мг білка) [12], глутатіонпероксидази (ГПО) - з використанням реактиву Елмана (мкмоль/хв×мг білка) [13]. Вміст загального білка у гомогенатах тканин (мг/мл) вивчали методом Lowry [14]. Аналіз результатів досліджень проведено за М. О. Плохінським [15].

Результати досліджень. Активність СОД тканин яєчника і ендометрію знаходиться в межах, відповідно, 8,8 - 26,3 і 11,7 - 17,6 МО/мг білка, ензимів, що руйнують H_2O_2 : ГПО - 0,38 - 0,83 і 0,40 - 0,49 мкмоль/хв×мг білка та КАТ - 0,97 - 1,19 і 0,63 - 0,76 мкмоль/ хв×мг білка (табл.).

Коливання величин значень активності ензимів АОЗ в тканинах яєчника і ендометрію залежать від фізіологічного стану статевої залози. Високі значення активності СОД характерні для статевих залоз «раннього» та «пізнього жовтого тіла» і нижчі на 29,7 % ($p < 0,01$) і 66,6% ($p < 0,001$), відповідно, за «фолікулярного росту» і гіпофункції.

Подібні відмінності активності ензиму виявлені в тканині ендометрію: вища величина значення показника при фізіологічному стані яєчника «раннього жовтого тіла» ($18,8 \pm 3,51$ МО/мг білка), майже такі ж величини при «фолікулярному рості» і «пізньому жовтому тілі» (17,0 - 17,6 МО/мг білка). Понижена активність СОД виявлена в ендометрії при гіпофункції яєчника. Різниця між максимальною і мінімальною величинами значення показника - 37,8 %.

Таблиця

Активність ензимів антиоксидантної системи в репродуктивних органах корів

Тканини за фізіологічного стану:	n	Активність ензимів		
		СОД, МО/мг білка	ГПО, мкмоль/хв×мг білка	КАТ, мкмоль/хв×мг білка
Яєчника:				
РЖТ	11	26,0±1,38	0,68±0,034	1,16±0,220
ПЖТ	16	26,3±1,87	0,71±0,064	1,19±0,104
ФР	14	18,5±1,33**	0,83±0,065	1,08±0,079
Гіпофункції	6	8,8±1,61***	0,38±0,082***	0,97±0,175
Ендоетрію:				
РЖТ	8	18,8±3,51	0,42±0,085	0,76±0,176
ПЖТ	7	17,0±3,10	0,46±0,111	0,72±0,162
ФР	4	17,6±3,18	0,40±0,163	0,69±0,176
Гіпофункції	3	11,7±1,02	0,49±0,056	0,63±0,024

Примітка. Різниця статистично вірогідна порівняно до максимальної величини значення - **p < 0,01; *** p < 0,001

Аналогічна залежність встановлена при вивченні активності ензимів, що перетворюють H_2O_2 . Так, активність ГПО у яєчниках найвища за «фолікулярного росту» (0,83±0,065 мкмоль/ хв×мг білка), менша на 14,5 та 18,1 %, відповідно, при «пізньому» та «ранньому жовтому тілі» і найнижча (0,38±0,082 мкмоль/ хв×мг білка) за гіпофункції. Різниця між мінімальним і максимальним значеннями активності ензиму - 54,3 % (p < 0,001).

Менша різниця за активністю ГПО встановлена в ендометрії відносно фізіологічного стану яєчника. Так, за «фолікулярного росту», «пізнього» і «раннього жовтого тіла» активність ензиму майже однакова (0,40 - 0,46 мкмоль/ хв×мг білка) і вища на 6,2 - 18,4 % при гіпофункції.

Активність КАТ в тканині яєчників меншою мірою залежить від їх фізіологічного стану. Зокрема, при «фолікулярному рості», «пізньому» і «ранньому жовтому тілі» активність ензиму не відрізняється і становить 1,08 - 1,19 мкмоль/ хв×мг білка і нижча на 10,2 - 18,5 % при гіпофункції. Подібна тенденція встановлена при аналізі активності КАТ в ендометрії: вищі величини значень виявлені при «ранньому» і «пізньому жовтому тілі» (0,76 і 0,72 мкмоль/ хв×мг білка), менша на 4,2 - 9,3 % за «фолікулярного росту» і найнижча при гіпофункції. Різниця між максимальним і мінімальним значеннями - 17,2 %.

Таким чином, тканини яєчників фізіологічних станів «раннього» і «пізнього жовтого тіла» характеризуються підвищеною активністю СОД, що свідчить про зростаюче окисне навантаження на структури статевих залоз, інтенсивніше утворення $O_2^{\cdot-}$, та перетворення надлишку супероксид-аніона за участі КАТ. У яєчнику «фолікулярного росту» окисні процеси протікають у фізіологічно необхідних межах й, відповідно, утворення $O_2^{\cdot-}$ забезпечує необхідні зміни в тканині статевої залози (дозрівання ооцитів). Наслідком фізіологічно низьких рівнів утворення супероксид-аніона активність СОД понижена і активується ГПО. При гіпофункції яєчника в тканинах статевої залози й ендометрію активність ензимів антиоксидантного захисту низька, що

вказує на понижений рівень окисних процесів і відсутність морфологічних змін (дозрівання ооцитів, розвиток і регресію жовтого тіла і підготовку до прикріплення ембріона). Подібні зміни виявлені при вивченні вмісту аскорбінової кислоти в ендометрії і стромі яєчника корів – вищі величини значень під час лютеальної стадії статевого циклу і нижчі при гіпофункції статевої залози [16].

Висновки:

1. Активність СОД в тканинах яєчника і ендометрію знаходиться в межах, відповідно, 8,8 - 26,3 і 11,7 - 17,6 МО/мг білка, ГПО - 0,38 - 0,83 і 0,40 - 0,49 та КАТ - 0,97 - 1,19 і 0,63 - 0,76 мкмоль/ хв×мг білка.
2. Активність ензимів антиоксидантного захисту в тканинах яєчника і ендометрію залежить від фізіологічного стану статевої залози.
3. Тканини яєчників фізіологічних станів «раннього» і «пізнього жовтого тіла» характеризуються підвищеною активністю СОД та КАТ.
4. При гіпофункції яєчника в тканинах статевої залози й ендометрію низька активність ензимів антиоксидантного захисту.

Література

1. Lapointe J. Bilodeau Jean-François Antioxidant Defenses Are Modulated in the Cow Oviduct During the Estrous Cycle /J. Lapointe//Biol Reprod.-2002. - Vol.68. - pp.1157–1164.
2. Смолянінов Б.В. Купчинська С.С. Процеси перекисного окиснення ліпідів: біологічна та патогенетична роль у функціонуванні живого організму / В.Б. Смолянінов, С.С. Купчинська // Аграрний вісник Причорномор'я. - Одеса, 2012. - Вип.62. - С.142 - 147.
3. Ho Y-S. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia / Y-S. Ho, C.D. Funk, J-L. Magnenat, R.T. Bronson, J. Cao, M. Gargano, M. Sugawara // J Biol. Chem. - 1997. -Vol. 272. - P. 16644 - 16651.
4. Ho Y-S. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury / Y-S. Ho, Y. Xiong, W. Ma, A. Spector, D.S. Ho // J. Biol. Chem. - 2004. - Vol. 279. - pp. 32804-32812.
5. Ran Q. The selenoprotein gpx4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults / Q. Ran, L. Rao, H. Van Remmen, T. Shibatani, J.G. Belter, L. Motta, A. Richardson, T.A. Prolla // Free Radic. Biol. Med. - 2003.-Vol. 34. - pp. 496-502.
6. Conrad M. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability / M. Conrad, S.G. Moreno, F. Sinowatz, F. Ursini, S. Kölle, A. Roveri, M. Brielmeier, W. Wurst, M. Maiorino, G.W. Bornkamm / Mol. Cell. Biol. - 2005. - Vol. 25. - pp. 7637 - 7644.
7. Schneider M. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility / M. Schneider, H. Förster, A. Boersma, A. Seiler, H. Wehnes, F. Sinowatz, C. Neumüller, M.J. Deutsch, A. Walch, M. Hrabé de Angelis, W. Wurst, F. Ursini, et al. // FASEB J. - 2009. - Vol. 23. - pp. 3233 - 3242.

8. Matzuk M.M. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice / M.M. Matzuk, L. Dionne, Q. Guo, T.R. Kumar, R.M // Lebovitz. *Endocrin.* - 1998. - Vol. 139. - pp. 4008 - 4011.

9. Lopez S.G. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis / S.G. Lopez, U. Luderer // *Free Radic. Biol. Med.* - 2004. Vol. 36. - pp. 1366.

10. Смолянінов Б.В. Процеси перекисного окиснення ліпідів: біологічна та патогенетична роль у функціонуванні живого організму / Б.В. Смолянінов, С.С. Купчинська // *Аграрний вісник причорномор'я.* - Одеса, 2012. - № 62 – С.142 - 147.

11. Чевари С.Н. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С.Н. Чевари, Т.А. Андян, Я.И. Штрэнгер // *Лаб. дело.* - 1991. - № 10. - С. 9 - 13.

12. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // *Лаб. дело.* - 1991. - №12. - С. 16 - 19.

13. Моим В.М. Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моим // *Лаб. дело.* – 1986.– №12. – С. 724 – 727.

14. Lowry O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L.Fair, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* - 1951. - Vol. 193, №1. - P. 264-275.

15. Плохинский Н. А. Биометрия / Н.А. Плохинский // М.: МГУ. - 1970. - С. 53- 60.

16. Коротких М.О. Окисно-відновні процеси в тканинах яєчника, матки та наднирникової залози корів і телиць залежно від стану репродуктивної системи. Автореф. дис. канд. вет. наук за спеціальністю 03.00.13. - Львів, 2001. - 18 с.

Рецензент – д.вет.н., професор Гуфрій Д.Ф.