

РІВЕНЬ НЕФЕРМЕНТНОЇ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ОРГАНІЗМУ БИЧКІВ ПРИ ГОСТРОМУ НІТРАТНО-НІТРИТНОМУ ТОКСИКОЗІ

В. О. Губерук, Б. В. Гутий, С. Д. Мурська, Д. Ф. Гуфрій

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького

Досліджено рівень неферментної системи антиоксидантного захисту за умов дії нітрату натрію у токсичних дозах на організм бичків. Встановлено зниження неферментної активності системи антиоксидантного захисту організму дослідних тварин при гострому нітратно-нітритному токсикозі. На шосту годину дослідів рівень неферментної системи антиоксидантного захисту організму бичків був найнижчим.

Збільшення дози нітрату натрію в раціони дослідних тварин до 0,5 гNO₃⁻/кг, супроводжувалось зменшенням у крові рівня неферментної системи антиоксидантного захисту, а саме: вітаміну А, вітаміну Е, селену, відновленого глутатіону

Ключові слова: НІТРАТИ, БИЧКИ, АНТИОКСИДАНТИ, ВІТАМІНИ, ТОКСИКОЛОГІЯ, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА

У сучасній токсикології активація перекисного окиснення ліпідів розглядається як універсальна відповідь живого організму на дію екстремальних факторів. Загалом, прооксидантно-антиоксидантний статус організму тварин відображає баланс між двома протилежно спрямованими діями в організмі, а саме: антиоксидантними властивостями (захист) та утворенням вільних радикалів (пошкодження) [1]. Вплив екстремальних чинників, включно токсикантів, призводить до порушення рівноваги між ними у прооксидантний бік і розвитку так званого «окисного стресу» [2, 5].

абрудненість навколишнього середовища нітратами і нітридами та їхній негативний вплив на організм тварин роблять проблему вивчення механізму нітратно-нітритного токсикозу у сільськогосподарських тварин особливо актуальною, що має теоретичне та практичне значення. Саме тому наші дослідження спрямували на поглиблене вивчення патогенезу нітратно-нітритного токсикозу в молодняку великої рогатої худоби.

Метою наших досліджень було встановити токсичний вплив нітратів у дозах 0,4–0,45–0,5 гNO₃⁻/кг маси тварини на рівень показників неферментної системи антиоксидантного захисту організму молодняку великої рогатої худоби.

Матеріали і методи

Досліди проводились на бичках шестимісячного віку, які були сформовані у 4 групи по 5 тварин у кожній:

1 група — контрольна, бички знаходились на звичайному раціоні згідно норм ВІТа;

2 група — дослідна 1, бичкам згодовували з кормом нітрат натрію у дозі 0,4 гNO₃⁻/кг маси тіла;

3 група — дослідна 2, бичкам згодовували з кормом нітрат натрію у дозі 0,45 гNO₃⁻/кг маси тіла;

4 група — дослідна 3, бичкам згодовували з кормом нітрат натрію у дозі 0,5 гNO₃⁻/кг маси тіла.

Кров для аналізу брали з яремної вени через 1, 2, 4, 6, 8 і 10 годин після згодовування нітрату натрію.

Вітаміни А і Е визначали у плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії, вміст відновленого глутатіону визначали за методом З. Батлер, О. Дюбон, Б. Келли, вміст селену визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі S-115 ПК.

Результати й обговорення

Інтенсивність вільнорадикального перекисного окиснення в організмі тварин залежить від концентрації кисню в тканинах, а також від активності ферментативних і неферментативних систем. Важливе місце у антиоксидантній системі захисту організму тварин займає неферментна система антиоксидантного захисту. Неферментна система антиоксидантного захисту організму тварин представлена вітаміном А, Е, глутатіоном та селеном. Вітаміни А, Е, а також мікроелемент селен є ефективними природними антиоксидантами, які здатні підтримувати рівновагу окисно-відновних реакцій в організмі тварин. Важливу роль у нормальній життєдіяльності організму відіграють вітаміни, які є низькомолекулярними органічними сполуками з високою біологічною активністю. Вони необхідні для здійснення механізмів ферментативного каталізу, забезпечення нормального обміну речовин, підтримання гомеостазу, біохімічного забезпечення всіх життєвих функцій організму. Для забезпечення організму вітаміном А, тварини використовують його попередники, каротиноїди. В організмі великої рогатої худоби з 1 мг каротину синтезується 450–600 МО вітаміну А. Синтез вітаміну А відбувається в ентероцитах і регулюється ферментом β -каротин-15,15-диоксигеназою. Вітамін А бере участь у багатьох ланках обміну речовин: синтезу білка родопсину, нуклеїнових кислот і білків, зокрема, білків сироватки крові та забезпечує антиоксидантний захист клітин, підвищує стійкість до інфекційних хвороб мікробної та вірусної етіології, сприяє розвитку та росту молодих тварин, підвищує продуктивність [3, 4]

Вміст вітаміну А у сироватці крові бичків за умов згодовування нітрату натрію у різних дозах наведений у таблиці 1. Слід відзначити, що внаслідок дії нітратів порушується засвоєння каротину та перетворення його у ретинол, що відбивається на здоров'ї тварин. Власне так у дослідах на телятах чорно-рябої породи було виявлено, що нітрати і нітрити перешкоджають нормальному засвоєнню каротину, в результаті руйнування вітаміну А в рубці.

Таблиця 1

Вміст вітаміну А у сироватці крові бичків при гострому нітратно-нітритному токсикозі ($M \pm m$, $n = 5$)

| Час дослідження крові (години) | Вітамін А (мкмоль/л) | | | |
|--------------------------------|----------------------|--|--|--|
| | Групи тварин | | | |
| | Контрольна | Дослідна 1 (0,40 гNO ₃ ⁻ /кг) | Дослідна 2 (0,45 гNO ₃ ⁻ /кг) | Дослідна 3 (0,50 гNO ₃ ⁻ /кг) |
| Вихідні величини | 0,90±0,035 | 0,85±0,035 | 0,80±0,025 | 0,87±0,032 |
| Перша година | 0,84±0,030 | 0,80±0,031 | 0,76±0,020 | 0,75±0,030 |
| Друга година | 0,90±0,025 | 0,72±0,024 | 0,69±0,022* | 0,65±0,025* |
| Четверта година | 0,85±0,035 | 0,69±0,015* | 0,61±0,016* | 0,54±0,019** |
| Шоста година | 0,82±0,035 | 0,58±0,020** | 0,53±0,015** | 0,50±0,020** |
| Восьма година | 0,89±0,035 | 0,62±0,018* | 0,59±0,018** | 0,58±0,025** |
| Десята година | 0,85±0,027 | 0,69±0,021* | 0,66±0,025* | 0,63±0,025* |

Примітка: у цій та наступних таблицях * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$

У бичків, яким згодовували нітрат натрію у дозі 0,40 г NO₃⁻/кг маси тіла, вміст вітаміну А у сироватці крові починаючи з першої години дослідження поступово знижувався.

На шосту годину даний показник становив $0,58 \pm 0,020$ мкмоль/л, що на 29 % є нижчим за контрольні величини.

У бичків, яким згодовували з кормом нітрат натрію у дозі $0,45$ г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, вміст вітаміну А коливався у межах величин $0,76 \pm 0,020$ – $0,53 \pm 0,015$ мкмоль/л. З першої по шосту години досліду встановили зниження вмісту вітаміну, а з восьмої по десяту годину досліду спостерігали незначне підвищення досліджуваного показника. На десяту годину вміст вітаміну А доходив до величин другої години досліду та відповідно становив $0,66 \pm 0,025$ мкмоль/л, що на 22 % є нижчим від контрольної групи.

У бичків дослідної групи Д₃ вміст вітаміну А на початку досліду був у межах величин фізіологічної норми. На першу годину досліду відзначали зниження вітаміну А на 14 % відносно величин на початку досліду. У подальшому вміст вітаміну, що досліджувався, продовжував знижуватися і найнижчим був на шосту годину досліду, де відповідно становив $0,50 \pm 0,020$ мкмоль/л. На восьму годину вміст вітаміну А дещо підвищився і на десяту годину відповідно становив $0,63 \pm 0,025$ мкмоль/л, що на 26 % є нижчим від контрольної групи.

Отже, чим нітрат натрію згодовувався у більшій дозі бичкам, тим нижчим був вміст вітаміну А у сироватці крові піддослідних бичків.

Другий вітамін, який відіграє важливу роль у системі антиоксидантного захисту є вітамін Е. Він відноситься до ендогенних прямих антиоксидантів, які утворюють менш реакційні радикали та володіють вираженішою антиоксидантною активністю. Антиоксидантна дія вітаміну Е полягає у попередженні поширення вільних радикалів у мембранах, тобто він не дозволяє вільним радикалам, які утворилися на місці подвійних зв'язків окремих ненасичених жирних кислот, викликати утворення вільних радикалів в інших ненасичених жирних кислотах.

Зміни вмісту вітаміну Е у сироватці крові бичків за умов згодовування їм нітрату натрію у різних кількостях наведені у таблиці 2. Нами встановлено, що нітрати негативно впливають також і на засвоєння вітаміну Е у молодняку великої рогатої худоби. Так, при згодовуванні нітрату натрію у дозі $0,40$ г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, у бичків встановили зниження вмісту вітаміну Е починаючи з другої години досліду з $3,8 \pm 0,12$ мкмоль/л до $2,5 \pm 0,11$ мкмоль/л на шосту годину. Лише на першу годину досліду відзначали незначне підвищення вмісту даного вітаміну, це можливо зумовлено захисною дією організму бичків на надходження нітрату натрію у токсичній дозі.

Таблиця 2

Вміст вітаміну Е у сироватці крові бичків при гострому нітратно-нітритному токсикозі ($M \pm m$, $n = 5$)

| Час дослідження крові (години) | Вітамін Е (мкмоль/л) | | | |
|--------------------------------|----------------------|--|--|--|
| | Групи тварин | | | |
| | Контрольна | Дослідна 1 ($0,40$ г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$) | Дослідна 2 ($0,45$ г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$) | Дослідна 3 ($0,50$ г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$) |
| Вихідні величини | $3,7 \pm 0,15$ | $4,2 \pm 0,18$ | $4,0 \pm 0,10$ | $3,9 \pm 0,11$ |
| Перша година | $4,4 \pm 0,18$ | $4,9 \pm 0,15$ | $4,8 \pm 0,16$ | $5,2 \pm 0,12$ |
| Друга година | $4,3 \pm 0,16$ | $3,8 \pm 0,12$ | $3,4 \pm 0,13^*$ | $3,4 \pm 0,12^*$ |
| Четверта година | $4,1 \pm 0,15$ | $3,1 \pm 0,13^*$ | $2,9 \pm 0,11^*$ | $2,5 \pm 0,11^{**}$ |
| Шоста година | $3,8 \pm 0,12$ | $2,5 \pm 0,11^{**}$ | $2,2 \pm 0,10^{**}$ | $2,0 \pm 0,10^{**}$ |
| Восьма година | $3,9 \pm 0,15$ | $2,8 \pm 0,10^{**}$ | $2,5 \pm 0,11^{**}$ | $2,3 \pm 0,10^{**}$ |
| Десята година | $4,0 \pm 0,17$ | $3,1 \pm 0,10^*$ | $2,8 \pm 0,13^*$ | $2,7 \pm 0,12^*$ |

При згодовуванні піддослідним бичка нітрату натрію у дозі $0,45$ г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, вміст вітаміну Е на першу годину досліду становив $4,8 \pm 0,16$ мкмоль/л. На другу годину досліду відзначали різке зниження досліджуваного показника, який відносно контролю знизився на 21 %. На шосту і восьму години досліду вміст вітаміну Е був найнижчим, де відповідно він становив $2,2 \pm 0,10$ і $2,5 \pm 0,11$ мкмоль/л.

При згодовуванні нітрату натрію у дозі 0,50 г NO₃⁻/кг маси тіла, у бичків на першу годину досліду виявили підвищення вмісту вітаміну Е на 18 %. З другої години досліду вміст вітаміну Е знизився, відносно другої години і відповідно становив 3,4±0,12 мкмоль/л. На відміну від двох попередніх дослідних груп, на шосту годину досліду у третьої дослідної групи встановили найнижчий вміст вітаміну Е у сироватці крові. На восьму годину досліду вміст вітаміну, що досліджувався, становив 2,3±0,10 мкмоль/л тобто знизився на 41 % відносно величин контрольної групи бичків.

Отже, чим нітрат натрію у більшій дозі згодовувався піддослідним тваринам, тим нижчим був вміст вітаміну Е у сироватці крові.

Селен є важливим елементом антиоксидантного захисту організму тварин. Вітаміни та флавоноїди не можуть замінити селен. Останній входить до складу глутатіонпероксидази, який нейтралізує найнебезпечніші агресивні вільні радикали, які інші антиоксиданти нейтралізувати не можуть. Якщо селену в організмі є недостатньо, то це найважливіший показник про пригнічення антиоксидантної системи в організмі тварин у цілому.

Вміст селену у крові бичків при гострому нітратно-нітритному токсикозі наведений у таблиці 3.

Таблиця 3

Вміст селену у крові бичків при гострому нітратно-нітритному токсикозі (M±m, n = 5)

| Час дослідження крові (години) | Селен (мкг/л) | | | |
|--------------------------------|---------------|---|---|---|
| | Групи тварин | | | |
| | Контрольна | Дослідна 1 (0,40 гNO ₃ ⁻ /кг) | Дослідна 2 (0,45 гNO ₃ ⁻ /кг) | Дослідна 3 (0,50 гNO ₃ ⁻ /кг) |
| Вихідні величини | 45±0,75 | 54±0,80 | 49±0,75 | 51±0,98 |
| Перша година | 50±0,95 | 48±0,75 | 46±0,90 | 45±0,87 |
| Друга година | 55±0,84 | 44±0,94* | 42±0,85* | 39±0,95** |
| Четверта година | 49±0,79 | 41±0,86* | 37±0,93** | 34±0,75** |
| Шоста година | 52±0,99 | 39±0,89** | 33±0,88** | 30±0,85** |
| Восьма година | 54±0,75 | 43±0,76 | 39±0,94* | 36±0,79* |
| Десята година | 48±0,96 | 45±0,90 | 42±0,80 | 40±0,89* |

На початку досліду вміст селену у крові піддослідних бичків був у межах величин 45±0,75–54±0,80 мкг/л. Починаючи з першої години досліду вміст селену у крові бичків трьох дослідних груп поступово знижувався. На другу годину досліду вміст селену у дослідних групах відповідно знизився на 20, 24 і 29 % відносно контрольної групи. На шосту годину досліду вміст селену у крові бичків дослідних груп Д₁, Д₂ і Д₃ був найнижчим, і, відповідно, становив: 39±0,89; 33±0,88 і 30±0,85 мкг/л. З восьмої години досліду вміст селену почав поступово підвищуватися, однак порівнюючи з показниками контрольної групи вміст селену був нижчим у бичків першої дослідної групи на 20 %, другої дослідної групи — на 28 % і третьої групи — на 33 %. На десяту годину досліду показники бичків дослідних груп становили 45±0,90; 42±0,80; 40±0,89 мкг/л.

Отже, при згодовуванні нітрату натрію у токсичних дозах супроводжувало до зниження вмісту селену у їх крові і чим більша доза нітрату натрію згодовувалась бичкам, тим вміст селену у крові знижувався. На це вказує і зниження ферменту антиоксидантної системи — глутатіонпероксидази, до якого він входить.

Найважливішим показником у глутатіоновій системі антиоксидантного захисту відіграє глутатіон — низькомолекулярний тіол, який виконує в організмі ряд важливих функцій, а саме: бере участь у знешкодженні ксенобіотиків; захищає від активних кисневих сполук; підтримує функціональний стан біологічних мембран.

У таблиці 4 наведено рівень відновленого глутатіону у сироватці крові бичків за умов токсичного ураження нітратами і нітритами. Відомо, що відновлений глутатіон є основним сірковмісним антиоксидантом в організмі, який захищає двовалентне залізо, сульфгідрильні

групи глобіну і мембрани еритроцитів від дії окиснювачів і, таким чином, запобігаючи надмірному метгемоглобіноутворенню.

У бичків, яким згодовували нітрат натрію у дозі 0,40 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, рівень відновленого глутатіону на першу годину дослідження становив $29,13 \pm 0,6$ мг%, на другу і четверту — знизився на 22 і 28 % відносно контролю, на шосту годину дослідження був найнижчим і відповідно становив $19,52 \pm 0,6$ мг%. На десяту годину рівень відновленого глутатіону незначно підвищився, однак відповідно до контролю він знизився на 25 %.

Таблиця 4

Рівень відновленого глутатіону у сироватці крові бичків при гострому нітратно-нітритному токсикозі ($M \pm m$, $n = 5$)

| Час дослідження крові (години) | Відновлений глутатіон (мг%) | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|--|--|--|
| | Групи тварин | | | |
| | Контрольна | Дослідна 1 (0,40 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$) | Дослідна 2 (0,45 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$) | Дослідна 3 (0,50 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$) |
| Вихідні величини | $30,60 \pm 0,7$ | $34,78 \pm 0,5$ | $33,90 \pm 0,6$ | $36,10 \pm 0,7$ |
| Перша година | $36,90 \pm 0,8$ | $29,13 \pm 0,6^*$ | $28,54 \pm 0,8^*$ | $28,21 \pm 0,6^*$ |
| Друга година | $35,35 \pm 0,6$ | $27,50 \pm 0,7^*$ | $27,64 \pm 0,8^*$ | $26,70 \pm 0,5^*$ |
| Четверта година | $35,89 \pm 0,5$ | $26,01 \pm 0,5^*$ | $25,03 \pm 0,6^{**}$ | $25,10 \pm 0,6^{**}$ |
| Шоста година | $30,90 \pm 0,7$ | $19,52 \pm 0,6^{**}$ | $16,71 \pm 0,5^{**}$ | $14,75 \pm 0,4^{**}$ |
| Восьма година | $34,56 \pm 0,5$ | $20,89 \pm 0,8^{**}$ | $20,35 \pm 0,7^{**}$ | $18,24 \pm 0,5^{**}$ |
| Десята година | $31,27 \pm 0,8$ | $23,51 \pm 0,6^*$ | $22,47 \pm 0,5^*$ | $22,12 \pm 0,5^*$ |

При згодовуванні бичкам нітрату натрію у дозах 0,45 і 0,50 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, спостерігали подібні зміни рівня відновленого глутатіону як і у першому випадку. На першу годину дослідження рівень відновленого глутатіону у другій і третій дослідних груп тварин був у межах величин $28,21 \pm 0,6$ – $28,54 \pm 0,8$ мг%. У наступні години дослідження рівень відновленого глутатіону знижувався відповідно на другу годину на 22 і 24 %, на четверту годину — на 30 і 30,1 %, на шосту годину — на 46 і 52 %. На десяту годину дослідження рівень відновленого глутатіону у двох дослідних груп відповідно становив $22,47 \pm 0,5$ і $22,12 \pm 0,5$ мг %.

Висновки

— згодовування бичкам з кормом нітрату натрію у дозах 0,40–0,45–0,50 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$, спричинило зниження рівня неферментної системи антиоксидантного захисту організму бичків;

— збільшення дози нітрату натрію в раціоні дослідних тварин до 0,5 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$, супроводжувалось зменшенням у крові рівня неферментної системи антиоксидантного захисту, а саме: вітаміну А, вітаміну Е, селену, відновленого глутатіону;

— на шосту годину дослідження рівень неферментної системи антиоксидантного захисту організму бичків був найнижчим.

Перспективи подальших досліджень. Наступні дослідження будуть спрямовані на вивчення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів у крові бичків за умов гострого нітратно-нітритного токсикозу, з метою корекції балансу у комплексі «Антиоксидантна система ↔ Перекисне окиснення ліпідів».

V. Huberuk, B. Hutiy, S. Murska, D. Hufriy

THE LEVEL OF NONENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEM ON BULLS ORGANISM IN ACUTE NITRATE-NITRITE TOXICOSIS

S u m m a r y

The level antioxidant system under the effect of sodium nitrate in toxic doses on the body of bulls was investigated. The decrease of activity of antioxidant system of the organism of experimental animals with acute nitrate-nitrite toxicosis was shown.

Increasing the dose of sodium nitrate in rations of experimental animals to 0.5 hNO₃⁻/kg, accompanied by a decrease in blood levels antioxidant system, namely vitamin A, vitamin E, selenium, reduced glutathione

В. А. Губерук, Б. В. Гутый, С. Д. Мурська, Д. Ф. Гуфрий

УРОВЕНЬ НЕФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА БЫЧКОВ ПРИ ОСТРОМ НИТРАТНО-НИТРИТНОМ ТОКСИКОЗЕ

А н н о т а ц и я

Исследован уровень ферментной системы антиоксидантной защиты в условиях действия нитрата натрия в токсических дозах на организм бычков. Установлено снижение активности ферментной системы антиоксидантной защиты организма подопытных животных при остром нитратно-нитритном токсикозе.

Увеличение дозы нитрата натрия в рационы подопытных животных до 0,5 гNO₃⁻/кг, сопровождалось уменьшением в крови уровня ферментной системы антиоксидантной защиты, а именно: витамина А, витамина Е, селена, восстановленного глутатиона.

1. *Гутый Б. В.* Нитратне навантаження організму бичків і стан антиоксидантної системи їх крові за цих умов / Б. В. Гутый // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. — Львів, 2004. — Т. 6 (№ 3), Ч. 1. — С. 88–94.

2. *Гуфрий Д. Ф.* Содержания нитратов и нитритов в химусе двенадцатиперстной кишки после введения бычкам нитрата натрия в разных дозах : тезисы докладов Респ. конференции «Проблема нитратов в животноводстве и ветеринарии» / Д. Ф. Гуфрий. — Киев, 1990. — С. 28.

3. *Дрошнев А. Е.* Влияние витамина Е на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у рыб при стрессе / А. Е. Дрошнев, М. Н. Борисова, Н. А. Костромитинов // Ветеринарна медицина. — Харків, 2005. — Т. 1. — С. 395–398.

4. *Куртяк Б. М.* Вміст вітамінів А і Е та продуктів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові корів при парентеральному введенні тривіту і інсолвіту в кінці стійлового періоду / Б. М. Куртяк, В. Г. Янович // Наук.- техн. бюл. Ін-ту біол. тварин. — Львів, 2006. — С. 212–214.

5. *Хмельницький Г. А.* О возможности предотвращения загрязнения молока крупного рогатого скота канцерогенными нитрозаминами : Респ. конф. «Пробл. нитратов в животноводстве и ветеринарии» 17–20 сент. 1990 г. / Г. А. Хмельницький, Н. Ф. Панько, Д. М. Вовк. — К., 1990. — С. 60–62.

Рецензент: доцент кафедри біохімії, біотехнології та загальної хімії Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, кандидат біологічних наук Грабовський С. С.