



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
 Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
 2013. 21(1)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 636.1.083.38:591.1

Прооксидантний і антиоксидантний баланс крові коней української верхової породи в динаміці фізичних навантажень

А.В. Андрійчук¹, І.В. Ткачова¹, Г.М. Ткаченко², Н.М. Кургалюк²

¹Інститут тваринництва Національної академії аграрних наук України, Харків, Україна

²Інститут біології та охорони навколишнього середовища, Померанський університет, Слупськ, Польща

Досліджено вміст маркерів оксидативного стресу та активність ферментів антиоксидантного захисту у крові, плазмі та суспензії еритроцитів коней української верхової породи, які використовуються у класичних видах кінного спорту. Встановлено достовірні зміни інтенсивності перекисного окиснення ліпідів еритроцитів та вмісту похідних оксидативної модифікації білків плазми, а також активності ферментів антиоксидантного захисту крові спортивних коней у динаміці тренувань. Виявлено істотне зниження вмісту малонового діальдегіду у суспензії еритроцитів і продуктів окиснювальної модифікації білків плазми коней після фізичних навантажень, що свідчить про розвиток ефективних адаптаційних реакцій. У динаміці тренінгу спостерігалось також істотне підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази та глутатіонредуктази). Кореляційний аналіз залежності між маркерами оксидативного стресу та системи антиоксидантного захисту виявив важливу роль ферментів глутатіонової ланки, які попереджують розвиток пероксидації ліпідів і білків під час фізичних навантажень у коней української верхової породи. Таким чином, рівень маркерів оксидативного стресу та активність ферментів антиоксидантного захисту у спортивних коней можуть бути інформативними показниками для оцінки рівня тренуваності коней спортивного напрямку працездатності.

Ключові слова: прооксидантний та антиоксидантний баланс; українська верхова порода; динаміка фізичних навантажень

Prooxidant and antioxidant balance in the blood of Ukrainian Warmblood horses during the exercises

A. Andriichuk¹, I. Tkachova¹, H. Tkachenko², N. Kurhaliuk²

¹Institute of Animal Breeding of National Academy of Agricultural Sciences, Kharkiv, Ukraine

²Institute of Biology and Environmental Protection, Pomeranian University, Slupsk, Poland

The goal of our study was an analysis of oxidative stress markers level and antioxidant defences in the blood of Ukrainian Warmblood horses at the rest and after training. There were significant decrease in the thiobarbituric acid reactive substrates (TBARS) content and lipid hydroperoxides level in the erythrocytes and plasma of horses after the training. There were also significant decreases in the values of the aldehyde derivatives of protein oxidation in the plasma. An antioxidant defence in the blood of horses after the training was provided by the activation of superoxide dismutase and glutathione reductase. Correlation analysis of the relationship between markers of oxidative stress and antioxidant defence system confirmed the important role of glutathione antioxidant system for prevention of oxidative stress during exercises. The level of oxidative stress markers and activity of antioxidant defences in the blood of sport horses can be sensitive and informative parameters for the assessment of equine performance.

Keywords: prooxidant and antioxidant balance; Ukrainian Warmblood horses; exercises

¹Інститут тваринництва Національної академії аграрних наук України, Харків. E-mail: anastasia.pohlyad@gmail.com

²Кафедра фізіології тварин, кафедра зоології, Інститут біології та охорони навколишнього середовища, Померанський університет, вул. Арцизевського, 22b, 76-200 Слупськ, Польща E-mail: biology.apsl@gmail.com

¹Institute of Animal Breeding of National Academy of Agricultural Sciences, Kharkiv, Ukraine. E-mail: anastasia.pohlyad@gmail.com

²Department of Animal Physiology, Department of Zoology, Institute of Biology and Environmental Protection, Pomeranian University, Arciszewski Str., 22b, 76-200 Slupsk, Poland. E-mail: biology.apsl@gmail.com

Вступ

Кінноспортивні змагання створюють умови для ретельного відбору коней з урахуванням їх породних особливостей, походження, екстер'єрних даних і функціональних показників. Визначення потенційних можливостей коней, призначених для використання у класичних видах кінного спорту (конкур, виїздка, триборство) вимагає поглибленого усебічного дослідження їх анатомо-морфологічних, фізіологічних та біохімічних показників, які відіграють важливу роль для конкретного виду рухової активності (Laskov, 1997).

Інтенсивні фізичні навантаження викликають в організмі коней кисневу недостатність, що спричинює тканину гіпоксію та активує процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) (Art and Lekeux, 2005; Kirschvink et al., 2008). Відповідно знижується спортивна витривалість коней, що часто супроводжується функціональними розладами та розвитком різноманітних патологічних станів організму, погіршуються результати змагань (Chiaradia et al., 1998; Art and Lekeux, 2005; Kirschvink et al., 2008). Інтенсифікація процесів ПОЛ в організмі спортивних коней під впливом фізичних навантажень може модифікувати систему антиоксидантного захисту (АОЗ) (Marlin et al., 2002; Kinnunen et al., 2005; Soares et al., 2011). Збільшення генерації активних форм кисню (АФК) та зменшення потужності системи АОЗ під впливом виснажливих фізичних навантажень супроводжуються оксидативним стресом (Marlin et al., 2002; Art and Lekeux, 2005; Kinnunen et al., 2005; Kirschvink et al., 2008). Із літературних джерел відомо, що надлишкове накопичення продуктів ПОЛ викликає набряк мітохондрій, роз'єднання процесів дихання та окисного фосфорилування, ушкодження сульфгідрильних груп тіолових ферментів (Glazkov and Razdajbedin, 2010). У силу своєї стабільності продукти ПОЛ, зокрема дієнові кон'югати та основний продукт реакції з тіобарбітуровою кислотою – малоновий діальдегід (МДА) – найінформативніші показники ліпопероксидації (Vladimirov and Archakov, 1972; Antonov, 2010).

Рівень маркерів оксидативного стресу та активність ферментів АОЗ можуть бути також корисними показниками відповідності використаних обсягів фізичних навантажень функціональним можливостям організму коней (Marlin et al., 2002; Kirschvink et al., 2008; Antonov, 2010; Soares et al., 2011). У спортивних коней, які перебувають у тривалому тренінгу, вміст маркерів оксидативного стресу істотно знижується після фізичних навантажень, відбувається активація системи АОЗ (Tkachenko et al., 2011; Andrijchuk et al., 2012a, 2012b). У спортивних коней під впливом фізичних навантажень відбуваються специфічні зміни резистентності еритроцитів до дії різних гемолітичних чинників (Andrijchuk et al., 2012d). Тому рівень маркерів оксидативного стресу та показники активності ферментів АОЗ можуть як відображати метаболічні реакції, пов'язані із процесами адаптації до фізичних навантажень, так і виявляти глибинні біодеструктивні зміни, спричинені перетренованням і загрозою розвитку патологічних змін систем і органів.

Мета цього дослідження – оцінити вміст маркерів оксидативного стресу (первинних і вторинних продуктів

ПОЛ, молекул середньої маси, похідних оксидативної модифікації білків) та активності ферментів АОЗ (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, церулоплазміну) у коней української верхової породи спортивного напрямку працездатності в динаміці фізичних навантажень (у стані спокою та після фізичного навантаження).

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт досліджень – 18 клінічно здорових спортивних коней 8–15-річного віку української верхової породи (рис. 1), які активно використовуються у класичних видах кінного спорту (конкур, виїздка, триборство). Коней утримували на базі ДЮСШ кінного спорту «Буревісник» (м. Львів). Вони брали активну участь у кінноспортивних змаганнях різних рівнів. Умови годівлі дослідних коней були однаковими, до того ж усі тварини перебували у тривалому спортивному тренінгу.

Для визначення вмісту маркерів оксидативного стресу та активності ферментів АОЗ у крові спортивних коней у динаміці тренінгу всі дослідні тварини піддавалися фізичному навантаженню середнього об'єму та середньої інтенсивності: рух кроком – 5 хв, рух риссю – 10 хв, рух кроком – 10 хв, рух риссю – 10 хв, рух кроком – 5 хв, рух галопом – 10 хв, рух кроком – 10 хв (Nerodenko, 2009). Фізичне навантаження тривало одну годину.

Кров у коней відбирали з яремної вени у пробірці з антикоагулянтом (К-EDTA, фірма MedLab) двічі: вранці, у стані спокою, та одразу після тренування. Для отримання плазми цільну кров центрифугували упродовж 10 хв при 3000 об./хв. Суспензію еритроцитів отримували промиванням осаду охолодженим фізіологічним розчином трічі. Уміст продуктів, які реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-продукти), визначали у крові, плазмі та суспензії еритроцитів. Кетонів та альдегідні похідні оксидативно модифікованих білків (ОМБ) та активність ферментів АОЗ визначали у суспензії еритроцитів і в плазмі. Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД), глутатіонредуктази (ГР) та глутатіонпероксидази (ГПО) використовували гемолізат крові. Активність каталази та вміст церулоплазміну, а також уміст молекул середньої маси та дієнових кон'югатів визначали у плазмі крові.

ТБК-активні сполуки оцінювали за вмістом продуктів, які реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою (малоновий діальдегід, МДА), виражали у мкмоль/л (Kamyshnikov, 2004). Рівень окиснювального пошкодження білків оцінювали за вмістом альдегідних (ОМБ₃₇₀) і кетонів похідних (ОМБ₄₃₀) оксидативної модифікації білків у реакції з 2,4-динітрофенілгідразином, використовуючи коефіцієнт поглинання $22000 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, і виражали в нмоль/мл (Levine et al., 1990). Уміст дієнових кон'югатів визначали в плазмі з використанням суміші гептан – ізопропанол у кислому середовищі (pH 2,0). У гептановому шарі визначали вміст дієнових кон'югатів за ступенем світлопоглинання в ультрафіолетовій ділянці спектра та виражали у $A_{233}/\text{мл}$ (Kamyshnikov, 2004). Концентрацію середніх молекул у сироватці крові визначали спектрофотометричним методом і виражали у мг/л. Метод базується на осадженні високомолекулярних біл-

ків плазми крові з використанням хлорної кислоти та етилового спирту з такою фотометрією за довжини хвилі 210 нм (Kamyshnikov, 2004). Активність супероксиддисмутази визначали в реакції окиснення кварцетину та виражали в од. акт./мл (Kostjuk et al., 1990). Активність каталази оцінювали в реакції з молібдатом амонію та виражали у мкмоль/хв•л крові (Koroljuk et al., 1988). Активність глутатіонредуктази визначали в реакції перетворення НАДФН₂ і відновленого глутатіону, виражали в нмолях НАДФН₂/хв•мл крові (Glatzle et al., 1974). Активність глутатіонпероксидази визначали за швидкістю окиснення глутатіону за присутності гідроперекису

третинного бутилу та виражали у в мкмольх GSH/хв•мл крові (Moin, 1986). Уміст церулоплазміну оцінювали в реакції окиснення *p*-фенілендіаміну та виражали у мг/л (Kamyshnikov, 2004). Загальну антиоксидативну активність (ЗАОА) плазми та еритроцитів визначали в реакції інгібування аскорбат- та залізоіндукованого окиснення Твіну-80 до МДА та виражали у % (Galaktionova et al., 1998). Усі лабораторні дослідження проводили на кафедрі фізіології тварин Інституту біології та охорони середовища Поморської Академії (м. Слупськ, Польща) в рамках міжнародної співпраці.



Рис. 1. Жеребець української верхової породи (фото Ірини Ткачової)

Отримані результати статистично проаналізовано за допомогою пакета програм Statistica 8.0 (StatSoft). Після аналізу нормальності вибірок за допомогою критеріїв Шапіро – Вілкі та Лілліфорса обраховували середнє арифметичне значення та похибку. Вірогідність різниці між групами тварин до і після фізичного навантаження визначали за відхиленням критерію Вілкоксона ($P < 0,05$). Кореляційні залежності між досліджуваними параметрами оцінювали за допомогою рангів Спірмана (Zar, 1999).

Результати та їх обговорення

Підвищення генерації АФК під впливом фізичних навантажень спричинює утворення багатьох продуктів вільнорадикального окиснення (дієнові кон'югати, малоновий діальдегід, перекиси, гідроперекиси, оксидативно модифіковані білки), які негативно впливають на функціонування клітин у цілому (Galaktionova et al., 1998; Deaton and Marlin, 2003; Niki, 2009). Молекули середньої маси (МСМ) також можуть бути інформативним показником оксидативного пошкодження та інтенсивності перебігу процесів ПОЛ у коней різних порід (Andriychuk et al., 2012c). Циркуючи в кров'яному руслі МСМ як продукти метаболізму, можуть відігравати роль факторів мікрооточення, що здатні впливати на морфологічний стан мембрани еритроцитів, індукуючи оксидативний стрес (Kamyshnikov, 2004).

Активізація вільнорадикального окиснення під впливом МСМ може спричинювати зміни фізико-хімічних властивостей мембран еритроцитів та їх проникність (Kamyshnikov, 2004). Підвищення вмісту оксидативних маркерів у крові вважається інформативною ознакою, що свідчить про деградацію біополімерів, молекулярних комплексів і порушення структурно-метаболических і фізико-хімічних властивостей мембран (Deaton and Marlin, 2003). У зв'язку з цим перший етап наших досліджень – визначення вмісту дієнових кон'югатів, МСМ та ТБК-активних продуктів у крові коней української верхової породи у стані спокою та після фізичних навантажень (рис. 2, 3).

Зареєстровано різноспрямовані зміни рівня маркерів оксидативного стресу у коней під впливом фізичних навантажень. Після тренувань спостерігалось істотне зниження вмісту дієнових кон'югатів у плазмі на 37% ($P < 0,05$) (див. рис. 2 а), натомість вміст МСМ після тренувань недостовірно збільшувався на 46% ($P > 0,05$) (див. рис. 2 б). Оскільки утворення дієнових кон'югатів виявляється на стадії ініціації вільних радикалів (Vladimirov and Archakov, 1972), істотне зменшення їх рівня у плазмі крові коней після тренінгу може свідчити про активацію системи АОЗ. Наші попередні дослідження підтверджують це припущення (Tkachenko et al., 2011; Andriychuk et al., 2012a, 2012b). За різних патологічних і стресових станів у плазмі крові збільшується вміст МСМ (Andriychuk et al., 2012c). Такі зміни рівня

МСМ пов'язують із порушенням транспорту амінокислот, підвищенням проникності клітин, активацією процесів пероксидації у головному мозку (Kamyshnikov, 2004; Andriychuk et al., 2012c). Оскільки фізичні навантаження – певною мірою стресовий чинник досліджуваних спортивних коней, збільшення вмісту МСМ плазми після фізичних навантажень відображає відповідь їх

організму на тренінг. Аналіз процесів ПОЛ крові коней УВП у стані спокою показав найвищий вміст ТБК-активних продуктів в еритроцитах і цільній крові ($14,36 \pm 0,43$ і $13,99 \pm 0,83$ мкмоль/л відповідно). Найменший вміст ТБК-активних продуктів виявлено у плазмі ($5,68 \pm 0,59$ мкмоль/л) (рис. 3).

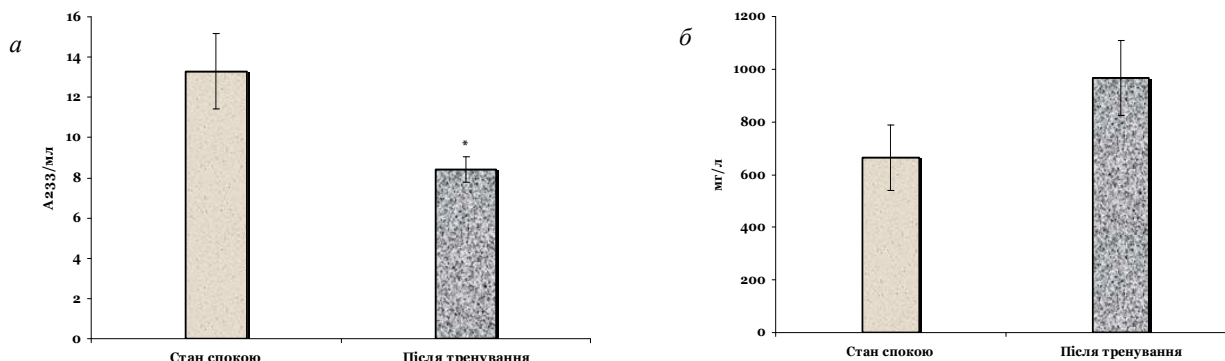


Рис. 2. Вміст дінітрових кон'югатів (а) і молекул середньої маси (б) у плазмі коней української верхової породи в динаміці фізичних навантажень: * – статистично істотні відмінності ($P < 0,05$) між показниками, отриманими до та після фізичного навантаження (тест Вілкоксона)

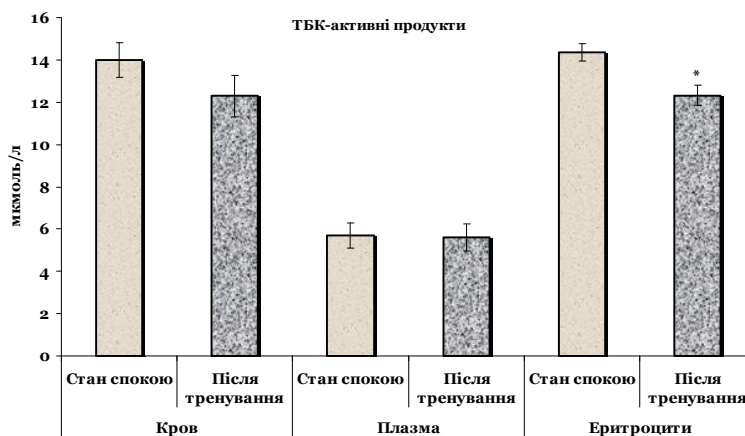


Рис. 3. Вплив фізичного навантаження на вміст ТБК-активних продуктів у крові, плазмі та суспензії еритроцитів спортивних коней у стані спокою та після тренування: * – див. рис. 2

Інтенсивність вільнорадикальних процесів визначається, передусім, особливостями метаболізму клітин і тканин, їх функціональним навантаженням (Vladimirov and Archakov, 1972). На нашу думку, високий вміст ТБК-активних продуктів саме в еритроцитах зумовлений їх мембранною структурою. Еритроцити сприятливі до оксидативного стресу в результаті значного вмісту поліненасичених жирних кислот в їх клітинних мембранах, високого вмісту в клітинах кисню та гемоглобіну – потенційно сильних активаторів окиснювальних процесів (Clemens and Waller, 1987).

У наших дослідженнях виявлено істотне зниження вмісту ТБК-активних продуктів в еритроцитах (на 14%, $P < 0,01$) після фізичних навантажень. Вміст МДА у крові неістотно знижувався (на 12%, $P > 0,05$), а у плазмі не зазнавав істотних змін (рис. 3). Під впливом систематичних фізичних навантажень розвиваються адаптаційні процеси, що супроводжуються зниженням інтенсивності оксидативного стресу (Deaton and Marlin, 2003). Зокрема, у бігунів після марафону не спостерігали збільшення

вмісту ТБК-активних продуктів у крові. Також у крові тренуваних людей після інтенсивних вправ на велотренажері не виявлено інтенсифікації процесів ПОЛ (Deaton and Marlin, 2003). Тренувані особи у стані спокою мають вищий рівень ТБК-активних продуктів і дінітрових кон'югатів у плазмі, ніж після фізичних навантажень (Deaton and Marlin, 2003).

Уміст ТБК-активних продуктів в еритроцитах спортивних коней суттєво знижувався власне після фізичних навантажень, що свідчить про розвиток ефективних адаптаційних змін до систематичних тренувань в організмі коней (Andriychuk et al., 2012b). Встановлене нами істотне зниження вмісту ТБК-активних продуктів в еритроцитах спортивних коней після тренувань свідчить, вочевидь, про ефективну адаптацію їх до фізичних навантажень шляхом модифікації процесів метаболізму в напрямку зменшення інтенсивності оксидативного стресу.

Активні форми кисню поряд з окисненням ліпідів спричиняють також оксидативну модифікацію білків, що викликає порушення конформації білкових молекул,

їх агрегацію та фрагментацію (Kolisnyk et al., 2009). У зв'язку з особливостями хімічної будови та структури протеїнів процес ОМБ пов'язаний з утворенням великої кількості окиснених продуктів радикальної та нерадикальної природи. Наслідком пошкоджень окиснених білків є різке підвищення активності мультикаталітичних протеаз (Kolisnyk et al., 2009). Разом із цим, деструкція білків – надійніший маркер окиснювальних пошкоджень тканин, ніж продукти ПОЛ, оскільки похідні ОМБ стабільніші (Kolisnyk et al., 2009). Зважаючи на це, наступним етапом наших досліджень став аналіз похідних ОМБ у плазмі та еритроцитах спортивних коней у стані спокою та після фізичних навантажень (рис. 4).

Аналіз вмісту альдегідних і кетонівих похідних ОМБ у стані спокою виявив різноскеровані зміни значень у плазмі та еритроцитах тварин. Останні характеризуються нижчим вмістом модифікованих похідних білків порівняно з плазмою. Високий рівень процесів модифікації білків плазми є “віддзеркаленням” окиснювальних змін в інших тканинах і органах, а не лише в еритроцитах. Натомість після фізичних навантажень спостерігалось достовірне зниження вмісту альдегідних похідних у плазмі (на 4%, $P < 0,05$), а вміст альдегідних і кетонівих похідних ОМБ в еритроцитах (рис. 4) достовірно зменшився (на 42%, $P > 0,05$ та 27%, $P > 0,05$ відповідно). Окиснення білків під дією АФК з утворенням альдегідо- та кетогруп також виконує адаптаційну

функцію при систематичних фізичних навантаженнях, що супроводжуються активацією протеосомних комплексів, які вибірково руйнують окиснені білки (Radak et al., 2008). Вочевидь, істотне зниження рівня альдегідних похідних окисдаційно модифікованих білків плазми та неістотне зменшення вмісту альдегідних і кетонівих похідних ОМБ у суспензії еритроцитів спортивних коней після фізичного навантаження свідчить про ініціацію процесів протеолітичної деградації окиснених білкових молекул.

У механізмах регуляції вільнорадикальних і пероксидних процесів ключову роль відіграють ферменти АОЗ, такі як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза, церулоплазмін тощо (Marlin et al., 2002; Kinnunen et al., 2005; Kirschvink et al., 2008; Antonov, 2010; Soares et al., 2011; Andrijchuk et al., 2012b). Підвищення ефективності функціонування системи АОЗ в організмі спортивних коней запобігає виникненню негативних наслідків, які викликані надмірною інтенсивністю перебігу окисдаційного стресу у тканинах при напруженій м'язовій діяльності, і тим самим підвищує їх стійкість до фізичних навантажень (Deaton and Marlin, 2003; Kinnunen et al., 2005; Kirschvink et al., 2008; Andrijchuk et al., 2012a, 2012b). Наступним етапом наших досліджень було визначення активності ферментів системи АОЗ у крові спортивних коней у стані спокою перед тренуванням і після фізичних навантажень (табл. 1).

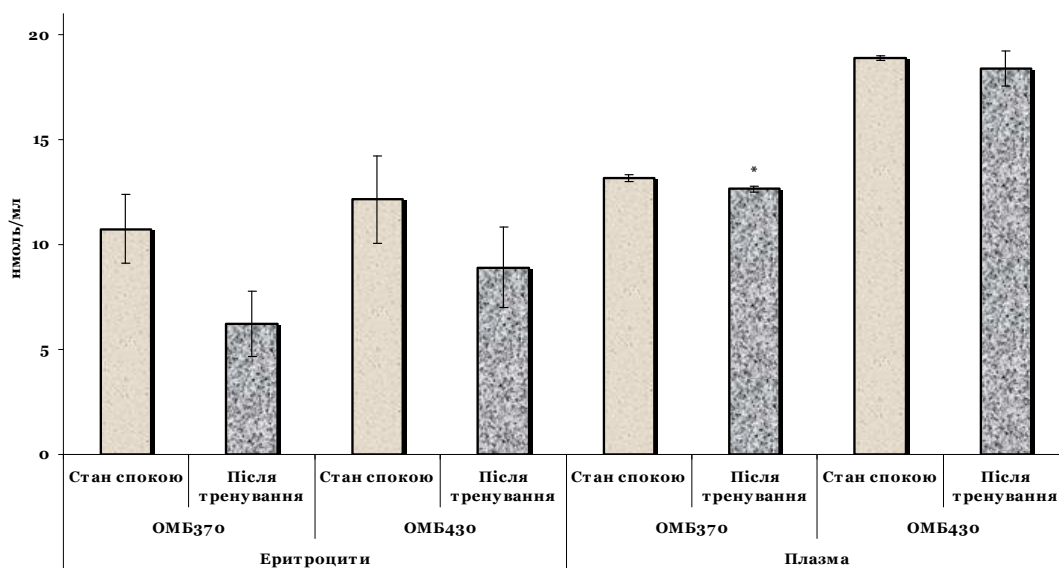


Рис. 4. Рівень альдегідних (ОМБ₃₇₀) та кетонівих (ОМБ₄₃₀) похідних окиснювальної модифікації білків у суспензії еритроцитів та плазмі крові спортивних коней української верхової породи до і після фізичних навантажень: * – див. рис. 2

Таблиця 1

Активність ферментів антиоксидантного захисту у крові коней української верхової породи, призначених для використання у класичних видах кінного спорту, в динаміці тренувань

| Ферменти антиоксидантного захисту | Перед тренуванням | Після фізичних навантажень |
|---|-------------------|----------------------------|
| Супероксиддисмутаза, од. акт./мл | 11,89 ± 0,48 | 16,30 ± 1,12* |
| Каталаза, мкмоль/хв·л | 2,79 ± 0,26 | 3,08 ± 0,36 |
| Глутатіонредуктаза, нмоль НАДФН ₂ /хв·мл | 1,13 ± 0,16 | 1,66 ± 0,23* |
| Глутатіонпероксидаза, мкмоль GSH/хв·мл | 0,96 ± 1,35 | 1,35 ± 0,26 |
| Церулоплазмін, мг/л | 31,16 ± 4,31 | 40,32 ± 6,32 |

Примітка: * – статистично достовірні зміни ($P < 0,05$) між показниками, отриманими у стані спокою та після фізичного навантаження (тест Вілкоксона).

Найпотужнішим природним антиоксидантом і ферментом першої ланки АОЗ є СОД, яка здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і перетворює їх на менш реакційно здатні молекули пероксиду водню (Deaton and Marlin, 2003). Нами встановлене істотне збільшення активності СОД після тренінгу коней (на 37%, $P < 0,01$). Після фізичних навантажень активність каталази у крові досліджуваних коней також неістотно зросла (на 10%, $P > 0,05$). Наші дані підтверджують результати, отримані раніше (Soares et al., 2011) щодо біохімічних і антиоксидантних змін у плазмі та еритроцитах коней до і після змагань із подолання перешкод. Ці автори також встановили, що у крові спортивних коней ефективно обмеження розвитку оксидативного стресу після змагань відбувалося за рахунок зниження вмісту ТБК-активних продуктів, і визначальну роль у цих процесах відігравала саме СОД. Спрямованість фізичних навантажень у коней спортивного та призового напрямку працездатності визначають зміни в антиоксидантній системі (Kirschvink et al., 2008). Активність СОД, зокрема, підвищувалася у коней стандартбредної породи після 12-тижневого періоду тренувань і позитивно корелювала зі збільшенням споживання кисню ($VO_{2\max}$) під час фізичних навантажень (Kirschvink et al., 2008).

Клітинні механізми АОЗ пов'язані також із функціонуванням потужної глутатионової ланки, що включає низку ферментів: глутатіонредуктазу, глутатіон-S-трансферазу, глутатіонпероксидазу та кофактори (глутатіон, НАДФН) (Deaton and Marlin, 2003; Kirschvink et al., 2008). Її захисні функції під час оксидативного стресу визначаються специфічним парціальним внеском кожного індивідуального компонента. Глутатіонпероксидаза каталізує розщеплення пероксиду водню та гідроперексидів жирних кислот за участю відновленого глутатіону (Deaton and Marlin, 2003; Kirschvink et al., 2008). Регенерацію окисненого глутатіону каталізує глутатіонредуктаза, завдяки чому забезпечується дія глутатіонпероксидази. Після фізичних навантажень у коней істотно зросла активність ГР (на 47%, $P < 0,05$) та недостовірно – активність ГПО (на 41%, $P > 0,05$). Наші результати узгоджуються з літературними даними, згідно з якими активація глутатионової ланки АОЗ відбувається у відповідь на виснажливі тривалі фізичні навантаження значного об'єму та середньої інтенсивності. Із літературних джерел також відомо, що більші за об'ємом фізичні навантаження на витривалість, такі як тривалі дистанційні пробіги коней на 80 і 210 км, викликають істотне збільшення активності глутатионової ланки системи АОЗ (Deaton and Marlin, 2003; Gondim et al., 2009).

У функціонуванні АОЗ важливу роль відіграє церулоплазмін – мідьмісна оксидаза крові, яка бере участь у транспорті та утилізації міді, нейроендокринній регуляції, гемопоезі, регуляції рівня біогенних амінів (Kamyshnikov, 2004). Це головний антиоксидант плазми, який бере активну участь у виведенні продуктів розпаду клітин і субклітинних структур із вогнища запалення (Kamyshnikov, 2004). У наших дослідженнях встановлено недостовірно збільшення вмісту церулоплазміну (на 29%, $P > 0,05$) у крові коней після тренування (табл. 1). Підвищення активності ферментів системи АОЗ у коней після фізичних навантажень можна розглядати як компенсаторну реакцію організму тварин, спрямовану на

нормалізацію процесів ПОЛ і зменшення шкідливих впливів АФК, викликаних фізичним навантаженням, що підтверджується статистично неістотним зниженням антиоксидантної активності плазми та еритроцитів після фізичних навантажень (рис. 5).

У коней спортивного напрямку працездатності тривала адаптація організму до фізичних навантажень супроводжується специфічними змінами перебігу метаболічних реакцій. Різні за об'ємом та інтенсивністю систематичні фізичні навантаження спрямовані на вдосконалення техніки стрибків, виїждженості та витривалості коней, модифікують рівновагу між оксидативним стресом і системою АОЗ в організмі цих тварин у напрямі попередження оксидативних порушень метаболізму. Статистичний аналіз залежності між маркерами оксидативного стресу та активністю ферментів АОЗ як у стані спокою, так і після фізичних навантажень виявив взаємозв'язок між досліджуваними параметрами (табл. 2).

Уміст дієнових кон'югатів плазми коней у стані спокою залежить від активності глутатіонредуктази ($r = -0,608$, $P < 0,01$). Вихідний вміст ТБК-активних продуктів у крові безпосередньо пов'язаний з умістом альдегідних похідних оксидативно модифікованих білків еритроцитів ($r = 0,618$, $P < 0,01$). У стані спокою рівень ТБК-активних продуктів еритроцитів ($r = -0,503$, $P < 0,05$), як і вміст альдегідних похідних оксидативно модифікованих білків плазми ($r = 0,613$, $P < 0,01$) пов'язаний з антиоксидативними властивостями церулоплазміну. Активність СОД у стані спокою також корелює з умістом церулоплазміну ($r = -0,672$, $P < 0,05$).

Таким чином, інтенсивність перебігу вільнорадикальних реакцій в організмі коней у стані спокою визначається активністю ферментів глутатионової ланки АОЗ та антиоксидантними властивостями церулоплазміну, які ефективно обмежують розвиток оксидативного стресу. Після фізичних навантажень зменшення вмісту дієнових кон'югатів безпосередньо пов'язане із загальними антиоксидативними властивостями еритроцитів ($r = 0,602$, $P < 0,01$). Спричинений фізичними навантаженнями оксидативний стрес лімітується зростанням вмісту середніх молекул за рахунок збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у крові ($r = 0,506$, $P < 0,05$) та підвищенням активності глутатіонпероксидази ($r = 0,606$, $P < 0,01$). Також уміст ТБК-активних продуктів у крові визначається інтенсивністю перебігу оксидативної модифікації еритроцитів під впливом фізичних навантажень ($r = 0,639$, $P < 0,01$ та $r = 0,483$, $P < 0,05$ для альдегідних і кетонних похідних відповідно). Підтримання ТБК-активних продуктів плазми після тренувань на вихідному рівні безпосередньо пов'язане із процесами оксидативної модифікації білків плазми ($r = 0,490$, $P < 0,05$), що, у свою чергу, спричинює зниження активності глутатіонредуктази ($r = -0,566$, $P < 0,05$), яка бере участь в елімінації шкідливих впливів АФК. Наші дослідження засвідчили, що інтенсивність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків у коней спортивного напрямку працездатності лімітується активністю ферментів глутатионової ланки АОЗ. Процеси ПОЛ і ОМБ у крові коней у динаміці тренувань безпосередньо пов'язані між собою та, вочевидь, певною мірою відображають відповідність обсягів використовуваних фізичних навантажень функціональним можливостям організму цих коней.

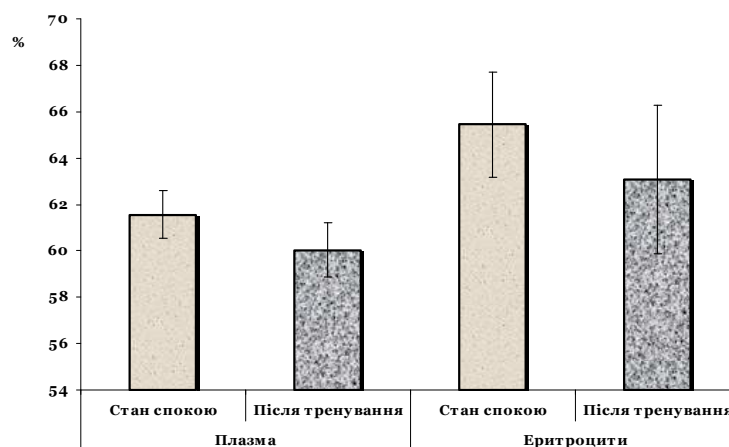


Рис. 5. Загальна антиоксидантна активність (ЗАОА) плазми та еритроцитів крові коней української верхової породи у стані спокою перед тренуванням і після фізичних навантажень

Таблиця 2

Кореляційні залежності між умістом маркерів оксидативного стресу та системою АОЗ у крові коней української верхової породи в динаміці тренінгу

| Зв'язок між параметрами | Коефіцієнт кореляції, <i>R</i> | Достовірність, <i>p</i> |
|---|--------------------------------|-------------------------|
| | Стан спокою перед тренуванням | |
| Дієнові кон'югати – глутатіонредуктаза | -0,608 | <0,01 |
| ТБК-активні продукти (кров) – ОМБ ₃₇₀ (еритроцити) | 0,618 | <0,01 |
| ТБК-активні продукти (еритроцити) – церулоплазмін | -0,503 | <0,05 |
| ОМБ ₃₇₀ (плазма) – церулоплазмін | 0,613 | <0,01 |
| ЗАОА (плазма) – глутатіонпероксидаза | -0,672 | <0,01 |
| СОД – церулоплазмін | -0,672 | <0,05 |
| Після тренування | | |
| Дієнові кон'югати – ЗАОА (еритроцити) | 0,602 | <0,01 |
| Середні молекули – ТБК-активні продукти (кров) | 0,506 | <0,05 |
| Середні молекули – ГПО | 0,606 | <0,01 |
| ТБК-активні продукти (кров) – ОМБ ₃₇₀ (еритроцити) | 0,639 | <0,01 |
| ТБК-активні продукти (кров) – ОМБ ₄₃₀ (еритроцити) | 0,483 | <0,05 |
| ТБК-активні продукти (плазма) – ОМБ ₃₇₀ (плазма) | 0,490 | <0,05 |
| ТБК-активні продукти (плазма) – ГР | -0,566 | <0,05 |

Висновки

Маркери оксидативного стресу (вміст дієнових кон'югатів, молекул середньої маси, ТБК-активних продуктів та оксидативно модифікованих білків), а також активність ферментів антиоксидантного захисту у крові коней спортивного напрямку працездатності – чутливі та інформативні показники, які можуть бути використані для оцінки адекватності фізичних навантажень і відображати рівень їх тренуваності.

Суттєве зниження вмісту ТБК-активних продуктів в еритроцитах і альдегідних похідних оксидативної модифікації білків у плазмі після фізичних навантажень у коней української верхової породи свідчить про розвиток ефективних адаптаційних реакцій в їх організмі, пов'язаних із систематичними тренуваннями з удосконалення техніки стрибків, витривалості та виїждженості.

Систематичний тренінг і активна участь у змаганнях із класичних видів кінного спорту у коней української верхової породи викликають різноспрямовані модифікаційні зміни метаболізму за рахунок підтримання балансу між прооксидантами та системою АОЗ, що запобігає негативному впливу АФК на клітинні та субклітинні структури. Кореляційний аналіз між маркерами оксидативного стресу та активністю ферментів антиоксидантного захисту, як у стані спокою, так і після фізичних навантажень,

показав, що для коней української верхової породи, спеціалізованої для використання в кінному спорті, важлива роль в антиоксидантному захисті відведена саме глутатіоновій ланці, яка суттєво обмежує розвиток оксидативного стресу під час фізичних навантажень.

Дослідження особливостей перебігу метаболічних процесів, пов'язаних із функціонуванням системи антиоксидантного захисту та інтенсивністю процесів ліпเปอร์оксидації у спортивних коней на різних етапах змагально-тренувальної діяльності залишається актуальним, оскільки дозволяє вивчати адаптаційні процеси до фізичних навантажень різного об'єму та інтенсивності, оцінювати рівень тренуваності та визначити чинники, що лімітують їх працездатність. Подальше дослідження про- та антиоксидантного балансу коней спортивного напрямку працездатності в динаміці тренінгу сприятиме науковому обґрунтуванню оцінки адекватності фізичних навантажень та розробки ефективних корекційних тренувальних програм спортивних коней.

Acknowledgments

This study was carried out during Anastasiia Andriichuk' Scholarship Program supported by The International Visegrad Fund (N51200912) in the Department of Animal Physiology, Institute of Biology and Environmental Protection,

Pomeranian University (Slupsk, Poland). We thank to The International Visegrad Fund for the support of our study.

Бібліографічні посилання

- Andrijchuk, A.V., Tkachova, I.V., Tkachenko, G.M., Kurgaljuk, N.M., 2012a. Oksidativnyj stress u sportivnyh loshadej pod vlijaniem fizicheskikh nagruzok [Oxidative stress in sport horses under the influence of physical activity]. Nauchnoe obespechenie razvitiya konevodstva: Mezhdunarodnaja nauchno-prakticheskaja konferencija. Divovo, 93–98 (in Russian).
- Andrijchuk, A.V., Tkachova, I.V., Tkachenko, G.M., Kurgaljuk, N.M., Vartovnyk, M.S., 2012b. Markery oksydatyvnoho stresu u konej, shho vykorystovujut'sja u vy'zdcu v dynamici treningu [Markers of oxidative stress in horses used in dressage training in the dynamics]. Pryrodnychyj Al'manah 17, 32–43 (in Ukrainian).
- Andrijchuk, A.V., Tkachova, I.V., Tkachenko, G.M., Kurgaljuk, N.M., 2012c. Gematologichni pokaznyky ta prooksydatyvni markery u krovi kobyly arabs'koi' chystokrovnoi' ta velykopol'skoi' porid [Hematological indices and prooksydatyvni markers in blood and purebred Arabian mares velykopol'skoiy rocks]. Pryrodnychyj Al'manah 17, 17–31 (in Ukrainian).
- Andrijchuk, A.V., Tkachova, I.V., Tkachenko, G.M., Kurgaljuk, N.M., Matjuha, I.O., 2012d. Zminy rezystentnosti erytrocytiv peryferijnoi' krovi u sportyvnyh konej pid vplyvom fizychnykh navantazhen' [Changes in resistance of erythrocytes in the peripheral blood sport horse under the influence of physical activity]. Naukovo-Tekhnichnyj Bjuletyn' 13(3–4), 93–98 (in Ukrainian).
- Antonov, A.V., 2010. Perekisnoe okislenie lipidov i antioksidantnaja zashhita u troebornyh loshadej v sorevnovatel'nyj period [Lipid peroxidation and antioxidant protection in triathlon horses in the competition period]. Sel'skohozyajstvennaja Biologija 6, 47–49 (in Russian).
- Art, T., Lekeux, P., 2005. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. Livestock Production Science 92, 101–111.
- Chiaradia, E., Avellini, L., Rueca, F., Spaterna, A., Porciello, F., Antonioni, M.T., Gaiti, A., 1998. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. Comp. Biochem Physiol. 119B, 833–836.
- Clemens, M.R., Waller, H.D., 1987. Lipid peroxidation in erythrocytes. Chem. Phys. Lipids 45, 251–268.
- Deaton, C.M., Marlin, D.J., 2003. Exercise-associated oxidative stress. Clin. Tech. Equine Pract. 2, 278–291.
- Galaktionova, L.P., Molchanov, A.V., El'chaninova, S.A., Varshavskij, B.J., 1998. Sostojanie perekisnogo okislenija bol'nyh s jazvennoj bolezn'ju zheludka i dvenadcatiperstnoj kishki [State peroxidation in patients with gastric ulcer and duodenal ulcer]. Klin. Lab. Diagnostika 6, 10–14 (in Russian).
- Glatzle, D., Vuilleumier, J.P., Weber, F., Decker, K., 1974. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in human. Experientia 30, 665–667.
- Glazkov, E.O., Razdajbedin, V.M., 2010. Vplyv kvarcetynu na pokaznyky systemy antyoksydantnogo zahystu organizmu sportsmeniv pry intensyvnomu fizychnomu navantazhenni [Kvartsetyn effect to performance of antioxidant protection of athletes during intense physical load]. Visnyk LNU 24(211), 31–35 (in Ukrainian).
- Gondim, F.J., Zoppi, C.C., Silveira, L.R., da-Silva, L.P., de Macedo, D.V., 2009. Possible relationship between performance and oxidative stress in endurance horses. J. Equine Vet. Sci. 29(4), 206–212.
- Kamyshnikov, V.S., 2004. Spravochnik po Kliniko-Biohimicheskim Issledovanijam i Laboratornoj Diagnostike [Handbook of Clinical and Biochemical Studies and Laboratory Diagnosis]. Moscow, Med-Press-Inform (in Russian).
- Kinnunen, S., Atalay, M., Hyppä, S., Lehmuskero, A., Hänninen, O., Oksala, N., 2005. Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse. J. Sport Sci. Med. 4, 415–421.
- Kirschvink, N., de Moffarts, B., Lekeux, P., 2008. The oxidant / antioxidant equilibrium in horses. Vet. J. 177(2), 178–191.
- Kolisnyk, M.I., Kolisnyk, I.V., Nidzjulka, J., Vlizlo, V.V., 2009. Aktyvni formy kysnju ta i'h rol' u metabolizmi klityn [Reactive oxygen species and their role in the metabolism of cells]. Biologija Tvaryn. 11(1–2), 59–71 (in Ukrainian).
- Koroljuk, M.A., Ivanova, L.I., Majorova, I.G., Tokarev, V.E., 1988. Metod opredelenija aktivnosti katalazy [The Method for Determining the Activity of Catalase]. Lab. Delo 1, 16–19 (in Russian).
- Kostjuk, V.A., Popovich, A.I., Kovaleva, Zh.I., 1990. Prostoij i chuvstvitel'nyj metod opredelenija superoksidmutazy, osnovannyj na reakcii okislenija kvercetina [A Simple and Sensitive Method for the Determination of Superoxide Dismutase Based on the Oxidation of Quercetin]. Vopr. Med. Himii 2, 78–91 (in Russian).
- Laskov, A.A., 1997. Podgotovka Loshadej k Olimpijskim Vidam Konnogo Sporta [Prepare Horses for Equestrian Olympic Kinds of Sports]. VNII Konevodstva (in Russian).
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Meth. Enzymol. 186, 465–478.
- Marlin, D.J., Fenn, K., Smith, N., Deaton, C.D., Roberts, C.A., Harris, P.A., Dunster, C., Kelly, F.G., 2002. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. J. Nutr. 132, 162–167.
- Moin, V.M., 1986. Prostoij i specificheskij metod opredelenija aktivnosti glutationperoksidazy v jericitocitah [A Simple and Specific Method for Determining the Activity of Glutathione Peroxidase in Erythrocytes]. Lab. delo 8, 724–727 (in Russian).
- Nerodenko, V.V., 2009. Biologicheskie Osnovy Sportivnoj Trenirovki v Konnom Sporte [Biological Basis of Sports Training in Equestrian Sports]. Cherkassy (in Russian).
- Niki, E., 2009. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. Free Radical Bio. Med. 29, 469–484.
- Radak, Z., Young, C.H., Goto, S., 2008. Systematic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. Free Radical Bio. Med. 44, 153–159.
- Soares, J.C.M., Zanelal, R., Bondan, C., Alves, L., Lima, M., Motta, A., Zanella, E., 2011. Biochemical and antioxidant changes in plasma, serum, and erythrocytes of horses before and after a jumping competition. J. Equine Vet. Sci. 31, 357–360.
- Tkachenko, H., Andriichuk, A., Kurhalyuk, N., Zalewska, K., Tkachova, I., 2011. Impact of training on blood pro- and antioxidant balance of trained horses. Abstracts of International Conference “Horse welfare”, 2011, 3–4 December, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland, 33.
- Vladimirov, J.A., Archakov, A.I., 1972. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranah [Lipid Peroxidation in Biological Membranes]. Moscow, Nauka (in Russian).
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical Analysis. 4th ed. New Jersey, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.

Надійшла до редколегії 09.04.2013