

УДК: 636.034:619:612.018

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ «РЕМІВІТАЛ» НА ПОКАЗНИКИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В КРОВІ КОРІВ, ХВОРИХ НА КЕТОЗ**Сімонов М.Р., Влізло В.В.**

Інститут біології тварин НААН, м. Львів, Україна, e-mail: msimonov@inenbiol.com.ua

Ефективність лікування корів, хворих на кетоз залежить не лише від нормалізації енергетичного і протеїнового живлення, а й від активності механізмів, спрямованих на подолання окисного стресу. На сьогодні найбільш поширеною схемою лікування корів, хворих на кетоз, є застосування пропіленгліколю в поєднанні з внутрішньовенними введеннями розчину глюкози. Однак ця схема не передбачає корекцію антиоксидантного статусу. Розроблений у Інституті біології тварин НААН препарат «Ремівітал», дозволяє не лише нормалізувати енергетичний дефіцит, а й проявляє гепатопротекторні та антиоксидантні властивості. Матеріалом для досліджень були молочні корови голштинської породи, продуктивністю понад 8000 л молока за попередню лактацію, у яких діагностували кетоз. Тварин було поділено на дві групи. Тваринам 1-ої дослідної групи протягом 5-ти днів застосовували традиційну для господарства схему медикаментозного лікування (згодувували пропіленгліколь, внутрішньовенно вводили розчин глюкози та внутрішньом'язово – інсулін). Тваринам 2-ої дослідної групи протягом 5-ти днів згодувували аналогічну з першою дослідною групою дозу пропіленгліколю та внутрішньовенно вводили препарат «Ремівітал». Препарат «Ремівітал» включає в себе фруктозу, амінокислоти та вітаміни групи В. Після п'ятидобового застосування медикаментозної терапії у корів двох дослідних груп було встановлено нормалізацію загального стану, відсутність кетонурії та покращення активності АОС. Однак, при аналізі результатів дослідження та порівнянні двох схем медикаментозної терапії корів з'ясовано, що запропоноване нами лікування було ефективнішим при корекції антиоксидантного статусу, зокрема вміст ТБК-активних продуктів був нижчим ($p < 0,01$), а активність каталази вищою ($p < 0,01$), порівняно з традиційним.

Ключові слова: корови, кетоз, антиоксидантна система, пероксидне окиснення ліпідів, лікування, ремівітал, пропіленгліколь

Однією із найбільш поширених хвороб обміну речовин у молочних корів є кетоз. Це захворювання характеризується переважним порушенням вуглеводно-ліпідного і протеїнового обмінів, супроводжується нагромадженням в організмі кетонових тіл, ураженням центральної нервової та ендокринної систем, печінки, серця, нирок та інших органів [1]. Крім цього, дане захворювання розвивається на фоні посилення процесів пероксидації, зниження активності антиоксидантного захисту і накопичення в тканинах токсичних продуктів окиснення [2–3]. Ефективність лікування молочних корів, хворих на кетоз залежить не лише від приведення до норми енергетичного і протеїнового живлення, а й від активності механізмів, спрямованих на подолання окисного стресу.

На сьогодні існує багато схем лікування корів, хворих на кетоз. Зокрема, використання глюкостатичних препаратів, наприклад, пропіленгліколю в поєднанні з внутрішньовенними введеннями розчину глюкози [4]. Однак, дана схема не передбачає корекцію антиоксидантного статусу. Крім цього, на нашу думку, використання такої схеми медикаментозної терапії є ефективним лише при субклінічних формах захворювання, коли ще не реєструється ураження печінки.

В Інституті біології тварин НААН було розроблено препарат «Ремівітал», який містить у своєму складі фруктозу, амінокислоти та вітаміни групи В (ТУ У 21.2-30995014-001:2014) [5]. Перевагами даного препарату перед традиційними глюкостатичними препаратами для лікування корів, є корекція метаболізму одночасно з гепатопротекторними та антиоксидантними властивостями. Зокрема, у даному препараті міститься фруктоза, яка швидко засвоюється організмом, на відміну від глюкози, не залежно від рівня інсуліну. Крім цього, в склад препарату входить L-карнітин, який володіє антиоксидантними властивостями [6, 7]. Крім антиоксидантної дії L-карнітин бере участь у транспорті жирних кислот через мітохондріальну мембрану та є важливим фактором підтримання рівня коензиму А [8]. L-орнітин стимулює синтез карбомілфосфатсинтетази – провідного ензиму синтезу сечовини у гепатоцитах [9]. L-аспарагін слугує сировиною для синтезу інших життєво важливих амінокислот та аспарагінової кислоти, яка в свою чергу є незамінною у синтезі сечовини [10]. За нестачі вуглеводів L-лізін може метаболізуватися з утворенням глюкози, цей процес служить важливим джерелом енергії для організму. Нікотинамід та ціанокобаламін беруть участь у метаболізмі жирних кислот та виведенню кетонових тіл [11].

Мета роботи. Встановити вплив застосування препарату «Ремівітал» на активність антиоксидантного статусу корів, хворих на кетоз.

Матеріали та методи. Для досліджень були використані високопродуктивні молочні корови, 2–4 лактації, продуктивністю понад 8000 л молока за попередню лактацію. Клінічні дослідження корів проводили загальноприйнятими методами [12] два тижні після отелення. За результатами клінічного дослідження та експрес-діагностики на вміст кетонових тіл у сечі виявляли хворих на кетоз корів ($n=20$). Хворих тварин поділили на дві групи та призначили їм лікування, яке тривало до зникнення кетонурії. Коровам 1-ої дослідної групи ($n=10$) застосовували традиційну для господарства схему лікування. А саме, згодувували пропіленгліколь з розрахунку 400 мл на голову в добу, внутрішньовенно вводили 20 % розчин глюкози (500 мл/гол/добу) та внутрішньом'язово інсулін (200 ОД/гол/добу). Коровам 2-ї дослідної групи ($n=10$) згодувували аналогічну з першою дослідною групою дозу пропіленгліколю

та внутрішньовенно вводили препарат «Ремівітал» з розрахунку 500 мл/гол/добу. Лікування хворих корів в даному випадку тривало п'ять діб. Кров у тварин відбирали з яремної вени до годівлі перед лікуванням та після його закінчення (на шосту добу). Отримані результати лабораторних досліджень порівнювали із результатами від клінічно здорових тварин (n=10) із негативним тестом на вміст кетонів у сечі, які утримувалися в аналогічних із дослідними групами корів умовах.

Вміст продуктів пероксидації ліпідів (ПОЛ) вивчали, досліджуючи у плазмі крові концентрацію гідропероксидів ліпідів (Миرونчик В.В., 1984), у цільній гепаринізованій крові – дієнових кон'югатів (Стальняя І.Д., 1977), у сироватці крові – ТБК-активних продуктів (Коробейникова С.Н., 1989). Активність супероксиддисмутази визначали методом Е.Е. Дубініної, глутатіонпероксидази – В.М. Моїна, каталази – М.А. Королюк. Вміст вітамінів А та Е у сироватці крові досліджували на рідинному хроматографі Міліхром-5 [13].

Результати досліджень. Проведення медикаментозної терапії в обох дослідних групах привело до покращення клінічного стану корів, відновлення апетиту та зниження кетонів у сечі.

Як показали наші дослідження (табл. 1) у хворих на кетоз корів зросла інтенсивність окиснення наявних у складі ліпідів поліненасичених жирних кислот перекисним шляхом, що виражалося у зростанні вмісту первинних та вторинних продуктів ПОЛ у крові. А саме, дієнових кон'югатів – на 40,7 % (p<0,001), гідропероксидів ліпідів – на 52,4 % (p<0,05) та ТБК-активних продуктів – на 86,8 % (p<0,001). У результаті застосованого лікування відбулося зниження рівня пероксидації ліпідів. Після застосування традиційної схеми протикетозної терапії вміст дієнових кон'югатів знизився на 21,7 % (p<0,01), гідропероксидів ліпідів – на 25 % (p<0,01), а ТБК-активних продуктів – на 21,1 %. За умови застосування запропонованої нами схеми лікування вміст продуктів пероксидації ліпідів також знизився, зокрема дієнових кон'югатів на 24,1 % (p<0,01), гідропероксидів ліпідів – на 28,1 % (p<0,01) та ТБК-активних продуктів – 36,6 % (p<0,01). Аналізуючи отримані результати досліджень у тварин дослідних груп, звертає на себе увагу вірогідно вищий (на 24,4 %; p<0,01) вміст ТБК-активних продуктів у крові корів, яким застосовували традиційну схему лікування. Індикатором посилення перебігу процесів ПОЛ у живому організмі є збільшення вмісту хоча б одного із його продуктів, однак існують дані [14], які свідчать, що одним з найбільш популярних і надійних маркерів визначення окиснювального стресу в клінічних ситуаціях є малоновий діальдегід (ТБК-активні продукти).

Таблиця 1 – Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у крові корів, хворих на кетоз до та після лікування

Група тварин	Показник	Дієнові кон'югати, мкмоль/л	Гідропероксиди ліпідів, од. Е480/мл	ТБК-активні продукти, мкмоль/л
Здорові, n=10	M±m	5,9±0,83	2,1±0,22	3,8±0,30
Хворі до лікування, n=20	M±m	8,3±0,39***	3,2±0,18*	7,1±0,70***
I група (традиційна схема), n=10	M±m	6,5±0,43***	2,4±0,18	5,6±0,29
	p<, до початку лікування	0,01	0,01	0,1
II група («Ремівітал»), n=10	M±m	6,3±0,61**	2,3±0,16	4,5±0,30
	p<, до початку лікування	0,01	0,01	0,01

Примітка. У цій і наступних таблицях * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001, порівняно зі здоровими тваринами

Основною причиною позитивних змін у вмісті продуктів ПОЛ є зростання активності антиоксидантної системи. Зокрема, у крові хворих на кетоз корів активність ензимної ланки антиоксидантного захисту є низькою (табл. 2). Так, порівняно зі здоровими тваринами активність супероксиддисмутази у крові хворих була нижчою на 22,2 %, глутатіонпероксидази – на 31 % (p<0,05), а каталази – на 40,6 % (p<0,01). Після застосування традиційної схеми протикетозної терапії була встановлена тенденція до зростання активності супероксиддисмутази (на 15,5 %) та глутатіонпероксидази (на 14,2 %). При цьому, активність каталази вірогідно зросла на 24,4 % (p<0,01). Після застосування запропонованої нами схеми лікування активність ензимів антиоксидантного захисту була вищою на 33,1 % (p<0,05), 33,9 % (p<0,01) та 51,2 % (p<0,001), відповідно. Порівняно із першою групою, у другій активність супероксиддисмутази була на 15,3 % вищою, глутатіонпероксидази – на 17,2 %, а каталази – на 21,6 % (p<0,01) та вірогідно не відрізнялася від показників, отриманих від здорових тварин (табл. 2).

Таблиця 2 – Активність ензимної ланки антиоксидантної системи у крові хворих на кетоз корів до та після лікування

Група тварин	Показник	Супероксид-дисмутаза, ум.од. на 1г Hb	Глутатіон-пероксидаза, мкМ/хв. на 1г Hb	Каталаза, мкМ/мг×хв
Здорові, n=10	M±m	42,3±0,74	452,70±7,96	6,9±0,70
Хворі до лікування, n=20	M±m	32,9±3,55	312,4±13,88*	4,1±0,22**

I група (традиційна схема), n=10	M±m	38,0±2,08	356,9±20,52**	5,1±0,29*
	p<, до початку лікування	0,1	0,1	0,01
II група («Ремівітал»), n=10	M±m	43,8±3,00	418,4±29,40	6,2±0,28
	p<, до початку лікування	0,05	0,01	0,001

Проведенні лабораторні дослідження вмісту вітамінів, які володіють антиоксидантними властивостями, показали, що у плазмі крові корів, хворих на кетоз, вміст ретинолу є нижчим у 2,9 рази ($p<0,01$), а токоферолу – у 2,6 ($p<0,001$), порівняно зі здоровими тваринами (табл. 3). Після лікування було встановлено вірогідне зростання вмісту як ретинолу, так і токоферолу. А саме, вміст ретинолу в плазмі крові корів після застосування традиційного лікування зріс у 2,6 рази ($p<0,001$), а після запропонованого – у 2,8 рази ($p<0,001$) до рівня показника здорових тварин. Вміст токоферолу зріс відповідно у 2,5 ($p<0,001$) та 2,8 рази ($p<0,01$). Отримані результати свідчать про позитивний вплив застосованого лікування на вміст вітамінів А та Е. На нашу думку, це відбувається опосередковано внаслідок покращення загального стану, апетиту, зниження концентрації ендотоксинів, інтенсивності окиснювального чинника та посилення метаболізму в цілому.

Таблиця 3 – Вміст ретинолу та токоферолу в плазмі крові хворих на кетоз корів до та після лікування, мкмоль/л

Група тварин	Показник	Ретинол	Токоферол
Здорові, n=10	M±m	4,0±0,41	15,6±2,26
Хворі до лікування, n=20	M±m	1,4±0,34**	6,1±0,41***
I група (традиційна схема), n=10	M±m	3,7±0,21	15,4±1,55
	p<, до початку лікування	0,001	0,001
II група («Ремівітал»), n=10	M±m	3,9±0,22	16,9±2,92
	p<, до початку лікування	0,001	0,01

Більш позитивна динаміка показників антиоксидантного захисту в молочних корів, яким застосовували запропоноване лікування, порівняно із традиційним, пов'язана із гепатопротекторними та антиоксидантними властивостями препарату «Ремівітал».

Висновки. У корів, хворих на кетоз, встановлено підвищення пероксидного окиснення ліпідів, що проявлялося зростанням вмісту в крові дієнових кон'югатів (на 40,7 %; $p<0,001$), гідропероксидів ліпідів (на 52,4 %; $p<0,05$), ТБК-активних продуктів (на 86,8 % $p<0,001$), а також зниження активності антиоксидантної системи, зокрема супероксиддисмутази (на 22,2 %), глутатіонпероксидази (на 31 %; $p<0,05$), каталази (на 40,6 %; $p<0,01$), вмісту ретинолу (у 2,9 рази; $p<0,01$) і токоферолу (у 2,6 рази; $p<0,001$).

Застосування традиційної та запропонованої нами схем протикетозної терапії веде до нормалізації вмісту продуктів ПОЛ та активності ензимів антиоксидантної системи, зокрема знижується рівень дієнових кон'югатів (на 22–24 %; $p<0,01$), гідропероксидів ліпідів (25–28 %; $p<0,01$), ТБК-активних продуктів (на 21–37 %; $p<0,01$) та зростає супероксиддисмутази (16–33 %; $p<0,05$), глутатіонпероксидази (14–34; $p<0,01$), каталази (24–51 %; $p<0,01$).

При проведенні взаємного порівняння двох схем медикаментозної терапії було встановлено, що при застосуванні запропонованого нами лікування вміст ТБК-активних продуктів є вірогідно ($p<0,01$) нижчим, а активність каталази – вищою ($p<0,01$).

Перспективи подальших досліджень. Полягають в апробації препарату «Ремівітал» при інших метаболічних порушеннях незаразної етіології, які супроводжуються зниженням функціонального стану печінки та розвитком оксидативного стресу.

Список літератури

1. Левченко В. І. Внутрішні хвороби тварин / В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін та ін.; За ред. В. І. Левченка. – Біла Церква, 2001. – Ч. 2. – 544 с.
2. Weiner H. Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism / H. Weiner, E. Maser, R. Lindahl, B. Plapp // Purdue University Press, 2007. – 414 p.
3. Knobler H. Metabolic Aspects of Chronic Liver Disease / Nova Publishers, 2008. – 362 p.
4. McArt J. A. A field trial on the effect of propylene glycol on displaced abomasum, removal from herd, and reproduction in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis / J. A. McArt, D. V. Nydam, G. R. Oetzel // J. Dairy Sci., – 2012. – Vol.95, No. 5. – P. 2505–2512.
5. ТУ У 21.2-30995014-001:2014. «Ремівітал» Розчин для ін'єкцій. Технічні умови. – затв. та введ. 2014-17-04. – Львів: ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, 2014. – 36 с.
6. Li H.T. Effect of craniotomy on oxidative stress and its effect on plasma L-carnitine levels / H. T. Li, Z. H. Zhao, H. Y. Ding et al. // Can. J. Physiol. Pharmacol., – 2014. – Vol. 92, No.11. – P. 913–916.
7. Sleem M. Combination therapy with losartan and L-carnitine protects against endothelial dysfunction of streptozotocin-induced diabetic rats / M. Sleem, A. Taye, M. A. El-Moselhy et al. // Eur. J. Pharmacol., – 2014. – Vol. 5, No. 744. – P. 10–17.
8. Akbar H. Feed restriction, but not L-carnitine infusion, alters the liver transcriptome by inhibiting sterol synthesis and mitochondrial oxidative phosphorylation and increasing gluconeogenesis in mid-lactation dairy cows / H. Akbar, M. Bionaz, D. Carlson // J. Dairy Sci. – 2013. – 96, №4. – P. 2201–2213.

9. Gerok W. Ammonia detoxication by the liver: New concepts of glutamin and urea synthesis / W. Gerok, D. Haussinger, H. Brunner // *Hepatology*. – 1985. – P. 211–221.
10. D'Mello J. P. F. Amino Acids in Animal Nutrition / J. P. F. D'Mello. – Edinburgh UK: CABI Publishing, 2003. – 526 p.
11. Füll M. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows / M. Füll, A. Deniz, B. Westphal et al. // *J. Dairy Sci.* – 2010. – Vol. 93, No9. – P. 4155–4164.
12. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин / В. І. Левченко, В. В. Влізла, І. П. Кондрахін та ін.; За ред. В.І. Левченка. – Біла Церква, 2004. – 608 с.
13. Лабораторні методи досліджень у біології тваринництві та ветеринарній медицині [Текст] : довідник / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; За ред. В.В. Влізла. – Львів: СПОЛОМ, 2012. – 764 с.
14. Giera M. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview / M. Giera, H. Lingeman, W. M. A. Niessen // *Chromatographia*, – 2012. – Vol. 75, No. 9-10. – P. 433–440.

INFLUENCE OF “REMIVITAL” ON PARAMETERS OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT DEFENCE IN COWS WITH KETOSIS

Simonov M. R., Vlizlo V. V.

Institute of animal biology of NAAS, Lviv, Ukraine

The efficacy of treatment of dairy cows with ketosis depends not only on the normalization of energy and protein supply, but also on the activity of mechanisms for overcoming oxidative stress. Today the most common pattern of treatment of cows with ketosis is the use of propylene glycol in combination with intravenous glucose solution. However, this scheme does not provide correction of antioxidant status. Developed in the Institute of Animal Biology of NAAS drug “Remivital” allows not only to normalize the energy deficit, but also exerts hepatoprotective and antioxidant properties. The study was conducted on ketotic cows of Holstein breed in their second to fourth lactation with milk yield above 8000 kg per previous lactation. The animals were divided into two groups. Animals in the 1st group were given usual for the farm scheme of medicamentous treatment for 5 days (they were orally given propylene glycol, intravenously received glucose and intramuscular insulin). Animals in the 2nd research group were given orally similarly to the first group the same dose of propylene glycol for 5 days and were intravenously injected with “Remivital”. The agent “Remivital” contains fructose, amino acids and vitamins of B group. After 5-day therapy, normalization of general condition, absence of ketonuria and improvement of AOS activity was observed in both groups. But after analysis of the study results and after comparison of two regimens of therapy it was found that proposed regimen of treatment was more effective for the correction of antioxidant status, in particular the content of TBA-active products was lower ($p < 0,01$), and catalase activity was higher ($p < 0,01$) compared to such in case of administration of usual scheme.

Keywords: cows, ketosis, antioxidant system, lipid peroxidation, treatment, remivital, propylene glycol