

## ВПЛИВ ДНК-ВАКЦИНИ ПРОТИ ХВОРОБИ МАРЕКА НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ КУРЧАТ

Бойко В.С.\*

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e-mail: vika-boyko-1634@mail.ru

У статті представлені дані щодо змін інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і показників його регуляції в сироватці крові курчат при імунізації ДНК-вакциною проти хвороби Марека та зараженні.

**Ключові слова:** антиокиснювальна система, вакцинація, курчата, перекисне окиснення ліпідів, сироватка крові, хвороба Марека.

Одним із пріоритетних напрямків сучасної молекулярної генетики є розробка вакцин на основі генно-інженерних конструкцій. Застосування рекомбінантних препаратів ДНК з метою імунізації є надійною альтернативою живим вакцинам у разі відсутності інактивованих аналогів при проведенні заходів специфічної профілактики. Це дозволяє уникнути циркуляції збудника в популяції сприйнятливих тварин. ДНК-вакцинація на сьогодні займає чільне місце в інноваційному розвитку біотехнологій і засобів превентивного спрямування в системі контролю інфекційних хвороб у тварин [1, 2]. Однак вплив нових ДНК-препаратів для імунізації птиці на перекисне окиснення ліпідів на сьогоднішній день не вивчено достатньо, тому робота в цьому напрямку є актуальною. Виходячи з вищезазначеного, метою нашої роботи стало вивчення рівня інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і показників його регуляції у сироватці крові курчат після вакцинації новою ДНК-вакциною проти хвороби Марека.

**Матеріали та методи.** У досліді використовували інтактних добових курчат породи Білий леггорн з благополучного щодо інфекційних хвороб птахогосподарства. Усі дослідження проводили відповідно до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) та «Спільних принципів експериментів на тваринах», схваленими І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Було сформовано 4 групи курчат-аналогів по 15 голів у кожній.

Курчатам першої групи вводили внутрішньом'язово плазмідну ДНК у дозі 110 нг з ліпосомальним комплексом 10 мМ СТАВ-фосфатиділхоліну з молярною долею СТАВ 0,5 % (по 150 мкл) розроблену у лабораторії молекулярної епізоотології і діагностики ННЦ «ІЕКВМ» (к.б.н. Солодянкін О.С.).

Птиці другої групи вводили плазмідну ДНК у аналогічній дозі з одночасним внутрішньом'язовим введенням 100 мкл імуностимулятора Cythosol-AVI (розробник – ННЦ «ІЕКВМ»).

Курчата третьої групи залишалися інтактними до моменту інфікування вірусом ХМ (контроль інфекційної активності).

Птиця четвертої групи була інтактною (контроль фізіологічного розвитку).

На 21-у добу курчат після щеплення та птицю третьої групи заражали контрольним штамом JM-UАвірусу хвороби Марека (ВХМ) з інфекційною активністю 10000 ФУО/мл у дозі 0,5 мл/курча.

Упродовж 89 діб вели спостереження за поведінкою та клінічним станом птиці. На 47-, 68-, 89-у добу досліді по 5 голів птиці з кожної групи були еутаназовані та знекровлені. Отримані зразки сироваток крові заморожували за температури мінус (22±1)°С для подальших досліджень.

Інтенсивність процесів перекисного окиснювання ліпідів (ПОЛ) оцінювали за визначення концентрації у сироватці крові його продуктів – ДК і МДА – у гептан-ізопропанольних екстрактах з використанням методики Гаврилової В. Б. і Мішкорудної М. І. (1985) [3]. Стан показників антиокиснювальної системи (АОС) досліджували за активністю каталази (КФ 1.11.1.6) з використанням Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> спектрофотометрично за довжини хвилі 410 нм, як описано в роботі Королюка М.О. (1988) [4] і за загальною АОА ліпідів плазми крові, як описано в роботі Клебанова Г. І. (1988) [5].

Математична обробка результатів була проведена за допомогою пакета статистичного аналізу Statistica 6.0. Відмінності між порівнюваними показниками вважали достовірними за  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** Відомо, що підвищена активація процесів перекисного окиснення ліпідів і перехід їх до ланки патогенезу хвороби має велике значення, але й затримка процесів ПОЛ в організмі є несприятливим фактором, тому що зниження швидкості метаболізму ліпідів призводить до змін в'язкості ліпідного бішару мембран, змін їх проникності, порушення рецепції [6, 7].

Результати дослідження інтенсивності процесів перекисного окиснювання ліпідів (ПОЛ) у сироватці крові дослідних курчат у динаміці експерименту наведені в таблиці 1.

У зразках сироватки крові курчат вакцинованої (1-ї) групи суттєвої різниці концентрації ДК у порівнянні з контролем не відмічали. У сироватці крові курчат, які були вакциновані та одночасно оброблені імуностимулятором Cythosol-AVI (2-а група) спостерігали зниження інтенсивності процесів ПОЛ за значенням ДК – на 11,1 %, 16,0 % та 11,5 % відповідно на 47-, 68- та 89-у добу дослідного періоду. Концентрація малонового діальдегіду на початку експерименту (47-а доба) була зменшена у порівнянні з показниками групи фізіологічного контролю і складала 17,9 % ( $p < 0,05$ ) у курчат 1-ї групи та 25,6 % ( $p < 0,05$ ) у курчат 2-ї групи відносно значень групи контролю. Друга половина досліді характеризується зменшенням різниці показників у курчат 2-ї дослідної групи на 13,0 % на 68-у добу досліді та на 10,0 % на 89-у добу в порівнянні з рівнем контролю.

**Таблиця 1** – Концентрація продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові курчат, імунізованих проти хвороби Марека та інфікованих вірусом хвороби Марека ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи птиці	Термін дослідження, доби дослідіду		
	47	68	89
ДК, мкмоль/л			
1	30,74±0,60	27,50±1,06	28,60±1,00
2	29,60±0,86	25,35±0,84	27,80±0,50
3	39,20±1,06 *	35,02±0,66 *	37,54±1,10 *
контроль	33,30±1,02	30,20±1,50	31,40±1,30
МДА, ΔD			
1	3,20±0,12 *	3,10±0,18	4,06±0,34
2	2,90±0,10 *	2,95±0,26	3,33±0,22
3	4,77±0,32	4,28±0,30	4,82±0,28 *
контроль	3,90±0,20	3,40±0,36	3,70±0,20

Примітка: \* – тут і далі різниця вірогідна за ( $p < 0,05$ ) відносно значень відповідного показника у контрольних тварин

Динаміка накопичення продуктів ліпопероксидації в курчат інфікованої групи мала зворотній характер. Так, починаючи з 47-ї доби дослідіду відмічали підвищення концентрації ДК на 18,2 %, а МДА на 22,3 %; на наступному терміні спостережень (68-а доба) різниця складає 15,9 % та 25,9 % відповідно, а на 89-у добу експерименту реєстрували найбільшу різницю 19,55 % для ДК та 30,3 % ( $p < 0,05$ ) для МДА в порівнянні з відповідними показниками у курчат групи фізіологічного контролю. Така динаміка вказує на низький рівень системи антиоксидантного захисту.

Дослідженнями встановлено, що застосування вакцинних препаратів не викликало у крові птиці надмірного утворення продуктів ПОЛ, що може пояснюватись активністю системи антиоксидантного захисту, а також вказувати на збалансування ферментативної та неферментативної ланок антиокиснювальної системи.

На початку експерименту відмічали тенденцію до підвищення загальної АОА у вакцинованих проти хвороби Марека курчат, але найбільш виражене – на 12,3 % ( $p < 0,05$ ) у групі з одночасною обробкою імуностимулятором (2-а дослідна група) (табл. 2).

**Таблиця 2** – Динаміка загальної антиокиснювальної активності в сироватці крові курчат імунізованих проти хвороби Марека та інфікованих вірусом хвороби Марека ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи птиці	Термін дослідження, доби дослідіду		
	47	68	89
Загальна АОА, % інгібіції			
1	65,60±1,94*	78,35±1,13*	67,10±2,03
2	68,20±0,60*	80,74±0,30*	70,22±2,10*
3	54,02±0,74*	58,46±0,66*	51,40±1,10*
контроль	60,70±0,40	67,20±0,53	62,80±0,70

На 68-у добу дослідіду активність антиокиснювальної системи підвищується в організмі 1-ї та 2-ї дослідних груп на 16,6 % та 20,1 % відповідно в порівнянні з контрольним рівнем ( $p < 0,05$ ). На останньому етапі досліджень (89-а доба) АО активність в організмі курчат 2-ї групи підвищується на 11,8 % ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контрольними показниками.

Розвиток інфекційного процесу в організмі дослідних курчат 3-ї групи призводить до поступового зниження активності системи антирадикального захисту починаючи з 47-ї доби експерименту на 11,0 %, на 68-у добу різниця складає 13,0 %, а на 89-у добу відмічали максимум зниження на 18,0 % у порівнянні з показниками групи фізіологічного контролю. Такий напрямок змін може вказувати на недостатність потенціалу власних ресурсів АОС організму дослідних курчат для запобігання впливу активних метаболітів кисню і відповідного включення протективних механізмів за розвитку інфекційного процесу при хворобі Марека.

Одним з важливих показників антиоксидантної статусу організму є також активність антиоксидантних ферментів, які регулюють інтенсивність вільнорадикальних процесів. З цією метою нами було вивчено активність ферменту каталази.

**Таблиця 3** – Активність каталази в сироватці крові курчат імунізованих проти хвороби Марека та інфікованих вірусом хвороби Марека ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи птиці	Термін дослідження, доби досліду		
	47	68	89
Активність каталази, нмоль $H_2O_2$ /сек мг білка			
1	18,64±0,56	17,72±0,34	19,60±0,64 *
2	23,92±0,62 *	21,16±0,82 *	26,84±1,20 *
3	19,02±0,70	15,62±1,10	16,22±0,52
контроль	16,70±0,90	15,92±0,63	17,28±0,49

Динаміка активності каталази в сироватці крові курей характеризується тенденцією до підвищення її активності у процесі розвитку поствакцинальних реакцій. Так, на початку експерименту (47-а доба) підвищення складає 11,62 % та 43,23 % ( $p < 0,05$ ) у курчат вакцинованих груп, інфікована група має різницю 13,89 % відносно показників фізіологічного контролю. На наступному етапі спостережень (68-а доба) різниця у 1-й та 2-й групах птиці складає 11,3 % і 33,0 % ( $p < 0,05$ ) відповідно. Пік зростання активності цього ферменту відмічали на останньому терміні спостережень (89-а доба) у сироватці крові курчат 1-ї та 2-ї груп на 13,4 % ( $p < 0,05$ ) та 55,3 % ( $p < 0,05$ ) відповідно відносно показників курчат фізіологічного контролю. У сироватці крові курчат третьої дослідної групи на кінець досліду не встановлено вірогідних змін вивченого показника у порівнянні з контролем. Поступове підвищення активності каталази в сироватці крові вакцинованої птиці впродовж експерименту є ознакою компенсаторної індукції антиокиснювальних ресурсів.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** 1. У курчат вакцинованої групи та групи з обробкою імуностимулятором Cythosol—AVI встановлено поступове зниження вмісту продуктів ліпопероксидації – ДК і МДА – на тлі витрачання потенціалу власних ресурсів АОС організму дослідних курчат, а також підвищеного рівня активності каталази ( $p < 0,05$ ).

2. Встановлено, що на фоні надлишкового утворення продуктів ПОЛ (ДК та МДА) ( $p < 0,05$ ) у сироватці крові курчат інфікованої групи впродовж усього експерименту відбувається поступове зниження активності ендогенної АОА та каталази.

3. Представляється перспективним у подальшій роботі більш детально вивчення направленості змін гуморального неспецифічного імунітету при застосуванні бігенної ДНК-вакцини ННЦ «ІЕКВМ» проти хвороби Марека.

#### Список літератури

1. Воробьев А.А., Егорова Н.Б., Захарова Н.С. и др. Прогноз в области создания вакцин нового поколения для вакцинопрофилактики и вакцинотерапии инфекционных и неинфекционных болезней [Текст] // Пульмонология. — 2005. — Вып.6. — С. 16-36.
2. Black J. Genome projects and gene therapy: gateways to next generation biological weapons // Miliz. Med. — 2003. — Vol.108. №11. — P. 864-871.
3. Гаврилова, В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови [Текст] / В.Б. Гаврилова, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. — 1985. — № 3. — С. 33–35.
4. Королюк, М.А. Определение активности каталаз [Текст] / М.А. Королюк // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
5. Клебанов, Г.И. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопропротеидов [Текст] / Г.И. Клебанов [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — № 5. — С. 59–62.
6. Арчаков, А.И. Модификация белков активным кислородом и их распад [Текст] / А.И. Арчаков, И.М. Михосоев // Биохимия. — 1998. — Т. 54, № 2. — С. 179–186.
7. Ajayan, P.M. Drug delivery and biomolekulartransport [Текст] / P.M. Ajayan, O.Z. Zhou // Carbon. — 2005. — V. 43. — P. 389-415.

#### THE IMPACT OF DNA-VACCINES AGAINST MAREK'S DISEASE AND THE CAUSATIVE AGENT ON THE INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION

**Boiko V.S.**

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

The article presents data on changes of intensity of lipid peroxidation and its regulation parameters in serum of chickens that have been previously immunized, and infected with of Marek's disease virus.

The aim of our study was to investigate the level of intensity of lipid peroxidation and its regulation parameters in serum chicks for DNA-vaccination.

**Materials and Methods.** In the experiment was used intact chickens white leghorn breed. Chickens of first and second groups were injected intramuscularly at a dose of plasmid DNA 110 ng in liposomal complex of 10 mM phosphatidylcholine STAB (STAB 0.5 %). In second group immunostimulant Cythosol—AVI was additional lyadded intramuscularly. The third group and the fourth group were intact.

Chickens of first, second and third groups were infected on 21th day by control strain JM-UA VCM infectivity F<sub>UO</sub>/sm<sup>3</sup> 10000. We observed chickens during 89 days. Blood serum was collected three times.

*The intensity of lipid peroxidation was evaluated by determining serum levels of its products – DC and MDA - in heptane-isopropanol extract using the method GavriloVA V.B. and Mishkorudna M.I. (1985). The total serum lipid AOA was determined as described in the Klebanov G.I. (1988). The activity of catalase was determined by the method Korolyuk M.O. (1988).*

*In chicken the vaccinated group and the group with immunostimulatory Cythosol–AVI research groups gradual reduction of lipid peroxidation products against the backdrop of expenditure potential own resources AOS body of research chicken, and increased levels of catalase activity ( $p < 0,05$ ). Found that against the background of excessive formation of lipid peroxidation products ( $p < 0,05$ ) in the blood serum of chicken infected group throughout the experiment, the gradual decrease in activity of endogenous AOA and catalase.*

*Seems promising in future work more detailed study of directional changes of humoral nonspecific immunity in the application of DNA vaccines NSC «IECVM» against Marek's disease.*

**Keywords:** antioxidant system, blood serum, chicken, lipid peroxidation, vaccination, Marek's disease.

**УДК 577.124:612.122:546.48'226:636.932.028**

### **ВПЛИВ КАДМІЮ СУЛЬФАТУ НА РІВЕНЬ ПОКАЗНИКІВ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ В КРОВІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ**

**Деркач Є.А.**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
м. Київ, України, e-mail: evg.derkach@gmail.com*

*Досліджено вплив кадмію сульфату на концентрацію лактату, пірувату,  $\alpha$ -кетоглутарату, малату та оксалоацетату в крові отруєних щурів 3- та 18-місячного віку. Показано, що отруєння щурів кадмію сульфатом призводить до підвищення концентрації метаболітів циклу трикарбонових кислот і гліколізу у крові тварин обох досліджених вікових груп.*

*Порівняння вікової динаміки змін показників вуглеводного обміну у крові щурів отруєних Кадмієм, свідчить, що організм тварин 3-місячного віку є більш чутливим до токсичної дії Кадмію.*

**Ключові слова:** кадмію сульфат, лактат, піруват,  $\alpha$ -кетоглутарат, малат, гліколіз, цикл трикарбонових кислот, кров, щури.

Антропогенне забруднення навколишнього середовища сполуками важких металів викликає серйозну стурбованість своїми наслідками для здоров'я людини та тварин. Серед важких металів, Кадмій – один з найтоксичніших елементів, який, потрапляючи в організм, практично не виводиться та накопичується в різних органах і тканинах. Вплив Кадмію на організм проявляється інтенсивною конкурентною взаємодією з іншими двовалентними металами в структурі ферментів [5].

Зміни інтенсивності окисно-відновних процесів, що відбуваються в разі отруєння важкими металами, призводять до порушення реакцій гліколізу та циклу трикарбонових кислот – важливих шляхів біологічного окиснення та генерації макроергічних зв'язків [7].

Вікова динаміка змін концентрацій метаболітів гліколізу та циклу трикарбонових кислот за отруєння Кадмієм пов'язана з особливостями обмінних процесів, властивих певному віковому періоду та характером поведінки даного важкого металу в організмі. Відомо, що за умов отруєння Кадмієм відбувається його інтенсивне накопичення у тканинах печінки і нирок. У свою чергу це призводить до зміни активності низки ферментів, порушення кислотно-лужного стану та інших важливих біохімічних показників. Чутливість організму до токсичної дії важких металів має виражену вікову залежність і знижується з віком [5, 6]. Транспортування важких металів в організмі в онтогенезі відбувається з неоднаковою інтенсивністю. Значна частина Кадмію зв'язується з альбумінами, глобулінами, еритроцитами. У старому організмі вміст альбумінів у крові зменшується, що істотно позначається на токсикокінезиці важких металів [6].

Разом з тим, незважаючи на чисельні дослідження в цьому напрямі, віковий аспект механізмів впливу Кадмію на окремі ланки метаболічних перетворень остаточно не з'ясовано. На сьогодні також відсутні дані щодо проведення системних досліджень концентрації метаболітів гліколізу та циклу трикарбонових кислот у крові отруєних тварин різного віку, що зумовлює актуальність вивчення цієї проблеми [1, 3, 7, 8, 9].

**Мета роботи.** Враховуючи надзвичайно важливу роль кетокислот у функціонуванні трикарбонового циклу, у трансмембранному перенесенні гідрогену, ацетил-КоА та низки інших сполук у процесах декарбоксилування, азотного обміну, регуляції окисно-відновних процесів тощо, було поставлено за мету дослідити вплив Кадмію на концентрацію кетокислот та інших метаболітів, тісно пов'язаних з їх обміном, у крові отруєних щурів різного віку.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводились на самцях білих безпорідних щурів двох вікових груп: 3-місячного віку (молоді тварини) і 18-місячного (старі тварини; період старості). Тварини утримувались на стандартному раціоні віварію. Отруєння Кадмієм проводили за допомогою зонду, шляхом щоденного внутрішньошлункового введення кадмію сульфату, який попередньо розводили 0,89 % розчином натрію хлориду з розрахунку 1,34 мг/кг маси тіла, що становить 1/50 LD<sub>50</sub>. [2] Інтактним тваринам вводили відповідну кількість 0,89 % розчину натрію хлориду. Тривалість дослідження становила 14 діб.