УДК: 619:616.2:636.2:577.21
DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.297

ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ПРИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ У ТЕЛЯТ

Шутиков В.А. – мл. науч. сотр. (ORCID 0009-0004-2018-2662); **Рудь Д.Е. –** соиск.; **Стрельников Н.А.** – мл. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0781-7713); **Гунькин Д.В.** – мл. науч. сотр., (ORCID 0009-0005-3460-8123); **Михайлов Е. В.** * – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5457-1325)

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» (ФГБНУ «ВНИВИПФиТ»)

*voronezh81@rambler.ru

Ключевые слова: *телята, респираторная патология, бронхопневмония, уровень экспрессии генов, антиоксидантная защита.*

Keywords: *calves, respiratory pathology, bronchopneumonia, gene expression level, antioxidant protection.*

Поступила: 26.04.2025 **Принята к публикации: 06.06.2025**
Опубликована онлайн:20.06.2025

РЕФЕРАТ

Целью настоящего исследования являлась оценка относительного уровня экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты антиоксидантной защиты, а именно супероксиддисмутазу (SOD), каталазу (CAT) и глутатионпероксидазу (GPX), у телят с респираторной патологией. Респираторные заболевания характеризуются дисбалансом между прооксидантными и антиоксидантными механизмами. Развивающийся оксидативный стресс усугубляет течение заболевания и может быть использован в качестве мишени для терапевтического воздействия. Для достижения поставленной цели использовался метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, материалом исследования служила периферическая кровь больных и здоровых телят. Для опыта были отобраны здоровые 3-х месячные телята (n=10) и больные (n=10) того же возраста животные с респираторной патологией. Результаты показали статистически значимое повышение экспрессии гена HIF-1α в крови у телят с респираторной патологией, что указывает на активацию гипоксического ответа. Экспрессия гена SOD1 также была повышена, что может указывать на компенсаторную реакцию оксидативного стресса. Кроме того, у больных телят была повышена экспрессия гена GPX1, что может свидетельствовать об усилении детоксикации перекиси водорода в ответ на повышенную продукцию активных форм кислорода. В то же время, экспрессия гена CAT не показала статистически значимых различий между группами. Повышение экспрессии HIF-1α, SOD1 и GPX1 в крови больных телят отражает активацию компенсаторных механизмов в ответ на гипоксию и окислительный стресс. Отсутствие значимых изменений в экспрессии каталазы может свидетельствовать о том, что на ранних стадиях заболевания этот ген не вовлечен в компенсаторные процессы в достаточной степени, либо его активация происходит на более поздних этапах.

ВВЕДЕНИЕ/ INTRODUCTION

Респираторные заболевания телят представляют собой одну из наиболее значимых проблем современного животноводства. Их распространенность и тяжесть течения обуславливают значительные экономические потери, связанные с затратами на лечение, снижением продуктивности и падежом [5,8]. В последние годы возрастает интерес к роли окислительного стресса в патогенезе респираторных заболеваний и поиску новых терапевтических подходов, направленных на коррекцию антиоксидантного статуса организма [1,9].

Окислительный стресс является одним из ключевых патогенетических механизмов при респираторных заболеваниях различной этиологии [10]. Мурадян и соавт. [7] отмечают, что воспалительный процесс в легочной ткани сопровождается гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК) фагоцитирующими клетками, что приводит к повреждению клеточных мембран и нарушению функциональной активности альвеолярных клеток. В исследованиях Lykkesfeldt и Svendsen [13] показано, что у животных с бронхопневмонией наблюдается достоверное повышение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови и легочной ткани.

Система антиоксидантной защиты (АОЗ) играет важнейшую роль в регуляции редокс-гомеостаза и предотвращении окислительного повреждения тканей [4]. Она включает ферментативные компоненты, такие как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатионпероксидаза (GPX), и неферментативные антиоксиданты – витамины А, Е, С, глутатион и другие [2]. У больных животных наблюдается дисбаланс между оксидантной и антиоксидантной системами, что усугубляет течение заболевания и замедляет процессы выздоровления [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования были проведены в крупном животноводческом комплексе Воронежской области. Для проведения опыта по оценке относительного уровня экспрессии генов антиоксидантного статуса были отобраны здоровые 3-х месячные телята (n=10) и больные (n=10) того же возраста животные с респираторной патологией. Для постановки диагноза использовали общеклинические и лабораторные методы. От животных исследуемых групп была взята кровь из яремной вены для дальнейшего изучения.

Кровь для лабораторных исследований от телят каждой группы отбирали для сравнительной оценки уровня экспрессии генов антиоксидантной системы и активности ферментов АОС у здоровых и больных животных. На протяжении всего опыта проводили клинические наблюдения, учитывали заболеваемость и падеж. Кровь для лабораторных исследований помещали в пробирки Эппендорфа и подвергали глубокой заморозке с использованием жидкого азота.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли на приборах Bio-Rad CFX 96 (Bio-rad, США), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и DTLite 4S1 (ДНК-Технология, Россия) с готовой коммерчески доступной смесью для PCR 5X qPCRmix-HS LowROX (Евроген, Россия). Выделение тотальной РНК осуществлено набором «РНК-Экстран» (Синтол, Россия) по утвержденной инструкции. Качество выделенной РНК оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Исследование проводили посредством ПЦР-анализа с добавлением красителя SYBR Green. Экспрессия генов рассчитывалась по методике 2-ΔΔCt, где сначала рассчитвывается разница между геном домашнего хозяйства (контроля) и исследуемым геном (ΔCt= Ct (β-actin) - Ct (исследуемый ген)). Полученное значение возводилось в степень -ΔΔCt. Для оценки экспрессии изучаемых генов использовалась панели специфичных праймеров для исследования уровней экспрессии генов, ответственных за иммунную и антиоксидантную систему (табл. 1).

Таблица 1 – Праймеры, используемые при постановке ПЦР в реальном времени (телята)

№	Название	Последовательность нуклеотидов
1	*β-actinf* *β-actinr*	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT GGGCAGTGATCTCTTTCTGC
2	*SOD1f* *SOD1r*	CACCATCCACTTCGAGGCAA GCACTGGTACAGCCTTGTGT
3	*CATf* *CATr*	TCACTCAGGTGCGGACTTTC GGATGCGGGAGCCATATTCA
4	*HIF-1αf* *HIF-1αr*	CCACGAGGAAATGAGAGAAATGCTT CCGCTGTGTATTTTGCTCTTTACC
5	*GPX1f* *GPX1r*	GAGCCCTTCAACCTGTCCTC GCGTTTTCCTGATGCCCAAAC

Исследование показателей антиоксидантной защиты проведено в соответствии с «Методическими положениями по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма» [6].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного пакета Microsoft Excel 2019 с применением встроенных функций статистического анализа и надстройки "Анализ данных". Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данные представляли в виде среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (m). Достоверность различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. При отсутствии нормального распределения применяли непараметрические методы статистики (критерий Манна-Уитни, критерий Уилкоксона). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Для выявления взаимосвязей между исследуемыми параметрами проводили корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции Пирсона (r). Силу корреляционной связи оценивали по шкале Чеддока: $0,1<r<0,3$ – слабая связь; $0,3<r<0,5$ – умеренная связь; $0,5<r<0,7$ – заметная связь; $0,7<r<0,9$ – высокая связь; $0,9<r<1,0$ – весьма высокая связь.

РЕЗУЛЬТАТЫ/ RESULTS

Результаты исследования относительного уровня экспрессии генов антиоксидантной системы у здоровых телят и телят с респираторной патологией представлены на рисунке 1.

Изучение молекулярных механизмов респираторной патологии у телят выявило значимые изменения в экспрессии ключевых генов антиоксидантной защиты. Анализ показал, что у больных животных наблюдается усиление экспрессии ферментов, отвечающих за нейтрализацию активных форм кислорода: каталазы (CAT), глутатионпероксидазы 1 (GPX1) и супероксиддисмутазы 1 (SOD1). По сравнению со здоровыми особями, у телят с бронхопневмонией уровень экспрессии CAT превышал норму на 2,47%, в то время как экспрессия GPX1 продемонстрировала существенно более выраженное повышение — на 53,7%. Активность гена SOD1 также оказалась повышенной, превосходя показатели контрольной группы на 9,8%. Примечательно, что одновременно с этим зафиксировано выраженное увеличение экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (HIF-1α), в 2,17 раза превышающее нормальные значения. Сочетание повышенной активности генов антиоксидантной системы с гиперэкспрессией HIF-1α свидетельствует о развитии у больных телят комплексной патофизиологической реакции, включающей окислительный стресс и гипоксические состояния в тканях респираторного тракта [11,15].

Из данных таблицы 2 можно наблюдать, что активность каталазы у здоровых телят выше, чем у больных, на 8,38%

(p≤0,01). Активность глутатионпероксидазы в обеих группах совпадает, однако у больных телят наблюдается незначительное снижение показателя, что указывает на возможные изменения в ферментативной антиоксидантной защите (p≤0,05). Показатель СОД у здоровых телят превышает уровень больных на 6,55% (p≤0,05), что свидетельствует о более высокой активности антиоксидантных ферментов в данной группе.

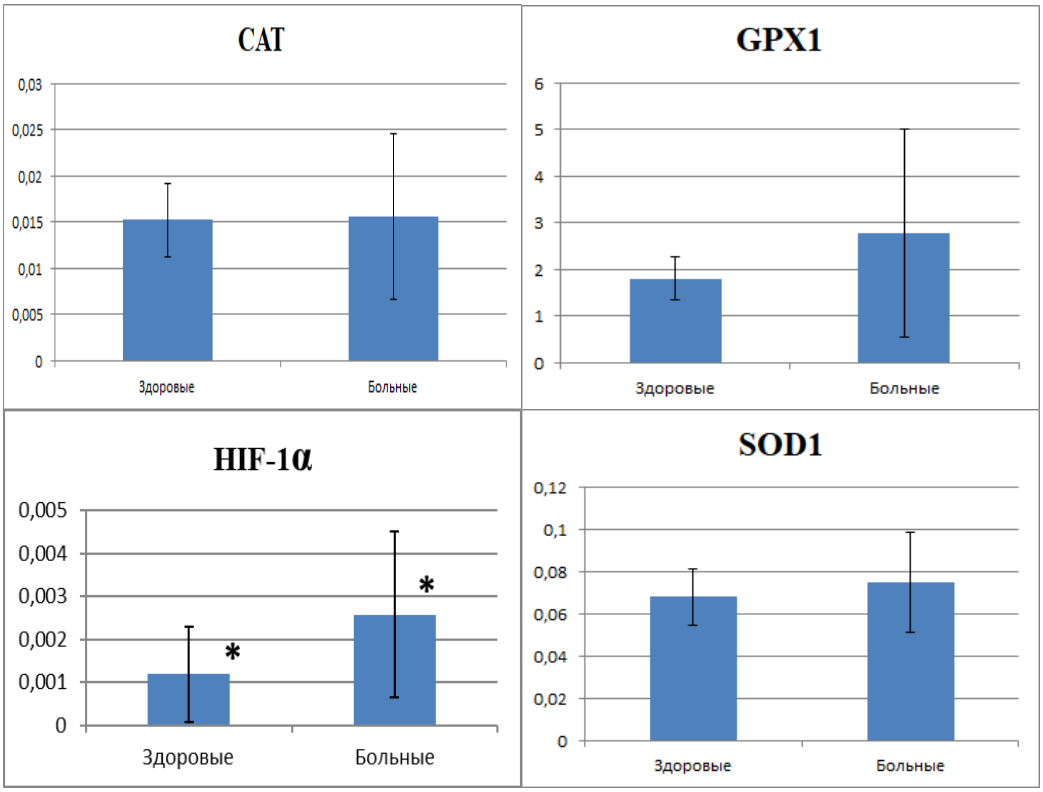

Рисунок 1 – Относительный уровень экспрессии генов антиоксидантной системы у здоровых телят и телят с респираторной патологией (- p≤0,05).*

Таблица 2 – Показатели системы ПОЛ-АОЗ

Показатели	Здоровые	Больные
Каталаза, ммоль вост перекиси/л*мин	34,73±1,22**	32,05±0,87
Глутатион пероксидаза, ммоль вост глут./л*мин	27,11±0,25	27,11±0,17
СОД (е.а./мг Hb)	1,432±0,052*	1,344±0,047

*Примечание: * p<0,05 ** p<0,01*

Анализ корреляционных взаимосвязей выявил значительную степень сопряженности между фактором, индуцируемым гипоксией (HIF-1α), и ключевыми компонентами антиоксидантной защиты. Наблюдаемая высокая положительная корреляция между HIF-1α и супероксиддисмутазой (SOD1) (r=0,72) свидетельствует о тесной функциональной взаимосвязи этих параметров. Аналогично, заметная положительная связь между HIF-1α и глутатионпероксидазой (GPX1) (r=0,65) подтверждает предположение о том, что гипоксический фактор активно участвует в регуляции экспрессии генов антиоксидантной защиты.

Данные корреляционные зависимости подкрепляют гипотезу о том, что в условиях тканевой гипоксии активируются компенсаторные механизмы, направленные на усиление антиоксидантной защиты для противодействия окислительному стрессу. Повышенная экспрессия HIF-1α у больных телят, отмеченная в исследовании, может рассматриваться как адаптивная реакция организма, направленная на индукцию антиоксидантных ферментов в ответ на гипоксическое состояние.

Также стоит отметить наблюдающуюся разницу между уровнями экспрессии генов антиоксидантной защиты (CAT, SOD1 и GPX1) и активностью функциональных ферментов. Подобные отличия имеют обширную этиологию разнонаправленного характера. Среди основных причин выделяют стабильность мРНК, различные посттрансляционные модификации (окислительное фосфорилирование), окислительный стресс (вызывает инактивацию ферментов), влияние кофакторов, а также регуляция на уровне эпигенетических механизмов. Всё это может вызывать снижение активности ферментов на фоне более высокой экспрессии соответствующих генов [12, 14, 16].

ВЫВОДЫ/ CONCLUSION

Оксидативный стресс играет важную роль в патогенезе респираторных заболеваний у телят. Изменение относительного уровня экспрессии генов антиоксидантной защиты организма может служить потенциальным биомаркером для диагностики, мониторинга и разработки новых стратегий профилактики и лечения респираторных заболеваний. Полученные данные подтверждают, что респираторные патологии у телят связаны с развитием окислительного стресса и ~~недостатку~~ недостатком кислорода. В ответ на эти патологические изменения организм активирует компенсаторные процессы, что выражается в увеличение экспрессии генов GPX1, SOD1 и HIF-1α.

RELATIVE EXPRESSION LEVEL OF ANTIOXIDANT PROTECTION GENES IN CALVES WITH RESPIRATORY PATHOLOGY

Shutikov V.A. – junior scientific co-author (ORCID 0009-0004-2018-2662); **Rud D.E.** – the applicant; **Strelnikov N.A.** – Junior scientific co. (ORCID 0000-0002-0781-7713); **Gunkin D.V.** – Junior scientific co. (ORCID 0009-0005-3460-8123); **Mikhailov E.V. *** – PhD in Veterinary Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5457-1325)

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy

*voronezh81@rambler.ru

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the relative expression levels of genes encoding key antioxidant enzymes, namely superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX), in calves with respiratory disease. Respiratory diseases are also characterized by an imbalance between pro-oxidant and antioxidant mechanisms. Developing oxidative stress exacerbates the disease course and can be used as a target for therapeutic intervention. To achieve this goal, quantitative real-time polymerase chain reaction was used, with peripheral blood from sick and healthy calves serving as the research material. Healthy 3-month-old calves (n=10) and sick (n=10) animals of the same age with respiratory disease were selected for the experiment. The results showed a statistically significant increase in

HIF-1α gene expression in the blood of calves with respiratory disease, indicating activation of the hypoxic response. SOD1 gene expression was also increased, which may indicate a compensatory reaction to oxidative stress. Furthermore, GPX1 gene expression was elevated in sick calves, which may indicate enhanced hydrogen peroxide detoxification in response to increased production of reactive oxygen species. At the same time, CAT gene expression did not show statistically significant differences between the groups. Increased expression of HIF-1α, SOD1, and GPX1 in the blood of sick calves reflects the activation of compensatory mechanisms in response to hypoxia and oxidative stress. The lack of significant changes in catalase expression may indicate that, in the early stages of the disease, this gene is not involved in compensatory processes to a sufficient extent, or its activation occurs at later stages.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Басова Н.Ю., Старикова Е.А., Схатум А.К. Окислительный стресс у телят при респираторных патологиях // Ветеринария Кубани. 2019. № 2. С. 6-9. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-2-6-9
2. Высокогорский В.Е., Воронова Т.Д., Веселов Д.С. Антиоксидантная система организма животных: механизмы регуляции и возрастные особенности // Ветеринарная патология. 2019. № 1. С. 23-30. DOI: 10.24411/0869-8015-2019-10004
3. Зайцева Е.В., Крапивина Е.В., Менькова А.А. Оксидативный стресс у молодняка при патологии // Вестник Брянской ГСХА. 2019. № 3. С. 31-35.
4. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Молекулярные механизмы работы антиоксидантной системы // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2018. № 2 (60). С. 203-207. DOI: 10.25631/tbsh.2018.60.2.203-207
5. Лысенко А.П., Красникова Е.Л., Власенко В.В. Этиология и патогенез респираторных болезней телят // Ветеринария. 2019. № 3. С. 3-7. DOI: 10.30896/0042-4846.2019.22.3.3-7
6. Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма / М. И. Рецкий, С. В. Шабунин, Г. Н. Близнецова [и др.]. – Воронеж: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Российской академии сельскохозяйственных наук, 2010. – 70 с.
7. Мурадян С.В., Петрова О.Г., Барашкин М.И. Особенности патогенеза респираторных заболеваний крупного рогатого скота // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2018. № 3. С. 58-61. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2018.3.58
8. Мурадян С.В., Петрова О.Г., Барашкин М.И. Респираторные вирусные инфекции крупного рогатого скота // Аграрный вестник Урала. 2018. № 8 (175). С. 45-49. DOI: 10.32417/article_5bf7aa18c9baa1.26199287
9. Петрянкин Ф.П., Семенов В.Г., Иванов Н.Г. Иммунокоррекция в биологии и ветеринарии. Чебоксары: Новое время, 2018. 168 с. DOI: 10.17238/isbn978-5-9909844-1-7
10. Karakike E., Giamarellos-Bourboulis E.J. Macrophage activation-like syndrome: a distinct entity leading to early death in sepsis // Frontiers in Immunology. 2019. Vol. 10. P. 55. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00055
11. Kim D.K., Lillehoj H.S., Lee S.H. Expression profiles of cytokines and chemokines against Eimeria maxima infection in two genetically distinct chicken lines // Poultry Science. 2018. Vol. 97. P. 1263-1273.
12. Lu Y. et al. Increased acetylation of H3K14 in the genomic regions that encode trained immunity enzymes in lysophosphatidylcholine-activated human aortic endothelial cells–novel qualification markers for chronic disease risk factors and conditional DAMPs // Redox biology. – 2019. – Т. 24. – С. 101221.
13. Lykkesfeldt J., Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals // Veterinary Journal. 2019. Vol. 173. P. 502-511. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.06.005
14. Nogueira N. P. et al. Heme modulates

Trypanosoma cruzi bioenergetics inducing mitochondrial ROS production // Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – Т. 108. – С. 183-191.
15. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning // Biochimica et Biophysica Acta. 2018. Vol. 1813. P. 1263-1268.
16. Tóth E. et al. The highly conserved, N-terminal (RXXX) 8 motif of mouse Shadoo mediates nuclear accumulation // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2013. – Т. 1833. – №. 5. – С. 1199-1211.

REFERENCES

1. Basova N.Yu., Starikova E.A., Shatum A.K. Oxidative stress in calves with respiratory pathologies // Veterinary Science of Kuban. 2019. No. 2. P. 6-9.
2. Vysokogorsky V.E., Voronova T.D., Veselov D.S. Antioxidant system of the animal body: regulatory mechanisms and age-related characteristics // Veterinary Pathology. 2019. No. 1. P. 23-30.
3. Zaitseva E.V., Krapivina E.V., Menkova A.A. Oxidative stress in young animals with pathology // Bulletin of the Bryansk State Agricultural Academy. 2019. No. 3. P. 31-35. DOI: 10.30679/2587-9847-2019-3-31-35
4. Kolesnichenko LS, Kulinsky VI Molecular mechanisms of the antioxidant system // Bulletin of the SB RAMS. 2018. No. 2 (60). P. 203-207.
5. Lysenko A.P., Krasnikova EL, Vlasenko VV Etiology and pathogenesis of respiratory diseases of calves // Veterinary science. 2019. No. 3. P. 3-7.
6. Methodological provisions for the study of free radical oxidation processes and the body's antioxidant defense system / M. I. Retsky, S. V. Shabunin, G. N. Bliznetsova [et al.]. - Voronezh: State Scientific Institution All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 2010. - 70 p.
7. Muradyan S. V., Petrova O. G., Barashkin M. I. Features of the pathogenesis of respiratory diseases in cattle // Issues of legal regulation in veterinary medicine. 2018. No. 3. P. 58-61.
8. Muradyan S.V., Petrova O.G., Barashkin M.I. Respiratory viral infections of cattle // Agrarian Bulletin of the Urals. 2018. No. 8 (175). P. 45-49. DOI: 10.32417/article_5bf7aa18c9baa1.26199287
9. Petryankin F.P., Semenov V.G., Ivanov N.G. Immunocorrection in biology and veterinary medicine. Cheboksary: Novoye Vremya, 2018. 168 p.
10. Karakike E., Giamarellos-Bourboulis E.J. Macrophage activation-like syndrome: a distinct entity leading to early death in sepsis // Frontiers in Immunology. 2019. Vol. 10. P. 55. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00055
11. Kim D.K., Lillehoj H.S., Lee S.H. Expression profiles of cytokines and chemokines against Eime-ria maxima infection in two genetically distinct chicken lines // Poultry Science. 2018. Vol. 97. P. 1263-1273.
12. Lu Y. et al. Increased acetylation of H3K14 in the genomic regions that encode trained immunity enzymes in lysophosphatidylcholine-activated human aortic endothelial cells–novel qualification markers for chronic disease risk factors and conditional DAMPs // Redox biology. – 2019. – Т. 24. – P. 101221.
13. Lykkesfeldt J., Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals // Veterinary Journal. 2019. Vol. 173. P. 502-511. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.06.005
14. Nogueira N. P. et al. Heme modulates Trypanosoma cruzi bioenergetics inducing mitochondrial ROS production // Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – Т. 108. – P. 183-191.
15. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning // Biochimica et Biophysica Acta. 2018. Vol. 1813. P. 1263-1268.
16. Toth E. et al. The highly conserved, N-terminal (RXXX) 8 motif of mouse Shadoo mediates nu-clear accumulation // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2013. – Т. 1833. – No. 5. – pp. 1199-1211