УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

БЕРШАДСЬКИЙ
Василь Іванович

ОСОБЛИВОСТІ ЕРИТРОПОЕЗУ ТА МЕТАБОЛІЗМУ В ЕРИТРОЇДНИХ КЛІТИНАХ СВИНЕЙ В НЕОНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ

03.00.04 - біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів - 1996

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00752310 (I)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті фізіології і біохімії тварин УААН

Наукові керівники: член-кореспондент УААН, доктор біологічних наук
СНІТИНСЬКИЙ В. В.
кандидат біологічних наук
АНТОНЯК Г. Л.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
РОЗГОНІ І. І.
доктор біологічних наук, професор
СТОЙКА Р. С.

Провідна організація: Інститут біохімії ім. О. Палладіна НАН України

Захист відбудеться 16 липня 1996 р.
о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д - 04.14.01
при Інституті фізіології і біохімії тварин УААН (290034, м. Львів-34,
вул. В. Стуса, 38).

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту фізіології і біохімії тварин УААН.

Автореферат розісланий 14 червня 1996 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради, доктор
сільськогосподарських наук **Я. І. Кирилів**

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Ав.35202

Актуальність проблеми.

З'ясування молекулярних механізмів неонатальної адаптації новонароджених тварин є однією з найбільш актуальних наукових і практичних проблем тваринництва. Вирішення цього питання неможливе без глибокого пізнання біохімічних процесів, які лежать в основі еритропоезу і детермінують рівень кисневого забезпечення тканин організму в умовах переходу від пре- до постнатального онтогенезу. Регуляція метаболізму в клітинах системи еритрона здійснюється шляхом складної взаємодії багатьох факторів (ростових, гормональних, нейромедіаторних). Порушення в регуляторних механізмах є передумовою виникнення в організмі патологічних станів - різного типу гіпоксії і анемії (Павлов А., Морщакова Е., 1987; Антоняк Г.Л. 1987; Ogawa M., 1993; Натан Д., Зифф К., 1994).

Згідно даних літератури, анемія є одним із найбільш поширених захворювань новонароджених ссавців (Dhindsa D. S. 1981, Means R. T., Krantz S. 1992; Hugh R., Hugh A., 1993). Особливо часто анемічний стан розвивається у новонароджених свиней, спричиняючи високу смертність молодняка в ранньому періоді постнатального онтогенезу (Хеннинг А. 1976). Незважаючи на ряд досліджень в цьому напрямку (Снітинський В. В. 1989; Снітинський В. В. і сп. 1994; Snitynsky V., Antonyak H. 1995), механізми, які лежать в основі виникнення неонатальної анемії у свиней з'ясовані недостатньо. (Дж. Понд, К. А. Хаупт 1983).Результати наукових досліджень дають підставу стверджувати, що поряд із адекватним забезпеченням організму іонами Fe^{2+} (Рябов С., Шостка Г. 1973) важливу роль у підтриманні функціональної активності клітин системи еритрона відіграють такі фактори як інтенсивність процесів проліферації і диференціації еритроїдних попередників в органах гемопоезу та рівень енергетичного метаболізму в еритроїдних клітинах (Снітинський В. В. і сп. 1994). Це в значній мірі зумовлено такими онтогенетичними особливостями кровотворення у свиней як пізнє становлення медулярного еритропоезу (Shimada A. et al. 1991) та відсутність фетального гемоглобіну (Стародуб М., Назаренко В. 1987). В зв'язку з цим кисневотранспортна функція крові свиней в постнатальному періоді онтогенезу забезпечується шляхом аллостеричної регуляції структурно-функціональних властивостей гемоглобіну органічними фосфатами, особливо 2,3-дифосфогліцератом (2,3-DPG)- специфічним продуктом гліколізу в еритроцитах (Benesh R., Benesh E. 1967, 1969; Chanutin A., Curnish E. 1967).

Відповідний рівень енергетичного метаболізму має значення і для підтримання функціональної активності антиоксидантної системи еритроїдних клітин. Каталітична активність ферментів антиоксидантної системи, яка регулює рівень процесів вільнорадикального окиснення в клітинах, забезпечує підтримання стабільності їх плазматичних мембран і внутрішньоклітинних структур в умовах оксидаційного стресу, характерного для раннього періоду після народження (Bochev P. 1989; Scott M. et al. 1991).

Особливості кістковомозкового еритропоезу, процесів енергетичного

метаболізму і функціонального стану системи антиоксидантного захисту еритроїдних клітин гемопоетичних органів і крові свиней в неонатальному періоді розвитку, зокрема, регуляторні аспекти цих питань на даний час з'ясовані недостатньо. Особливо це стосується регуляторної ролі інсуліну у функціонуванні клітин системи еритрона. Наявні в літературі дані вказують на те, що еритроїдні клітини ссавців містять специфічні рецептори гормону, а окремі ланки їх метаболізму знаходяться під регуляторним контролем інсуліну (Gambhir K. et al. 1978, 1991; Pettersson L. et al. 1994; Антоняк Г. 1987; Антоняк Г. і сп. 1988). В зв'язку з цим представляють інтерес дослідження, скеровані на з'ясування онтогенетичних особливостей еритропоезу і метаболізму еритроїдних клітин свиней в ранньому періоді постнатального онтогенезу та ролі інсуліну в регуляції цих процесів.

Мета роботи. Дослідити інтенсивність еритропоезу, енергетичного метаболізму і стан антиоксидантної системи в клітинах еритроїдного ряду кісткового мозку і периферійної крові свиней в періоді від народження до 10-денного віку та з'ясувати роль гормонів, і зокрема інсуліну в регуляції окремих ланок енергетичного обміну в еритроїдних клітинах.

Для вирішення вказаної проблеми були поставлені наступні завдання:

1. вивчити динаміку популяцій клітин еритроїдного ряду в кістковому мозку і периферійній крові свиней в періоді від народження до 10-денного віку і зміни їх відносного вмісту під впливом інсуліну;
2. дослідити зміни інтенсивності окремих етапів енергетичного обміну еритроїдних клітин свиней у віковому аспекті і під впливом інсуліну шляхом визначення активності гексокінази, піруваткінази, лактатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, 2,3-дифосфогліцератмутази, ізоцитратдегідрогенази і цитохромоксидази;
3. вивчити стан антиоксидантної системи еритроїдних клітин кісткового мозку і крові свиней в періоді від народження до 10-денного віку шляхом визначення активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази;
4. вивчити гормональний статус свиней в неонатальному періоді онтогенезу.

Об'єм досліджень. Експериментальна частина роботи виконана на 40 поросятах віком до 10 днів від народження, отриманих від свиноматок великої білої породи в спецгосподарствах Сокальського і Стрийського районів Львівської області. Робота є фрагментом теми UA № 01002232, шифр 09.01 "Дослідити субстратно - гормональні механізми високої продуктивності свиноматок і інтенсивного росту поросят".

Наукова новизна. Проведено дослідження вікової динаміки популяцій еритробластів кісткового мозку і різновікових популяцій еритроцитів крові свиней під час неонатального періоду онтогенезу, вперше виявлено зміни в популяційному складі еритроїдних клітин кісткового мозку і крові під впливом інсуліну.

Досліджено інтенсивність окремих ланок катаболізму моносахаридів

та стан антиоксидантної системи в клітинах еритроїдного ряду кісткового мозку і крові свиней в період від народження до 10-денного віку.

Виявлено зміни активності ряду цитоплазматичних і мітохондріальних ферментів енергетичного обміну в еритроїдних клітинах під впливом інсуліну.

Практичне значення. Робота присвячена вивченню онтогенетичних особливостей еритропоезу і метаболізму еритроїдних клітин свиней і скерована на з'ясування біохімічних механізмів, які лежать в основі забезпечення життєздатності новонародженого організму і його адаптаційних можливостей в період переходу від пре- до постнатального розвитку. Результати досліджень можуть бути теоретичною основою для розробки адаптогенних технологій та антианемічних препаратів з метою підвищення збереження та інтенсифікації росту молодняка протягом критичних періодів онтогенезу.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи доповідались на:

- XIV з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. І. П. Павлова (Київ, 1994)
- Всеукраїнській науковій конференції з фізіології і біохімії тварин (Львів, 1994).
- науковій конференції, присвяченій 100-річчю кафедри фізіології Львського медичного інституту (Львів, 1995) ;

Структура і об'єм роботи. Дисертація містить 138 сторінок машинописного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, описання методів, результатів досліджень і їх обговорення, заключення, висновків і списку використаної літератури, який включає 325 джерел, з них- 270 іноземних авторів.

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 7 робіт включаючи 2 статті.

Положення, які виносяться на захист.

1. Ранній період постнатального онтогенезу характеризується визначеною динамікою популяцій еритробластів в кістковому мозку і різновікових еритроїдних клітин в периферійній крові свиней.
2. Протягом 10-денного періоду після народження відбувається становлення антиоксидантного статусу еритроїдних клітин, активація в них окисних етапів розщеплення моносахаридів і синтезу 2,3-дифосфогліцерату при зниженні інтенсивності перебігу кінцевих етапів гліколітичного процесу.
3. Інсулін приймає участь в регуляції процесів проліферації і диференціації та енергетичного метаболізму еритроїдних клітин.

Особистий внесок дисертанта. Всі експериментальні дослідження за темою дисертації виконані автором особисто.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальна частина роботи виконана на 40 поросятах віком до 10 днів від народження, живою масою 1-3 кілограми, отриманих від свиноматок великої білої породи в спецгосподарствах Сокальського і Стрийського районів Львівської області. Поросята утримувалися під свиноматками,

годівля яких здійснювалася згідно деталізованих норм (Калашніков А. П. і сп., 1985).

Матеріалом для досліджень були периферійна кров і гемопоетична тканина кісткового мозку свиней, отримані після народження і на 1-, 3-, 5-, 10-у доби життя.

При дослідженні впливу інсуліну на інтенсивність еритропоезу та метаболізм еритроїдних клітин 7-денним поросятам дослідної групи підшкірно вводили гормон в дозі 0,15 МО/кг маси кожні 12 годин протягом 3-х діб. Свиням контрольної групи вводили відповідний об'єм 0,95% розчину NaCl. Щоразу після ін'єкцій інсуліну або фізрозчину свиням дослідної і контрольної груп підшкірно вводили 5 мл 20% -ного розчину глюкози.

Кров отримували шляхом пункції передньої порожнистої вени. Кістковий мозок виділяли після декапітації тварин.

Фракціонування клітин кісткового мозку здійснювали в градієнті густини фікол-верографіну (Harrison F. et al. 1981), а фракціонування еритроцитів периферійної крові - в градієнті густини сахарози (Сизова И. и др. 1985).

Цитологічний аналіз клітин проводили шляхом фарбування фіксованих метанолом висушених мазків за допомогою бензидину і розчину Гімза-Романовського. Еритроїдні елементи класифікували за загальноприйнятою методикою (Borsook H. et al. 1969).

В плазмі крові досліджували концентрацію гормонів інсуліну, тироксину, трийодтироніну і кортизолу радіоімунним методом з використанням наборів фірми "ХОПІБОК - МЕНСК" (Беларусь).

Для визначення вмісту інсуліну в крові використовували РИО-ИНС-ПГ-^{125}I, кортизол визначали за допомогою набору СТЕРОН-К-^{125}I-М, 3,3',5 трийодтиронін визначали за допомогою набору РИО-$Т_3$-ПГ, тироксин визначали за допомогою набору РИО-$Т_4$-ПГ. Концентрацію гормонів в крові визначали на лічильнику гама-випромінювання "COMPI -GAMA 1282". Розрахунки здійснювали в координатах "logit-log".

Активність гексокінази (КФ 2.7.1.1), піруваткінази (КФ 2.7.1.40), лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27), 2,3-дифосфогліцератмутази (КФ 2.7.5.4), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49), ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.40) визначали спектрофотометричними методами, які базуються на використанні спряжених систем окислення чи відновлення нікотинамідних коферментів (Oesper P., 1955; Chapman R. et al. 1962; Снітинський В. і сп. 1984). Для визначення активності цитохромоксидази (КФ 1.9.3.1) використовували спектрофотометричний метод (Van Kuileburg A. 1991).

Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.11) визначали методом Дубініної Є. і сп. (1983). Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення глутатіону в присутності гідроперекису третинного бутилу (Моин В. 1986), глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.3)- за швидкістю відновлення глутатіону в присутності NADPH (Власова С. и др. 1990).

Концентрацію білку в лізатах еритроїдних клітин визначали методом Лоурі (1951). Отримані дані опрацьовували статистично за методом Ойвіна (1960).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Зміни популяційного складу еритроїдних клітин кісткового мозку і крові свиней в ранньому періоді після народження

Результати проведених досліджень вказують на те, що в ранньому неонатальному періоді розвитку у свиней відбуваються значні зміни у функціональній активності еритропоетичної системи. Так, інтенсивність еритропоезу в організмі новонароджених тварин є досить високою, проте рівень цього процесу різко знижується протягом перших 3-х діб постнатального життя. При цьому спостерігається значне зниження вмісту еритроїдних попередників (проеритробласти, базофільні і поліхроматофільні еритробласти) в кістковому мозку та еритроцитів у периферійній крові за рахунок кількісного зменшення фракції молодих еритроїдних форм (табл. 1).

Це явище, мабуть, зумовлюється пригніченням синтезу еритропоетину, який є регулятором процесів проліферації і диференціації еритроїдних попередників - в організмі свиней при підвищенні парціального тиску кисню в крові і, відповідно, тканині нирок, в ранньому періоді після народження (Wickrema A. et al. 1992; Hugh R., Hugh A. 1993). В подальшому розвитку у свиней спостерігається інтенсифікація еритропоетичної активності кісткового мозку, проте лише у 10-денному віці вміст еритроїдних попередників у гемопоетичній тканині і еритроцитів у периферійній крові досягає рівня, властивого для новонароджених тварин (табл. 1).

Згідно до даних літератури, підвищення проліферативної активності еритроїдних попередників та їх термінальної диференціації в кістковому мозку і крові є адаптивними реакціями системи еритропоезу, скерованими на забезпечення постачання кисню до периферійних тканин в умовах інтенсивного росту організму (Hugh R., Hugh A. 1993). Інтенсифікація цих процесів може зумовлюватись дією багатьох регуляторних факторів, до яких відносяться як підвищення концентрації еритропоетину в крові тварин, так і зростання інтенсивності його рецепції еритроїдними попередниками під впливом інших біорегуляторів (Means R., Krantz S. 1992). Не виключено, що в регуляції інтенсивності еритропоезу під час досліджуваного періоду онтогенезу поряд з еритропоетином приймають участь й інші гормони, зокрема інсулін та гормони щитовидної залози (Golde D. et al. 1977; Daniak H. et al., 1978; Kurtz A. et al. 1983).

2. Дослідження вікової динаміки активності ферментів енергетичного обміну в еритроїдних клітинах кісткового мозку і крові свиней

Процес неонатальної адаптації свиней в значній мірі детермінується рівнем метаболізму в еритроїдних клітинах, оскільки нагромадження органічних фосфатів має важливе значення для забезпечення постнатального зниження кисневого споріднення крові у тварин цього виду. Відомо, що

Таблиця 1.

Вікова динаміка вмісту еритроцитів і популяцій еритроїдних клітин в гемопоетичній тканині кісткового мозку та крові свиней (%) (M±m; n=5-7)

Вік тварин	Проеритро-бласти	ЕРИТРОБЛАСТИ			ПОПУЛЯЦІЇ ЕРИТРОЦИТІВ			Кількість еритроцитів (1 x10^9/мл крові)
		базофільні	поліхромато-фільні	оксифільні	"молоді"	"зрілі"	"старі"	
новонародж.	9,3±0,6	10,6±1,3	14,8±1,7	11,5±0,9	29,0±1,5	51,6±3,1	19,2±1,2	5,54±0,52
1-денні	7,6±0,8	6,7±0,6*	11,9±0,9	13,0±0,9	23,8±1,3*	57,0±3,6	18,3±1,0	3,57±0,45*
3-денні	4,8±0,4**	5,5±0,6**	9,5±0,9*	10,3±0,9	26,5±1,7	58,2±3,9	14,5±1,4*	3,86±0,41*
5-денні	6,3±0,5*	7,3±0,7	10,7±1,1	12,8±0,9	25,4±2,4	58,5±4,0	15,9±1,2	4,57±0,56
10-денні	11,4±0,7	8,9±0,7	12,5±1,4	15,7±1,3*	26,2±1,9	58,0±2,4	15,4±1,1	5,40±0,48

Примітка: *, **- вірогідність відмінностей у значеннях показників порівняно з групою новонароджених тварин (*-$p<0,05$; **-$p<0,01$).

специфічний продукт гліколізу - 2,3-DPG має здатність, зв'язуючись з гемоглобіном, аллостерично знижувати його спорідненість до кисню(Benesh R., Benesh E. 1967,1969; Chanutin A., Curnish E. 1967). В зв'язку з цим дослідження вікових закономірностей протікання обмінних процесів в еритроїдних клітинах становить значний інтерес у плані з'ясування молекулярних механізмів адаптації тварин при переході від пре- до постнатального розвитку.

Таблиця 2.

Вікові зміни активності ферментів енергетичного обміну в еритроїдних клітинах кісткового мозку свиней (M±m; n=5-7)

Вік тварин / ферменти	Новонароджені	1-денні	3-денні	5-денні	10-денні
Гексокіназа (нмольNADP+/ хв/мг білку)	16,17±0,95	23,3±1,2*	26,6±1,7	22,0±1,04	20,5±1,3
Піруваткіназа (нмольNADH/ хв/мг білку)	95,9±5,3	92,6±6,1	65,0±4,2*	70,7±5,0	78,5±4,8
2,3-DPG мутаза (нмоль NAD/хв/ мг білку)	18,8±1,4	28,4±1,9**	43,6±2,7***	55,7±3,4*	59,3±3,8
Лактатдегідрогеназа (нмольNADH/ хв/мг білку)	210,0±15,7	185,3±12,9	140,6±8,6*	155,8±8,0	153,5±9,7
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (нмольNADP+/ хв/мг білку)	38,2±2,4	37,7±5,1	67,7±5,1**	79,3±6,2	119,1±6,5**
Ізоцитратдегідрогеназа (нмольNADP+/ хв/мг білку)	0,98±0,07	1,06±0,09	1,86±0,13**	2,24±0,29	5,20±0,62**
Цитохромоксидаза (ум.од/мг білку)	1,55±0,15	4,99±0,26***	4,62±0,19	5,46±0,43	6,09±0,40

Примітка: в цій і подальших таблицях*,**,***- вірогідність відмінностей у значеннях показників між віковими групами тварин(*-p<0,05; **p<0,01; ***-p<0,001).

Ядерні еритроїдні попередники, на відміну від зрілих еритроцитів ссавців, характеризуються високим рівнем окисних процесів у зв'язку з наявністю в них ферментних систем окислювального декарбоксилювання субстратів і дихального ланцюга (Федоров Н. 1976; Гаврилов О. и др. 1985).

В наших дослідженнях встановлено, що для цих клітин характерна також висока активність ферментів гліколізу і пентозофосфатного шляху (табл. 2).

Виявлено, що активність гексокінази, яка лімітує загальний рівень утилізації моносахаридів в еритроїдних клітинах кісткового мозку тварин, вірогідно зростає протягом 1-ї доби після народження ($p<0,05$) і залишається високою практично до 10-денного віку. Разом з тим активність ферментів, які каталізують кінцеві стадії гліколізу (піруваткіназа і лактатдегідрогеназа) характеризуються високим рівнем у новонароджених і 1-денних свиней, проте значно знижується, починаючи з 3-ї доби постнатального життя ($p<0,05$). Отримані результати дають підставу вважати, що в постнатально-му періоді онтогенезу утворений в гексокіназній реакції глюкозо-6-фосфат значною мірою утилізується в реакціях пентозофосфатного шунту. На це вказує вірогідне підвищення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, яка каталізує початкову стадію цього процесу в періоді з 3-ї до 10-ї доби після народження ($p<0,05$-$0,01$).

Крім активації пентозофосфатного шляху, в постнатальному періоді розвитку в еритроїдних клітинах кісткового мозку свиней спостерігається інтенсифікація інших ланок окислювального катаболізму субстратів, зокрема ферментної системи циклу трикарбонових кислот та мітохондріальних цитохромів. Так, в періоді від народження до 10-денного віку в еритроїдних клітинах поступово зростає активність ізоцитратдегідрогенази ($p<0,01$), а активність цитохромоксидази - останньої ланки дихального ланцюга окисно-відновних процесів у клітинах - різко підвищується протягом 1-ї доби після народження ($p<0,001$), що, очевидно, зв'язане зі змінами парціального тиску кисню в артеріальній крові і, відповідно, в клітинах новонароджених тварин (Bochev P. 1989; Scott M. et al. 1991).

Перебудова енергетичного метаболізму в напрямку інтенсифікації окисних процесів в еритроїдних клітинах свиней після народження, очевидно, має значення не лише для підтримання рівня їх проліферації у кістковому мозку, але й для забезпечення енергією синтезу гемоглобіну, оскільки, як відомо, цей процес вимагає енергії макроергів, утворених під час окислювального фосфорилювання субстратів в мітохондріях (Yamamoto S. et al. 1988).

Згідно до отриманих даних зміни в інтенсивності окремих ланок енергетичних процесів в еритроїдних попередниках кісткового мозку свиней супроводжуються відповідними змінами в метаболічній активності в еритроцитах периферійної крові (табл. 3).

В зрілих еритроїдних клітинах не функціонують такі ферментні системи, як дихальний ланцюг і цикл трикарбонових кислот, а енергетичні потреби еритроцитів забезпечуються шляхом гліколітичного розщеплення глюкози. Виявлено, що паралельно з активацією гексокіназної реакції, що є особливо характерним для "молодих" клітин ($p<0,05$-$0,01$), протягом 10-денного періоду після народження в еритроцитах свиней різко зростає активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази ($p<0,05$). Активація цього ферменту, рівень

активності якого певною мірою відображає рівень окисних процесів в еритроцитах, спостерігається не лише в "молодих", але і в "зрілих" еритроїдних клітинах. Разом з тим в активності піруваткінази вірогідних змін не спостерігається, а інтенсивність лактатдегідрогеназної реакції вірогідно знижується на третю добу постнатального розвитку ($p<0,05$), що свідчить про пригнічення кінцевих етапів "прямого" гліколітичного шляху в еритроцитах свиней після народження.

Таблиця 3.

Вікова динаміка активності ферментів енергетичного обміну та концентрації 2,3-DPG в еритроцитах свиней під час неонатального періоду (M±m; n=5).

Вік тварин	Нефракціоновані еритроцити	"Молоді" еритроцити	"Зрілі" еритроцити
Гексокіназа(нмоль $NADP^+$/хв/мг білку)			
новонародж.	3,45±0,15	4,87±0,17	2,99±0,12
1-денні	4,69±0,20**	6,64±0,68*	4,57±0,60*
3-денні	4,90±0,23	6,12±0,47	6,30±0,25*
5-денні	4,95±0,16	6,40±0,42	6,90±0,48
10-денні	3,31±0,16***	3,20±0,18**	5,43±0,72
Піруваткіназа(нмоль NADH/хв/мг білку)			
новонародж.	35,9±2,09	39,5±3,09	28,5±2,70
1-денні	40,7±3,20	42,5±3,70	33,4±3,40
3-денні	37,9±2,50	40,7±2,80	36,4±3,20
5-денні	35,9±2,10	35,3±2,00	34,5±3,20
10-денні	27,1±1,80*	28,5±1,70*	30,2±2,70
Лактатдегідрогеназа(нмоль NADH/хв/мг білку)			
новонародж.	115,8±9,3	130,5±12,8	95,0±10,2
1-денні	107,2±9,5	128,7±9,5	88,5±7,4*
3-денні	77,2±6,3*	90,0±9,1*	55,3±4,7*
5-денні	83,6±6,0	92,3±7,0	68,0±5,6
10-денні	86,4±5,3	95,7±6,8	72,4±5,4
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа(нмоль$NADP^+$/хв/мг білку)			
новонародж.	3,53±0,37	4,22±0,42	3,80±0,25
1-денні	5,02±0,54	7,63±0,62*	7,04±0,92*
3-денні	4,92±0,58	7,62±0,95	7,29±0,66
5-денні	10,02±1,80*	11,10±1,07	9,42±0,85
10-денні	10,24±1,62	15,70±1,40	14,90±1,50*
2,3-дифосфогліцерат(мкмоль/мл еритроцитів)			
новонародж.	1,65±0,13	2,00±0,21	1,65±0,18
1-денні	3,08±0,23**	3,62±0,27**	2,18±0,14
3-денні	6,78±0,84*	7,42±0,66**	6,73±0,55**
5-денні	7,29±0,69	7,95±0,64	8,24±0,63
10-денні	8,00±0,65	7,76±0,55	8,96±0,66

Разом з тим виявлено, що в періоді від народження до 10-денного віку інтенсифікується процес утилізації субстратів в 2,3-дифосфогліцератному шунті гліколізу(табл. 3). Згідно до отриманих даних, еритроцити

новонароджених свиней характеризуються низьким вмістом 2,3- DPG в цитоплазмі. Проте, протягом 10-денного періоду після народження рівень цієї сполуки в еритроцитах зростає майже п'ятикратно($p<0,05$-$0,001$). Ці зміни відбуваються паралельно до підвищення активності 2,3-дифосфогліцератмутази, яка безпосередньо каталізує синтез 2,3-DPG в клітинах кісткового мозку і еритроцитах крові (табл. 2). Швидке нагромадження 2,3-DPG вказує на важливу роль 2,3-дифосфогліцератмутази в процесі неонатальної адаптації тварин, оскільки у свиней в зв'язку з відсутністю фетального гемоглобіну постнатальне зниження кисневої спорідненості крові може відбуватись лише шляхом аллостеричних модуляцій структурно-функціональних властивостей гемоглобіну під впливом органічних фосфатів, особливо, 2,3-DPG. Зниження споріднення цього білку до кисню, в свою чергу, полегшує вивільнення цього елементу в клітинах зумовлюючи, таким чином, підвищення інтенсивності окисних процесів в тканинах і органах тварин в постнатальному періоді розвитку.

3. Дослідження стану антиоксидантної системи в еритроїдних клітинах кісткового мозку і крові свиней

Інтенсифікація окисних процесів в організмі, зокрема, виявлена нами в еритроїдних клітинах кісткового мозку свиней активація системи цитохромів, супроводжується підвищенням рівня реакційноздатних продуктів неповного відновлення кисневих молекул (Bochev P. 1989; Осипов А. 1990). Крім того, додатковим джерелом постійного утворення активних форм кисню в клітинах еритроїдного ряду є процес оксигенації молекул гемоглобіну (Mansouri F., Perry C. 1987). В зв'язку з цим важлива роль у захисті від окиснення ліпідних компонентів внутрішньоклітинних і плазматичних мембран та інших клітинних структур належить ферментам антиоксидантної системи клітин (Bochev P. 1989; Scott M. et al. 1991).

Таблиця 4.

Вікові зміни активності ферментів антиоксидантної системи в еритроїдних клітинах кісткового мозку свиней (M±m; n=5-7)

Вік тварин / ферменти	Новонароджені	1-денні	3-денні	5-денні	10-денні
Супероксид-дисмутаза (ум. од./мг білку)	2,05±0,19	11,84±1,36**	18,55±2,64	48,70±5,15**	50,59±6,97
Глутатіон-пероксидаза (нмоль глут./хв/мг білку)	34,5±3,2	123,0±24,2*	68,4±7,5	81,6±5,8	54,6±4,2*
Глутатіон-редуктаза (нмоль NADPH/хв/мг білку)	25,7±2,7	28,3±1,9	23,8±3,8	42,2±3,9*	36,2±3,7

Встановлено, що рівень активності антиоксидантних ферментів - СОД, ГП і ГР - є низьким у новонароджених свиней і це є характерним як для клітин кісткового мозку так і для еритроцитів (табл. 4,5). Разом з тим активність СОД і ГП суттєво зростає протягом перших 3-х діб постнатального життя ($p<0,05$-$0,01$), причому найбільш виразні зміни спостерігаються в еритроїдних клітинах кісткового мозку. В периферійній крові підвищення активності цих ферментів у нефракціонованих клітинах відбувається, головним чином, за рахунок їх активації у фракції "молодих" еритроцитів. В той самий час активність глутатіонредуктази в еритроїдних клітинах кісткового мозку і крові підвищується, починаючи з 5-денного віку тварин ($p<0,05$), що може бути пов'язане із підвищенням вмісту NADPH (кофактор ферменту) внаслідок активації реакцій пентозофосфатного шляху.

Таблиця 5.

Зміни активності ферментів антиоксидантної системи в еритроїдних клітинах крові свиней в неонатальному періоді (M±m; n=5)

Вік тварин	Нефракціоновані еритроцити	"Молоді" еритроцити	"Зрілі" еритроцити
Супероксиддисмутаза (ум. од./мг білку)			
новонародж.	9,74±1,09	10,71±1,20	7,48±0,68
1-денні	10,54±0,94	12,20±1,20	8,43±0,45
3-денні	17,87±1,42**	19,23±1,80*	11,22±1,29
5-денні	19,66±1,90	23,27±2,07	16,10±1,23*
10-денні	16,74±1,30	19,60±1,18	17,49±1,50
Глутатіонпероксидаза (нмоль глут./хв/мг білку)			
новонародж.	25,66±2,94	26,53±4,70	26,99±2,73
1-денні	37,80±2,15*	42,10±4,30*	40,80±3,70*
3-денні	42,70±2,90	40,35±3,70	35,70±2,90
5-денні	38,48±2,80	35,06±3,12	36,80±3,40
10-денні	34,00±3,25	34,81±2,27	36,60±3,50
Глутатіонредуктаза (нмольNADPH/хв/мг білку)			
новонародж.	6,67±0,85	6,14±0,69	7,05±0,80
1-денні	7,81±0,67	6,34±0,58	8,59±0,90
3-денні	6,97±0,32	8,50±0,72*	10,69±0,85
5-денні	8,67±0,72	9,08±0,95	12,24±1,15
10-денні	12,37±1,70	11,35±1,55	12,69±0,98

Таким чином під час раннього періоду постнатального онтогенезу у свиней відбуваються значні зміни в функціонуванні системи еритропоезу. Вони стосуються не лише інтенсивності утворення еритроїдних попередників у кістковому мозку та швидкості їх термінальної диференціації в циркуляції, але й рівня реакцій енергетичного обміну та стану антиоксидантної системи в еритроїдних клітинах кісткового мозку і крові.

4. Дослідження впливу інсуліну на еритропоетичну активність кісткового мозку та метаболізм еритроїдних клітин свиней

Процес неонатальної адаптації в значній мірі визначається динамікою адаптивних гормонів (інсулін, гормони щитовидної залози, кортизол), концентрація яких в крові свиней в ранньому віці після народження значно змінюється (табл. 6). Проте регуляторна участь гормонів у механізмах адаптивних змін в системі еритропоезу під час ранніх стадій постнатального розвитку свиней, незважаючи на ряд досліджень в цьому напрямку (Антоняк Г. 1987; Снітинський В. і сп. 1994), на даний час не з'ясована. В зв'язку з цим проводились дослідження впливу інсуліну, концентрація якого помітно зростає в організмі свиней протягом 1-ї доби після народження, на інтенсивність еритропоезу та метаболізм еритроїдних клітин свиней.

Таблиця 6.

Динаміка вмісту адаптивних гормонів в крові поросят під час раннього постнатального періоду (M±m; n=5-6)

Вік тварин	Інсулін (мкод/мл)	Кортизол (нмоль/л)	Тироксин (нмоль/л)	Трийодтиронін (нмоль/л)
0,5 год	1,10±0,18	430,6±90,5	120,1±15,3	1,36±0,19
6 год	3,07±0,21**	480,1±40,0	61,1±13,9*	2,60±0,29*
12 год	9,30± 1,40*	394,0±90,9	48,7± 3,2	4,12± 0,30*
24 год	27,4± 5,9*	66,8±8,7*	37,9± 5,0	3,57± 0,29
5-денні	17,5± 4,1	68,1±16,6	42,2±5,5	1,22±0,14***
10-денні	13,5± 3,1	60,8± 10,1	40,6± 4,9	2,69±0,20**

Встановлено, що після введення інсуліну суттєво змінюється співвідношення між вмістом окремих популяцій еритроїдних попередників в гемопоетичній тканині кісткового мозку 10-денних тварин (табл. 7). Зокрема, кількість проеритробластів зростає більше ніж на 50% ($p<0,05$), а вміст базофільних еритробластів зростає майже вдвічі ($p<0,01$). В той самий час рівень поліхроматофільних і оксифільних еритробластів в кістковому мозку свиней значно знижується ($p<0,05$-$0,001$). Отримані результати можуть свідчити про те, що процес термінальної диференціації еритроїдних клітин на пізніх еритробластичних стадіях прискорюється, і поліхроматофільні, а особливо, оксифільні еритробласти швидко перетворюються в ретикулоцити і виходять в кровоносну систему. На це вказує, зокрема, кількісне збільшення фракції "молодих" еритроїдних клітин ($p<0,05$), виявлене нами в крові свиней після введення їм інсуліну.

Таким чином отримані результати свідчать, з одного боку, про участь інсуліну в регуляції процесів проліферації і диференціації в еритроїдних клітинах гемопоетичної тканини кісткового мозку, а з іншого - можуть вказувати на роль цього гормону в інтенсифікації еритропоезу у свиней в період від 5 до 10-денного віку (табл. 1).

Таблиця 7.

Вплив інсуліну на вміст еритроцитів та співвідношення популяцій еритроїдних клітин в гемопоетичній тканині кісткового мозку та периферійній крові свиней (%)(M±m, n=5)

Показники	Контрольні тварини	Дослідні тварини
ПЕРИФЕРІЙНА КРОВ		
Вміст еритроцитів ($1x10^9$/мл крові)	5,40±0,48	4,37±0,39
"молоді" еритроцити	26,2±1,9	35,3±2,0*
"зрілі" еритроцити	58,0±2,4	53,7±3,5
"старі" еритроцити	15,4±1,1	10,9±1,2*
КІСТКОВИЙ МОЗОК		
Проеритробласти	11,4±0,7	17,8±1,6*
Еритробласти базофільні	8,92±0,7	16,6±1,9**
Еритробласти поліхроматофільні	12,5±1,4	7,8±0,6*
Еритробласти оксифільні	15,7±1,3	3,0±0,4***

Примітка: в цій і наступних таблицях *,**,***- вірогідність відмінностей у значеннях показників між контрольною та дослідною групами тварин (*-p<0,05;**-p<0,01;***-p<0,001).

Кількісні зміни у співвідношенні популяцій еритроїдних клітин кісткового мозку і крові свиней при введенні інсуліну супроводжуються змінами інтенсивності окремих ланок енергетичного обміну цих клітин (табл. 8). В процесі досліджень встановлено, що після введення гормону в еритроїдних клітинах кісткового мозку зростає інтенсивність утилізації глюкози в гліколітичному шляху перетворень, про що свідчить вірогідне підвищення активності гексокінази і піруваткінази (p<0,05), тоді як рівень окислення моносахариду в реакціях пентозофосфатного шляху, судячи з активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, суттєво не змінюється. Разом з тим під час дії інсуліну в цих клітинах спостерігається активація інших дегідрогеназ - ЛДГ і ізоцитратдегідрогенази (p<0,01-0,001). В мітохондріях еритроїдних клітин виявлено значне пригнічення активності цитохромоксидази (p<0,001), що, очевидно, відображає загальну тенденцію до зниження інтенсивності

окисних процесів в організмі під час дії інсуліну.

Таблиця 8.

Вплив інсуліну на активність ферментів енергетичного обміну в еритроїдних клітинах кісткового мозку свиней (M±m; n=5)

Умови досліджень / Ферменти	Контроль	Дослід
Гексокіназа (нмольNADP⁺ /хв/мг білку)	20,5±1,3	31,2±2,8*
Піруваткіназа (нмоль NADH/ хв/мг білку)	78,5±4,8	105,7±6,2*
Лактатдегідрогеназа (нмоль NADH/хв/ мг білку)	153,5±9,7	258,4±17,5**
Глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа (нмоль NADP⁺/хв/ мг білку)	119,1±6,5	94,0±8,1
Ізоцитратдегідро-геназа (нмоль NADP⁺/хв/ мг білку)	5,20±0,62	14,93±1,41***
Цитохромоксидаза (ум. од./мг білку)	6,09±0,40	2,35±0,18***

Поряд з регуляторним впливом інсуліну на активність ферментів в еритроїдних попередниках, виявлено активацію гліколізу в клітинах периферійної крові свиней після введення тваринам цього гормону (таб. 9). При цьому встановлено, що зростання активності гексокінази і піруваткінази в нефракціонованих клітинах відбувається за рахунок активації цих ферментів у фракції "молодих" еритроцитів ($p<0,01$-$0,001$).

Крім того, встановлено, що після дії інсуліну різко знижується рівень утилізації субстратів у 2,3-дифосфогліцератному шунті гліколізу, на що вказує пригнічення активності 2,3-дифосфогліцератмутази в еритроцитах ($p<0,01$) та зменшення концентрації 2,3-DPG в їх цитоплазмі ($p<0,05$).

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що інсулін приймає участь в регуляції окремих ланок метаболізму еритроїдних клітин. Регуляторна дія цього гормону проявляється не лише на рівні ядерних попередників еритроцитів в гемопоетичній тканині кісткового мозку, але і на рівні функціонально зрілих клітин периферійної крові тварин. Проте для з'ясу-

Таблиця 9.

Вплив інсуліну на активність ферментів енергетичного обміну в еритроїдних клітинах крові свиней (M±m; n=5)

Умови досліджень	Нефракціонова ні еритроцити	"Молоді" еритроцити	"Зрілі" еритроцити
Гексокіназа(нмоль $NADP^+$/хв/мг білку)			
контроль	3,31±0,16	3,20±0,18	5,43±0,72
дослід	4,17±0,19*	4,99±0,30**	5,23±0,24
Піруваткіназа(нмоль NADH/хв/мг білку)			
контроль	21,7±1,80	28,5±1,70	30,2±2,70
дослід	41,9±2,7**	47,2±2,9***	38,9±2,1*
Лактатдегідрогеназа(нмоль NADH/хв/мг білку)			
контроль	86,4±5,3	95,7±6,8	72,4±5,4
дослід	103,6±12,2	157,5±14,3*	94,3±7,0
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа(нмоль$NADP^+$/хв/мг білку)			
контроль	10,24±1,62	15,70±1,40	14,90±1,50
дослід	9,00±1,20	16,55±2,1	9,95±1,37
2,3-дифосфогліцератмутаза(нмольNAD^+/хв/мг білку)			
контроль	39,5±2,4	62,7±5,8	47,3±2,9
дослід	31,6±1,9*	51,2±4,0	26,3±2,2**

вання молекулярних механізмів дії інсуліну на метаболізм еритроїдних клітин необхідні додаткові дослідження.

ВИСНОВКИ

1. В ранньому періоді постнатального онтогенезу відбуваються вікові зміни в популяційному складі еритроїдних клітин кісткового мозку свиней, а саме зниження відносного вмісту проеритробластів і базофільних та поліхроматофільних еритробластів протягом перших 3-х днів після народження та підвищення вмісту цих клітин в кістковому мозку 10-денних тварин.
2. У периферійній крові 1-3-денних свиней кількість еритроцитів зменшується за рахунок зниження процентного вмісту "молодих" і "старих" еритроїдних клітин. У 10-денних свиней вміст еритроцитів в крові близький до вмісту цих клітин у новонароджених тварин.
3. В перші 3-дні після народження в еритроїдних клітинах кісткового мозку свиней підвищується активність гексокінази і знижується активність піруваткінази і лактатдегідрогенази, які каталізують кінцеві етапи гліколізу.
4. В еритроїдних клітинах кісткового мозку свиней протягом 10-денного періоду після народження зростає активність глюкозо-6-фосфатдегідогенази, ізоцитратдегідрогенази, цитохромоксидази і 2,3-дифосфогліцератмутази та активуються ферменти антиоксидантної системи - супероксиддисмутаза і глутатіонпероксидаза.

5. В ранньому періоді постнатального онтогенезу (1-3 дні після народження) в еритроцитах крові свиней спостерігається активація ферментів антиоксидантної системи - супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази, в еритроцитах 10-денних тварин зростає активність глутатіонредуктази.
6. Еритроцити новонароджених свиней характеризуються низьким вмістом 2,3-DPG в цитоплазмі, а в 1-10 денних свиней концентрація 2,3-DPG в еритроцитах зростає.
7. Ранній період після народження у свиней характеризується змінами в гормональному статусі, що полягають в підвищенні концентрації інсуліну і трийодтироніну і зниженні концентрації тироксину і кортизолу в плазмі 1-10-денних тварин.
8. Інсулін регулює співвідношення популяцій еритроїдних клітин кісткового мозку і периферійної крові свиней. Після введення цього гормону в гемопоетичній тканині кісткового мозку збільшується відносний вміст проеритробластів і базофільних еритробластів поряд із зниженням вмісту поліхроматофільних і оксифільних еритробластів. Одночасно в периферійній крові зростає вміст "молодих" еритроцитів.
9. Інсулін регулює інтенсивність окремих ланок енергетичного метаболізму в еритроїдних клітинах кісткового мозку свиней. Після дії цього гормону в даних клітинах спостерігається підвищення активності гексокінази, піруваткінази та ізоцитратдегідрогенази і пригнічення активності цитохромоксидази. Під впливом інсуліну в еритроцитах крові зростає активність гексокінази і піруваткінази і знижується активність 2,3-дифосфогліцератмутази поряд зі зменшенням концентрації 2,3-DPG.
10. Встановлено, що еритропоез у свиней в ранньому періоді після народження характеризуються зниженням проліферативної активності еритроїдних клітин кісткового мозку, зменшенням відносного вмісту "молодих" еритроцитів в периферійній крові при відсутності вираженого впливу гормонального статусу на клітинний склад та формуванням субстратних і гормональних механізмів регуляції метаболізму в еритроїдних клітинах.

СПИСОК РОБІТ ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Снітинський В. В., Антоняк Г. Л., Бершадський В. І. Активність деяких ферментів гліколізу еритроцитів поросят у неонатальному періоді. Укр. біохім. журнал, 1994, т. 66, № 5, с.31-35.
2. Антоняк Г. Л., Бершадський В. І., Демчук О. М., Снітинський В. В. Порівняльна характеристика активності ферментів антиоксидантної системи еритроцитів свиней і великої рогатої худоби. Наук.-техн. бюл. Інституту фізіології і біохімії тварин, 1994, вип. 16 (1), с. 16-19.
3. Антоняк Г. Л., Снітинський В. В., Бершадський В. І. Регуляція кисневотранспортної функції еритроцитів свиней в періоді неонатальної адаптації. Тези доп. XIV з'їзду Укр. фізіол. товариства ім І. П. Павлова, К., 1994, с. 230-231.

4. Снітинський В. В., Антоняк Г. Л., Кичун І. В., Данчук В. В., Бершадський В. І. Особливості динаміки концентрацій гормонів та активності ферментів антиоксидантної системи у новонароджених свиней. Тези доп. XIV з'їзду Укр. фізіол. товариства ім І. П. Павлова, К., 1994, с. 254-255.
5. Снітинський В. В., Антоняк Г. Л., Бершадський В. І. Зв'язування і протеоліз ^{125} І- інсуліну в плазматичних мембранах еритроцитів поросят. Тези доп. Всеукраїнської конф. з фізіології і біохімії тварин, Львів, 1994, с. 138.
6. Антоняк Г. Л., Бершадський В. І., Демчук О. М., Іскра Р. Я., Снітинський В. В. Гормональна регуляція метаболічної активності в еритроцитах свиней в неонатальному періоді. Тези доп. І Укр. симп. по ендокринології тварин, Львів, 1994, с. 7-8.
7. Антоняк Г. Л., Снітинський В. В., Кичун І. В.. Бершадський В. І. Вікові особливості процесу зв'язування ^{125} І- інсуліну еритроїдними клітинами свиней. Матеріали наукової конф. присвяченої 100-річчю кафедри фізіології Львівського мединституту. Львів, 1995, с. 300-301.

Bershadsky V.I. The peculiarities of erythropoiesis and erythroid cell metabolism in pig during the neonatal period.

Doctoral thesis on specialization 03.00.04 - biochemistry. Institute for Research in Animal Physiology and Biochemistry UAAS, Lviv, 1996.

Summary

The manuscript and 7 printed works, containing the results of investigation of age peculiarities of erythropoiesis and erythroid cell metabolism in pig during the neonatal period of ontogenesis are defended.

It was established that during early period after birth the changes in proliferative activity of erythroid precursors took place. This was accompanied by an appropriate dynamics of erythroid populations in bone marrow and peripheral blood of pigs. The intensity of certain stages of energy metabolism was also established to change in piglet bone marrow and blood erythroid cells in the neonatal period. These alterations included the decrease of glycolysis rate and intensification of oxidative processes simultaneously with the accumulation of 2,3-diphosphoglycerate in investigated cells.

During a short period after birth the development of adequate hormonal status in pig organism as well as functional activity of antioxidant system in erythroid cells occured.

It was estabilised that insulin participated in the regulation of erythropoiesis intensity and metabolic activity in the cells of erythroid lineage of pig. Under the influence of hormone the contents of early erythroid precursors - proerythroblasts and basophylic erythroblasts - in pig bone marrow significantly increased while the polychromatophylic and oxyphylic erythroblast contents decreased. The intensification of glycolysis and decrease of oxidative processes rates in erythroid cells of pig was observed under the influence of insulin.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Бершадский В. И. Особенности эритропоэза и метаболизма в эритроидных клетках свиней в неонатальном периоде.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03. 00. 04-биохимия, Институт физиологии и биохимии животных УААН, Львов, 1996.

Резюме

Защищаются рукопись и 7 печатных работ, содержащих результаты исследований возрастных особенностей эритропоэза и метаболизма эритроидных клеток свиней в раннем периоде постнатального онтогенеза.

Установлено, что в периоде от рождения до 10-дневного возраста в органах гемопоэза происходят изменения пролиферативной активности эритроидных предшественников, что сопровождается соответствующей динамикой эритроидных популяций в костном мозге и периферической крови поросят. При этом в клетках костного мозга и эритроцитах животных изменяется интенсивность отдельных этапов энергетического обмена в сторону снижения активности гликолиза и интенсификации окислительных процессов наряду с накоплением в эритроидных клетках 2,3-дифосфоглицерата.

Показано, что на протяжении короткого периода после рождения происходит становление соответствующего гормонального статуса организма и антиоксидантного статуса клеток костного мозга и эритроцитов поросят.

Установлено, что в регуляции интенсивности эритропоэза и метаболизма эритроидных клеток животных принимает участие инсулин. При введении гормона в костном мозге поросят неонатального возраста увеличивается относительное содержание ранних эритроидных предшественников - проэритробластов и базофильных эритробластов и снижается содержание полихроматофильных и оксифильных эритробластов. В эритроидных клетках свиней под влиянием инсулина наблюдается интенсификация гликолиза и снижение интенсивности окислительных этапов энергетического обмена.

Ключові слова: свині, онтогенез, неонатальна адаптація, еритропоез, еритроїдні клітини, еритроцити, кістковий мозок, гормони, інсулін, енергетичний обмін, гліколіз, 2,3-дифосфогліцерат, антиоксидантна система.

Віддруковала фірма
"ВМС"
Оперативний друк
будь-яких поліграфічних
матеріалів
Львів,
вул. І.Франка, 157,
тел. 42-10-41,
42-10-46

436303

AB 35.202