



УДК: 591.13:636.92

Влияние разных типов питания на уровень перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты в плазме крови кролика европейского (*Oryctolagus cuniculus*)

С. С. Тарасов, А. С. Корягин

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
E-mail: Tarasov_ss@mail.ru

Аннотация. Исследовали состояния перекисного окисления липидов (ПОЛ) по содержанию малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови кроликов (*Oryctolagus cuniculus*), выращенных в экспериментальных условиях при разных вариантах рациона, а также состояние ферментативной активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Показана зависимость исследуемых показателей от типа питания. Наибольшая концентрация продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов регистрируется в плазме крови кролика, содержащегося при инновационном типе питания, наименьшая – при естественном типе. Выявлена способность характерных для естественного типа питания компонентов рациона, обогащённых антиоксидантными веществами, снижать при добавлении в рацион животных концентрацию продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, питание животных, кролики, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, супероксиддисмутаза, каталаза.

Введение

Одним из важнейших следствий избыточного образования активных форм кислорода (АФК) является повышенная активация процессов перекисного окисления липидов (далее ПОЛ) [2; 5]. АФК участвуют в метаболических процессах организма, связанных с обменом липидов, белков, нуклеиновых кислот; в синтезе лейкотриенов, тромбоксанов; являются продуктами ферментативных и неферментативных метаболических процессов, которые в норме протекают в организме [1; 8; 9]. Генерация АФК происходит по ходу окислительно-восстановительных реакций с участием кислорода в различных субклеточных структурах клетки и при различных её функциональных состояниях [4; 16].

На ПОЛ в организме животных влияют эндогенные процессы: физиологическое дыхание, транспорт кислорода, окисление субстратов, транспорт электронов, окислительное фосфорилирование. Усиление или уменьшение образования АФК и как следствие интенсивности ПОЛ зависит от факторов среды [15; 17]. Одним из важнейших факторов является питание: в зависи-

мости от его особенностей возрастает или снижается интенсивность окислительных процессов в живых организмах.

На основании вышеизложенного целью нашей работы являлось экспериментальное изучение влияния разных кормовых рационов на интенсивность ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов (СОД и каталаза) в плазме крови одного из широко распространённых видов млекопитающих – кролика европейского.

Материалы и методы

Исследования проводились на кроликах породы советская шиншилла в возрасте от 3 до 5 мес. [11], выращенных в стандартных условиях на кролиководческой ферме. Среди выделенных из общего стада были сформированы 3 группы по 7 животных в каждой, далее в течение 2 недель содержащихся при определённом составе рациона.

Для 1-й группы был установлен так называемый естественный тип питания (ЕТП), для 2-й – традиционный (ТТП), для 3-й – инновационный (ИТП) (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика качественного состава кормов для разных типов питания кроликов в экспериментальных группах

Естественный тип питания (ЕТП)	Традиционный тип питания (ТТП)	Инновационный тип питания (ИТП)
Свежескошенная трава (луговое разнотравье), ветки сосновые, ветки ивовые, спелые колосья пшеницы, ячменя, овса, корни одуванчика, бодяка, корнеплоды моркови	Подвяленная трава (луговое разнотравье), зерносмесь (ячмень, пшеница, овёс), мел кормовой, соль поваренная, витаминно-минеральные добавки	Комбикорм КК-90, сено из лугового разнотравья

Естественный тип питания включал те продукты, которыми кролик питается в естественных условиях (трава, ветки деревьев и кустарников, неочищенные колосья зерновых, в небольших количествах плодовоовощные культуры), в большом количестве содержащие низкомолекулярные антиоксиданты. Традиционный тип кормления, преимущественно применяемый при искусственном разведении в индивидуальных и не крупных фермерских хозяйствах, включает сено, большое количество зерновых культур, витаминно-минеральные добавки и иногда плодовоовощные культуры [13]. Инновационный тип кормления применяется в современных крупных хозяйствах и включает всего 2 компонента: грубый корм (сено) и комбикорма, обогащённые необходимыми питательными веществами, витаминами и микроэлементами [3]. Он характеризуется обеднённым составом компонентов, содержащих низкомолекулярные антиоксиданты.

Все животные в эксперименте в течение 2 недель постоянно имели в наличии пищу соответствующей кормовой группы. На 1, 3, 7 и 14-е сутки этого периода у них проводили забор крови из ушной вены с целью опреде-

ления концентрации в ней продуктов ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов – каталазы и супероксиддисмутазы (СОД).

Анализировался основной параметр интенсивности ПОЛ: концентрация в крови его продуктов – малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДГ). Определение содержания малонового диальдегида проводили методом, основанным на его взаимодействии с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в результате которого образуются хромогены с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм [12].

Определение содержания диеновых конъюгатов в плазме крови кролика проводили путём добавления к 0,2 мл плазмы 2 мл смеси изопропанол-гептан (1:1). В смесь последовательно с регулярным перемешиванием добавляли 0,5 мл HCl (pH=7,2) и 1 мл гептана, после истечения первого часа верхнюю фазу фотометрировали при 232 нм против контрольной пробы на спектрофотометре СФ 2000 (Ломо, Россия). Использовали коэффициент экстинкции $2,2 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ [10].

Антиоксидантный статус определялся соответственно изменению степени активности: каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Активность каталазы определяли по методу, основанному на способности фермента разлагать перекись водорода с образованием воды. Активность оценивается по снижению количества пероксида в пробе, определяемого по уменьшению экстинкции пробы [14]. Активность СОД определяли по методике Л. А. Дубининой с соавторами [6], основанной на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анион-радикалы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН с феназинметасульфатом. В присутствии СОД процент восстановления HCl снижается.

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программ Excel из пакета Microsoft Office 2003 и Биостатистика v. 4.03 методами параметрической статистики. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. Уровень значимости достоверности различий составил 95 % [7].

Результаты и обсуждение

Экспериментальные исследования содержания продуктов (ПОЛ) и активности ферментативных антиоксидантов каталазы и СОД в плазме крови кролика выявили изменения этих показателей в зависимости от разных рационов питания.

На рис. 1 представлены результаты измерения активности перекисного окисления липидов, происходящего при разных типах питания кроликов.

При традиционном питании наблюдается увеличение содержания диеновых конъюгатов в плазме крови кролика по отношению к контролю примерно на 20 %, а при инновационном – примерно на 40 %. Увеличение концентрации малонового диальдегида при «традиционном» питании составляет примерно 15 %, однако разница при инновационном составляет почти 50 % по отношению к контролю ($p \leq 0,05$). Такое увеличение содержания

продуктов ПОЛ можно объяснить недостатком в рационе веществ, препятствующих окислительной деструкции биополимеров, в частности липидов, либо избытком веществ, способствующих увеличению темпов такой деструкции [19]. В частности, наблюдается увеличение концентрации продуктов ПОЛ при кормлении животных комбикормами – концентратами. Возможно, это связано с тем, что в состав премикса входит большое количество солей металлов с переменной валентностью, которые способствуют неферментативному окислению липидов. Эти корма также содержат много аскорбиновой кислоты, которая участвует в процессах перекисного окисления липидов, тем более нет гарантии того, что этот искусственно синтезированный для премиксов витамин в структурном виде не является стереоизомером естественной аскорбиновой кислоты. Кроме всего прочего при производстве комбикормов есть вероятность структурного изменения некоторых веществ, которые при попадании в плазму крови не выполняют своей прямой функции, а напротив, нагружают работу выделительной системы и могут провоцировать процессы биологического окисления.

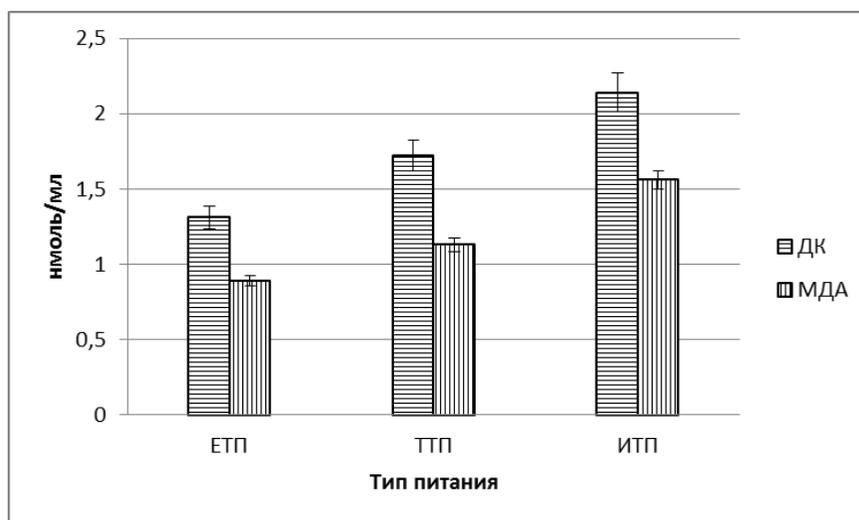


Рис. 1. Содержание различных продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови кроликов, содержащихся в эксперименте при разных типах питания. ДК – диеновые конъюгаты, МДА – малоновый диальдегид, ЕТП – естественный тип питания, ТТП – традиционный тип питания, ИТП – инновационный тип питания

В экспериментальной группе, содержащейся при традиционном типе питания, в рацион дополнительно вводили продукты, содержащие антиоксидантные вещества естественного происхождения. Серьезного изменения содержания продуктов ПОЛ в первые 3 дня не наблюдалось ($P \geq 0,05$). Через неделю было зафиксировано снижение содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов примерно на 10 % по отношению к контролю, через 14 дней содержание продуктов ПОЛ достигло уровня естественного типа питания (рис. 2, А).

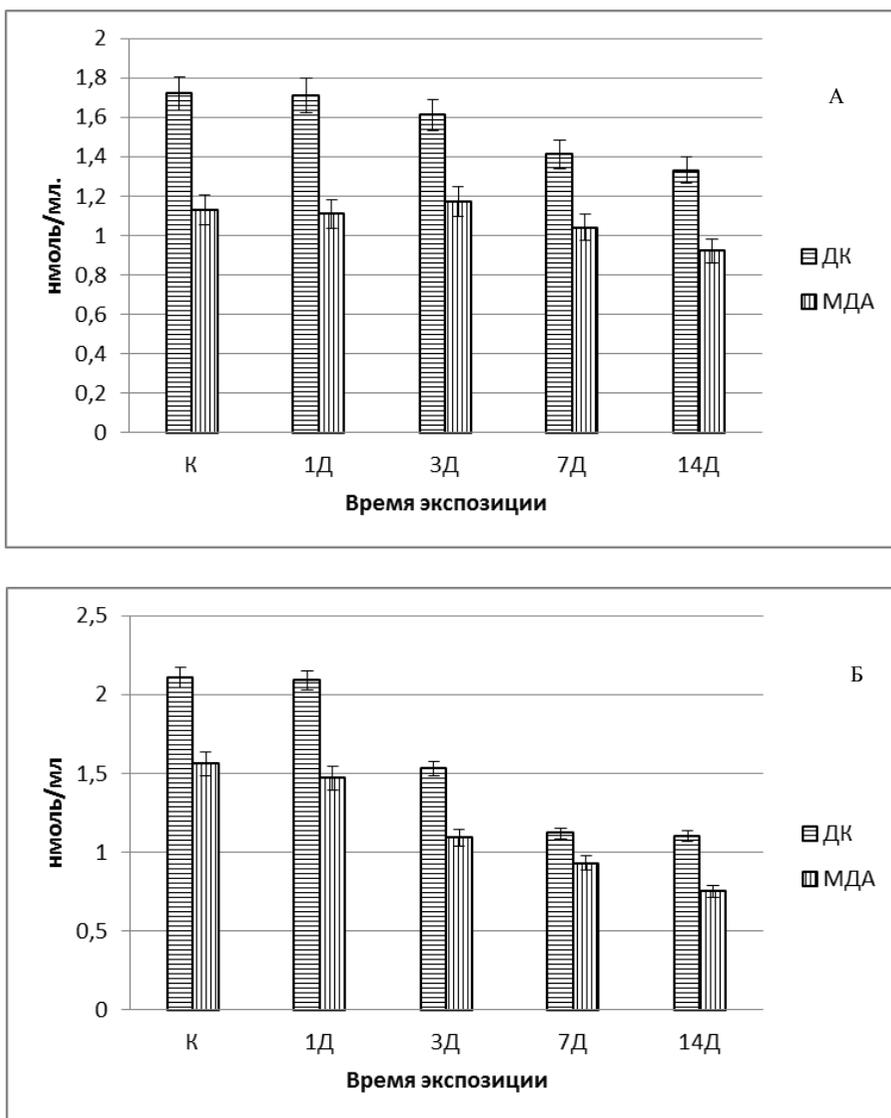


Рис. 2. Влияние сырых растительных компонентов на процесс перекисного окисления липидов в плазме крови кроликов, содержащихся в эксперименте при традиционном (А) и инновационном (Б) типах питания (обозначения см. рис. 1)

У животных, выращенных при инновационном типе питания, наблюдается максимальное содержание продуктов ПОЛ в плазме крови.

С введением дополнительных компонентов естественной природы, содержащих вещества, препятствующие биологическому окислению, наблюдается отчётливая картина снижения концентрации продуктов ПОЛ уже на 3-и сутки (рис. 2, Б). Зафиксировано примерно 20%-ное снижение содержания диеновых конъюгатов, а на 7-е сут. наблюдается снижение почти на 50 % по отношению к контролю ($p \leq 0,05$). Концентрация малонового

диальдегида также снижается примерно на 20 % на 3-е сут., на 7-е сут. наблюдается незначительное уменьшение концентрации относительно предыдущего измерения, однако на 14-е сут. снижение по отношению к контролю вновь составило около 50 % ($p \leq 0,05$). После эксперимента концентрация продуктов ПОЛ становится ниже, чем при традиционном типе питания, примерно на 10 %. Очевидно, при рациональном питании организм имеет более стабильную иммунную систему и способен легче противостоять процессам ПОЛ, при этом в рационе имеется достаточное количество низкомолекулярных антиоксидантных веществ, что позволяет останавливать процессы ПОЛ, не затрачивая ресурсы на синтез антиоксидантных ферментов.

Концентрация каталазы в плазме крови экспериментальных животных оказалась невелика: этот фермент сосредоточен преимущественно в мембранах клеток, имеет большую молекулярную массу и слабо экстрагируется в плазму [18]. Концентрация другого антиоксидантного фермента – СОД – значительно выше, поскольку он имеет специальную внеклеточную форму СОД3 с малой молекулярной массой [20], при этом содержание СОД в плазме в 2–3 раза ниже, чем клеточной.

Сравнение показателей активности антиоксидантных ферментов экспериментальных групп (рис. 3) показало, что концентрация СОД наибольшая в группе, содержащейся при инновационном типе питания, наименьшая – при естественном типе питания, концентрация же внеклеточной каталазы практически не различается. Очевидно, наблюдаемую разницу можно объяснить тем, что при естественном типе питания в плазме содержится больше неферментативных антиоксидантных веществ, а генерация СОД менее необходима для организма.

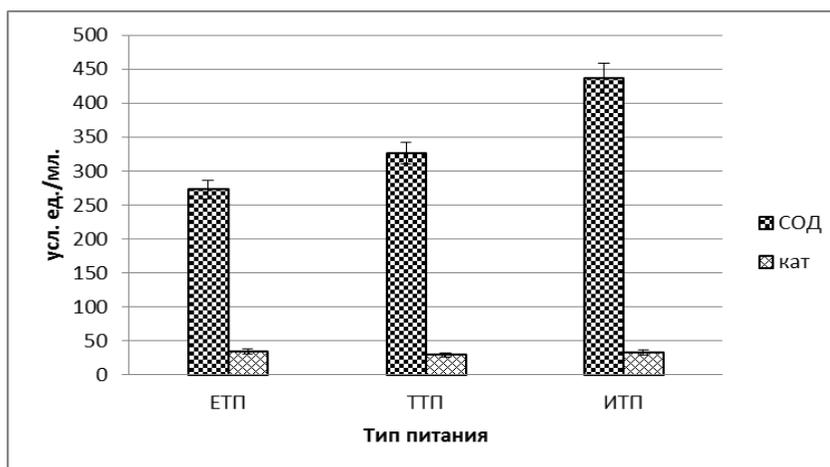


Рис. 3. Активность антиоксидантных ферментов в плазме крови кроликов, содержащихся в эксперименте при разных типах питания. СОД – супероксиддисмутаза, кат – каталаза, ЕТП – естественный тип питания, ТТП – традиционный тип питания, ИТП – инновационный тип питания

При добавлении в рацион кормов, содержащих характерные для естественного типа питания, естественные антиоксиданты (см. табл.), в группе животных, содержащихся на традиционном типе питания (рис. 4, А), в первые три дня наблюдается выраженный рост концентрации СОД, а затем ещё более заметное её падение. Аналогичная картина характерна и для кроликов, содержащихся при инновационном типе питания (рис. 4, Б), при этом темп спада концентрации СОД после 3-го дня введения дополнительных компонентов оказался ещё более резким.

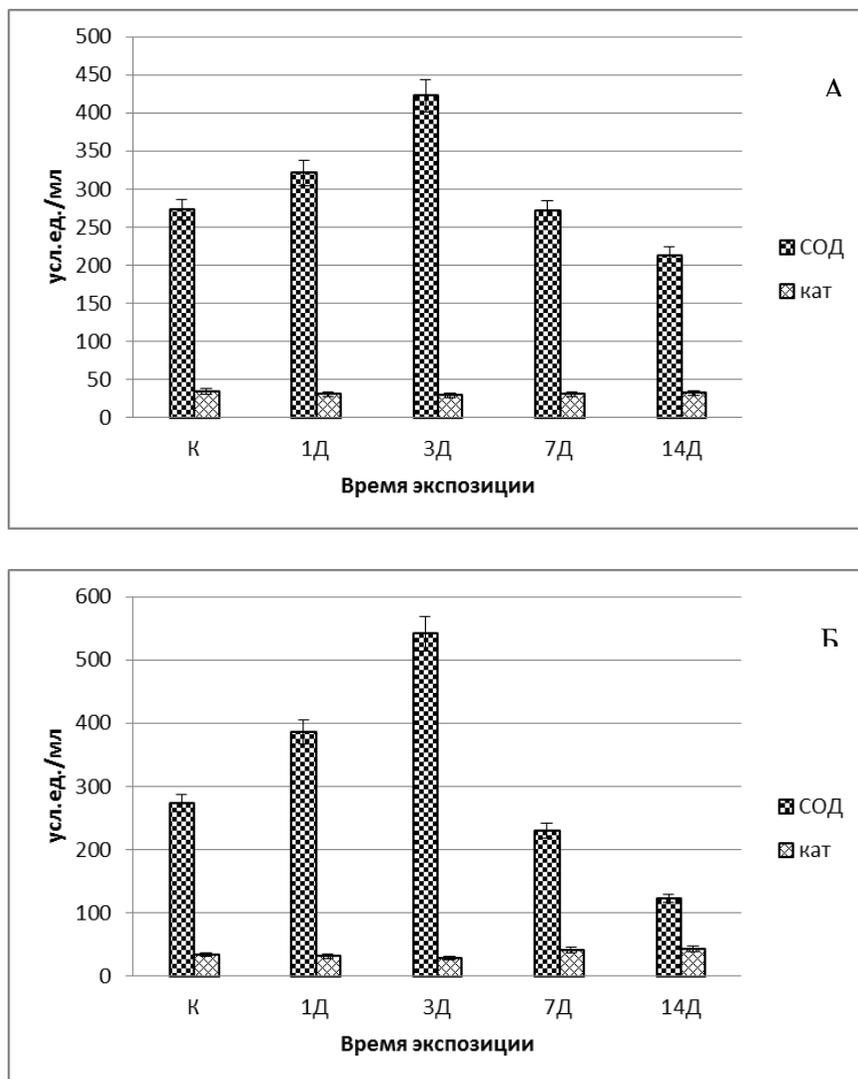


Рис. 4. Влияние сырых растительных компонентов на содержание антиоксидантных ферментов в плазме крови кроликов, содержащихся в эксперименте при традиционном (А) и инновационном (Б) типах питания (обозначения см. на рис. 3)

Вероятно, это обусловлено особенностями действия адаптационных механизмов животных в связи со сменой рациона питания. В соответствии с информацией от рецепторов пищеварительной системы ввиду возможного нестабильного состава крови и лимфы как основного депо питательных веществ усиливается выработка антиоксидантных ферментов, что может привести к генерации АФК. Однако после адаптации к новому рациону и нормализации гомеостаза темп продуцирования СОД снижается после получения сигнала о более высоком содержании низкомолекулярных антиоксидантов в крови, которые могут выполнять функцию по утилизации АФК, в частности супероксидного анион-радикала (O_2^-) и перекиси водорода (H_2O_2).

Выводы

1. Общее количество продуктов перекисного окисления липидов в крови экспериментальных животных, содержащихся при естественном типе питания, статистически значительно ниже, чем при традиционном и инновационном типах ввиду высокого содержания низкомолекулярных антиоксидантных веществ.

2. При добавлении компонентов, включающих антиоксидантные вещества естественной природы в рацион кроликов, содержащихся на традиционном и инновационном типах питания, наблюдается постепенное снижение содержания продуктов перекисного окисления липидов при традиционном питании на 20 %, а при инновационном – на 50 % по отношению к контролю, в связи с активацией низкомолекулярных антиоксидантов и участием их в дезактивации активных форм кислорода.

3. Максимальное содержание супероксиддисмутазы регистрируется в плазме крови кроликов при инновационном типе питания, а минимальное – при естественном типе. Концентрация каталазы статистически значимо не отличается.

4. В первые дни эксперимента в связи со стрессовыми реакциями животного на смену рациона питания наблюдается статистически значимое увеличение концентрации супероксиддисмутазы как при традиционном, так и при инновационном типах питания. Однако к 14-му дню у животных при традиционном типе питания происходит снижение показателя до уровня, соответствующего естественному, а при инновационном типе питания – ниже него. Очевидно, функции СОД переходят к каротиноидам, флавоноидам, аскорбиновой кислоте и другим антиоксидантам, содержащимся в новом рационе.

Список литературы

1. Арчаков А. И. Модификация белков активным кислородом и их распад / А. И. Арчаков, И. М. Мохосоев // Биохимия. – 1989 – Т. 54, № 2. – С. 176–179.
2. Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В. А. Барабой // Успехи соврем. биологии. – 1991. – Т. 111, № 6. – С. 923–931.
3. Боярский Л. Г. Производство и использование кормов / Л. Г. Боярский. – М. : Росагропромиздат, 1988. – 221 с.

4. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биомембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М. : Наука, 2003. – С. 230–272.
5. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю. А. Владимиров // Вестн. РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43–51.
6. Выделение и свойства супероксиддисмутазы плазмы крови человека / Е. Е. Дубинина [и др.] // Биохимия. – 1992. – Т. 57, № 12. – С. 1892–1901.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
8. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е. Е. Дубинина. – СПб. : Мед. пресса, 2006. – 396 с.
9. Игуменов В. Л. Агрегация мембранных белков клеток *E. coli* при действии синглетного кислорода / В. Л. Игуменов, Б. П. Шаров, В. А. Пасечник // Биохимия. – 1988. – Т. 53, № 6. – С. 925–929.
10. Каган В. Е. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов / В. Е. Каган, О. Н. Орлов, Л. Л. Прилипко // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1986. – Т. 18. – 136 с.
11. Седов Ю. Д. Кролики разведение, содержание, уход / Ю. Д. Седов. – Ростов н/Д : Феникс, 2009. – 173 с.
12. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1997. – С. 66–68.
13. Томмэ М. Ф. Кормовые рационы и нормы кормления для сельскохозяйственных животных / М. Ф. Томмэ. – М. : Сельхозиздат, 1963. – 358 с.
14. An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plants / B. D. Patterson [et al.] // Plant Physiology. – 1984. – Vol. 76, N 4. – P. 1014–1018.
15. Dix T. A. Mechanisms and biological significance of lipid peroxidation initiation / T. A. Dix, J. Aikens // Chem. Res. Toxicol. – 2005. – Vol. 6. – P. 2–18.
16. Frey P. A. Radical mechanisms of enzymatic catalysis / P. A. Frey // Annu. Rev. Biochem. – 2001. – Vol. 70. – P. 121–148.
17. Gutteridge J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidation as biomarkers of tissues damage / J. M. C. Gutteridge // Clinical Chemistry. – 2005. – Vol. 41, N 12. – P. 1819–1828.
18. Halliwell B. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // Lancet. – 1984. – P. 1396–98.
19. Meral A. Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia / A. Meral, P. Tuncel, E. Surmen-Gur // Pediatr. Hematol. Oncol. – 2000. – Vol. 17. – P. 687–693.
20. Stocker R. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma / R. Stocker, B. Frei // Oxidative stress: oxidants and antioxidants. – London : Academic Press, 1991. – P. 213–243.

Impact of Different Types of Food on Lipid Peroxidation Level and Antioxidant Defense System in Blood Plasma of European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)

S. S. Tarasov, A. S. Koryagin

N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod

Abstract. The status of lipid peroxidation based on malondialdehyde and diene conjugates in blood plasma of European rabbit grown at different feeding options, as well as state of the enzymatic antioxidant system superoxide dismutase and catalase were investigated. The dependence of lipid peroxidation, as well as changes in the concentration of antioxidant enzymes on type of food is demonstrated. The ability of food containing antioxidant substances of natural origin, to normalize the balance of antioxidant protection and to reduce oxidative stress is revealed.

Keywords: lipid peroxidation, animal nutrition, rabbits, malondialdehyde, diene conjugates, superoxide dismutase, catalase.

Тарасов Сергей Сергеевич
аспирант
Нижегородский государственный
университет им. Н. И. Лобачевского
603022, г. Нижний Новгород,
пр. Гагарина, 23
тел.: (831) 462-32-11
e-mail: tarasov_ss@mail.ru

Tarasov Sergey Sergeevich
Postgraduate
N. I. Lobachevsky State University of
Nizhny Novgorod
23, Gagarin ave., Nizhny Novgorod,
603022
tel.: (831) 462-32-11
e-mail: tarasov_ss@mail.ru

Корягин Александр Сергеевич
доктор биологических наук, профессор
Нижегородский государственный
университет им. Н. И. Лобачевского
603022, г. Нижний Новгород,
пр. Гагарина, 23
тел.: (831) 462-32-11
e-mail: tarasov_ss@mail.ru

Koryagin Aleksandr Sergeevich
Doctor of Sciences (Biology), Professor
N. I. Lobachevsky State University of
Nizhny Novgorod
23, Gagarin ave., Nizhny Novgorod,
603022
tel.: (831) 462-32-11
e-mail: tarasov_ss@mail.ru