УДК 619:616 – 092:636.22/.28:615.3

ОГРАНИЧЕНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ БЫЧКОВ ПРИ ТРАНСПОРТНОМ СТРЕССЕ ПРЕПАРАТАМИ НА ОСНОВЕ ХИТИНА

Таирова А.Р., Сенькевич Е.В., Фаткуллин Р.Р.

ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины», Троицк, e-mail: atairova@yandex.ru

В стрессогенных условиях промышленного животноводства антиоксидантная система является важным фактором естественной профилактики стрессорных повреждений при транспортировке бычков, непосредственно защищающая клеточные мембраны от повреждающего действия свободных радикалов. Изучена возможность стимуляции антиоксидантных механизмов защиты организма бычков для ограничения свободнорадикального окисления при экстремальном воздействии транспортного стресс-фактора на организм путем применения препаратов на основе хитина. Результаты исследований показали, что ограничение хитиновыми препаратами стресс-реализующих механизмов подтверждается их антиоксидантными свойствами, проявляющимися снижением концентрации малонового диальдегида, в среднем, в 1,6 раза; повышением функционального состояния системы защиты организма бычков, тестируемого увеличением концентрации основного антиоксиданта сыворотки крови (церулоплазмина) – в 1,5 раза, повышением активности вспомогательного фермента дыхания (каталазы) – на 11,22–14,63 %, а также характером изменений содержания биорастворимых антиоксидантов (фосфолипидов).

Ключевые слова: транспортный стресс, бычки, антиоксидантная система, хитиновые биополимеры

LIMITATION OF FREE-RADICAL OXIDIZATION IN ORGANISM OF BULL-CALVES AT A TRANSPORT STRESS BY PREPARATIONS ON BASIS OF CHITIN

Tairova A.R., Senkevich E.V., Fatkullin R.R.

Ural State Academy of Veterinary Medicine, Troitsk, e-mail: atairova@yandex.ru

In the stressful conditions of industrial livestock antioxidant system is an important factor in the natural prevention of stress damage in transit steers directly protects cell membranes from the damaging effects of free radicals. The possibility of stimulation of antioxidant defense mechanisms of the organism of gobies to limit free radical oxidation at the extreme effects of transport stress factors on the body through the use of drugs based on chitin. The results showed that the restriction of chitin preparations of stress-realizing mechanisms is confirmed by their antioxidant properties, manifested by reduced concentrations of malondialdehyde, an average of 1,6 times, increasing the functional state of defense bulls tested increasing concentrations of the main antioxidant serum (ceruloplasmin) – 1.5-fold increase in enzyme activity of respiratory support (catalase) – on 11,22–14,63 %, as well as changes in the nature of the content of antioxidants biosoluble (phospholipids).

Keywords: transport stress, bull-calves, antioxidant system, chitinous biopolimers

Антиоксидантная система, относящаяся к числу стресс-лимитирующих механизмов организма, является важным фактором ограничения активности стресс-реализующих систем и непосредственно защищает клеточные мембраны от повреждающего действия свободных радикалов, образующихся в значительных количествах в результате интенсификации свободнорадикальных процессов, перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, наблюдающихся при развитии общего неспецифического адаптационного синдрома [2].

В предыдущих исследованиях нами была установлена активация липолиза в организме бычков при их транспортировке свыше 100 км, ведущая к образованию свободных жирных кислот – донаторов энергии для интенсивно функционирующих органов. Однако использование жирных кислот в организме бычков сопряжено с повышением потребления кислорода. При его дефиците в условиях действия транспортного стрессорного фактора утилизация свободных жирных кислот нарушается, происходит их накопление, инициирующее ряд патологических процессов.

Чрезмерную интенсификацию перекисного (свободнорадикального) окисления липидов связывают также с действием высоких концентраций катехоламинов. Под действием продуктов перекисного окисления липидов – гидроперекисей липидов – происходят образование свободных радикалов, лабилизация лизосом, освобождение протеолитических ферментов и, в конечном результате, появляются высокотоксичные продукты – альдегиды, кетоны, спирты, накопление которых вызывает повреждение мембраносвязанных ферментов, нарушение мембранного транспорта и гибель клеток [1, 3].

В связи с этим, целью работы явилось изучение возможности стимуляции антиоксидантных механизмов защиты организма бычков для ограничения свободнорадикального окисления при экстремальном воздей-

ствии транспортного стресс-фактора путем применения хитин/хитозана. Среди последних несомненный интерес представляют хитозановые биополимеры. Как показывают данные литературы, одним из основных компонентов противовоспалительного и общеукрепляющего действия хитозана, самого известного производного хитина, является его антиоксидантная активность. При исследовании процессов свободнорадикального повреждения гемоглобина было установлено, что хитозан способен улавливать активные формы кислорода, то есть выполнять роль антиоксиданта широкого спектра действия [5].

При постановке опыта в хозяйстве-поставщике (СХП «Воронино» Уйского района Челябинской области) для транспортировки на расстояние свыше 100 км были отобраны клинически здоровые бычки черно-пестрой породы, подобранные по принципу аналогов, живой массой 65,81–67,10 кг, в возрасте 2 месяца и сформированы четыре группы по 10 голов в каждой. Бычки 1-й группы служили контролем. Бычки 2-й опытной группы за 3 дня до транспортировки получали per os 2%-й раствор хитозана водорастворимого с молекулярной массой 38,0 кДа и степенью деацетилирования 85,0% (ТУ 9289-002-114/8234–99); бычки 3-й опытной группы – 2%-й раствор сукцината хитозана высокомолекулярного водорастворимого с молекулярной массой 487,0 кДа и степенью замещения 75,3% (ТУ 9289-003-1173426–98); бычки 4 опытной группы – 2%-й раствор сукцината хитозана низкомолекулярного с молекулярной массой 80,0 кДа и степенью замещения 75,2% (ТУ 9289-003-11734/26–98). Препараты применяли 2 раза в день из расчета 2 мл раствора на 1 кг живой массы. После прибытия в ОАО ПКЗ «Дубровский» Красноармейского района Челябинской области применение препаратов продолжали в течение двух 5-дневных курсов с интервалом 5 дней.

Оценку функционального состояния антиоксидантной системы защиты организма бычков проводили по показателям, характеризующим функциональную активность стресс-реализующих и стресс-лимитирующих механизмов, в том числе по концентрации церулоплазмина, являющегося универсальным внеклеточным «гасителем» свободных радикалов, и малонового диальдегида – конечного продукта перекисного окисления липидов.

На наш взгляд, хитиновые препараты проявили антирадикальную активность. Согласно полученным данным, изменения концентрации церулоплазмина на 1-й день после транспортировки имели у всех подопытных животных одинаковый характер, однако степень выраженности этих изменений была различной. Наиболее значительное снижение концентрации этого основного антиоксиданта сыворотки крови нами установлено у бычков контрольной группы, достигшее 1,45 ± 0,04 г/л, что ниже исходного уровня на 38,62%. В группах бычков, получавших производные хитозана, снижение концентрации церулоплазмина составило 6,92% (хитозан); 7,06% (сукцинат хитозана высокомолекулярный) и 4,64%, $p > 0,05$ (сукцинат хитозана низкомолекулярный). При этом в 4-й группе бычков уменьшение концентрации церулоплазмина было достоверно незначимым. Наше предположение подтверждается нарастанием концентрации церулоплазмина к 10-му дню опыта в группах бычков, получавших хитиновые биополимеры, когда уровень медьсодержащего протеида составил 2,58 ± 0,06 (2-я группа) 2,67 ± 0,04 (3-я группа) и 2,62 ± 0,06 г/л (4-я группа), и превысил значение изучаемого показателя у бычков контрольной группы на 37,36; 47,25 и 40,65% соответственно по группам, достигнув уровня верхней границы физиологической нормы, не претерпевая достоверно значимых изменений до конца периода наблюдений.

К 20-му дню опыта прослеживается тенденция повышения уровня содержания церулоплазмина в сыворотке крови и в контрольной группе бычков, при этом установлено повышение его концентрации на 15,38%, по сравнению с предыдущим периодом, однако не достигшее как исходного уровня, так и референтной величины. И только к 30-му дню в контрольной группе бычков происходит нормализация изучаемого показателя. На этом фоне в опытных группах бычков концентрация церулоплазмина не претерпела достоверно значимых изменений и продолжала оставаться таковой до конца периода наблюдения.

Полученные данные по динамике церулоплазмина свидетельствуют, что в организме бычков контрольной группы на фоне ранее установленной нами гипоксии более выражено развивается так называемый окислительный стресс, сопровождающийся образованием высокоактивных форм кислорода. Причинами этого могут быть как нарушение функций митохондрий, например, при гипоксии, с прекращением образования молекул воды – конечного продукта кислородного метаболизма и накоплением промежуточных свободнорадикальных форм кислорода, так и подавление эндогенных антиоксидантных систем, нейтрализующих свободные радикалы. Применение хи-

тиновых препаратов при гипоксии, на наш взгляд, уменьшает или даже предотвращает образование свободных радикалов, благодаря нормализации функций митохондрий (уменьшается накопление высокоактивных форм кислорода) и энергостабилизирующему действию.

Наше мнение подтверждается динамикой концентрации малонового диальдегида – конечного продукта перекисного окисления липидов. Концентрация этого метаболита в крови бычков контрольной группы превысила исходный уровень в 1,73 раза. Этот факт явился результатом снижения уровня глюкозы крови, преимущественного анаэробного её окисления, способствовавшего образованию жирных кислот, усилению процессов пероксидации и, как следствие, накоплению продуктов перекисного окисления липидов.

В организме бычков опытных групп в 1-й день после транспортировки накопление малонового диальдегида происходило в меньших размерах и составило от 7,24 % на фоне применения сукцината хитозана низкомолекулярного до 8,92 % – сукцината хитозана высокомолекулярного.

В последующие изучаемые сроки концентрация малонового диальдегида в контроле была выше исходного уровня на 46,32 % (10-й день), 22,18 % (20-й день) и 15,95 % (30-й день).

У бычков опытных групп нормализация уровня этого метаболита установлена уже на 10-й день опыта в 4 группе на фоне применения сукцината хитозана низкомолекулярного. Во 2-й группе бычков (хитозан) и 3-й группе (сукцинат хитозана высокомолекулярный) соответствие физиологическим параметрам наступило к 20-му дню исследований. При этом обращает на себя внимание установленная в работе обратная корреляционная связь между содержанием малонового диальдегида и церулоплазмина – основного антиоксиданта сыворотки крови животных.

В настоящее время неясно, от какой активности – ферроксидазной, аскорбатоксидазной или O_2 – перехватывающей – в большей степени зависит антиокислительная активность церулоплазмина. В исследованиях Погосяна Г.Г. и соавторов [4] установлено, что церулоплазмин, как ингибитор липидной пероксидации, примерно на два порядка менее эффективен, чем супероксиддисмутаза. Однако для проявления защитных функций организма очень важно, что церулоплазмин циркулирует в крови, в то время как супероксиддисмутаза – внутриклеточный фермент. Ингибирующий и предотвращающий окисление липидов церулоплазмин играет большую роль в удалении токсических радикалов супероксиданиона. Клетки и ткани, как известно, защищены от повреждений супероксиданионным радикалом, главным образом, с помощью медьсодержащей оксиддисмутазы, внутриклеточного фермента, катализирующего дисмутацию свободных радикалов до перекиси и кислорода. Церулоплазмин с помощью пары ионов меди связывает супероксиданион, в отличие от действия супероксиддисмутазы, без образования перекиси, осуществляя четырехэлектронное восстановление кислорода до воды.

Можно предположить, что обнаруженные изменения у бычков контрольной группы являются следствием снижения защитных сил организма, в том числе и антиоксидантных, под действием транспортного стресс-фактора. Применение производных хитозана до и после транспортировки вызвало активацию антиоксидантной защиты организма бычков от стрессорного фактора. Вышеизложенное согласуется и с каталазной активностью. Активность вспомогательного фермента дыхания – каталазы, разрушающей гидроперекиси с образованием молекулярного кислорода и, наряду с пероксидазой, составляющей первую линию защиты от свободных радикалов, на 1-й день после транспортировки в организме бычков опытных групп была даже несколько выше средних физиологических параметров и составила 20,12 ± 0,72 мкмольH_2O_2 (хитозан); 20,45 ± 0,63 (сукцинат хитозана высокомолекулярный) и 20,74 ± 0,71 (сукцинат хитозана низкомолекулярный), что было выше контрольной величины на 11,23; 13,05 и 14,65 %, а исходного уровня – на 14,39; 16,66 и 15,55 % соответственно. В контрольной группе бычков увеличение каталазной активности составило 2,15 % ($p > 0,05$).

К 10-му дню опыта, по сравнению с предыдущим периодом исследований, активность фермента имеет тенденцию к снижению на 6,28 % ($p < 0,05$) на фоне применения хитозана, 11,98 % ($p < 0,01$) – при применении сукцината хитозана высокомолекулярного и 9,21 % – сукцината хитозана низкомолекулярного. В контроле, напротив, активность энзима повысилась до 18,47 ± 0,59 мкмольH_2O_2, однако статистическая обработка не подтвердила этого факта. В дальнейшем, если активность фермента в организме бычков опытных групп находилась на уровне физиологической нормы, то в контроле продолжалось её нарастание, превысившее исходный уровень по 20-й день на 7,64 % с последующей стабилизацией к 30-му дню опыта на уровне 19,05 ± 0,82 мкмоль H_2O_2. Если учесть,

что каталаза относится к числу ферментов с наиболее высоким числом оборотов (каталаза может разложить 44000 молекул H_2O_2 в секунду, поэтому для разложения большого количества перекиси требуется малое количество фермента), то можно предполагать, что у животных на фоне применения хитиновых препаратов происходит более эффективное обезвреживание активных радикалов. Каталаза, как и пероксидаза, может утилизировать субстраты, органические гидроперекиси, а значимость установленной нами динамики в активности фермента возрастает в связи с тем, что как полагает ряд исследователей, что в животных тканях каталаза действует как пероксидаза.

Таким образом, применение производных хитозана до и после транспортировки вызвало активацию антиоксидантной защиты организма бычков от стрессорного фактора. Ограничение хитиновыми препаратами стресс-реализующих механизмов подтверждается их антиоксидантными свойствами, проявляющимися снижением концентрации малонового диальдегида, в среднем, в 1,6 раза; повышением функционального состояния системы защиты организма бычков, тестируемого увеличением концентрации основного антиоксиданта сыворотки крови (церулоплазмина) – в 1,5 раза, повышением активности вспомогательного фермента дыхания (каталазы) – на 11,22–14,63 %, а также характером изменений содержания биорастворимых антиоксидантов (фосфолипидов).

Список литературы

1. Васильев Н.В. Захаров Ю.М., Коляда Т.И. Система крови и неспецифическая резистентность в экстремальных климатических условиях. – Новосибирск: Наука, 1992. – 257 с.

2. Казимирко В.К., Мальцев В.Н., Бутылин В.Ю. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. – Киев: Морион, 2004. – 160 с.

3. Камскова Ю.Г., Рассохин А.Г., Цейликман В.Э. Изменения в системе крови при длительной гипокинезии // Вестник ЧГПУ. – 2000. – Серия 9. – №1. – С. 90–93.

4. Погосян Г.Г., Налбандян Р.М. Ингибирование липидной пероксидации супероксиддисмутазой и церулоплазмином // Биохимия. – 1983. – Т.48. – С. 1129–1134.

5. Шугалей И.В., Львов С.Н., Целинский И.В. Некоторые аспекты действия крилевого хитозана при свободнорадикальных поражениях биообъектов // Производство и применение хитина и хитозана: тез. докл. 4-й Всерос. конф. – 1995. – С. 49.

References

1. Vasilev N.V., Zaharov Ju.M., Koljada T.I. Sistema krovi i nespecificheskaja rezistentnost' v jekstremalnyh klimaticheskih uslovijah.- Novosibirsk: Nauka, 1992. 257 p.

2. Kazimirko V.K., Malcev V.N., Butylin V.Ju. Svobodnoradikal'noe okislenie i antioksidantnaja terapija. – Kiev: Morion, 2004. 160 p.

3. Kamskova Ju.G., Rassohin A.G., Cejlikman V.Je. Izmenenija v sisteme krovi pri dlitel'noj gipokinezii // Vestnik ChGPU. 2000. Serija 9. no. 1. pp. 90–93.

4. Pogosjan G.G., Nalbandjan R.M. Ingibirovanie lipidnoj peroksidacii superoksiddismutazoj i ceruloplazminom. Biohimija. 1983. T.48. pp. 1129–1134.

5. Shugalej I.V., Lvov S.N., Celinskij I.V. Nekotorye aspekty dejstvija krilevogo hitozana pri svobodnoradikal'nyh porazhenijah bioob'ektov//Proizvodstvo i primenenie hitina i hitozana: Tez. dokl. 4-j Vseros. konf. 1995. pp.49.

Рецензенты:

Дерхо М.А., д.б.н., зав. кафедрой органической, биологической и физколлоидной химии ФГБОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины», г. Троицк;

Горелик О.В., д.с.-х.н., декан факультета биотехнологии ФГБОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины», г. Троицк.

Работа поступила в редакцию 10.07.2012.