

УДК 619:618.14:636.2:(612.664.36 + 611.018.5)

ПЕРОКСИДАЦИЯ ЛИПИДОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ МОЛОКА И КРОВИ КОРОВ, БОЛЬНЫХ ПОСЛЕРОВОДОВЫМ ЭНДОМЕТРИТОМ

Высокогорский В.Е., Воронова Т.Д., Погорелова Н.А.

ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», Омск, e-mail: ntali839@list.ru

В работе определяли выраженность окислительной модификации белков и пероксидации липидов крови и молока коров с послеродовым эндометритом. Интенсивность свободнорадикальных процессов оценивали по следующим показателям: содержание молекулярных продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах молока эритроцитов и плазмы крови; окислительную модификацию белков оценивали по количеству карбонильных группировок аминокислотных остатков, образующихся в результате окислительной модификации исследуемых белков. *Полученные результаты свидетельствуют о различных нарушениях свободнорадикальных процессов липидов и белков молока и крови коров, больных послеродовым эндометритом. Содержание конечных продуктов пероксидации липидов (шиффовых оснований) увеличивается как в гептановых, так и изопропанольной экстрактах эритроцитов и плазмы крови, уровень первичных и вторичных продуктов изменяется в противоположных направлениях в эритроцитах и в плазме крови. Установлено повышение содержания диеновых конъюгатов, уровень же конечных и вторичных продуктов пероксидации липидов молока не изменялся. В плазме крови и молоке коров, больных послеродовым эндометритом, возрастает содержание нейтральных альдегиддinitрофенилгидразонов (356 нм), нейтральных кетондinitрофенилгидразонов (370 нм). Наиболее выражено повышение уровня карбонилирования белков молока при 530 нм (в 3,44 раза).*

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, послеродовые эндометриты коров

PEROXIDATION OF LIPIDS AND OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS OF MILK AND BLOOD OF COWS WITH PUERPERAL ENDOMETRITIS

Vysokogorskiy V.E., Voronova T.D., Pogorelova N.A.

FGBOU VPO «Omsk Stolypin State Agrarian University», Omsk, e-mail: ntali839@list.ru

In the work were determined intensity of oxidative modification of proteins and peroxidation of blood lipids and milk of cows with puerperal endometritis. The intensity of free radical processes was evaluated on the following parameters: content of molecular produce of lipid peroxygenation in heptan- isopropanol extracts of milk, erythrocytes and blood plasma; oxidative modification of proteins was evaluated by the number of carbonyl groups of amino acid residues, resulting from the oxidative modification of proteins under study. Obtained results attest to variant disturbance in lipids and proteins of milk and blood of cows with postpartum endometritis. The content of final products of peroxidation of lipids (digital base) increases so in heptane as in isopropanol extracts of erythrocytes and blood plasma, the level of primary and secondary products varies in opposite directions in erythrocytes and in blood plasma. It was established the elevation of content of diene conjugate, the level of final and secondary product of peroxidation of blood lipids was unchanged. In blood plasma and milk of cows with postpartum endometritis increases the exposure of neutral aldehyde dinitrophenylhydrazine (356 nm), neutral ketone dinitrophenylhydrazine (370 nm). The most pronounced the stiffening in carbonylation of milk proteins at 530 nm (in 3,44 times).

Keywords: lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, puerperal endometritis in cows

Во время беременности, родов и по их завершении наблюдается активация процессов свободнорадикального окисления в организме сельскохозяйственных животных [13]. Значительное повышение интенсивности перекисного окисления липидов приводит к развитию акушерской патологии, которая остается одной из самых актуальных проблем ветеринарного акушерства и молочного скотоводства в целом [4].

Среди акушерской патологии в послеродовой период наиболее распространён эндометрит крупного рогатого скота [3]. При исследовании сыворотки крови установлено, что у коров, больных послеродовым гнойно-катаральным эндометритом, возрастает прооксидантная активность и снижается антиоксидантная [11, 9]. Данная патоло-

гия характеризуется снижением активности важнейших ферментов антиокислительной системы (АОС) крови: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и ферментов глутатионового звена [8]. Снижение активности антиокислительной защиты приводит к активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), проявляющейся накоплением малонового диальдегида (МДА) крови, увеличением содержания флюоресцирующих оснований Шиффа (ОШ) плазмы крови [7].

Различные внешние факторы (сезон года, особенности корма), особенности физиологического состояния коров, их здоровье отражаются не только на уровне компонентов антиокислительной защиты крови, но и молока [2, 10]. В исследованиях Макарова А.В., Тарариной Л.И. (2009) выявлено увеличение

ТБК-активных продуктов коров, больных послеродовым эндометритом [14, 5].

Дисбаланс про- и антиоксидантных процессов в организме, свидетельствующий о формировании оксидативного стресса, приводит к окислительной деструкции не только липидов, но и белков. Однако отсутствуют результаты исследований окислительной деструкции белков молока коров с послеродовым эндометритом. Представляется необходимым и сопоставление данных об уровне карбонильных группировок белков как плазмы крови, так и молока совместно с определением продуктов перекисидации липидов эритроцитов, плазмы и молока.

Цель данного исследования – оценить выраженность окислительной модификации белков и перекисидации липидов эритроцитов, плазмы крови и молока коров с послеродовым эндометритом.

Материалы и методы исследований

Исследования выполнены на базе хозяйств лесостепной зоны Омской области. В работе изучали биологический материал коров черно-пестрой породы, 3–4-летнего возраста, первой половины стельности.

Все коровы были полновозрастными (2–3 лактация), животные находились в одинаковых условиях кормления (по рационам хозяйства) и содержания. Группы комплектовались по принципу аналогов (вес, период лактации, форма вымени): 1 группа (контрольная) – клинически здоровые животные; 2 группа (основная) – коровы с диагнозом «субклинический эндометрит». Разница в сроках отела не превышала 1 месяца. Кровь для биохимических исследований брали из яремной вены в утреннее время до кормления в вакуумные пробирки. Молоко охлаждали до 5°C и хранили при этой температуре до дальнейших исследований в течение 24 часов.

Параметры липидперекисидации исследовали в гептан-изопропанольных экстрактах молока в модификации И.А. Волчегорского и др. [1]. Необходимость использования двух фаз вызвана особенностями экстрагирования, так, в гептан экстрагируются в основном нейтральные липиды, а изопропанол – фосфолипиды, которые являются важнейшими субстратами перекисидации липидов. Определяли содержание молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов и сопряженных триенов (КД/СТ), конечных продуктов ПОЛ – оснований Шиффа (ОШ), в каждой из экстрагируемых фаз молока спектрофотометрическим методом при 220, 232, 278 и 400 нм. Результаты выражали в единицах окислительного индекса (е.о.и.), который рассчитывали как отношение $E_{232/220} \cdot E_{278/220} / E_{400/220}$.

Окислительную модификацию белков оценивали по Levine (1990) в модификации Е.Е. Дубининой (1995) [15, 6]. Карбонильные группировки аминокислотных остатков, образующиеся в результате окислительной модификации исследуемых белков, характеризовали степень их окислительной деструкции: нейтральные и основного характера альдегид-динитрофенилгидразоны определяли при длине 356

и 430 нм (АДФГ); а кетон-динитрофенилгидразоны нейтральные и основного характера при 370 и 530 нм соответственно (КДФГ).

Результаты обрабатывали с помощью пакета прикладных программ «Statistika 6.0» [12]. Для определения различий между независимыми группами использовали U-критерий Манна–Уитни. Уровень отличий рассматривался как статистически значимый при вероятности ошибки $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Изучение процессов СРО липидов крови было проведено с отдельной регистрацией продуктов ПОЛ эритроцитов и плазмы в гептановой и изопропанольной фазах. В гептановой фазе содержание первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов – было меньше в эритроцитах коров основной группы на 20,2% (табл. 1), а вторичных – (кетодиены и сопряженные триены) и конечных продуктов (шиффовые основания) было выше соответствующих показателей эритроцитов контрольной группы (на 18 и 50,2% соответственно).

Уровень конечных продуктов показал самое большое различие и в исследуемых образцах плазмы крови – шиффовых оснований в 2,1 раза больше в плазме коров больных эндометритом. Содержание изопропанолрастворимых кетодиенов, *сопряженных* триенов (КД, СТ) и шиффовых оснований (ШО) в эритроцитах коров основной группы выше на 34,7 и 50,6% соответственно в сравнении показателями здоровых животных. Выявлены изменения окисляемости липидов и в плазме крови больных коров, так, в 1,2 раза КД, СТ и в 3,4 раза ШО больше в основной группе. Содержание ДК эритроцитов и плазмы крови существенно не отличалось в основной группе животных от контрольной.

Таким образом, наибольшие изменения в уровне содержания продуктов ПОЛ эритроцитов и плазмы крови больных животных наблюдается в отношении вторичных и конечных продуктов окислительной деструкции липидов.

При анализе молока коров двух групп животных (табл. 2) было определено более высокое содержание в молоке коров основной группы первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов как в гептановой (на 8,2%), так и в изопропанольной фазах (на 13,4%).

Уровень же вторичных (кетодиены и сопряженные триены) и конечных продуктов (шиффовые основания) в молоке больных коров существенно не отличался от данных здоровых животных.

Таблица 1

Показатели липопероксидации эритроцитов и плазмы крови коров в норме и при послеродовом эндометрите (в е.о.и.)

Показатель	Группа животных			
	Контрольная (n = 10)		Основная (n = 10)	
<i>Гептановая фаза</i>	эритроциты	плазма	эритроциты	плазма
Диеновые конъюгаты	0,894 ± 0,015	0,411 ± 0,023	0,716 ± 0,091 (P = 0,005)	0,481 ± 0,035 (P = 0,047)
Кетодиены и сопряжённые триены	0,327 ± 0,031	0,249 ± 0,016	0,399 ± 0,052 (P = 0,043)	0,225 ± 0,011 (P = 0,007)
Шиффовые основания	0,136 ± 0,012	0,097 ± 0,032	0,273 ± 0,013 (P = 0,005)	0,203 ± 0,039 (P = 0,023)
Изопропанольная фаза	0,529 ± 0,038	0,453 ± 0,021	0,545 ± 0,024 (P = 0,07)	0,493 ± 0,036 (P = 0,061)
<i>Диеновые конъюгаты</i>	0,250 ± 0,013	0,226 ± 0,018	0,383 ± 0,015 (P = 0,0057)	0,274 ± 0,063 (P = 0,037)
Кетодиены и сопряжённые триены				
Шиффовые основания	0,125 ± 0,075	0,057 ± 0,012	0,253 ± 0,10 (P = 0,038)	0,193 ± 0,020 (P = 0,0039)

Примечание. Значения P представлены в сравнении с контрольной группой.

Таблица 2

Показатели липопероксидации молока коров в норме и при послеродовом эндометрите (е.о.и.)

Показатель	Группа животных	
	Контрольная (n = 10)	Основная (n = 10)
Гептановая фаза	1,037 ± 0,039	1,130 ± 0,040 (P = 0,048)
<i>Диеновые конъюгаты</i>	0,090 ± 0,010	0,093 ± 0,032 (P = 0,628)
Кетодиены и сопряжённые триены		
Шиффовые основания	0,008 ± 0,001	0,013 ± 0,0039 (P = 0,073)
Изопропанольная фаза	0,433 ± 0,018	0,500 ± 0,049 (P = 0,047)
<i>Диеновые конъюгаты</i>	0,205 ± 0,026	0,240 ± 0,024 (P = 0,062)
Кетодиены и сопряжённые триены		
Шиффовые основания	0,038 ± 0,036	0,023 ± 0,010 (P = 0,356)

Примечание. Значения P представлены в сравнении с контрольной группой.

Таблица 3

Показатели карбонилирования белков плазмы крови коров в норме и при послеродовом эндометрите (е.о.п. на 1 мл плазмы)

Показатель	Группа животных	
	Контрольная (n = 10)	Основная (n = 10)
Алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны, (356 нм)	6,52 ± 0,62	7,37 ± 0,74 (P = 0,017)
Алифатические кетондинитрофенилгидразоны, (370 нм)	6,40 ± 0,18	7,40 ± 0,36 (P = 0,026)
Альдегиддинитрофенилгидразоны основного характера, (430 нм)	3,37 ± 0,09	3,60 ± 0,10 (P = 0,378)
Кетондинитрофенилгидразоны основного характера, (530 нм)	0,34 ± 0,09	0,51 ± 0,02 (P = 0,015)

Примечание. Значения P представлены в сравнении с контрольной группой.

Активация СРО липидов эритроцитов и плазмы крови сопровождается увеличением карбонильных производных белков плазмы больных животных (табл. 3), о чем свидетельствует повышение среднего уровня алифатических альдегиддинитрофенилгидразонов и кетондинитрофенилгидразонов на 11,5 и 13,5%. Содержание кетондинитрофенилгидразонов основного характера плазмы крови в группе больных коров с послеродовым эндометритом выше на 32,7% по сравнению со здоровыми животными.

Свободные радикалы могут вызывать окислительную деструкцию не только белков крови, но и белков молока (табл. 4), по-

этому далее определяли количество карбонильных соединений белка сырого молока, основную часть которых составляют альдегидо- и кетонпроизводные нейтрального характера. Нами установлено повышение уровня алифатических альдегиддинитрофенилгидразонов нейтрального характера на 28,8% ($p = 0,0047$) и кетондинитрофенилгидразонов на 78% ($p = 0,008$) у коров больных послеродовым эндометритом по сравнению с контрольной группой. Выявлено повышение и кетондинитрофенилгидразонов основного характера, определяемых при 530 нм, в сыром молоке коров основной группы в 3,44 раз по сравнению со здоровыми животными ($p = 0,029$).

Таблица 4

Показатели карбонилирования белков молока коров в норме и при послеродовом эндометрите (*е.о.п. на 1 мл молока*)

Показатель	Группа животных	
	Контрольная ($n = 10$)	Основная ($n = 10$)
Алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны, (356 нм)	$3,19 \pm 0,195$	$4,11 \pm 0,612$ ($P = 0,005$)
Алифатические кетондинитрофенилгидразоны (370 нм)	$2,86 \pm 0,232$	$3,67 \pm 0,570$ ($P = 0,008$)
Альдегиддинитрофенилгидразоны основного характера, (430 нм)	$1,34 \pm 0,560$	$1,55 \pm 0,647$ ($P = 0,491$)
Кетондинитрофенилгидразоны основного характера (530 нм)	$0,148 \pm 0,028$	$0,508 \pm 0,145$ ($P = 0,029$)

Примечание. Значения P представлены в сравнении с контрольной группой.

Полученные результаты свидетельствуют о значительных свободнорадикальных нарушениях белков молока коров, больных послеродовым эндометритом, в меньшей степени эти изменения выявлены в уровне содержания продуктов ПОЛ молока.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о различных нарушениях свободнорадикальных процессов липидов и белков молока коров больных послеродовым эндометритом. Следует отметить, что конечные продукты пероксидации липидов (шиффовые основания) увеличиваются как в гептановом, так и изопропанольном экстрактах эритроцитов и плазмы крови, а уровень первичных и вторичных продуктов изменяется в противоположных направлениях в эритроцитах и в плазме крови. В противоположность показателям крови содержание конечных и вторичных продуктов пероксидации липидов молока не изменяется, отмечается только некоторое повышение диеновых конъюгатов. В плазме крови и молоке коров, больных послеродовым эндометритом, возрастает содер-

жание как ранних маркёров окислительной деструкции белков – нейтральных альдегиддинитрофенилгидразонов, так и поздних – нейтральных кетондинитрофенилгидразонов. Наиболее выражено повышение уровня карбонилирования белков молока при 530 нм (в 3,44 раза).

Список литературы

1. Волчегорский И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов // Вопр. мед. химии. – 1989. – № 1. – С. 127–131
2. Высокогорский В.Е. Антиокислительные свойства молока в разных зонах Омской области / В.Е. Высокогорский, Т.Д. Воронова, В. Веселов // Молочная промышленность. – 2009. – № 10. – С. 73–74.
3. Епанчинцева О.С. Распространение и сезонная динамика акушерско-гинекологических болезней у коров в хозяйствах Омской области / О.С. Епанчинцева, Б.В. Гуринов, А.А. Колупаев // Омский научный вестник. Серия Ресурсы Земли. Человек. – № 1 (118). – 2013. – С. 208–213.
4. Кушнир И.Ю. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита организма у высокопродуктивных молочных коров в предродовой и послеродовой периоды: дис. ... канд биол. наук. – Воронеж, 2002. – 180 с.
5. Макаров А.В. Физико-химические свойства молока при эндометритах у коров / А.В. Макаров, Л.И. Тарарина // Молочная промышленность. – 2009. – № 3. – С. 78–79.

6. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Поротов // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.

7. Пасько Н.В. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов у коров с субинволюцией матки // Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных. Материалы международной научно-практической конференции. – Воронеж: Воронежский государственный университет. – 2004. – С. 127–130.

8. Пасько Н.В. Пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система и оксид азота при послеродовых нарушениях сократительной функции матки у коров: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. – Воронеж, 2009. – 144 с.

9. Пасько Н.В. Хемилюминесцентный анализ плазмы крови коров при субинволюции матки // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: материалы международной научно-практической конференции. – Курск, 2008. – С. 283–287.

10. Погорелова Н.А. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления молока коров, больных послеродовым эндометритом / Н.А. Погорелова, В.Е. Высокотгорский, Н.В. Стрельчик // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 4 (24) – С. 76–81.

11. Распутина О.В. Оксидативно-антиоксидантный статус у коров, больных послеродовым эндометритом и возможность его коррекции / О.В. Распутина, М.Н. Скомарова, Д.Д. Цырендоржиев // Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 60-летию ГНУ Краснодарского НИВИ. – Краснодар, 2006. – С. 366–368.

12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: Медиа Сфера, 2006. – 312 с.

13. Рецкий М.И. и др. Эколого-адаптационная стратегия защиты здоровья и продуктивности животных в современных условиях. – Воронеж, 2001. – С. 22–85.

14. Эндометриты у коров: Изменение технологических свойств молока / Л.И. Тарарина, А.В. Макаров, И.М. Саражакова, И.В. Боер // Молочная промышленность. – 2009. – № 4. – С. 76–77.

15. Levine R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver et al. // Methods Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 464–478.

tive dairy cows in prenatal and postnatal periods]. Voronezh, 2002, 180 p.

5. Makarov A.V., Tararina L.I., Molochnaya promyshlennost, 2009, no. 3, pp. 78–79.

6. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Hodov D.A., Porotov I.G., Voprosy. med. khimii, 1995, T. 41, no. 1, pp. 24–26.

7. Pasko N.V. Materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Svobodnye radikaly, antioksidanty i zdorove zhitovnykh». (Materials of the international scientific-practical conference «Free radicals, antioxidants and animal health»). Voronezh, 2004, pp. 127–130.

8. Pasko N.V. Peroksidnoe okislenie lipidov, antioksidantnaja sistema i oksid azota pri poslerodovykh narushenijah sokratitelnoj funkcii матки u korov [Lipid peroxidation, antioxidant system and nitrogen oxide with postpartum disorders contractility of the uterus in cows]. Voronezh, 2009, 144 p.

9. Pasko N.V., Materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Aktualnye problemy veterinarnoj mediciny» (Materials of the international scientifically-practical conference «Actual problems of veterinary medicine»). Kursk, 2008, pp. 283–287.

10. Pogorelova N.A., Vysokogorskiy V.E., Strelchik N.V. Vestnik Ulyanovskoy selskhozaystvennoy akademii, 2013, no. 4 (24), pp. 76–81.

11. Rasputina O.V., Materialy mezhdunar. nauch.-prakt. konf., posvyashhennoy 60-letiju GNU Krasnodarskogo NIVI «Aktualnye problemy veterinarii v sovremennykh usloviyah» (Materials of international scientific-practical conference devoted to 60-anniversary of the Krasnodar research veterinary Institute «Actual problems of veterinary medicine in modern conditions»). Krasnodar, 2006, pp. 366–368.

12. Rebrova O.Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh program STATISTICA [Statistical analysis of medical data. The application of a package of applied programs STATISTICA]. Moscow, MediaSfera, 2006. 312 p.

13. Reckij M.I. i dr. Jekologo-adaptacionnaja strategija zashhity zdorovja i produktivnosti zhitovnyh v sovremennykh usloviyah [Ecological adaptation strategy to protect the health and productivity of animals in modern conditions]. Voronezh, 2001, pp. 22–85.

14. Tararina L.I., Makarov A.V., Sarazhakova I.M., Boer I.V. Molochnaya promyshlennost, 2009, no. 4, pp. 76–77.

15. Levine R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver et al. // Methods Enzymol. 1990. Vol. 186. pp. 464–478.

References

1. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Voprosy med. khimii, 1989, no.1, pp. 127–131.

2. Vysokogorskiy V.E., Voronova T.D., Veselov P.V., Molochnaya promyshlennost, 2009, no.10, pp. 73–74.

3. Eranchinceva O.S., Gurinov B.V., Kolupaev A.A. Omskiy nauchny vestnik, 2013, no.1 (118), pp. 208–213.

4. Kushnir I. Ju. Perekisnoe okislenie lipidov i antioksidantnaja zashhita organizma u vysokoproduktivnyh molochnyh korov v predrodovoj i poslerodovoj periody [Lipid peroxidation and antioxidant protection of the organism in highly produc-

Рецензенты:

Конвай В.Д., д.м.н., профессор кафедры химии, ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», г. Омск;

Степанова И.П., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой химии, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Омск.

Работа поступила в редакцию 31.01.2014.