

УДК 577.115:577.151

С. С. Тарасов, А. С. Корягин

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ СУКОЛЬНЫХ И ЛАКТИРУЮЩИХ САМОК КРОЛИКА

Исследовали состояние перекисного окисления липидов по содержанию малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, и антиоксидантных ферментов: каталазы и супероксиддисмутазы в плазме крови сукольных, лактирующих и не сукольных самок кролика. Показано, что многие из исследуемых параметров имеют уникальную динамику в зависимости от стадии беременности или лактации. Приводится анализ полученных данных в связи с биологическими особенностями окислительного метаболизма животных и их адаптационными возможностями.

Ключевые слова: кролики; перекисное окисление липидов; антиоксидантная система; малоновый диальдегид; диеновые конъюгаты; супероксиддисмутаза; каталаза; беременность и лактация.

S. S. Tarasov, A. S. Koryagin

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

CONTENTS PRODUCTS OF LIPID PEROXIDANT AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN PLASMA PREGNANT AND LACTATING FEMALE RABBITS

The state of lipid peroxidation on the content of MDA and diene conjugates in blood plasma pregnant, lactating and pregnant rabbits. And the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase. It is shown that many of the studied parameters have unique dynamics, depending on the stage of pregnancy or lactation. The analysis of the data obtained in connection with the biological characteristics of the oxidative metabolism of animals and their ability to adapt.

Key words: rabbits; lipid peroxidation; antioxidant system; malondialdehyde; diene conjugates; superoxide dismutase; catalase; pregnancy and lactation.

Введение

В нормальных условиях процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) находятся на невысоком уровне, но при стрессовых ситуациях происходит некоторое усиление образования АФК, что в конечном итоге может привести к патологическому состоянию, которое сопровождается дисбалансом ферментативных и не ферментативных компонентов системы антиоксидантной защиты [Владимиров, 1998]. Физиологическая беременность и лактация как фактор изменения внутренней среды может сопровождаться существенными изменениями в про/антиоксидантном статусе [Гусак, Лазарева, Морозов, 2006].

Характерным проявлением окислительного стресса является интенсификация процессов ПОЛ, идентификатором которых служит увеличение содержания хотя бы одного продукта, образовавшегося

в результате окислительных процессов. Данные о содержании продуктов ПОЛ в биологических объектах могут нести в себе информацию о глубине и степени патологического процесса. В качестве количественных маркеров для ПОЛ являются диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид. Изменения антиоксидантной защиты наблюдали за счёт изменения реакции ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (СОД).

Период беременности у крольчих – 30–34 дня. Внутриутробное развитие плодов происходит очень быстро: через 10–12 ч. после оплодотворения яйцеклетки начинают делиться; на 4-й день бластулы имеют 0,3 мм в диаметре, на 8-й – прикрепляются к стенке матки, на 13-й – их можно прощупать через брюшную стенку, на 16-й – плоды начинают двигаться, к 30-му дню (моменту рождения) вес каждого крольчонка составляет от 40

до 90 г, в зависимости от их количества, породы кроликов и условий кормления матери. Самки рожают по 6–12, иногда по 16–19 крольчат в помете. [Harcourt-Brown, 2002].

Период лактации у крольчих, при содержании с ними крольчат, продолжается более двух месяцев. При этом количество выделяемого молока до 20-го дня увеличивается, а затем уменьшается, особенно резко после 30-го дня. Крольчиха во время лактации ежедневно дает от 50 до 270 г молока, чаще 100–200 г [Flecknell, 2002; Седов, 2009; Ульихина, 2009].

Отделение молока начинается незадолго до окрота. Примерно до 20-го дня молочность крольчих постепенно увеличивается, с 21-го до 25-го дня количество выделяемого молока остается неизменным, а затем постепенно снижается.

Иногда выделение молока у крольчих не прекращается и через 60 дней после окрота, что позволяет использовать их в качестве кормилиц других крольчат после отсадки своих.

Материалы и методы

Исследования проводили на вторично сукрольных кроликах породы «Советская шиншилла» в возрасте 10–12 месяцев. Животных содержали на экспериментальной ферме компании «ВитАс», кормили комбикормами-концентратами и сухим грубым кормом (сено), поили водой, еда и вода были у животных всегда, т.е. они потребляли пищи по потребности. В эксперименте было задействовано 9 самок, по три в каждой группе.

Забор крови проводили из ушной вены на 1, 3, 7, 14, 21-й день у беременных самок и в день окрота. В случае изучения лактации через 1, 3, 7, 14 и 21 день, а при изучении индуктивного влияния лактации и сукрольности на процессы ПОЛ через 1, 2, 3, 7, 14, 21 день и в день окрота.

Определение содержания диеновых конъюгатов в плазме крови проводили путём добавления к 0.2 мл плазмы 2 мл смеси изопропанол/гептан (1:1). Смесь встряхивали в течение 1-го ч., после чего добавляли 0.5 мл HCl (pH = 2) и ещё раз встряхивали 2 мин., затем добавляли 1 мл гептана и встряхивали ещё 15 мин., после истечения 1-го часа верхнюю фазу фотометрировали при 232 нм против контрольной пробы [Стальная, Гаришвили, 1977].

Определение содержания малонового диальдегида проводили методом, основанным на взаимодействии его с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в результате которого образуются хромогены с максимум поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм [Стальная, Гаришвили, 1977].

Активность СОД определяли по методике Е.Е. Дубиной, Л.А. Салтыковой, Л.Ф. Ефимовой

[1983]. Метод основан на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолом за супероксидные анион-радикалы, образующие в результате аэробного взаимодействия НАДН с феназинметасульфатом. В присутствии СОД процент восстановления HCl уменьшается [Дубинина, Сальникова, Ефимова, 1983].

Активность каталазы определяли по методу, основанному на способности данного фермента разлагать перекись водорода с образованием воды. Активность определяется по снижению количества пероксида в пробе, определяемого по уменьшению экстинкции пробы [Patterson et al., 1984].

Результаты и их обсуждение

Выявлено, что в первые 3 дня после спаривания увеличивается концентрация диеновых конъюгатов примерно на 40%, то же самое наблюдается и с малоновым диальдегидом. На 7-й день беременности наблюдается снижение концентрации ДК примерно на 25% и МДА – на 15%. Незначительное снижение зафиксировано и в последующие дни беременности (рис. 1). Это можно объяснить тем, что сразу же после зачатия происходит значительная перестройка жизнедеятельности организма беременных самок, которая сопряжена с изменениями в системах крови, гемостаза, эндокринной, иммунной системах и с изменением биохимического состояния организма в целом. «Не ожидая» подобных изменений, ткани и органы испытывают определенный стресс, в результате которого резко повышается количество свободных радикалов, атакующих, помимо прочего, клетки плаценты и эмбриона. Резкий спад, после 3-го дня беременности, концентрации продуктов ПОЛ, возможно, связан с короткими сроками беременности кроликов [Седов, 2009], а также с их быстрыми адаптационными процессами.

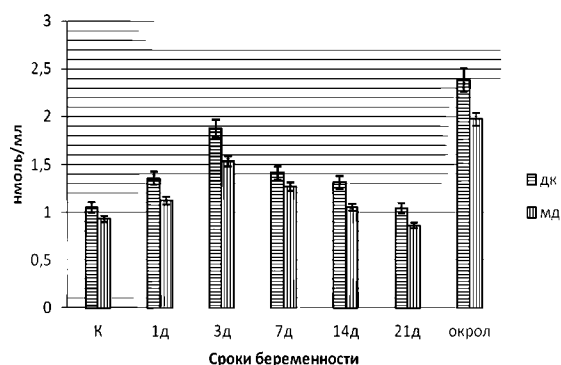


Рис. 1. Содержание продуктов ПОЛ в плазме крови самок кролика на разных стадиях беременности:

ДК – диеновые конъюгаты, МДА – малоновый диальдегид

В день окрола наблюдается резкое увеличение продуктов ПОЛ, почти на 100% по отношению к контролю. Данное явление можно также объяснить серьёзными биохимическими изменениями, возникшими в результате стрессового состояния, выбросом адреналина, кортизола и прогестерона в кровь животного [Савченко и др., 2006].

Анализируя концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови лактирующих самок, можно сказать, что в 1-й день лактации (день окрола) наблюдается резкое повышение уровня ПОЛ, но уже на 3-й день лактации заметно статистически значимое снижение диеновых конъюгатов, примерно на 40%, а малонового диальдегида примерно на 10% (рис. 2). К 7-му дню лактации наблюдается незначительное понижение продуктов ПОЛ, а на 14-й день их концентрация приближается к уровню контроля, таким образом, выходит на нормальный уровень. Это можно объяснить тем, что после стрессового состояния организм самок постепенно начинает приходить в норму, а также тем, что процессы лактогенеза сопровождаются повышенным выделением антиоксидантных ферментов (см. рис. 4).

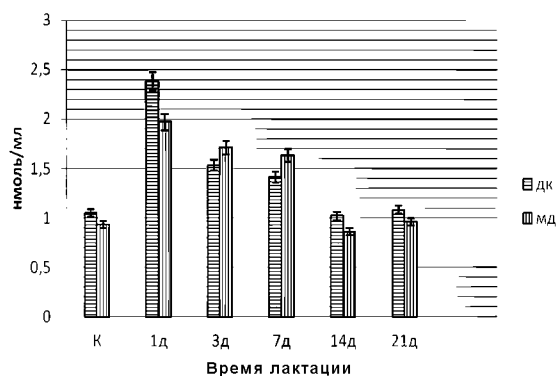


Рис. 2. Содержание продуктов ПОЛ в плазме крови кролика на разных стадиях лактации самки.

Обозначения см. рис. 1

Интересной особенностью кроликов является их способность одновременно вынашивать и выкармливать молодняк [Ульяхина, 2009]. Однозначно такое «мероприятие» является сильной нагрузкой на организм животного и может иметь биологический смысл лишь при благоприятных условиях существования. Соответственно при таком явлении меняются и процессы ПОЛ. Зафиксировано, что у животных при спаривании в день окрола концентрация продуктов ПОЛ высокая, как упоминалось выше; после трех дней сукрольности и лактации наблюдается ещё большее увеличение продуктов ПОЛ, однако увеличение незначительное, в районе 10%. Через неделю зафиксирован спад концентрации МДА и ДК примерно на 30% относительно предыдущего измерения. На 14-й день происходит резкое снижение концентрации

продуктов ПОЛ по отношению к 7-дневному измерению около 80% и становится даже ниже на 10% относительно контроля ($P \leq 0.05$). В последующие измерения статистически значимых изменений не наблюдалось ($P \geq 0.05$), а концентрация МДА и ДК в день окрола оставалась на уровне контроля (рис. 3). Данное состояние процессов ПОЛ можно объяснить тем, что в первые дни организм животного испытывает огромные нагрузки и не способен на защиту от атаки свободных радикалов, однако такое состояние приводит к «боевой» готовности организм самок и при благоприятных условиях вырабатывает большое количество веществ, подавляющих процессы ПОЛ, что в итоге приводит к «лёгкому» окролу.

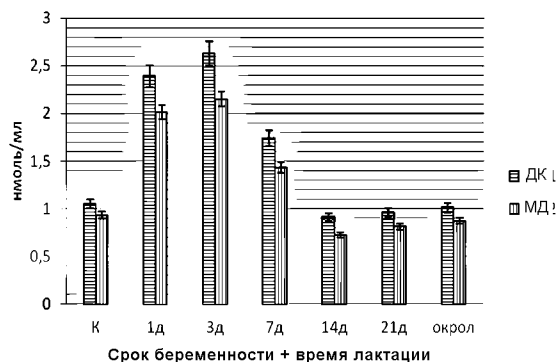


Рис. 3. Содержание продуктов ПОЛ в плазме крови кролика на разных стадиях беременных и одновременно лактирующих самок

Обозначения см. рис. 1

Для более полной картины влияния беременности и лактации на процессы ПОЛ исследовали содержание антиоксидантных ферментов в плазме крови. У беременных самок наблюдается в первую неделю существенный рост СОД (рис. 4) по отношению к контролю более чем в 2 раза ($P \leq 0.05$). На 14-е сутки зафиксировано падение концентрации фермента на 20% по отношению к предыдущему измерению, на 21-е сутки и в день окрола концентрация СОД становится равной концентрации контрольных проб. Каталаза в крови обнаружена в небольших количествах [Stocker, Frei, 1991], максимальные значения зафиксированы на уровнях 7 и 14 дней беременности. Рост ферментативной активности, возможно, объясняется тем, что в первые дни беременности организм испытывает повышенный стресс и в его условиях увеличивается количество свободно-радикальных соединений, которые необходимо утилизировать антиоксидантами.

У лактирующих самок наблюдается увеличение активности СОД с 1-го по 14-й день, на 21-й день зафиксирован спад активности СОД на 25% по отношению к предыдущему измерению (рис. 5), однако он оставался выше контроля на 30% ($P \leq 0.05$).

Скорость активности каталазы статистически значимо не изменялась. Рост СОД в первые 14 дней лактации можно объяснить тем, что во время беременности происходит повышение процессов ПОЛ (см. рис. 1), а, следовательно, для нормализации необходимы вещества, препятствующие образованию свободных радикалов, каким и является СОД.

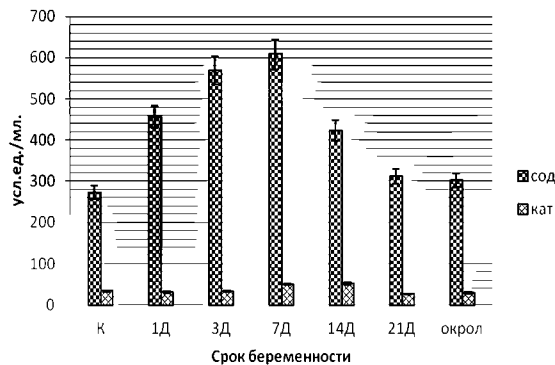


Рис. 4. Активность антиоксидантных ферментов в плазме крови на разных стадиях беременности самки кролика: СОД – супероксиддисмутаза, кат – каталаза

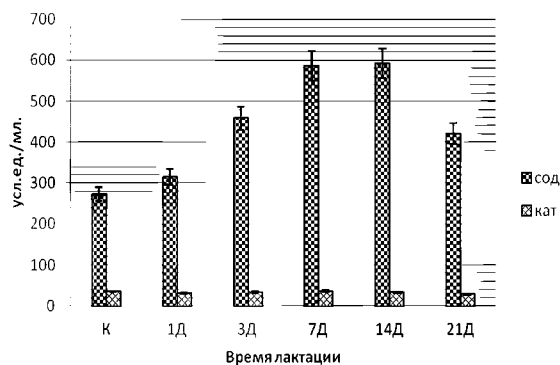


Рис. 5. Активность антиоксидантных ферментов в плазме крови на разных стадиях у лактирующих самок кролика. Обозначения см. рис. 4

Животные, которые одновременно вынашивали и выкармливали крольчат, имеют схожую картину активности СОД с просто лактирующими самками (рис. 6). Но отличаются более резким ростом концентрации СОД в первые 7 дней почти на 150% по отношению к контролю, а также резким падением на 14-й день по отношению к предыдущему измерению с последующим снижением на 30% к 14-му дню и к моменту окрола. Стоит отметить, что в данной группе животных наблюдается рост каталазы на 7-, 14- и 21-й день примерно на 35% по отношению как к контролю, так и ко всем остальным измерениям; данный процесс, возможно, связан с тем, что повышенное содержание свободных радикалов вызвало гиперэкспрессию генов катала-

зы, которая привела к повышению её концентрации и как следствие её активности.

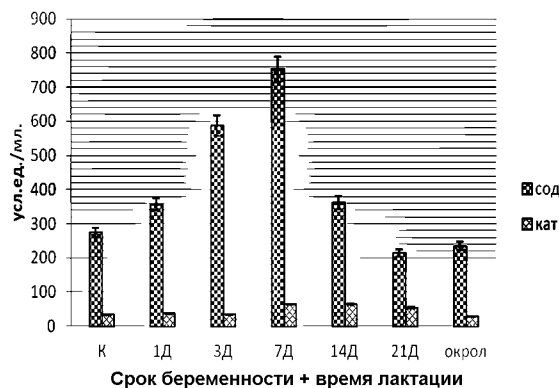


Рис. 6. Активность антиоксидантных ферментов в плазме крови на разных стадиях у беременных и одновременно лактирующих самок кролика.

Обозначения см. рис. 4

Выводы

1. Содержание продуктов перекисного окисления липидов у беременных самок увеличивается в течение первых трех дней беременности, с последующим понижением и резко возрастает в день окрола.
2. Активность супероксиддисмутазы у беременных самок увеличивается в первые 7 дней с последующим уменьшением, изменение активности каталазы незначительно.
3. Уровень продуктов перекисного окисления липидов у лактирующих самок снижается с момента окрола на протяжении всего исследуемого периода лактации, концентрация супероксиддисмутазы увеличивается в первые 7 дней с последующим понижением, каталаза изменений не показала.
4. У животных, одновременно беременных и лактирующих, зафиксировано резкое увеличение как малонового диальдегида, так и диеновых конъюгатов в первые 3 дня, с последующим снижением, в период окрола концентрация этих веществ не превышала контроль.
5. Активность супероксиддисмутазы у беременных и лактирующих самок резко увеличивалась в первые 3 дня, с последующим резким падением, более 100% на 14-й день и падением на 30% к 14-му дню и дню окрола, также зафиксирована активность каталазы на 7-, 14- и 21-й день.

Библиографический список

- Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. 1998. № 7. С. 43–51.

- Гусак Ю.К., Лазарева Ю.В., Морозов В.Н. Психонейроиммунологические особенности адаптивных механизмов нормального репродуктивного цикла у женщин [Электронный ресурс]. 2006. URL: <http://www.mednet.com>.
- Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Клиническая лабораторная диагностика. 1983. № 10. С. 30–33.
- Савченко А.А. и др. Система мать-плацента-плод. Вопросы функциональной диагностики. Красноярск, 2006. 129 с.
- Седов Ю.Д. Кролики: разведение, содержание, уход. Ростов н/Д: Феникс, 2009. 172 с.
- Стальная И.Д., Гаршвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.
- Ульяхина Л. И. Справочник кролиководов от А до Я. М.: Аквариум-Принт, 2009. 256 с.
- Flecknell P.A. Guinea pigs // BSAVA Manual of Exotic Pets / Meredith A., Redrobe S., eds.; British Small Animal Medical Association. 4th ed. Quedgeley, 2002. С. 52–64.
- Harcourt-Brown F. Textbook of Rabbit Medicine. Oxford: Butterworth Heinemann, 2002.
- Patterson B.D. et al. An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plants // Plant Physiology, 1984. Vol. 76, № 4. P. 1014–1018.
- Stocker R., Frei B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma // Oxidative stress: oxidants and antioxidants / H. Sies, ed. London: Academic Press, 1991. P. 213–243.
- mechanisms of normal reproductive cycle in women]. 2006. (In Russ.). Available at: <http://www.mednet.com>
- Dubinina E.E., Salnikova L.A., Efimova L.F. [Activity and isoenzyme spectrum of superoxide dismutase of erythrocytes and human blood plasma]. *Kliničeskaja laboratornaja diagnostika*. 1983, N 10, pp. 30-33. (In Russ.).
- Savchenko A.A. et al. *Sistema mat'-placenta-plod. Voprosy funkcional'noj diagnostiki* [The system mother-placenta-fetus. Questions of functional diagnostics]. Krasnoyarsk, Krasnoyarsk State University Press, 2006. 129 p. (In Russ.).
- Sedov Y.D. *Kroliki: razvedenie, sodержanie, uchod* [Rabbits: breeding, keeping, care]. Rostov-on-Don, Feniks Publ., 2009. 172 p. (In Russ.).
- Stal'naja I.D., Garishvili T.G. [Method for determination of malondialdehyde]. *Sovremennye metody v biochimii* [Modern methods in biochemistry]. Moscow, Medicina Publ., 1977, pp. 66-68. (In Russ.).
- Ul'ichina L.I. *Spravočnik krolikovoda ot A do JA* [Handbook breeder from A to Z]. Moscow, Akvarium-Print Publ., 2009. 256 p. (In Russ.).
- Flecknell P.A. Guinea pigs. In: Meredith A, Redrobe S, eds. BSAVA Manual of Exotic Pets 4th ed. Quedgeley, UK: British Small Animal Medical Association; 2002, pp. 52-64.
- Harcourt-Brown F. Textbook of Rabbit Medicine. Oxford, UK: Butterworth Heinemann; 2002.
- Patterson B.D., Paune L.A., Chen Yi-Zhu, Graham P. An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plants. *Plant Physiology*, 1984, V 76, N 4, pp. 1014-1018.
- Stocker R., Frei B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Sies H. ed. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London, Academic Press, 1991, pp. 213-243.

References

- Vladimirov Y.A. [Free radicals and antioxidants]. *Vestnik RAMS*, 1998, N 7, pp. 43-51. (In Russ.).
- Gusak Ju.K., Lazarva Ju.V., Morozov V.N. [Psychoneuroimmunological features of the adaptive

Поступила в редакцию 09.06.2016

Об авторах

Тарасов Сергей Сергеевич, аспирант кафедры биохимии и физиологии
ФГАОУВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
603022, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23;
tarasov_ss@mail.ru; +79040426164

Корягин Александр Сергеевич, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии
ФГАОУВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
603022, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

About the authors

Tarasov Sergey Sergeevich, postgraduate of the Department of biochemistry and physiology
National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. 23, Prosp. Gagarina, Nizhny Novgorod, Russia, 603022; tarasov_ss@mail.ru; +79040426164

Koryagin Alexandr Sergeevich, doktor of biology, professor of the Department of biochemistry and physiology
National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. 23, Prosp. Gagarina, Nizhny Novgorod, Russia, 603022