

**ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ
И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ
У ЗДОРОВЫХ СУК РАЗНОГО ВОЗРАСТА***Кузьмич Р.Г., доктор ветеринарных наук, профессор**Мирончик С.В., ассистент**УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", г. Витебск, Беларусь***ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время в ветеринарии актуальным является изучение процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), как составной части свободнорадикального окисления (СРО). Данные процессы играют важную роль в жизнедеятельности клеток и при их низкой интенсивности относятся к нормальным метаболическим процессам. Физиологической функцией перекисного окисления липидов является обновление фосфолипидного состава мембран, индукция биоэнергетических процессов, активация ряда ферментов, регулирующих переключение метаболических путей клетки [1]. Однако при повышении концентрации свободных радикалов клетки организма теряют способность к делению и выполнению своих биологических функций. Свободные радикалы образуются при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как загрязненная атмосфера, табачный дым, радиация, химические соединения, попадающие в организм с пищей, и многих других, еще не изученных. Образовавшиеся радикалы являются очень нестабильными частицами с нечетным числом электронов на внешней орбите, содержат активированный кислород, вступают в реакцию с липидами мембраны клетки (перекисное окисление липидов), в результате которой происходит ее разрушение, нарушается проницаемость, освобождается избыточная энергия, а все это, в свою очередь, ведет к разрушению всей клетки. Негативное действие свободных радикалов проявляется в ускорении старения организма, провоцировании воспалительных процессов в тканях, неправильном функционировании различных систем организма, что приводит к развитию патологических состояний.

Наиболее известными свободными радикалами считаются производные кислорода. Общеизвестно, что существование любого живого организма без доступа кислорода невозможно. Однако надо учитывать, что в организме из этого элемента образуются активные формы кислорода (АФК), избыточная продукция которых вызывает усиленное окислительное повреждение биомембран молекул, что приводит к развитию дисфункции клеток и тканей организма, то есть окислительному стрессу. В результате многочисленных цепных реакций образуется широкий спектр продуктов. На начальном этапе образуются гидроперекиси, диеновые и триеновые конъюгаты, эндперекиси. Промежуточными или вторичными соединениями являются альдегиды и кетоны. Конечными продуктами – низкомолекулярные легколетучие углеводороды (этан, пентан) и флуо-

ресцирующие продукты – основания Шиффа [2]. Иначе говоря, происходит активизация реакций перекисного окисления липидов. А как доказано многими учеными, окислительное повреждение тканей играет ключевую роль в развитии большинства заболеваний [1, 7, 10, 11].

Поддержание процессов перекисного окисления на определенном стационарном низком уровне достигается за счет постоянного функционирования различных звеньев антиоксидантной системы защиты организма, которая представлена ферментативными и неферментативными веществами. Основными антиоксидантными ферментами крови являются супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и церуплазмин. К неферментативным веществам относятся: жирорастворимые витамины А, Е, β -каротин, убихиноны, стероидные гормоны и водорастворимые – глутатион, аскорбиновая кислота, мочева кислота, мочевины, билирубин и многие другие соединения, проявляющие свое протекторное действие как на мембране, так и в плазме крови. Совокупность механизмов клеток, тканей, органов и систем, направленных на сохранение и поддержание в пределах нормы окислительных реакций организма, получила название физиологической антиоксидантной системы.

В научных трудах ветеринарной медицины накоплено незначительное количество материала по изучению взаимосвязи функциональной активности антиоксидантной системы с интенсивностью свободно-радикального окисления в организме животных, как при физиологической норме, так и при различных заболеваниях [4, 8, 9]. Изучению данной проблемы у собак посвящены единичные исследования [3, 5]. Немаловажно и то, что в большинстве экспериментов предпочтение отдают исследованию одного–двух показателей, что вряд ли может достоверно отразить происходящие в организме реакции взаимодействия процессов перекисного окисления и антиоксидантной системы.

Этим вопросам и посвящены наши исследования.

Целью эксперимента явилось изучение физиологических показателей основных первичных и вторичных продуктов перекисного окисления (определение концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида) и ферментов антиоксидантной системы организма (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, суммарной антиоксидантной активности) клинически здоровых суек разного возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-исследовательская работа проводилась на базе питомника областного управления департамента охраны г. Витебска Министерства внутренних дел Республики Беларусь и Кинологического центра пограничных войск Республики Беларусь.

Для эксперимента были отобраны 32 суки породы немецкая овчарка. Подопытных животных регистрировали индивидуально, по каждому собирался анамнез. Все суки подвергались общему клиническому исследованию и исследованию отдельных систем организма. При необ-

ходимости проводилось ультразвуковое исследование органов брюшной полости на стационарном сканере Digi Prince 3300 Vet.

Собаки, в зависимости от возраста, были разделены на четыре группы: 1 группа – 0-3 летние; 2 группа – 3-6 летние; 3 группа – 6-9 летние; 4 группа – 9-12 летние. Животных подбирали по принципу парных аналогов, по 8 голов в каждую группу.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы защиты организма определяли по полученным результатам исследования плазмы и эритроцитарной массы крови подопытных животных. Для чего производили забор проб крови у сук объемом 10 мл утром натощак из подкожной латеральной вены предплечья в сухие чистые пробирки. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (50ЕД на 10 мл крови). Получение плазмы проводили путем центрифугирования стабилизированной крови при 1600 об/мин в течение 20 минут. Эритроцитарную массу получали двойным отмыванием в физиологическом растворе и центрифугированием при 1600 об/мин в течение 15 мин.

Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по уровню диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови подопытных животных. Активность ферментативной антиоксидантной защиты организма определяли по таким показателям, как суммарная антиоксидантная активность, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза.

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов и ферментативную антиоксидантную защиту определяли в плазме крови и эритроцитарной массе модифицированными для животных методами [6].

Диеновые конъюгаты (ДК) полиненасыщенных жирных кислот в плазме крови определяли экстрагированием сопряженных диеновых структур гептанизопропиловой смесью, имеющих максимум поглощения 232-234нм.

Определение малонового диальдегида (МДА) основано на реакции МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой в кислой среде с образованием триметилового комплекса, имеющего максимум поглощения при 532-535нм.

Ферментативная антиоксидантная защита оценивалась по каталазной активности сыворотки крови методом, в основе которого лежит способность перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410нм.

Суммарная антиоксидантная активность (АОА) крови определялась по накоплению малонового диальдегида в тест системе с яичным лецитином путем активации свободнорадикального окисления двухвалентного железа.

Метод определения супероксиддисмутазы (СОД) основан на торможении СОД восстановления бесцветных тетразолневых солей су-

пероксидными анионрадикалами, при котором происходит их превращение в окрашенные соединения.

Активность глутатионредуктазы (ГР) в эритроцитарной массе определяли на основании измерения скорости уменьшения оптической плотности при длине волны 340 нм, обусловленной окислением НАДФН⁺(Н), глутатионпероксидазы (ГР) - по убыли глутатиона, восстановленного в инкубационной среде, которая определяется с помощью реактива Элмана специфическим взаимодействием с SH группами.

Данные, полученные в ходе исследований, подвергали статистической обработке. Уровень достоверности определяли по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При регистрации и сборе анамнеза было выяснено, что все подопытные животные содержатся в одинаковых условиях: в специальных клетках на свежем воздухе, моцион активный, кормление трехкратное, рацион: крупа овсяная, пшено – 600г, мясо второй категории – 400г, конина или мясные субпродукты второй категории – 1000г, жиры животные – 13г, картофель и овощи – 300г, соль – 13г на голову в сутки. Животным проведены плановые вакцинации, витаминизации и дегельментизации. Для проведения научного эксперимента отбирались суки разного возраста, не стерилизованные, с регулярными половыми циклами, не болевшие инфекционными заболеваниями.

Проведя общее клиническое исследование и исследование отдельных систем подопытных животных, было установлено, что отобранные суки клинически здоровы.

В результате проведенных лабораторных исследований крови было определено, что содержание продуктов перекисного окисления липидов у здоровых подопытных сук разных возрастных категорий находилось в пределах следующих физиологических колебаний: диеновые конъюгаты жирных кислот 0, 39 – 0,95 мкМ/л, малоновый диальдегид 2,22 – 6,24 мкМ/л.

Анализируя полученные в ходе опыта показатели перекисного окисления липидов, можно сделать заключение о том, что с возрастом у беременные животные наблюдается существенное повышение накопления первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов. Концентрация диеновых конъюгатов жирных кислот в крови собак к 6 годам увеличивается на 31,34% ($P \geq 0,99$), к 9 годам – на 48,7% ($P \geq 0,999$), к 12 годам – на 76,5% ($P \geq 0,999$). Показатель малонового диальдегида повышается к 6 годам на 1,72%, к 9 годам – на 6,13%, к 12 годам – на 26,59% ($P \geq 0,99$).

Показатели, характеризующие активность ферментативной антиоксидантной защиты организма подопытных сук разного возраста находились в пределах следующих физиологических колебаний: суммар-

НЕЗАРАЗНЫЕ БОЛЕЗНИ

ная антиоксидантная активность 31,58 – 65,55 %, супероксиддисмутаза 0,95–2,17 УЕ/(мин*гНб*), каталаза 3,42 – 7,09 ммоль/(л*мин*гНб*мин), глутатионредуктаза 1,36 – 2,26 мкМ/(гНб*мин), глутатионпероксидаза 5,54 – 11,39 мкМ/(гНб*мин). Анализируя полученные в ходе эксперимента данные, также было определено то, что активность антиоксидантных ферментов организма клинически здоровых собак увеличивается лишь до 6-9 летнего возраста, а затем наблюдается резкий спад их концентрации в крови.

Концентрация супероксиддисмутазы, которая ускоряет реакцию дисмутации супероксидных радикалов, образующихся в ходе биологического окисления и обеспечивает превращение супероксидного анионрадикала в менее активный окислитель – перекись водорода, у сук 1 и 2 группы (0-6 летнего возраста) остается на одном уровне, к 9 годам повышается на 24,72% ($P \geq 0,95$), а к 12 годам резко снижается на 29,64% ($P \geq 0,99$) относительно показателя 9 летних животных.

Важно отметить, что супероксиддисмутаза находится в тесных корреляционных связях с каталазой. Повышающаяся активность фермента приводит к интенсивному образованию перекиси водорода, токсическое воздействие которого не проявляется, пока в организме активно функционируют каталаза и глутатионпероксидаза. Анализируя же полученные в ходе исследований результаты, можно отметить, что у подопытных животных наблюдалось повышение активности супероксиддисмутазы в 1, 2 и 3 группе (до 9 летнего возраста), а каталазы лишь в 1 и 2 группе (до 6 лет). То есть каталаза, которая эффективно разлагает перекись водорода до двух молекул воды и молекулы кислорода, прекращает полноценно выполнять свою функцию. Супероксиддисмутаза же продолжает активно образовывать перекись водорода, участвуя в инициации перекисного окисления липидов.

Глутатионпероксидаза также способна эффективно разлагать гидроперекиси липидов и перекись водорода. Однако глутатионпероксидаза более эффективно работает при низких концентрациях перекиси, а каталаза защищает клетки от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями перекиси водорода. В данном случае концентрация глутатионпероксидазы повышалась до 9 летнего возраста всего на 12,2%, а каталазы до 6 летнего – на 14,25%. Это говорит о том, что количество перекиси в молодом организме животных велико и, поэтому, основную работу выполняет каталаза. С возрастом у собак к 9-12 годам уровень каталазы снижается на 19,8%, по отношению к показателям 0-3 летних сук, а глутатионпероксидазы на 20,96% ($P \geq 0,95$). Это свидетельствует об истощении активности антиоксидантных ферментов.

Глутатионредуктаза необходима живому организму для восстановления глутатиона из окисленной формы. Наличие внутриклеточного восстановленного глутатиона предохраняет многие компоненты тканей

организма от разрушения окислителями. Взаимодействуя с активными формами кислорода, он прямо взаимодействует с супероксиданионом и гидроксилрадикалом, либо с участием глутатионпероксидазы разлагает перекись водорода. Также самым главным является то, что восстановленный глутатион – это основной агент, защищающий тиоловые ферменты, которые принимают непосредственное участие в механизме функционирования ферментативного звена антиоксидантной системы от окисления. При анализе полученных нами результатов было определено, что концентрация глутатионредуктазы до 6 летнего возраста повышается на 15,6%, а к 12 годам снижается на 10,16%.

Что касается суммарной антиоксидантной активности, то концентрация ее, также как и всех рассмотренных выше ферментов, повышается лишь до 6 летнего возраста на 17,97%, а к 12 годам снижается на 20,95% ($P \geq 0,95$).

ВЫВОДЫ

С возрастом у клинически здоровых собак наблюдается избыточная активация процессов перекисного окисления липидов и соответствующее увеличение концентрации ферментов антиоксидантной системы, которые обеспечивают равновесие между интенсивностью транспорта кислорода к клеткам и метаболическими процессами по его утилизации. Однако у 6-12 летних животных наблюдается истощение биохимической антиоксидантной системы, а свободнорадикальные процессы продолжают нарастать и организм остается незащищенным.

Учитывая то, что дисбаланс в равновесии между антиоксидантной системой и процессами перекисного окисления липидов вызывает лавинообразную реакцию переокисления, приводящую к гибели клеток, можно с уверенностью говорить о том, что существует необходимость применения собакам старше 6 летнего возраста системной антиоксидантной терапии, с целью предупреждения развития «окислительного стресса организма» и развития на его фоне хронических заболеваний.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абрамченко, В.В. Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве. (Оксидативный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами) / В.В. Абрамченко. – Санкт-Петербург: Издательство ДЕАН, 2001. – 400с.
2. Владимиров, Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран / Ю.А. Владимиров // Биофизика. – 1987. – 5(32). – С. 830–844.
3. Карпенко, Л.Ю. Возрастные и половые особенности состояния антиоксидантной системы организма здоровых собак / Л.Ю. Карпенко, Ю.В. Конопатов, А.А. Вахта // Международный вестник ветеринарии. – Санкт-Петербург. – 2007. – №3. – С.52–56.

4. Карпенко, Л.Ю. Состояние антиоксидантной системы при нефропатиях / Л.Ю. Карпенко, А.А. Вахта // Материалы 14-го международного московского конгресса по болезням мелких домашних животных, Москва, 22–24 апреля 2006г. – Москва, 2006. – С.36.
5. Кашов, В.Н. Влияние антиоксидантов на формирование иммунитета при вакцинации собак против хламидиоза / В.Н. Кашов, Р.Х. Равилов // Материалы 14-го международного московского конгресса по болезням мелких домашних животных, Москва, 22–24 апреля 2006г. – Москва, 2006. – С.1362.
6. Кузьмич, Р.Г. Перекисное окисление липидов и система антиоксидантной защиты организма животных: учеб.–метод. пособие / Р.Г. Кузьмич, Д.И. Бобрик, А.В. Саватеев; Учебно-методический центр Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь. – Минск, 2004. – 56с.
7. Шанин, Ю.Н. Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведения) / Ю.Н. Шанин, В.Ю. Шанин, Е.В. Зиновьев. – Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб, 2003. – 128с.
8. Шатилов, А.В. Роль антиоксидантов в организме в норме и при патологии / А.В. Шатилов, О.Г. Богданова, А.В. Коробов // Ветеринарная патология. – 2007. – №2(21). – С.207–211.
9. Шестакова, А.Н. Перекисное окисление липидов у спортивных лошадей в норме и при кардиопатиях / А.Н. Шестакова, С.Н. Копылов, О.В. Карпова // Болезни лошадей: диагностика, профилактика, лечение: материалы 6-ой науч.-практ. конф., Москва, 23–24 августа 2005г. – Москва, 2005. – С.72–74.
10. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – Oxford: Clarendon Press, 1999. – p.238.
11. Scandalios, J.G. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. – Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory, 1997. – p.126.