

**ПОКАЗАТЕЛИ ПРООКСИДАНТНОГО
И АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ОВЕЦ НА ФОНЕ
ПРИМЕНЕНИЯ ЦИНКСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ**

Ковалёнок Ю.К., кандидат ветеринарных наук, доцент

Курдеко А.П., доктор ветеринарных наук профессор

Котович И.В., кандидат биологических наук, доцент

Мацинович А.А., кандидат ветеринарных наук, доцент

Голубь А.А., аспирант

Николаенко С.А., магистрант

Шмуракова Е.И., студентка

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы установлено, что в основе патогенеза многих заболеваний лежит активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), протекающих по свободнорадикальному механизму. ПОЛ в норме в здоровом организме протекает на низком уровне и направлено на обновление мембранных структур клетки. Однако при длительных воздействиях на организм различных факторов, инициирующих процессы липопероксидации, ПОЛ нарушается и становится одним из ведущих звеньев в развитии различных патологий [10].

В организме человека и животных имеются соединения, которые могут инициировать и ингибировать процессы ПОЛ. Так, в частности, микроэлементы с переменной валентностью (железо, медь) могут выступать как в роли прооксидантов, так и в качестве антиоксидантов [7]. Общеизвестно также, что почвы Республики Беларусь являются дефицитными по ряду минеральных веществ, что в свою очередь приводит к широкому развитию многих болезней. В силу вышеизложенного, научно и производственно актуальными остаются вопросы поиска новых, высокоэффективных минеральных препаратов. В этой связи одним из направлений исследования новых, разработанных в нашей республике биометаллов, является их влияние на интенсивность течения ПОЛ и АОС.

В качестве исследуемого образца мы определили ветеринарный препарат, созданный белорусскими учёными «Цинковет».

Наш выбор пал на источник цинка для животных в связи с тем, что в отношении данного элемента в литературных источниках имеются противоречивые данные – большинство исследователей акцентирует внимание на его антиоксидантной функции [5, 6]. В тоже время цинк рассматривается и как прооксидант [3].

Целью нашей работы было изучение показателей пероксидного окисления липидов и антиоксидантной системы плазмы крови овец на фоне применения различных цинксодержащих соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на 3-х группах клинически здоровых овец романовской породы 3-4-х летнего возраста, подобранных по принципу условных аналогов. Опыт проводился в условиях клиники кафедры внутренних незаразных болезней УО ВГАВМ.

Овцы 1-й группы помимо основного рациона (ОР) один раз в сутки на протяжении 14 дней получали испытуемый препарат «Цинковет», представляющий собой хелатное соединение цинка с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА-Zn), животным 2-й (базовой) группы скармливали сульфат цинка ($ZnSO_4$), 3-я группа являлась контролем. Препараты задавались согласно существующим инструкциям по их применению.

Клиническое исследование проводили по общепринятой схеме. Для этого, после регистрации животного, определяли габитус, состояние кожи, шерстного покрова, слизистых оболочек, лимфатических узлов и измеряли температуру тела, частоту пульса и дыхания, состояние систем организма.

Получение крови осуществляли с соблюдением правил асептики и антисептики утром до кормления из яремной вены в две стерильные пробирки. Для получения плазмы использовали 10 % раствор ЭДТА- Na_2 . Кровь у овец всех трех групп исследовали дважды: до начала и после окончания скармливания цинксодержащих препаратов.

Биохимический анализ крови проводили в ЦНИЛ (аттестат аккредитации № ВУ/11202.1.0.087) и в лаборатории кафедры химии УО ВГАВМ.

В плазме крови определяли показатели прооксидантной системы - содержание диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (КД), триенкетонов (ТК), ТБК-активных продуктов (ТБК-АП), оснований Шиффа (ОШ), железа, меди и антиоксидантной системы - активность церулоплазмينا (ЦП), содержание токоферола (ТФ) и аскорбиновой кислоты (АК).

Продукты липопероксидации в плазме крови экстрагировали гептан-изопропанольной смесью (2:1) [2]. Оптическую плотность гептанового экстракта регистрировали на спектрофотометре СФ-46 в кварцевых кюветках толщиной 1 см. Измеренная при 232 нм оптическая плотность (A_{232}) соответствует содержанию первичных продуктов, имеющих сопряженную систему двойных связей (диеновые конъюгаты), а при 278 нм (A_{278}) – уровню вторичных продуктов ПОЛ (кетодиены и сопряженные триенкетоны). Значения абсорбции при 400 нм (A_{400}) характеризует содержание конечных продуктов ПОЛ, т.е. оснований Шиффа [9].

Содержание ТБК-АП, которые также характеризуют уровень вторичных продуктов ПОЛ, определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Оптическую плотность бутанольного экстракта измеряли при 535 (специфическое) и 580 нм (неспецифическое поглощение) [1].

НЕЗАРАЗНЫЕ БОЛЕЗНИ

Содержание ДК, КД, ТК и ОШ в плазме крови выражали в условных единицах оптической плотности в расчете на мл плазмы крови, а концентрацию ТБК-АП – в мкмоль/л.

Уровень железа в плазме крови определяли спектрофотометрически с использованием наборов «Rendox» (Великобритания) на спектрофотометре СФ-200, а меди и цинка – атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре МГА-915.

Показатели АОС определяли фотометрическим методом: активность ЦП (КФ 1.16.3.1) по реакции окисления парафенилендиамина, а содержание АК и ТФ - по реакции с а,α-дипиридиллом [8].

Для более полной характеристики соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем организма овец было рассчитано соотношение ТБК-АП/ТФ.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием программы «Microsoft Excel». Достоверность динамики показателей ПОЛ и АОС после применения препаратов цинка по отношению к началу опыта рассчитана с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изменение показателей, характеризующих состояние прооксидантной системы плазмы крови у овец в течение эксперимента, отражено в таблице 1.

Таблица 1 - Показатели прооксидантного статуса плазмы крови у овец при применении цинксодержащих препаратов

Показатели	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	в начале опыта	в конце опыта	в начале опыта	в конце опыта	в начале опыта	в конце опыта
ДК (A_{232} /мл)	1,330± 0,248	1,955± 0,087	1,190± 0,045	1,555± 0,138*	1,450± 0,156	1,600± 0,034
КД+ТК (A_{278} /мл)	0,320± 0,050	0,451± 0,026	0,265± 0,037	0,365± 0,010*	0,285± 0,030	0,345± 0,010
ОШ (A_{400} /мл)	0,300± 0,071	0,250± 0,017	0,215± 0,026	0,170± 0,019	0,255± 0,015	0,205± 0,013*
ТБК-АП, мкмоль/л	1,33± 0,07	1,96± 0,04***	1,41± 0,06	1,75± 0,08**	1,46± 0,07	1,38± 0,08
Железо, мкмоль/л	32,98± 2,32	29,19± 2,48	26,54± 0,92	24,47± 1,89	31,45± 2,72	35,29± 2,13
Медь, мкмоль/л	13,83± 0,72	18,75± 1,94	12,26± 1,45	19,97± 2,50*	14,27± 0,92	17,51± 2,20

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ к началу опыта в соответствующей группе

Уровень диеновых конъюгатов, являющихся первичными продуктами липопероксидации, является чувствительным тестом на обнаружение в биологических объектах ацилгидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот [9]. В наших исследованиях установлено, что содержание ДК в плазме крови в течение эксперимента повышалось во всех

группах. Однако, если в контроле увеличение ДК было незначительным (10,34 %), то при использовании сульфата цинка оно оказалось достоверным, составив 30,67 %, а при применении этилендиаминтетраацетата цинка - 46,99 %.

Содержание вторичных продуктов ПОЛ – кетодиенов и триенкетонов имело аналогичную тенденцию. В контрольной группе овец увеличение данных показателей составило 21,05 %. Скармливание $ZnSO_4$ повысило уровень КД и ТК на 37,74 %, а использование ЭДТА-Zn – на 40,94 %.

Интенсивность образования вторичных продуктов ПОЛ оценивают также по образованию более устойчивых ТБК-активных продуктов, главным из которых является малоновый диальдегид. У овец, получавших сульфат цинка, отмечалось достоверное повышение содержания ТБК-АП в плазме крови на 24,11 %. Более значительным выглядело увеличение этого показателя у овец 1-й группы (ОР+ЭДТА-Zn) – 47,37 %. У животных контрольной группы было зарегистрировано незначительное снижение уровня ТБК-АП в плазме крови (на 5,48 %).

Основания Шиффа являются конечными продуктами ПОЛ. Они обладают высокой реакционной способностью и токсичностью. Повышение их уровня в организме указывает на изменения в структуре клеточных мембран, связанные с образованием полимерных сшивок белковых молекул, а также с нарушением функционирования ферментов и других биомолекул [8].

Содержание ОШ в наших исследованиях у овец всех исследованных групп снижалось: после скармливания этилендиаминтетраацетата цинка - на 20 %, после использования сульфата цинка – на 26,47%. В контрольной группе животных концентрация ОШ понизилась на 19,61%. Необходимо отметить, что на фоне увеличения уровня первичных (ДК) и вторичных (КД+ТК и ТБК-АП) продуктов ПОЛ снижение содержания ОШ, особенно в опытных группах овец, следует рассматривать как отсутствие деструктивных изменений со стороны клеточных мембран на фоне применения цинксодержащих препаратов.

Известно, что железо и медь необходимы для процессов жизнедеятельности (кровотворение, окислительное фосфорилирование, активаторы ряда ферментов и др.). В тоже время, ионы Fe^{2+} и Cu^{+} могут инициировать процессы ПОЛ. Поэтому мы проследили динамику изменения данных микроэлементов в плазме крови овец на фоне применения препаратов цинка. Концентрация железа в плазме крови животных опытных групп снижалась, но не достоверно (в 1-й группе овец – на 10,49 %, а во 2-й – на 7,80 %). Уровень железа у контрольной группы несколько повысился к концу эксперимента (на 12,21 %). При этом содержание гемоглобина в цельной крови животных всех исследованных групп не подвергалось значимым изменениям.

НЕЗАРАЗНЫЕ БОЛЕЗНИ

Динамика меди имела более выраженную картину и, в определенной степени, соответствовала увеличению в плазме крови первичных и вторичных продуктов липопероксидации. Во всех исследованных группах нами было зарегистрировано увеличение содержания меди в плазме крови к концу эксперимента. При этом наиболее существенное повышение концентрации данного микроэлемента зарегистрировано в группе овец, получавших $ZnSO_4$ (на 62,89 %). Далее следуют овцы, которым скармливали ЭДТА-Zn (на 35,57 %). Увеличение содержания меди в контроле составило 22,70 %.

Для поддержания в организме физиологического гомеостаза и нормального функционирования органов и тканей необходим соответствующий баланс между функционированием прооксидантной и антиоксидантной систем.

Церулоплазмин рассматривается в настоящее время в качестве одного из основных антиоксидантов плазмы крови [8]. Помимо транспорта меди, он нейтрализует подобно СОД супероксид-анион радикалы ($O_2^{\cdot-}$), связывает ионы Fe^{2+} и Cu^+ , выводя их из реакции Фентона, которая является одной из ключевых в инициации процессов ПОЛ [12].

В опытных группах овец установлено недостоверное повышение уровня ЦП (таблица 2). У овец, получавших ЭДТА-Zn, увеличение активности ЦП составило 19,02 %, а у животных, которым в виде подкормки давали $ZnSO_4$ – на 10,01 %. В контроле, наоборот, к концу эксперимента активность ЦП снизилась (на 14,09 %).

Таблица 2 - Показатели антиоксидантной системы плазмы крови у овец при применении цинксодержащих препаратов

Показатели	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	в начале опыта	в конце опыта	в начале опыта	в конце опыта	в начале опыта	в конце опыта
ЦП, мкмоль/л×мин	64,89± 6,80	77,23± 3,64	77,76± 8,54	85,54± 6,21	100,82± 13,88	86,61± 9,16
АК, мкмоль/л	27,27± 2,02	35,57± 1,14*	26,03± 1,32	29,81± 1,08	24,40± 1,57	21,12± 1,51
ТФ, мкмоль/л	2,97± 0,31	3,05± 0,29	3,45± 0,11	3,64± 0,05	3,61± 0,07	3,46± 0,06
Zn, мкмоль/л	10,62± 0,82	11,83± 0,30	9,89± 0,40	9,85± 0,39	10,39± 0,52	9,74± 0,53
ТБК-АП/ЦП	0,021± 0,003	0,026± 0,001	0,019± 0,002	0,021± 0,002	0,015± 0,002	0,016± 0,02
ТБК-АП/ТФ	0,464± 0,055	0,659± 0,062	0,410± 0,018	0,480± 0,026	0,404± 0,017	0,399± 0,022

Примечание: * $P < 0,05$ к началу опыта в соответствующей группе

Известно, что токоферол является одним из важнейших природных антиоксидантов, защищающих клетку от процессов свободнорадикального окисления. В наших исследованиях выявлено незначительное

повышение уровня ТФ в опытных группах овец (в 1-й на 2,69 % и во 2-й – на 5,51%), но оно оказалось недостоверным. В контрольной группе животных зарегистрировано некоторое снижение уровня токоферола (на 4,16%). В тоже время следует обратить внимание на то, что содержание данного антиоксиданта на протяжении эксперимента было ниже физиологической нормы. Это, возможно, связано с двумя причинами – некоторым дефицитом его в рационе овец и эндогенными затратами на ингибирование процессов ПОЛ.

В поддержании запасов токоферола в организме животных ключевое значение принадлежит аскорбиновой кислоте [5]. Динамика АК в плазме крови исследованных овец имеет более существенные изменения в сравнении с ТФ. Повышение уровня АК к концу эксперимента в группе овец, получавших в виде подкормки этилендиаминтетраацетат цинка, оказалось достоверным, составив 30,44 %. У животных, которым скармливали сульфат цинка, увеличение концентрации АК оказалось менее значительным и недостоверным (14,52 %). У овец контрольной группы установлено снижение уровня АК (на 13,44 %). Необходимо отметить, что содержание АК, также как и ТФ в плазме крови овец находится ниже границ физиологической нормы [8, 11]. В тоже время, на наш взгляд, это нельзя рассматривать как плохой прогностический признак, так как в высоких концентрациях АК повышает уровень ионов металлов переменной валентности (Fe^{2+} и Cu^{+}) и выступает уже как прооксидант.

Сопряженность протекания процессов липопероксидации и антиоксидантной защиты можно оценить, рассчитав соотношение ряда компонентов этих систем. Отношение содержания ТБК-АП к активности ЦП показало более значительное, хотя и недостоверное, увеличение данного показателя у животных, получавших ЭДТА-Zn (23,81 %). Далее следует группа овец, которым давали $ZnSO_4$ (10,53 %). В контрольной группе коэффициент ТБК-АП/ЦП повысился лишь на 6,67 %.

Соотношение ТБК-АП/ТФ также недостоверно увеличивалось у овец опытных групп (в 1-й – на 42,03 % и во 2-й – на 17,07 %). У животных контрольной группы данный показатель практически не изменился на момент окончания исследований.

Повышение соотношения ТБК-АП/ЦП и ТБК-АП/ТФ свидетельствует о некоторой несбалансированности между интенсивностью процессов перекисного окисления липидов и функционирования антиоксидантной системы организма овец, получавших подкормку в виде различных соединений цинка. В тоже время, снижение уровня оснований Шиффа в плазме крови дает нам возможность, с одной стороны, говорить об отсутствии негативных изменений в структуре биомембран клеток, а с другой – предположить более значительное вовлечение в нейтрализацию продуктов ПОЛ ферментативного звена АОС.

Картина динамики содержания цинка в плазме крови в процессе эксперимента имела определенные особенности. Установлено повышение его концентрации у всех овец, получавших ЭДТА-Zn. При этом увеличение концентрации цинка в крови по данной группе животных в среднем составило 11,39 % по отношению к началу опыта. У овец, которым скармливали $ZnSO_4$, выявлено разновекторное изменение содержания цинка. У ряда животных оно повышалось, в тоже время у некоторых, наоборот, уменьшалось, а в среднем по группе данный показатель остался на уровне начала исследований. В контрольной группе животных содержание цинка на момент окончания опыта несколько снизилось (на 6,26%). Возможно, данные особенности вызваны тем, что у животных контрольной группы и у овец, получавших сульфат цинка, данный микроэлемент более активно включается в различные метаболические процессы, связанные с функционированием цинксодержащих оксидоредуктаз. Отсюда и меньший его уровень в плазме крови.

ВЫВОДЫ

Проведенные нами исследования по изучению прооксидантно-антиоксидантного статуса плазмы крови овец показали усиление процессов липопероксидации у животных, получавших в виде подкормки препараты цинка. В тоже время, интенсификация процессов перекисного окисления липидов у животных, получавших цинксодержащие препараты не приводит к росту уровня оснований Шиффа, являющихся конечными продуктами ПОЛ и сопровождается определенным усилением антиоксидантной системы, что выражается в повышении активности церулоплазмينا и содержания аскорбиновой кислоты в плазме крови.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Гаврилов, В.Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мажуль // Вопросы мед. химии. – 1987. – № 1. – С. 118–122.
2. Гаврилов, В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лаборатор. дело. – 1988. – № 2. – С. 60–64.
3. Использование комплексной оценки перекисного окисления липидов при изучении компенсаторно-адаптационных механизмов организма детей с тенденцией к повышению артериального давления / Л.В. Рычкова [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – № 1 (111). – С. 18–21.
4. Кармолиев, Р.Х. Биохимические процессы при свободнорадикальном окислении и антиоксидантной защите. Профилактика окислительного стресса у животных / Р.Х. Кармолиев // Сельскохозяйст-

- венная биология. Серия биология животных. – 2002. – № 2. – С. 19–28.
5. Коровина, Н.А. Использование антиоксидантов в педиатрической практике / Н.А. Коровина, И.Н. Захарова, Е.Г. Обычная // *Consilium Medicum. Журн. доказательной медицины для практикующих врачей* [Электронный ресурс]. – 2003. – Режим доступа: http://www.consilium-medicum.com/media/consilium/03_09c/47.shtml. – Дата доступа: 10.11.2008.
 6. Кухтина, Е.Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов печени *in vivo* / Е.Н. Кухтина, Н.Н. Глушенко // *Биохимия*. – 1996. – Т. 61, вып.6. – С. 993–996.
 7. Мацинович, А.А. Процессы перекисного окисления липидов и эндотоксикации при хронических субклинических полимикрозлементозах у крупного рогатого скота / А.А. Мацинович // *Актуальные проблемы ветеринарной медицины: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию ветеринарии Курской обл., Курск, 22-23 мая 2008 г.* / Управлении ветеринарии Курской обл., Курская гос. сельскохоз. акад., Курская биофабрика-фирма «Биок», Курский науч.-исслед. ин-т агропромышл. произ-ва. – Курск, 2008. – С. 249–251.
 8. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / И.П. Кондрахин [и др.]; под ред. проф. И.П. Кондрахина. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.
 9. Перекисное окисление липидов при неврологической патологии у детей / Е.М. Васильева [и др.] // *Клинич. лаборатор. диагностика*. – 2005. – № 2. – С. 8–12.
 10. Перекисное окисление липидов и эндогенная интоксикация (значение в патогенезе болезней животных, пути коррекции) / С.С. Абрамов [и др.]. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 208 с.
 11. Холод, В.М. Справочник по ветеринарной биохимии / В.М. Холод, Г.Ф. Ермолаев. – Минск: Ураджай, 1988. – 168 с.
 12. Gutteridge, J.M. Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities / J.M. Gutteridge // *Chem. Biol. Interact.* – 1985. – V. 56. – P. 113–120.