

УДК 599.735.51:577.115

И. В. Котович¹, О. П. Позывайло², В. П. Баран³, Н. П. Разумовский⁴¹Кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биологии
МГПУ им. И. П. Шамякина, г. Мозырь, Республика Беларусь²Кандидат ветеринарных наук, доцент, декан биологического факультета
МГПУ им. И. П. Шамякина, г. Мозырь, Республика Беларусь³Кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой химии
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь⁴Кандидат биологических наук, доцент,
доцент кафедры кормления сельскохозяйственных животных
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА, ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ КОРОВ-ПЕРВОТЕЛОК В ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД ЛАКТАЦИИ

Исследованы показатели липидного обмена (уровень общих липидов, триацилглицеринов, общего холестерина), состояние прооксидантной (содержание диеновых конъюгатов, кетодиенов, триенкетонов, активных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) и антиоксидантной (активность церулоплазмينا, уровень токоферола и аскорбиновой кислоты) систем плазмы крови коров-первотелок ЗАО «Ольговское» Витебской области в заключительный период лактации. Установлено, что на фоне избытка жира в рационе и нарушения сахаро-протеинового соотношения в организме коров отмечается накопление ТБК-активных соединений, являющихся вторичными продуктами пероксидного окисления липидов и снижение содержания в плазме крови церулоплазмينا, токоферола и аскорбиновой кислоты. Для устранения разбалансированности прооксидантной и антиоксидантной систем организма животных рекомендуется скорректировать их рацион по жиру, сахарам и клетчатке.

Ключевые слова: общие липиды, триацилглицерины, общий холестерин, диеновые конъюгаты, кетодиены, триенкеты, ТБК-активные продукты, церулоплазмин, токоферол, аскорбиновая кислота, плазма крови, коровы-первотелки.

Введение

Одной из ведущих отраслей агропромышленного комплекса Республики Беларусь является молочное скотоводство. Республиканская программа развития молочной отрасли предусматривает увеличение производства молока в стране в 2015 году до 10 млн. тонн. Выход на запланированный показатель требует повышения продуктивности до 6300 кг молока в расчете на 1 голову [1]. Решение данной задачи возможно только на основе интенсификации отрасли с применением передовых технологий на основе глубоких знаний взаимоотношений организма с окружающей средой и биологически обоснованной системы кормления и содержания животных [2].

Генетические особенности высокопродуктивных коров, высокий энергетический обмен, способность превращения энергии корма в молоко приводят к повышению стресс-чувствительности к негативным факторам, сопровождающим промышленную технологию (гиподинамия, гипоксия, изменение условий кормления и содержания), активируют прооксидантные процессы, снижают иммунитет и приводят к развитию различных патологий [3]–[8].

В данных условиях объективный мониторинг метаболического статуса организма крупного рогатого скота на разных этапах его развития будет способствовать своевременной диагностике и принятию необходимых лечебно-профилактических мер для сохранения здоровья животных и повышения их продуктивности. Одной из составляющих физиолого-биохимического статуса организма животных является исследование особенностей липидного обмена и состояния прооксидантной и антиоксидантной систем [7].

Среди показателей, характеризующих липидный обмен, определяют содержание общих липидов (ОЛ), триглицеридов (триацилглицеринов, ТАГ), общего холестерина (ОХ). Состояние прооксидантной системы оценивают по уровню диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов и триенкетонов (КД+ТК), активных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) в плазме (сыворотке) крови, а для оценки антиоксидантной системы (АОС) исследуют содержание аскорбиновой кислоты (АК), токоферола (ТФ) и активность церулоплазмينا (ЦП) [2], [7]–[10], [12].

Отдельные публикации, посвященные вышеуказанной проблематике, имеют отрывочный характер, поскольку большинство исследований проводилось на фоне изучения влияния ветеринарных препаратов или кормовых добавок. Поэтому исследования состояния липидного обмена, прооксидантной и антиоксидантной систем необходимы для определения референтных величин, характеризующих метаболический статус организма коров на разных этапах его онтогенеза и во взаимосвязи с продуктивностью. Это позволит своевременно выявлять нарушения протекания обменных процессов, проводить необходимые лечебные и профилактические мероприятия, корректировать кормление и содержание животных в различные периоды их промышленной эксплуатации.

Цель и задачи исследования

Целью работы явилось исследование показателей липидного обмена, пероксидного окисления липидов и антиоксидантной системы плазмы крови у коров-первотелок в заключительный период лактации.

В связи с этим были поставлены следующие *задачи*:

- определить содержание общих липидов, триацилглицеринов и общего холестерина в плазме крови коров-первотелок;
- оценить состояние прооксидантной и антиоксидантной систем плазмы крови указанных животных.

Методы исследования. Работа проведена на базе молочного комплекса «Подберезье» СПК «Ольговское» Витебского района Витебской области. Для решения поставленных задач были отобраны 10 коров-первотелок с живой массой 450–470 кг и суточным удоем 12 кг молока. Животные находились в одной секции с беспривязным содержанием.

Исследование химического состава кормов, входивших в состав рациона коров-первотелок, проводили в соответствии с традиционными методами зоотехнического анализа в лаборатории кафедры кормления сельскохозяйственных животных учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» (УО ВГАВМ). В кормах рассчитывали обменную энергию и определяли содержание сухого вещества, сырого и переваримого протеина, сырой клетчатки, сахаров и сырого жира.

Кровь от животных брали из яремной вены утром до кормления в стерильные пробирки с соблюдением правил асептики и антисептики. В качестве антикоагулянта для получения плазмы использовали гепарин.

Биохимические исследования проводили в лаборатории кафедры химии УО ВГАВМ. В плазме крови определяли показатели обмена липидов – содержание общих липидов, триглицеридов, общего холестерина, прооксидантной системы – уровень диеновых конъюгатов, кетодиенов, триенкетонов, ТБК-активных продуктов и неферментативного звена антиоксидантной системы – содержание аскорбиновой кислоты, токоферола и активность церулоплазмينا.

Уровень общих липидов, триглицеридов и общего холестерина определяли фотометрическим методом с использованием наборов НТК «Анализ-Х» (Республика Беларусь) и «Витал Дигностикс СПб» (Российская Федерация).

Продукты пероксидного окисления липидов в плазме крови экстрагировали гептан-изопропанольной смесью, взятой в соотношении 2:1. Оптическую плотность гептанового экстракта регистрировали на спектрофотометре СФ-46. Показания абсорбции при 232 нм (A_{232}) соответствовали содержанию диеновых конъюгатов, а при 278 нм (A_{278}) – суммарному уровню кетодиенов и триенкетонов [11], [13]. Значения абсорбции A_{232} и A_{278} выражали в расчете на мл плазмы крови и на мг липидов плазмы крови.

Содержание ТБК-активных продуктов в мкмоль/л плазмы определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Оптическую плотность бутанольного экстракта регистрировали при 535 нм (специфическое поглощение) и при 580 нм (неспецифическое поглощение) [14].

Показатели АОС определяли с использованием фотометрического метода: активность церулоплазмينا (ферроксидаза; КФ 1.16.3.1) в мкмоль/л·мин плазмы по реакции окисления

парафенилендиаміна, а содержание аскорбиновой кислоты и токоферола – в мкмоль/л по реакции с α, α' -дипиридиллом [9].

Для более полной характеристики прооксидантно-антиоксидантного статуса организма коров-первотелок были рассчитаны соотношения ТБК-активных продуктов к уровню церулоплазмину и ТБК-активных продуктов к уровню токоферола.

Обработка экспериментальных данных осуществлена с использованием пакета статистического анализа для «MSExcel».

Результаты исследования и их обсуждение

Высокая продуктивность коров-первотелок связана с большим напряжением метаболических процессов в организме животных. Поэтому к организации их полноценного кормления предъявляются повышенные требования [15]–[17].

Проведенный нами анализ рациона первотелок показал, что по кормовым единицам, уровню сырого и переваримого протеина он в целом соответствовал норме (таблица 1).

Таблица 1. – Содержание элементов питания в рационе коров-первотелок в заключительный период лактации

Показатели	Фактическое содержание	Норма	% обеспеченности
Кормовые единицы, кг	11,10	11,30	101,80
Обменная энергия, МДж	123,64	135,00	91,59
Сухое вещество, кг	12,02	15,90	75,60
Сырой протеин, г	1637,60	1710,00	95,77
Переваримый протеин, г	1117,60	1130,00	98,90
Сырая клетчатка, г	1864,60	4290,00	43,46
Сахара, г	572,40	1000,00	57,24
Сырой жир, г	456,00	355,00	128,45

Однако по большинству компонентов рацион был не сбалансирован и имел отклонения от нормативных критериев. Так, имелся дефицит сырой клетчатки (56,54%) и сахаров (42,76%) на фоне повышенного содержания в рационе первотелок жира (28,45%). Снижение сахаро-протеинового соотношения может привести к развитию кетозов, что отразится на снижении продуктивности животных и приведет к их ранней выбраковке из молочного стада.

Выявленные нарушения в кормлении животных отразились на состоянии липидного обмена, ПОЛ и АОС, показатели которых приведены в таблице 2.

Таблица 2. – Показатели липидного обмена, пероксидного окисления липидов и антиоксидантной системы плазмы крови коров-первотелок в заключительный период лактации

Исследованные показатели	Min–Max	M \pm σ
<i>Показатели липидного обмена</i>		
ОЛ, г/л	1,72–4,66	3,21 \pm 0,886
ТАГ, ммоль/л	0,13–0,22	0,16 \pm 0,028
ОХ, ммоль/л	3,93–7,20	5,62 \pm 1,199
<i>Показатели ПОЛ</i>		
ДК, A ₂₃₂ /мл плазмы	0,072–0,192	0,136 \pm 0,0397
КД+ТК, A ₂₇₈ /мл плазмы	0,058–0,250	0,093 \pm 0,0563
ДК, A ₂₃₂ /мг липидов	0,025–0,060	0,0437 \pm 0,0110
КД+ТК, A ₂₇₈ /мг липидов	0,016–0,054	0,0536 \pm 0,0770
ТБК-АП, мкмоль/л	1,00–2,31	1,676 \pm 0,537
<i>Показатели АОС</i>		
АК, мкмоль/л	18,29–24,35	20,94 \pm 1,919
ТФ, мкмоль/л	1,12–9,24	2,98 \pm 2,547
ЦП, мкмоль/л·мин	72,94–148,02	117,45 \pm 24,449
ТБК-АП/ТФ	0,280–1,426	0,722 \pm 0,4311
ТБК-АП/ЦП	0,008–0,024	0,015 \pm 0,0066

Содержание общих липидов в плазме крови коров-первотелок в целом соответствовало норме (2,80–6,00 г/л) [9].

Гиперхолестеринемия была установлена у 70% исследованных животных (норма – 1,30–4,42 ммоль/л), что может быть связано с повышенным синтезом соединений стероидной природы у коров в заключительный период лактации, так как в это время происходит активное формирование и рост органов развивающегося плода, а холестерин необходим для построения клеточных мембран. В то же время у всех первотелок уровень триацилглицеринов плазмы крови не превышал нижней границы нормативных величин (0,22–0,60 ммоль/л) [9], что, возможно, связано с низким уровнем эндогенного синтеза данной группы липидов.

Определение диеновых конъюгатов, которые являются первичными продуктами ПОЛ, используют для обнаружения в биологическом материале ацилгидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот [11]. Анализ проведенных нами исследований показал, что содержание диеновых конъюгатов в плазме крови коров-первотелок не превышает нормативных критериев (0,100–0,300 ед. опт. пл./мг липидов).

Аналогичная картина получена и по уровню диенкетонов и триенкетонов, суммарный уровень которых не превысил норму (0,050–0,100 ед. опт. пл./мг липидов) [8], [9]. Содержание ТБК-активных продуктов, основным компонентом которых является малоновый диальдегид, у большинства животных оказалось выше нормы (0,25–1,00 мкмоль/л), что свидетельствует об усилении процессов свободно-радикального окисления и накоплении вторичных продуктов пероксидации липидов [8]. Повышение интенсивности ПОЛ в немалой степени может быть связано с избыточным количеством жиров в рационе, так как ненасыщенные жирные кислоты являются субстратами для активных форм кислорода.

Для обеспечения в организме животных физиологического гомеостаза и нормального функционирования органов и тканей необходим баланс между функционированием прооксидантной и антиоксидантной систем. Интенсификация процессов ПОЛ должна быть сопряжена с повышенной потребностью в веществах, обладающих антиоксидантными свойствами.

Церулоплазмин является одним из основных антиоксидантов плазмы крови [2], [7]–[9]. Данный белок нейтрализует радикалы O_2^{\cdot} , связывает ионы Fe^{2+} и Cu^+ , являющиеся инициаторами процессов ПОЛ [9], [18], [19]. Проведенные нами исследования по изучению активности церулоплазмينا плазмы крови показали, что у всех коров-первотелок данный показатель ниже необходимых нормативных величин (150–550 мкмоль/л-мин) [8], [9].

Токоферол – важнейший компонент неферментативного звена антиоксидантной системы. Он защищает непредельные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов клеточных мембран, от окисления [20]. В наших исследованиях установлено, что уровень токоферола в плазме крови всех обследованных животных не соответствовал норме (10–34 мкмоль/л) [8], [9].

Аскорбиновая кислота способствует сохранению в организме запасов токоферола. Содержание аскорбиновой кислоты в плазме крови у всех исследованных первотелок также оказалось значительно ниже нормативных критериев (34,09–85,23 мкмоль/л) [9].

Среди исследованных показателей антиоксидантной системы была установлена положительная корреляционная зависимость средней силы между уровнем аскорбиновой кислоты и активностью церулоплазмينا ($r = 0,61$) и уровнем аскорбиновой кислоты и содержанием токоферола ($r = 0,58$). Низкая корреляция была зарегистрирована между активностью церулоплазмينا и уровнем токоферола ($r = 0,19$).

Таким образом, низкий уровень церулоплазмينا, токоферола и аскорбиновой кислоты в плазме крови свидетельствует о слабой активности антиоксидантной системы у первотелок в заключительный период лактации, когда организм коров характеризуется напряженностью всех обменных процессов и подвержен воздействию различных стресс-факторов.

Сопряженность процессов пероксидного окисления липидов и антиоксидантной системы можно оценить, рассчитав соотношение ряда компонентов этих систем и корреляций между ними. Определенные нами соотношения ТБК-АП/ТФ и ТБК-АП/ЦП плазмы крови коров-первотелок вследствие отсутствия в литературе нормативных значений могут служить ориентировочными данными для анализа сбалансированности системы ПОЛ-АОС в последующих исследованиях.

Расчет корреляций между показателями ПОЛ и АОС показал, что между ними имеет место отрицательная зависимость (таблица 3), что указывает на разбалансированность в работе данных систем.

Таблица 3. – Корреляции между показателями пероксидного окисления липидов и антиоксидантной системы плазмы крови коров-первотелок в заключительный период лактации

Показатели	Коэффициент корреляции (r)
ДК – АК	-0,69
ДК – ТФ	-0,32
ДК – ЦП	-0,85
КД+ТК – АК	-0,61
КД+ТК – ТФ	-0,29
КД+ТК – ЦП	-0,76
ТБК-АП – АК	-0,93
ТБК-АП – ТФ	0,04
ТБК-АП – ЦП	-0,44

Выводы

Проведенные нами исследования по изучению состояния липидного обмена, ПОЛ и АОС у коров-первотелок в заключительный период лактации позволили сделать следующие **выводы**:

1. Уровень общих липидов и триацилглицеринов в плазме крови коров соответствует нормативным величинам. Высокий уровень общего холестерина может быть связан с повышенным синтезом соединений стероидной природы, необходимых для формирования и роста органов развивающегося плода.

2. Увеличение содержания ТБК-активных продуктов на фоне низкого уровня антиоксидантов плазмы крови (церулоплазмينا, токоферола, аскорбиновой кислоты) связано с недостатком сахаров и избытком жиров в рационе животных. Для восстановления сбалансированности нарушенного в заключительный период лактации прооксидантно-антиоксидантного соотношения у коров-первотелок необходимо скорректировать рацион животных по жиру, сахарам и клетчатке.

3. Полученные результаты исследований могут быть использованы в оценке состояния липидного обмена и прооксидантно-антиоксидантного статуса организма коров-первотелок, а в комплексе с другими биохимическими показателями плазмы крови – для мониторинга физиологического состояния данных животных в заключительный период лактации.

СПИСОК ЦИТИРУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Интенсификация производства молока: опыт и проблемы / В. И. Смунев [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2011. – 486 с.
2. Ярован, Н. И. Биохимические аспекты оценки, диагностики и профилактики технологического стресса у сельскохозяйственных животных : автореф. ... дис. д-ра. биол. наук : 03.00.04 / Н. И. Ярован ; ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К. И. Скрябина. – М., 2008. – 39 с.
3. Венцова, И. Ю. Показатели антиоксидантного статуса у высокопродуктивных коров в динамике сухостойного и послеродового периодов / И. Ю. Венцова // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2012. – № 4. – С. 46–48.
4. Высокогорский, В. Е. Пероксидация липидов и окислительная модификация белков молока и крови коров, больных эндометритом / В. Е. Высокогорский, Т. Д. Воронова, Н. А. Погорелова // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 3. – С. 81–85.
5. Копылов, С. Е. Перекисное окисление липидов у коров / С. Е. Копылов, Е. В. Пименов // Ветеринарная медицина. – 2012. – № 1. – С. 45–47.
6. Кушнир, И. Ю. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита организма у высокопродуктивных молочных коров в предродовой и послеродовой периоды : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.00.04, 16.00.07 / И. Ю. Кушнир ; Всерос. НИИ патологии, фармакологии и терапии. – Воронеж, 2002. – 26 с.
7. Новикова, И. А. Коррекция биохимического статуса у высокопродуктивных коров при кетозах в условиях промышленного комплекса : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.01.04 / И. А. Новикова ; ФГБОУ ВПО КГСХА им. проф. И. И. Иванова. – Курск, 2013. – 19 с.
8. Перекисное окисление липидов и эндогенная интоксикация у животных (значение в патогенезе внутренних болезней животных, пути коррекции : монография) / С. С. Абрамов [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2007. – 208 с.

9. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики : справочник / И. П. Кондрахин [и др.]; под ред. проф. И. П. Кондрахина. – М. : КолосС, 2004. – 520 с.
10. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – М. : МЕДпресс-инфо, 2004. – 920 с.
11. Перекисное окисление липидов при неврологической патологии у детей / Е. М. Васильева [и др.] // Клинич. лаборатор. диагностика. – 2005. – № 2. – С. 8–12.
12. Холод, В. М. Справочник по ветеринарной биохимии / В. М. Холод, Г. Ф. Ермолаев. – Минск : Ураджай, 1988. – 168 с.
13. 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.
14. 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.
15. Ковзов, В. В. Диагностика нарушений обмена веществ у высокопродуктивных коров / В. В. Ковзов // Ученые записки Витебской ордена «Знак Почета» гос. акад. ветеринар. медицины. – 2007. – Т. 43. – Вып. 1. – С. 109–111.
16. Разумовский, Н. П. Высокопродуктивные коровы: обмен веществ и полноценное кормление / Практическое пособие для ветеринарных врачей, зооинженеров, студентов факультета ветеринарной медицины, зооинженерного факультета и слушателей ФПК / Н. П. Разумовский, В. В. Ковзов, И. Я. Пахомов. – Витебск : УО ВГАВМ, 2007. – 290 с.
17. Валеев, А. Н. Молочная продуктивность и качество молока коров-первотелок черно-пестрой породы при использовании в рационах энергетических добавок : автореф. дис. канд. с.-х. наук : 06.02.10 / А. Н. Валеев; ФГБОУ ВПО ИГСХА. – Ижевск, 2011. – 22 с.
18. 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.
19. Stoj, C. Cuprous oxidase activity of yeast Fet 3 p and human caeruloplasmin : implication for function / C. Stoj, D. J. Kosman // FEBS Lett. – 2003. – V. 554. – P. 422–426.
20. Евсигнеева, Р. П. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стимулятор биологических мембран / Р. П. Евсигнеева, И. М. Волков, В. В. Чудинова // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15, № 2. – С. 119–136.

Поступила в редакцию 23.02.2015

E-mail: ivkotovich@mail.ru

I. V. Kotovich, O. P. Pozyvailo, V. P. Baran, N. P. Razumovsky

INDICES OF LIPID METABOLISM, PEROXIDE OXIDATION OF LIPIDS AND ANTIOXIDANT SYSTEM OF BLOOD PLASMA IN THE FINAL PERIOD OF FIRST-CALF COWS' LACTATION

The article is devoted to investigation of lipid exchange (level of total lipids, triacylglycerols, general cholesterol), consistence of prooxidant (content of diene conjugates, diene ketones, triene ketone, active products that react with thiobarbituric acid) and antioxidant (activity of caeruloplasmin, level of tocopherol and cevitamic acid) blood plasma system of first-calf cows in the last period of lactation at CJSC "Olgovskoe", Vitebsk region. It has been established that against the backdrop of cows fat excess and sugar-protein distortion, concentration of TBA-active metabolites (secondary product of lipids peroxide oxidation) and reduction of caeruloplasmin, tocopherol and cevitamic acid in blood plasma have been observed. In order to eliminate disbalance of prooxidant and antioxidant system of animal organisms it is important to correct the amount of consumable fat, sugar and fibre.

Key words: total lipids, triacylglycerols, total cholesterol, diene conjugates, diene ketones, triene ketones, TBA-active metabolites, caeruloplasmin, tocopherol, cevitamic acid, blood plasma, first-calf cows.