

На правах рукописи

Полежаев Сергей Леонидович

**СТАБИЛЬНОСТЬ МАТРИЧНЫХ РНК, ПОТРЕБЛЕНИЕ
КОРМА И ПРОДУКТИВНОСТЬ МОНОГАСТРИЧНЫХ
ЖИВОТНЫХ ПРИ ИМБАЛАНСЕ ЛИЗИНА И ТРИПТОФАНА**

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Боровск 2009

Работа выполнена в ГНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства, в лаборатории испытания биологически активных веществ

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
академик РАСХН
Рядчиков Виктор Георгиевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,
Галочкин Владимир Анатольевич

кандидат биологических наук,
Головко Елена Николаевна

Ведущая организация: ФГУ Кубанский государственный университет

Защита состоится «___» _____ 2009 г. в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д. 006.030.01 при ГНУ Всероссийском научно-исследовательском институте физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных.

Адрес института: 249013, Калужская область, г. Боровск, пос.
Институт, ВНИИФБиП с.-х. животных. Телефон 8-495-9963415,
Факс 8-484-3842088

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания с.-х. животных.

Автореферат разослан «___» _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

В.П. Лазаренко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Сбалансированное по незаменимым аминокислотам питание животных является наиболее значимым условием высокой продуктивности и здоровья животных. Различают несколько форм сбалансированности рационов: недостаток одной или нескольких аминокислот (дефицит); баланс (все незаменимые аминокислоты обеспечены на уровне норм потребности без избытка и недостатка, такой белок называют «идеальным»); имбаланс (острый недостаток одной на фоне избытка остальных; избыток 2-й или 3-й лимитирующих аминокислот на фоне острого недостатка 1-й лимитирующей); антагонизм (лизин-аргинин) и токсичность (D.E. Harper, N. J. Benevenga, e.a., 1970).

Основными признаками имбаланса являются плохой аппетит и, как следствие этого, низкая продуктивность животных (В.Г. Рядчиков и др., 1981-2007). В практике животноводства нередко приходится сталкиваться с случаями дефицита и имбаланса в результате неправильного применения синтетических аминокислот, использования неполноценных высокобелковых кормов без соответствующей корректировки полноценными белками и препаратами аминокислот. Поэтому изучение признаков имбаланса и разработка способов его преодоления имеет как научное, так и практическое значение.

Цитоплазматические мРНК являются центральным звеном белоксинтезирующей системы. От их количества зависит интенсивность синтеза белка. Исследования последних лет показали, что индивидуальные мРНК значительно различаются по продолжительности жизни, которая варьирует в клетках эукариот от нескольких минут до недель (J. Ross, G. Kobs e.a., 1986, В.К. Плотников, 1987-2007). Главным детерминантом стабильности мРНК является степень её полиаденилирования в 3'-нетранслируемой области, т. е. длина ее терминальной гомонуклеотидной цепи – поли (А)-хвоста (E.Y. Baker, 1993). Длина хвоста мРНК и скорость его элиминации в процессе трансляции зависит как от гена, так и от условий окружающей среды. В этом плане представляет определенный интерес проследить действие разных форм баланса

незаменимых аминокислот в питании животных на концентрацию и стабильность суммарных РНК, мРНК и мРНК специфических генов: фактора элонгации трансляции eEF-1 α , протоонкогена c-myc в раскрытии механизмов биосинтеза белка и пищевого поведения животных.

Цель и задачи исследований

Изучить действие разных форм сбалансированности рационов по незаменимым аминокислотам – дефицита, имбаланса лизина и триптофана, баланса (на уровне «идеального» белка) на:

- аппетит, рост, биосинтез белка в теле и печени белых крыс и поросят;
- концентрацию и стабильность суммарной мРНК, а также специфических мРНК – фактора элонгации трансляции eEF-1 α , протоонкогена c-myc печени и мозга крыс;
- выяснить причинно-следственные связи между формой баланса аминокислот, аппетитом, ростом, биосинтезом белка, концентрацией и стабильностью матричных РНК.

Научная новизна

1. Основным фактором снижения аппетита при имбалансе является избыток аминокислот относительно первых лимитирующих – лизина или триптофана. Снижение потребления корма проявляется значительно сильнее при имбалансе триптофана, чем лизина.
2. Установлено, что стабильность суммарной мРНК печени и мРНК фактора элонгации трансляции eEF-1 α зависит от формы сбалансированности рациона. При имбалансе лизина и триптофана, их концентрация и стабильность снижаются в сравнении с показателями у животных на сбалансированных по аминокислотам рационах. Стабильность мРНК протоонкогена c-myc в печени, наоборот повышается в ответ на низкобелковое несбалансированное по аминокислотам питание. Это свидетельствует о разной экспрессии специфических генов на ту или другую форму аминокислотного баланса.

3. Балансирование рационов по принципу «идеального белка» способствует существенной его экономии. Рационы свиней, сбалансированные по аминокислотам комбинированием кормов, не отвечают требованиям «идеального белка» из-за значительного избытка таких аминокислот как аргинин, лейцин, валин, тирозин. Можно полагать, что практические рационы, в том числе и кукурузо-соевые, обладают свойствами, характерными для имбаланса.

Практическая значимость работы

Разработанный состав рациона для поросят на основе принципа «идеального белка», позволяет существенно сократить затраты белка без ущерба для продуктивности. Наши исследования показали, что аппетит, играющий наиболее значимую роль в повышении продуктивности животных, зависит от сбалансированности рационов по незаменимым аминокислотам. Поэтому в практике свиноводства вопросу сбалансированности рационов, как фактора аппетита, рекомендуем придавать больше внимания.

Апробация работы

Основные результаты научных исследований по диссертационной работе доложены и обсуждены на международных, всероссийских и региональных научных конференциях. Основные из них: Второй съезд биохимического общества РАН (май 1997г., Москва, Пущино), Вторая краевая школа-семинар молодых учёных «Научное обеспечение сельскохозяйственного производства» (1997г., НИИ Риса, Краснодар).

Положения, выносимые на защиту:

- имбаланс лизина и триптофана вызывает ухудшение аппетита и, как следствие этого, резкое снижение роста и отложения белка, высокие затраты белка и корма на единицу продукции, при этом реакция животных на имбаланс триптофана проявляется более остро, чем на имбаланс лизина;

- причиной имбаланса является избыток аминокислот относительно содержания лизина и триптофана. Понижение аппетита является физиологически обоснованной защитной реакцией, направленной на поддержание гомео-

стаза путём ограничения потребления излишнего количества аминокислот и образующихся вредных продуктов распада;

- при имбалансе не снижается количество суммарной РНК, суммарной мРНК и мРНК фактора элонгации трансляции eEF-1 α в печени, однако существенно снижается стабильность мРНК. Это особенно заметно при имбалансе триптофана в результате увеличения количества аминокислот до 150% норм потребности. В то же время уровень и стабильность протоонкогена c-myc повышается в печени крыс. Это свидетельствует о том, что разные гены экспрессируются неодинаково в ответ на одну и ту же форму сбалансированности аминокислотного питания;

- снижение экспрессии гена фактора элонгации трансляции eEF-1 α в печени и мозге при имбалансе может быть ключевым звеном в цепи регуляторных механизмов пищевого поведения животных (аппетита);

- более низкий рост свиней на высокобелковом рационе кукуруза+соя в сравнении с ростом на монозерновом рационе, обогащенном кристаллическими аминокислотами точно до норм потребности («идеальный белок»), обусловлен избытком нелимитирующих аминокислот, создающим естественный имбаланс за счёт самих кормов. Этот вывод подтверждается показателями снижения стабильности суммарной мРНК, аналогично снижению стабильности в печени крыс на рационах с имбалансом лизина;

- способность регулировать уровень и стабильность мРНК в зависимости от условий аминокислотного питания является приспособительным механизмом организма животных. При снабжении аминокислотами на уровне современных норм наблюдается высокая стабильность мРНК, хороший рост животных и биосинтез белка. Индекс стабильности суммарной мРНК печени может быть более объективным тестом для оценки сбалансированности рационов по аминокислотам и обмену белка чем концентрация суммарной РНК.

Публикация результатов исследований

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в которых отражены основные результаты экспериментальных исследований, из них одна работа в центральном издании, рекомендованном ВАК Министерства образования и науки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертации изложена на 94 страницах без списка источников, а всего она содержит 109 страниц компьютерного набора.

Состоит из введения, обзора литературы, материала и методики исследований, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и предложения производству, содержит 23 таблицы, 4 рисунка, список использованной литературы включает 142 источника.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведено три опыта на растущих крысах породы Вистар и один опыт на поросятах породы СМ 1. В каждом опыте на крысах было четыре группы по 10 голов в каждой, содержание – в индивидуальных клетках. Продолжительность I и II опытов – 14 дней, III – 10 дней. Животные первой группы получали основной рацион, который состоял на 96% из кукурузной дерти (8,8% сырого белка) + микро- и макроэлементы, витамины по нормам NRC-1972. Лизин является первой лимитирующей аминокислотой в белке кукурузы. Его количество составило 27% от нормы (2,4 г против 9 г/кг по норме). Триптофан является второй лимитирующей аминокислотой, его количество в рационе составило 42% от нормы (0,63 г вместо 1,5 г/кг по норме). Имбаланс по лизину (2-я группа) создавали путём добавления всех недостающих аминокислот, кроме лизина, в виде синтетических препаратов L-формы, до 100% в I опыте и до 150% норм потребности во II-III опытах соответственно. Имбаланс триптофана (3-я группа) создавали за счёт такой же добавки аминокислот, в т.ч. лизина, но без триптофана. Животные 4-й группы получали скорректированный рацион, обогащённый всеми недостающими аминокислотами (рис. 1).

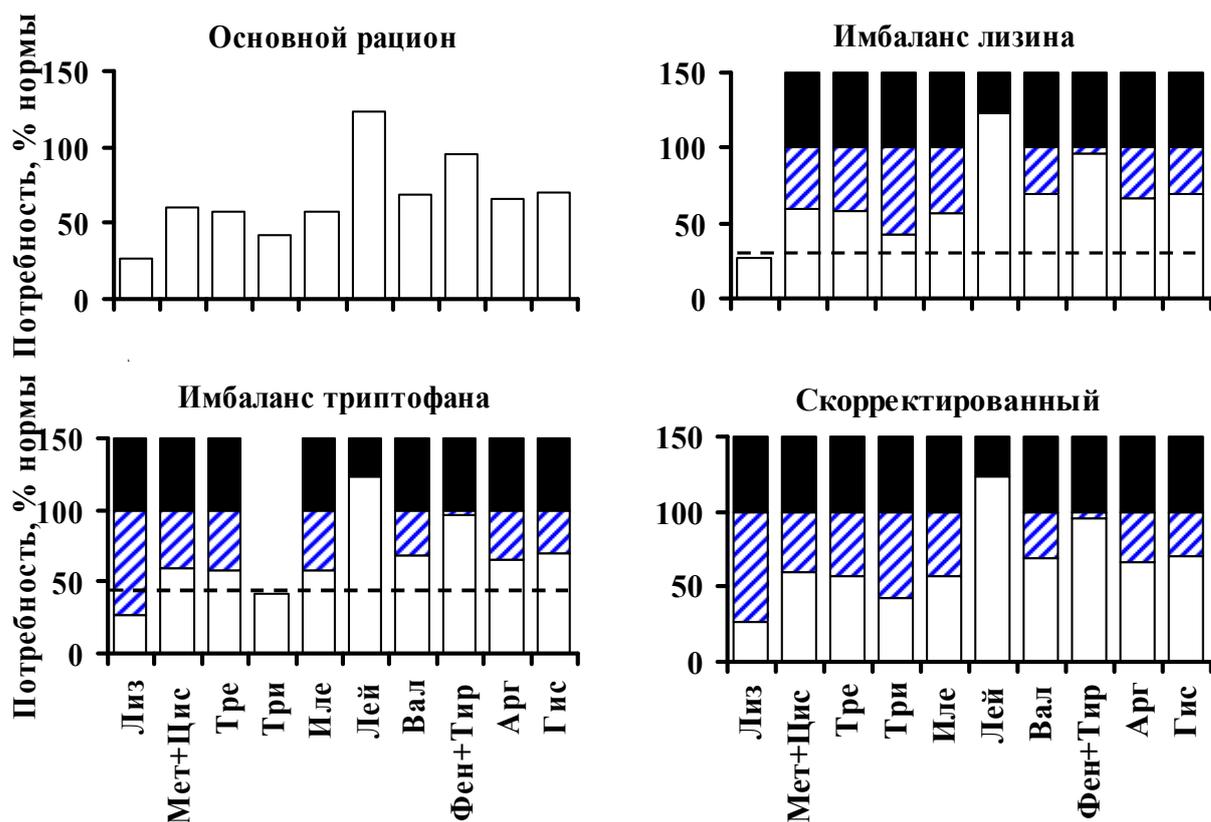


Рис.1. Содержание незаменимых аминокислот в % от норм потребности в рационах. Источники аминокислот: □ - кукуруза; ▨ - кристаллические аминокислоты до 100%; ■ - то же до 150%

Опыт на поросятах продолжительностью 30 дней проведен на пяти группах, по 12 голов в каждой. Схема опыта с первой по четвертую группу была аналогичной схеме опытов на крысах: аминокислоты добавляли до 100% норм потребности для свиней (Рекомендации «Аминокислотное питание свиней, М. 2000»). Балансирование рациона по аминокислотам в 5-й группе произведено за счет введения в кукурузный рацион 25% соевого шрота (рис. 2). Рационы обогащали витаминными и минеральными премиксами.

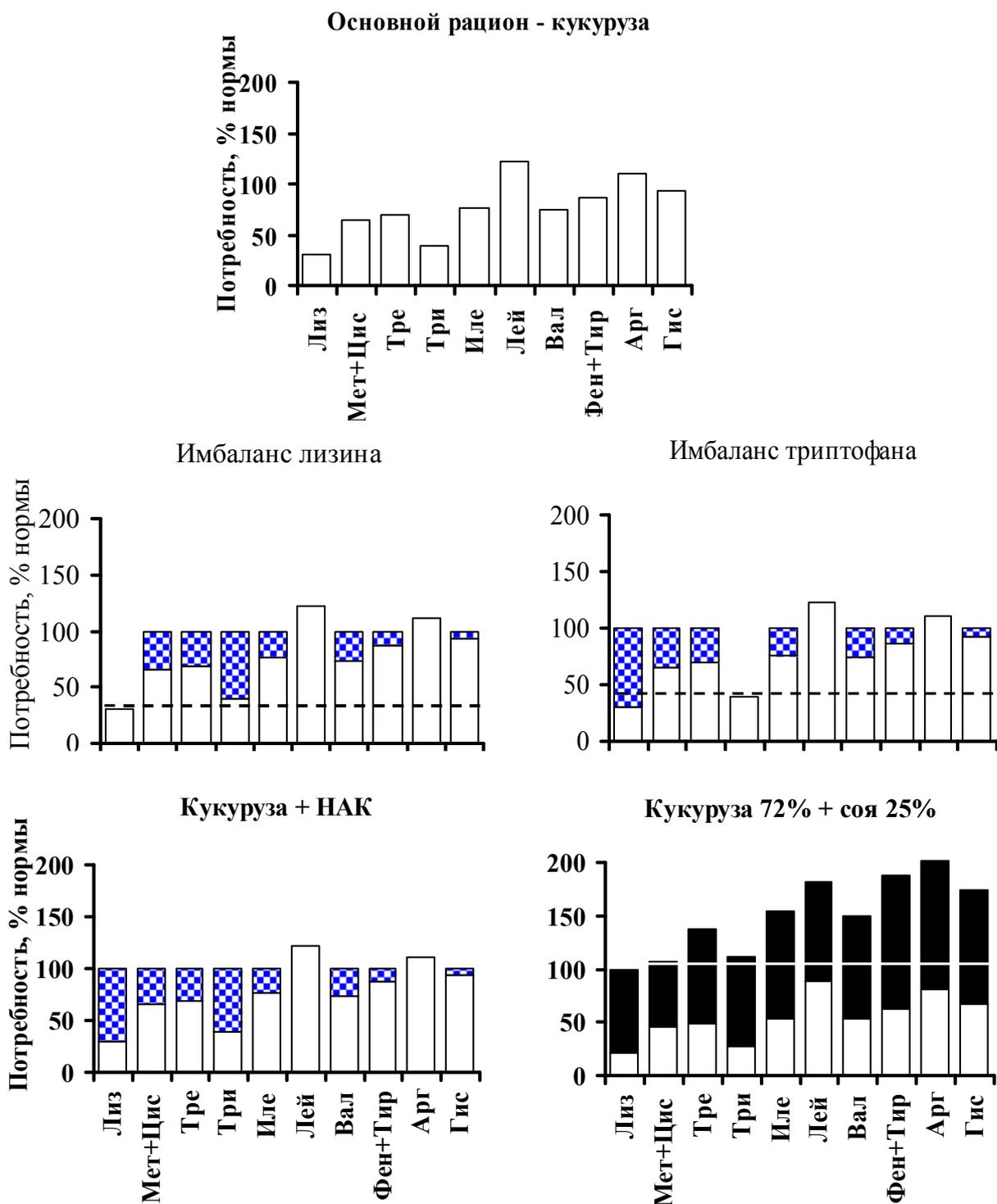


Рис. 2. Содержание незаменимых аминокислот в % от норм потребности в рационах свиней. Источники аминокислот: □ - кукуруза; ▣ - кристаллические незаменимые аминокислоты (НАК); ■ - соевый шрот

Содержание белка в кормах, тушках крыс, печени определяли по азоту методом Кьельдаля. Переваримость определяли по методу Томаса, (1908); отложение азота – по методу Бендера, (1953), в прописи В.Г. Рядчикова,

(1978). Анализ крови на клинические и биохимические показатели определяли общепринятыми методами.

Суммарную РНК печени и мозга выделяли фенол – детергентным методом в присутствии ионов Mg (В.К.Плотников и др., 1998).

Концентрацию и чистоту препаратов РНК определяли спектрофотометрически по стандартной методике из расчета $10E_{260}=37$ мкг/мл (Маниатис и др., 1985).

Выделение суммарной матричной РНК (мРНК) осуществляли методом аффинной хроматографии на колонке с поли(У)-сефарозой. Суть метода состоит в том, что препарат суммарной РНК пропускают через колонку с аффинным носителем. В этих условиях полимер носителя – поли(У) комплементарно гибридизируется с поли(А) последовательностью на 3' конце мРНК и связывает ее: рибосомная и транспортная РНК не связываются с аффинным сорбентом и уходят с элюатом. Поли(А) мРНК элюировали с колонки соответствующим буфером при температуре 50 °С.

В процессе хроматографии, как и в условиях *in vivo*, под действием температурного и ионного окружения происходит распад мРНК, скорость которого зависит от пространственной структуры (конформации) молекул мРНК. Структура определяется степенью полиаденилирования, т. е. длиной поли(А)-хвоста. Поэтому методикой предусмотрена двухциклическая хроматография на поли(У)-сефарозе; в первый цикл получают фракцию поли(А)⁺мРНК, во второй – фракцию поли(А)⁺⁺мРНК. Стабильность суммарной мРНК выражают в % по формуле: $[\text{поли(А)}^{++}/\text{поли(А)}^{+}] \times 100$.

Концентрацию и стабильность мРНК eEF-1 α и мРНК с-тус определяли по методу В.К. Плотникова и Н.В. Бакалдиной, (1993). Суммарную поли(А)⁺мРНК гибридизировали с радиоактивно мечеными зондами. В качестве зондов использовали синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные участку кодирующей области мРНК белков: эукариотического фактора элонгации трансляции eEF-1 α и протоонкогена с-тус.

Зонды метили концевым включением радиоактивной метки с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и [$\gamma^{33}\text{P}$] АТФ («Изотоп», Россия).

Гибридизацию дезоксирибонуклеотидных зондов с поли(А)⁺мРНК и поли(А)⁺⁺мРНК производили на колонке поли(У)–сефарозы в течении 1 часа при 36°C. Концентрацию этих РНК определяли по удельной радиоактивности (число импульсов в минуту на 1 мкг) с помощью сцинтилляционного счетчика Rack Beta Spectral 1219 (“ЛКВ”, Швеция).

Суммарную радиоактивность рассчитывали, умножая значение удельной радиоактивности на количество поли(А) мРНК.

Определение соотношения молекул суммарной мРНК с длинными и короткими поли(А) последовательностями на 3'-конце определяли методом термальной ступечатой элюции поли(А)⁺мРНК с колонки поли(У) – сефарозы при температуре 35°C и 65°C. Соотношение высоко- и низкотемпературной фракции – (А)_n65°C / (А)_n35°C использовали в качестве характеристики степени полиаденилирования суммарной мРНК.

Суммарную ДНК определяли по методу Л. Блобеля и В. Поттера в прописи М.Г. Трудолюбовой, (1977). РНК-азную активность определяли по С. Уилсону, (1975).

Математическую обработку полученных результатов выполняли стандартными методами по Стьюденту в описании Е.К. Меркурьевой (1970) на ПК с применением программ Microsoft Excel пакета MS Office 2000.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I и II опыты. Аппетит и рост животных. Добавление к основному рациону кристаллических аминокислот до норм потребности, но без лизина и триптофана, вызывало снижение потребления корма на 13,4 и 20,6%, роста на 86 и 95% (p<0,001) соответственно. В то же время добавление той же смеси синтетических аминокислот, но с лизином и триптофаном, способствовало повышению потребления корма в 2,5 раза (p<0,01) и среднесуточных приростов в 8,5 раз (p<0,001) по сравнению с таковыми у крыс на основном рационе (таблица 1).

Во II опыте в результате добавления смеси аминокислот до 150% норм потребности в группах с имбалансом лизина и триптофана наблюдалась еще более острая реакция животных, чем в первом опыте, в виде снижения потребления корма и роста животных. Более того, животные в группе с имбалансом триптофана снизили живую массу на 1,54 г за 14 дней опыта.

На скорректированном рационе животные также хуже поедали корм и медленнее росли ($p < 0,05$), чем на скорректированном рационе при 100% добавлении аминокислот в первом опыте.

Таблица 1.

Действие разных форм баланса незаменимых аминокислот на потребление корма и рост белых крыс (n=10)

| Показатели | Основной рацион (ОР) 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скорректированный рацион 4-я группа |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| I опыт + НАК до 100% потребности | | | | |
| Начальная ж.м., г | 46,8±0,9 | 46,5±0,7 | 46,9±0,6 | 46,9±0,7 |
| Потребление корма, г/гол в сутки | 4,02±0,2 | 3,48±0,2 | 3,19±0,1* | 10,0±0,5** |
| в % к ОР | 100 | 86,6 | 79,4 | 248,8 |
| Прирост ж.м., г/14 дн. | 5,74±0,26 | 0,84±0,11*** | 0,28±0,003*** | 49,0±1,7*** |
| в % к ОР | 100 | 14 | 5 | 853,7 |
| II опыт + НАК до 150% потребности | | | | |
| Начальная ж.м., г | 46,8±0,4 | 46,6±0,6 | 46,9±0,7 | 46,8±0,5 |
| Потребление корма, г/гол в сутки | 4,12±0,5 | 3,20±0,4 | 2,54±0,2* | 7,5±0,6** |
| в % к ОР | 100 | 77,7 | 61,7 | 182,0 |
| Прирост ж.м., г/14 дн. | 5,85±0,26 | 3,36±0,15** | -1,54±0,17 | 37±1,6*** |
| в % к ОР | 100 | 57,4 | - | 632,5 |

Достоверность различий к группе ОР: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.
ж.м. – живая масса. НАК – добавка незаменимых аминокислот.

Из опытов очевидно, что причиной имбаланса является избыток аминокислот относительно уровня лимитирующих – лизина и триптофана, чем выше избыток, тем выше его отрицательное действие на аппетит и рост животных, при этом оно проявляется сильнее при имбалансе триптофана, нежели лизина.

В тушках, печени и сыворотке крови крыс на скорректированных рационах в I и II опытах содержание ($p < 0,05-0,01$) и отложение белка ($p < 0,001$) было существенно выше по сравнению с показателями у животных, получавших рационы с имбалансом (таблица 2).

Таблица 2.

Содержание белка в тушках, печени и сыворотке крови крыс, % (n=4)

| Показатели | Основной рацион 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скорректированный 4-я группа |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| I опыт (100% НАК) | | | | |
| Тушка | 18,7±0,22 | 18,3±0,23 | 16,2±0,31 | 19,7±0,51 |
| Печень | 15,8±0,3 | 15,9±0,6 | 17,3±0,07 | 21,8±0,01** |
| Сыворотка крови | 5,36±0,07 | 5,17±0,03 | 4,21±0,06 | 6,73±0,08** |
| II опыт (150% НАК) | | | | |
| Тушка | 14,9±0,17 | 15,81±0,8 | 14,2±0,43 | 16,3±0,4** |
| Печень | 15,7±0,09 | 17,1±0,4 | 16,0±0,6 | 19,6±0,2** |
| Сыворотка крови | 5,6±0,08 | 5,61±0,07 | 6,04±0,02 | 7,5±0,03** |

Достоверность различий к группе ОР: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Увеличение уровня аминокислот при добавке до 150% не приводило к повышению содержания белка и отложению азота у крыс на скорректированном рационе по сравнению с отложением при 100% обеспеченности аминокислотами. Наоборот, наблюдалось достоверное снижение отложения азота: 1,22 против 0,94 г за 14 дней. Несмотря на низкое абсолютное количество отложенного азота в тушках крыс на рационах с имбалансом, в расчете же на 100 г прироста не было достоверных различий по его отложению при разных условиях аминокислотного питания (таблица 3).

Таблица 3.

Отложение азота в тушках крыс (n=4)

| Показатели | Основной рацион 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скорректи- рованный 4-я группа |
|----------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| I опыт (100% НАК) | | | | |
| Отложено, г / 14 дн. | 0,14±0,05 | 0,02±0,003** | 0,1±0,007** | 1,2±0,05*** |
| г на 100г прироста | 2,41±0,08 | 2,22±0,1 | 2,5±0,1 | 2,43±0,12 |
| II опыт (150% НАК) | | | | |
| Отложено, г / 14 дн. | 0,16±0,04 | 0,1±0,003** | -0,12±0,001 | 0,97±0,08*** |
| г на 100г прироста | 2,73±0,08 | 2,94±0,04 | - | 2,61±0,09 |

Достоверность различий к группе ОР: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Содержание и стабильность суммарных РНК, мРНК и ДНК в печени лабораторных животных

Уровень суммарной РНК в печени крыс на скорректированном рационе был выше, чем у крыс на низкобелковом основном рационе (p<0,05), однако достоверных различий с уровнем РНК в печени животных, получавших рационы с имбалансом лизина и триптофана, не отмечено (таблица 4).

Таблица 4.

Содержание суммарной РНК, ДНК и мРНК, и индекс стабильности мРНК в печени крыс (II опыт)(n=4)

| Показатели | Основной рацион 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скорректи- рованный 4-я группа |
|--|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Суммарная РНК, мг/г | 4,66±0,3 | 5,01±0,09 | 5,0±0,25 | 5,61±0,17* |
| -“-“- ДНК, мг/г | 2,00±0,11 | 2,1±0,14 | 1,95±0,07 | 2,10±0,13 |
| РНК/ДНК | 2,33±0,12 | 2,39±0,17 | 2,56±0,09 | 2,81±0,08 |
| Суммарная поли(А) ⁺ мРНК, мкг/г | 11,0±1,5 | 13,3±0,9 | 15,4±1,1 | 13,8±2,0 |
| Суммарная поли(А) ⁺⁺ мРНК, мкг/г | 2,97±0,2 | 3,06±0,11 | 3,54±0,24 | 4,55±0,25** |
| Индекс стабильности, % | 27±0,5 | 23±0,41* | 23±0,27* | 33±0,4** |

Достоверность относительно 1-ой группы: * – p<0,05; ** – p<0,01.

Не было различий между группами по количеству ДНК. Транскрипционная активность, выражаемая отношением РНК/ДНК, была более высокой у крыс на скорректированном рационе.

По уровню суммарной поли(А)⁺мРНК не выявлено достоверной разницы между группами, в то время как уровень стабильной поли(А)⁺⁺мРНК оказался существенно выше в печени крыс на скорректированной диете ($p < 0,01$) по сравнению с тем в остальных группах. У животных на рационах с имбалансом стабильность мРНК была ниже по сравнению с этим показателем в первой группе ($p < 0,05$). Следовательно, имбаланс лизина и триптофана не угнетает сколько-нибудь существенно транскрипционную активность генома печени, однако, оказывает заметное отрицательное действие на стабильность цитоплазматической мРНК.

Представляло интерес рассмотреть действие разных форм сбалансированности на количество и стабильность мРНК фактора элонгации трансляции eEF-1 α . (таблица 5).

Таблица 5.

Содержание и стабильность мРНК eEF-1 α печени крыс

| Показатели | Основной рацион 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скорректированный 4-я группа |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Добавка АК до 100% потребности (I опыт) | | | | |
| ¹⁾ Концентрация поли(А) ⁺ мРНК | 20,0 \pm 1,1 | 26,3 \pm 0,9** | 24,5 \pm 0,6** | 21,7 \pm 0,9 |
| Концентрация поли(А) ⁺⁺ мРНК | 27,5 \pm 0,8 | 20,7 \pm 1,5** | 32,6 \pm 1,7 | 35,8 \pm 1,0** |
| Индекс стабильности, % | 137,5 \pm 7 | 78,7 \pm 4,8** | 133,0 \pm 6,1 | 164,6 \pm 8,9* |
| Добавка АК до 150% потребности (II опыт) | | | | |
| Концентрация поли(А) ⁺ мРНК | 21,5 \pm 0,9 | 21,7 \pm 1,0 | 25,0 \pm 0,2 | 19,9 \pm 0,5 |
| Концентрация поли(А) ⁺⁺ мРНК | 22,4 \pm 0,4 | 23,0 \pm 0,6 | 20,6 \pm 0,4 | 27,4 \pm 0,4 |
| Индекс стабильности, % | 104,3 \pm 5,9 | 106 \pm 5,1 | 82,3 \pm 4,2 | 137,3 \pm 7,3 |

1) Концентрация мРНК eEF-1 α выражается числом радиоактивных импульсов тысяч/минуту/0,5 мг суммарной РНК при гибридизации поли(А) мРНК на поли(У)-сефарозе. Разница достоверна относительно показателей 1-ой группы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Оказалось, что общий уровень поли(А)⁺мРНК eEF-1 α в печени крыс на рационах с имбалансом более высокий, чем у крыс на основной низкобелковой и скорректированной диетах. В то же время концентрация стабильной фракции поли(А)⁺⁺ и индекс стабильности фактора элонгации трансляции

оказались наиболее высокими у животных, получавших скорректированный рацион – 35,2 тыс. импульсов и 164,6%, соответственно.

Следует также отметить существенно более высокую стабильность фактора элонгации трансляции у крыс на диете с имбалансом триптофана, которая была на уровне со стабильностью у животных на основном рационе (133,0 и 137,5%). У крыс на рационе с имбалансом лизина стабильность быстро снижается.

Во II опыте сохранилась та же тенденция более высокой стабильности мРНК eEF-1 α у крыс на скорректированном рационе. Отмечается резкое снижение её стабильности при имбалансе триптофана в результате увеличения смеси аминокислот до 150% от норм потребности ($p < 0,001$).

III опыт. Представляло интерес проследить действие имбаланса на более взрослых животных при более высоком содержании белка в зерне кукурузы 12,5%. Добавление к основному рациону аминокислот до 150% потребности не вызвало столь резкого снижения аппетита, как это имело место в двух предыдущих опытах, приросты за опыт в группе с имбалансом лизина и триптофана составили соответственно 66,7 и 25,9% относительно приростов крыс на основном рационе (таблица 6).

Крысы на скорректированном рационе росли в 3,3 раза быстрее, чем на основном. Содержание и отложение белка в тушке находилось в соответствии с ростом крыс.

Таблица 6.

Потребление корма и рост белых крыс в III опыте, n=10

| Показатели | Основной рацион 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скорректированный 4-я группа |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Начальная ж.м., г | 75 \pm 0,3 | 75 \pm 0,5 | 75 \pm 0,4 | 75 \pm 0,7 |
| Потребление корма, г/гол в сутки | 8,14 \pm 0,2 | 7,97 \pm 0,4 | 6,62 \pm 0,3** | 8,94 \pm 0,7 |
| в % к ор | 100 | 98,0 | 81,3 | 110,0 |
| Прирост ж.м., г/10 дн. | 5,4 \pm 0,12 | 3,6 \pm 0,4* | 1,4 \pm 0,1*** | 18 \pm 0,4*** |
| в % к ор | 100 | 66,7 | 25,9 | 333 |
| Содержание белка в тушке, % | 15,9 \pm 0,3 | 15,8 \pm 0,8 | 14,2 \pm 0,4 | 16,3 \pm 0,4 |
| Отложено N, г/10 дн. | 0,125 \pm 0,003 | 0,089 \pm 0,002 | 0,035 \pm 0,003 | 0,47 \pm 0,01*** |
| -“-, г/100 г прироста | 2,31 \pm 0,12 | 2,47 \pm 0,09 | 2,50 \pm 0,20 | 2,61 \pm 0,11 |

Достоверность различий к группе ОР: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Как и в первых двух опытах количество суммарной РНК в печени крыс не коррелирует с ростом и отложением азота (таблица 7). Более того, у крыс на рационах с имбалансом ее содержание выше, чем у крыс на основном рационе ($p < 0,05$).

Таблица 7

Содержание суммарной РНК, ДНК и активность РНКазы (III опыт) (n=4)

| Показатели | Основной рацион 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скорректи- рованный 4-я группа |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Суммарная РНК, мг/г | 4,18±0,3 | 5,20±0,15* | 5,58±0,23* | 5,18±0,22* |
| -“- ДНК, мг/г | 2,07±0,1 | 2,10±0,15 | 2,23±0,09 | 1,98±0,21 |
| РНК/ДНК | 1,54 | 2,48 | 2,81 | 2,62 |
| Активность РНКазы, ед/мг | 1,27±0,09 | 2,45±0,05** | 0,94±0,15 | 0,64±0,33 |

Достоверность различий к группе ОР: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Активность РНК-азы – наименьшая в группе с имбалансом триптофана и на скорректированном рационе, что согласуется с высоким уровнем у них РНК. Высокая активность РНК-азы в печени крыс на рационе с имбалансом лизина, при достаточно высоком уровне суммарной РНК, трудно объяснима.

Показатели концентрации и стабильности мРНК eEF-1 α в печени распределились по группам примерно в том же порядке, как во II опыте: наивысшая концентрация стабильных поли(A)⁺⁺ и индекс стабильности у животных на скорректированном рационе – 31,3 тыс. имп. и 117,5%, соответственно, самые низкие – на рационе с имбалансом триптофана – 13,7 тыс. имп. и 94,5% ($p < 0,01$) (таблица 8).

Таблица 8.

Концентрация и индекс стабильности специфических мРНК в печени крыс (III опыт) (n=4)

| Показатели | Основной рацион 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скоррек- тирован- ный 4-я группа |
|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|
| eEF-1 α | | | | |
| Концентрация поли(A) ⁺ | 21,0±1,1 | 23,3±1,0 | 14,5±0,9 | 26,6±1,3 |
| -“- поли(A) ⁺⁺ | 24,5±1,4 | 21,1±1,2 | 13,7±0,8*** | 31,3±1,3*** |
| Индекс стабильности, % | 116,5±5,5 | 90,7±5,8* | 94,5±4,7* | 117,5±4,2 |
| c-тус | | | | |
| Концентрация поли(A) ⁺ | 17,0±0,6 | 18,1±1,0 | 28,0±1,2*** | 29,4*** |
| -“- поли(A) ⁺⁺ | 30,5±1,0 | 23,8±1,2 | 24,5±1,0 | 24,0±1,2 |
| Индекс стабильности, % | 180±10 ^{ΨΨ} | 132±8 ^{ΨΨ} | 87,5±7 | 81,8±7 |

Достоверность относительно 1-ой группы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; достоверность относительно 4-ой группы; ^Ψ – $p < 0,05$; ^{ΨΨ} – $p < 0,01$.

В печени животных, получавших основной рацион, отмечается довольно высокая концентрация поли(A)⁺⁺ – 24,5 тыс. имп. и стабильность – 116,5%, у крыс на рационах с имбалансом эти показатели существенно ниже (p<0,05).

Иная картина получена по концентрации и стабильности мРНК протоонкогена c-myc. Наиболее высокой стабильность оказалась на основном кукурузном рационе. Здесь концентрация поли(A)⁺⁺ фракции составила 30,5 тыс. имп., что на 27-30% больше, чем у крыс на рационах с имбалансом аминокислот и скорректированном. Об увеличении экспрессии гена c-myc в условиях голодания, в том числе белкового, сообщалось и в других работах (Т. Kanamoto e.a., 1999).

Известно, что регуляция пищевого поведения осуществляется под контролем структур головного мозга. Поэтому представляло интерес изучить уровень и стабильность мРНК eEF-1α в мозге крыс (таблица 9).

Таблица 9

Концентрация и индекс стабильности мРНК eEF-1α в мозге крыс (n=4)

| Показатели | Основной рацион 1-я группа | Имбаланс лизина 2-я группа | Имбаланс триптофана 3-я группа | Скорректи- рованный 4-я группа |
|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| I-й опыт (100% НАК) | | | | |
| Концентрация поли(A) ⁺ | 18,6±1,1 | 20,0±1,0 | 15,9±0,7 ^{**} | 17,5±0,6 |
| -“- поли(A) ⁺⁺ | 24,0±0,9 | 27,9±1,2 | 15,4±1,0 ^{**} | 20,6±0,8 [*] |
| Индекс стабильности, % | 121±8 | 139±7 | 97,2±6 ^{**} | 117,4±8 |
| II-й опыт (150% НАК) | | | | |
| Концентрация поли(A) ⁺ | 16,5±0,6 | 17,8±1,0 | 14,6±0,8 [*] | 17,0±1,0 |
| -“- поли(A) ⁺⁺ | 18,7±0,7 | 18,2±1,0 | 16,6±0,4 [*] | 20,6±1,2 |
| Индекс стабильности, % | 113,3±6 | 102±6 | 114±5 | 121,3±8 |

Достоверность относительно 1-ой группы: * – p<0,05; ** – p<0,01.

Самая низкая концентрация поли(A)⁺ и поли(A)⁺⁺ мРНК eEF-1α, как в первом так и во втором опытах оказалась в мозге крыс на рационе с имбалансом триптофана (p<0,01). В остальных группах эти показатели в опытах на крысах были довольно близкими. По данным В.Г. Рядчикова и др., (2007), концентрация свободных аминокислот в целом мозге цыплят на рационах с имбалансом лизина и треонина, на основном и скорректированном рационах сохраняется на одинаковом уровне, что объясняется способностью структур мозга регулировать состав и концентрацию свободных аминокислот на го-

меостатическом уровне. По-видимому, при имбалансе триптофана, в отличие от имбаланса лизина, происходят более значительные нарушения в мозге, что доказывается более низкой концентрацией мРНК eEF-1 α , более сильным подавлением аппетита и роста у животных, чем при имбалансе лизина.

Опыт на поросятах. В результате добавления к монозерновому кукурузному рациону смеси аминокислот до 100% нормы потребности, без лизина или триптофана, как и в опытах на крысах, приводило к снижению потребления корма на 8,8 и 21,9%, среднесуточных приростов на 18,6 и 66,8% (221 против 180 и 80 г) соответственно (таблица 10). На скорректированном рационе в результате балансирования кристаллическими аминокислотами среднесуточный прирост составил 580 г., или в 2,62 раза больше, чем на основном рационе. На рационе, сбалансированном за счет добавления соевого шрота, приросты, несмотря на значительный более высокий уровень белка составили 470 г или на 19% меньше, что являлось для нас весьма неожиданным.

Таблица 10.

Потребление корма и рост свиней на рационах с разным балансом незаменимых аминокислот (n=12)

| № группы | 1-я | 2-я | 3-я | 4-я | | 5-я |
|------------------------------------|----------------------|-----------------|---------------------|-------------------|------------------|-----|
| | | | | Скорректированный | | |
| Показатели | Основной рацион (ОР) | Имбаланс лизина | Имбаланс триптофана | + до 100% НАК* | +25% соев. шрота | |
| Содержание: белок, % | 10,7 | 11,4 | 11,9 | 12,0 | 16,7 | |
| лизин, г/кг | 2,7 | 2,7 | 9,0 | 9,0 | 9,0 | |
| триптофан, г/кг | 0,7 | 1,8 | 0,7 | 1,8 | 2,0 | |
| Ж.м. на нач. опыта, кг | 18,3±0,5 | 18,4±0,8 | 18,7±0,7 | 18,7±0,8 | 18,6±0,5 | |
| Потребление корма, кг/гол в день | 1,14±0,1 | 1,04±0,02 | 0,89±0,06 | 1,28±0,06 | 1,15±0,08 | |
| в % к ОР | 100 | 91,2 | 78,1 | 112,2 | 100,9 | |
| Среднесут. прирост, г | 221±11 | 180±12 | 80±13 | 580±25** | 470±21 | |
| в % к ОР | 100 | 81,4 | 36,2 | 262,4 | 212,6 | |
| Затраты корма на 1 кг прироста, кг | 5,16±0,8 | 5,78±0,6 | 11,1±0,9 | 2,2±0,3 | 2,45±0,2 | |
| Затраты белка на 1 кг прироста, г | 459 | 601 | 1154 | 233 | 431 | |

* -НАК – незаменимые аминокислоты.

Объяснить более низкие показатели продуктивности животных 5-й группы на рационе с 16,7% белка по сравнению с приростами в 4-й группе на

рационе, сбалансированном по принципу идеального белка (12%), можно значительным избытком нелимитирующих аминокислот. Поедаемость корма у свиней 5-й группы была на 10,2%, приросты – на 19,2% меньше, чем в 4-й.

Самые высокие показатели переваримости и отложения азота отмечены у животных 4-й группы (таблица 11). Отложение азота у свиней на основном рационе и при имбалансе было значительно меньше ($p < 0,01-0,001$). В группе с имбалансом триптофана отложение азота, как в г/гол., так и в % от потребленного – почти в 2 раза меньше чем на основном рационе и в 4,5 раза меньше, чем у свиней 4 группы на скорректированном рационе.

Таблица 11.

Переваримость и отложение азота у свиней (n=3)

| № группы | 1-я | 2-я | 3-я | 4-я | | 5-я |
|---------------------------------|----------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|------------------|-----|
| | | | | Скорректированный | | |
| Показатели | Основной рацион (ОР) | Имбаланс лизина | Имбаланс триптофана | +100 НАК | +25% соев. шрота | |
| | | | | Коэфф. переваримости N, % | 84,3±2,1 | |
| Отложение N, г/гол в сутки | 5,98±0,7 | 5,81±0,4 | 3,15±0,2 | 14,12±0,8 | 13,43±0,6 | |
| Отложение N, % от потребленного | 31,9±1,2 | 29,05±1,4 | 17,93±0,9 | 44,42±1,8 | 36,93±1,3 | |

Исследования степени полиаденилирования суммарной мРНК печени поросят четко выявило резкое снижение количества мРНК с длинными поли(А) последовательностями в стрессовых условиях имбаланса (таблица 12).

Таблица 12.

Соотношение молекул с короткими поли(А)_n35°C и длинными поли(А)_n65°C поли(А) последовательностями в суммарной мРНК (n=4)

| № группы | 1-я | 2-я | 3-я | 4-я | | 5-я |
|---|------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------|-----|
| | | | | Скорректированный | | |
| Показатели | Основной рацион (ОР) | Имбаланс лизина | Имбаланс триптофана | +100 НАК | +25% соев. шрота | |
| | | | | Короткие поли(А) _n 35°C | 9,8±0,7 | |
| Длинные поли(А) _n 65°C | 8,0±0,4 ^ψ | 5,1±0,3 ^{ψψ} | 3,1±0,2 ^{ψψψ} | 11,7±0,6 | 6,5±0,4 ^{ψψ} | |
| (А) _n 65°C / (А) _n 35°C | 0,82±0,06 ^ψ | 0,47±0,04 ^{ψψ} | 0,31±0,05 ^{ψψψ} | 1,01±0,08 | 0,44±0,04 ^{ψψ} | |

Достоверность относительно 1-ой группы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; достоверность относительно 4-ой группы; ^ψ – $p < 0,05$; ^{ψψ} – $p < 0,01$.

Отношение $(A)_{n65^{\circ}\text{C}} / (A)_{n35^{\circ}\text{C}}$ при имбалансе лизина и триптофана составили 0,47 и 0,31, на основном и скорректированном рационах – 0,82 и 1,01 соответственно.

Весьма неожиданным для нас оказалось низкое количество стабильных поли(А) последовательностей мРНК в печени поросят, получавших рацион, сбалансированный за счет сои. Единственное объяснение этому может быть следующим: рацион кукуруза+соя несет свойства имбаланса в результате значительного избытка незаменимых аминокислот относительно первой лимитирующей – лизина (см. рис. 2). Этот опыт подтверждает, что балансирование за счет естественных кормов, аминокислотный состав которых далеко не соответствует нормам потребности, не позволяет создавать рационы с «идеальным белком». Поскольку аминокислоты не могут запасаться в организме наподобие жира и гликогена, от них приходится избавляться путём усиления деградации излишних аминокислот в организме животных. По-видимому этот путь в условиях острого имбаланса оказывается недостаточно эффективным. Поэтому снижение аппетита следует рассматривать как физиологически-обоснованную защитную реакцию организма от вредного избытка аминокислот.

ВЫВОДЫ

1. Имбаланс, как форма несбалансированности рационов по незаменимым аминокислотам, характеризуется не недостатком первой, а избытком нелимитирующих аминокислот. Основным признаком имбаланса является снижение потребления корма (ухудшение аппетита) и, как следствие этого, снижение роста.
2. Острота проявления имбаланса зависит от биологических свойств лимитирующей аминокислоты. Животные более остро реагируют на имбаланс триптофана, нежели лизина.
3. Рационы, сбалансированные по аминокислотам за счёт естественных кормов, несут свойства «естественного имбаланса» вследствие сверх - нормативного избытка аминокислот относительно первой лимитирующей.
4. Форма сбалансированности аминокислотного питания оказывает существенное влияние на экспрессию генов: на скорректированных рационах уровень суммарной РНК в печени крыс выше, по сравнению с уровнем на низкобелковом основном рационе; при имбалансе концентрация суммарной мРНК оказывается такой же высокой, как при сбалансированном по аминокислотам питании. Поэтому уровень суммарной РНК в печени не является надёжным тестом интенсивности отложения белка и роста животных.

5. Стабильность мРНК в печени при имбалансе существенно снижается в сравнении со стабильностью у крыс на низкобелковом рационе и более существенно в сравнении со стабильностью на скорректированном рационе. С учетом наших и данных других исследователей, снижение стабильности, по-видимому, обусловлено более интенсивным оборотом короткоживущих белков-ферментов деградации излишних аминокислот при имбалансе и соответствующих короткоживущих мРНК.
6. Имбаланс вызывает снижение стабильности мРНК фактора элонгации трансляции eEF-1 α в печени. Высокий уровень стабильных форм и индекс стабильности мРНК eEF-1 α характерен для хорошо сбалансированного по аминокислотам питания на уровне идеального белка.
7. Повышение стабильности мРНК протоонкогена c-myc на низкобелковом основном рационе и при имбалансе лизина свидетельствует о разнонаправленной экспрессии специфических генов при разных формах баланса незаменимых аминокислот в питании животных.
8. В мозге крыс резко снижается количество и стабильность мРНК eEF-1 α при имбалансе триптофана, что находится в прямой зависимости с резким снижением потребления корма и роста животных. При низкобелковом, имбалансе лизина и скорректированном питании уровень стабильной фракции и индексы стабильности были примерно одинаковыми при 100% добавлении аминокислот. При более высокой нагрузке нелимитирующими аминокислотами стабильность мРНК eEF-1 α в мозге крыс понижается в группах на низкобелковом рационе и с имбалансом лизина, что совпадает с снижением потребления корма. Это свидетельствует о наличии регулирующей роли аминокислотного питания на функции головного мозга в пищевом поведении животных.
9. Снижение аппетита при имбалансе следует рассматривать как защитную реакцию животных, направленную на уменьшение поступления в организм неостребованных аминокислот, освобождение от которых из организма сопряжено со значительными затратами в организации их нейтрализации.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

В практику откорма свиней, в соответствии с «идеальным балансом» аминокислот, рекомендуем максимально использовать синтетические аминокислоты промышленного производства. Наши исследования на молекулярном уровне свидетельствуют, что можно снизить общий уровень протеина в рационе на 30-50%, относительно существующих норм без ущерба в физиологии и продуктивности животных.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Полежаев С.Л. Стабильность мРНК при балансе и имбалансе аминокислот у животных на примере лизина и триптофана// Сборник докладов второй краевой школы-семинара молодых ученых «Научное обеспечение сельскохозяйственного производства». – НИИ РИСА. - 1997 г.
2. Полежаев С.Л., Рядчиков В.Г., Омаров М.О. Дифференциальная стабильность мРНК эукариот в отпр системе: новое в биотехнологии // Второй съезд биохимического общества Российской академии наук. - 19-23 мая 1997. -Москва, Пушкино.
3. Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Новиков Б.Н., Алексеенко Ж.В., Бибишев В.А., Полежаев С.Л., Рядчиков В.Г. Посттранскрипционная регуляция генов эукариот: влияние на стабильность мРНК// Генетика. - 1998. - Т. 34 – С. 1205-1211.
4. Полежаев С.Л., Омаров М.О., Рядчиков В.Г., Плотников В.К., Бакалдина Н.Б. Влияние баланса и имбаланса лизина и триптофана на стабильность мРНК у белых крыс // Материалы международной конференции, посвящённой 80 - летию профессора Викторова П.И., Краснодар, 1998г С 93-94.
5. Полежаев С.Л., Омаров М.О., Рядчиков В.Г., Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Бибишев В.А., Новиков Б.Н., Алексеенко Ж.В. Влияние качества аминокислотного питания на стабильность мРНК животных // Сборник научных трудов РАСХН «Проблемы повышения качества зерна пшеницы и других зерновых культур». Москва, 1998. - С. 248-255.
6. Полежаев С.Л., Омаров М.О., Рядчиков В.Г., Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Бибишев В.А. Молекулярно-биологические аспекты действия имбаланса незаменимых аминокислот на моногастричных животных// В кн.: Научные основы ведения животноводства и кормопроизводства. Сборник научных трудов СКНИИЖ. - 1999. – С. 345-354.
7. Омаров М.О., Полежаев С.Л. Повышение эффективности использования кормов на основе балансирования рационов молодняка свиней по лизину и триптофану. В кн.: Актуальные проблемы научного обеспечения увеличения качества кормов и эффективного их использования. (международная конференция) Краснодар, 2001, - С. 253 – 254.
8. Рядчиков В.Г., Полежаев С.Л., Тарабрин И.В. Реакция животных на баланс и имбаланс незаменимых аминокислот – безусловный рефлекс //Актуальные проблемы в животноводстве. – Боровск. - 2006. – С. 87-89.
9. Насонов А.И., Полежаев С.Л., Радуль А.П., Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Взаимосвязь содержания катионов магния (Mg⁺⁺), стабильности РНК и интенсивности метаболизма в клетках эукариот // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – Краснодар, 2008. №2 (11). – С 104-110.

Подписано в печать

формат 60x84, ¹/₁₆

Бумага офсетная

Офсетная печать

Печ. л. 1,0.

Заказ №

Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии КубГАУ

350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13