

На правах рукописи

Гаглошвили Анатолий Анатольевич

Углеводный обмен, неспецифическая резистентность
и продуктивность свиней на низкопротеиновых рационах
с различными уровнями аминокислот и энергии

03.01.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Боровск - 2010

Диссертационная работа выполнена в лаборатории иммунобиотехнологии ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных»

Научный руководитель- доктор биологических наук, профессор
Галочкин Владимир Анатольевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Дудин Виталий Иванович
кандидат биологических наук, доцент
Саковцева Татьяна Владимировна

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства

Защита состоится 30 июня 2010 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006.030.01 во 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(48438) 42088

Автореферат диссертации разослан 26 мая 2010 года и размещён на официальном сайте института www.bifip2006.narod.ru 25 мая 2010 года

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

В.П.Лазаренко

Общая характеристика работы

1.1. Актуальность работы

Специфические особенности свиней в сравнении с другими сельскохозяйственными животными делают их одним из приоритетных видов в решении задач продовольственной безопасности страны. Свиньи - скороспелые, многоплодные, всеядные животные с высокой энергией роста и высокой степенью трансформации питательных веществ корма в высококачественную продукцию.

Существующие нормы кормления свиней, при всей глубине проработки, не всегда продолжают удовлетворять возрастающим требованиям – быстрому производству продукции за счет ускорения синтетических процессов в организме растущих, откармливаемых и племенных животных, получению продукции высоких пищевых достоинств и повышению конверсии питательных веществ корма в продукцию. В наше время сохраняется актуальность новых разработок, совершенствование норм кормления, уточнение принципов и способов оценки питательности кормов на основе современных достижений биохимии питания животных и фундаментальных знаний обмена веществ и механизмов его регуляции.

В последние годы усилия многих ученых направлены на совершенствование системы полноценного питания свиней, в которой важное значение придают обеспечению животных высококачественным белком, содержащим в определенном количестве и соотношении все заменимые и незаменимые аминокислоты (концепция идеального протеина) (Рядчиков В.Г. и др., 2000; Thong H.T., Liebert F., 2004; Stein H.H. et al., 2007). На основании этой концепции можно существенно снизить уровень сырого протеина в рационах свиней, обогатив их незаменимыми аминокислотами (Ниязов Н.А., 2005; Аверкиева О., 2007; Голушко В.М. и др., 2008). Однако на этот счет в литературе имеются противоречивые данные. Так, (Smith J.W. et al., 1998) зарегистрировали снижение массы мышц и отложения белка в теле у свиней на низкопротеиновом рационе с добавками лимитирующих аминокислот, (Knowles

Т.А. et al., 1998) не выявили существенных изменений в массе мышц и отложения белка, а (Каширина М.В. и др., 2005) отметили положительные изменения.

В наше время заметно возросла роль биохимических тестов в мониторинге физиологического статуса сельскохозяйственных животных, обеспеченности их в основных элементах питания, адаптации к технологии содержания. В частности, первостепенное значение имеет изучение особенностей обмена углеводов в организме сельскохозяйственных животных с целью широкого использования отдельных показателей углеводного обмена для решения практических вопросов животноводства. Интенсивность и направленность углеводного обмена имеет прямые взаимосвязи с белково-аминокислотным, липидным и энергетическим обменами. Исследование обмена углеводов у свиней заслуживает особого внимания, поскольку они характеризуются повышенной интенсивностью липогенеза, главным образом, за счёт превращений углеводных компонентов.

Другой немаловажный аспект широкого внедрения интенсивных промышленных технологий производства животноводческой продукции связан с возникновением противоречий между биологическими и технологическими аспектами данной проблемы. Возникает ряд новых стресс-факторов, называемых технологическими. Низкобелковый рацион, в свою очередь, также выступает стрессором (Галочкин В.А. и др., 2007). Интенсификация процессов перекисного окисления липидов и избыточное образование свободных радикалов является неотъемлемым следствием стрессов любой природы. Данные нарушения функционирования системы антиоксидантной и иммунной защиты организма животных отрицательно сказываются на обмене веществ, сопротивляемости животных и, как следствие, на их продуктивности и качестве производимой продукции. В связи с этим является актуальным изучение антиоксидантного статуса сельскохозяйственных животных.

1.2. Цели и задачи исследования

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было изучение особенностей функционирования гликолиза, глюконеогенеза, цикла трикарбоновых кислот и их взаимосвязи у молодняка свиней в период интенсивного доращивания и откорма на низкопротеиновых рационах при различных соотношениях и уровнях заменимых и незаменимых аминокислот и обменной энергии и их влияния на продуктивные качества и неспецифическую резистентность животных.

В соответствии с указанной целью, в задачи исследования входило:

1. Изучить взаимосвязь интенсивности и направленности метаболизма углеводов с экспериментальными условиями белкового, аминокислотного и энергетического питания;
2. Выявить взаимосвязь интенсивности углеводного обмена с антиоксидантным статусом и неспецифической резистентностью организма животных;
3. Исследовать взаимосвязь показателей неспецифической резистентности с продуктивностью животных;
4. Изыскать возможность недопущения потерь продуктивности растущими и откармливаемыми свиньями при снижении в рационе уровня протеина, добавках синтетических незаменимых аминокислот и варьировании обменной энергии.

1.3. Научная новизна работы

Впервые изучены особенности функционирования гликолиза, глюконеогенеза, цикла трикарбоновых кислот и их взаимосвязи с неспецифической резистентностью и продуктивностью у интенсивно растущих и откармливаемых свиней в условиях пониженного содержания протеина в рационе с добавками синтетических незаменимых аминокислот и с различными уровнями обменной энергии.

1.4. Практическая значимость работы

Полученные данные будут использованы для усовершенствования системы питания свиней с целью разработки способов нормализации обмена веществ, повышения неспецифической резистентности, улучшения эффективности биоконверсии питательных веществ корма в компоненты мяса и повышения качества производимой продукции.

1.5. Положения выносимые на защиту:

1. С возрастом обмен пировиноградной кислоты в тканях интенсифицируется и усиливается вовлечение её в процессы митохондриального окисления.
2. Величины активности ключевых ферментов глюконеогенеза в печени свиней с возрастом имеют тенденцию к снижению.
3. В возрасте 65 суток наблюдается наивысшая интенсивность гликолитических процессов. С возрастом роль гликолиза в энергетике мышечной ткани снижается.
4. В организме свиней прослеживается положительная взаимосвязь функциональной активности системы редукции глутатиона с величинами каталитической активности ферментов углеводного обмена, и обратная связь интенсивности процессов липопероксидации с продуктивностью животных.

1.6 Апробация результатов исследований.

Материалы диссертационной работы доложены на:

14-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века».

1.7. Структура диссертации.

Диссертация изложена на 104 стр. компьютерного текста, содержит 10 таблиц, 7 рисунков. Включает следующие разделы: введение, обзор литературы, объект и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, предложения практике и список литературы, включающий 150 источников, в том числе 58 иностранных.

2. Объект и методы исследований

Для решения поставленных задач был проведен опыт в условиях вивария института ВНИИФБиП с.-х. животных на помесных поросятах (ландрас × крупная белая). В уравнительный период животные получали полнорационный комбикорм типа СК-5. После уравнительного периода по принципу аналогов с учетом живой массы, пола и возраста были сформированы три группы поросят по 16 голов в каждой, с начальной живой массой 21-22 кг. Содержание и кормление групповое. Опыт продолжался до достижения живой массы свиней 105-110 кг.

Животные 1-й (контрольной) группы в период выращивания получали комбикорма на ячменно-пшеничной основе с содержанием обменной энергии и лимитирующих аминокислот по детализированным нормам (Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Под ред. А.П. Калашникова и др., 2003), но со сниженным уровнем сырого протеина до 120 - 107 г/кг комбикорма (в зависимости от периода выращивания). У поросят 2-й группы количество сырого протеина было на уровне контрольной группы, а концентрация обменной энергии была увеличена на 5% и уровень лимитирующих аминокислот - на 22-33% путем дополнительного введения в рацион синтетических аминокислот - лизина, метионина и треонина. В комбикормах для свиней 3-й группы концентрация сырого протеина была повышена до 150-118 г путем добавки высокобелковых кормов и уровень обменной энергии повышен на 10% по сравнению с контрольной группой за счёт добавки подсолнечного масла (Табл.1). Количество лимитирующих аминокислот в 3-й группе было выше контроля на 40-52%. Рационы в опытных группах отличались разными соотношениями лизина и обменной энергии, а также отношением метионина+цистина и треонина к лизину (Табл. 2). В течение опыта проводили групповой учет потребления комбикорма, контролировали его химический состав и фиксировали расход корма, сырого протеина и обменной энергии на единицу прироста живой массы. С целью контроля за ростом

подопытных животных проводили взвешивания в начале и в конце каждого возрастного периода.

Таблица 1
Состав комбикормов для свиней, %

Компоненты	Период доращивания			Первый период откорма			Второй период откорма		
	Группы			Группы			Группы		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ячмень	71,5	69,5	60,0	77,5	75,5	66,4	66,5	63,5	53,2
Пшеница	20,0	20,0	20,0	10,0	10,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Кукуруза	-	-	-	-	-	-	10,0	10,0	15,0
Шрот соевый	4,6	4,8	13,0	-	0,4	7,5	-	0,7	4,5
Отруби пшеничные				9,0	9,0	-	-		
Масло растительное	0,4	2,2	3,5	-	1,65	2,6	-	2,3	3,8
Трикальций-фосфат	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Поваренная соль	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Мука известковая	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Премикс КС-3	1,0	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-
Премикс КС-4	-	-	-	1,0	1,0	1,0	-	-	-
Премикс КС-5	-	-	-	-	-	-	1,0	1,0	1,0

Таблица 2
Содержание питательных веществ и энергии в 1 кг комбикорма

Компоненты	Период доращивания			Первый период откорма			Второй период откорма		
	Группы			Группы			Группы		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ЭКЕ	1,24	1,30	1,36	1,19	1,25	1,31	1,22	1,28	1,34
Обменной энергии, МДж	12,4	13,0	13,6	11,9	12,5	13,1	12,2	12,8	13,4
Сырого протеина, г	120	122	152	114	114	135	107	107	118
Переваримого протеина, г	92	95	122	77	79	107	85	85,1	96,6
Лизина, г	7,7	9,4	10,8	6,85	8,36	9,61	5,9	7,20	8,28
Метионин+	4,6	6,1	7,0	4,45	5,84	6,67	4,0	5,25	6,0

цистин, г									
Треонина, г	4,8	6,3	7,2	4,25	5,63	6,47	3,8	5,03	5,78
Лизин/обменная энергия	0,62	0,72	0,79	0,57	0,67	0,73	0,47	0,55	0,60
Метионин+ цистин / лизин	60	65	65	65	69	69	68	72	73
Треонин / лизин	62	67	67	62	66	67	64	69	70
Сырого жира, г	24,9	43,0	55,7	38,7	39,2	46,6 2	22,8	45,7	61,2
Сырой клетчатки, г	41,2	41,3	40,9	47,6	46,3	40,5 8	39,7 3	39,8 1	37,9 5
Кальция, г	8,48	8,49	8,48	8,58	8,52	8,46	8,28	8,25	8,18
Фосфора, г	6,04	6,06	6,14	6,48	6,40	6,13	6,06	60,7	6,10

С целью изучения метаболизма углеводов в плазме крови определяли концентрацию низкомолекулярных метаболитов: пирувата, лактата и глюкозы. Концентрацию пировиноградной кислоты определяли по Фридеману и Хаугену (Прохорова М.И., Тупикова З.Н., 1965) в реакции с динитрофенилгидразином, последующей экстракцией образующихся гидразонов этилацетатом и выявлением гидразона пировиноградной кислоты содовым раствором и щелочью. Концентрацию молочной кислоты определяли по увеличению поглощения при 340 нм раствора образца плазмы крови с НАД и очищенной лактатдегидрогеназой. Концентрацию глюкозы анализировали с помощью набора реактивов Глюкоза ФС «ДДС». В основе принципа метода лежит глюкозооксидазная реакция, с последующей цветной реакцией образующейся перекиси водорода с фенольным субстратом, катализируемой пероксидазой.

В печени изучали активность фруктозодифосфатазы (КФ 3.1.3.11), пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1) и пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.2.2), а в образцах длинной мышце спины – активность пируваткиназы (КФ 2.7.1.40) и лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27). Выбор данных ферментов основывался на идентификации катализируемых ими реакций как неравновесных в процессах гликолиза и глюконеогенеза, а, следовательно, причастных к регуляции интенсивности и направленности метаболических потоков по этим циклам (Ньюсхолм Э., Старт К., 1977).

Активность лактатдегидрогеназы определяли по оптическому тесту с использованием набора реагентов ЛДГ-01-ВИТАЛ. В основе определения лежит детекция понижения светопоглощения раствора НАДН, инкубируемого с образцом и субстратом реакции (пируват). Активность пируватдегидрогеназы определяли с применением красителей тетразолиевого синего и феназин-метасульфата (Методы биохимического анализа, 1997). Последний служит акцептором водорода пируватдегидрогеназы и переводит тетразолиевый краситель в восстановленную форму – формазан, нерастворимый в воде. Далее формазан экстрагируется ацетоном и спектрофотометрируется при 570 нм. Активность пируваткарбоксилазы определяли с применением кинетической методики с инкубированием пробы с субстратом (пируват натрия) и карбоксилирующим агентом (гидрокарбонат калия) в присутствии активаторов и НАДН. В основе метода лежит фиксирование понижения светопоглощения образца вследствие восстановления пиридиннуклеотидами образующейся щавелевоуксусной кислоты. Активность фруктозодифосфатазы анализировали по увеличению концентрации неорганического фосфора в растворе при инкубации образца с субстратом гидролиза (фруктозо-1,6-дифосфат). Фосфор определяли с помощью ванадат-молибдатного реактива. Активность пируваткиназы мышечной ткани анализировали по убыли НАДН, идущего на восстановление пирувата, образующегося в ходе пируваткиназной реакции из субстрата (фосфоенолпируват).

Для оценки неспецифической резистентности были определены следующие показатели: концентрация в плазме крови сульфгидрильных групп низкомолекулярных соединений (глутатион восстановленный + цистеин), дисульфидных групп низкомолекулярных соединений (глутатион окисленный + цистин) и концентрация малонового диальдегида. Для определения тиоловых групп в плазме крови применяли раствор дитионитробензойной кислоты в фосфатном буфере (ДТНБ, реактив Элмана) (Соколовский и др., 1997). Образующийся в ходе восстановления нитротиобензоат (НТБ) определяли фотометрически при 412 нм. Дисульфидные группы оттитровывали раствором

нитротисульфобензойной кислоты (НТСБ), который готовили по модифицированной нами методике (Thannhauser et al., 1984) окислением водного дитионитробензоата кислородом воздуха в чашке Петри на свету в присутствии сульфита натрия. После инкубации раствора нитротисульфобензойной кислоты с исследуемым образцом фотометрически определяли нитротибензоат. Концентрацию малонового диальдегида определяли фотометрически после кипячения с тиобарбитуровой кислотой материала осаждённого из плазмы фосфо-вольфрамовой кислотой (Коробейникова, 1989).

Математическая обработка осуществлена с использованием t-критерия по Плохинскому Н.А. (1980).

Схема 1

Схема эксперимента

Возраст	→											
	65 суток			120 суток			165 суток			210 суток		
Группы:	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
СП:	-29	-29	-12%	-31	-31	-25%	-33	-33	-20%			
ОЭ:	+0	+5	+10%	-	-	-	-	-	-			
ЛА:	+0	+22-33	+40-52%	-	-	-	-	-	-			

СП – сырой протеин

ОЭ – обменная энергия

ЛА – лимитирующие аминокислоты

0 - норма

3. Результаты исследований

3.1. Углеводный обмен

Исследовали концентрации ключевых низкомолекулярных метаболитов углеводного обмена: молочной кислоты, пировиноградной кислоты и свободной глюкозы в плазме крови.

Судя по представленным данным (Табл. 3) концентрация глюкозы снизилась в течение периода доразщивания (с 5,88 ммоль/л) и претерпела незначительный подъём в течение двух последующих периодов откорма. Это го-

ворит о повышении роли жирных кислот в энергетическом обмене у свиней в позднем постнатальном онтогенезе. Между тем, Cериелло А. et al., 1996 предположили, что гипергликемия может повышать продукцию свободных радикалов, вызывая клеточную дисфункцию. Показано, что высокий уровень глюкозы может провоцировать окислительный стресс в клетках, повышая продукцию активных форм кислорода.

Концентрация пировиноградной кислоты оказалась достаточно стабильной и значимых межгрупповых различий нам выявить не удалось. Auoffen M., 2004 показал, что окислительные повреждения молекулы церулоплазмина, сопровождаемые потерей его ферментативной активности, предотвращаются пировиноградной кислотой. Таким образом, выяснилась роль пирувата в антиоксидантной системе организма.

Следует обратить внимание на показатель интенсивности гликолитических превращений углеводов (К), равный отношению концентрации молочной к пировиноградной кислоте в плазме крови. Обращает на себя внимание высокая интенсивность гликолитических процессов в возрасте 65 суток. Это мы объясняем изменением соотношения с возрастом гликолитических и липолитических процессов в пользу последних и трактуем как биологическую специфику вида.

Таблица 3

Концентрации глюкозы, пирувата и лактата в плазме крови у свиней разного возраста, $M \pm m$.

Возраст, сутки-группы	n	Глюкоза, ммоль/л	Пируват, ммоль/л	Лактат, ммоль/л	К
65-фон	3	5,88±0,28	0,056±0,006	1,39±0,01	24,8
120 - 1	4	3,08±0,58	0,11±0,006	1,18±0,20	10,7
120 - 2	4	3,43± 0,60	0,11±0,002	1,18± 0,13	10,7
120 - 3	4	4,18± 0,33	0,10± 0,006	1,10±0,08	11
165 - 1	4	4,3± 0,85	0,10± 0,003	0,97± 0,08	9,7
165 - 2	4	3,55± 0,83	0,08±0,006	1,10± 0,11	13,8
165 - 3	4	5,78± 1,18	0,09±0,004	1,07± 0,06	11,9
210 - 1	5	4,63±0,48	0,07±0,005	0,74±0,06	10,6
210 - 2	5	4,95± 0,70	0,08±0,008	0,82± 0,06	10,3
210 - 3	5	3,75±0,80	0,08±0,007	0,94± 0,11	11,8

Необходимо отметить, что молочная кислота является более лабильным показателем и повышенное содержание лактата в крови и мышечной ткани является типичным признаком стрессового состояния у свиней (Wirtz A. Bickhardt K., 1978). В нашем эксперименте наблюдалась выраженная тенденция возрастного снижения концентрации молочной кислоты в плазме крови животных (Рис.1).

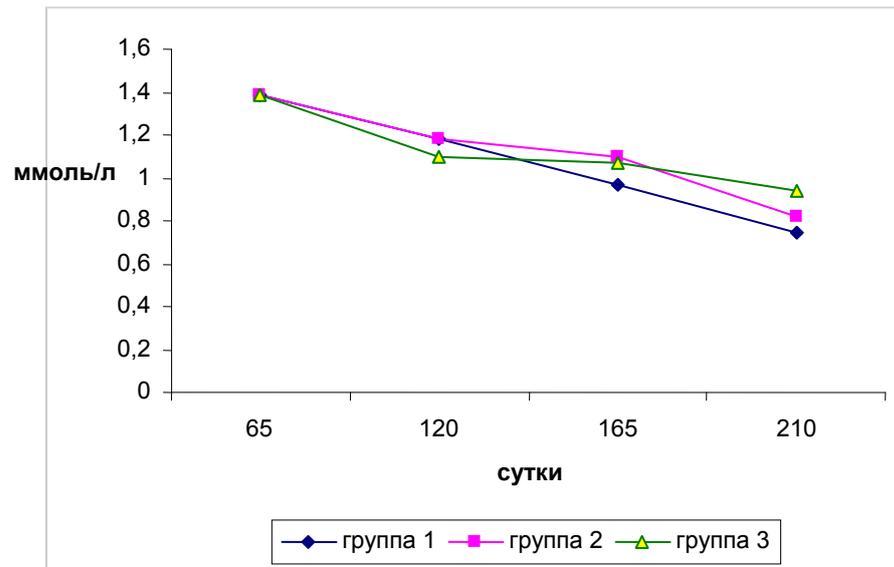


Рис.1 Возрастная динамика концентрации молочной кислоты в плазме крови

В основе этого, по-видимому, лежит увеличение использования жирных кислот в энергообеспечении органов и тканей в сравнении с углеводной компонентой.

Рассматриваемые низкомолекулярные метаболиты, за исключением глюкозы, активно используются в процессе глюконеогенеза. Представляется возможным по активности ключевого фермента данного процесса – фруктозодифосфатазы, судить о ресинтезе глюкозы (Табл. 4). В основе снижения интенсивности глюконеогенеза, по всей видимости, лежит увеличение использования кетокислот, образуемых в процессе деградации глюкозы, для синтеза аминокислот в органах и тканях свиней, растущих на рационах дефицитных по протеину (Малайдах Ф.П., 1975).

Таблица 4

Возрастные изменения активности фруктозодифосфатазы печени, (M±m).

Возраст, сутки	n	Фруктозодифосфатаза, мкмоль/ мин/г			Фруктозодифосфатаза, ммоль/мин/орган		
		Группы			Группы		
		1	2	3	1	2	3
65	3	27,3±9,24	-	-	15,75±5,33	-	-
120	4	12,33±5,85	10,1±3,73	6,5±1,58	10,69±5,07	9,67±3,57	6,81±1,66
165	4	3,65±1,15	3,85±1,39	9,4±2,62	4,26±1,34	4,64±1,67	13,63±3,80
210	5	5,12±1,39	5,16±0,74	3,82±0,92	7,14±1,94	7,11±1,0	5,45±1,31

Возрастное снижение активности выявлено также и для другого ключевого фермента глюконеогенеза - пируваткарбоксилазы печени (табл. 5, рис.2), на фоне отсутствия значимых межгрупповых различий. Реакция карбоксилирования пирувата обратима, но в физиологических условиях сдвинута вправо, поэтому во многих метаболических ситуациях ПК определяет лимитирующее звено всего процесса глюконеогенеза.

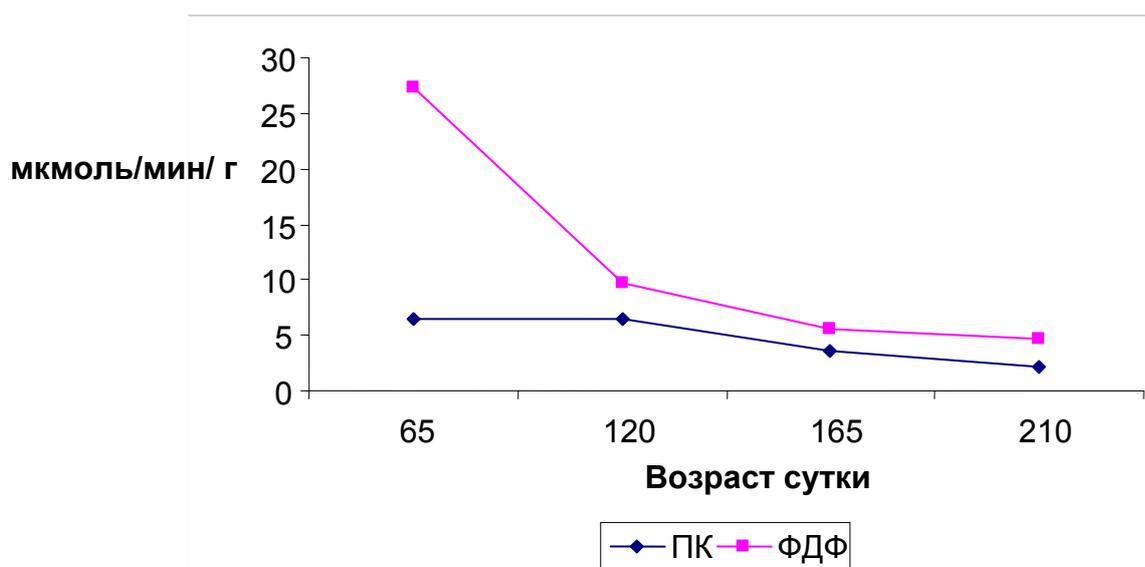


Рис.2 Возрастные изменения усреднённой удельной активности пируваткарбоксилазы (ПК) и фруктозодифосфатазы (ФДФ).

Уместно также отметить, что ферменты, связанные с пируваткарбоксилазой в процессе глюконеогенеза у крыс, ассоциированы во временный комплекс и меняют свою активность согласованно (Fahien L.A. et al., 2006).

Так, физиологические концентрации жирных кислот не оказывают стимулирующего действия на глюконеогенез, хотя в препаратах печени *in vitro* длинноцепочечные жирные кислоты стимулируют глюконеогенез, но только в присутствии субстратов для синтеза, поскольку сами жирные кислоты не служат непосредственными субстратами глюконеогенеза (Кендыш И.Н., 1985).

Таблица 5

Возрастные изменения активности пируваткарбоксилазы печени ($M \pm m$).

Возраст, сутки	n	Пируваткарбоксилаза, мкмоль/(мин·г)			Пируваткарбоксилаза, ммоль/мин/орган		
		Группы			Группы		
		1	2	3	1	2	3
65	3	6,44± 0,64	-	-	3,72±0,37	-	-
120	4	5,56± 1,43	7,01±0,8	6,76± 1,43	4,82±1,21	6,71±0,80	7,08± 1,51
165	4	4,17± 0,78	2,5±1,03	4,06± 0,87	4,87±0,92	3,01±1,23	5,89± 1,33
210	5	1,64± 0,39	3,09± 1,36	1,93± 0,75	2,29±0,54	4,26±1,87	2,76± 1,07

Метаболизм пирувата зависит преимущественно от соотношения активностей пируватдегидрогеназы и пируваткарбоксилазы, которые определяют степень его превращения в ацетил-коэнзим А либо глюкозу. Так, в опыте на свином сердце с мечеными пируватом и лактатом была показана доля карбоксилирования пировиноградной кислоты (3-6%) от потока метаболитов по циклу Кребса (Panchal A.R. et al., 2006). В свою очередь, пируваткарбоксилаза и пируватдегидрогеназа проявляют максимальную активность только при восстановленном состоянии своих тиоловых групп. Известно также, что продукт пируватдегидрогеназной реакции – ацетил-КоА является аллостерическим активатором пируваткарбоксилазы. Таким образом, налицо тесная

взаимосвязь концентрации пирувиноградной кислоты, активности тиоловых энзимов и антиоксидантного потенциала. В настоящее время идентифицированы заболевания, вызванные повышением свободно-радикальных процессов, в результате чего снижается активность пируватдегидрогеназы (Asanuma N., 2004). Ишемия мозга вызывает повышенное образование свободных радикалов, а они снижают активность пируватдегидрогеназного комплекса.

Таблица 6

Возрастные изменения активности пируватдегидрогеназы печени, (M±m)

Возраст, сутки	n	Пируватдегидрогеназа, нмоль/ (мин·г)			Пируватдегидрогеназа, мкмоль/мин/орган		
		Группы			Группы		
		1	2	3	1	2	3
65	3	1,92±0,49	-	-	1,11±0,28	-	-
120	4	1,04±0,3	1,55±0,45	1,7±0,46	0,9±0,23	1,48±0,52	1,78±1,02
165	4	2,12±0,88	2,78±0,68	3,29±0,69	2,48±0,78	3,35±0,43	4,77±0,97
210	5	8,62±0,17	7,7±0,37	6,74±1,37	12,02±0,24	10,61±0,5	9,62±2,0

На основании данных по активности пируватдегидрогеназного комплекса можно отметить тенденцию к более интенсивному включению пирувата в цикл трикарбоновых кислот с возрастом (табл.6). Кроме того, в возрасте 120 и 165 суток во второй и третьей группах активность комплекса повышается в сравнении с контролем, а в возрасте 210 суток зависимость обратная.

С другой стороны, необходимо иметь в виду, что жирные кислоты (в этих группах в рацион добавлено подсолнечное масло) обычно тормозят вход пирувата в цикл Кребса посредством торможения пируватдегидрогеназной реакции, которое заключается в ингибировании фермента ацетил-СоА и НАДН (Розанов А.Я., 1973; Кендыш И.Н., 1985). Поэтому в данном случае, возможно, дополнительное влияние оказывали другие факторы, например, белково-аминокислотного метаболизма и синтез жирных кислот из углеводов.

ных остатков. Также обращают на себя внимание противоположно направленные тенденции в возрастном изменении активности пируваткарбоксилазы и пируватдегидрогеназы, что закономерно, так как данные ферменты работают с одним и тем же субстратом - пировиноградной кислотой.

По результатам анализа активности пируваткиназы (Табл.7) в мышечной ткани, можно отметить, что у свиней второй опытной группы в период откорма активность фермента минимальна. Это мы связываем с уменьшением роли гликолиза и увеличением использования жирных кислот в энергетических процессах.

Таблица 7

Возрастные изменения активности пируваткиназы и лактатдегидрогеназы длиннейшей мышцы, ($M \pm m$)

Возраст, сут	n	Пируваткиназа, мкмоль/мин/г			Лактатдегидрогеназа, моль/мин/г		
		Группы			Группы		
		1	2	3	1	2	3
65	3	4,1±0,87	-	-	0,176±0,023	-	-
120	4	3,85±0,91	2,35± 0,71	1,22±0,64	0,158±0,006	0,15±0,007	0,15±0,004
165	4	0,63±0,13	0,49±0,1	0,86±0,23	0,303±0,006	0,318±0,019	0,328±0,023
210	5	2,18±1,01	0,84±0,18*	2,82±0,74*	0,232±0,028	0,26±0,036	0,248±0,032

Примечание: * $P \leq 0,05$ в сравнении с 1-й (контрольной) группой

В качестве примечательного факта следует отметить параллельное изменение активностей пируваткиназы и лактатдегидрогеназы с возрастом во всех группах. Данную динамику мы трактуем как изменение соотношения аэробного и анаэробного гликолиза в онтогенезе. Рост активности пируваткиназы и одновременное снижение активности лактатдегидрогеназы (аэробный гликолиз) свидетельствует о более интенсивном включении углеводных компонентов в синтез заменимых аминокислот. Обратные отношения величин активности этих ферментов (анаэробный гликолиз) указывают на интенсификацию процессов биосинтеза белка.

3.2 Неспецифическая резистентность

Основные показатели, в совокупности определяющие статус неспецифической резистентности организма опытных и контрольных животных представлены в таблице 8.

Таблица 8

Возрастные изменения показателей неспецифической резистентности в плазме крови у подопытных свиней ($M \pm m$)

Возраст, сутки-группы	n	МДА, нмоль/мл	SH, мкмоль/мл	SS, мкмоль/мл	ТДС
65 - фон	3	2,330± 0,01	0,385±0,09	0,175±0,04	2,2
120 - 1	4	2,320±0,172	0,404±0,10	0,192±0,05	2,1
120 - 2	4	1,950±0,231	0,462±0,08	0,159±0,04	2,9
120 - 3	4	2,135± 0,272	0,425±0,12	0,185±0,07	2,3
165 - 1	4	2,068±0,221	0,496±0,11	0,217±0,05	2,29
165 - 2	4	1,722±0,419*	0,559±0,11	0,188±0,06	3
165 - 3	4	1,803±0,108*	0,511±0,09	0,203±0,04	2,5
210 - 1	5	2,070±0,362	0,580±0,08	0,233±0,04	2,49
210 - 2	5	1,735±0,295*	0,650±0,11	0,215±0,06	3
210 - 3	5	1,935±0,230*	0,602±0,10	0,220±0,05	2,75

Примечание: МДА – малоновый диальдегид; SH – сульфгидрильные группы низкомолекулярных соединений (глутатион восстановленный + цистеин); SS – дисульфидные группы низкомолекулярных соединений (глутатион окисленный + цистин); ТДС – тиол-дисульфидное соотношение (SH / SS).* $P \leq 0,05$

Судя по представленным в таблице данным, при сравнении с 1-й (контрольной группой) животные второй группы явно лидировали по концентрации SH-групп, имели самое высокое тиол-дисульфидное отношение (Рис. 3) и самую низкую концентрацию вторичных продуктов перекисного окисления липидов ($P \leq 0,05$).

По величине показателей полученных у поросят в пределах одной группы можно судить об их изменении в онтогенезе. С возрастом концентрация SH-групп в плазме крови закономерно повышается. Повышается и

концентрация SS-групп, но в меньшей степени. В результате этого с возрастом повышается тиол-дисульфидное отношение.

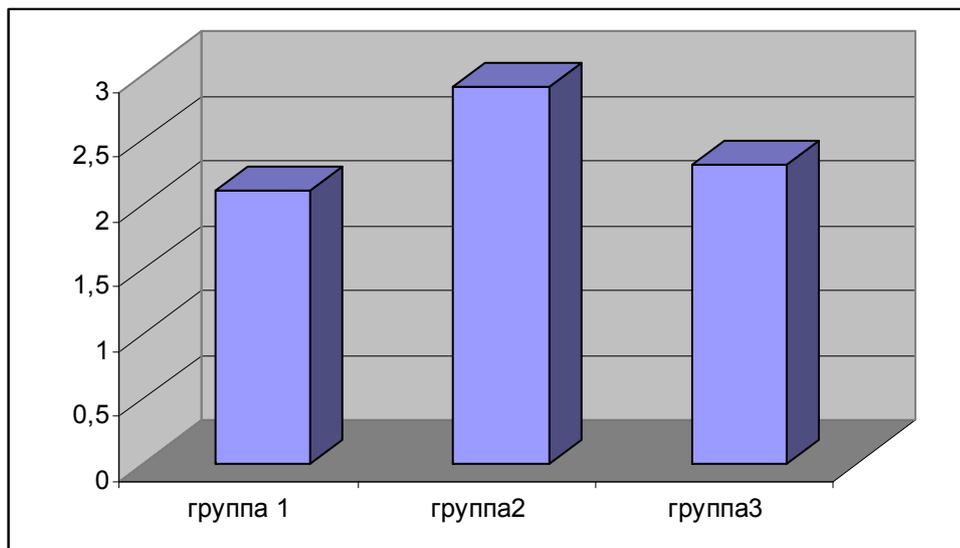


Рис. 3 Тиол-дисульфидное соотношение плазмы крови свиней в возрасте 120 дней

В плазме подопытных животных концентрация ТБК-продуктов изменялась противоположно динамике концентрации тиоловых групп и тиол-дисульфидного отношения (рис.4).

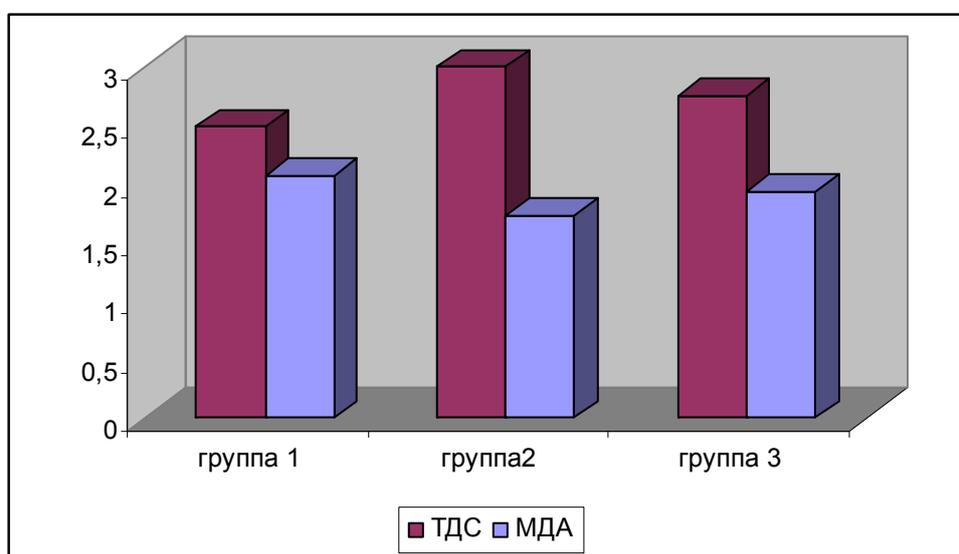


Рис.4 Тиол-дисульфидное соотношение и концентрация ТБК-активных продуктов в плазме крови свиней в возрасте 210 дней.

Это можно объяснить повышением с возрастом активности антиоксидантной системы организма, а с другой стороны уменьшением интенсивно-

сти роста на единицу массы и как следствие, уменьшение концентрации побочных продуктов метаболизма.

У поросят третьей группы, несмотря на большее содержание в рационе лимитирующих аминокислот, протеина и обменной энергией, вероятно, отмечалась недостаточная его сбалансированность и, как следствие, показатели резистентности несколько занижены в сравнении со второй опытной группой. Однако, как и у животных второй группы, у поросят третьей группы в плазме крови (по сравнению с животными контрольной группы) было выше содержание тиоловых групп и выше тиол-дисульфидное отношение, что характеризует несколько более высокий у них антиоксидантный статус.

Известно, что уровень SH групп в крови и тканях организма, обусловленный различными факторами, является в большой степени выражением интенсивности обменных процессов. Поэтому представляло интерес сопоставить показатели состояния тиол-дисульфидной системы с активностью ферментов углеводного обмена, типичным представителем которых является пируваткарбоксилаза печени (табл. 5). В литературе описана взаимосвязь окислительно-восстановительного состояния тиол-дисульфидной системы и активности ферментов. Так, Ramp K., 2005 предложил механизм конформационных изменений в активных центрах НАД-зависимых дегидрогеназ. При взаимодействии этих ферментов с НАДН восстанавливаются цистеиновые остатки, меняется структура ферментов и повышается доступность сульфгидрильных групп для окислительной атаки свободными радикалами. Именно этот механизм в настоящее время связывают с окислительными процессами сульфгидрильных групп и, как следствие, с обратимым снижением каталитической активности ферментов.

При анализе данных по трём группам обнаруживается положительная достоверная корреляция этих показателей в возрасте 120 и 210 дней (Рис. 5 и 6 соответственно).



Рис. 5. Корреляция концентрации сульфгидрильных групп низкомолекулярных соединений и величины активности пируваткарбоксилазы печени в возрасте 120 суток ($r = 0,79$, $P < 0,01$).



Рис. 6 Корреляция концентрации сульфгидрильных групп низкомолекулярных соединений и величины активности пируваткарбоксилазы печени в возрасте 210 суток ($r = 0,58$, $P < 0,1$).

При сопоставлении данных по неспецифической резистентности с зоотехническими показателями (Табл.9) можно прийти к выводу о синхронном изменении тиол-дисульфидного потенциала и продуктивности животных (рис.7). Так, еще Бойнович М.М. (1970) пришла к выводу, что увеличение среднесуточного прироста идёт параллельно с повышением концентрации SH групп в сыворотке крови свиней.

Таблица 9

Среднесуточный прирост и расход корма на кг прироста у свиней в период дорастивания и откорма

Показатели	Группы		
	1	2	3
65-120 суток			
Среднесуточный прирост, г	407±32	517±26	503±24
Расход корма на кг прироста, кг	3,97±0,32	3,13±0,16	3,22±0,18
120-165 суток			
Среднесуточный прирост, г	621±34	646±36	630±33
Расход корма на кг прироста, кг	3,76	3,61	3,7
165-210 суток			
Среднесуточный прирост, г	648±45	687±39	675±56
Расход корма на кг прироста, кг	4,51	4,25	4,32

Так, повышение показателей неспецифической резистентности привело к повышению интенсивности роста. Наблюдается самый высокий среднесуточный прирост и самый низкий расход корма на кг прироста у животных второй группы.

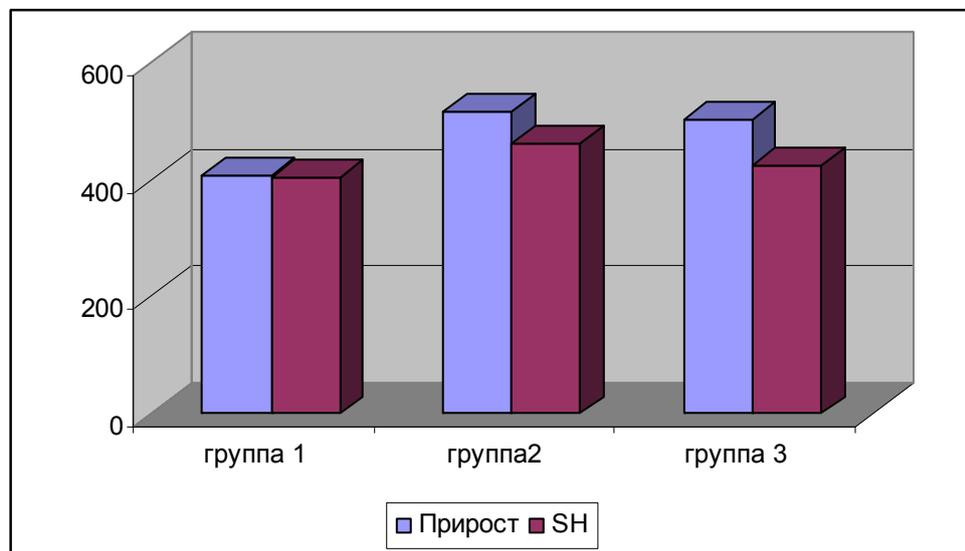


Рис.7 Среднесуточный прирост (г/сут) и концентрация тиоловых групп низкомолекулярных соединений (нмоль/мл) в возрасте 120 дней.

3.3 Продуктивность и расход корма

В конце периода дорастивания средняя живая масса поросят 2-й и 3-й групп оказалась выше на 15,1 и 14,2 % ($P<0,05$) соответственно, чем у животных контрольной группы, а среднесуточные приросты живой массы поросят составили в опытных группах 517 ± 26 ($P<0,05$) и 503 ± 24 г ($P<0,05$), а в контрольной 407 ± 32 г (табл. 9). Затраты корма на 1 кг прироста у поросят опытных групп были на 21,1 и 18,9% ниже по сравнению с контрольной. Затраты сырого протеина на 1 кг прироста у поросят 2-й группы был на 17,8 % ниже по сравнению с контролем (табл.10). Поросята 3-й группы тратили несколько больше сырого протеина в сравнении контрольной. Аналогичная картина отмечена и по затратам обменной энергии на кг прироста у животных опытных групп и она была ниже на 17,3 и 10,5%, чем у животных контрольной группы.

Таблица 10

Прирост живой массы, расход сырого протеина и обменной энергии на кг прироста

Показатели	Группы		
	1	2	3
Период дорастивания (65-120 суток)			
Прирост живой массы, кг	25,24±1, 98	32,06±1,6 3*	31,16±1,4 9*
Расход сырого протеина, г	476,4	375,0	482,3
Расход обменной энергии, МДж	49,23	40,69	44,05
Первый период откорма (120-165 суток)			
Прирост живой массы, кг	27,32±2, 11	28,42±2,9 6	27,72±2,9 5
Расход сырого протеина, г	428	412	500
Расход обменной энергии, МДж	44,92	45,35	48,72
Второй период откорма (165-210 суток)			
Прирост живой массы, кг	31,12±4, 40	32,98±4,1 8	32,43±3,5 5
Расход сырого протеина, г	482	459	510

Расход обменной энергии, МДж	55,0	54,5	58,0
За весь период откорма (120-210 суток)			
Прирост живой массы, кг	58,44±3,87	60,41±4,05	60,15±3,58
Расход сырого протеина, г	459	444	505
Расход обменной энергии, МДж	50,28	51,07	50,37

* $P < 0,05$ при сравнении с 1-й (контрольной группой)

К концу откорма (210 суток) разница в живой массе по группам между контрольной и 2-й и 3-й группами составила 9,03 кг (8,6%) и 8,31 кг (7,91%), а между опытными группами разницы не отмечено. Валовой прирост, полученный за период откорма, был высоким у свиней 2-й группы. Среднесуточные приросты живой массы животных трех подопытных групп составили 635±43; 656±48 и 654±45г соответственно.

Переваримость протеина корма и степень использования животными азота также подтверждает отмеченные изменения в интенсивности роста в зависимости от уровня обеспеченности организма поросят аминокислотами и энергией. Так, у поросят 2-й группы использование азота, как от принятого, так и от переваренного, были выше по сравнению с таковыми у 1-й и 3-й групп (Ниязов Н., 2009), что свидетельствует о более эффективном использовании у них азотистых веществ. Исходя из этих данных, можно считать, что улучшение обеспеченности организма поросят суммарным количеством аминокислот и обеспечение их оптимального (идеального) соотношения нужно рассматривать как один из важнейших факторов повышения эффективности использования азотистых веществ и продуктивности животных. В условиях эксперимента аминокислотная обеспеченность «идеальным» (оптимальным) соотношением незаменимых аминокислот, а также энергией в полной мере была характерна для поросят 2-й группы. В то же время у поросят 3-й группы по сравнению с 1-й и 2-й группами имело место повышение переваримости азотистых веществ корма. Повышение переваримости протеина корма в 3-й группе обусловлено, по всей видимости, более высоким

содержанием в составе комбикорма высокопереваримого белкового компонента - соевого шрота. При этом у поросят 3-й группы имело место наибольшее выведение азота с мочой, что вполне естественно, поскольку они больше потребляли азота корма. Соответственно у них в метаболический пул поступало избыточное количество аминокислот, не относящихся к лимитирующим, а это и по биологическим, и по экономическим, и по экологическим соображениям следует рассматривать как отрицательный фактор.

Различия по эффективности использования азота у поросят разных групп нашли отражение в убойных и мясных качествах. Исследование состава туши при убое в конце периода доращивания показало, что у свиной опытных групп по сравнению с контролем было больше содержание мякоти в туше, убойный выход был выше, масса туши, а относительное содержание сала было меньше (Родионова О.В., Кальницкий Б.Д., 2010). Отношение количества мякоти к выходу жира в опытных группах было более высоким. Также, выявлено повышенное содержание белка в длиннейшей мышце у поросят опытных групп по сравнению с контролем.

4. Заключение

Подводя итоги всему полученному экспериментальному материалу можно заключить, что все три испытанных рациона с различными уровнями протеина, незаменимых аминокислот и энергии можно отнести к биологически адекватным, удовлетворяющим пластические и энергетические потребности поросят и свиной разного возраста, поддерживающим здоровье животных и позволяющим на протяжении всего технологического цикла производства свинины получать вполне удовлетворительные приросты живой массы животных.

Нами отмечено отсутствие выраженных достоверных различий по величинам концентрации метаболитов и каталитической активности изученных в эксперименте ключевых и регуляторных ферментов углеводного обмена между животными контрольной и обеих опытных групп. Это свидетельствует о достаточно высоких биологических качествах всех разработанных и испы-

танных рецептур комбикормов. Предложенные низкобелковые рационы не выступают стрессорами для растущих и откармливаемых свиней.

Увеличение уровня обменной энергии на 5 %, лизина, метионина и треонина на 22 – 33 % с одновременным снижением содержания протеина до 12,2 - 10,7 % в рационе животных в период доращивания и откорма проявило себя наиболее оптимальным из испытывавшихся вариантов. Именно группа животных, находившаяся на указанных условиях белково-аминокислотного и энергетического питания продемонстрировала лучшие характеристики неспецифической резистентности, продуктивности и использования азотистых веществ, что в совокупности и позволяет наметить реальные перспективы и пути существенного повышения эффективности использования в кормлении свиней зерна злаковых культур, содержащих низкий уровень протеина.

Руководствуясь соображениями о центральной регуляторной роли в организме системы редукции глутатиона, мы сочли логичным уделить пристальное внимание этому критерию. Тиол-дисульфидное отношение, как нам это представляется, совершенно оправданно и аргументировано может быть отнесено к числу важнейших регуляторных параметров, способных объективно, информативно и оперативно характеризовать функциональное состояние систем ответственных за общую неспецифическую резистентность, за способность организма преодолевать метаболические стрессы, обусловленные взрывом свободнорадикальных реакций и липопероксидации.

Более того, полученные нами экспериментальные данные указывают на связь концентрации сульфгидрильных групп в крови и активности ферментов углеводного обмена в тканях животных, типичным представителем которых является пируваткарбоксилаза печени. При сопоставительном анализе данных по трём группам животных нами обнаружена положительная корреляция этих показателей в возрасте животных 120 и 210 дней.

При проецировании данных по неспецифической резистентности на зоотехнические показатели можно прийти к выводу о параллельном изменении тиол-дисульфидного потенциала и продуктивности животных. Увеличение

среднесуточного прироста идёт достаточно синхронно с повышением концентрации SH групп. Нами отмечен самый высокий среднесуточный прирост и самый низкий расход корма на кг прироста у животных второй группы, которые явно лидировали по концентрации SH-групп, имели самое высокое тиол-дисульфидное отношение и самую низкую концентрацию вторичных продуктов перекисного окисления липидов.

У поросят третьей группы, несмотря на большее содержание в рационе лимитирующих аминокислот, протеина и обменной энергией, вероятно, отмечалась недостаточная его сбалансированность и, как следствие, показатели резистентности были несколько занижены в сравнении со второй опытной группой. Однако, как и у животных второй группы, у поросят третьей группы в плазме крови (по сравнению с животными контрольной группы) было выше содержание тиоловых групп и выше тиол-дисульфидное отношение, что характеризует имевшийся у них более высокий антиоксидантный статус.

С нашей точки зрения все сказанное логично вписывается в современный контекст понимания неуклонно возрастающей роли и значимости биохимических тестов в оценке физиологического статуса сельскохозяйственных животных, расшифровке степени обеспеченности их в основных элементах питания, адаптации к технологиям выращивания. На настоящем уровне продуктивности сельскохозяйственных животных только новые успехи в раскрытии глубинных биохимических механизмов регуляции обмена веществ и энергии и в разработке новых способов направленного на них воздействия позволят решить практические проблемы, стоящие перед животноводами по дальнейшей интенсификации отрасли.

5. Выводы

1. Увеличение уровня обменной энергии на 5% и лимитирующих аминокислот на 22-33% при одновременном снижении содержания протеина до 12,2-10,7% в рационе поросят в период доращивания и откорма обеспечили лучшие характеристики продуктивности и неспецифической резистентности.

2. Интенсивность гликолитических процессов у свиней максимальна в возрасте 65 суток и затем снижается. Это мы объясняем изменением соотношения с возрастом гликолитических и липолитических процессов в пользу последних и трактуем как биологическую специфику вида.
3. Величины активности ключевых ферментов глюконеогенеза в печени – пируваткарбоксилазы и фруктозодинфосфатазы - с возрастом имеют выраженную тенденцию к снижению ($P < 0,05$), что мы связываем с повышенным использованием кетокислот для синтеза аминокислот в органах и тканях свиней, растущих на рационах дефицитных по протеину, а не для ресинтеза глюкозы в печени.
4. Каталитическая активность пируватдегидрогеназного комплекса с возрастом повышается, свидетельствуя об усилении вовлечения пирувиноградной кислоты в процессы митохондриального окисления, метаболизма заменимых аминокислот и липогенеза.
5. Активность пируваткиназы в мышечной ткани, у свиней второй опытной группы в периоды откорма имеет наименьшие значения ($P < 0,05$), что мы связываем со снижением роли гликолиза и увеличением использования жирных кислот в энергетических процессах.
6. Активность пируваткиназы и лактатдегидрогеназы с возрастом во всех группах изменяется разнонаправлено и интерпретируется нами как критерий изменения соотношения аэробного и анаэробного гликолиза в онтогенезе.
7. Отсутствие выраженных достоверных различий по величинам каталитической активности ряда изученных ключевых и регуляторных ферментов и концентрации метаболитов между животными контрольной и обеих опытных групп, свидетельствует о достаточно высоких биологических качествах разработанных и испытанных рецептур комбикормов.

8. Доказано наличие положительной взаимосвязи интенсивности функционирования в организме тиол-дисульфидной системы и обратной связи процессов липопероксидации, с продуктивностью животных.
9. Полученные экспериментальные данные подтверждают существование связи между функциональной активностью систем антиоксидантной защиты организма и величинами каталитической активности ферментов углеводного обмена ($P < 0,05$).

6. Предложения практике

Полученные результаты будут использованы в совершенствовании системы питания свиней. Оптимальное содержание в 1 кг корма обменной энергии, протеина и лимитирующих аминокислот в рационе поросят-помесей в периоды доращивания и откорма составляет: 13,02, 12,55 и 12,81 МДж обменной энергии; 122, 114 и 107 г сырого протеина; 9,4, 8,36 и 7,2 г лизина; 5,9, 5,84 и 5,25 метионина+цистина; 6,1, 5,63 и 5,03 г треонина.

Список работ опубликованных по теме диссертации:

1. Гаглошвили А.А. Углеводный обмен у свиней в период интенсивного доращивания и откорма на низкопротеиновых рационах с различными уровнями обменной энергии и аминокислот [Текст] / А.А. Гаглошвили // Проблемы биологии продуктивных животных. -2009.- № 4.- С. 46-53.
2. Гаглошвили А.А. Неспецифическая резистентность свиней на фоне низкопротеиновых рационов с различными уровнями энергии и аминокислот [Текст] / А.А.Гаглошвили // Проблемы биологии продуктивных животных.- 2009.- №4.- С. 27-32.
3. Гаглошвили А.А. Неспецифическая резистентность свиней, содержащихся на низкопротеиновых рационах с добавками синтетических аминокислот [Текст] /А.А.Гаглошвили // Сборник тезисов 14

международной Пущинской школы-конференции молодых учёных
«Биология наука 21 века». Пущино – 2010. том 1 С.116.