На правах рукописи

Гвай Елена Геннадьевна

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ПРИСТЕНОЧНОГО СЛИЗИСТОГО СЛОЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА И ЕГО АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ У СВИНЕЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ

03.00.13 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

ТОМСК - 2007

Работа выполнена в лаборатории физиологии пищеварения НИИ биологии и биофизики Томского государственного университета

Научный руководитель — доктор биологических наук, профессор **Кривова Наталья Андреевна**

Официальные оппоненты: — доктор биологических наук, профессор **Васильев Владимир Николаевич**

доктор биологических наук, профессор **Морозов Игорь Александрович**

Ведущая организация — Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт - Петербург

Защита состоится «_28_»__марта_2007г. в ___час____мин. На заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при Томском государственном университете по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Томского государственного университета, г. Томск.

Автореферат разослан «____»_____2007г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук — Просекина Е.Ю

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследование становления физиологических функций в течение постнатального периода является одной из важнейших теоретических проблем физиологии. Период постнатального развития характеризуется выраженной зависимостью, как от наследственных факторов, так и от факторов внешней среды, значительными колебаниями морфофункциональных и метаболических процессов, взаимозависимостью динамики изменения функциональной активности висцеральных систем от функционального состояния регуляторных систем, которые также претерпевают значительные изменения [Журавлёв А.С., 1975; Аршавский И.А., 1982; Илюха В.А., 2001; Мельничук Д.О. 2001; Болдырев А.А., 2003]. Поэтому исследование становления физиологических функций в онтогенезе, и особенно, в постнатальный период является актуальной теоретической и практической проблемой. Особое значение имеют так называемые защитные функции организма, которые обеспечивают гомеостаз внутренней среды. к ним относятся в том числе и защитные функции пищеварительного тракта. Пищеварительный тракт является открытой системой организма, то есть системой, обеспечивающей взаимодействие организма с внешней средой наряду с такими системами, как дыхательная и мочеполовая. Основными структурными элементами защитных функций пищеварительного тракта являются его морфофункциональные механизмы, многочисленные лимфоидные скопления, пристеночный слизистый слой. Слизистый слой покрывает всю люминальную поверхность пищеварительного тракта и выполняет многочисленные защитные функции, в том числе недавно установленную антирадикальную защитную функцию [Мосин В.И., 1989; Бочкарёва Н.В. и др., 1999; Кривова Н.А. и др., 2002; Карпов А.Б. и др., 2003; Allen A. et al., 1977, 1978, 1985, 1990, 1993, 1997; Engel E. et al., 1995; Gum J.R., 1995; Brandizaeg P., 1996; Winterford C.M., 1999; Akiba Y. et al., 2000; Schreiber S. et al., 2000].

Особое значение имеет исследование становления защитных функций пищеварительного тракта у разных видов животных [Журавлёв А.С., 1975; Илюха В.А., 2001; Мельничук Д.О. 2001; Болдырев А.А., 2003], и, с практической точки зрения, у сельскохозяйственных животных, в том числе у свиней. Особенности функционирования пищеварительной системы у свиней определяют особый интерес исследователей к этой системе [Журавлёв А.С., 1975; Снитковский В.В., 1998; Илюха В.А., 2001; Мельничук Д.О. 2001; Болдырев А.А., 2003], однако становление защитных функций – секреции гликопротеинов слизи, формирование пристеночного слизистого слоя и его антирадикальной активности остаются почти не изученными.

Цель работы. Изучить становление защитных функций желудочно-кишечного тракта у свиней в постнатальном периоде.

Задачи исследования:

1. Изучить состав пристеночного слизистого слоя верхних отделов пищеварительного тракта у здоровых свиней трёх возрастных групп – поросята, подсвинки, свиноматки.

2. Изучить антиоксидантную и антирадикальную активность пристеночного слизистого слоя верхних отделов пищеварительного тракта у здоровых свиней в онтогенезе.
3. Провести анализ зависимости состава антиоксидантной и антирадикальной активности пристеночного слизистого слоя в разных отделах пищеварительного тракта у свиней разных возрастов от уровня секреции слизи, пепсина, интенсивности слущивания эпителия.

Научная новизна. Впервые установлен характер изменений состава гликопротеинов пристеночной слизи желудочно-кишечного тракта у здоровых свиней в онтогенезе. Проведено комплексное изучение состава гликопротеинов, пепсина и нуклеиновых кислот в секрете различных отделов желудка и кишечника в зависимости от возраста животных. Описаны возрастные изменения антиоксидантной и антирадикальной активности слизистого слоя пищеварительного тракта и плазмы крови у свиней разных возрастных групп.

Практическая значимость. Полученные данные могут стать физиологическим обоснованием для прогноза нарушений состояния пристеночного слизистого слоя пищеварительного тракта и разработки методов его коррекции в условиях промышленного свиноводства.

Положения, выносимые на защиту:

1. Структурно – функциональное состояние пристеночного слизистого слоя пищеварительного тракта изменяется у свиней самок в постнатальном периоде.
2. В постнатальном периоде у самок свиней прослеживаются изменения антирадикальной активности плазмы крови и пристеночного слизистого слоя. Антирадикальная активность пристеночного слизистого слоя не обнаруживает коррелятивных взаимосвязей с составом суммарных моносахаров полимеризованных и деградированных гликопротеинов.

Апробация работы. Результаты исследования были доложены на региональной научно-практической конференции «Научные основы агропромышленного комплекса» (Томск, 2003); межрегиональной конференции молодых учёных «Аграрная наука России в новом тысячелетии» (Омск, 2003); межрегиональной научно-практической конференции «Повышение устойчивости и эффективности агропромышленного производства в Сибири: наука, техника, практика» (Кемерово, 2003); международной научно-практической конференции «Актуальные аспекты экологической, возрастной и экспериментальной морфологии» (Улан – Удэ, 2004), на всероссийской конференции «Механизмы адаптации организма» (Томск 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов. Данные проиллюстрированы 22

таблицами, 1 рисунком. Библиографический указатель включает 203 источника, из них 112 – иностранные работы.

Вклад автора. Автор самостоятельно провела забор всех материалов от свиней всех возрастных групп, провела биохимические исследования по определению состава пристеночного слизистого слоя. Диссертационная работа выполнена под научным руководством доктора биологических наук, профессора Н.А. Кривовой, анализ антирадикальной и антиоксидантной активности плазмы крови и пристеночной слизи проведён под руководством О.Б. Заевой, которым диссертант выражает признательность и благодарность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Острые опыты были поставлены на свиньях-самках трёх возрастных групп: поросята 2-3 месячного возраста, подсвинки 6-8 месячного возраста и свиноматки 2-3 лет. В каждой группе было по 8 животных. В течение всей жизни свиньи содержались в типовых свинарниках ЗАО САГ свинокомплекс «Томский» на стандартном рационе. Для планового убоя выбирались только здоровые животные, что подтверждается клиническим осмотром и гельминтологическим обследованием. Убой проводился в соответствии с положением Ветеринарного Законодательства о правилах убоя животных на животноводческих комплексах и мясоперерабатывающих предприятиях.

Во время убоя собирали пробы крови, из которых после центрифугирования отбирали плазму и хранили её в замороженном состоянии до момента исследования антиоксидантной и антирадикальной активности.

После убоя извлекали начальный отдел пищеварительного тракта, промывали его проточной водой и выделяли следующие отделы: малая кривизна желудка, большая кривизна желудка, пилорический отдел желудка, проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки (1/3 ДПК), медиальный отдел двенадцатиперстной кишки (2/3 ДПК), дистальный отдел двенадцатиперстной кишки (3/3 ДПК), проксимальный отдел тощей кишки. Пристеночную слизь собирали шпателем с люминальной поверхности каждого отдела, замораживали её и хранили до момента проведения исследования при температуре – 20ºС.

Исследование слизи желудочно-кишечного тракта. Образцы желудочно-кишечной слизи после их размораживания подвергали гомогенизации в 5-ти кратном избытке физиологического раствора. При этом в анализ попадали полимеризованные гликопротеины, находящиеся на разных стадиях деградации. Подобный подход даёт возможность оценить активность выделения гликопротеинов в пристеночном слизистом слое.

Для выделения моносахаров полимеризованных гликопротеинов проводился ступенчатый кислотный гидролиз в специально подобранных условиях [А. Нойберг, Р.Д. Маршал, 1969]. Моносахара деградированных гликопротеинов находились в гомогенате в свободном состоянии.

Для определения сиаловой кислоты использовался кислотный гидролиз в 0,25 н H_2SO_4 в течении одного часа при температуре 80ºС [Warren L., 1959], для определения галактозы и фукозы – гидролиз в 2 н HCl в течении одного часа при температуре 100ºС, для определения гексозаминов – продолжение гидролиза в 2 н HCl до 5 часов при температуре 100ºС [Кук Д., 1979, Н.А.Кривова, 1994]

В полученных гидролизатах определяли концентрацию гексозаминов [G.Blix, 1940], галактозы [D.U.Handel, W.Kittlak, 1963], фукозы [Z.Dische, L.B.Shettles, 1948] и N - ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты [L.Warren, 1959].

Результаты пересчитывали на мл нативной слизи, взятой для анализа с учётом разведения пробы при гидролизе. Анализировали концентрацию отдельных моносахаров в том или ином отделе пищеварительного тракта, а также их сумму, что является показателем уровня секреции гликопротеинов пристеночного слизистого слоя.

Биохимический анализ внеструктурных компонентов желудочно-кишечной слизи. В гомогенате проб слизи определяли концентрацию белковых компонентов пристеночного слизисто слоя, для чего использовали метод осаждения полипептидов амидо – чёрным [Бузун Г.А. и др., 1982], концентрацию нуклеиновых кислот [Критский Г.А. и др., 1980], активность пепсина [Уголев А.М., и др. 1969]. При расчёте концентрации отдельных показателей учитывали разведение проб слизи при гомогенизировании.

Исследование антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови и желудочно-кишечной слизи. Антиоксидантную и антирадикальную активность проб желудочно-кишечной слизи и плазмы крови определяли с использованием принципа тушения исследуемой пробой индуцированной хемилюминесценции стандартного раствора. Для определения антиоксидантной активности в качестве источника супероксид аниона использовали дифенилпикрилгидразил (DPPH). Для определения антирадикальной активности в качестве источника свободных радикалов использовали фитонцидную фракцию.

Обработку полученных результатов исследования проводили с использованием методов вариационной статистики. Оценку значимости различий средних осуществляли по критерию Вилкоксона. Характер взаимосвязи между количественными признаками выделяли корреляционным анализом с помощью пакета прикладных программ «Statistica – 6,0»

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состав гликопротеинов в секрете различных отделов желудка и кишечника в зависимости от возраста животных. Моносахара гликопротеинов слизи представлены гексозаминами, галактозой, фукозой и сиаловыми кислотами. Концентрация отдельных моносахаров, составляющих олигосахаридную часть молекулы гликопротеина – гексозаминов, галактозы и фукозы совпадает с динамикой возрастных изменений суммы моносахаров.

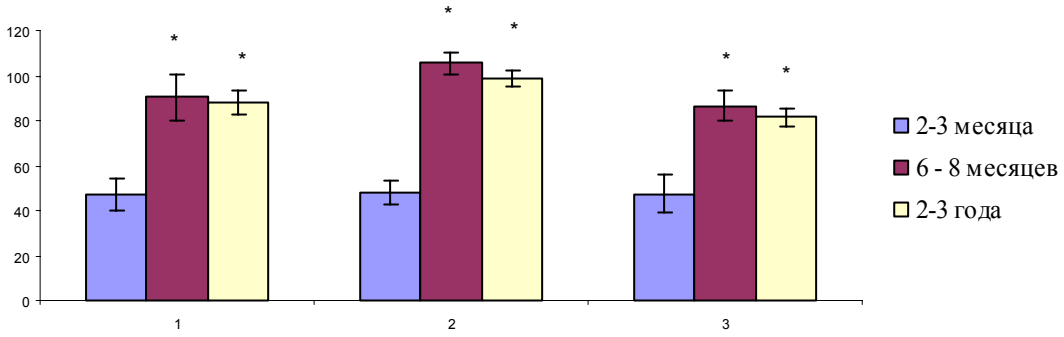
Концентрация N – ацетилнейраминовой кислоты не оказывает влияния на сумму моносахаров, поскольку её вклад в общую сумму невелик (концентрация N – ацетилнейраминовой кислоты колеблется от 0,8 до 1,5 мк М/мл слизи).

Таким образом, изучая концентрацию отдельных моносахаров в гликопротеинах пристеночного слизистого слоя пищеварительного тракта у свиней разных возрастов, выявили ряд закономерностей. У поросят уже в возрасте 2 – 3 - ёх месяцев в гликопротеинах слизи пристеночного слизистого слоя присутствуют все виды моносахаров, как и у половозрелых животных. Следовательно, биосинтетические процессы в так называемых слизеобразующих клетках (в основном – эпителиальных, но так же бокаловидных, шеечных, клетках Бруннеровых желёз) функционируют с самого раннего возраста.

Общий пул гликопротеинов желудочно-кишечной слизи складывается из суммы концентраций всех моносахаров гликопротеинов. Сумма моносахаров характеризует общую секрецию гликопротеинов слизи, поскольку анализируются гликопротеины, как находящиеся в полимеризованном состоянии, так и подвергнутые деградации.

Изменение содержания суммы моносахаров в пристеночной слизи исследованных отделов желудка и кишечника свиней зависит от возраста животных.

Результаты анализа суммы моносахаров у свиней разных возрастов в разных отделах желудочно-кишечного тракта представлены на рисунках 1, 2.



1- большая кривиза; 2 - малая кривизна; 3 - пилорический отдел

Рисунок 1. Сумма моносахаров (мкМ/мл слизи) в пристеночной слизи желудка у свиней разных возрастов

Примечание: * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами при $P < 0,05$.

У поросят в период перехода на дифинитивное питание показатели суммы моносахаров самые низкие и в желудке, и в исследованных отделах кишечника по сравнению с подсвинками и свиноматками. Ранее было показано, что биосинтез и секреция гликопротеинов слизи в период постнатального развития мышей претерпевает существенные колебания и

достигает «взрослого» состояния лишь по завершению полового созревания [Кривова и др., 2002]. Результаты данных опытов также подтверждают эти выводы. Самки свиней достигают половой зрелости к 8-му месяцу жизни, именно в этом возрасте у них наблюдается по сравнению с поросятами более высокий уровень суммы моносахаров, достигающий показателей у взрослых животных.

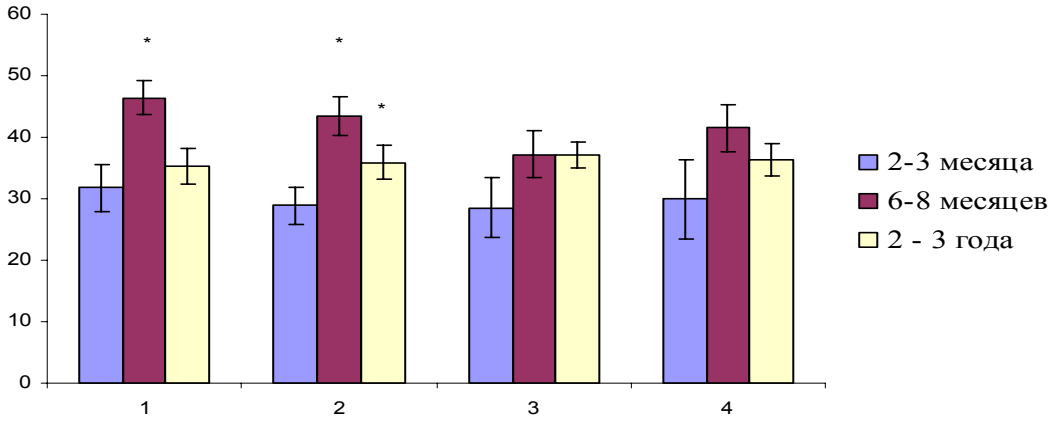


Рисунок 2. Сумма моносахаров (мкМ/мл слизи) в пристеночной слизи кишечника у свиней разных возрастов

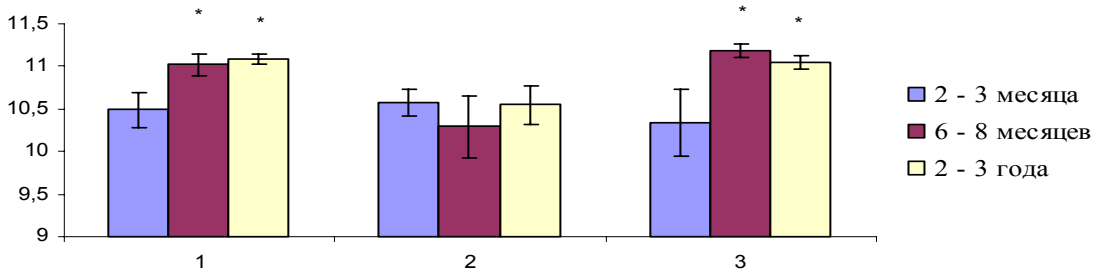
Примечание: Примечание: 1 – проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки; 2 – медиальный отдел двенадцатиперстной кишки; 3 – дистальный отдел двенадцатиперстной кишки; 4 – проксимальный отдел тощей кишки;* - отмечена достоверность по сравнению с поросятами при $P < 0,05$.

Следует отметить, что у поросят в отделах желудка показатели суммы моносахаров не отличаются от тех же показателей в исследованных отделах кишечника. Однако уже у подсвинков сумма моносахаров в желудке почти в 2 раза выше, чем в отделах кишечника. Подобная топографическая особенность была показана нами и у других видов животных и человека [Кривова и др., 2002]. По – видимому, это связано с тем, что в желудке полостная среда более агрессивна, чем в кишечнике, благодаря высокой кислотности, что и определяет высокий уровень секреции гликопротеинов слизи. Кроме того, желудок является начальным отделом пищеварительного тракта и туда поступает пища грубой консистенции, ещё не разбавленная пищеварительными соками и не переваренная пищеварительными секретами. Поэтому такая топографическая особенность, как более высокий уровень секреции гликопротеинов пристеночного слизистого слоя, имеет физиологическое обоснование.

У поросят переход на дифинитивное питание состоялся, но ещё очень недавно. И в желудке у них низкие показатели структурных гликопротеинов по сравнению с подсвинками и свиноматками. Вероятно, переход на дифинитивное питание может быть одним из факторов, обеспечивающим регуляцию секреции гликопротеинов слизистого слоя. У подсвинков уровень

секреции гликопротеинов пристеночного слизистого слоя не отличается от аналогичных показателей у свиноматок, но так же, как и было отмечено при рассмотрении концентрации отдельных моносахаров, колебания уровня секреции гликопротеинов более выражены, о чём свидетельствуют более высокие значения средних ошибок по сравнению со свиноматками. Это может быть связано с недавно завершившимся или ещё продолжающимся (у некоторых животных) пубертатным периодом.

Исследование внеструктурных компонентов желудочно-кишечной слизи. При изучении концентрации белковых компонентов пристеночного слизистого слоя для анализа были взяты образцы белковых веществ разного происхождения, а именно: полипептидные частицы гликопротеинов слизистого слоя, ферменты, другие биологические активные вещества белковой природы. Однако разделить их в условиях наших опытов было невозможно, поэтому мы оценивали интегральные показатели концентрации белка как маркёра биосинтетических процессов в слизистой оболочке. Он является одним из немногих показателей, демонстрирующих стабильность в течение всего постнатального периода пристеночного слизистого слоя. Изменение содержания белка в гликопротеинах пристеночной слизи исследованных отделов желудка и кишечника свиней в зависимости от возраста представлено на рисунках 3 и 4.



1 - большая кривизна; 2 - малая кривизна; 3 - пилорический отдел

Рисунок 3. Концентрация белка (мг/мл слизи) в пристеночной слизи желудка у свиней разных возрастов

Примечание: * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами при $P < 0,05$.

Исследования показали, что наибольшее количество белка в гликопротеинах слизи пищеварительного тракта содержится в области большой кривизны и пилорического отдела желудка, а также в проксимальном и медиальном отделе двенадцатиперстной кишки. Следует отметить, что концентрация белкового компонента увеличивается в начальном отделе двенадцатиперстной кишки, то есть как раз в том отделе, где полупереваренная пища эвакуируется из желудка в кишечник. Содержание белка в этом отделе кишечника выше, чем в желудке. У маленьких поросят во всех исследованных отелах кишечника содержание

белка остаётся примерно на одном уровне, а у подсвинков и взрослых свиней начинает снижаться по мере удаления от желудка.

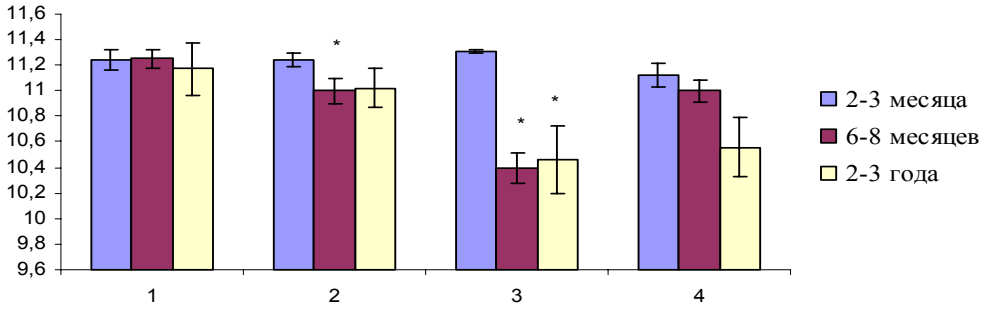


Рисунок 4. Концентрация белка (мг/мл слизи) пристеночной слизи кишечника у свиней разных возрастов

Примечание: 1 – проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки; 2 – медиальный отдел двенадцатиперстной кишки; 3 – дистальный отдел двенадцатиперстной кишки; 4 – проксимальный отдел тощей кишки; * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами при $P < 0,05$.

Анализ возрастных изменений концентрации белка гликопротеинов слизи у свиней показал, что этот показатель остаётся на одном уровне, что в желудке, что в кишечнике и с возрастом значительно не изменяется. Концентрация белковых веществ различается в разных отделах желудочно – кишечного тракта у свиноматок: так, на малой кривизне желудка, в дистальном отделе двенадцатиперстной кишки и проксимальном отделе тощей кишки концентрация белковых веществ ниже, чем в других исследованных отделах желудка и кишечника, где этот показатель находится на одном уровне.

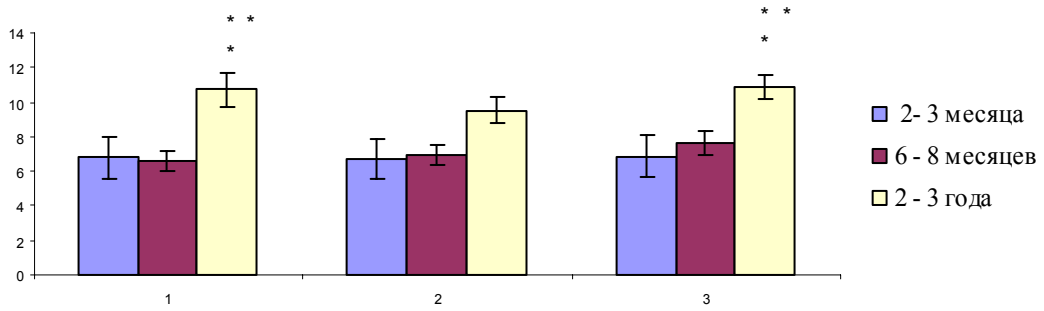
У подсвинков эти различия менее выражены, снижение концентрации белковых веществ установлено лишь на малой кривизне.

У поросят низкий уровень белковых веществ в желудке установлен не только на малой кривизне, но и на большой кривизне, и в пилорическом отделе желудка. В исследованных отделах кишечника у поросят снижения содержания белковых веществ не установлено.

Эти результаты свидетельствуют о том, что биосинтетические процессы в отделах кишечника имеют высокую активность уже в раннем возрасте, а в отделах желудка, наоборот, увеличиваются с возрастом.

Одной из важных функционально активных составляющих белковых веществ надэпителиального слизистого слоя желудочно-кишечного тракта являются ферменты. В наших исследованиях было изучено распределение пепсина в слизи разных отделов желудка и тонкого кишечника, а также изменение концентрации пепсина у свиней в онтогенезе. Результаты

исследования концентрации пепсина в надэпителиальном слизистом слое пищеварительного тракта представлены на рисунках 5 и 6.



1 - большая кривизна; 2 - малая кривизна; 3 - пилорический отдел

Рисунок 5. Концентрация пепсина (мЕд/мг слизи) в пристеночной слизи желудка у свиней разных возрастов

Примечание: * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами ; ** - достоверность по сравнению с подсвинками при P < 0,05.

Исследования динамики изменения пепсина показали, что концентрация пепсина в пристеночном слизистом слое обнаруживает колебания в течение постнатального развития во всех исследованных отделах желудочно-кишечного тракта, а именно, с возрастом содержание пепсина увеличивается.

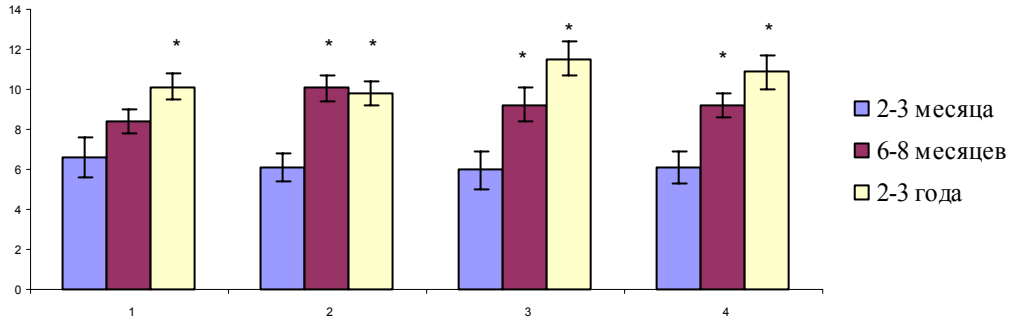


Рисунок 6. Концентрация пепсина (мЕд/мг слизи) в пристеночной слизи кишечника у свиней разных возрастов

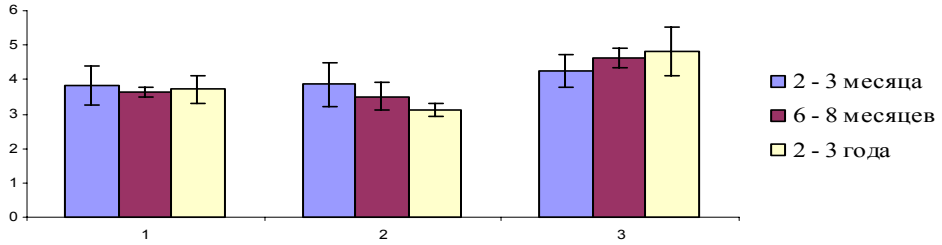
Примечание: 1 – проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки; 2 – медиальный отдел двенадцатиперстной кишки; 3 – дистальный отдел двенадцатиперстной кишки; 4 – проксимальный отдел тощей кишки; * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами при P < 0,05.

У поросят концентрация пепсина во всех исследованных отделах желудка и кишечника одинаковая. В желудке свиноматок концентрация пепсина находится на более высоком уровне, чем у подсвинков и поросят. В

отделах кишечника наименьшая концентрация пепсина установлена у поросят. У подсвинков и свиноматок этот показатель находится примерно на одном уровне в отделах ДПК и начальном отделе тощей кишки. Отмечается зависимость количественных и деструктивных изменений молекул гликопротеина от концентрации пепсина.

Таким образом, концентрация пепсина в пристеночном слизистом слое обнаруживает колебания в течение постнатального развития. Эти результаты согласуются с литературными данными [А.М. Уголев и др., 1977] о том, что на функциональную топографию тонкой кишки существенное влияние оказывает гормональный фон организма. Авторы указывали, что в естественных условиях характер распределения ферментативной активности детерминирован как эндогенными индукторами, так и экзогенными, важнейшими их которых является пища. Можно также предполагать, что ещё одним фактором, влияющим на распределение ферментативной активности в пристеночном слизистом слое, являются его сорбционные свойства

Распределение нуклеиновых кислот в надэпителиальном слизистом слое желудочно-кишечного тракта представлено на рисунках 7 и 8. Их концентрация свидетельствует об эффективности выполнения слизистым слоем своих защитных функций и характеризует интенсивность обмена эпителия.



1 - большая кривизна; 2 - малая кривиза; 3 - пилорический отдел

Рисунок 7. Концентрация нуклеиновых кислот (мкг/мг слизи) в пристеночной слизи желудка у свиней разных возрастов

В наших опытах было получено, что у свиней в постнатальный период концентрация нуклеиновых кислот в разных отделах пищеварительного тракта изменяется в зависимости от возраста в небольших пределах. Так, уровень нуклеиновых кислот в области большой кривизны желудка находится на одном уровне у всех возрастных групп. В области малой кривизны желудка и во всех исследованных отделах тонкого кишечника концентрация нуклеиновых кислот у поросят на более низком уровне, затем к 6-8-ми месячному возрасту, она возрастает, а к двум годам жизни свиней содержание нуклеиновых кислот опять снижается.

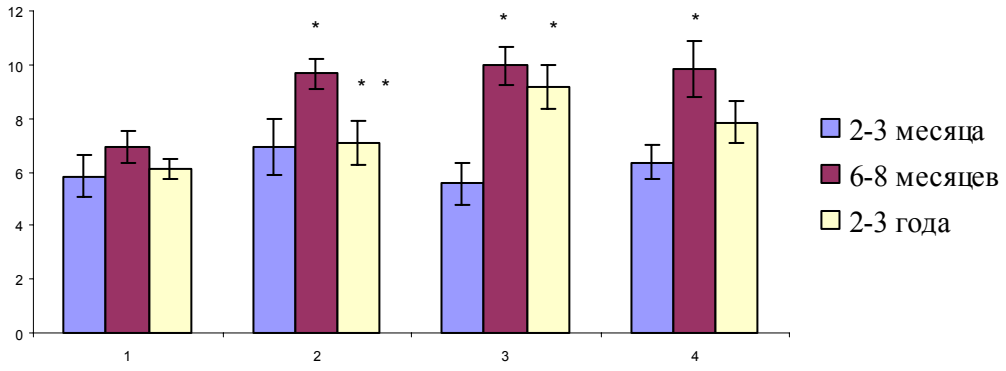


Рисунок 8. Концентрация нуклеиновых кислот (мкг/мг слизи) в пристеночной слизи кишечника у свиней разных возрастов

Примечание: 1 – проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки; 2 – медиальный отдел двенадцатиперстной кишки; 3 – дистальный отдел двенадцатиперстной кишки; 4 – проксимальный отдел тощей кишки; * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами; ** - достоверность по сравнению с подсвинками при $P < 0,05$.

Отмечаются также топографические особенности распределения нуклеиновых кислот в отделах пищеварительного тракта у свиней. У всех половозрастных групп наименьшая концентрация нуклеиновых кислот слизи пищеварительного тракта находиться в области малой кривизны желудка, затем их концентрация начинает постепенно увеличиваться по направлению к кишечнику. В исследуемых отделах тонкого кишечника концентрация нуклеиновых кислот значительно выше, чем в отделах желудка. У поросят наибольшая концентрация нуклеиновых кислот в медиальном отделе двенадцатиперстной кишки – 6,83 ± 1,74 мг и в проксимальном отделе тощей кишки – 6,53 ± 1,14 мг. Обращают на себя внимание высокие значения содержания нуклеиновых кислот в пристеночном слое медиального и дистального отдела ДПК и проксимального отдела тощей кишки у подсвинков. Возможно, что это обстоятельство, свидетельствующее о некотором снижении защитной функции слизистого слоя в этот период развития свиней, необходимо учитывать для профилактики возможных гастродуоденальных заболеваний.

Антиоксидантная и антирадикальная активность слизи пищеварительного тракта и плазмы крови.. Результаты антиоксидантной активности плазмы крови у свиней исследованных возрастов (поросята, подсвинки, свиноматки) представлены на рисунке 9.

Исследования показали, что антиоксидантная активность плазмы крови у этих животных не имеет достоверных отличий, связанных с возрастом, хотя у подсвинков среднее значение антиоксидантной активности плазмы крови снижено в 1,5 раза, но у них отмечен более высокий уровень дисперсии данных.

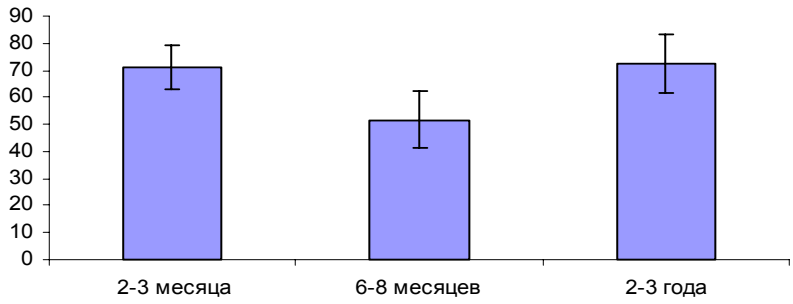


Рисунок 9. Антиоксидантная активность [(х 10^6 фотонов/мл)/сек] плазмы крови у свиней разных возрастных групп

Уровень антирадикальной активности плазмы крови у свиноматок почти в 2 раза ниже, чем у поросят, значения антирадикальной активности плазмы крови у подсвинков занимают промежуточное положение (рисунок 10).

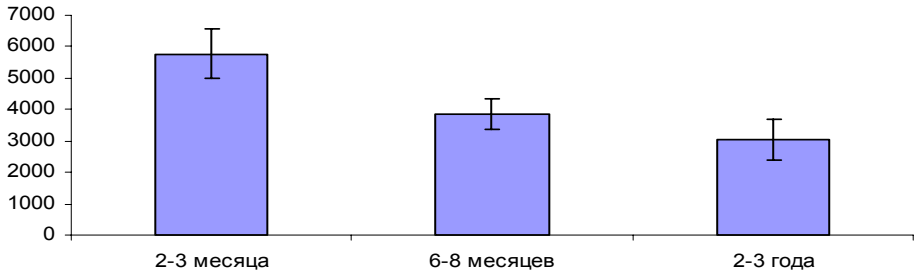


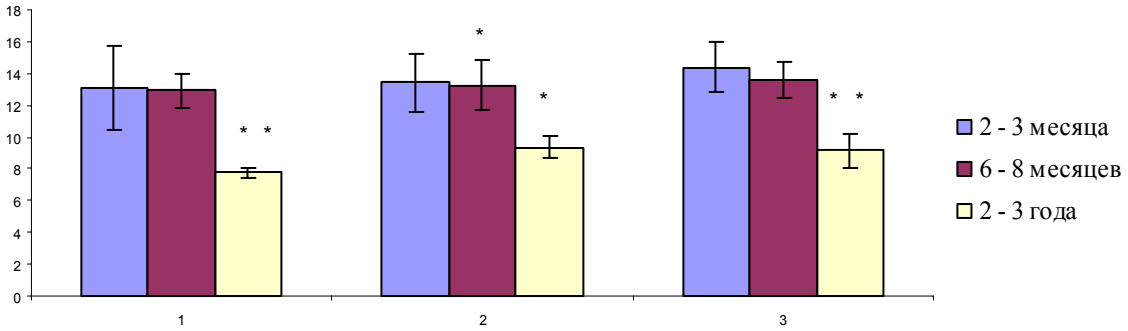
Рисунок 10. Антирадикальная активность [(х 10^6 фотонов/мл)/сек] плазмы крови у свиней разных возрастных групп

Антиоксидантных защитные механизмы в плазме крови могут быть представлены как ферментативными, так и неферментативными субстанциями. К последним относятся витамины (E, C, D), каротиноиды, уроновые кислоты, билирубин, стероиды, некоторые аминокислоты, пурины и другие субстанции. Ранее было отмечено [G. Lewin, I.Popov, 1994], что результаты определения количества этих антиоксидантов трудны для интерпретации в связи с их сложными взаимоотношениями. Поэтому авторы считают с физиологической точки зрения уместной альтернативой определение общей антиоксидантной активности в системе, генерирующей свободные радикалы.

В наших условиях были использованы два вида систем – генерирующих только супероксид анион (DPPH) и сумму свободных радикалов, в том числе и кислорода (фитонцидная фракция). Таким образом, можно сделать вывод, что в период полового созревания (подсвинки) перестройки метаболизма приводят к некоторому снижению уровня антиоксидантная и антирадикальная активность плазмы крови, но у здоровых свиноматок антиоксидантная активность плазмы находится на уровне поросят, а общая антирадикальная активность плазмы крови значительно ниже.

Помимо плазмы крови антиоксидантной и антирадикальной активностью обладает слизистый слой пищеварительного тракта. В пробах

пристеночной слизи желудочно-кишечного тракта уровень антиоксидантной активности примерно в 4-5 раз ниже, чем в плазме крови (рисунок 11 и 12).



1 - большая кривизна; 2 - малая кривизна; 3 - пилорический отдел

Рисунок 11. Антиоксидантная активность [(х 10^6 фотонов/мл)/сек] пристеночного слизистого слоя желудка у свиней разных возрастных групп

Примечание: * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами; ** - достоверность по сравнению с подсвинками при P < 0,05.

Исследования показали, что антиоксидантная активность пристеночной слизи исследованных отделов желудка и кишечника у поросят и подсвинков находится на самом высоком уровне, у свиноматок этот показатель снижен почти в 1, 5 раза.

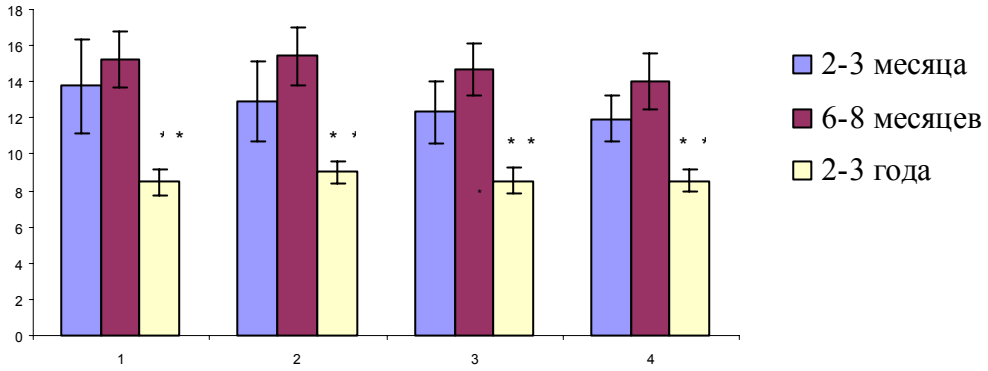


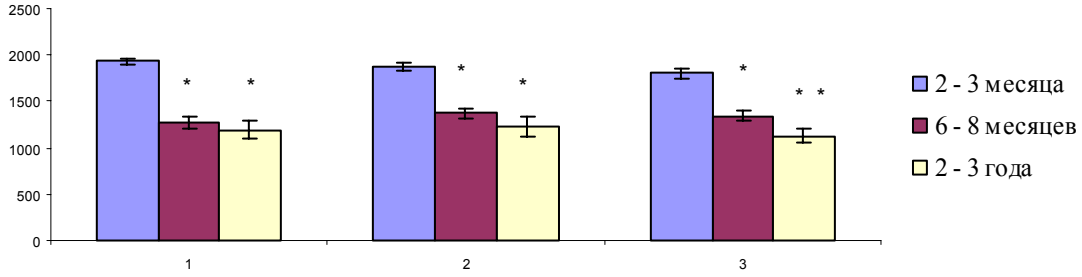
Рисунок 12. Антиоксидантная активность [(х 10^6 фотонов/мл)/сек] пристеночного слизистого слоя кишечника у свиней разных возрастных групп

Примечание: 1 – проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки; 2 – медиальный отдел двенадцатиперстной кишки; 3 – дистальный отдел двенадцатиперстной кишки; 4 – проксимальный отдел тощей кишки; ** - отмечена достоверность по сравнению с подсвинками при P < 0,05.

У всех возрастных групп антиоксидантная активность слизи по мере удаления от желудка снижается. Внутри каждой возрастной группы пробы

пристеночной слизи исследованных отделов желудочно-кишечного тракта по уровню антиоксидантной активности не имеют достоверных отличий.

Помимо антиоксидантной активности слизистый слой пищеварительного тракта обладает также и антирадикальной активностью. Уровень антирадикальной активности пристеночной слизи желудка и кишечника в 3 раза ниже, чем в плазме крови (рисунок 13 и 14).



1 - большая кривизна; 2 - малая кривизна; 3 - пилорический отдел

Рисунок 13. Антирадикальная активность [(х 10^6 фотонов/мл)/сек] пристеночного слизистого слоя желудка у свиней разных возрастных групп

Примечание: * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами; ** - достоверность по сравнению с подсвинками при $P < 0,05$.

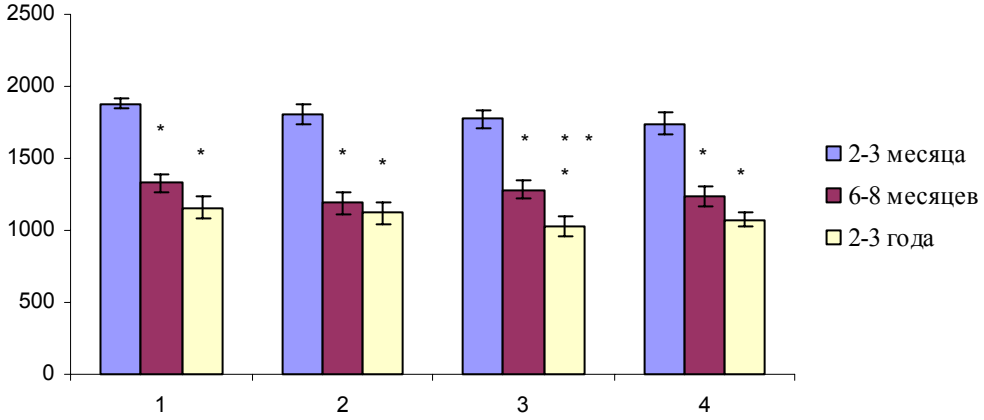


Рисунок 14. Антирадикальная активность [(х 10^6 фотонов/мл)/сек] пристеночного слизистого слоя кишечника у свиней разных возрастных групп

Примечание: 1 – проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки; 2 – медиальный отдел двенадцатиперстной кишки; 3 – дистальный отдел двенадцатиперстной кишки; 4 – проксимальный отдел тощей кишки; * - отмечена достоверность по сравнению с поросятами;** - достоверность по сравнению с подсвинками при $P < 0,05$.

Антирадикальная активность пристеночной слизи всех исследуемых отделов у поросят находиться на самом высоком уровне, затем снижается в 1,5-2 раза у подсвинков и остается на таком же низком уровне у свиноматок. Динамика возрастных изменений антирадикальной активности слизи желудочно-кишечного тракта сходна с динамикой возрастных изменений антирадикальной активности плазмы. Хотя внутри каждой возрастной пробы пристеночной слизи исследованных отделов желудка и кишечника по уровню антирадикальной активности не имеет достоверных отличий.

Таким образом, результаты исследования показали, что антиоксидантная и антирадикальная активность плазмы крови у свиней значительно выше антиоксидантной и антирадикальной активности пристеночной слизи желудочно-кишечного тракта.

Физиологическое значение наличия антирадикальной активности в пристеночном слизистом слое может быть связано с механизмами первичной защиты организма от свободных радикалов внешней и энтеральной среды. Основным защитным механизмом пищеварительного тракта является сам пристеночный слизистый слой, обладающий многими защитными функциями, в том числе, и антирадикальной активностью. Носителем этого вида защитной функции, по нашему мнению, может быть как сама пристеночная и полостная слизь, так и её внеструктурные компоненты. Как и в плазме крови, в пристеночном слизистом слое и полостной слизи присутствуют многие субстанции, для которых показана их антирадикальная активность, такие, как витамины, каратиноиды, билирубин, продукты распада нуклеиновых кислот и многие другие. Однако присутствие этих субстанций в слизистом слое может существенно изменять их активность. Подобный механизм был установлен для каталазы, показавшей более высокую антитромботическую активность в ковалентно модифицированной хондроитинсульфатом форме или в смеси нативного фермента и свободного хондроитинсульфата по сравнению с нативным ферментом [Максименко А.В. и др., 1999]. В желудочно-кишечном тракте также была продемонстрирована более высокая активность кишечных ферментов, сорбированных на флокулах полостной слизи, по сравнению с нативными ферментами. [Гальперин Ю.М., 1986]. Характерной особенностью гликозамингликанов и гликопротеинов слизи является то, что они представляют собой поливалентные анионы, что обеспечивается олигосахаридной частью их молекулы, и благодаря этому могут участвовать в инактивации свободных радикалов. По-видимому, можно предполагать как минимум 2 механизма антирадикальной активности слизи: собственная антирадикальная активность, обусловленная их олигосахаридным составом, и активация других антирадикальных субстанций за счёт их модификации и упорядочивания их пространственной организации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено изучению становления защитных функций надэпителиального слизистого слоя желудочно-кишечного тракта у здоровых свиней в постнатальном развитии.

Анализ количественных и качественных характеристик состава гликопротеинов слизи пищеварительного тракта, внеструктурных компонентов, антиоксидантной и антирадикальной активности местного иммунитета позволил выявить ряд особенностей процесса слизеобразования и состояния факторов защиты надэпителиального слизистого слоя желудочно-кишечного тракта у свиней в зависимости от возраста.

В наших опытах было получено, что у свиней в период постнатального развития происходит изменение состояния защитных функций пищеварительного тракта. Биосинтез и секреция гликопротеинов слизистого слоя, которые определяют его физико-химические свойства и основную защитную функцию – механическую и химическую защиту подлежащего эпителия, а также его свойства молекулярного сита, зависят от гормонального фона и условий питания. Это совпадает с литературными данными [А.М. Уголев и др., 1977, Кривова Н.А. и др., 2002] в отношении функциональной топографии желудочно-кишечного тракта у собак и мышей. Изменение содержания суммы моносахаров в пристеночной слизи исследованных отделов желудка и кишечника свиней зависит от возраста животных. У поросят в период перехода на дифинитивное питание показатели суммы моносахаров самые низкие и в желудке, и в исследованных отделах кишечника по сравнению с подсвинками и свиноматками. Это говорит о том, что гликопротеины слизистого слоя приобретают более длинные и разветвлённые олигосахаридные цепочки. Завершение формирования этапов биосинтеза и секреции гликопротеинов происходит к 6-8-ми месячному возрасту, то есть при достижении половой зрелости и в условиях дефинитивного питания.

Изучение внеструктурных компонентов надэпителиального слизистого слоя желудочно-кишечного тракта показало, что на их уровень влияют, прежде всего, сорбционные свойства гликопротеинового слоя. Показатели белка остаются на одном уровне во всех исследованных отделах желудка и кишечника. Определяемые осаждением амидо – чёрного белковые вещества пристеночного слизистого слоя представлены пептидными компонентами молекул гликопротеинов, ферментами, частицами пищи и другими белковыми частицами. Следовательно, содержание белка в пристеночном слое является комплексным показателем. Можно предполагать, что на уровень содержания белка оказывают влияние физико-химические свойства гликопротеинового слоя и, прежде всего, его сорбционные свойства. Это связано с тем, что благодаря высокой вязкости пристеночный слизистый слой непроницаем для крупных белковых молекул [Allen A., 1982], поэтому ферменты и другие пептиды могут сорбироваться только на его люминальной поверхности. В этом случае одним из факторов, влияющих на

содержание белка в пристеночном слизистом слое, может быть площадь его люминальной поверхности, и размеры отделов пищеварительного тракта вообще. Если это предположение верно, то можно полагать, что после перехода на дифинитивное питание размеры отделов пищеварительного тракта быстро достигают взрослого состояния. Зависимость размеров и массы внутренних органов от характера питания описаны в работе [Fabian J. et al., 2002].

Концентрация пепсина увеличивается с возрастом, наименьшее его содержание установлено у поросят. Таким образом, на ферментативную активность слизи пищеварительного тракта существенное влияние оказывают не только сорбционные свойства слизи, но и гормональный фон организма и, конечно, характер пищи.

По мере удаления от желудка увеличивается скорость обмена эпителиоцитов, о чём свидетельствуют высокие концентрации нуклеиновых кислот в этих отделах, особенно у подсвинков. Это обстоятельство, свидетельствующее о некотором снижении защитной функции слизистого слоя в этот период развития свиней, необходимо учитывать для профилактики возможных гастродуоденальных заболеваний.

Анализ антиоксидантной и антирадикальной активности надэпителиального слизистого слоя показал, что с возрастом у здоровых свиней наблюдается тенденция к снижению этих свойств. У всех возрастных групп антиоксидантная и антирадикальная активность по мере удаления от желудка также снижаются. Вероятно, что носителями этой активности являются олигосахаридные частицы молекул гликопротеинов и другие антирадикальные субстанции, присутствующие в слизистом слое, как ковалентно модифицированные гликопротеином, так и диффузно распределённые в слое. На их состав влияют эндогенные и экзогенные индукторы, но большее значение имеет функциональная незрелость биосинтеза гликопротеинов в пубертатном периоде. Эта функциональная незрелость определяет низкие гелеобразующие свойства гликопротеинов слизистого слоя, его меньшую вязкость и эластичность, большую скорость деградации. Это объясняется более низкими по сравнению с половозрелыми особями межмолекулярными взаимодействиями между молекулами гликопротеинов в слизистом слое и, следовательно, большим числом свободных отрицательно и положительно заряженных групп, которые могут ввязывать свободные радикалы экзогенного и эндогенного происхождения.

Динамика возрастных изменений антиоксидантной активности слизи желудочно-кишечного тракта сходна с динамикой возрастных изменений антиоксидантной активности плазмы крови.

ВЫВОДЫ

1. Сумма моносахаров полимеризованных и деградированных гликопротеинов пристеночного слизистого слоя в отделах желудка у поросят ниже, чем у подсвинков и свиноматок, а в отделах кишечника одинакова у всех исследованных возрастных групп.
2. Концентрация белковых веществ в пристеночном слизистом слое исследованных отделов желудка и кишечника различна у самок свиней разных возрастных групп.
3. Концентрация пепсина в пристеночном слизистом слое исследованных отделов желудка и кишечника увеличивается по мере взросления животных.
4. Интенсивность десквамации эпителия, определяемая по содержанию нуклеиновых кислот, в пристеночном слизистом слое не изменяется у поросят, подсвинков и свиноматок в отделах желудка. В отделах кишечника этот показатель увеличен в дистальном отделе двенадцатиперстной кишки у свиноматок, в медиальном и дистальном отделах двенадцатиперстной кишки и в проксимальном отделе тощей кишки у подсвинков по сравнению с поросятами.
5. Антиоксидантная активность пристеночной слизи в исследованных отделах пищеварительного тракта у поросят и подсвинков находится на одном уровне, у свиноматок снижена в 1,5 раза. Этот показатель коррелирует с динамикой антиоксидантной активности в плазме крови тех же возрастных групп.
6. Антирадикальная активность пристеночной слизи всех исследованных отделов у поросят находится на самом высоком уровне, у подсвинков снижается в 1,5 – 2 раза и у свиноматок остаётся на таком же низком уровне.
7. Защитная функция пищеварительного тракта, определяемая составом пристеночного слизистого слоя и его антиоксидантной и антирадикальной активностью, у свиней – самок изменяется в постнатальном периоде до наступления половой зрелости.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Гвай Е.Г.**, Куликова А.В. Биохимический состав бронхиального секрета телят, больных бронхопневмонией // Сборник «Научные основы АПК». 3 региональная научно-практическая конференция студентов, аспирантов, молодых учёных. - Томск, 2001. - Вып. № 4. - С. 35-37.
2. Zaeva O.B., **Gvaji E.G.,** Gromova A.Y., Lapteva T.A., Selivanova T.I., Vusik M.V., Kulicova A.V., Salnikov A.V., Serebrov V.Y. Functioning of Open Sistems of the Organism in Norm and in Patologi // 5-th International Symposium on Science and Technology. – Tomsk, 2001. – P. 112 – 114.
3. **Гвай Е.Г.**, Лаптева Т.А., Кривова Н.А., Заева О.Б. Изменение функционального состояния надэпителиального слизистого слоя желудочно-кишечного тракта у свиней в онтогенезе // Сборник трудов ТСХИ НГАУ. – Томск, 2002. – Вып. № 5. - С. 239-241.
4. **Гвай Е.Г.**, Заева О.Б., Кривова Н.А. Возрастные особенности структуры и состава надэпителиального слизистого слоя желудочно-кишечного тракта у свиней // Сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции «Повышение устойчивости и эффективности агропромышленного производства в Сибири: наука, техника, практика». – Кемерово, 2003. - С. 21-22.
5. **Гвай Е.Г.**, Лаптева Т.А., Кривова Н.А., Заева О.Б. Изменение биохимического состава пристеночной слизи пищеварительного тракта свиней в онтогенезе // Материалы международно-практической конференции, посвящённой 100-летию профессора В.Я. Суетина «Актуальные аспекты экологической, возрастной и экспериментальной морфологии». – Улан-Удэ ФГОУ ВПО БСХА, 2004. – С. 59-62.
6. **Гвай Е.Г.**, Лаптева Т.А., Кривова Н.А., Заева О.Б. Особенности формирования надэпителиального слизистого слоя желудочно-кишечного тракта у свиней разных возрастов. // Сборник «Ноосферные знания и технологии». – Томск ТГУ, 2004. – Вып. I.– С. 84-89.
7. Кривова Н.А., **Гвай Е.Г.**, Заева О.Б., Лаптева Т.А. Функциональная топография пристеночного слизистого слоя пищеварительного тракта у свиней в процессе постнатального развития. // Вестник Томского государственного университета. Бюллетень оперативной научной информации. – 2005. - № 30. - С. 84-98.
8. **Е.Г. Гвай.**, Н.А. Кривова, О.Б. Заева, Т.А. Лаптева. Изменение защитных функций слизи пищеварительного тракта свиней в онтогенезе. // Свиноводство. – 2006. - № 4. - С. 25 – 28.
9. Н.А. Кривова, **Е.Г. Гвай.**, О.Б. Заева, Т.А. Лаптева. Развитие защитных функций пищеварительного тракта у свиней в онтогенезе. // Физиологический журнал им. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 1. – С. 68 - 75.