

УДК 636.6:612:636.5.087.7:577.1
© 2016

Є.О. МИХАЙЛЕНКО,
аспірант

**О.О. ДЬОМШИНА,
Л.М. СТЕПЧЕНКО,**
кандидати біологічних наук

Г.О. УШАКОВА,
доктор біологічних наук

Дніпропетровський державний
аграрно-економічний університет
– Дніпропетровський національний
університет імені О. Гончара,
Україна
E-mail: eugeniePM@ukr.net

м. Дніпро, вул. С. Єфремова, 25
м. Дніпро, пр. Гагаріна, 72

АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА
ПЕЧІНКИ БРОЙЛЕРІВ
КРОСУ КОББ-500
В УМОВАХ ВИПОЮВАННЯ
ПРИРОДНОЮ
БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЮ
ДОБАВКОЮ НА ОСНОВІ
ГУМІНОВИХ РЕЧОВИН

Наведено результати вивчення впливу біологічно активної кормової добавки Гумілід на ефективність антиоксидантної системи печінки курчат-бройлерів кросу Кобб-500. Показано, що в птиці, якій у воду додавали Гумілід, у водорозчинній фракції печінки, найбільша частка якої представлена цитозольною фракцією, відбулося підвищення активності каталази, що може бути позитивною ознакою гальмування процесів утворення окисних продуктів та активізації адаптивних процесів у печінці дослідної птиці.

Ключові слова: курчата-бройлери, біологічно активна кормова добавка Гумілід, каталаза, супероксиддисмутаза, ТБК-активні речовини, цитохром С.

Усі живі організми реагують на зміни зовнішнього середовища. Найчастіше відповідною реакцією є стрес, який викликає утворення вільних радикалів, перевантаження внутрішньоклітинним кальцієм, пригнічення енергопродукції, синтеза протеїна та посилення його деградації, що несприятливо позначається на обміні речовин тварин, їхньому здоров'ї, продуктивності та якості продукції [8–10]. Надлишкове вільнорадикальне окиснення суттєво змінює гомеостаз біологічних систем та може стати однією з ланок розвитку патології, незалежно від характеру ініціюючого його етіологічного фактора [4]. Одним

з органів, в якому інтенсивно відбуваються окисно-відновні реакції, є печінка. Серед реакцій, які ініціюють вільні радикали є реакція ланцюгового окиснення ліпідів, що призводить до дестабілізації і деструкції клітинних мембран і до руйнування тканин печінки [5, 15, 16, 19]. У результаті відбуваються метаболічні зрушення в організмі, особливо високопродуктивних тварин і птиці. Однак у нормі в клітинах біорадикали підтримуються на оптимальному рівні завдяки наявності складної системи антиоксидантного захисту, що включає як відповідні ферменти, так і низькомолекулярні сполуки [4, 18]. Саме ці

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

біоантиоксиданти інактивують фізіологічні концентрації вільних радикалів до прояву ними пошкодження біомолекул. Забруднене токсичними речовинами довкілля, токсичні ксенобіотики, а також ультрафіолетове випромінювання та іонізуюча радіація стимулюють підвищене утворення біорадикалів, які виснажують власну антиоксидантну систему та призводять до дезорганізації різних біомолекул, перш за все ліпідів, а потім протеїнів і нуклеїнових кислот, що в підсумку може спричинити загибель клітин. Основним маркером пошкодження цих структур і їхніх молекул, а також ступеня пероксидації у клітині в цілому є кількість ТБК-активних продуктів, а саме малонового діальдегіду.

Ензимом, який першим вступає в реакцію взаємодії з перекисами, є каталаза, найвища активність якої характерна для клітин печінки, нирок і еритроцитів [9], які мають високі значення продукції окисних продуктів. До компонентів антиоксидантного захисту клітини від токсичної дії супероксиданіону, який інтенсивно утворюється в дихальному ланцюзі, належить також ензим супероксиддисмутаза (СОД) і цитохром С, найвищі рівні яких рееструються саме в печінці [4, 7]. У печінці курчат СОД представлена Mn- та Cu/Zn-ізоферментними формами. Однак формою, що домінує в клітині і становить понад 65 % загальної активності, є мітохондріальна (Mn-СОД) [18]. Цитохром С – це гемовмісний протеїн, що потребує наявності Феруму в середовищі. Окиснена форма цитохром С (Fe^{3+}) виявляє потужні антиоксидантні властивості за рахунок більш ефективного, ніж СОД, окиснення супероксиданіону в молекулярний Оксиген [6], тому являє собою маркер ефективності функціонування антиоксидантної системи мітохондрій. Вивільнення цього протеїну в цитоплазму – наслідок розвитку оксидативного стресу в клітині, активації пероксидазної активності комплексу цитохрому С із кардіоліпіном, що підвищує проникність мітохондріальної мембрани за рахунок або формування пор, або ініціації розкриття тимчасових пор проникності мембрани [1, 7, 23]. Цілісність мітохондріальної мембрани є одним із важливіших параметрів енергетичного обміну клітини.

Інтенсивні технології вирощування бройлерів, високе метаболічне навантаження можуть призвести до зниження функціональних можливостей печінки і, як наслідок, розвитку деструктивних і запальних процесів [20–22]. Тому все більшого значення набуває пошук способів підвищення життєздатності курчат і рівня продуктивності птиці шляхом цілеспрямованого застосування біологічно активних речовин, що сприяють оптимізації обміну речовин і гомеостазу, зростанню рівня природної резистентності. При цьому пріоритетним є використання економічно виправданих екологічних засобів і технологій [11, 13, 20–22]. Насамперед, перевага надається природним речовинам, які виявляють гепатопротекторні властивості та підвищують природну резистентність свійських тварин.

У літературі все частіше з'являються свідчення про антиоксидантні властивості похідних гумінових речовин. Так, у досліджах на свійських і лабораторних тваринах [3, 13, 14, 20] показано, що гумінові речовини викликають активізацію системи антиоксидантного захисту крові і кардіоміоцитів завдяки підвищенню активності СОД і каталази. Автори вважають одним із можливих механізмів доставки й утримання у внутрішньому середовищі металів, зокрема Zn, Cu, Mn, Fe, які необхідні для формування активного центру металопротеїнів, завдяки здатності гумінових речовин утворювати хелатні комплекси з макро- і мікроелементами.

Крім того, методом катодної вольтамперометрії, зокрема процесом електровідновлення Оксигену ($EB O_2$), доведено, що гуміновий комплекс безпосередньо виявляє антиоксидантну або антирадикальну активність, тобто здатний нейтралізувати, шляхом прямої взаємодії, різні форми активного Оксигену та інші вільні радикали, які утворюються в процесі метаболізму. Зазначимо, що такий ефект може дорівнювати або перевищувати дію аскорбінової кислоти і дигідрокверцетину [12].

З огляду на досить значні досягнення у вивченні біологічної активності гумінових речовин, **метою роботи** було встановити ступінь впливу Гуміліду на ефективність анти-

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

оксидантного захисту печінки курчат бройлерного типу кросу Кобб 500.

Матеріали та методи дослідження. Експеримент проводили на курчатах бройлерного типу кросу Кобб-500 від народження (вилуповання) до 42-добового віку, яких утримували за стандартних умов ТОВ “Птахокомплекс” Дніпровський” Нікопольського району Дніпропетровської області. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил “Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986). Птицю було розділено на 2 групи по 23000 тварин: птичник № 1 – інтактні курчата (контроль), а птичник № 2 – курчата, яким у воду при вилупованні додавали 1%-вий розчин Гуміліду в оптимальній кількості за схемою, запропонованою раніше [13]. На 42 добу розвитку, після вибіркового зважування, відбирали по 15 курчат з групи зі середньою живою масою. Проводили декапітацію піддослідних курчат-бройлерів під етерним наркозом. Водорозчинну фракцію печінки отримували шляхом диференційного центрифугування гомогенату за швидкості 1000 об/хв протягом 10 хв. Отриману фракцію використовували для визначення стану антиоксидантної системи печінки за змінами активності супероксиддисмутази (СОД, КФ1.15.1.1), каталази (КТ, КФ1.11.1.6), кількості цитохрому С, ТБК-активних продуктів [2, 17].

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за t-критерієм Ст’юдента та Манна-Уїтні в програмі Microsoft Excel. Вірогідними відмінності вважали за $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Відповідною реакцією клітини на потрапляння ксенобіотиків у цитоплазму є активація мікросомального окиснення, про що свідчить утворення метаболітів, які, за особливих умов, можуть спровокувати утворення активних форм Оксигену [5, 15, 16]. До таких активних окиснених продуктів (ТБК-активних продуктів) відносять малоновий діальдегід, підвищення кількості якого слугує одним із маркерів оксидативного стресу в клітині (рис. 1).

Введення до раціону курчат-бройлерів Гуміліду сприяло незначному збільшенню кількості ТБК-активних продуктів у фракції розчинних протеїнів порівняно з показниками контрольної групи. Фактично надходження ксенобіотиків гумінової природи формувало відповідну реакцію клітин печінки.

Необхідно підкреслити, що таке підвищення кількості ТБК-активних продуктів у цитозольній фракції дослідних тварин, порівняно зі значеннями контрольної групи, може свідчити про реакцію клітин печінки на вплив ксенобіотичних речовин, які є субстратами для ензимів їхнього метаболізму і, як наслідок, утворення їхніх метаболітів. Враховуючи те, що дослідною рідиною була водорозчинна фракція печінки, яка містить найбільший відсоток цитозольних протеїнів та включає компоненти з усіх її клітин, підвищення кількості ТБК-активних продуктів може бути пояснено процесом біотрансформації гумінових кислот за рахунок ензимів, переважно локалі-

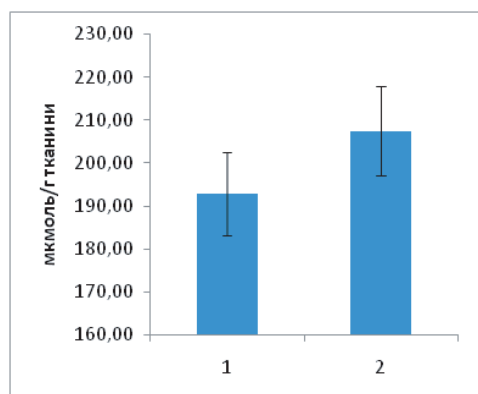


Рис. 1.
Вміст ТБК-активних продуктів у водорозчинній фракції печінки курчат-бройлерів.

Тут і далі в підписах до рисунків:

1 – контрольна група;

2 – курчата-бройлери, які отримували Гумілід;

* – $P < 0,05$ відносно контрольної групи;

усі величини наведені $x \pm SD$, $n = 15$

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

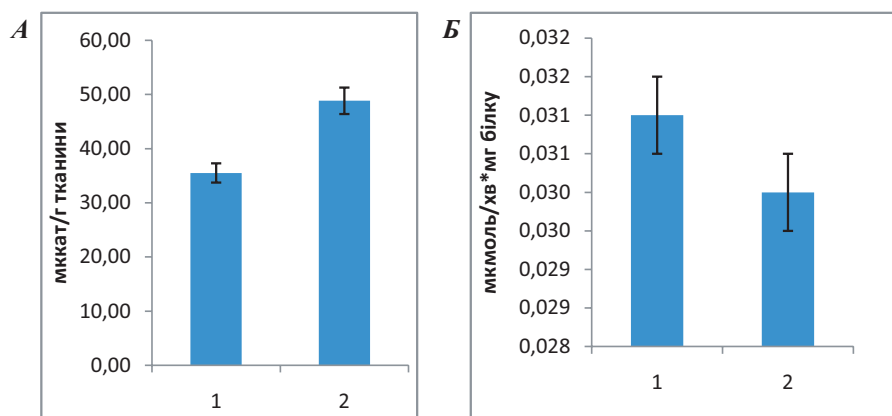


Рис. 2. Активність каталази (А) та супероксиддисмутази (Б) у водорозчинній фракції печінки курчат-бройлерів

зованих у клітинах Купфера, міросомах та пероксисомах гепатоцитів.

Ефективність функціонування антиоксидантної системи залежить від активності її високомолекулярних компонентів, наявності та кількості низькомолекулярних. До основних оксидоредуктаз, які формують високомолекулярну антиоксидантну систему, належать супероксиддисмутаза та каталаза [4, 9, 10] – рис. 2.

Збагачення корму курчат-бройлерів кросу Кобб-500 Гумілідом впливало на функціонування антиоксидантної системи захисту у водорозчинній фракції печінкової тканини, яка представлена цитозольними протеїнами. На фоні використання Гуміліду спостерігали збільшення активності каталази на 37 %, активність СОД при цьому варіювала в межах

контрольної групи. Одночасно й кількість ТБК-активних продуктів у фракції розчинних білків дослідних тварин збільшувалася відносно контрольної групи (рис. 1). Сукупність цих фактів вказує на активізацію антиоксидантної системи захисту.

Результати дослідження підтверджуються літературними даними щодо інтенсифікації ензиматичної активності антиоксидантного захисту [3] за рахунок підвищення концентрації металів у печінці [20, 22], які входять до складу активних центрів металопротеїнів: Zn – каталази, Mn (Cu/Zn) – супероксиддисмутази. Здатність гумінових речовин утворювати хелатні сполуки забезпечує пролонговане використання мікроелементів у процесингу металопротеїнів і в такий спосіб активізує ензими. Крім того, гумінові

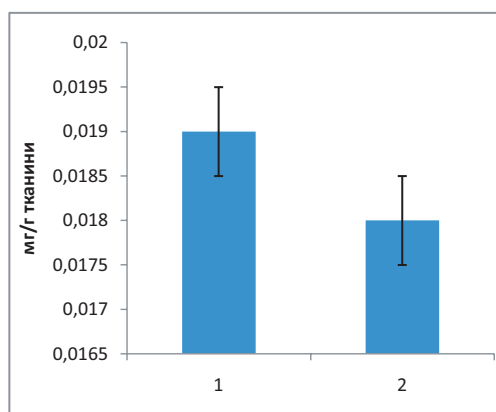


Рис. 3. Вміст цитохрому С у водорозчинній фракції печінки курчат-бройлерів

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

сполуки, які входять до складу Гуміліду, виявляють антиоксидантні властивості [12, 21, 22] та можуть самостійно гальмувати утворення перекисів.

Одним із механізмів старіння та загибелі клітини внаслідок розвитку оксидативного стресу є утворення комплексу цитохрому С і кардіоліпіну на внутрішній мембрані мітохондрій та активізація пероксидазної активності даного комплексу. У результаті цього стимулюється окиснення ліпідів, дезорганізація мембрани і вивільнення цитохрому С у цитоплазму, що запускає реакцію апоптозу клітини [6]. Тому підвищення концентрації цитохрому С у водорозчинній фракції печінки є фактором, який вказує на рівень оксидативного стресу (рис. 3).

У курчат, які отримували з водою природний антиоксидант гумінової природи, вміст цитохрому С у водорозчинній фракції печінки знизився в середньому на 12 %. Тобто представлені дані вказують на відсутність

оксидативного стресу в умовах застосування Гуміліду.

Незважаючи на збільшення кількості ТБК-активних продуктів у водорозчинній фракції печінки, вивільнення цитохрому С у цитозоль не відбувалося. Можливо, застосування Гуміліду гальмує в печінці курчат-бройлерів пероксидазну активність комплексу цитохрому С і кардіоліпіну, що уповільнює процеси старіння та загибелі клітин організму в цілому, зокрема печінки. До того ж Гумілід є джерелом Феруму, який входить до складу гему цитохрому С, і, отже, інтенсивніше відбувається його процесинг і закорювання у внутрішню мітохондріальну мембрану. Результати дослідження вказують і на залучення до процесу антиоксидантного захисту інших компонентів антиоксидантної системи, як низькомолекулярних, так і високомолекулярних, під впливом гумінових речовин, що потребує подальших досліджень у цьому напрямі.

Висновки

Встановлено факт відсутності розвитку оксидативного стресу в печінці бройлерів кросу Кобб-500 в умовах згодовування корму, збагаченого біологічно активною добавкою Гумілід. Цей факт підтверджено даними щодо активності супероксиддисмутази та кількості цитохрому С, зміни яких не відбувалися. Незначне підвищення кількості

ТБК-активних продуктів пов'язане з процесом біотрансформації гумінових кислот, яка має місце в органелах печінки. Натомість, здійснилась інтенсифікація високомолекулярних компонентів антиоксидантної системи за рахунок активізації каталази, що є одним із механізмів адаптації клітин печінки в умовах ксенобіотичного впливу.

Бібліографія

1. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver / [Begriffe K., Massart J., Robin M.-A., Borgne-Sanchez A., Fromenty B.] // Journal of Hepatology. – 2011. – 54. – P. 773–794.
2. Bertis S.A. Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics / S.A. Bertis, E.R. Ashvud, D. Bruns. – Filadelfiya, PA: WB Saunders, 2006. – 4Th ed. – 549 p.
3. Бучко О.М. Вільнорадикальні процеси в організмі поросят за дії гумінової добавки / О.М. Бучко // Біологія тварин. – 2013. – № 1, т. 15. – С. 27–33.
4. Чеснокова Н.П. Общая характеристика источника свободных радикалов и анти-

- оксидантных систем / Н.П. Чеснокова, Е.В. Поцукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. Медицинские науки. – 2006. – № 7. – С. 37–41.
5. D'Alessandro A. Redox proteomics and drug development / A. D'Alessandro, S. Rinalducci, L. Zolla // J. Proteomics. – 2011. – 74(12). – 2575–2595.
6. Демин Е.М. Антиоксидантное действие дигидрокверцетина и рутина в пероксидазных реакциях, катализируемых цитохромом С / Е.М. Демин, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // Вестник московского университета. – 2008. – Т. 49, № 5. – С. 354–360. – (Серия: Химия).
7. Apoptosis of hela cells induced by a newtargeting photosensitizer-based PDT via a

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

- mitochondrial pathway and ER stress / [L. Donghong, L. Lei et al.] // *OncoTargets and Therapy*. – 2015. – 8. – P. 703–711.
8. Галочкин В.А. Разработка теоретических основ и создание антистрессовых препаратов нового поколения для животноводства / В.А. Галочкин, В.П. Галочкина, К.С. Остриенко // *Сельскохозяйственная биология*. – 2009. – № 2. – С. 43–54.
9. Effects of two different high doses of irradiation on antioxidant system in the liver of guinea pigs / [Guney Y., Bukan N., Dizman A., Hicsonmez A., Bilgihan A.] // *Experimental Oncology*. – 2004. – 26. – 1. – P. 71–74.
10. Cytotoxicity of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time / [Gülden M., Jess A., Kammann J., Maser E., Seibert H.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2010. – 49. – P. 1298–1305.
11. Фисинин В.И. Эффективная защита от стрессов в птицеводстве: от витаминов к витаминизированным продуктам / В.И. Фисинин, П. Сурай // *Птица и птицепродукты*. – 2011. – № 5. – С. 23–26.
12. Федько И.В. К вопросу об использовании биологически активных гуминовых веществ в медицине / И.В. Федько, М.В. Гостищева, Р.Р. Исмаева // *Химия растительного сырья*. – 2005. – № 1. – С. 49–52.
13. Михайленко Е.А. Особенности белкового обмена у цыплят-бройлеров кросса Кобб-500 при включении в рацион Гумилада / Е.А. Михайленко, В.Г. Грибан, Л.М. Степченко // *Сборник тезисов: Гуминовые вещества и другие биологически активные соединения в сельском хозяйстве*. – Москва, 2014. – С. 55–58.
14. Вплив корвітину та гуміліду на стан оксидантно-антиоксидантної системи шурів на фоні введення адреналіну / Паронік В.А., Степченко Л.М., Дяченко Л.М., Левих А.Е., Шевцова А.І. // *Біологія тварин*. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 109–114.
15. Poyton R.O. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling / R.O. Poyton, K.A. Ball, P.R. Castello // *Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling*. Trends Endocrinol Metab. – 2009. – 20(7). – P. 332–340.
16. Robert A.M. Xanthine oxidoreductase, free radicals and cardiovascular disease. A critical review / A.M. Robert, L. Robert // *Pathol. Oncol. Res.* – 2013. – 20(1). – P. 1–10.
17. Пат. РФ № 2084869, G01N21/25, 1997. Способ количественного определения цитохрома С в препаратах, содержащих коллаген / Селиванов Е.А., Хмылова Г.А., Беляева И.С., Слепнева Л.В., Сидорова Н.Д.
18. Sentman M.L. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase / M.L. Sentman, M. Granstrom, H. Jakobson // *J. Biol. Chem.* – 2006. – 281. – P. 6904–6909.
19. Шмараков І.О. Особливості генерування активних форм кисню та азоту за гострої гепатотоксичності / І.О. Шмараков, В.Л. Борщовецька, М.М. Марченко // *Вісник Дніпропетровського університету*. – 2014. – № 22(1). – С. 3–7. – (Серія: Біологія та екологія).
20. Скорик М. Взаимосвязь функционального состояния эритроцитов и микроэлементов в печени кур-несушек под влиянием гуминовых кормовых добавок различного происхождения / М. Скорик // *Научный вестник Львовского национального университета ветеринарной медицины и биотехнологии имени С.З. Гжицького*. – 2008. – Т. 10, № 3(38), Ч. 2. – С. 190–197.
21. Степченко Л.М. Механизмы формирования биопродукции у быстрорастущей птицы под влиянием препаратов гуминовой природы / Л.М. Степченко // *Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету*. – 2005. – № 2. – С. 237–241.
22. Степченко Л.М. Стан системи антиоксидантного захисту еритроцитів курей-несучок за дії гумінових речовин / Л.М. Степченко, М.В. Скорик // *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів і корм. добавок*. – Львів, 2006. – Вип. 7, № 3–4. – С. 137–143.
23. Vickers A.E. Characterization of Hepatic Mitochondrial Injury Induced by Fatty Acid Oxidation Inhibitors / A.E. Vickers // *Toxicol. path.* – 2009. – V. 37. – № 1. – P. 78–88.

Рецензенти – доктори сільськогосподарських наук,
професори М.М. Харитонов, Т.П. Шкурко