

*Костюк І. О., кандидат сільськогосподарських наук
Харківська державна зооветеринарна академія*

ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ СУКЦИНАТУ ЯК ЕНЕРГЕТИЧНОГО СУБСТРАТУ ТКАНИННОГО ДИХАННЯ ЗА УМОВ НАКОПИЧЕННЯ ВІТАМІНУ Е В ПЕЧІНЦІ КУРЕЙ

Рецензент – доктор біологічних наук, професор М. М. Лемешева

У зв'язку із застосуванням бурштинової кислоти (сукцинату) як фактора метаболічної корекції в раціонах тварин та у ветеринарній медицині, актуальним є дослідження особливостей використання цієї речовини як енергетичного субстрату тканинного дихання. Важливим для ефективного застосування метаболічної корекції є вивчення впливу вітаміну Е – як мембранотропного фактора – на окиснення сукцинату мітохондріями печінки. Встановлено стимуляцію вільного окиснення сукцинату в мітохондріях печінки під дією високих доз вітаміну Е у раціоні курей, що важливо враховувати в разі можливого сумісного застосування вітаміну Е і сукцинату, як енерготропних факторів метаболічної корекції у птиці.

Ключові слова: бурштинова кислота, вітамін Е, тканинне дихання, мітохондрії, окислювальне фосфорилування, печінка, сукцинат.

Постановка проблеми. Сукцинат (бурштинова кислота) – проміжний продукт метаболізму у всіх клітинах, які мають мітохондріальний комплекс ферментів ЦТК і тканинного дихання. Сукцинат як енергетичний субстрат окислюється ферментом сукцинатдегідрогеназою (КФ 1.3.5.1), віддаючи електрони й протони у дихальний ланцюг (ДЛ). У результаті такого окиснення однієї молекули сукцинату утворюється дві молекули АТФ. Процеси дихання та окиснювального фосфорилування здійснюються в мембранах мітохондрій, що обумовлює їх високу чутливість до різних ендо- та екзогенних мембранотропних факторів. Зокрема, вітамін Е як антиоксидант впливає на структуру і функціональну активність мембран. Взаємодіючи з вільними радикалами [12], вітамін Е регулює обмін ліпідних компонентів біологічних мембран, забезпечує функціонування внутрішньоклітинних мембранних ферментних систем.

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. Встановлено, що застосування добавок вітаміну Е курям-несучкам позитивно впливає на реакції тканинного дихання в мітохондріях печінки [10]. Оскільки процеси ПОЛ і тканинне дихання взаємозв'язані, то й антиоксидантна дія α -токоферолу

прямо або побічно відображається на функціонуванні дихальних комплексів. У літературі мало даних про вплив вітаміну Е на тканинне дихання при Е-гіпервітамінозі. За результатами досліджень Higdon J. та співавт. [11] повідомляється, що вітамін Е вже в п'ятикратній дозі здійснює захисний ефект на стінки кровоносних судин. Нині питання щодо застосування вітаміну Е як антиоксиданту з лікувальною метою є предметом дискусій і активних досліджень. Так, у роботі [10] повідомляється, що застосування вітаміну Е та іншого антиоксиданту за новоутворень у мишей сприяє активному росту злоякісних пухлин і погіршує стан організму. Вітамін Е застосовують як харчову добавку в дієті людей. Альфа-токоферол використовують у тваринництві як компонент комбікормів, лікувальний і профілактичний препарат, засіб метаболічної корекції.

Бурштинова кислота (завдяки своїм антиоксидантним властивостям і участі у ключових енергетичних процесах в клітині [7]) активно використовується в медицині [8], у сільському господарстві [9], у ветеринарній практиці з метою корекції обміну речовин [1; 6]. Згідно з сучасною медичною концепцією, що формується, традиційні лікувально-профілактичні раціони харчування, функціональні харчові продукти, нутрицевтики і фармаконутрієнти відносяться до метаболічної терапії. Так, бурштинова кислота застосовується в якості протистресового засобу, має імуномодельючу дію, а також відома своїми антигіпоксичними властивостями [1]. У птиці сукцинат окислюється активніше порівняно з іншими субстратами тканинного дихання, в 1,5–2 рази швидше, ніж 2-оксоглутарат.

Фермент СДГ є одним зі структурних компонентів дихального ланцюга і зв'язаний із внутрішньою мембраною мітохондрій. Цей фермент має великий запас каталітичної активності, яка може бути реалізована як у фізіологічних, так і екстремальних станах організму. СДГ, будучи одночасно ферментом ЦТК і дихального ланцюга, виконує регуляторні функції в системі енергетичного мета-

болізму клітини. Відомо, що сукцинат окислюється в екстремальних умовах, за яких використання НАД-залежних субстратів неможливе [7].

Важливо, що сукцинат і вітамін Е – це речовини органічного походження, природні життєво необхідні компоненти клітин. Сукцинат, як проміжний продукт ЦТК і субстрат клітинного дихання, а також альфа-токоферол, як антиоксидант і мембранотропний фактор, можуть бути цілком впевнено зараховані до енерготропних речовин. Енерготропні препарати (в силу своєї здатності впливати на функцію мітохондрій) є патогенетично обґрунтованими за різних станів, що призводять до розвитку первинних і вторинних мітохондріальних порушень [8]. Отже, корекція метаболізму на рівні енергетичних процесів у мітохондріях за допомогою субстратних або мембранотропних речовин може здійснюватися природним шляхом. У зв'язку з цим актуальним є дослідження впливу токоферолу на процеси використання сукцинату у мітохондріях, якщо ці речовини додатково вводять в організм у вигляді лікувальних і профілактичних препаратів або добавок у складі раціону.

У даному експерименті енергетичні процеси в мітохондріях вивчали за умови створення підвищеної концентрації вітаміну Е в печінці.

Метою роботи є дослідження особливостей окиснення сукцинату в мітохондріях печінки курей під дією підвищених доз вітаміну Е.

Завдання досліджень: визначити показники окиснення сукцинату мітохондріями печінки курей різного віку за таких умов: 1) створення запасу вітаміну Е в печінці курей за рахунок збагачення раціону; 2) накопичення вітаміну Е в печінці отриманих курчат за рахунок високого вмісту в яєчному жовтку; 3) короточасне підвищення концентрації вітаміну Е в печінці після його перорального введення в організм курчат.

Матеріали та методи досліджень. В експерименті використовували курей-несучок віком

180 днів, яким упродовж 40 і 60 днів додавали до раціону вітамін Е (олійний розчин альфа-токоферилацетату). Було сформовано 4 групи птиці: I – стандартний раціон, рекомендована доза вітаміну Е складала 10 мг/кг [5].; II група – не отримувала добавки вітаміну Е; III група – доза вітаміну Е 100 мг/кг; IV група – доза вітаміну Е 200 мг/кг. Групи курчат віком 1 доба були сформовані відповідно до груп курей-несучок. Курчата одержували стандартний корм. У наступному досліді курчатам добового віку одноразово вводили 1 мг вітаміну Е, що відповідає десятикратній дозі [3; 5].

Проводили полярографічні дослідження процесів дихання в мітохондріях печінки, які одержували методом диференційного центрифугування. Сукцинат використовували як субстрат окиснення, а 2,4-динітрофенол (2,4-ДНФ) – як роз'єднувач процесів дихання і фосфорилування. Швидкість поглинання кисню визначали за допомогою кисневого електрода Кларка. Розраховували швидкості дихання мітохондрій (V_2 , V_3 , V_4 , $V_{днф}$), інтенсивність фосфорилування (ІФ), коефіцієнт дихального контролю за Ларді (ДК) та ефективність фосфорилування (АДФ/О) [3].

Концентрацію вітаміну Е визначали за допомогою ТШХ. Активність ферменту СДГ (КФ.1.3.5.1.) досліджували за методом Ф. С. Путіліної та Н. Д. Єщенко з модифікаціями [2; 3]. Математичне опрацювання результатів проведено з використанням комп'ютерних таблиць Excel.

Результати дослідження. Застосування підвищених доз вітаміну Е в раціоні курей впродовж 40 днів привело до накопичення його в печінці курей, яєчному жовтку й печінці отриманих курчат (табл. 1). Після згодовування добавок вітаміну Е куркам-несучкам у дозах – 100 і 200 мг/кг корму, концентрація вітаміну Е в печінці курчат 3-ї і 4-ї груп підвищувалася, відповідно, в 3,4 і 18,6 разів, порівняно з контрольною групою.

1. Вплив споживання вітаміну Е курками-несучками на вміст цих вітамінів у яєчному жовтку і печінці курчат, $M \pm m$ (n=15)

Групи	Добавка вітаміну Е, мг/кг	Концентрація вітаміну Е в яєчному жовтку, мкг/г	Концентрація вітаміну Е в печінці курчат, мкг/г
1	10	80,82±7,55	253,11±5,04
2	0	64,80±3,42	233,31±18,04*
3	100	600,03±45,98**	860,00±46,32**
4	200	1016,00±103,86*	4730,02±276,26**

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – різниця достовірна порівняно з показниками 1-ї групи

ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

2. Вплив споживання вітаміну Е курками-несучками на дихальну активність мітохондрій печінки добових курчат, $M \pm m$ (n=5)

Показники окиснення, (нмоль O_2 /хв×мг)	Групи курчат			
	1	2	3	4
V_2	23,03 ±3,21	13,65 ±0,32	16,60 ±0,20	23,16 ±0,02
V_3	59,86 ±5,14	48,89 ±1,48	57,18 ±0,61	89,47±0,67*
V_4	32,89±2,19	16,51±0,11*	21,52±0,10*	78,95±1,01*
$V_{днф}$	64,50 ±2,85	31,46 ±3,50	42,73 ±0,13	98,48 ±4,33
ДК (V_3/V_2), од.	2,60 ±0,35	3,58 ±0,03	3,46 ±0,05	3,86 ±0,06

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – різниця достовірна порівняно з показниками 1-ї групи

Після застосування добавок вітаміну Е (100 і 200 мг/кг) у раціоні курей протягом 40 днів у отриманих курчат у віці 1 доба встановлено стимуляцію окиснення сукцинату мітохондріями печінки (табл. 2). Так, у курчат 4-ї групи відбувалося значне підвищення швидкості окиснення сукцинату, швидкість V_3 перевищувала показник контрольної групи на 49,5 % ($p < 0,05$), а швидкість V_4 збільшувалася в 2,4 разу.

Важливо відзначити, що в 4-й групі курчат швидкість окиснення в роз'єднаному стані, $V_{днф}$, була найвищою в даному досліді, до того ж ДК за Ларді збільшувався на 48,5 %. Показник ДК за Ларді відображає реакцію мітохондрій на екзогенний АДФ і, ймовірно, необхідність в АТФ. Відомо, що підвищення інтенсивності окиснення сукцинату відбувається під дією несприятливих чинників на мембрани мітохондрій. Ймовірно, підвищення швидкості $V_{днф}$ у разі окиснення сукцинату в 7-й групі курчат можна вважати відображенням «стресового» впливу високої концентрації вітаміну Е в печінці на дихальну активність мітохондрій.

У процесі окиснення сукцинату у курчат 4-ї групи встановлене підвищення показника ІФ на 14,6 %, але ефективність фосфорилування АДФ/О знижувалась. У курчат 3-ї групи (доза вітаміну Е в раціоні курей – 100 мг/кг) встановлено загальне зниження дихальної активності мітохондрій, що супроводжувалося зниженням АДФ/О на 35,7 %.

У результаті застосування в раціоні курей-несучок вітаміну Е в 10- і 20-кратних дозах він спричиняє несприятливий вплив на дихальну активність мітохондрій печінки курчат добового віку, оскільки за окиснення сукцинату процеси тканинного дихання і фосфорилування роз'єднуються.

В результаті дії ліпотропних роз'єднуючих агентів, наприклад 2,4-ДНФ, тканинне дихання стає неконтрольованим або відбувається з максимальною швидкістю. Так, як 2,4-ДНФ прони-

кає кризь внутрішню мембрану мітохондрій у вигляді іону (PhO⁻) або фенолу (PhOH), транспортує в матрикс H⁺. Можливо, вітамін Е, який також має у структурі фенольне угруповання, здатен у великих концентраціях діяти як протонфор. Тобто, у «надлишковій» концентрації вітамін Е, який не витрачається як антиоксидант, може впливати на транспортування протонів і змінювати заряд мембрани, порушуючи протонний градієнт, необхідний для синтезу АТФ. Результатом такої дії є вільне окиснення субстрату, не сполучене з утворенням АТФ.

У наступному досліді на курчатах добового віку визначали показники дихальної активності мітохондрій за одноразового перорального введення в організм десятикратної дози вітаміну Е та динаміку накопичення альфа-токоферолу в печінці. Пік концентрації вітаміну Е в плазмі крові та в печінці курчат наступав одночасно, – через 4 години після введення препарату (рис. 1). У плазмі крові концентрація вітаміну Е збільшувалася з 9,77±0,84 мкг/мл до 34,33±2,56 мкг/мл, а в печінці – з 362,64±7,80 мкг/г до 728,12±12,27 мкг/г ($p < 0,01$). Такий ефект був короткочасним, рівень вітаміну Е відновлювався впродовж дев'яти годин.

У курчат, протягом 6-ї годин після введення вітаміну Е, встановлене нерівномірне зростання швидкості окиснення сукцинату. Дихальна активність мітохондрій печінки змінювалася вже через годину (рис. 2). Максимальне підвищення швидкостей окиснення сукцинату визначено через 4 години після введення вітаміну Е.

Так, на 4-й годині досліді швидкість V_3 збільшувалася в 3,2 разу, а $V_{днф}$ – в 3,4 разу. Встановлене незначне зростання ступеня сполучення реакцій дихання і фосфорилування: впродовж першої години досліді ДК за окиснення сукцинату зростав від 2,06±0,04 до 2,34±0,20 од., через 4 години цей показник складав 2,56±0,09 од. Такі зміни супроводжувалися підвищенням показни-

ків ІФ у 3,3 разу (рис. 3) за майже сталого відношення АДФ/О (рис. 4). Це свідчить про загальну стимуляцію окиснення сукцинату мітохондріями в разі збільшення концентрації вітаміну Е

в печінці більше ніж у удвічі. Зокрема, більш активно проходили реакції вільного окиснення, а процеси утворення АТФ відбувалися швидко, хоча й малоєфективно.



Рис. 1. Динаміка накопичення вітаміну Е у плазмі крові курчат після введення препарату

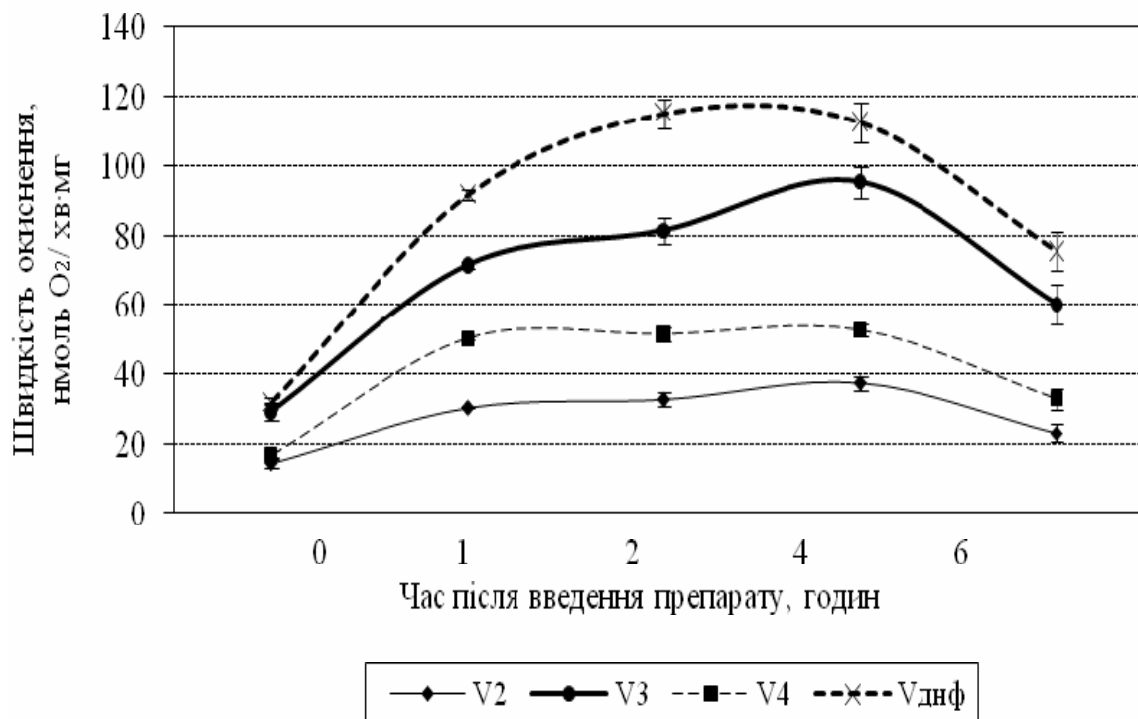


Рис. 2. Динаміка окиснення сукцинату мітохондріями печінки курчат після перорального введення вітаміну Е

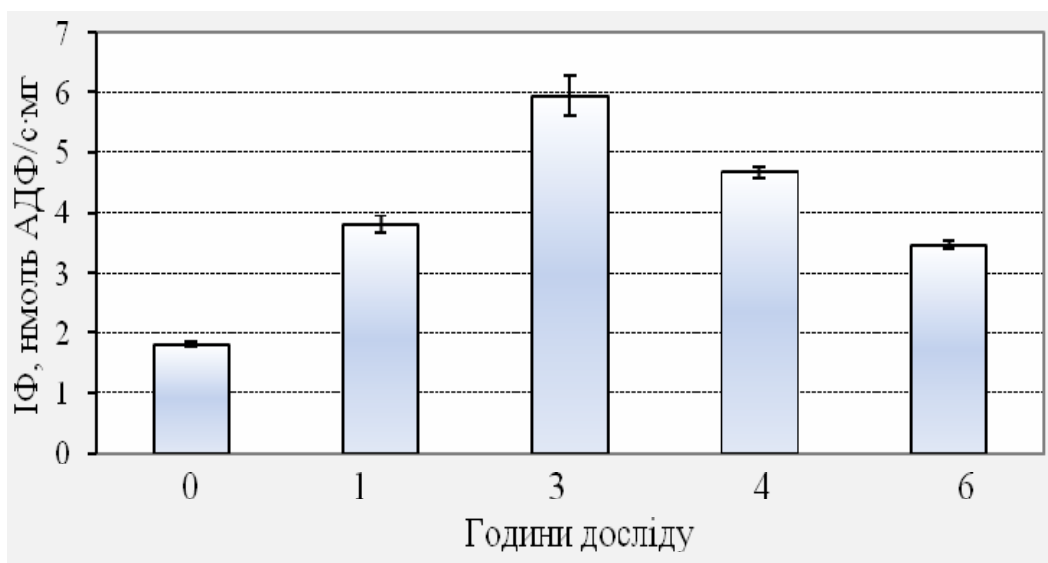


Рис. 3. Динаміка інтенсивності фосфорилювання в мітохондріях печінки курчат після одноразового введення вітаміну Е

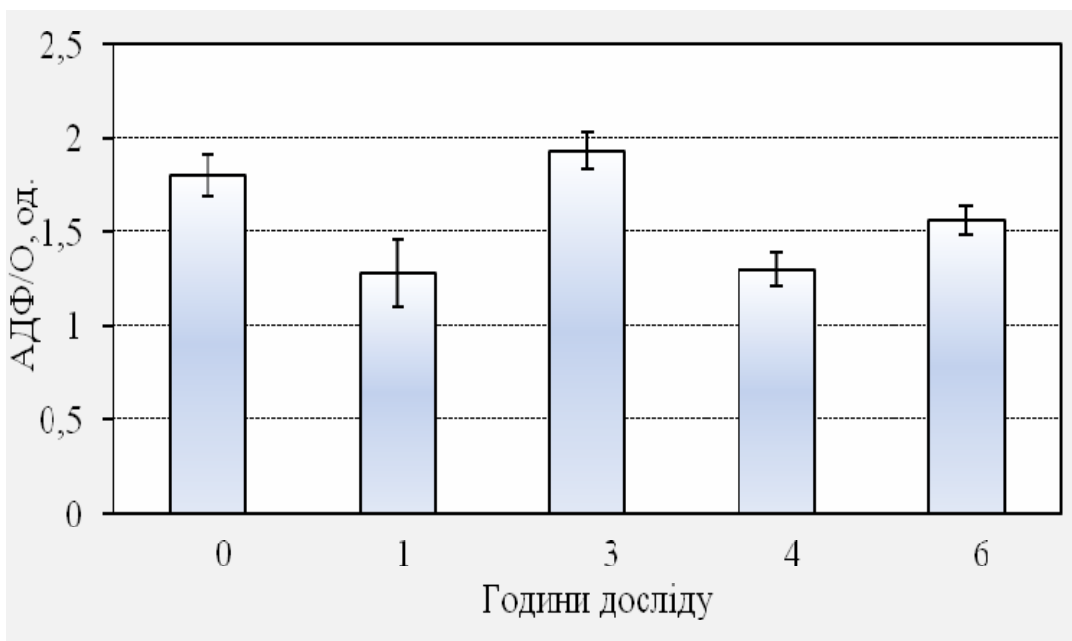


Рис. 4. Ефективність фосфорилювання в мітохондріях печінки курчат після одноразового введення вітаміну Е

У курей-несучок, яким впродовж 40 днів згодовували корми, збагачені вітаміном Е, визначали показники тканинного дихання, а також активність ферменту СДГ у мітохондріях печінки. За застосування вітаміну Е в раціоні курей у кількості 100 мг/кг активність ферменту СДГ у печінці збільшилася від 1,796 до 2,326 мкМоль/мг×год ($p < 0,05$). Вірогідно, активізація СДГ в печінці курей є неспецифічною в результаті реакції мітохондрій на дію вітаміну Е як мембранотропного фактора.

У 3-й групі курей (доза 100 мг/кг) швидкість V_2 підвищилася на 78,9 % ($p < 0,05$), ІФ суттєво не змінилась, але АДФ/О збільшився від 1,23 од. (в контролі) до 1,94 од. У курей 4-ї групи за збільшення дози вітаміну Е до 200 мг/кг корму та зростання його концентрації в печінці в 9,5 разу інтенсивність окиснення сукцинату V_2 підвищилася на 115,4 %; встановлено незначне підвищення коефіцієнта АДФ/О, водночас зі збільшенням ІФ на 12,4 %. Такі зміни є відображенням стимулюючої дії вітаміну Е в 10- і 20-

кратних дозах на процеси дихання та окислювального фосфорилування в мітохондріях печінки в разі споживання його птицею впродовж 40 днів. Стимулюючий вплив вітаміну Е на окиснення сукцинату мітохондріями печінки курей, окрім мембранотропної дії, може бути також відображенням міжвітамінних взаємодій убихінону (компоненту ІІІ комплексу ДЛ) та токоферолу [4].

Подальше накопичення (60 днів) у печінці курей вітаміну Е за споживання у таких дозах спричиняє зниження дихальної активності мітохондрій і роз'єднання процесів дихання та фосфорилування, що виявилось порушенням використання екзогенного АДФ та уповільненням синтезу АТФ за окиснення сукцинату. Це узгоджується з даними літератури про застосування високих доз вітаміну Е в раціоні курей [12].

Показники ІФ і АДФ/О значно знижувались у курей 4-ї групи, які одержували дозу вітаміну Е – 200 мг/кг. Так, ІФ зменшився від 1,69 (у контролі) до 0,98 (нмоль АДФ/с×мг), а показник АДФ/О – від 1,02 до 0,80 од. Це відображає несприятливий вплив вітаміну Е на реакції дихання та фосфорилування в разі окиснення сукцинату за умов тривалого накопичення альфа-токоферолу в печінці курей.

У цілому, на основі отриманих результатів дійсно висновку, що вітамін Е спричиняє дозозалежні ефекти на реакції біологічного окиснення в печінці курей і курчат. Незважаючи на шляхи накопичення вітаміну Е в печінці (тривале збагачення раціону курей, перехід з яєчного жовтку в печінку курчати, одноразове пероральне введення альфа-токоферилацетату), зміни у процесах окиснення сукцинату мітохондріями під дією вітаміну Е відбувались однотипно і залежно від його дози та концентрації в печінці.

З метою активізації ферментативної активності мітохондрій печінки та активізації окиснення субстратів ЦТК вітамін Е можна застосовувати в раціоні курей у кількості 100 мг/кг корму не більше 35–40 днів. У разі такої корекції раціону можна стимулювати енергетичний обмін у птиці, а також отримати яйця, збагачені вітаміном Е. Проте для отримання інкубаційних яєць не слід перевищувати дозу вітаміну Е для курей більше, ніж 100 мг/кг корму, так як активізація вільного

окиснення сукцинату в печінці курчат є несприятливим чинником на початку росту.

Висновки. Зміни дихальної активності мітохондрій та процесів фосфорилування за окиснення сукцинату залежать від дози вітаміну Е й пов'язані з його вмістом у печінці.

1. Зростання концентрації вітаміну Е в печінці добових курчат більше ніж у 3,4 разу, внаслідок його попереднього накопичення в яйці, спричиняє негативний вплив на енергетичні процеси у мітохондріях, оскільки за інтенсивного окиснення сукцинату відбувається зниження ефективності фосфорилування.

2. Одноразове пероральне введення курчатам 1 мг вітаміну Е спричиняє короточасну стимуляцію вільного окиснення сукцинату, а процеси дихання і синтезу АТФ роз'єднуються.

3. Вплив вітаміну Е на окиснення сукцинату у мітохондріях печінки курей виявляється залежно від його дози в раціоні й термінів накопичення в організмі. Вітамін Е (у дозах 100 і 200 мг/кг за накопичення в організмі курей протягом 40 днів) має позитивний стимулюючий вплив на окиснення сукцинату і процеси фосфорилування у мітохондріях печінки.

4. Довготривале застосування вітаміну Е в 10- і 20-кратних дозах у раціоні курей-несучок (впродовж 60 днів недоцільне), оскільки спричиняє гальмування окиснення сукцинату в мітохондріях печінки.

5. Стимуляцію вільного окиснення сукцинату в мітохондріях печінки курчат під дією високих доз вітаміну Е в раціоні важливо враховувати в разі можливого сумісного застосування вітаміну Е і сукцинату, як факторів метаболічної корекції у процесі вирощування птиці.

Перспективи подальших досліджень. У зв'язку з мембранотропною та антиоксидантною функціями вітаміну Е необхідне подальше вивчення його впливу на енергетичні процеси в печінці за умов введення у раціон тварин екзогенних субстратів тканинного дихання. За одночасного застосування сукцинату і вітаміну Е у раціоні птиці важливо дослідити їх дозозалежні ефекти на реакції біологічного окиснення. Такі розробки сприятимуть ефективному проведенню заходів метаболічної корекції та метаболічної терапії.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Басанкин А. В. Фармако-токсикологическое обоснование применения янтарной кислоты в животноводстве и ветеринарии: дисс... кандидата вет. наук: спец. 16.00.04 «Ветеринарная фармакология с токсикологией» / Алексей Вадимович Басанкин. – Казань, 2007. – 142 с.

2. Биохимические методы контроля метаболизма в органах и тканях птиц и их витаминной обеспеченности (научно-методические рекомендации) / П. Ф. Сурай, И. А. Ионов. – Х. : Юж. отд. ВАСХНИЛ УНИИП, 1990. – 138 с.

3. Критерии и методы контроля метаболизма в

организме животных и птиц / И. А. Ионов, С. О. Шаповалов, Е. В. Руденко [и др.] – Х. : Институт животноводства НААН, 2011. – 376 с.

4. *Кучменко О. Б.* Розробка біологічно активних комплексів для корекції показників біоенергетичних процесів за умов вітамін Е-гіповітамінозу / О. Б. Кучменко, Г. В. Донченко, Д. М. Петухов // Вісник БДАУ. – 2009. – Вип. 60. – Ч. 1. – С. 78–81.

5. *Лемешева М. М.* Кормление сельскохозяйственной птицы / М. М. Лемешева. – Сумы : Слобожанщина, 2003. – 152 с.

6. *Московцева О. М.* Влияние янтарной кислоты и ее производных на состояние свободнорадикальных процессов экспериментальных животных: дисс. ... кандидата биол. наук: спец. 03.00.00 «Биологические науки» / О. М. Московцева. – Нижний Новгород, 2006. – 160 с.

7. *Саакян И. Р.* Активация и ингибирование сукцинатзависимого транспорта Ca^{2+} в митохондриях печени при развитии адаптационных реакций / И. Р. Саакян, С. Г. Саакян, М. Н. Кондрашова // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – Вып. 7. – С. 976–984.

8. Современные аспекты метаболической коррекции / И. С. Чекман, В. С. Сухоруков, И. В. Ле-

онтьева [и др.] // Здоров'я України. – 2007. – № 7. – С. 12.

9. *Трунов М. А.* Действие и применение препарата ЯК-85 в птицеводстве: дисс. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.03, 16.00.04 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология» / М. А. Трунов. – Краснодар, 2000 – 156 с.

10. *Bergö M.* Antioxidants in the diet can worsen cancer [Electronic Resource] / M. Bergö, P. Lindahl // Pressrelease. – University of Gothenburg, 2014. – <http://www.expertsvar.se/english/pressrelease?pressReleaseID=21763&languageID=2> – Title from the screen (дата обращения: 17.02.2014).

11. *Higdon J.* Vitamin E [Electronic Resource] / J. Higdon, V. J. Drake, M. G. Traber // Linus Pauling Institute, Micronutrient Information Center, Oregon State University. – Copyright 2008. – Mode of access : URL : <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminE/>. – Title from the screen (дата обращения: 23.01.2014).

12. *Surai P. F.* Vitamin E and avian reproduction / P. F. Surai // Poultry and avian biology reviews. – 1999. – V. 10, № 1. – P. 3–60.