

и испытаний в здравоохранении ; ред. С. И. Марченко. – Молодечно : Победа, 2016. – 1368 с. 3. Фармацевтический анализ лекарственных средств / под ред. В. А. Шаповаловой. – Харьков : Рубикон, 1995. – 400 с. 4. Глоба, И. И. Хромографические и спектральные методы анализа : учебное пособие для студентов вузов по специальности «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» и химико-технологической специальности / И. И. Глоба, С. А. Ламоткин. – Минск : БГТУ, 2008. – 349 с. 5. Глоба, И. И. Оптические методы и приборы контроля качества промышленных и продовольственных товаров. Лабораторный практикум : учебно-методическое пособие для студентов учреждений высшего образования по специальности 1-54 01 03 «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» / И. И. Глоба, А. А. Гаиновский. – Минск : БГТУ, 2012. – 249 с. 6. Глоба, И. И. Оптические методы и приборы контроля качества товаров. Лабораторный практикум / И. И. Глоба. – Минск : БГТУ, 2003. 7. Дегтярев, Е. В. Анализ лекарственных средств в исследованиях, производстве и контроле качества / Е. В. Дегтярев // Российский химический журнал. – 2002. – Т. XLVI, № 4.

Поступила в редакцию 23.04.2020 г.

УДК 619:616.34-002:615.246:636.2.053

### ПОЛИСУБСТРАТНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ МЕМБРАННОМ ГИДРОЛИЗЕ БЕЛКОВ И УГЛЕВОДОВ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

\*Щербakov Г.Г., \*\*Напреенко А.В., \*\*Ковалёнок Ю.К.

\*Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины,  
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

\*\*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

При мембранном пищеварении происходит одновременная переработка основных субстратов, при этом компоненты диеты избирательно воздействуют на гидролиз субстратов из других групп нутриентов. Экспериментально показано, что взаимодействие между модификаторами и субстратами происходит по принципу торможения или стимулирования гидролиза. При этом расщепление дипептидов максимально тормозится в присутствии жиров в среднем в 70% ( $p < 0,01$ ), дисахариды (сахароза) вызывают незначимую ( $p > 0,05$ ), но постоянную стимуляцию гидролиза глицил-L-лейцина. Максимальный ингибирующий эффект на гидролиз исследуемых субстратов отмечен преимущественно у трибутирина (более 80%). Отмечено, что модификаторы являются более активными регуляторами гидролиза, чем их производные; большинство взаимодействий между субстратами осуществляется на уровне ферментативных молекул и в меньшей степени - мембран клеток. **Ключевые слова:** мембранное пищеварение, гидролиз, крысы, субстраты, модификаторы.

### POLYSUBSTRATE PROCESSES IN MEMBRANE HYDROLYSIS OF PROTEINS AND CARBOHYDRATES IN MAMMALS

\*Shcherbakov G.G., \*\*Napreenka A.V., \*\*Kavalionak Y.K.

\*Saint Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

\*\*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

In membrane digestion, the main substrates are simultaneously processed, while the components of the diet selectively affect the hydrolysis of substrates from other groups of nutrients. It is shown experimentally that the interaction between modifiers and substrates occurs on the principle of inhibition or stimulation of hydrolysis. In this case, the cleavage of dipeptides is maximally inhibited in the presence of fats by an average of 70% ( $p < 0,01$ ), disaccharides (sucrose) cause insignificant ( $p > 0,05$ ), but constant stimulation of hydrolysis of glycy-L-leucine. The maximum inhibitory effect on the hydrolysis of the studied substrates was noted mainly for tributyrin (more than 80%). It is noted that modifiers are more active hydrolysis regulators than their derivatives; most interactions between substrates are carried out at the level of enzymatic molecules and, to a lesser extent, cell membranes. **Keywords:** membrane digestion, hydrolysis, rats, substrates, modifiers.

**Введение.** Эмпирический и научный анализы предусматривают в своей основе создание моделей, позволяющих интегрировать сущность естественных процессов. Биология пищеварения продолжает оставаться актуальной областью научных школ разных стран мира [4, 5, 6, 7]. Научным наследием сформирован существенный задел современного понимания биологии полостного и мембранного пищеварения, существующих механизмов транспорта нутриентов диеты из полости кишки во внутреннюю среду организма и т.д. Вместе с тем, до настоящего времени среди ученых не выработана единая парадигма о гидролизе многокомпонентной диеты. При этом широко представлены взгляды от существования изолированных энзиматических путей расщепления каждого субстрата [2, 3, 4] до сообщений [1] о сложных полисубстратных взаимодействиях. Сторонники теории прямых гидролитических путей утверждают, что переработка алиментарных субстратов осуществляется большим числом специфических ферментов (гидролаз), функционирующих в пищеварительном тракте вне связи друг с другом. Оппоненты данной точки зрения находят механизмы гидролиза компонентов диеты мультифакторными, стратификация которых может определяться весьма обширными и разнонаправленными векторами.

Данные обстоятельства создают, на наш взгляд, весомые предпосылки для поиска новых подходов к изучению обсуждаемого вопроса. Исходной гипотезой исследований являлась мысль о том, что участвующие в мембранном пищеварении ферменты могут изменять свою активность в присутствии различных субстратов-модификаторов, не являющихся субстратами данных энзимов.

Целью наших исследований явилось изучение особенностей взаимодействия основных групп нутриентов на стадии мембранного гидролиза у млекопитающих.

**Материалы и методы исследований.** Исследования выполнены в институте физиологии им. М.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербургской (Российская Федерация) и Витебской (Республика Беларусь) государственных академиях ветеринарной медицины.

Опыты проводились на белых крысах ( $n=7$ ). Экспериментальные животные содержались в вивариях, уход, кормление и содержание были стандартными и соответствовали требованиям СНИП для вивариев НИИ, приказ № 1045-73. Опыты выполнены в 3-кратной повторности. Рационы и режимы кормления стандартизированы исходя из соответствующих рекомендаций и приказов, что определило нормальный биологический фон.

Все экспериментальные процедуры с животными выполнялись в соответствии с руководящими принципами Директивы 2010/63 / EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях, и были одобрены Советом по этике животных в учреждениях, в которых проводились эксперименты.

Материалом для исследований являлись биосубстраты, полученные от экспериментальных животных: отрезки тонкой кишки, ее гомогенаты и солиобилизованные кишечные ферменты.

Из эксперимента все животные выводились путем цервикальной дислокации. Получаемые участки тонкой кишки от всех животных смешивались, что обеспечивало совокупность ферментативных активностей в усредненных образцах из различных участков кишки. Сегменты тонкой кишки, взятые дистальнее связки Трейтца, быстро удалялись из организма, промывались холодным раствором Рингера (рН 7,4). Вывернутые (интактные) сегменты тонкой кишки в последующем подвергались инкубации с испытуемыми субстратами и модификаторами. Для получения гомогенатов слизистой оболочки участки кишечника длиной 30-50 мм суспендировали вместе в ледяном фосфатном буфере Рингера.

В качестве субстратов и модификаторов использовались растворы: глицил-L-лейцин (3 г/л), сахароза и мальтоза (20 г/л),  $\beta$ -глицерофосфат натрия (5 г/л) и трибутирин (2,5 г/л). Кроме того, в качестве модификаторов использовались бутирины (2 г/л) и эквивалентная глицил-L-лейцину смесь аминокислот (3 г/л).

Образцы кишки массой 700 мг инкубировали в 16 мл субстратных растворов при рН 7,4 и газировали  $O_2-CO_2$  (95:5). Инкубационный период составлял 45 минут при 37°C при постоянном перемешивании (амплитуда 10 мм, скорость 60 об/мин). Первый образец отбирали после инкубации в течение 5 минут, последующие - с интервалами в 10 минут. Гомогенаты тканей инкубировали в течение 10-15 мин. при 37°C с 16 мл субстратных растворов. Скорость гидролиза субстрата оценивалась по накоплению соответствующих продуктов. Гидролиз дипептидов (на примере глицил-L-лейцина) определялся по методу Мура и Стейна (1948) либо по методу Уголева А.М. и Тимофеевой Н.М. (1969). Гидролиз сахарозы исследовался глюкозооксидазным методом (Уголев А.М. и Иезуитова Н.Н., 1969); гидролиз трибутирина - по приросту свободного глицерина (Уголев А.М. и Черняховская М.Ю., 1969), гидролиз  $\beta$ -глицерофосфата натрия - по приросту неорганического фосфора по методу Фиске и Субарроу (1925). Концентрация субстратов - модификаторов соответствовала концентрации основных субстратов.

Процедуры анализа осуществляли с помощью статистических пакетов SAS 9.2, STATISTICA 9 и SPSS-19. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось менее 0,05. Выбор критерия оценки значимости парных различий проверяли соответствием формы распределения нормальному, используя критерий  $\chi^2$ , Колмогорова и Шапиро-Уилки, равенство генеральных дисперсий контролировали с помощью F-критерия Фишера.

В итоге распределение большинства полученных данных соответствовало нормальному и анализировалось с использованием t-критерия Стьюдента. Для всех количественных признаков проводилась оценка средних арифметических ( $M$ ) и стандартного отклонения ( $\sigma$ ). Доверительные интервалы, приводимые в работе, строились для доверительной вероятности  $p = 95\%$ .

**Результаты исследований.** В ходе изучения влияния модификаторов на гидролиз дипептидов интактными кусочками тонкой кишки белых крыс, было установлено, что трибутирин вызывает резкое значимое торможение гидролиза глицил-L-лейцина начиная с первых минут эксперимента, достигая 70% ( $p < 0,01$ ) к концу инкубации (таблица 1).

Обращает на себя внимание тот факт, что торможение гидролиза глицил-L-лейцина в присутствии  $\beta$ -глицерофосфата натрия через 45 минут не столь резко выраженное, как в присутствии предыдущего модификатора и составляет 18% ( $p < 0,05$ , таблица 1).

Интересные результаты были получены в отношении сахарозы, которая в отличие от липидов вызывает незначимую ( $p > 0,05$ ), но регулярную стимуляцию гидролиза глицил-L-лейцина начиная с первых периодов инкубации (таблица 1). При этом дисахарид в сочетании с трибутирином потенцирует ингибиторный эффект последнего.

**Таблица 1 – Влияние трибутирина, β-глицерофосфата натрия и сахарозы на гидролиз глицил-L-лейцина интактными кусочками тонкой кишки белых крыс (M, σ, p)**

Время инкубации (мин)	Активность глицил-L-лейцин дипептидазы (в ммоль гидролизованного дипептида)			
	Гидролиз дипептида в отсутствие модификатора	В присутствии трибутирина	В присутствии β-глицерофосфата натрия	В присутствии сахарозы
5	3,45±0,286	1,45±0,121*	1,98±0,178	3,85±0,186
25	8,74±0,631	2,28±0,178	5,12±0,374	8,94±0,571
45	11,95±1,034	7,03±0,214**	10,15±0,789	11,98±0,961

Примечания: \* -  $p < 0,01$ , \*\* -  $p < 0,05$  при сравнении с гидролизом дипептида.

Анализируя данные таблицы 2, можно отметить, что ингибиторный эффект трибутирина не обусловлен накоплением промежуточных и конечных продуктов его гидролиза, поскольку при исследовании в тех же методических условиях влияния три-, ди- и монобутирина, а также масляной кислоты было установлено, что тормозящий гидролиз дипептида эффект ранжируется таким образом (по убыванию): трибутирин, дибутирин, монобутирин и масляная кислота (таблица 2).

В ряде модельных опытов нами было изучено влияние различных модификаторов на гидролиз дисахаридов. Было установлено, что трибутирин не оказывает значимое влияние на гидролиз сахарозы (таблица 3). Важно отметить, что в тех же самых концентрациях трибутирин резко тормозил расщепление дипептидов, что показано нами выше (таблица 2).

В то же время при определении суммарной мальтазной активности был установлен значительный стимулирующий эффект трибутирина, выражающийся в усилении гидролиза мальтозы преимущественно в первые минуты инкубации (таблица 3). При исследовании влияния β-глицерофосфата натрия на мембранный гидролиз углеводов было обнаружено, что темпы гидролиза сахарозы практически не изменяются.

**Таблица 2 - Влияние различных субстратов-модификаторов на гидролиз глицил-L-лейцина интактными кусочками тонкой кишки белых крыс (M, σ, p)**

Время инкубации (мин.)	Активность глицил-L-лейцин дипептидазы (в моль гидролизованного дипептида)				
	Гидролиз дипептида в отсутствие модификатора	В присутствии масляной кислоты	В присутствии монобутирина	В присутствии дибутирина	В присутствии трибутирина
5	3,45±0,286	1,56±0,107	1,69±0,148	1,78±0,130	1,45±0,121*
25	8,74±0,631	6,31±0,617	5,87±0,547	4,46±0,226	2,28±0,178
45	11,95±1,034	10,8 ± 0,65	9,75 ± 0,728	7,84 ± 0,341	7,03±0,214**

Примечания: \* -  $p < 0,01$ , \*\* -  $p < 0,05$  при сравнении с гидролизом дипептида в отсутствие модификатора.

**Таблица 3 - Влияние трибутирина на гидролиз дисахаридов интактными кусочками тонкой кишки белых крыс (M, σ, p)**

Время инкубации (мин.)	Ферментативная активность дисахаридаз (в мкмоль образующихся продуктов гидролиза)			
	Гидролиз сахарозы	Гидролиз в присутствии трибутирина	Гидролиз мальтозы	Гидролиз в присутствии трибутирина
5	8,83±0,786	8,15±0,0,587	40,2±3,49	73,5±6,04**
15	38,7±2,71	32,1±2,45	98,3±6,61	120,3±9,25
35	50,2±3,56	49,0±3,48	175,4±11,49	192,8±12,16

Примечания: \* -  $p < 0,01$ , \*\* -  $p < 0,05$  при сравнении с гидролизом дисахарида в отсутствие субстрата-модификатора.

Анализируя результаты исследований, мы пришли к выводу, что существуют значительные взаимодействия между субстратами при переваривании многокомпонентной диеты на поверхности тонкой кишки млекопитающих (на примере белых крыс). В частности мы показали, что протекание моно-субстратных процессов значительно отличается от бисубстратных, наиболее приближенных к модели сложной переработки естественной диеты. Так, результатами исследований показано, что гидролиз глицил-L-лейцина значительно замедляется в присутствии трибутирина, в то время как сахароза, наоборот, стимулирует гидролиз пептида, а в сочетании с трибутирином – потенцирует ингибиторный эффект последнего. Выступая в качестве модификаторов, трибутирин и глицил-L-лейцин, не оказывают существенного влияния на гидролиз сахарозы.

Анализ временной динамики процессов межсубстратного взаимодействия в обобщающем контексте для модификаторов (трибутирина и глицил-L-лейцина), промежуточных и конечных дериватов их расщепления (моно-, дибутирин, масляная кислота, эквивалентная смесь аминокислот) показал следующее: действие трибутирина на дипептидазную активность развивалось постепенно, нарастая к концу эксперимента.

**Заключение.** Экспериментально показано, что взаимодействие между модификаторами и субстратами происходит по принципу торможения или стимулирования гидролиза. Так, расщепление дипептидов максимально тормозится в присутствии жиров в среднем на 70% ( $p < 0,01$ ), дисахариды (сахароза) вызывают незначимую ( $p > 0,05$ ), но постоянную стимуляцию гидролиза глицил-L-лейцина. Максимальный ингибирующий эффект на гидролиз исследуемых субстратов отмечен преимущественно у трибутирина (более 80%).

**Литература.** 1. Ковалёнок, Ю. К. Механизмы всасывания микроэлементов кишечником жвачных в условиях *in vitro* / Ю. К. Коваленко // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины. – Казань, 2012. – Т. 211. – С. 269–274. 2. Ковалёнок, Ю. К. Устройство для изучения всасываемости веществ кишечником животных / Ю. К. Коваленко // Международный вестник ветеринарии. – 2012. – № 1. – С. 16–20. 3. Ковалёнок, Ю.К. Активность мальтазы при кишечном дисбиозе животных / Ю. К. Ковалёнок, А. В. Напреенко // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. – Витебск, 2017. – Т. 53, вып. 2. – С. 56–59. 4. Метельский, С. Т. Два механизма мембранного пищеварения: ферментативно-транспортный ансамбль существует и для олигопептидов / С. Т. Метельский, В. Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2011. – Т. 21, № 3. – С. 19–23. 5. Распределение инвертазной, пептидазной и моноглицеридлипазной активностей вдоль тонкой кишки у различных млекопитающих / А. М. Уголев [и др.] // Материалы IV конференции физиологов республик Средней Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1969. – Т. II. – С. 260–263. 6. Уголев, А. М. Определение протеолитической активности / А. М. Уголев, Н. М. Тимофеева // Исследование пищеварительного аппарата у человека: обзор современных методов / А. М. Уголев [и др.] – Ленинград: Наука, 1969. – С. 176. 7. Черняховская, М. Ю. Локализация заключительных стадий гидролиза трибутирина в эпителиальных клетках тонкой кишки / М. Ю. Черняховская, А. М. Уголев // Доклады АН СССР. – 1969. – Т. 187, № 3. – С. 701–703. 8. Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum / M. Mizumori [et al] // J. Physiol. – 2009. – Vol. 587, № 14. – P. 3651–3663. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172270> 9. Iqbal, J. Intestinal lipid absorption / J. Iqbal, M. M. Hussain // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 296, № 6. – P. 1183–1194. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90899.2008> 10. Role of phosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration / T. Nakano [et al] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. – 2009. – Vol. 297, № 1. – P. 207–214.

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.

УДК 619:614.31:637.54

#### ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «КОЛИСТИНЛАКТ» НА ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНУЮ ОЦЕНКУ МЯСНЫХ КАЧЕСТВ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Юркевич В.В., Гласкович М.А., Пахомов П.И.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Немаловажное значение для сохранения здоровья людей имеет повышение санитарного качества, а также пищевой и биологической полноценности продуктов питания и их безвредности. Важнейшим мероприятием в решении этих задач является научно обоснованная ветеринарно-санитарная оценка продуктов убоя птицы. Заслуживает особого внимания оценка мяса, полученного от птицы, которой вводили в рацион препараты. В статье представлены данные лабораторных исследований мяса цыплят-бройлеров кросса Ross-308, в рацион которых вводился препарат «Колистинлакт». Установлено, что по органолептическим, бактериологическим, физико-химическим показателям, биологической ценности, а также по некоторым химическим показателям мясо опытных групп достоверно превосходило мясо контрольной группы. Комплексная ветеринарно-санитарная оценка тушек птицы не выявила каких-либо отклонений от существующих стандартов, что позволит в будущем выпускать продукцию в реализацию без ограничения. **Ключевые слова:** цыплята-бройлеры, продукты убоя, ветеринарно-санитарная оценка, физико-химические показатели, мясные качества, безвредность мяса и жира птицы, сортность тушек.

#### THE INFLUENCE OF THE «KOLISTINLAKT» PREPARATION ON THE VETERINARY AND SANITARY EVALUATION OF BROILER CHICKENS MEAT QUALITY

Yurkevich V.V., Glaskovich M.A., Pakhomov P.I.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

Important value for maintaining people's health is improving the sanitary quality as well as the nutritional and biological usefulness of food products and their safety. The most important measure in solving these problems is the scientifically based veterinary and sanitary assessment of poultry slaughter products. Special attention is given to the assessment of meat obtained from poultry which were given the preparation. The article presents the data of laboratory studies of meat of the cross Ross-308 broiler chickens in the diet of which the preparation «Kolistinlakt» was introduced. It has been found that the meat of the experimental groups significantly exceeded the meat of the control group in organoleptic, bacteriological, physical and chemical indices, biological value, and in some chemical indices. A comprehensive veterinary and sanitary assessment of poultry carcasses did not reveal any deviations from current standards. In future it will allow to release products for sale without restriction. **Keywords:** broiler chickens, slaughter products, veterinary and sanitary assessment, physical and chemical indices, meat quality, harmlessness of poultry meat and fat, carcass grade.