

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР

ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

На правах рукописи

Ж И Г У Р Е

Дале Рудольфовна

ДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЯ, ФОСФОРА И ВИТАМИНА D НА
ВСАСЫВАНИЕ И БАЛАНС ЦИНКА В ОРГАНИЗМЕ ЦЫПЛЯТ

03.00.04 Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Р И Г А, 1975

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

На правах рукописи

Ж И Г У Р Е
Дале Рудольфовна

ДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЯ, ФОСФОРА И ВИТАМИНА D НА
ВСАСЫВАНИЕ И БАЛАНС ЦИНКА В ОРГАНИЗМЕ ЦЫПЛЯТ

03.00.04 Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Р И Г А, 1975

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

Работа выполнена в Институте биологии АН Латвийской ССР в лаборатории физиологии и биохимии животных.

Научный руководитель: член - корреспондент АН Латв. ССР, доктор биологических наук В.К. БАУМАН.

Официальные оппоненты: заслуженный деятель науки Латв. ССР, доктор биологических наук Е.М. АЛИКОВА;
кандидат биологических наук, доцент Ш.А. БЕРМАН.

Ведущее научно-исследовательское учреждение: Латвийский научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Министерства Здравоохранения Латвийской ССР.

Автореферат разослан *1 мая* 1975 года.

Защита диссертации состоится *5 июня* 1975 года в 14.00 часов на заседании Объединенного ученого совета по биологическим наукам при Отделении химических и биологических наук Академии наук Латвийской ССР (г. Рига, ул. Тургенева 19, в лекционном зале, III-й этаж).

Просим ознакомить специалистов с авторефератом и прислать отзывы в двух экземплярах с подписью, заверенной печатью учреждения, по адресу: г. Рига, ул. Тургенева 19, Отделение химических и биологических наук АН Латвийской ССР.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке АН Латвийской ССР (г. Рига, ул. Комунала 4).

Ученый секретарь совета,
кандидат сельскохозяйственных наук

М. Зарубин
М.П. Зарубина

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

Цинк является необходимым для жизни микроэлементом. Он входит в состав многих биологически активных веществ (ферменты, гормоны) и участвует в таких жизненно важных процессах организма, как биосинтез белка и нуклеиновых кислот, деление клеток, а также в репродуктивной функции. Дефицит цинка в организме вызывает значительное торможение роста и снижение продуктивности животных. Особенно чувствительны к дефициту цинка быстро созревающие сельскохозяйственные животные — свиньи и птицы. В зоотехнической практике нередко случаи развития у этих животных цинковой недостаточности, что наносит народному хозяйству значительный экономический ущерб.

Цинковая недостаточность у птиц в практических условиях, как правило, не связана с дефицитом этого элемента в кормах, так как в обычном рационе смешанного типа, состоящем из кормов растительного и животного происхождения, содержание цинка колеблется в пределах нормы и составляет в среднем около 35 мг/кг. Однако усвоение цинка птицей из рационов варьирует в зависимости от многочисленных факторов, связанных как с физиологическим состоянием организма, так и с составом рациона, и в некоторых случаях может быть значительно понижено, что приводит к развитию в организме вторичной цинковой недостаточности.

Вопрос о факторах рациона, влияющих на усвоение цинка у животных, изучался рядом отечественных и зарубежных исследователей (Петрухин, 1966; Беренштейн, Штак, 1968; Тауцин, 1968; Андонин, 1973; Heth et al., 1965; 1966; Hoekstra, 1964, 1972; O'Dell et al., 1960, 1964, 1972; Methfessel et al., 1973).

Установлено, что на усвоение цинка значительное влияние оказывает состав и количество белков рациона, фитиновая кислота, витамин D, минеральные вещества — кальций и фосфор. О роли белков и аминокислот, а также фитиновой кислоты в процессе всасывания цинка имеются довольно детальные иссле-

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 4 -

дования, но относительно действия таких факторов, как витамин D, кальций и фосфор литературные данные крайне скудны и противоречивы. В ряде слитов (Нахомов, 1971; O'Dell, Savage, 1957, 1964; Robertson, Schaible, 1960) показано, что с увеличением уровня кальция в рационе птиц и свиней потребность их в цинке увеличивается. Однако до сих пор не изучено, какие количества кальция и фосфора угнетают всасывание цинка, не вскрыты механизмы взаимодействия этих элементов в кишечном тракте птиц. Неясно также, действует ли витамин D на усвоение и обмен цинка в организме цыплят.

Как известно, потребность птиц в минеральных веществах выше, чем у других сельскохозяйственных животных, и их рационы соответственно богаче кальцием и фосфором. Поэтому изучение роли этих элементов в процессе всасывания цинка у птиц имеет несомненное практическое значение. Определенный интерес этот вопрос представляет и в теоретическом отношении, ибо механизмы всасывания катионов, в частности цинка, в пищеварительном тракте животных пока еще мало исследованы. Гипотеза о существовании в слизистой кишечника общей транспортной системы для кальция и цинка, вследствие чего между этими катионами в процессе всасывания возникают отношения конкурентного ингибирования, пока еще экспериментально не обоснована.

Все это послужило нам основанием для выбора данной темы. При ее разработке был поставлен ряд конкретных задач:

1. Особенности транспорта цинка через кишечную стенку.
2. Действие витамина D на баланс цинка в организме и процесс его всасывания в кишечнике.
3. Взаимодействие катионов в процессе всасывания в тонкой кишке. Влияние различных уровней кальция в рационе на всасывание и баланс цинка.
4. Роль фосфора в процессе всасывания цинка. Влияние различных количеств фосфора на баланс цинка в организме и его всасывание в кишечнике.
5. Совместное влияние кальция и фосфора на всасывание

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 5 -

и баланс цинка в организме и взаимодействие этих элементов в процессе всасывания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Поставленная задача по изучению действия витамина D, кальция и фосфора на всасывание и баланс цинка в организме цыплят решалась нами с применением трех основных методических приемов:

1. Зоотехнические опыты по выращиванию цыплят на рационах с различным уровнем кальция и фосфора и различной обеспеченностью витамином D₃ с учетом роста цыплят, баланса цинка и содержания его в органах и тканях.

2. Исследования в условиях in situ, на изолированном отрезке двенадцатиперстной кишки цыплят, всасывания цинка и влияния на этот процесс кальция, фосфора и витамина D.

3. Исследования в условиях in vitro, с инкубацией тонкой кишки в буферном растворе, транспорта цинка через стенку кишки и влияния на него различных концентраций кальция и фосфора, а также использование пробирочного метода для выявления взаимодействия изучаемых элементов.

Зоотехнические опыты. Влияние различных факторов рациона на усвоение, баланс и обмен цинка изучалось нами в 4 зоотехнических опытах на 980 цыплятах. В первом опыте исследовалась роль витамина D, во втором – различных уровней кальция (0,5; 1,0; 2,4%), в третьем – различных уровней фосфора (0,3; 0,6; 1,0%) и в четвертом – совместное действие двух элементов: кальция и фосфора.

Опыты проводились на петушках породы белый леггорн; цыплята выращивались в батарейных клетках и имели свободный доступ к корму и воде. Основной рацион (ОР) был следующего состава (%): кукуруза – 43,0; ячмень – 24,0; подсолнечный шрот – 17,0; казеин – 10,0; дрожжи – 3,0; костная мука – 1,5;

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 6 -

соль - 0,5. Данный рацион содержал кальция - 0,51%, фосфора - 0,64% и цинка от 35 до 40 мг на кг корма. В большинстве опытов (за исключением изучения всасывания и баланса цинка у γ -авитаминозных цыплят) к рациону добавлялся витамин D_3 в количестве 500 И.Е. на кг корма. Уровень кальция и цинка изменяли путем добавления углекислых солей, а фосфора - добавлением однозамещенного фосфата натрия.

Продолжительность опытов - 30 дней. В возрасте от 27 до 30 дней у цыплят в течение трех суток проводились балансовые исследования с учетом потребления корма и воды, а также и выделенного помета. В балансовых опытах определяли задержанный в организме цинк в мг на 100г живого веса в сутки и вычисляли эффективность использования цинка корма, в процентах.

В конце опыта цыплят взвешивали, забивали и для анализа брали сыворотку крови, печень, поджелудочную железу, большую берцовую кость, перья. Образцы сушили при 105°C до абсолютно сухого веса и озоляли при 600°C с последующим растворением в 6N HCl. В растворах определяли цинк. В сыворотке крови цинк определяли после ее депротеинизации с 12% трихлоруксусной кислоты.

При оценке сперения учитывалось состояние маховых перьев правого крыла. Цыплят, у которых были обнаружены перья с неправильным строением или обломанными концами, относили к числу птиц с нарушенным оперением. Состояние оперения группы в целом выражалось как процент нормально оперенных цыплят от общего количества в группе.

Всасывание in situ. Цыплята выращивались до 30-дневного возраста на полноценном или γ -авитаминозном рационах, которые содержали кальция - около 1,0%, фосфора - около 0,6%, цинка - 37-40 мг на кг корма. Перед исследованием цыплята голодали в течение 16-18 часов.

Катионы в 0,5 мл физиологического раствора вводились в изолированный лигатурами отрезок двенадцатиперстной кишки

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 7 -

цylinder, находящихся под эфирным наркозом. Через 60 минут отрезок кишки удалялся и гомогенизировался. В депротеинизированном гомогенате определяли цинк. О величине всасывания судили по количеству катиона, оставшегося в отрезке кишки после 60 минут, и выражали в процентах от введенной дозы.

Влияние витамина D₃ на всасывание цинка исследовалось при введении в петлю двенадцатиперстной кишки контрольных и D-авитаминозных cylinder 50 и 200 мкг цинка.

При исследовании влияния кальция различные количества этого катиона (400; 1000; 2000 или 5000 мкг) вводили в отрезок кишки совместно с 50 или 200 мкг цинка.

Взаимодействие между цинком, кальцием и фосфором при всасывании цинка исследовалось при введении в петлю кишки цинка (200 мкг) вместе с кальцием (400; 1000 или 2000 мкг) и фосфором (250; 500; 1000 или 2000 мкг).

Всасывание in vitro. В опытах in vitro использовались 30-дневные контрольные и D-авитаминозные cylinder, которые получали рацион, содержащий кальция - около 1,0%, фосфора - около 0,6% и цинка 37-40 мг на кг корма.

Исследования проводились по методике вывернутого кишечного мешочка (Wilson, Wiseman, 1954). Кишечные сегменты инкубировали в термостатируемой камере при 37°C в течение 60 минут. С мукозной стороны кишки камеру заполняли экспериментально выбранным буферным раствором следующего состава (на 1 л): трис-HCl - 1,66г; NaCl - 9,00г; фруктоза - 3,60 г; HCl pH - 11,0 мл с содержанием 6,54 мкг (0,1 ммоль) цинка в 1 мл. По окончании инкубационного периода брали пробы мукозного и серозного растворов, в которых определяли цинк. Содержание цинка в кишке определяли после гомогенизации и депротеинизации.

В опытах in vitro изучалось влияние на транспорт цинка через стенку тонкой кишки различных факторов: продолжительности инкубации (15, 30, 45, 60, 90, 120 и 150 минут), оксигенации инкубационной среды, метаболических ядов (2,4 -

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 8 -

динитрофенола, моноиодацетата, цианистого калия и р-хлор - меркурибензоата в концентрациях 1,0 ммоль). Для выяснения направленности процесса проводилось сравнительное изучение транспорта цинка через стенку невывернутых (С→М) и вывернутых (М→С) кишечных мешочков.

Влияние фосфора исследовалось при инкубации кишки в растворах, содержащих 0,10 ммоль цинка и различные концентрации фосфора: 0,05; 0,10; 0,20 или 0,40 ммоль.

О 1 личине всасывания цинка в условиях *in vitro* судили по повышению его концентрации в серозном растворе, куда катион не вводился, и по коэффициенту транспорта К, выражающему отношение концентрации цинка в серозном и мукозном растворах в конце инкубации ($K = \frac{C}{M}$).

В исследованиях по всасыванию цинка в условиях *in situ* и *in vitro* для каждого варианта использовались по 8-10 цыплят (общее количество цыплят в опытах по всасыванию цинка составило 850).

Пробирочные опыты *in vitro*. В этих опытах исследовалось образование и растворимость фосфорнокислых солей цинка и кальция в зависимости от pH среды (4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0) и концентрации ионов.

Содержание цинка определялось в надосадочной жидкости и выражалось в % от начального количества катиона.

Определение элементов. Цинк и кальций определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Perkin-Elmer, модель 403. Определение фосфора проводилось по молибдатному методу (Tausky, Shorr, 1953).

Полученные данные обработаны статистически по Стьюденту и Фишеру.

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 9 -

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Транспорт цинка через стенку тонкой кишки в условиях *in vitro*

Транспорт против градиента концентрации. После первых 15 минут инкубации вывернутого кишечного мешочка в буферном растворе, содержащем цинк ($0,1 \text{ ммоль}$), транспортный коэффициент $- K = 0,96 \pm 0,08$, т.е. концентрации катиона в серозном и мукозном растворах почти выравнивались. Резкое увеличение транспорта цинка против градиента концентрации начинается после 45-й минуты инкубации, через 60 минут K достигает $1,83 \pm 0,10$, а через 90 минут $- 2,08 \pm 0,10$ (рис.1).

Направленность процесса. Исследования показали, что перенос цинка в направлении мукоза $\rightarrow$ сероза ($M \rightarrow C$) более чем в три раза превышает обратный процесс, т.е. в направлении сероза $\rightarrow$ мукоза ($C \rightarrow M$) ($p < 0,001$; рис.2).

Влияние кислорода и метаболитических ядов. Транспорт цинка в отсутствии кислорода по сравнению с контролем значительно подавляется (на 45-48%, $p < 0,001$) (табл.). По сравнению с контролем транспорт цинка заметно понизился (на 40-60%) в присутствии 2,4-динитрофенола, моноиодацетата, цианистого калия и р-хлормеркурибензоата. Однако метаболитические яды по-разному действовали на накопление элемента в слизистой кишки и перенос его в серозный раствор (табл.). Цианистый калий и 2,4-динитрофенол вызвали усиление аккумуляции катиона в стенке кишки от $33,06 \pm 1,12$ (контроль) до $36,50 \pm 0,79 \text{ мкг}$ на г кишки соответственно. Но содержание его в серозном растворе понижалось от $7,84 \pm 0,45$ до $4,30 \pm 0,61$ и $5,58 \pm 0,74 \text{ мкг/мл}$, соответственно ($p < 0,001$). Под действием моноиодацетата, р-хлормеркурибензоата и в условиях аноксии уменьшение транспорта цинка сопровождалось понижением его аккумуляции в слизистой ($26,60 \pm 1,04$; $28,83 \pm 1,74$; $31,20 \pm 0,94 \text{ мкг/г}$ соответственно).

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 30 -

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Жигуре Д.Р. Динамика всасывания цинка в тонкой кишке цыплят *in vitro*. "Теоретические и практические вопросы рационального использования животных и растений". Тез. докл. конф. молодых ученых-биологов, Рига, "Зинатне", 1973, 77-79.
2. Жигуре Д.Р., Бауман В.К., Валиниеце М.Ю., Андрушайте Р.Я. Угнетающее действие цинка на процесс всасывания кальция в тонкой кишке цыплят. Материалы II Всесоюзного симпозиума по физиологии и патологии всасывания в желудочно-кишечном тракте. Одесса, 1973, 35-37.
3. Бауман В.К., Жигуре Д.Р., Валиниеце М.Ю., Андрушайте Р.Я., Берзинь Н.И., Янсоне Л.А. Влияние различных уровней кальция и цинка в рационе цыплят на отложение этих элементов в перо и его качество. World's Poultry congress, New Orleans, Louisiana, USA, 1974, 182.
4. Бауман В.К., Андрушайте Р.Я., Берзинь Н.И., Валиниеце М.Ю., Жигуре Д.Р., Кирштейне Е.С., Янсоне Л.А. Усвоение цинка цыплятами в зависимости от их

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 31 -

- обеспеченности витаминами А и D и содержания минеральных веществ (кальция и фосфора) в рационе. "Биологическая роль и практическое применение микроэлементов". Тез. докл. VII Всесоюзного совещания по микроэлементам, Рига, "Зинатне", 1975, 55.
5. Бауман В.К., Валиниеце М.Ю., Андрушайте Р.Я., Жигуре Д.Р., Янсон Л.А. Всасывание и обмен кальция и цинка у цыплят в зависимости от обеспеченности витамином D. В кн.: Всасывание и обмен питательных веществ в организме животных. Рига, "Зинатне", 1975, 18 - 27.
6. Жигуре Д.Р., Бауман В.К., Валиниеце М.Ю., Андрушайте Р.Я. Всасывание и обмен цинка в организме цыплят в зависимости от уровня кальция в рационе. В кн.: Всасывание и обмен питательных веществ в организме животных. Рига, "Зинатне", 1975, 38 - 48.
7. Жигуре Д.Р., Бабарыкин Д.А. Изучение всасывания цинка в тонкой кишке цыплят в условиях *in vitro*. В кн.: Всасывание и обмен питательных веществ в организме животных. Рига, "Зинатне", 1975, 28 - 37.
8. Валиниеце М.Ю., Бауман В.К., Берзинь Н.И., Жигуре Д.Р., Янсон Л.А. Действие различного уровня кальция и дефицита витаминов А и D в организме цыплят. В кн.: Всасывание и обмен питательных веществ в организме животных. Рига, "Зинатне", 1975, 159 - 167.
9. Жигуре Д.Р., Бауман В.К. Угнетающее действие фосфора на всасывание цинка в кишечнике цыплят. Изв. АН Латв.ССР, 1975, №1, 132 - 133.
10. Жигуре Д.Р. Всасывание и баланс цинка в организме цыплят в зависимости от уровня кальция и фосфора в рационе. "Пути повышения продуктив-

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

- 32 -

ности животных и растений". Тез. докл. конф. молодых ученых (в печати).

Основные положения диссертационной работы доложены:

1. На конференции молодых ученых-биологов, Рига, 1973.
2. На Всесоюзном симпозиуме по физиологии и патологии всасывания в желудочно-кишечном тракте, Одесса, 1973.
3. На отчетной сессии Института биологии АН Латв.ССР "Биологическая наука - сельскому хозяйству", Рига, 1975.

Отпечатано на ротатипе в Институте органического синтеза АН Латв.ССР, 1975 г., г.Рига, ул.Айзкрачкес, 21. № 58, тир.250 экз.