

УДК 636:612.017.11/.12

Коваленко М.В.¹, Степченко Л.М.¹, Шевцова А.І.², Машталір М.А.²

ЗМІНИ КІЛЬКОСТІ ТА ЛОКАЛІЗАЦІЇ ФІБРОНЕКТИНІВ У КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ ЗА УМОВ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

¹Дніпропетровський державний аграрний університет, Україна

²Дніпропетровська державна медична академія, Україна

e-mail: marishazuj@mail.ru

Ключові слова: *фібронектин, імуногістохімія*

Фібронектини (ФН) – полідоменні глікопротеїни, розчинна форма яких знайдена у плазмі крові, цереброспінальній, амніотичній, синовіальній рідинах та інших біологічних рідинах, а нерозчинна димерна або мультимерна форма – у складі екстрацелюлярного матриксу та на поверхні мембран багатьох клітин [13]. Плазмовий та клітинний ФН відрізняються за складом доменів та вуглеводної частини і мають різну біологічну активність. Розчинна форма синтезується гепатоцитами і приймає участь у процесах згортання крові, забезпеченні захисних реакцій за рахунок опсонізації чужерідних частинок, імунних комплексів та ін. Клітинний ФН, більшість якого секретується фібробластами забезпечує специфічну біологічну адгезію, міжклітинні комунікації, процеси ембріо- та онтогенезу [4].

ФН – обов'язковий компонент базальних мембран. У невеликих кількостях він з'являється в базальних мембранах на ранніх стадіях ембріогенезу; по мірі диференціювання тканин його вміст поступово зростає, потім знижується в деяких тканинах по мірі старіння [12]. Концентрація плазмового ФН також збільшується у період гестаційного розвитку, корелюючи з вагою плоду, досягає максимуму у зрілому віці [14]. В процесі старіння кількість ФН практично не змінюється, навіть може злегка збільшуватись за відсутності патології [11].

Враховуючи захисні властивості фібронектину, слід очікувати, що підвищення його синтезу є одним із факторів, що формують стійку резистентність організму до дії несприятливих факторів. На вміст ФН у плазмі крові впливають різні ендогенні та екзогенні фактори, в тому числі й споживні речовини та лікарські засоби [8, 9].

Підвищення в останні роки інтересу до використання у різних сферах медицини та сільського господарства біологічно активних

добавок на основі селену та гуматів ставить задачу пошуку об'єктивних критеріїв оцінки їх дії. На сьогодні встановлено, що препарати селену мають антиоксидантні, імуномодельючі та противірусні властивості [7], а торф'яні гумінові препарати приймають участь у регуляції обміну речовин і підтримці гемостазу [6]. Чи впливають ці препарати на рівень та тканинний розподіл фібронектинів і як це відображається на стані організму – питання залишається відкритим.

Метою роботи було дослідити та порівняти вплив препаратів селену та добавок гумінової природи на рівень плазмового та локалізацію тканинного фібронектину у курчат-бройлерів в динаміці росту.

Матеріали та методи

44-х денний експеримент на курчатах-бройлерах кросу Cobb 500 проводився в умовах віварію Дніпропетровської дослідної станції Інституту експериментальної та клінічної ветеринарної медицини. Умови утримання, а також режим годування відповідали вимогам ГОСТу, розробленим для технології вирощування бройлерів даного кросу.

Добові курчата-бройлери були поділені на п'ять експериментальних варіантів (в кожному з яких було по три групи з 15-ти курчат-бройлерів): 1 – контрольний варіант, де птахи вирощувались без кормових добавок (n = 45), 2 – дослідні птахи, що додатково вживали по 0,3 мг/кг корму органічного селену у вигляді препарату Sel-Plex (n = 45), 3 – курчата-бройлери, що додатково вживали по 0,3 мг/кг корму неорганічного селену у вигляді селеніту натрію (n = 45), 4 – дослідні птахи, яким до основного господарчого раціону додавали по 2,1 мл/кг корму кормову добавку Гідрогумат (n = 45), 5 – курчата-бройлери, що додатково вживали ГСВД в розрахунку 2,1 мл Гідрогумату + 0,058 г добавки Сейвіт /кг корму (n = 45).

Добавки гумінової природи та селенвмісні препарати дослідні птахи вживали з 10-го по 38-й день проведення експерименту: Sel-Plex – селенвмісна добавка, що містить Se в органічній формі та має дріжджове походження; Гідрогумат – торф'яний гуміновий препарат; ГСВД – гуміно-селено-вітамінна добавка.

Виділення ФН з плазми крові проводили за допомогою афінної хроматографії на желатин-агарозі фірми Sigma (США) за схемою, що була модифікована нами для виділення курячого ФН і описана раніше [2]. Одержаний препарат ФН використовували для отримання моноспецифічної антисироватки до курячого фібронектину шляхом імунізації кролів підшкірно в декілька точок спини (по 25 мкг

препарату ФН у співвідношенні 1:1 з повним ад'ювантом Фрейнда) тричі, з інтервалом сім днів із наступною реіmunізацією через кожен місяць. Специфічність антитіл оцінювали шляхом перехрестного імуноелектрофорезу та імуногістохімії.

Вміст ФН визначали у плазмі крові 10-ти, 29-ти та 39-ти денних курчат-бройлерів з п'яти експериментальних варіантів. Оцінку ФН-синтезуючої функції печінки проводили за визначенням концентрації загального білку та ФН в екстрактах, які отримували шляхом гомогенізації 1г печінкової ткани від кожного зразка в 3 мл 0,05М трис-НСІ буферному розчину, рН 7,5 у присутності 2М КСІ з подальшим центрифугуванням при 8000 об/хв протягом 20 хв. Концентрацію ФН у плазмі крові та гомогенатах тканин печінки визначали методом ракетного імуноелектрофорезу у 1%-му розчині агарози [5].

Визначення локалізації ФН у тканинах бурси, тимусу, серця проводили методом імуногістохімії. Зрізи тканин піддавали депарафінізації, після чого виснажували ендогенну пероксидазу (10 хв.) та обробляли розчином БСА 1%. Наступними етапами аналізу були дві послідовні інкубації з кролячими антитілами до ФН в розведенні 1:50 на ізотонічному фізіологічному розчині (12 годин, +4°C), а потім – з вторинними антитілами до IgG кролів, міченими пероксидазою хрому, в розведенні 1:5000 на ізотонічному фізіологічному розчині (2 години, +37°C). Комплекс ФН з міченими антитілами забарвлювали розчином діамінбензидину. Після промивки зрізи проводили через батарею спиртів, ксилол та заключали у бальзам.

Результати імуногістохімії спостерігали за допомогою світлооптичного мікроскопу Leica СМЕ, при кінцевому збільшенні 1000.

Статистичну обробку результатів та побудову калібрувальних графіків проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel ХР.

Результати та обговорення

Було відмічено, що рівень плазмового ФН у контрольній групі практично не змінювався в процесі росту курчат-бройлерів. Інша картина мала місце у дослідних групах, що отримували препарати Se. При вживанні Se органічної природи концентрація ФН у плазмі достовірно зростала з 10-го по 39-й день вирощування курчат-бройлерів ($p < 0,001$), під дією селеніту Na спостерігалось менш виражене підвищення рівня плазмового ФН в динаміці росту. При вживанні препаратів гумінової природи значно зменшувалась

концентрація ФН у 29-денних курчат-бройлерів, а потім достовірно зростала до 39 дня вирощування (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст фібронектину у плазмі крові курчат-бройлерів у динаміці росту, (мкг/мл)

групи	10-денні курчата – бройлери M±m, n=15	29-денні курчата – бройлери M±m, n=15	39-денні курчата – бройлери M±m, n=15
Контроль	208,8±5,2	210,4±3,2	211,8±3,9
Неорганічний селен	207,4±2,3	217,4±2,8	222,2±4,0
Органічний селен	208,7±3,1	226,1±4,6**	245,0±5,9***
Гідрогумат	207,9±3,7	201,9±4,7	222,8±5,6
ГСВД	208,2±3,0	190,7±4,4**	213,2±5,8

Примітка: * $p < 0,05$ – достовірні зміни відносно контролю;

** $p < 0,01$ – достовірні зміни відносно контролю;

*** $p < 0,001$ – достовірні зміни відносно контролю.

Кількість ФН у курчат –бройлерів, які вживали органічний селен достовірно ($p < 0,01$) зростала у плазмі – на 7,4% для 29-денних та на 15,7% для 39-денних ($p < 0,001$), порівняно з контролями відповідних вікових груп.

Зростання рівню ФН у групах курчат-бройлерів, які додатково вживали неорганічний селен мало недостовірний характер та складало у плазмі – 3,3% для 29-денних та 5% для 39-денних, порівняно з контролями.

Рівень плазмового ФН за умов дії ГСВД достовірно ($p < 0,01$) зменшувався на 9,4% у плазмі 29-денних та практично не відрізнявся у 39-денних курчат-бройлерів, порівняно з контролями відповідних вікових груп. При вживанні Гідрогумату недостовірний характер мало зниження ФН у плазмі 29-денних – на 4,1% та його зростання на 5,2% у 39-денних курчат-бройлерів, порівняно з контролями.

Відомо, що кількісні та якісні зміни ФН можуть відображати функціональний стан печінки за умов її патології, оскільки основним органом синтезу та секреції у кров ФН є печінка. Концентрація ФН у печінці 39-денних курчат зростала на 21,6% ($p < 0,001$), порівняно з контролем, при вживанні органічного селену та на 9,16%, порівняно з контролем під дією селеніту Na. Аналогічно збільшувалась концентрація ФН у печінці 39-денних курчат, порівняно з контролем,

при вживанні Гідрогумату (на 8,6%) ($p < 0,05$), та ГСВД (на 5,65%) (недостовірні зміни відносно контролю) (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст фібронектину (мкг/мл) та загального білку (мг/мл) в екстрактах білкових фракцій печінки 39-денних курчат-бройлерів

Показники в екстрактах білкових фракцій печінки	39-денні курчата-бройлери $M \pm m, n=15$				
	Контроль	Неорганічний селен	Органічний селен	Гідрогумат	ГСВД
Фібронектин, мкг/мл	258,6±4,9	282,3±7,9*	314,5±9,9***	280,8±8,7*	273,2±6,8
Загальний білок, мг/мл	77,0±3,8	62,3 ±5,2	74,3±3,3	73,2±4,8	83,1±2,3

Примітка: див. табл. 1.

Водночас, процентний вміст ФН до загального білку у гомогенатах печінки становив для контрольної групи – 0,33%, для органічного Se – 0,42%, для неорганічного Se – 0,45%, для групи курчат-бройлерів, що вживали Гідрогумат – 0,38%, для курчат-бройлерів, що вживали ГСВД – 0,33%. Тобто, порівняно із загальним білком, на долю ФН найменша частка припадала в екстрактах білкових фракцій печінки контрольної групи та груп курчат-бройлерів, що вживали гумінові препарати.

При аналізі даних було з'ясовано, що тканинний ФН в органах імунної системи та у тканинах серця курчат-бройлерів, що додатково отримували біологічно-активні добавки, має відмінності у локалізації та розподілі, порівняно з контрольними групами.

В контрольному варіанті тканини тимусу, тканинний ФН був розподілений у стромі капсули долей та незначна його кількість спостерігалась у сполучній тканині септ, що занурювалися у коркову речовину. Найменша концентрація тканинного ФН була у матриксі між лімфоїдними елементами коркової речовини (рис. 1, А). Такий розподіл обумовлений тим, що головними джерелами синтезу ФН є фібробласти сполучної тканини й ендотеліоцити кровоносних судин [1]. У наших дослідженнях виявлені схожі зони локалізації тканинного ФН у стромі органів курчат експериментальних груп.

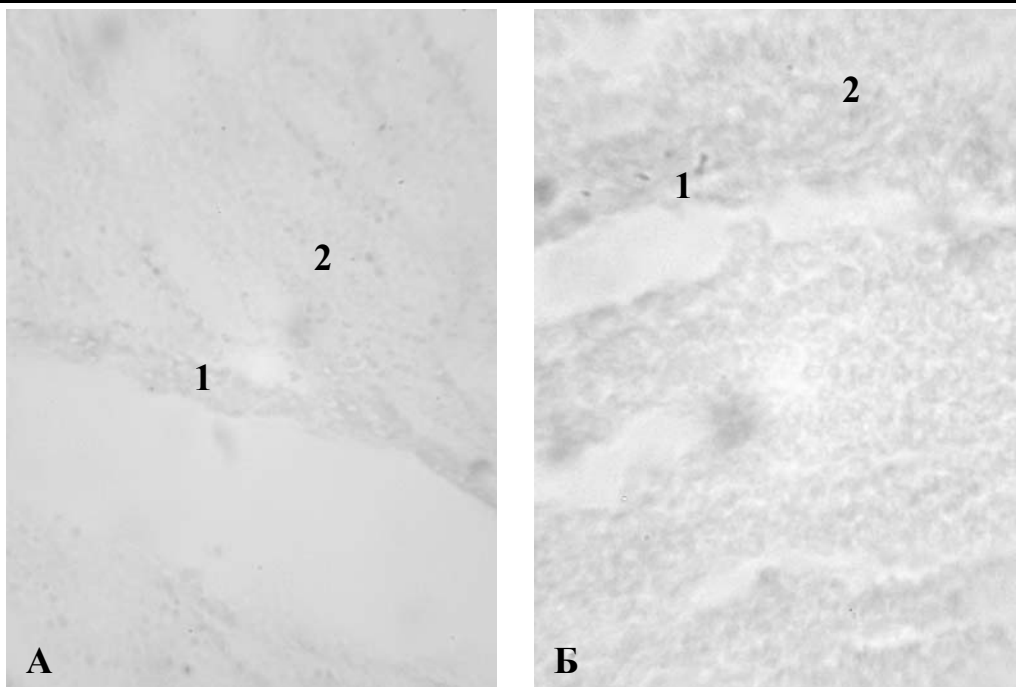


Рис. 1. Локалізація ФН у тимусі курчат-бройлерів. А. Контрольний варіант. Б. Після вживання органічного селену. Збільш.: ок. $\times 10$, об. $\times 100$:
1 – капсула долей; 2 – коркова речовина долей тимусу.

Однак, більша кількість ФН в експериментальній групі спостерігалась у позаклітинному матриксі, незалежно від розташування судин та прошарків сполучної тканини (рис. 1, Б). За умов впливу селенвмісних добавок, тканинний ФН забарвлювався зонально у вигляді гранулярних скупчень в корковій речовині та більша його кількість спостергалась у сполучній тканині капсули долей тимусу. Інтерстицій септ, що відходять від капсули, також містив відносну велику кількість ФН.

В контрольних зразках бурси значне забарвлення виявлялось у прошарках з'єднувальної тканини, клітини якої продукують тканинний ФН, та у речовині навколо лімфоїдних фолікулів. Розподіл ФН був нерівномірний (рис. 2, А). У тканинах бурси за умов впливу неорганічного селену, була характерна більш дифузна локалізація клітинного ФН у матриксі навколо фолікулів (рис. 2, Б). В експериментальних зразках окремі ділянки демонстрували більшу ступінь забарвлення сполучної тканини, що, можливо, свідчить про неоднорідність реакції на БАД фібробластів в тканинах бурси.

В контрольних зразках серця ФН виявлявся в прошарках сполучної тканини між окремими пучками м'язових волокон на у навколо судинній сполучної тканині. Розподіл ФН був більш-менш рівномірний. Після вживання Гідрогумату ми не знайшли значних відмінностей у концентрації та розподілі ФН у тканинах серця. Ми

спостерігали суттєве підвищення інтенсивності мітки в прошарках сполучної тканини міокарду шлуночків та передсердь після вживання органічного селену, також при цьому ФН виявлявся у інтерстиції навколо окремих пучків кардіоміоцитів.

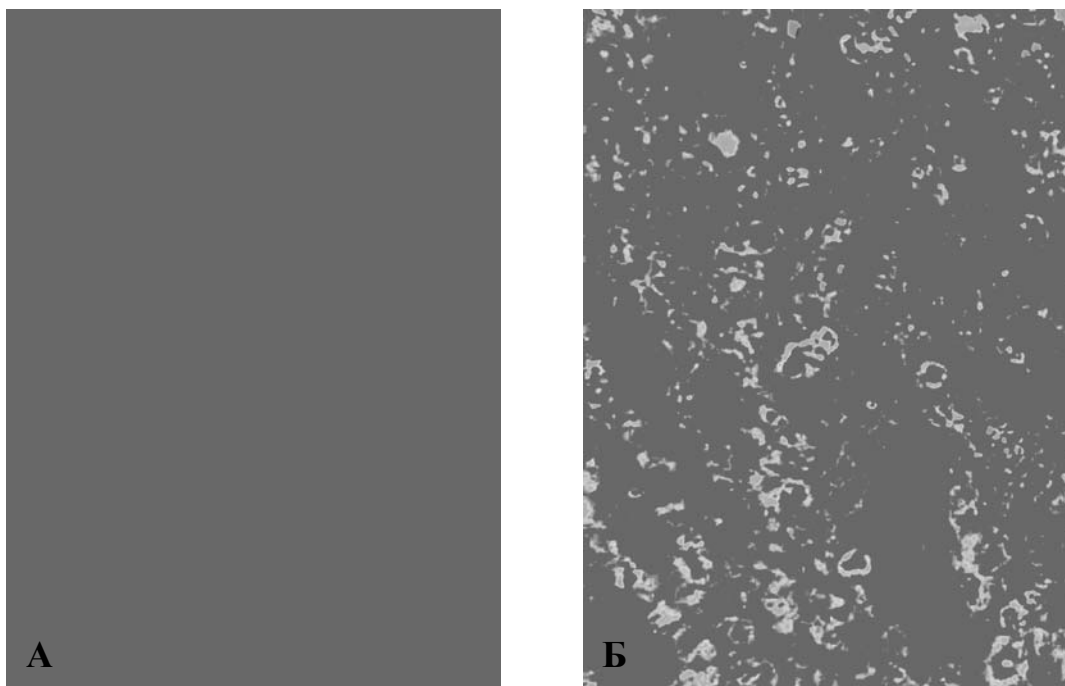


Рис. 2. Локалізація ФН у бурсі курчат-бройлерів. А. Контрольний варіант. Б. Після вживання неорганічного селену. Збільш.: ок. $\times 10$, об. $\times 100$.

За умов вживання селенвмісних добавок, спостерігалось найбільш інтенсивне накопичення тканинного ФН в органах імунної системи, порівняно з гуміновими препаратами та контролем. Селенвмісні добавки викликають суттєву експресію тканинного ФН в органах імунної системи та серця у курчат-бройлерів.

Оскільки захисна дія ФН виявляється у підтримці оптимального фагоцитарного статусу макрофагів та нейтрофілів [3], а дефіцит Se призводить до порушення властивостей фагоцитів та проліферації лімфоцитів [10], можливо припустити, що збільшення рівня ФН, за умов вживання у якості кормових добавок препаратів Se (особливо органічного походження), пов'язане з участю ФН у формуванні резистентності курчат-бройлерів та його ролі як фактора неспецифічного захисту.

Вживання Гідрогумату в якості кормової добавки також викликає збільшення рівня плазмового ФН у 39-денних курчат-бройлерів, порівняно з контролем та інтенсивне накопичення ФН в білкових екстрактах тканин печінки курчат-бройлерів.

Висновки

Кількість ФН у курчат-бройлерів, які вживали органічний селен достовірно зростала як у плазмі 29-денних та 39-денних, порівняно з контролями, так і у печінці 39-денних курчат. Зростання рівню ФН у групах курчат-бройлерів, які додатково вживали неорганічний селен мало недостовірний характер. Таким чином, виявлено суттєвий вплив органічного селену на продукування плазмового ФН у курчат-бройлерів в динаміці росту. За умов дії селенвмісних препаратів інтенсивність зростання локалізації ФН у тканинах органів імунної системи та серці курчат-бройлерів була вищою, порівняно з контролем та впливом гумінових кормових добавок.

Вживання препаратів гумінової природи викликало збільшення рівню плазмового та тканинного ФН у 39-денних курчат-бройлерів в меншій мірі, ніж за умов дії селенвмісних добавок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Єна Я.М., Мороз Г.С., Прокопчук А.І., Назар П.С., Міранська І.Л. Фібронектин при онкологічних захворюваннях // Лікарська справа. –1997. – №4. – С. 26-30.
2. Коваленко М.В., Степченко Л.М., Шевцова А.І. Особливості виділення та очистки курячого фібронектину // Ветеринарна медицина. Харківськ. інститут експеримент. мед. – 2007. – № 88. – С. 96-99.
3. Муминов Т.А. Фибронектины: структура, функции, возможные прикладные аспекты // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1985. – Вып. 6. – С. 82-87.
4. Романенко А.М., Дранник Г.Н., Єна Я.М. Фибронектин, его роль в процессах тканевой дифференцировки, регенерации и опухолевой трансформации // Экспериментальная онкология. – 1987. – Т. 9, № 4. –С. 8-13.
5. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу / Под ред. Н. Аксельсена. – М.: Мир, 1987. – 216 с.
6. Степченко Л.М. Механизмы формирования биопродукции у быстрорастущей птицы под влиянием препаратов гуминовой природы // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2005. – № 2. – С. 237-241.
7. Сурай П.Ф., Дворская Ю.Е. Органический селен и его роль в птицеводстве // Птахівництво. – 2003. – Вып. 55. – С. 362-368.
8. Anderlik P., Szeri I., Bános Z., Barna Z., Kalabay L., Jakab L. Effect of mannozymb treatment on plasma fibronectin concentration in germfree and conventional mice // Acta Microbiol Hung. – 1990. – Vol. 37(3). – P. 295-299.
9. Delgado A.F., Kimura H.M., Cardoso A.L., Uehara D., Carrazza F.R. Nutritional follow-up of critically ill infants receiving short term parenteral nutrition // Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. – 2000. – 55(1). – P. 3-8.
10. Dhur, A., Galan, P., Hercberg, S. Relationship between selenium, immunity and resistance against infection // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1990. – Vol. 96. – P. 271-280.

11. Labat-Robert J., Marques M.A., N'Doye S., Alperovitch A., Moulias R., Allard M., Robert L. Plasma fibronectin in French centenarians // Arch Gerontol Geriatr. – 2000. – 31(2). – P. 95-105.
12. Li-Korotky H.S., Hebda P.A., Lo C.Y., Dohar J.E. Age-dependent differential expression of fibronectin variants in skin and airway mucosal wounds // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2007. – 133(9). – P. 919-924.
13. Magnusson M., Mosher D.F. Fibronectin: structure, assembly and cardiovascular implications // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1998. – Vol.18. – P. 1363-1370.
14. Yoo Y., Lee K.C., Tockgo Y.C. Plasma Fibronectin Concentration in the Neonate // J Korean Pediatr Soc. – 1996. – 39(3). – P. 319-325.

М. В. Коваленко, Л. М. Степченко, А. І. Шевцова, М. А. Машталір
ЗМІНИ КІЛЬКОСТІ ТА ЛОКАЛІЗАЦІЇ ФІБРОНЕКТИНІВ У
КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ ЗА УМОВ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ
РЕЧОВИН

Ключові слова: фібронектин, імуногістохімія

Досліджено вплив гумінових та селенвмісних добавок на рівень плазмового та локалізацію тканинного фібронектину у курчат-бройлерів.

M. Kovalenko, L. Stepchenko, A. Shevtsova, M. Mashtalir
CHANGES IN THE AMOUNT AND LOCALIZATION OF
FIBRONECTINS IN BROILER CHICKENS UNDER THE
INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Key words: fibronectin, immunohistochemistry

The study deals with the effect of humine and selenium supplements on the level and localization of fibronectins in broiler chickens.