

## УРОВЕНЬ КАЛЬЦИЯ В РАЦИОНЕ И ЕГО СВЯЗЬ С АКТИВНОСТЬЮ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

В.Г. Вертипрахов, доктор биологических наук, И.В. Кислова,  
Н.В. Овчинникова

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства,  
141311, Московская область, Сергиев Посад, ул. Птицезрадская, 10  
E-mail: vertiprakhov63@mail.ru

*В хроническом эксперименте изучена ферментативная активность и биохимические показатели кишечного содержимого в разных физических формах дуоденального химуса (жидкости и лиофилизированном порошке) и илеального содержимого цыплят-бройлеров, прошедшего лиофильную сушку. Результаты показывают, что активность амилазы после лиофильной сушки в контрольной группе увеличивается в 5,7 раза, липазы – в 11,6 раз, активность общих протеаз – в 8,2 раза. По щелочной фосфатазе увеличение активности составляет 15,9 раза. Уровень кальция после лиофильной сушки увеличивается в 11,4 раза, содержание фосфора – в 17,7 раза. Уровень холестерина после сушки возрастает в 4,8 раза. При уменьшении кальция с 0,9 до 0,8% в рационе бройлеров в дуоденальном содержимом активность щелочной фосфатазы увеличивается на 35,1% по сравнению с контрольной группой ( $p \leq 0,05$ ). Следовательно, лиофильная сушка изменяет активность ферментов и содержание минеральных веществ в химусе неравномерно. Установлено, что при изменении уровня кальция в рационе происходит адаптация активности амилазы, липазы, протеаз, щелочной фосфатазы, кальция, фосфора и холестерина в илеальном содержимом, что может использоваться для диагностики здоровья кишечника птицы в новых тест-системах.*

## THE INTERRELATIONSHIPS OF DIETARY CALCIUM LEVEL AND ACTIVITIES OF THE DIGESTIVE ENZYMES IN BROILER CHICKS

Vertiprakhov V.G., Kislova I.V., Ovchinnikova N.V.

All-Russian Research and Technological Poultry Institute,  
141311, Moskovskaya oblast, Sergiev Posad, ul. Ptitsegradskaya, 10  
E-mail: vertiprakhov63@mail.ru

*The activities of the digestive enzymes and certain biochemical parameters in the native and lyophilized duodenal digesta and lyophilized ileal digesta were studied in broiler chicks with chronic duodenal or ileal fistulae fed different calcium levels. The activity of amylase after the lyophilization of duodenal digesta from the control treatment increased 5.7-fold in compare to the native liquid form, lipase 11.6-fold, total proteases 8.2-fold, alkaline phosphatase (AP) 15.9-fold; concentration of calcium increased 11.4-fold, phosphorus 17.7-fold, total cholesterol 4.8-fold. It was concluded that lyophilization differently affect the enzymatic activities and concentrations of minerals in the digesta. The decrease in dietary calcium level from 0.9 to 0.8% resulted in the significant increase in AP activity in lyophilized duodenal digesta by 35.1% ( $P < 0.05$ ). It was also found that the activities of amylase, lipase, proteases, and AP, as well as concentrations of calcium, phosphorus, and cholesterol in the ileal digesta can adjust to dietary calcium level; these findings could be used for the assessment of the intestinal health in poultry in innovative test systems.*

**Ключевые слова:** пищеварительные ферменты, цыплята-бройлеры, дуоденальный химус, илеальное содержимое, лиофильная сушка химуса

**Key words:** digestive enzymes, broiler chicks, duodenal digesta, ileal digesta, lyophilization of digesta

В организме сельскохозяйственной птицы кальциевый метаболизм протекает наиболее интенсивно по сравнению с млекопитающими животными. Кальций является важнейшим элементом формирования костной ткани и в оптимальном количестве гарантирует прочность костей [1]. Поступая с кормом в кишечник, кальций, попадая в слой гликокаликса, переносится через мембрану эпителиоцита по принципу пассивной диффузии. Переносчиком кальция в процессе абсорбции последнего в энтероцитах тонкой кишки является кальцийсвязывающий белок [2]. Известно, что большую часть содержимого кишечника составляют пищеварительные соки, которые обладают высокой биологической активностью за счет содержания в них ферментов. Минеральные вещества, находящиеся в жидкости, обеспечивающей энтеральный гомеостаз, взаимодействуют с пищеварительными ферментами.

Результаты хронических экспериментов на курах-несушках кросса «Хайсекс белый» с фистулой панкреатического протока показывают, что изменение уровня кальция в рационе оказывает влияние на экзокринную функцию поджелудочной железы, адаптация которой проявляется увеличением объема панкреатического

сока и изменением в его составе активности липазы и общих протеаз [3]. Изменение уровня кальция в рационе несушек отражается на базальном уровне активности щелочной фосфатазы. В опытах *in vivo* [4] установлена отрицательная корреляция между протеазами и активностью щелочной фосфатазы ( $r = -0,87$ ), а также содержанием в панкреатическом соке общего кальция ( $r = -0,64$ ). Активность щелочной фосфатазы и общего кальция в панкреатическом соке находятся в прямой зависимости ( $r = 0,81$ ). Известно, что ионы кальция являются сигнальными молекулами при панкреатитах [5], так как существует связь между ними и протеазами, которые играют ключевую роль в развитии аутолиза ткани панкреаса.

Для изучения использования питательных и минеральных веществ в организме птицы наряду с классическими балансовыми опытами все шире применяются методы илеальной доступности веществ. Установлено, что при использовании илеального метода показатель усвоения кальция организмом кур-несушек выше на 14,2% по сравнению с классическим методом определения [3].

На цыплятах-бройлерах вопросы взаимодействия кальция с пищеварительными ферментами изучены

недостаточно, что определило направление наших исследований. Целью работы является изучение ферментативной активности в дуоденальном и илеальном содержимом цыплят-бройлеров, прошедшем лиофильную сушку, при изменении уровня кальция в рационе.

**Методика.** Опыты выполняли на цыплятах-бройлерах кросса «Смена 8» 20-42-суточного возраста с дуоденальной фистулой (6 голов) и илеальной фистулой (6 голов) в лаборатории физиологии ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН в 2019 году в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123, Страсбург, 1986) [5].

Цыплят-бройлеров оперировали в 15-18-суточном возрасте для получения дуоденального [6] и илеального [7] содержимого. Через 5-7 суток после хирургического вмешательства цыплята восстанавливались и использовались для выполнения экспериментов.

Физиологические опыты выполняли ежедневно утром в одно и тоже время в течение 14 суток, следовательно, с учетом повторностей в каждом опыте, было получено не менее 20 значений для каждой группы. Цыплята-бройлеры находились в виварии ВНИТИП при соблюдении оптимальных условий кормления и содержания [8]. Дуоденальный химус собирали через один час после кормления птицы в количестве 3-5 мл. Центрифугировали при 4000 об/мин в течение 3 мин. Активность ферментов и биохимические показатели исследовали в опыте 1 в надосадочной жидкости, опыте 2 – после сушки на лиофильной сушилке серии TFD (ilShinbiobase Co.Ltd, Корея) в течение 24 ч при температуре -77,8 °С и давлении 5 mTorr. Полученный материал разводили раствором Рингера 1:100 и выполняли биохимические исследования. Илеальное содержимое (опыт 3) для получения сопоставимых результатов также подвергали лиофильной сушке.

Схема исследований представлена в таблице 1. Основной рацион состоял из комбикорма, соответствующего требованиям ВНИТИП (2018), с уровнем содержания кальция 0,9%.

Балансовые опыты по определению переваримости питательных и минеральных веществ выполняли общепринятыми методами [9]. Биохимические исследования выполняли следующими методами: определение амилазы – по Smith-Roe в модификации для определения высокой активности фермента [10]; протеаз – по гидролизу казеина, очищенного по Гаммерстену, при калориметрическом контроле (длина волны 450 нм) [10]; липазы – на

полуавтоматическом биохимическом анализаторе BS-3000P (SINNOWA, Китай) с набором ветеринарных диагностических реагентов для определения концентрации липазы в крови животных компании «ДИАКОН-ВЕТ» (РФ). Определение активности щелочной фосфатазы, холестерина, кальция и фосфора выполняли с использованием наборов компании «ДИАКОН-ВЕТ» (РФ) на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BS-3000P (SINNOWA, Китай). pH среды устанавливали с помощью pH-150МИ (ООО «Измерительная техника», Москва, РФ).

Статистическую обработку результатов исследований выполняли, используя компьютерную программу Excel, достоверность результатов определяли при помощи таблиц Стьюдента, разность считалась достоверной при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В опыте 1 исследована жидкая часть дуоденального химуса после центрифугирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что при увеличении кальция в рационе изменяется активность пищеварительных ферментов (табл. 2).

Результаты показывают, что при увеличении содержания кальция в рационе цыплят-бройлеров до 1,0% активность амилазы в жидкой фракции дуоденального химуса уменьшается на 33,0%. Активность липазы, соответственно, возрастает на 161,8% по сравнению с контрольной группой. Активность протеаз, щелочной фосфатазы, содержание холестерина, кальция и фосфора существенно не изменяется.

Учитывая, что пищеварительные ферменты находятся, в том числе, и в твердых фракциях дуоденального содержимого, мы решили сравнить метод определения в жидкой и сухой физических формах химуса. Данные опыта 2 представлены в таблице 3.

Представленные в таблице 3 показатели, полученные при исследовании материала, подвергнутого лиофильной сушке, имеют существенные отличия от данных изучения жидкой части дуоденального химуса, причем не только по основным показателям в контрольной группе, но и в опытных группах, имеющих различия по уровню кальция в рационе. Результаты показывают, что активность амилазы после лиофильной сушки в контрольной группе увеличивается в 5,7 раза, липазы – в 11,6 раз, активность общих протеаз – в 8,2 раза. По щелочной фосфатазе увеличение активности составляет в 15,9 раза. Уровень кальция после лиофильной сушки увеличивается соответственно в 11,4 раза, содержание фосфора – в 17,7 раза. Уровень холестерина после сушки

Табл. 1. Схема исследований

Опыт	Исследуемое кишечное содержимое	Группа	Кол-во голов	Уровень содержания кальция в рационе птицы, %
1	Дуоденальное (надосадочная жидкость)	контрольная	2	0,9
		опытная 1	2	0,8
		опытная 2	2	1,0
2	Дуоденальное (сухое вещество)	контрольная	2	0,9
		опытная 1	2	0,8
		опытная 2	2	1,0
3	Илеальное (сухое вещество)	контрольная	2	0,9
		опытная 1	2	0,8
		опытная 2	2	1,0

Табл. 2. Результаты исследования дуоденального химуса в жидкой форме

Показатель	Группа		
	контрольная	опытная 1	опытная 2
Амилаза, мг/мл.мин	497±37,6	494±63,8	333±64,2*
Липаза, ед/л	1540±302,3	1195±224,0	4032±459,3*
Протеазы, мг/мл.мин	22,4±1,81	26,2±1,53	24,4±1,25
Кальций, ммоль/л	32,0±0,93	29,6±1,24	27,8±0,94
Фосфор, ммоль/л	2,7±0,13	2,9±0,16	2,2±0,22
Щелочная фосфатаза, ед/л	8879±987,5	10447±1171,3	10887±1240,1
Холестерин, ммоль/л	0,6±0,06	0,4±0,04	0,6±0,08
pH среды	5,5±0,08	5,5±0,09	5,5±0,09
Здесь и далее: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем			

**Табл. 3. Результаты исследования дуоденального химуса в сухом веществе**

Показатель	Группа		
	контрольная	опытная 1	опытная 2
Амилаза, мг/мл.мин	2821±137,7	2528±247,4	2842±292,8
Липаза, ед/л	17941±405,8	18163±478,8	19777±2914,5
Протеазы, мг/мл.мин	185±13,5	172±4,7	158±7,9
Трипсин, ед/л	9769±495,1	9304±362,1	9595±443,7
Кальций, ммоль/л	366±34,5	334±7,6	331±16,8
Фосфор, ммоль/л	47,8±2,8	40,3±3,0	49,4±5,42
Щелочная фосфатаза, ммоль/л	141658±13496,2	91917±12145,3*	150053±16795,1
Фосфатазно-трипсиновый индекс	14,5	9,9	15,6
Холестерин, ммоль/л	2,9±0,15	3,2±0,43	3,1±0,14

**Табл. 4. Показатели содержимого подвздошной кишки после лиофильной сушки**

Показатель	Группа		
	контрольная	опытная 1	опытная 2
Амилаза, мг/мл.мин	200±10,0	150±7,5*	140±5,2*
Липаза, ед/л	889±7,5	688±18,8*	645±21,2*
Протеазы, мг/мл.мин	42±4,2	48±1,7	69±0,6*
Трипсин, ед/л	4023±142,1	3407±23,3*	3707±5,4*
Кальций, ммоль/л	301±0,75	512±7,75*	456±1,15*
Фосфор, ммоль/л	116±2,5	92±1,3*	85±1,1*
Щелочная фосфатаза, ммоль/л	71703±14388,2	22317±641,5*	33636±5231,3*
Фосфатазно-трипсиновый индекс	17,8	6,5	9,0
Холестерин, ммоль/л	9,8±0,07	10,5±0,02*	11,3±0,04*

возрастает в 4,8 раза. Следовательно, лиофильная сушка изменяет активность ферментов и содержание минеральных веществ в химусе неравномерно. Максимально увеличиваются показатели фосфора и щелочной фосфатазы. Причем наиболее чувствительным показателем к содержанию кальция в рационе является активность щелочной фосфатазы, которая при уменьшении кальция в корме с 0,9 до 0,8% снижается на 35,1% по сравнению с контрольной группой ( $p \leq 0,05$ ).

Для того, чтобы понять, насколько интенсивно изменяется активность пищеварительных ферментов по мере продвижения в каудальном направлении кишечника, был выполнен опыт 3 для сопоставления дуоденальной активности ферментов с илеальной (табл. 4).

Результаты исследования показывают, что активность амилазы снижается в подвздошной кишке в 14 раз и составляет 7% от исходной активности в дуоденальном содержимом. Аналогичным образом изменяется активность липазы, уменьшаясь по ходу кишечника в 20,2 раза, её уровень составляет 4,9% от исходной величины. Активность протеаз в процессе продвижения по кишечнику изменяется не так интенсивно, как амилазы и липазы, в илеальном содержимом активность протеаз уменьшается в 4,4 раза и составляет 22,7% от исходной дуоденальной. Снижение активности пищеварительных ферментов в процессе движения по кишечнику вписывается в гипотезу о возврате ферментов в кровь и поджелудочную железу. Механизм этого явления до конца

еще не изучен, но исследования ученых подтверждают факты всасывания из кишечника гидролаз по включенным в них радионуклидным меткам и по каталитической активности [11]. Кроме того, в литературе описаны случаи деградации молекул гидролаз под действием протеаз [12].

Сравнительный анализ илеальной активности ферментов в разных группах показывает, что уровень кальция в рационе влияет на ферментативную активность. Амилолитическая активность при уменьшении кальция в рационе снижается на 25%, а при увеличении до 1% – снижается на 30% по сравнению с контрольной группой. Аналогичная динамика отмечается в активности липазы. При снижении кальция в корме активность фермента уменьшается на 22,6% ( $p \leq 0,05$ ), а при увеличении кальция в рационе – снижается на 27,5% ( $p \leq 0,05$ ). Следовательно, можно отметить более рациональное использование амилазы и липазы организмом цыплят-бройлеров при отклонении кальция в рационе от нормы. Протеолитическая активность при изменении содержания кальция в рационе цыплят-бройлеров характеризуется противоположной тенденцией: при минимальном уровне кальция в рационе активность протеаз существенно не изменяется, а при максимальном уровне – увеличивается на 64,3% ( $p \leq 0,05$ ), т.е. возрастает выход протеолитических ферментов вследствие, видимо, ингибирования фермента высоким количеством кальция. Как показывают результаты исследования содержимого подвздошной кишки у цыплят-бройлеров [13], высокий уровень кальция увеличивает общие эндогенные потери аминокислот на 39%, что связано с переваримостью протеина и активностью протеаз.

Содержание кальция в илеальном содержимом после лиофильной сушки в опытной группе 1 увеличивается на 70,1%, в опытной 2 – возрастает на 51,5% по сравнению с контрольной группой. Содержание фосфора в илеальном содержимом опытной группы 1 уменьшается на 20,7%, в опытной 2 – на 26,7% по сравнению с контрольной группой. Кальций-фосфорное соотношение при изменении уровня кальция в корме цыплят-бройлеров увеличивается с 2,6 до 5,5-5,4 единиц. Наши данные согласуются с результатами исследования на цыплятах-бройлерах действия фитазы и уровня кальция на продуктивность птицы, которые коррелируют между собой [14].

Активность щелочной фосфатазы при изменении содержания кальция в рационе снижается на 68,9% (при минимальном количестве кальция) и 53,1% (при максимальном количестве кальция в рационе). Следовательно, сохраняется зависимость, характерная для кур-несушек: при снижении кальция в кишечнике цыплят-бройлеров активность щелочной фосфатазы уменьшается. Это находит подтверждение в работах зарубежных ученых [15], которые установили отрицательную корреляцию между активностью щелочной фосфатазы и адсорбцией кальция в кишечнике мышей.

Содержание кальция в рационе связано с количеством холестерина: отклонение кальция в корме увеличивает выход холестерина в илеальном содержимом у цыплят-бройлеров на 7,1% и 15,3% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

Результаты исследования показывают, что протеазы наиболее четко реагируют на содержание кальция в рационе. Наши экспериментальные данные согласуются с данными о том, что механизм активирования панкреатических ферментов гормонами кишечника (холецистокинин и другие) связан с высвобождением клеточного кальция [16]. Кроме того, по данным Лазаревой Н. (2015) [17] высокое содержание кальция в рационе снижает эффективность действия фитазы и приводит к образованию в желудочно-кишечном тракте птицы нерастворимых комплексных соединений. Высокий уровень кальция и фосфора в кормах увеличивает скорость прохождения химуса через кишечник за счет изменения осмоса, в результате ухудшается конверсия корма и снижается прирост живой массы. Использование новой технологии при определении биологически активных веществ в лиофилизированном содержимом кишечника позволяет получить объективные данные о динамике пищеварительных ферментов в разных отделах желудочно-кишечного тракта и их взаимодействиях с минеральными веществами.

Таким образом, исследования жидкой части дуоденального химуса не позволяют объективно оценить активность пищеварительных ферментов, участвующих в гидролизе питательных веществ, поскольку часть из них сосредоточена на субстрате в твердом виде (остатки корма) и становится доступной для анализа после лиофильной сушки. Кроме того, сложно оценить разбавление активных пищеварительных ферментов панкреатического сока другими жидкостями, находящимися в полости тонкой кишки, поэтому метод исследования биологических сред в форме абсолютно сухого вещества после лиофильной сушки является перспективным в научных исследованиях.

Наиболее чувствительным показателем в дуоденальном содержимом, высушенном в лиофильной сушилке, при изменении уровня кальция в рационе бройлеров является активность щелочной фосфатазы, которая при уменьшении кальция с 0,9 до 0,8% в рационе бройлеров увеличивается на 35,1% по сравнению с контрольной группой ( $p \leq 0,05$ ), что, по-видимому, связано с функцией печени.

Установлено, что активность амилазы снижается в подвздошной кишке в 14 раз и составляет 7% от исходной активности в дуоденальном содержимом. Активность липазы уменьшается в 20,2 раза, в итоге ее уровень составляет 4,9% от исходной величины. Активность протеаз в процессе продвижения по кишечнику изменяется не так интенсивно, как амилазы и липазы, уменьшаясь в 4,4 раза и составляя 22,7% от исходной дуоденальной активности. Биохимические исследования лиофилизированного илеального содержимого цыплят-бройлеров позволяют заключить, что полученные показатели активности пищеварительных ферментов, щелочной фосфатазы, кальция, фосфора и холестерина адаптируются при введении в рацион разных доз кальция, что может использоваться для диагностики здоровья кишечника в новых тест-системах.

#### Литература

1. Ермаков В.В., Тютиков С.Ф. Геохимическая экология животных. – М.: Наука, 2008. – 315 с.
2. Иванов А.А., Ильяшенко А.Н. Рост, развитие и формирование скелета цыплят-бройлеров при включе-

- нии в рацион кофакторов минерального обмена // Известия ТСХА. – 2011. – Вып. 4. – С.114-130.
3. Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Кислова И.В., Ребракова Т.М. Использование илеального метода в оценке баланса кальция в организме кур-несушек // Международный вестник ветеринарии. – 2019. – №4. – С. 125-131.
  4. Вертипрахов В.Г., Кислова И.В. Вопросы минерального обмена с участием щелочной фосфатазы у кур-несушек // Птица и птицепродукты. – 2020. – №1-2. – С.44-46.
  5. Li J., Zhou R., Li Z.F. Calcium signaling of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of pancreatitis // World J Gastroenterol. – 2014. – Nov 21. – P.16146-16152.
  6. Фисинин В.И., Егоров И.А., Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Ленкова Т.Н., Манукян В.А., Егорова Т.А. Активность пищеварительных ферментов в дуоденальном химусе и плазме крови у исходных линий и гибридов мясных кур при использовании биологически активных добавок в рационе // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – №52 (6). – С. 1226-1333.
  7. Isshiki Y., Nakahiro K., Yamauchi K., Zhou Zh.-X. Fistulation technique for the middle and caudal part of the jejunum and the ileum in chicken // Jpn. Poultry Sci. – 1989. – V.26. – P.314-321.
  8. Руководство по оптимизации рецептов комбикормов для сельскохозяйственной птицы / Под редакцией В.И. Фисинина. – Сергиев Посад: ВНИТИП, 2014. – 155 с.
  9. Методика проведения научных и производственных исследований по кормлению сельскохозяйственной птицы / Под общей редакцией В.И. Фисинина. – Сергиев Посад: ВНИТИП, 2013. – 51 с.
  10. Батоев Ц.Ж. Физиология пищеварения птиц. – Улан-Удэ: Изд-во Бурятского государственного университета, 2001. – 214 с.
  11. Rothman S.S., Liebow C., Isenman L. Conservation of digestive enzymes // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82. – P.1-18.
  12. Коротыко Г.Ф. Рециркуляция ферментов пищеварительных желез // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2011. – №4. – С.14-21.
  13. Adedokun S.A., Pescatore A.J., Ford M.J., Ao T., Jacob J.P. Investigating the effect of dietary calcium levels on ileal endogenous amino acid losses and standardized ileal amino acid digestibility in broilers and laying hens // Poult. Sci. – 2018. – №97(1). – P. 131-139.
  14. Lee S.A., Nagalakshmi D., Raju M.V.L.N., Rao S.V.R., Bedford M.R., Walk C.L. Phytase as an alleviator of high-temperature stress in broilers fed adequate and low dietary calcium // Poult. Sci. – 2019. – №98(5). – P.2122-2132.
  15. Brun L.R., Lombarte M., Roma S., Perez F., Millán J.L., Rigalli A. Increased calcium uptake and improved trabecular bone properties in intestinal alkaline phosphatase knockout mice // J. Bone Miner Metab. – 2018. – №36(6). – P.661-667.
  16. Gardner J.D. Biochemical basis of action of gastrointestinal hormones // World J. Surg. – 1979. – V.3. – P.407-413.
  17. Лазарева Н. Ферменты с фитазной активностью в рационе бройлеров // Животноводство России. – 2015. – №5. – С.18-20.

Поступила в редакцию 16.03.20  
После доработки 01.04.20  
Принята к публикации 17.04.20