

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
 Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ
 Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.

Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 2016. 24(2), 410–415.

doi:10.15421/011655

ISSN 2310-0842 print
 ISSN 2312-301X online

www.ecology.dp.ua

УДК 577.1:616-092.9

Біологічна активність препаратів на основі гумінових речовин у печінці піщанок (*Meriones unguiculatus*)

Д.О. Серова, О.В. Таран, О.О. Дьомшина

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Одна з важливих причин відмови від застосування лікарських препаратів – їх гепатотоксичність. Пошук нових природних біологічно активних речовин із гепатопротекторними властивостями – важливе завдання сьогодення. Наведено дані щодо впливу кормових біологічно активних добавок Гумілід (окремо та у комплексі з аскорбіновою кислотою) та Еко-Імпульс на печінку піщанок *Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867. Доведено гепатомодельовальні властивості гумінових речовин у складі Гуміліду, що підтверджено стимуляцією активності трансаміназ, підвищенням загальної кількості протеїну, особливо за умов комбінації з аскорбіновою кислотою. Спостерігали гальмування накопичення окиснених продуктів у клітині внаслідок активації каталази та супероксиддисмутази. Інтенсифікація каталази розглядається як один із важливих механізмів адаптації клітини за дії ксенобіотиків. Додавання до розчину Гуміліду аскорбінової кислоти посилювало антиоксидантну дію його діючих речовин, завдяки як власним антиоксидантним властивостям, так і захисту гумінових кислот від окиснення. Формування відповідної реакції клітин печінки піщанок на потрапляння діючих речовин препарату Еко-Імпульс супроводжувалося збільшенням кількості ТБК-активних продуктів та цитохрому С, що свідчить про формування оксидативного стресу, який супроводжується підвищенням проникності мітохондріальної мембрани. Отримані результати вказують на гепатопротекторні властивості діючих речовин препарату Гумілід як окремо, так і в комбінації з аскорбіновою кислотою, та необхідність корекції концентрації препарату Еко-Імпульс для використання у клінічній практиці.

Ключові слова: Гумілід; Еко-Імпульс; амінотрансферази; каталаза; супероксиддисмутаза; ТБК-активні продукти; цитохром С

Biological activity of humic substances in the liver of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)

D. Serova, O. Taran, O. Dyomshina

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

One important reason for non-use of medicinal drugs is their hepatotoxicity. The search for new natural biologically active substances with hepatoprotective properties and which are cost-effective is an important task today. This article presents the data on the impact of the fodder-dietary supplement Humilid alone and in combination with ascorbic acid, and Eco-Impulse on the liver of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867). Hepatomodulation of properties of humic substances in the Humilid confirmed that stimulation of the activity of the enzyme transaminase increases the total amount of protein, especially in combination with ascorbic acid. There was inhibition of accumulation of oxidized products in the cell due to activation of catalase and superoxidizedismutase. Intensification of catalase is regarded as one of the important mechanisms of adaptation of the cell under the influence of xenobiotics. Addition of ascorbic acid to the solution Humilid increased the antioxidant action of its active ingredients both through its own antioxidant properties and protection of humic acids from oxidation. Formation of response in liver cells of gerbils receiving active ingredients of the drug Eco-Impulse was accompanied by an increase in the number of TBA-active products and cytochrome C, which indicates the development of oxidative stress, which is accompanied by increased permeability of mitochondrial membranes. The results indicate the hepatoprotective properties of the active ingredients of the drug Humilid, alone and in combination with ascorbic acid, and the need for correcting the concentration of the drug Eco-Impulse for use in clinical practice.

Keywords: Humilid; Eco-Impulse; aminotransferases; catalase; superoxidizedismutase; TBA-active products; cytochrome C

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна
 Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine
 Tel.: +38-050-607-52-83. E-mail: olga-d2009@ukr.net*

Вступ

За своїм генезисом гумінові речовини – особлива гранична стадія фізичного, хімічного та мікробіологічного процесів трансформації органічної речовини у природі. Унікальність їх властивостей визначають ґрунтовірні процеси та родючість ґрунтів, а також розкладання гірських порід та мінералів, зв'язування, фіксація, концентрація, розсіювання та перевідкладання хімічних елементів (Kocsis et al., 2008; Fedosyeyeva et al., 2009; Fisinin and Chapter, 2011; Vorobyov and Lapushkina, 2012).

Природні гумінові речовини регулюють процеси росту рослин, поліпшують фізико-хімічні властивості ґрунту, активізують мікроорганізми, впливають на міграцію поживних речовин, стимулюючи дихання, синтез білків і вуглеводів, ферментативну активність, широко використовуються в рослинництві та у ветеринарній практиці (Islam et al., 2005; Derho and Kolesnik, 2011; Stepchenko, 2011; Mikhaïlenko et al., 2014;). Прояв біологічної активності як природних гумінових речовин, так і їх промислових препаратів спостерігається не тільки відносно вищих рослин; це явище значною мірою універсальне для живих організмів. Незважаючи на широке використання таких препаратів у рослинництві та ветеринарії, механізми впливу гумінових речовин на організм тварин, яких використовують у преклінічних дослідженнях із метою впровадження нових лікарських засобів у терапевтичну практику лікування хвороб у людей, практично не вивчені.

Уважають встановленим той факт, що стимулювальний вплив гумінові речовини дають за певних, досить низьких концентрацій (10^{-2} – $10^{-4}\%$), а за вищих концентрацій проявляється інгібування біологічної активності організмів. Така реакція властива для багатьох біологічно активних речовин. Хоча спроби ідентифікації гормонів у складі гумінових речовин досі не увінчалися успіхом, гормоноподібна активність як природних, так і промислових препаратів не залишає сумнівів (Khrysteva, 1973; Perminova, 2008; Stepchenko, 2010; Buchko, 2011; Buchko and Maksimovic, 2011; Buchko 2013). Незважаючи на широке використання гуматів у різних галузях господарства, впровадження цих речовин у медичну та фармакологічну галузь триває. Тому проведення досліджень впливу похідних гумінових кислот на формування різних патологій – перспективний і актуальний напрям медицини, фармакології та біохімії.

Печінка – один із центральних органів метаболізму, де активно відбуваються процеси біосинтезу та розпаду молекул, біотрансформація метаболітів ендogenous та екзогенного походження, перетворення та екскреція з організму токсичних метаболітів і ксенобіотиків (Jaeschke et al., 2002; Shirakami et al., 2012; Zhu et al., 2012). Надходження ксенобіотиків до клітин викликає оксидативний стрес, пов'язаний з утворенням активних форм кисню. Кількість окисних продуктів контролюється антиоксидантною системою, яка включає низько- та високомолекулярні сполуки (Surai et al., 2005).

Ензим, який першим вступає в реакцію з перекисами у клітині, – каталаза. Найвища її активність характерна для клітин печінки, нирок і еритроцитів (Maltsev et al., 2010, Shmarakov et al., 2014), які мають високі значення продукції перекисів. Компоненти антиоксидантного

захисту клітини від токсичної дії супероксиданіона, який інтенсивно утворюється у дихальному ланцюзі, – ензим супероксиддисмутаза (СОД) та цитохром С. Найвищі їх рівні реєструються саме у печінці (Demin et al., 2008; Rakytyansky and Efimov, 2010; Donghong et al., 2015). У печінці СОД представлена Mn- і Cu/Zn-ізоферментами. Однак домінує у клітині та складає понад 65% загальної активності ферменту мітохондріальна форма (Mn-СОД) (Surai et al., 1999). Цитохром С – гемовмісний протеїн, що потребує наявності феруму у середовищі. Окиснена форма цитохрому С (Fe^{3+}) виявляє потужні антиоксидантні властивості за рахунок ефективнішого, ніж СОД, окиснення супероксиданіона в молекулярний кисень (Demin et al., 2008). Тому ця форма – один із маркерів ефективності функціонування антиоксидантної системи. Вивільнення цього протеїну в цитоплазму – наслідок розвитку оксидативного стресу у клітині, який впливає на цілісність мітохондріальної мембрани (Donghong et al., 2015). Підвищення концентрації цитохрому С у цитоплазмі запускає каскад реакцій апоптозу.

Дослідження біохімічних маркерів стану печінки та інтенсивності функціонування її антиоксидантної системи – актуальне та важливе питання біохімії, медицини та фармакології. Пошук лікарських препаратів, які б виявляли одночасно біологічну активність і гепатопротекторні властивості – також актуальне завдання сучасності.

У зв'язку з цим питання ефективності застосування препаратів на основі гумінових речовин із гепатопротекторною метою залишається відкритим. Мета цієї статті – визначити зміни біохімічних маркерів стану та ефективності антиоксидантної системи печінки піщанок за умов застосування кормових біологічно активних добавок Гумілід (окремо та в комбінації з аскорбіновою кислотою та Еко-Імпульс).

Матеріал і методи досліджень

Експеримент проводили на монгольських піщанках (*Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867) зрілого віку (6 місяців), середньою вагою 63–83 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Тварин поділили на чотири дослідні групи (по 5 тварин у кожній): I група – інтактні тварини (контроль), які отримували звичайну дієту, II – тварини, яким у питну воду додавали 1% розчин Гуміліду, III – у питну воду додавали суміш 1% розчинів Гуміліду та аскорбінової кислоти, IV – у питну воду додавали 1% розчин препарату Еко-Імпульс. Експеримент тривав 24 доби. Наприкінці тварин зважували та виводили з експерименту під етерним наркозом, видаляли печінку, промивали її у фізіологічному розчині та використовували для подальших досліджень.

Отримання гомогенату печінки та її водорозчинної фракції проводили шляхом диференційного центрифугування у градієнті сахарози методом Jonson and Lardy (1969). Для визначення загальної кількості протеїну, активності аспаратамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1),

аланінамінотрансферази (АлАТ, КФ 2.6.1.2), каталази (КТ, КФ 1.11.1.6), супероксиддисмути (СОД, КФ 1.15.1.1), ТБК-активних продуктів, цитохрому С використовували водорозчинну фракцію печінки та стандартні лабораторні тест-набори (Фелісіт, Україна, м. Дніпропетровськ) методами Vertis (2006) та Young (2001) згідно з протоколом фірми виробника.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за критерієм Манна – Уїтні. Вірогідними відмінностями вважали за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Важливий параметр гомеостазу цілісного організму – кількість загального протеїну. Визначення даного показника у печінці дає інформацію про інтенсивність синтетичних процесів за умов екзогенного впливу. Кількість загального протеїну у водорозчинній фракції печінки, основна частина якої представлена цитозольними протеїнами, за умов застосування 1% розчину препарату Гумілід, суміші 1% розчинів Гуміліду та аскорбінової кислоти та 1% розчину препарату Еко-Імпульс змінювалась не односпрямовано (рис. 1).

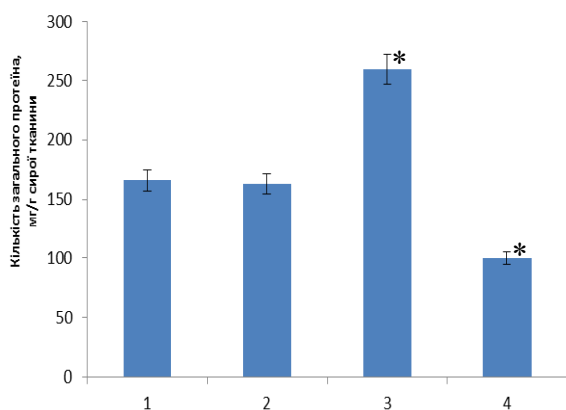


Рис. 1. Кількість загального протеїна у водорозчинній фракції печінки піщанок: 1 – контрольна група тварин, 2 – тварини, які отримували у питній воді 1% Гуміліду, 3 – у питній воді суміш 1% Гуміліду та 1% аскорбінової кислоти, 4 – у питній воді 1% препарату Еко-Імпульс; * – $P < 0,05$ відносно контрольної групи; $x \pm SD$, $n = 5$

Кількість загального протеїну у водорозчинній фракції печінки тварин, яких випоювали 1% розчином Гуміліду, залишалась на рівні контрольної групи. У піщанок, яких випоювали сумішню 1% розчину Гуміліду в комбінації з 1% розчином аскорбінової кислоти, кількість протеїну достовірно підвищувалась (у 1,5 раза порівняно з контрольною групою). У тварин, яких випоювали 1% розчином препарату Еко-Імпульс, кількість протеїну знижувалась до 60% порівняно з контрольною групою. Отримані результати вказують на чутливість білкового обміну печінки за впливу ксенобіотиків гумінової природи. Додаткове введення до раціону аскорбінової кислоти знижувало ксенобіотичне навантаження на печінку, що супроводжувалось відновленням протеїн-синтетичної функції цього органу.

Важливі ланки азотного, вуглеводного та енергетичного обміну печінки – активність аспартатамінотрансфе-

рази та аланінамінотрансферази (рис. 2, 3). У тварин, яких випоювали 1% розчином Гуміліду, активність аспартатамінотрансферази залишалась на рівні контрольної групи. У піщанок, яких випоювали сумішню 1% розчину Гуміліду, аскорбінової кислоти та 1% розчином препарату Еко-Імпульс, активність ензиму підвищувалась у 2,5 раза порівняно з контрольною групою та групою тварин, яких випоювали 1% розчином Гуміліду. Можливо, за умов застосування цих препаратів відбувалося посилення малатаспартатного цовникового механізму, опосередковано пов'язаного з вуглецевим і енергетичними обмінами, та аспартатаргініносукцинатного циклу, пов'язаного з азотним обміном. У групі, де як поживну добавку додавали 1% препарат Гуміліду у комбінації із 1% розчином аскорбінової кислоти, вказані процеси пов'язані з посиленням біосинтетичних реакцій, а у разі використання 1% розчину препарату Еко-Імпульс – із посиленням процесів протеолізу та утилізації його метаболітів. Це підтверджується даними щодо загальної кількості протеїну в даній дослідній групі (рис. 1).

Помітні зміни відбувалися в активності аланінамінотрансферази у водорозчинній фракції печінки піщанок: випоювання тварин 1% розчином Гуміліду спричинювало до зниження активності ферменту на 47% порівняно з контрольною групою.

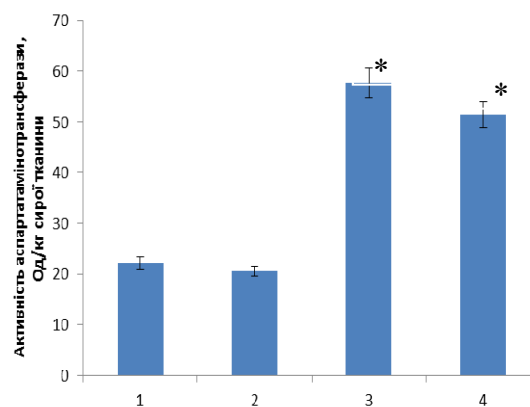


Рис. 2. Активність аспартатамінотрансферази у водорозчинній фракції печінки піщанок: див. рис. 1

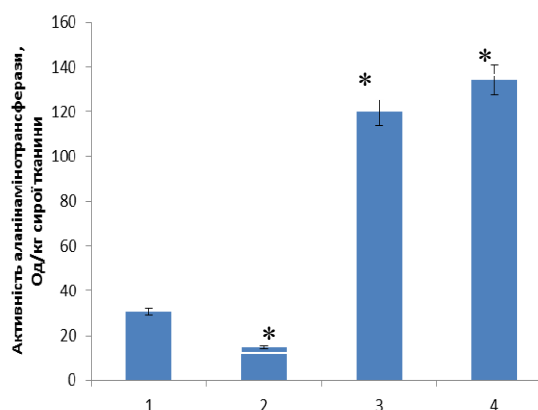


Рис. 3. Активність аланінамінотрансферази у водорозчинній фракції печінки піщанок: див. рис. 1

Можливо, це пов'язано з переключенням метаболізму пірувату й аланіну на метаболізм аспартату у печінковій тканині піщанок у наведених умовах, що підтверджується даними щодо аспартатамінотрансферази у даній групі

тварин (рис. 2). Такий ефект характерний для свійських тварин (Derho and Kolesnik, 2011).

У піщанок, яких випоювали сумішшю 1% розчинів Гуміліду та аскорбінової кислоти та 1% розчином препарату Еко-Імпульс, активність аланінамінотрансферази підвищувалась у 4,5 раза порівняно з контрольною групою. Отримані результати можуть вказувати на активацію процесів трансамінування внаслідок підвищення концентрації субстратів, а саме аланіну, до якого виявляє високу специфічність печінкова ізоформа ензиму та можливої активації гліоконеогенезу або процесів енергозбереження. У групі тварин, яких випоювали 1% розчином препарату Еко-Імпульс відбувалось підвищення активності аспартатамінотрансферази у 2,5 раза та аланінамінотрансферази у 4,5 раза у водорозчинній фракції печінки піщанок. Враховуючи дані щодо зниження кількості загального протеїну в цій дослідній групі на 60% порівняно з контрольною групою, отримані дані щодо активності аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази можуть вказувати на інтенсифікацію процесів утилізації продуктів протеолізу. Також це може свідчити про залучення даних ензимів до процесів використання продуктів розпаду амінокислот, пул яких збільшується за умов розпаду протеїнів.

Для встановлення впливу похідних гумінових речовин на прооксидантно-антиоксидантну систему печінки піщанок визначали біохімічні показники: кількість ТБК-активних продуктів, основний із яких – малоновий діальдегід (МДА), цитохрому С, активність каталази, супероксиддисмутази (рис. 4–7).

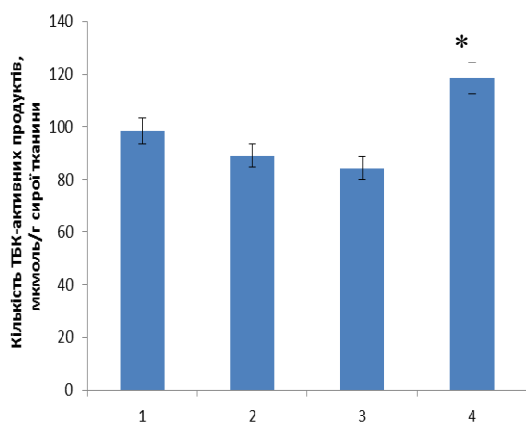


Рис. 4. Вміст ТБК-активних продуктів у водорозчинній фракції печінки піщанок: див. рис. 1

У водорозчинній фракції печінки піщанок (рис. 4), яких випоювали 1% розчином Гуміліду та 1% розчину Гуміліду в комбінації з 1% розчином аскорбінової кислоти, кількість ТБК-активних продуктів перебувала у межах контрольної групи, що вказує на відсутність прооксидантних властивостей досліджених препаратів. Однак застосування 1% розчину препарату Еко-Імпульс зумовлює підвищення цього показника на 20% порівняно з контрольною групою, що можна пов'язати з активацією перекисного окиснення ліпідів і, як наслідок, збільшення його продукту – малонового діальдегіду. Отримані результати вказують на підвищену біологічну активність компонентів препарату Еко-Імпульс у дослідженій концентрації, яка потребує корекції та подальших досліджень.

Зміни активності супероксиддисмутази у водорозчинній фракції печінки (рис. 5) спостерігали у піщанок, яких випоювали 1% розчином препарату Еко-Імпульс – відбувалось підвищення активності майже удвічі. Таке явище супроводжувалось підвищенням кількості ТБК-активних продуктів у даній дослідній групі. У піщанок, яких випоювали 1% розчином Гуміліду та сумішшю 1% розчинів Гуміліду та аскорбінової кислоти, активність ензиму у даній фракції коливалась у межах контрольної групи (1,0–1,5%).

Не менш важливий показник реактивності антиоксидантної системи – активність каталази (рис. 6). У першій і другій дослідних групах цей показник змінювався у межах 25% порівняно з контрольною групою, що розглядається як активація процесів адаптації у клітинах печінки за дії гумінових речовин і аскорбінової кислоти. Слід зазначити, що у піщанок, яких випоювали водою із додаванням 1% розчину препарату Еко-Імпульс, активність каталази підвищувалась на 40%. Однак, враховуючи дані щодо підвищення кількості ТБК-активних продуктів (рис. 4) та активності супероксиддисмутази (рис. 5) у цій дослідній групі, можна зробити висновок про активацію захисних систем в умовах впливу ксенобіотиків, які ініціюють утворення перекисних продуктів. Також результати проведених досліджень підтверджують необхідність оптимізації концентрації діючих речовин препарату Еко-Імпульс для подальшого застосування у дослідах на тваринах із метою впровадження у клінічну практику.

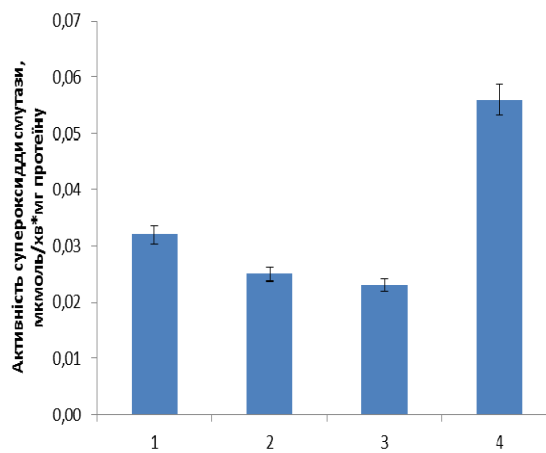


Рис. 5. Активність супероксиддисмутази у водорозчинній фракції печінки піщанок: див. рис. 1

Одні з параметрів рівня оксидативного стресу, стану мітохондріальної мембрани, інтенсивності дихання та життєздатності клітини – зміни концентрації цитохрому С (рис. 7), який виконує роль транспортера електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій і, таким чином, бере участь у процесах, що забезпечують клітини енергією; ефективний антиоксидант, який інтенсивніше, ніж супероксиддисмутаза, перетворює супероксид-аніон на молекулярний оксиген; регулятор процесу загибелі клітини шляхом апоптозу (Demin et al., 2008; Donghong, 2015).

Результати дослідження показали незначне збільшення концентрації цитохрому С у водорозчинній фракції печінки у групі тварин, яких випоювали 1% розчином Гуміліду. Випоювання піщанок 1% розчином Гуміліду в комбінації з 1% розчином аскорбінової ки-

слоти спричинило зниження концентрації цитохрому С на 20% порівняно з контрольною групою та на 48% порівняно з групою тварин, яким у питну воду додавали лише 1% розчин Гуміліду. За таких умов спостерігали додатковий захист у печінці завдяки фізико-хімічним властивостям аскорбінової кислоти, яка знижує концентрацію як окиснених ендогенних метаболітів, так і окиснених продуктів гумінових кислот.

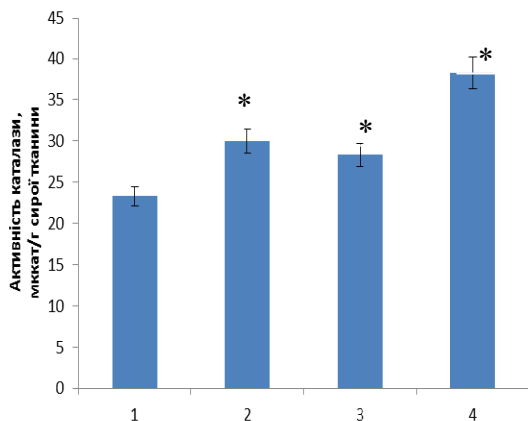


Рис. 6. Активність каталази у водорозчинній фракції печінки піщанок: див. рис. 1

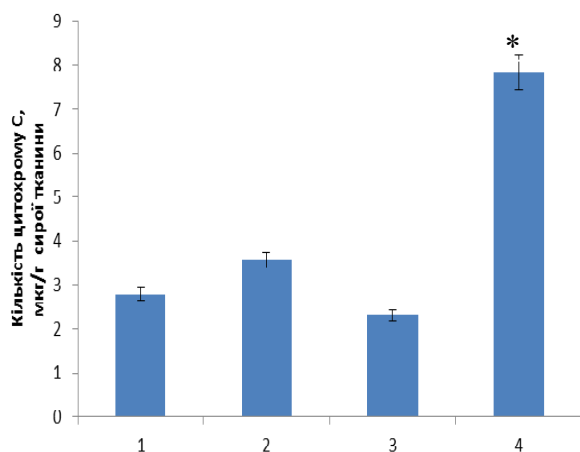


Рис. 7. Вміст цитохрому С у водорозчинній фракції печінки піщанок: див. рис. 1

У печінці піщанок, яких випоювали розчином препарату Еко-Імпульс кількість цитохрому С збільшувалась у 2,5 рази порівняно з контрольною групою тварин. Враховуючи дані щодо кількості ТБК-активних продуктів, активності каталази та супероксиддисмутаз у даній дослідній групі, можна зробити висновок про інтенсифікацію окисних процесів у клітинах печінки піщанок. Також отримані результати вказують на активізацію пероксидазної активності комплексу цитохрому С і кардіоліпіну (Demin et al., 2008) внаслідок підвищення концентрації перекисних продуктів, що є причиною підвищення проникності мітохондріальної мембрани та вивільнення цитохрому С у цитоплазму.

Експериментальні дані наукового дослідження підтверджують відомі факти чутливості білкового, азотного та енергетичного обмінів до дії біологічно активних речовин гумінової природи (Islam et al., 2005; Fedosyeyeva et al., 2009; Stepchenko, 2010, 2011; Derho and Kolesnik, 2011; Vorobyov and Lapushkina, 2012; Mikhailenko et al.,

2014). Активізація процесів трансмінування викликана підвищенням концентрації субстратів, що забезпечують і контролюють процеси амінокислотного та вуглеводного обмінів за впливу препаратів на основі гумінових речовин (Derho and Kolesnik, 2011; Mikhailenko et al., 2014). Надходження ксенобіотиків до клітин викликає оксидативний стрес з утворенням активних форм кисню. Кількість окисних продуктів контролюється антиоксидантною системою, яка включає низько- та високомолекулярні сполуки (Jaeschke et al., 2002; Surai et al., 2005; Shirakami et al., 2012; Zhu et al., 2012; Donghong et al., 2015). За таких умов підвищується проникність мітохондріальної мембрани (Demin et al., 2008; Maltsev et al., 2010; Shmarakov et al., 2014; Donghong, 2015), внаслідок чого підвищується концентрація цитохрому С у цитозолі та знижується інтенсивність клітинного дихання, перетворення супероксиданіона на молекулярний кисень за його участю та життєздатність клітини в цілому. Біологічно активна кормова добавка Гумілід активізує функціонування захисних систем печінки та стимулює адаптаційні процеси (Stepchenko, 2010; Buchko, 2011, 2013), а аскорбінова кислота виступає додатковим фактором їх стимуляції та захищає гумінові кислоти від окиснення.

Висновки

Установлено чутливість білкового, азотного та енергетичного обмінів у печінці піщанок до дії препаратів на основі гумінових речовин. Препарат Гумілід виявив гепатопротекторні властивості, а додавання аскорбінової кислоти до раціону посилювало біологічну активність гумінових речовин. Підтверджено його антиоксидантні властивості та стимуляцію адаптаційних процесів у печінці піщанок. Печінкова тканина особливо чутливо відреагувала на дію складових препарату Еко-Імпульс, що супроводжувалось посиленням процесів протеолізу та утилізації його метаболітів, інтенсифікацією реакцій утворення окиснених продуктів, підвищенням проникності зовнішньої мітохондріальної мембрани. Результати досліджень – підстава для рекомендації корекції концентрації діючих речовин препарату Еко-Імпульс із метою подальших досліджень у пошуку оптимальних схем застосування та впровадження у клінічну практику.

Подяки

Дякуємо завідувачу кафедри фізіології та біохімії ДДАУ, науковому керівнику науково-дослідної лабораторії з гумінових речовин імені професора Л.А. Христової професору Лілії Михайлівні Степченко за надані дослідні препарати.

Бібліографічні посилання

- Bertis, S.A., Ashvud, E.R., Bruns, D., 2006. Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th Ed. WB Saunders, Filadelfiya, PA.
- Buchko, O.M., 2011. Protein metabolism in pigs under the influence of the feed additive humic. *Nature Anim. Ukr.* 10, 27–30.
- Buchko, O.M., 2012. Antioxidant defense system of pigs under the influence of the additive nature of humic. *Visn. Lviv. Univ. Ser. Biol.* 58, 68–73.

- Buchko, O.M., 2013. Free radical processes in the pig lets for the actions of humic additives. *Anim. Biol.* 15(1), 27–33.
- Buchko, O.M., Maksimovic, I.Y., 2011. Link glutathione antioxidant protection of pigs under the influence of humic additives. *Nature Anim. Biol.* 13, 60–65.
- Demin, E.M., Proskurnina, E.V., Vladimirov, Y., 2008. Antioxidant effect of DHQ and rutin in peroxidase reactions catalyzed by cytochrome c. *Moscow Univ. Bull. Chem.* 49(5), 354–360.
- Derho, M.A., Kolesnik, E.A., 2011. Correlation of weight gain and the preservation of broilers ISA-15 cross-country with the level of blood biochemical parameters. *Vestn. Agric. Urals.* 3, 27–29.
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 18 March 1986).
- Fedosyeyeva, Y.E., Patsayeva, S.V., Terekhova, V.A., 2009. Influence of humic substances on same physiology characteristics of different pigments of microscopy mushroom. *Mikologiya i Fitopatologiya* 43(3), 243–249.
- Fedosyeyeva, Y.E., Terekhova, V.A., Yakymenko, O.S., Hladkova, M.M., 2009. Ecotoxicological assessment of humic substances of different origin using microalgae *Scenedesmus quadricauda*. *Theor. App. Eco.* 4, 45–50.
- Fisinin, V.I., Chapter, P., 2011. Effective protection from stress in poultry, from vitamins to animal breeding. *Bird Poult. Prod.* 5, 23–26.
- Islam, K.M.S., Schuhmacher, A., Gropp, J.M., 2005. Humic acid substances in animal agriculture. *PJN* 4(3), 126–134.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pes-sayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65(2), 166–176.
- Shirakami, Y., Lee, S.A., Clugston, R.D., Blaner, W.S., 2012. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 124–136.
- Shmarakov, I.O., Borschovetska, V.L., Marchenko, M.M., 2014. Reactive oxygen and nitrogen species generation features under conditions of acute hepatotoxicity. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 22(1), 3–7.
- Stepchenko, L.M., 2010. Regulatory mechanisms of action of biologically active substances humic nature organism productive poultry. *J. Physiol.* 56(2), 306.
- Stepchenko, L.M., 2010. The value of cathepsin B and its inhibitors in the regulation of metabolism in broiler chickens for the actions of humic substances *Nature Anim. Biol.* 12(2), 180–188.
- Stepchenko, L.M., 2011. Biologicheski active substances humic nature as regulators of homeostasis of poultry. *Articles 7 Internat Conf Radostim 2011. Phytohormones, humic substances and other bioratsionalnye pesticides in agriculture, Minsk* 164–167.
- Surai, K.P., Surai, P.F., Speake, B.K., 2005. Antioxidant-prooxidant balance in the intestine: food for thought. *J. Dairy Sci.* 87, 797–809.
- Vorobyov, A.V., Lapushkina, M.A., 2012. Biochemical parameters of broiler chickens in the application immunostimulant. *Vestn. Veterinary* 63(4), 132–133.
- Young, D.S., 2001. *Effects of disease on clinical laboratory test.* 4th ed. AACC Press.
- Zhu, H., Jia, Z., Misra, H., Li, Y.R., 2012. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: Updated experimental and clinical evidence. *J. Dig. Dis.* 13(3), 133–142.

Надійшла до редколегії 04.10.2016