

## МОРФОЛОГІЧНИЙ СКЛАД КРОВІ І БІОХІМІЧНІ ПРОЦЕСИ В ОРГАНІЗМІ САМИЦЬ ЩУРІВ F<sub>1</sub> ЗА ДОВГОТРИВАЛОГО ВПЛИВУ ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

У. І. Тесарівська<sup>1</sup>, канд. вет. наук,  
Р. С. Федорук<sup>2</sup>, д-р вет. наук, проф., членкор НААН,  
С. Я. Мартиник<sup>1</sup>, Т. В. Юринець<sup>1</sup>, В. А. Смук<sup>1</sup>, А. І. Кишко<sup>1</sup> – наукові співробітники

<sup>1</sup>Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів  
та кормових добавок  
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна  
[tesar21@gmail.com](mailto:tesar21@gmail.com)

<sup>2</sup>Інститут біології тварин НААН,  
вул. Василя Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

У роботі розглядається вплив на організм щурів довготривалого впоювання водного розчину лимонної кислоти ( $C_6H_{12}O_6 \times H_2O$ , «хч») у кількості 8 мг/л. Дослідження проведено на 10 лабораторних щурах-самицях F<sub>1</sub> лінії Wistar, отриманих від самиць F<sub>0</sub>. Сформовано дві групи: контрольну і дослідну, по 5 тварин у кожній. Тварини перебували в стандартних умовах з природним світловим режимом день / ніч, водні розчини цитрату, воду і корм отримували *ad libitum*. Визначали морфологічний склад та біохімічні показники крові щурів-самиць F<sub>1</sub>. Результати дослідження вказують на відсутність негативного впливу лимонної кислоти на червоні кров'яні клітини. Щодо білої крові, то відзначено зниження кількості лейкоцитів, що може бути зумовлено виробленням адаптивної реакції організму на лимонну кислоту, або про інгібування лимонною кислотою імунної його відповіді за тривалої адаптивної дії. У самиць F<sub>1</sub> зберігається суттєве зростання відносного вмісту еозинофілів, що у нашому випадку, можливо, спричинено дією лимонної кислоти. Аналіз отриманих результатів біохімічних показників крові вказує на певну тенденцію до зменшення, щодо контролю, вмісту сироваткового Феруму, а також загальної і ненасиченої Fe-зв'язувальної її здатності. Насичення Ферумом сироваткового трансферину зберігалось на рівні тварин контрольної групи. Аналіз результатів досліджень вказує на відсутність змін щодо контролю в активності ензимів: Лужна фосфатаза АЛТ та АсАТ, також не мають статистично вірогідного підтвердження відмінностей щодо контролю. Відзначено статистично не вірогідно вищий, щодо контролю, рівень сечовини. Отже, довготривале впоювання з водою лимонної кислоти самицям щурів у поколінні F<sub>0</sub> та F<sub>1</sub> у період фізіологічного і статевого їх дозрівання та вагітності вказує на відсутність у самиць щурів F<sub>1</sub> негативного її впливу. Однак, відзначено адаптивну імунологічну реакцію організму зі зниженням кількості лейкоцитів та суттєве зростання відносного вмісту еозинофілів. Результати біохімічних досліджень сироватки крові вказують на відсутність статистично вірогідних різниць щодо тварин контрольної групи.

**Ключові слова:** МОРФОЛОГІЯ КРОВІ, БІОХІМІЯ СИРОВАТКИ КРОВІ, ЛИМОННА КИСЛОТА, САМИЦІ, ЩУРИ.

## MORPHOLOGICAL COMPOSITION OF BLOOD AND BIOCHEMICAL PROCESSES IN THE ORGANISM OF FEMALE RATS F<sub>1</sub> UNDER LONG-TERM EXPOSURE OF CITRIC ACID

*U. I. Tesarinska<sup>1</sup>, R. S. Fedoruk<sup>2</sup>, S. Ya. Martynyk<sup>1</sup>, T. V. Yurynech<sup>1</sup>, V. A. Smuk<sup>1</sup>, A. I. Kyshko<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,  
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine  
[tesar21@gmail.com](mailto:tesar21@gmail.com)

<sup>2</sup>Institute of Animal Biology NAAS,  
38, Vasyl Stus str., Lviv, 79034, Ukraine

The paper considers the effect on rats of long-term feeding of an aqueous solution of citric acid (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> x H<sub>2</sub>O, "chemically pure.") in the amount of 8 mg/l. The study was performed on 10 laboratory female rats F<sub>1</sub> of the Wistar line, obtained from F<sub>0</sub> females. Two groups were set up: control and experimental, 5 animals in each. Animals were under standard conditions with natural light regime day/night, aqueous solutions of citrate, water, and feed received ad libitum. Were determined the morphological composition and biochemical parameters of the blood of female F<sub>1</sub> rats. The results of the study indicate the absence of an unfavorable effect of citric acid on red blood cells. Concerning white blood, there is a decrease in the number of leukocytes, which may be due to the development of an adaptive response of the body to citric acid or the inhibition of citric acid's immune response to long-term adaptive action. There is a significant increase in the relative content of eosinophils in females F<sub>1</sub>, which probably may be due to the action of citric acid. The analysis of the obtained results of blood biochemical parameters indicates a certain tendency to decrease, in terms of control, the content of serum iron, as well as its total and unsaturated Fe-binding capacity. Ferrum saturation of serum transferrin was present at the level of animals in the control group. Analysis of the study results indicates no changes in control in the activity of enzymes: Alkaline phosphatase ALT and AST, also have no statistically significant confirmation of differences in the control group. The level of urea was statistically not significantly higher in terms of control. Thus, long-term watering of citric acid to female rats in the generation F<sub>0</sub> and F<sub>1</sub> during their physiological and sexual gestation and pregnancy reveal un-favorable effects in female rats F<sub>1</sub>. However, there was distinguished the adaptive immune-biological response of the animals organism. The immunological response was supported by a decrease in the number of leukocytes and a significant increase in the relative content of eosinophils. The results of biochemical studies of serum indicate the absence of statistically significant differences in animals of the control group.

**Keywords:** BLOOD MORPHOLOGY, BLOOD SERUM BIOCHEMISTRY, CITRIC ACID, FEMALES, RATS.

Лимонна кислота, яка широко використовується у харчовій і фармацевтичній промисловості (Fales et al., 2009; Novinyuk, 2009), має своє застосування також у ветеринарії та тваринництві (Dmytruk, 2008; Nagoba et al., 2011; European Food Safety Authority, 2015). Відомо, що вона позитивно впливає на функціонування різних фізіологічних систем сільськогосподарських тварин, а саме: стимулює обмін речовин в організмі, підвищує апетит, сприяє кращому засвоєнню їжі (Kostenko et al., 2004; Kostenko et al., 2008; Egorov et al., 2013).

Застосування органічних кислот з низькою молекулярною масою є одним із запропонованих сьогодні способів розв'язання проблеми підвищеного залуження травної системи тварин та птиці. Такі кислоти поліпшують контактну дію корму зі шлунково-кишковим трактом, створюючи кисле середовище. Вказаний вплив є найбільш сприятливим для розвитку корисної мікрофлори, водночас пригнічуючи активність шкідливої мікрофлори (Camhbell & Bedford, 2012). Застосування лимонної кислоти у годівлі тварин зумовлює також

стимулюючий вплив на їх репродуктивну здатність (Tesarivska et al., 2016).

У багатьох ветеринарних препаратах, біологічно активних добавках і засобах, основним діючим компонентом є цитрати (Matjushkina et al., 2014, Derzhprodsposhyvsluzhba Ukrainy, Rejestracija veterynarnykh preparativ, 2020). Набувають поширення солі лимонної кислоти на основі макро- і мікроелементів та їх наночастинок (Kovalchuk, 2014, Kovalchuk et al., 2018). Це зумовлює зацікавлення в проведенні фізіологічних досліджень щодо впливу лимонної кислоти та її сполук на організм тварин.

Попри значний вплив лимонної кислоти на функціонування окремих систем та органів живих організмів, нами виявлено лише окремі дослідження з цього напрямку. Тому метою досліджень було з'ясувати вплив тривалого впоювання лимонної кислоти на морфологічний склад і біохімічні показники крові самиць щурів F<sub>1</sub>.

**Матеріали і методи.** Досліди проведені у віварії ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок на самицях білих лабораторних щурів, лінії Wistar, які отримані від самиць F<sub>0</sub>. Тварини поділені на контрольну і дослідну групи по 5 тварин у кожній. Утримання і годівля тварин відповідали зооветеринарним вимогам. Самицям в поколіннях F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>, протягом фізіологічного і статевого дозрівання, запліднення, вагітності та вигодовування потомства впоювали з водою розчин 8 мг/л лимонної кислоти (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> xH<sub>2</sub>O, «xч»). Водні розчини цитрату, воду і корм отримували ad libitum.

Самицям покоління F<sub>1</sub> на 21-у добу вагітності проводили евтаназію методом миттєвої декапітації і відбирали кров для подальших досліджень. Показники червоної крові визначали загальноприйнятими методами: підрахунок еритроцитів і кількість лейкоцитів – на сітці Горяєва, концентрацію гемоглобіну – гемоглобін-ціанідним методом, гематокрит – за допомогою гематокритної центрифуги, лейкоцитарну формулу – шляхом мікроскопії мазків крові, забарвлених барвником Романовського-Гімза і підрахунку клітин (Kondrakhyn et al., 1985). З відповідних формул вираховували такі величини індексів: середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті, середній вміст гемоглобіну в еритроциті, середній об'єм еритроцита. Для цього використовували величини показників кількості еритроцитів, рівня гемоглобіну крові і гематокриту.

Біохімічні показники в сироватці крові самиць щурів F<sub>1</sub>, визначали за допомогою напіваавтоматичного біохімічного аналізатора HumaLyzer 3000 з використанням стандартизованих наборів «Human Diagnostics Worldwide» (Німеччина). Досліджували активність АЛАТ, АсАТ, ЛФ, вміст креатиніну, сечовину, сироваткове заліза, загальну залізовз'язувальну здатність сироватки крові (ТІВС). Вивчаючи характер обміну Феруму, за величиною сироваткового Феруму і ТІВС, нами також визначені розрахунковим методом показники: ненасичена ферумзв'язувальна здатність сироватки крові (UIBS) і відсоток насичення трансферину. Визначали сироватковий рівень молекул середньої маси (МСМ) за методикою Н. І. Габріелян (Gabrielyan et al., 1985). Дослідження з вивчення дії лимонної кислоти на потомство виконані за методиками, які викладені в довіднику «Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів» (Kotsjumbas et al., 2006).

При проведенні експериментів дотримувались загальних етичних принципів згідно з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» та ухвалою Першого національного конгресу України з біоетики (European convention, 1986, Reznikov et al., 2006).

Отриманий цифровий матеріал опрацьовано методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента. Розраховували середні арифметичні величини (M) та похибки середніх арифметичних величин ( $\pm m$ ). Зміни вважали вірогідними за  $P \leq 0,05$ . Для розрахунків використано комп'ютерну програму Excel.

**Результати й обговорення.** Дослідження тривалого, протягом двох поколінь, щоденного впоювання лимонної кислоти вказують на відсутність негативного її впливу на червоні кров'яні клітини крові (табл. 1). У тварин дослідної групи показники числа

еритроцитів, вмісту гемоглобіну та величина гематокриту порівняно з тваринами контрольної групи не мають значної різниці. Також відсутня тенденція до змін між контрольною і дослідною групами усіх еритроцитарних індексів, що вказує на не токсичність застосованої дози лимонної кислоти на клітини червоної крові.

Таблиця 1

Гематологічні показники самиць щурів  $F_1$  ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Показники	Групи	
	контрольна	дослідна
Еритроцити, Г/л	6,00 $\pm$ 0,28	6,20 $\pm$ 0,24
Гемоглобін, г/л	110,00 $\pm$ 4,40	114,00 $\pm$ 4,40
Гематокрит, л/л	0,32 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, %	33,95 $\pm$ 0,19	33,05 $\pm$ 0,84
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	18,35 $\pm$ 0,22	18,38 $\pm$ 0,29
Середній об'єм еритроцита, мкм <sup>3</sup>	54,00 $\pm$ 1,28	54,70 $\pm$ 0,53
Лейкоцити, Г/л	18,60 $\pm$ 1,40	10,70 $\pm$ 1,60*
Нейтрофіли сегментоядерні, %	25,25 $\pm$ 1,50	21,00 $\pm$ 2,89
Лімфоцити, %	68,25 $\pm$ 1,80	70,30 $\pm$ 4,30
Моноцити, %	6,70 $\pm$ 0,67	5,00 $\pm$ 1,50
Еозинофіли, %	1,25 $\pm$ 0,75	3,60 $\pm$ 0,30
Базофіли, %	-	-

Примітка: в цій і наступній таблиці вірогідність результатів стосовно контрольної групи: \* -  $p < 0,05$

Щодо білої крові, то відзначено зниження кількості лейкоцитів на 42,5 % ( $p < 0,05$ ), що може бути зумовлено виробленням адаптивної реакції організму на лимонну кислоту, як на хімічну речовину впродовж тривалого ( $F_0$  і  $F_1$ ) її вживання. Разом з тим це може свідчити і про інгібування лимонною кислотою імунної відповіді у самок  $F_1$  за тривалої адаптивної дії. Водночас, у самиць  $F_1$  аналогічно як і  $F_0$  (Tesarivska, 2019) зберігається суттєве (в 2,9 раза) зростання відносного вмісту еозинофілів.

Еозинофіли відповідають на хемотоксичні чинники, що виділяються гладкими клітинами і базофілами, а також на комплекс антиген – антитіло. Дія еозинофілів активно виявляється в сенсibiliзованих тканинах. Вони залучаються до реакції гіперчутливості негайного та уповільненого типу. В літературі зазначено, що гіпереозинофілія в поєднанні з іншими проявами алергії або без них може виникнути при прийомі лікарських препаратів (антибіотиків, сульфаніламідів, ацетилсаліцилової кислоти) – так звана медикаментозна еозинофілія (Ponosheva & Okhotnikova, 2018). У нашому випадку, це можливо, спричинено дією лимонної кислоти.

Аналіз отриманих результатів, вказує на відсутність статистично вірогідних змін у біохімічних показниках крові (табл. 2).

Таблиця 2

Біохімічні показники сироватки крові самиць щурів  $F_1$  ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Показники	Групи	
	контрольна	дослідна
Сироватковий Ферум, мкмоль/л	48,00 $\pm$ 4,6	41,00 $\pm$ 9,30
TIBC, мкмоль/л	132,20 $\pm$ 13,00	109,10 $\pm$ 13,00
UIBS, мкмоль/л	84,20 $\pm$ 14,04	67,80 $\pm$ 4,20
Насичення трансферину, %	37,60 $\pm$ 5,10	36,30 $\pm$ 4,30
АлАТ, Од/л	69,10 $\pm$ 6,80	67,00 $\pm$ 8,90
АсАТ, Од/л	149,70 $\pm$ 16,90	152,20 $\pm$ 36,60
ЛФ, Од/л	394,50 $\pm$ 65,80	309,00 $\pm$ 78,90
Сечовина, ммоль/л	6,80 $\pm$ 0,66	7,80 $\pm$ 1,1
МСМ, ум.од	1,045 $\pm$ 0,02	1,09 $\pm$ 0,035

У крові тварин дослідної групи простежується певна тенденція до зменшення, щодо контролю, вмісту сироваткового Феруму на 14,6 %, а також загальної і ненасиченої ферумзв'язувальної здатності крові, відповідно, на 17,5 і 7,6 %. Насичення Ферумом сироваткового трансферину, основними функціями якого є транспорт вищезазначеного мікроелементу від місця всмоктування до органів його використання або кумулювання, в самиць дослідної групи зберігалось на рівні тварин контрольної групи.

Аналіз результатів досліджень активності амінотрансфераз у самок F<sub>1</sub> за дії лимонної кислоти вказує на відсутність змін щодо контролю в активності АлАТ та АсАТ. Значна відмінність щодо контролю, показника активності лужної фосфатази, яка у тварин дослідної групи є нижчою на 21,7 %, не має статистично вірогідного підтвердження. В крові самиць щурів дослідної групи відзначено статистично не вірогідне збільшення, щодо контролю, рівня сечовини на 14,7 % та вмісту речовин середньої молекулярної маси на 4,3 % за впливу лимонної кислоти.

## ВИСНОВКИ

1. Довготривале впоювання з водою лимонної кислоти самицям щурів у поколінні F<sub>0</sub> та F<sub>1</sub> в період фізіологічного і статевого їх дозрівання та вагітності вказує на відсутність у самок щурів F<sub>1</sub> негативного її впливу на червоні кров'яні клітини крові, однак щодо білої крові: відзначено зниження кількості лейкоцитів та суттєве зростання відносного вмісту еозинофілів.

2. Результати біохімічних досліджень сироватки крові вказують на тенденцію до зменшення рівня Феруму в сироватці крові та можливі зміни у його метаболізмі. Тенденція до вищого рівня сечовини в крові може вказувати про зміну метаболізму азотистих сполук в організмі самиць за активного впливу лимонної кислоти.

**Перспективи досліджень.** Враховуючи отримані результати, нами будуть проводитись подальші дослідження щодо з'ясування впливу тривалого впоювання лимонної кислоти на організм щуренят F<sub>2</sub>.

## References

Camhbell, Y.Y. & Bedford, M.R. (2012). Enzyme application for monogastric feeds: Areview. *Can. J. Anim.* 72. 5. 449-466.

Derzhprodspozhyvslyzhba Ukrainy, Rejestracija veterynarykh preparativ v Ukraini (2020). <http://www.consumer.gov.ua/ContentPages/Reestri/38/>. [in Ukrainian].

Dmytruk, I.V. (2008). Riststymuljujucha ta antystresova dija lymonnoji i burshtynovoji kyslot ta probiotyky «Probiol-L» v ghodivli molodnjaku svynej: avtoref. dys. na zdobuttja naukovogho stupenja kand. s-gh. nauk : spec. 06.02.02 «Ghodivlja tvaryn i tekhnologhija kormiv». Lviv; Lvivskyj nac. universytet veterynarnoji medycyny ta biotekhnologhij imeni S.Z. Gzhycjkogho. 20. [in Ukrainian].

Doklinichni doslidzhennja veterynarykh likarskykh zasobiv (2006). Dovidnyk. za red. d. vet. n., professora Kotsjumbasa I.Ja. Lviv: Triada pljus,. 360. [in Ukrainian].

Egorov, B.V., Levitskiy, A.P., Turpurova, T.M. (2013). Vliyanie organicheskikh kislot na usvoenie kaltsiya v kormlenii selskohozyaystvennoy ptitsyi. *Zernovi produkty i kombikormy.* – 1 (49). 27–30. [in Russian].

European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg. (1986). 53.

Fales, V.M., Khivrych, O.V., Lytvynenko, A.M. (2009). Analiz vyrobnyctva ta zastosuvannja lymonnoji kysloty. *Kharchova promyslovistj.* 8. 91-94. [in Ukrainian].

Gabrielyan, N.I., Levitskiy, E.R., Dmitriev, A.A. [et al]. (1985). Skringovyiy metod opredeleniya srednih molekul v biologicheskikh zhidkostyah: [metod. rekomendatsii]. M. 22. [in Russian].

Kondrakhyn, Y.P., Kurylov, N.V., Malakhov, A.Gh., Arkhypov, V.A., Belov, A.D., Beljakov, Y.M., Blynov, N.Y., Korobov, A.V., Frolova, L.A., Sevast'janova, N.A. (1985). Klynycheskaja laboratornaja dyaghnostyka v veterynaryy. M. Aghropromyzdat. 287. [in Russian].

Kostenko, V.M., Dmytruk, I.V., Nechyporuk, Ju.I., Sukhovukha, S.M. (2008). Efektyvnistj vykorystannja lymonnoji ta burshtynovoji kyslot, probiotyktiv ta jikh sumishok, jak riststymuljujuchykh ta imunozakhystnykh bezpechnykh dobavok v ghodivli tvaryn. Zbirnyk naukovykh prac VDAU. 34. 230-233. [in Ukrainian].

Kostenko, V.M., Dmytruk, I.V., Nechyporuk, Ju.I. (2004). Produktyvnistj ta ghematologhichni pokaznyky teljat ta porosjat pry zghodovuvanni jim lymonnoji ta jantarnoji kyslot. Naukovyj visnyk LNAVIM im. S. Z. Ghzhycjkogho. 6. 72–79. [in Ukrainian].

Kovalchuk, I.I. Vplyv cytrativ khromu ta selenu na lipidnyj sklad tkanyn orghanizmu medonosnykh bdzhil. (2014). Naukovyj visnyk Lvivskogho nacionalnogho universytetu veterynarnoji medycyny ta biotekhnologhij im. Ghzhycjkogho. 16, 3(2). 148-153. [in Ukrainian].

Kovalchuk, I.I., Dvyljuk, I.I., Pashhenko, A.Gh. (2018). Umist mineraljnykh elementiv u medi ta jogho biologhichna cinnistj za umov zghodovuvannja bdzholam cytrativ So, Ni, Ag i Su. Visnyk agrarnoji nauky. 8. 38-43. [in Ukrainian].

Matjushkina, M.V., Ghodovan, V.V., Mudryk, L.M., Ghrydina, T.L. (2014). Antymikrobnii vlastyvoli novykh koordynacijnykh spoluk metaliv z lymonnoju kyslotoju. Odesjkyj medychnyj zhurnal. 4. 13-17. [in Ukrainian].

Nagoba, B.S., Wadher, B.J., Selkar, S.P. (2011). Citric Acid Treatment of Chronic Wounds in Animals International Journal of Animal and Veterinary Advances. 3, I. 26-28.

Novinyuk, L.V. (2009). Tsitraty – bezopasnyie nutrientyi Pischevnye ingredienty: syire, dobavki. 1. 70-71. [in Russian].

Ponochevna O.V. & Okhotnikova O.M. (2018). Syndrom ghipereozynofiliji: suchasna sutnistj, rozmajittja prychn, skladnistj diaghnostyky i vyboru terapiji. Klinichna imunologija. Alergologija. Infektologija. 7 (112) 24 – 31. [in Ukrainian].

Reznikov O.Gh., Solovjov A.I., Dobrelja N.V., Stefanov O.V. (2006). Bioetychna ekspertyza doklinichnykh ta inshykh naukovykh doslidzhenj, shho vykonujutsja na tvarynakh. /metodychni rekomendaciji. Kyiv. 28. [in Ukrainian].

Scientific Opinion on the safety and efficacy of citric acid when used as a technological additive (acidity regulator) for all animal. (2015). European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Journal. 13, I. 2.15.

Tesarivska, U.I., Fedoruk, R.S., Shumska, M.I. (2016). Reproduktyvna funkcija samok shhuriv F1 i postnatalnyj rozvytok shchurenjat F2 za dii riznykh doz nanogermaniju cytrat. Naukovyj visnyk Lvivskogo nacionalnogo universytetu veterynarnoji medycyny ta biotekhnologij imeni S.Z. Ghzhyckogo. Lviv, 124-130. [in Ukrainian].

Tesarivska, U.I. (2019). Vplyv tryvalogho vypojuvannja lymonnoji kysloty na organizm samyci shchuriv F<sub>0</sub>. Naukovyj visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Ghzhyckogo. Cerija «Veterynarni nauky». 21. 3 (95). 102–106. [in Ukrainian].