

Изменение активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы в крови и почках цыплят в ходе развития стресс-реакции

С.Ю. Харлап, аспирантка, М.А. Дерхо, д.б.н., профессор, Т.И. Середа, к.б.н., ФГБОУ ВО Южно-Уральский ГАУ

В последние годы воспроизводство высокопродуктивных кроссов птиц на птицефабриках России происходило в основном за счёт импорта прародительских и родительских форм цыплят. Однако в новых экономических условиях резко ограничился ввоз импортной продукции, что побуждает птицеводческие племрепродукторы использовать в производстве племенного инкубационного яйца собственные ресурсы. В связи с этим возникла необходимость оценить биологический потенциал импортных и отечественных цыплят родительского стада.

Для реализации генетического потенциала большое значение имеют адаптационные способности птиц, которые можно оценить по характеру формирования стресс-реакции под действием стрессоров. Известно, что для птиц, содержащихся в промышленных условиях, одним из самых распространённых стресс-факторов является транспортировка и перегруппировка [1]. Например,

время нахождения цыплят в транспортной таре определяет уровень снижения массы тела [2]. Первичной эффекторной мишенью стресса являются надпочечники, состояние которых тесно взаимосвязано с функциональной активностью почек [3]. Так, под действием стрессоров в почках животных протекают компенсаторно-приспособительные процессы, в которые вовлекаются все отделы и компоненты нефрона, а также сосудистая система [4]. Это служит доказательством участия почек в реализации адаптационной стратегии организма.

Одним из чувствительных биоиндикаторов действия стрессоров различного происхождения являются ферменты, отражающие физиолого-биохимическое состояние организма и его адаптационные возможности [1, 5]. При этом в основном изучена информативность сывороточных ферментов [5, 6]. В то же время ферментативные изменения клеток внутренних органов, в том числе и почек, недостаточно отражены в литературе, что и определило тему нашего исследования.

Целью исследования явилось изучение динамики активности АсАТ, АлАТ и ЩФ в крови и

супернатанте почек импортных и отечественных цыплят кросса Ломан белый в ходе стресс-реакции, развивающейся на фоне моделированного производственного стресса перегруппировки и транспортировки.

Материал и методы исследования. Экспериментальная часть работы выполнена на базе вивария и кафедры органической, биологической и физколлоидной химии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский ГАУ» в 2014–2015 гг. Объектом исследования служили 40-суточные цыплята кросса Ломан белый, принадлежащие ОАО «Челябинская птицефабрика». Птиц подбирали в группы по принципу аналогов с учётом происхождения, живой массы и клинического состояния. До начала эксперимента их выдерживали в условиях вивария в течение двух недель, поддерживая условия содержания в соответствии с технологией выращивания кросса.

Для проведения опыта было сформировано две группы ($n=25$): I гр. (контрольная) состояла из цыплят, полученных на птицефабрике от птиц родительского стада. Во II гр. (опытную) вошли импортные цыплята, завезённые на птицефабрику в суточном возрасте. Для моделирования производственного стресса перегруппировки и транспортировки и инициации стресс-реакции использовали шуттелирование на шуттель-аппарате при частоте механических движений 160 в мин. в течение двух часов [2] (эксперимент проводили в утренние часы (с 9 до 11 час.).

Материалом исследований служили кровь и почки, которые получали после декапитации цыплят, выполненной под наркозом эфира с хлороформом с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, до шуттелирования (фон), сразу, через 1, 4 и 24 часа после шуттелирования. После декапитации кровь собирали в пробирки, подвергали центрифугированию и получали плазму крови. Почки перфузировали охлаждённым физраствором, гомогенизировали в среде выделения, содержащей 0,005н Tris, 0,1н KCl в соотношении 1:50. Полученный гомогенат центрифугировали. В супернатанте и плазме крови определяли активность АсАТ (аспартатаминотрансферазы), АлАТ (аланинаминотрансферазы) и ЩФ (щелочной фосфатазы) при помощи стандартных наборов реактивов «Абрис», «Эко-сервис». В почках активность ферментов рассчитывали на 1 г ткани. Для оценки цитолитической реакции клеток почек определяли соотношение между уровнем энзимов в плазме крови и супернатанте почек по формуле:

$$КЦР = \frac{\Phi_{\text{крови}}}{\Phi_{\text{почек}}} \cdot 1000,$$

где КЦР – коэффициент цитолитической реакции, усл. ед.;

$\Phi_{\text{крови}}$ – активность ферментов в плазме крови, мкмоль/(ч·мл);

$\Phi_{\text{почек}}$ – активность ферментов в супернатанте почек, мкмоль/(ч·мл) на 1 г ткани;

1000 – нормализующий коэффициент.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики на ПК с помощью табличного процессора «Microsoft Excel - 2003» и пакета прикладной программы «Биометрия». Достоверность различий между группами оценивали с учётом непараметрического критерия Манна – Уитни.

Результаты исследования. Мы установили, что отечественные и импортные цыплята до моделирования экспериментального стресса отличались по уровню ферментов в плазме крови и супернатанте почек (табл. 1), что свидетельствовало о различиях в метаболическом состоянии клеток организма и их энергетических возможностях. Так, в плазме крови и супернатанте почек импортных цыплят активность ферментов АлАТ и АсАТ была значительно меньше, чем у отечественных. АлАТ и АсАТ являются метаболитами цикла Кребса [7]. Исходя из этого можно сделать вывод о том, что в организме цыплят опытной группы значительно меньшее количество аминокислотных остатков вовлекалось в энергетический обмен. Возможно, одной из причин этого являлось нарушение соотношения между константой Михаэлиса ферментов и концентрацией субстрата [5]. В данных условиях, вероятно, ЩФ способствовала образованию и высвобождению энергии за счёт транспорта фосфатов через плазматические мембраны, что проявлялось более высокой активностью фермента в клетках почек импортных цыплят.

Результаты наших исследований показали, что ферменты являются одним из быстро реагирующих звеньев биохимического гомеостаза на действие стресс-фактора. Динамика изменений их активности в ходе развития стресс-реакции соответствовала следующим её фазам [8]: 1) латентная фаза с критическим минимумом; 2) фаза реабилитации; 3) фаза мобилизации.

В почках отечественных цыплят данные фазы обнаруживались в течение первых 24 часов после шуттелирования, являющегося для птиц, согласно данным [1], стресс-фактором при частоте механических движений 160 в мин. Первая фаза ответной реакции организма была максимально выражена для АлАТ и АсАТ через 1 час, а ЩФ – сразу после действия стрессора (табл. 1) и проявилась уменьшением активности ферментов в супернатанте почек до минимума за счёт подавления их биосинтеза. Возможно, это было результатом изменений транскрипционной активности генов почки, контролирующей синтез данных каталитических белков [9]. Одним из путей поддержания концентрации ферментов в клетках органа явилось уменьшение количества каталитических белков, мигрирующих из почек в кровь. Об этом свидетельствовало увеличение величины КЦР (табл. 2),

отражающей соотношение ферментов в крови и супернатанте почек, что сказывалось на уровне каталитических белков в крови цыплят (табл. 1). Аналогичные данные были получены ранее [6].

Фаза реабилитации стресс-реакции для исследуемых ферментов в супернатанте почек была очень короткой и не зарегистрирована нами в ходе эксперимента. Однако через 1 час после шуттелирования было уже установлено резкое повышение активности ЩФ, что свидетельствовало о наступлении фазы мобилизации стресс-реакции для физиологических систем, контролирующей уровень энзима в почках (табл. 1). Для ферментов переаминирования данная фаза обнаруживалась через 4 часа после действия стрессора, при этом активность АсАТ преобладала над АлАТ (коэф. де Ритиса $2,42 \pm 0,05$). Однако к 24-му часу эксперимента соотношение аминотрансфераз выровнялось (коэф. де Ритиса $1,25 \pm 0,07$), что отражало повышение роли глюконеогенеза в поддержании энергетического баланса в организме птиц. На фоне роста биосинтетической активности клеток почек увеличивался выход ферментов из органа в кровь (величина КЦР (табл. 2) снижалась для АлАТ, АсАТ, ЩФ), обеспечивая возрастание их активности в плазме крови цыплят. Результаты наших исследований согласуются с данными [1, 6].

Таким образом, характер динамики ферментов в супернатанте почек и крови отечественных цыплят в ходе развития стресс-реакции свидетельствовал, что она протекала по пути, обеспечивающему адекватную мобилизацию энергетических и пластических ресурсов организма, что соответствует представлениям об эустрессе. Следовательно, организм птиц обладал высоким адаптационным потенциалом.

В группе импортных цыплят наступление и выраженность соответствующих фаз стресс-реакции отличалась от контроля. Так, в течение 24 часов после шуттелирования состояние внутриклеточных систем, обеспечивающих активность аминотрансфераз в клетках почек, соответствовало латентной фазе стресс-реакции с критическим минимумом. При этом наименьшая активность АсАТ была установлена в конце эксперимента, а АлАТ – через 1 час после шуттелирования (табл. 1). В клетках почек в большей степени подавлялся биосинтез аланинаминотрансферазы, что сказывалось на значениях коэффициента де Ритиса. Следовательно, в организме импортных птиц резко ограничивалось использование аминокислот в процессах глюконеогенеза, что было результатом изменения проницаемости плазматических мембран, как клеток почек, так и митохондрий, о чём свидетельствовало повышение величины КЦР и изменение уровня ферментов в крови (табл. 1, 2). Логично предположить, что организм птиц обладал значительно меньшим запасом пластических и, как следствие, энергетических ресурсов, обеспечивающим его адаптацию к действию стресс-фактора. Этот вывод согласуется с данными [1], согласно которым реализация срочного этапа адаптации возможна только благодаря тем резервам организма, которые обусловлены генетически, за счёт ранее сформированных физиолого-биохимических механизмов.

Активность щелочной фосфатазы в супернатанте печени имела минимальное значение сразу после шуттелирования (табл. 1), что соответствовало латентной фазе с критическим минимумом в структуре стресс-реакции. В ходе дальнейшего эксперимента концентрация фермента постепенно увеличивалась, что можно расценивать как про-

1. Ферменты крови и супернатанта почек ($X \pm Sx$)

Показатель	Группа	До шуттелирования (фон), (n=5)	После воздействия вибрации			
			сразу (n=5)	через 1 ч (n=5)	через 4 ч (n=5)	через 24 ч (n=5)
Плазма крови						
АсАТ, мкмоль / ч·мл	I	5,91±0,21	4,99±0,13*	2,43±0,14***	7,20±0,22*	9,28±0,22**
	II	1,51±0,03	6,36±0,24***	6,95±0,31***	6,08±0,17***	5,26±0,31***
АлАТ, мкмоль / ч·мл	I	2,45±0,11	0,92±0,03***	0,83±0,05***	5,55±0,33***	7,71±0,09***
	II	0,75±0,02	9,75±0,37***	7,10±0,33***	5,88±0,24***	4,38±0,18***
Коэф. де Ритиса, усл. ед.	I	2,51±0,23	5,55±0,37***	3,03±0,25	1,33±0,09**	1,26±0,01**
	II	1,95±0,02	0,66±0,03***	1,00±0,06***	1,05±0,04***	1,21±0,08***
ЩФ, Е/л	I	2057,05±20,89	1626,00±40,15***	1143,29±57,28***	1383,60±20,06***	1562,08±23,17***
	II	1950,08±9,31	1729,49±27,59***	1015,79±11,19***	575,71±10,41***	558,98±15,72***
Супернатант почек						
АсАТ, мкмоль / ч·мл на 1 г ткани	I	126,06±2,42	90,46±2,07***	51,11±1,82***	297,11±6,22***	293,55±8,97***
	II	19,30±0,26	18,04±0,39	17,34±0,27*	9,61±0,19***	6,91±0,22***
АлАТ мкмоль / ч·мл на 1 г ткани	I	57,32±3,22	33,75±1,24***	17,39±0,63***	123,07±2,31**	233,75±2,45***
	II	16,27±0,21	4,85±0,18***	3,76±0,11***	4,27±0,07***	4,56±0,10***
Коэф. де Ритиса, усл. ед.	I	2,19±0,16	2,68±0,09*	2,94±0,24*	2,42±0,05*	1,25±0,07***
	II	1,19±0,02	3,72±0,16***	4,61±0,15***	2,25±0,07***	1,52±0,06***
ЩФ, Е/л на 1 г ткани	I	399,41±10,76	252,52±5,52***	1508,13±51,27***	4054,55±87,80***	5091,67±138,49***
	II	1790,17±25,52	434,72±7,31***	647,89±17,43***	675,96±11,78***	619,73±8,43***

Примечание: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ по сравнению с величиной «фон»

2. Коэффициент цитолитической реакции ферментов ($X \pm Sx$)

Показатель	Группа	До шуттелирования (фон), (n=5)	После воздействия вибрации			
			сразу (n=5)	через 1 ч (n=5)	через 4 ч (n=5)	через 24 ч (n=5)
Плазма крови						
КЦР(АсАТ), усл. ед.	I	46,89±2,19	55,57±2,37	47,22±1,48	24,31±0,27***	33,31±2,09**
	II	78,23±2,11	352,54±11,61***	400,81±6,56***	632,66±13,53***	761,22±41,82***
КЦР(АлАТ), усл. ед.	I	38,74±0,87	27,16±0,98***	48,00±0,41**	45,09±2,16	32,89±0,39***
	II	46,10±2,14	2010,31±153,18***	1888,29±182,09***	1377,05±46,33***	960,52±60,37***
КЦР(ЩФ), усл. ед.	I	5150,22±115,24	6439,09±54,66***	758,08±37,76***	341,24±7,21***	306,79±5,77***
	II	1089,32±35,63	3978,39±151,90***	1567,84±98,39***	851,69±38,89***	901,97±36,15***

текание фазы реабилитации. Однако и через 24 часа после шуттелирования активность ЩФ была меньше фоновой величины в 2,88 раза ($p < 0,001$). Аналогичные данные получены [3] при длительной насильственной иммобилизации крыс. Возможно, одной из причин снижения активности ЩФ в супернатанте почек было увеличение скорости выхода фермента из клеток почек в кровь за счёт повышения проницаемости плазматических мембран или уменьшения их стабильности в результате гипертрофии частей нефрона на фоне нарушения кровообращения [4]. Об этом свидетельствовала динамика значения КЦР (ЩФ) (табл. 2). Изменение проницаемости клеточных мембран при действии стрессоров различной этиологии наблюдали [10]. Однако уменьшение уровня ЩФ в супернатанте печени на фоне увеличения выхода фермента в кровь не приводило к возрастанию его активности в плазме крови цыплят (табл. 1).

Совокупность изменений активности ферментов в исследуемых биосредах импортных цыплят свидетельствовала, что клетки почек в ходе развития стресс-реакции после шуттелирования испытывали дефицит энергии за счёт недостаточного запаса белковых субстратов. Поэтому стресс-реакция по сравнению с контролем была более длительной во времени и менее активной, что характерно для организмов с низким уровнем резистентности [6]. В этих условиях достаточно высока вероятность перехода стресс-реакции в дистресс.

Выводы. Результаты наших исследований показали, что динамика изменения активности ферментов в крови и супернатанте почек отечествен-

ных цыплят после воздействия шуттелирования соответствовала классической картине развития этапа срочной адаптации в общем адаптационном синдроме. В группе импортных цыплят формирование адаптивной реакции было модифицировано, что свидетельствовало о низких адаптационных возможностях как белоксинтезирующих систем, так и организма в целом.

Литература

- Ковтутнеко А.Ю. Адаптационные реакции у кур при транс-оприровке и шумовом воздействии: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Белгород: БГСХА, 2009. 22 с.
- Плященко С.И., Сидоров В.Т. Стрессы у сельскохозяйственных животных. М.: Агропромиздат, 1987. 192 с.
- Тулик В.Д., Полина Ю. В., Уварова И.А. и др. Эффекты низкоинтенсивного электромагнитного излучения в структуре почек и надпочечников изолированно и при стрессе // Астраханский медицинский журнал. 2010. № 1. С. 282–285.
- Тулик В.Д., Родзаевская Е.Б., Уварова Н.А. и др. Гистофункциональная характеристика кортикальных и около мозговых нефронов почки при реакции на экспериментальный стресс // Известия Саратовского университета. Серия «Химия. Биология. Экология». 2013. Т. 13. Вып. 4. С. 58–65.
- Ковалев Н.Н. Холинэстеразы — биохимические маркеры механизма адаптации гидробионтов: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Владивосток: Тихоокеанский НИИ, 2003. 40 с.
- Хижнева О.А., Дерхо М.А., Серда Т.И. Ферменты крови животных, подвергнутых комбинированному воздействию сульфата кадмия и вибрации // Актуальные проблемы научной мысли: сб. статей междунар. науч.-практич. конф. 24.04.14. Уфа: Аэтерна, 2014. С. 54–57.
- Серда Т.И., Дерхо М.А. Оценка роли аминотрансфераз в формировании продуктивности у кур-несушек // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 2. С. 72–77.
- Беньковская Г.В. Стресс-реакция как механизм реализации адаптивного потенциала особей и популяции насекомых: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Новосибирск: ИСиЭЖ СО РАН, 2009. 40 с.
- Пыльник Т.О. Изменение экспрессии генов в почках крыс НИСАГ в покое и под воздействием эмоционального стресса // Студент и научно-технический прогресс: тез. докладов конф. Новосибирск: НГАУ, 2011. С. 199.
- Boya P., Kroema G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death // Oncogene. 2008. Vol. 50. № 22. P. 6434–6451.