

УДК 636.2:591.111.1

И. В. Котович¹, О. П. Позывайло², В. П. Баран³, Ю. Г. Соболева⁴, С. В. Петровский⁵

¹Кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биолого-химического образования, УО «Мозырский государственный педагогический университет им. И. П. Шамякина», г. Мозырь, Республика Беларусь

²Кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующий кафедрой биологии и экологии, УО «Мозырский государственный педагогический университет им. И. П. Шамякина», г. Мозырь, Республика Беларусь

³Кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой химии, УО «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

⁴Кандидат ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры химии, УО «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

⁵Кандидат ветеринарных наук, доцент, директор НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

ГЕПАТОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ КОРОВ-ПЕРВОТЕЛОК

Исследована активность гепатоспецифических ферментов (лактатдегидрогеназы, аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы) сыворотки крови коров-первотелок РСУП «Экспериментальная база «Криничная» Мозырского района Гомельской области. Установлено, что активность ферментов соответствует нормативным величинам для крупного рогатого скота. Наибольшая положительная корреляционная зависимость отмечена между активностью аланинаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы, средняя положительная корреляция – между активностью лактатдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы, а также между аланинаминотрансферазой и щелочной фосфатазой.

Положительная корреляция средней силы выявлена между активностью щелочной фосфатазы и уровнем альбумина, отрицательная зависимость – между активностью лактатдегидрогеназы и содержанием альбумина, активностью аспартатаминотрансферазы и общим белком, активностью гамма-глутамилтранспептидазы и альбумином сыворотки крови.

Полученные данные могут использоваться как ориентировочные величины для оценки физиологического состояния животных на разных этапах промышленной эксплуатации.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, аминотрансферазы, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтранспептидаза, сыворотка крови, коровы, первая лактация.

Введение

Одной из приоритетных задач агропромышленного комплекса Республики Беларусь на 2021–2025 годы в соответствии с Государственной программой развития аграрного бизнеса является реализация потенциала продуктивности сельскохозяйственных животных. К 2025 году планируется довести объемы производства молока по стране до 9200 тыс. тонн, в том числе в Гомельской области – до 1289 тыс. тонн [1]. В современных условиях интенсификации и специализации животноводства потенциальная продуктивность не может быть достигнута только при обеспечении потребности животных в питательных веществах и энергии. Знание биохимических и физиологических закономерностей метаболических процессов у коров и способов профилактики их нарушений приобретает особое значение. Черно-пестрая порода молочного скота имеет высокий генетический потенциал продуктивности (до 8000 кг молока за лактацию). В то же время реализуется он недостаточно (не более чем на 55 %). Причинами снижения продуктивности являются концентрация животных на ограниченных площадях, дефицит полноценных кормов и несбалансированность их по питательным компонентам, нарушения обмена веществ, патологии различных органов, включая печень [2]–[5].

Печень является центром химического превращения веществ, поступающих из желудочно-кишечного тракта, и выполняет разнообразные функции, связанные с обеспечением обмена

углеводов, липидов, белков, нуклеиновых кислот. В гепатоцитах происходят глюконеогенез, синтез и распад гликогена, образование жирных кислот, холестерина, желчных кислот, кетонных тел, синтез белков крови. В печени также осуществляется метаболизм гормонов, детоксикация экзо- и эндогенных токсинов [6].

Большое разнообразие функций печени, множественность возможных патологий затрудняют выбор диагностических показателей при заболевании данного органа. Доминирующее значение в функциональной диагностике состояния печени имеет определение активности ферментов. При разных патологических процессах ферменты, локализующиеся в гепатоцитах, элиминируются в кровь [7]–[9].

Высокая специфичность ферментов позволяет использовать их в доклинический период заболеваний для выявления нарушений метаболизма, объективной оценки состояния организма животных на разных этапах их промышленной эксплуатации и своевременного проведения необходимых лечебно-профилактических мероприятий [7], [10]–[13].

Учитывая тесную взаимосвязь между печенью и системой крови, уточнение особенностей сывороточных биохимических нарушений при различного рода гепатопатиях у продуктивных животных (в том числе у крупного рогатого скота), представляет большой интерес для прикладной биологии [14], [15].

Целью наших исследований явилось определение активности гепатоспецифических ферментов сыворотки крови коров-первотелок.

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1) определить активность лактатдегидрогеназы, трансаминаз, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы сыворотки крови коров-первотелок;
- 2) провести анализ корреляционной зависимости между активностью вышеуказанных ферментов, а также между активностью ферментов и содержанием общего белка и сывороточного альбумина.

Материал и методы исследования

Для решения вышеуказанных задач были отобраны коровы-первотелки (10 голов) чернопестрой породы Республиканского сельскохозяйственного унитарного предприятия (РСУП) «Экспериментальная база «Криничная» Мозырского района Гомельской области живой массой 450–500 кг. Кровь от животных брали из яремной вены утром до кормления с соблюдением правил асептики и антисептики в стерильные пробирки.

Биохимические исследования крови проводились в лаборатории кафедры химии учреждения образования «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины» и в научно-исследовательской лаборатории «Экология животных и биомониторинг» технолого-биологического факультета учреждения образования «Мозырский государственный педагогический университет имени И. П. Шамякина».

Активность ферментов определяли на спектрофотометре «Solar PB 2201» с использованием наборов фирм «Spinreact» (Испания) – для лактатдегидрогеназы (ЛДГ); АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Российская Федерация) – для аспартатаминотрансферазы (АсТ), аланинаминотрансферазы (АлТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП).

Лактатдегидрогеназную и аминотрансферазную активность определяли кинетическим методом по убыли в реакционной смеси НАДН(H^+), которую регистрировали на спектрофотометре при длине волны 340 нм.

В основе определения активности щелочной фосфатазы лежит унифицированный метод с образованием п-нитрофенола при гидролизе п-нитрофенилфосфата в глициновом буфере (рН = 10,4). Содержание п-нитрофенола устанавливали по приросту оптической плотности инкубационной смеси при 405 нм.

Определение активности гамма-глутамилтрансферазы (ГГТФ) проводили по реакции взаимодействия L-γ – глутамил-3-карбоксии-п-нитроанилида и глицил-глицина с образованием окрашенного 5-амино-2-нитробензоата, который определяли по изменению оптической плотности при 405 нм.

В международной системе единиц ферментативную активность выражают в каталах, а комиссией по ферментам рекомендована международная единица, поэтому мы рассчитали энзиматическую активность исследованных ферментов в единицах (Е/л) и в нанокаталах (нкат/л) на литр сыворотки крови.

Для более полной характеристики гепатоспецифического профиля сыворотки крови рассчитывали:

– соотношение активности трансаминаз (коэффициент де Ритиса);
 – корреляционные связи между активностью исследованных ферментов, а также между активностью ферментов и уровнем общего белка и альбумина, содержание которых определялось с использованием фотоэлектроколориметра КФК-3 и наборов АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Российская Федерация) и НТПК «Анализ-Х» (Республика Беларусь).

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с использованием программ «Microsoft Excel» и «Statistica».

Результаты исследования и их обсуждение

Высокая молочная продуктивность коров-первотелок свидетельствует о напряженности биохимических процессов и предполагает высокую нагрузку на ряд систем и органов, включая печень. Мониторинг гепатоспецифических энзимов сыворотки крови позволяет достаточно объективно оценить функциональное состояние печени и при необходимости вносить коррективы в лечебно-профилактические мероприятия.

Среди гепатоспецифических ферментов в практике биохимической лабораторной диагностики наиболее часто определяют активность лактатдегидрогеназы (L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27), аспартатаминотрансферазы (L-аспартат: 2-оксоглутаратаминотрансфераза; КФ 2.6.1.1), аланинаминотрансферазы (L-аланин: 2-оксоглутаратаминотрансфераза, КФ 2.6.1.2), гамма-глутамилтранспептидазы (γ -глутамил-пептид: аминокислота; КФ 2.3.2.2), щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) [7]–[16].

Приводимые в литературе данные по указанным ферментам у животных чаще всего носят обобщенный характер, не учитывают возраст, направление и уровень продуктивности животных. В связи с этим мы определили активность гепатоспецифических энзимов сыворотки крови коров-первотелок (таблица 1).

Таблица 1. – Активность гепатоспецифических энзимов, содержание общего белка и альбумина сыворотки крови коров-первотелок черно-пестрой породы

Исследованные показатели	Единицы измерения	Min–Max	M \pm σ	Норма
Лактатдегидрогеназа	Е/л	270,88–879,11	481,42 \pm 180,172	119,00–1445,00
	нкат/л	4515,57–14654,76	8025,27 \pm 3003,473	1983,73–24088,15
Аспартат-аминотрансфераза	Е/л	69,84–92,54	79,09 \pm 7,982	11,00–160,00
	нкат/л	1164,23–1542,64	1318,50 \pm 133,051	183,37–2667,20
Аланин-аминотрансфераза	Е/л	8,73–20,95	14,14 \pm 4,069	1,30–60,00
	нкат/л	145,53–349,24	235,77 \pm 67,835	21,67–1000,20
АсТ : АлТ (коэффициент де Ритиса)		3,42–8,66	6,05 \pm 1,857	не нормируется
Гамма-глутамил-транспептидаза	Е/л	8,88–15,05	12,04 \pm 2,056	до 39,00
	нкат/л	148,03–250,88	200,74 \pm 34,277	до 650,13
Щелочная фосфатаза	Е/л	13,42–48,37	26,06 \pm 12,944	до 164,00
	нкат/л	223,71–806,33	434,39 \pm 215,771	до 2733,88
Общий белок	г/л	66,07–74,76	70,22 \pm 3,373	72,00–90,00
Сывороточный альбумин	г/л	31,10–42,76	38,38 \pm 3,227	18,00–46,00

Среди исследованных гепатоспецифических энзимов сыворотки крови наибольшей активностью обладает лактатдегидрогеназа, далее в убывающем порядке идут аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза и гамма-глутамилтрансфераза.

Лактатдегидрогеназа обеспечивает катализ обратимой реакции превращения пировиноградной кислоты в L-молочную.

Аминотрансферазы участвуют в организме животных в реакциях трансаминирования, играющих амфиболическую роль: с одной стороны, данные процессы являются первым этапом в катаболизме аминокислот, а с другой – обеспечивают синтез ряда заменимых аминокислот.

Лактатдегидрогеназа и трансаминазы являются индикаторными ферментами [17], [18].

Щелочная фосфатаза обеспечивает гидролиз сложных эфиров, содержащих фосфорную кислоту. Данный фермент относится к группе экскреторных энзимов. Он локализуется в плазматической мембране гепатоцитов и в клетках желчных канальцев, при закупорке которых выходит в кровь и является одним из индикаторов холестаза [13].

Гамма-глутамилтранспептидаза, называемая также гамма-глутамилтрансферазой, катализирует реакцию переноса γ -глутамильного остатка с γ -глутамилпептидов на аминокислоты или пептиды с образованием новых γ -глутамилпептидов и является одним из наиболее чувствительных скрининговых тестов на заболевания печени [7].

В наших исследованиях активность всех ферментов оказалась в пределах нормы [11]. Это свидетельствует о том, что со стороны печени у коров-первотелок нет патологических изменений. Подтверждает данное заключение и достаточно высокий уровень сывороточного альбумина, синтез которого происходит в печени. Альбумин участвует в транспорте ряда соединений в плазме крови, обеспечивает постоянство pH, регулирует онкотическое давление, является быстро реализуемым резервом белка. В то же время у 60 % исследованных животных обнаружено пониженное содержание общего белка сыворотки крови, что предполагает дальнейший мониторинг биохимических показателей, дающих оценку функционального состояния печени.

Определено соотношение активности трансаминаз, известное как коэффициент де Ритиса. Данный показатель часто используют для дифференциальной диагностики различных патологий организма животных. Повышенные значения показателя свидетельствуют о патологии миокарда, а низкие – о заболеваниях печени [12], [19]. Поскольку по соотношению активности АсТ:АлТ нет нормативных показателей, определенные нами значения (3,42–8,66) могут быть использованы в комплексе с другими биохимическими показателями как ориентировочные величины в оценке функционального состояния печени.

Нами также были рассчитаны корреляционные связи между исследованными ферментами (таблица 2).

Таблица 2. – Корреляции между показателями активности ферментов сыворотки крови коров-первотелок

Показатели	Коэффициент корреляции (r)
Лактатдегидрогеназа – аспаратаминотрансфераза	0,26
Лактатдегидрогеназа – аланинаминотрансфераза	0,41
Лактатдегидрогеназа – щелочная фосфатаза	-0,22
Лактатдегидрогеназа – гамма-глутамилтранспептидаза	0,20
Аспаратаминотрансфераза – аланинаминотрансфераза	-0,34
Аспаратаминотрансфераза – щелочная фосфатаза	-0,33
Аспаратаминотрансфераза – гамма-глутамилтранспептидаза	0,10
Аланинаминотрансфераза – щелочная фосфатаза	0,35
Аланинаминотрансфераза – гамма-глутамилтранспептидаза	0,78
Щелочная фосфатаза – гамма-глутамилтранспептидаза	0,01

Наибольшая корреляционная зависимость высокой силы была зарегистрирована между активностью АлТ и ГГТП. Средняя положительная корреляция установлена между активностью ЛДГ и АлТ, АлТ и ЩФ; отрицательная – между активностью АсТ и АлТ, а также АсТ и ЩФ.

С учетом того, что большинство белков крови синтезируется в печени, мы также рассчитали корреляционную зависимость между активностью исследованных ферментов и содержанием общего белка и альбуминов сыворотки крови (таблица 3).

Таблица 3. – Корреляции между показателями активности ферментов и содержанием общего белка и альбуминов сыворотки крови коров-первотелок

Показатели	Коэффициент корреляции (r)
Лактатдегидрогеназа – общий белок	0,22
Лактатдегидрогеназа – альбумин	-0,57
Аспаратаминотрансфераза – общий белок	-0,57
Аспаратаминотрансфераза – альбумин	-0,20
Аланинаминотрансфераза – общий белок	0,24
Аланинаминотрансфераза – альбумин	0,05
Щелочная фосфатаза – общий белок	0,20
Щелочная фосфатаза – альбумин	0,50
Гамма-глутамилтранспептидаза – общий белок	-0,06
Гамма-глутамилтранспептидаза – альбумин	-0,42

Положительная зависимость средней силы зарегистрирована между активностью щелочной фосфатазы и содержанием альбуминов, отрицательная корреляция такой же силы – между активностью ЛДГ и уровнем альбуминов, активностью АсТ и общим белком, активностью ГГТП и концентрацией альбумина сыворотки крови. В остальных случаях показатели корреляции имели низкие величины.

Заклучение

На основании проведенных исследований можно сделать следующие *выводы*:

1. В результате мониторинга активности лактатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы сформирован гепатоспецифический энзиматический профиль сыворотки крови коров-первотелок РСУП «Экспериментальная база «Криничная» Мозырского района Гомельской области. Активность указанных ферментов соответствовала нормативным критериям.

2. Рассчитаны корреляционные связи между активностью указанных ферментов, а также между активностью ферментов и уровнем общего белка и альбумина сыворотки крови. Наибольшая зависимость высокой силы установлена между активностью аланинаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы. Средняя положительная корреляция выявлена между активностью лактатдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы, а также в паре аланинаминотрансфераза – щелочная фосфатаза. Отрицательная корреляция средней силы отмечается между активностью трансаминаз, а также между активностью аспартатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы.

Положительная зависимость средней силы зарегистрирована между активностью щелочной фосфатазы и содержанием альбумина, отрицательная корреляция такой же силы – между активностью лактатдегидрогеназы и уровнем альбумина, активностью аспартатаминотрансферазы и общим белком, активностью гамма-глутамилтранспептидазы и концентрацией альбумина сыворотки крови.

3. Показатели активности лактатдегидрогеназы, трансаминаз, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы в комплексе с другими биохимическими показателями могут быть использованы для мониторинга физиологического состояния коров-первотелок молочного направления продуктивности.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Государственная программа развития аграрного бизнеса в Республике Беларусь на 2021–2025 годы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.mshp.gov.by>. – Дата доступа: 10.02.2022.

2. Коваленок, Ю. К. Совершенствование способов лечения и профилактики микроэлементозов продуктивных животных / Ю. К. Коваленок // Ученые записки Витебской ордена «Знак Почета» гос. акад. ветеринар. медицины. – 2007. – Т. 43, вып. 1. – С. 105–108.

3. Ковзов, В. В. Диагностика нарушений обмена веществ у высокопродуктивных коров / В. В. Ковзов // Ученые записки Витебской ордена «Знак Почета» гос. акад. ветеринар. медицины. – 2007. – Т. 43, вып. 1. – С. 109–111.

4. Разумовский, Н. П. Высокопродуктивные коровы: обмен веществ и полноценное кормление : практическое пособие для ветеринарных врачей, зооинженеров, студентов факультета ветеринарной медицины, зооинженерного факультета и слушателей ФПК / Н. П. Разумовский, В. В. Ковзов, И. Я. Пахомов. – Витебск : УО ВГАВМ, 2007. – 290 с.

5. Никанов, А. Ю. Биохимические и экологические аспекты формирования продуктивного здоровья первотелок и получения молока с высокими биологическими и гигиеническими свойствами : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.04 / А. Ю. Никанов ; Всерос. НИИ животноводства им. акад. К. Э. Эрнста. – Дубровицы, 2015. – 22 с.

6. Маршалл, В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл ; пер. с англ. ; под ред. Н. И. Новикова. – М. – СПб. : «БИНОМ» – «Невский диалект», 2000. – 368 с.

7. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики : справочник / И. П. Кондрахин [и др.] ; под ред. проф. И. П. Кондрахина. – М. : КолосС, 2004. – 520 с.

8. Титов, В. Н. Патологические основы лабораторной диагностики заболеваний печени / В. Н. Титов // Клинич. лаб. диагностика. – 1996. – № 1. – С. 3–9.

9. Тишківський, М. Я. Ферментативна функція печінки у корів, хворих на алиментарну дистрофію / М. Я. Тишківський, В. І. Головаха // Вісник Білоцерківського держ. аграр. ун-ту : зб. наук. праць. – Біла Церква, 1997. – Вип. 3, ч. 1. – С. 155.

10. Беляков, И. М. Функционально-метаболический статус и его коррекция при острой печеночной недостаточности у животных : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.02 / И. М. Беляков ; Моск. гос. ун-т прикладной биотехнологии. – М., 2000. – 50 с.

11. Нормативные требования к показателям обмена веществ у животных при проведении биохимических исследований крови / С. В. Петровский [и др.]. – 2-е изд., стереотип. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 68 с.

12. Холод, В. М. Справочник по ветеринарной биохимии / В. М. Холод, Г. Ф. Ермолаев. – Минск : Ураджай, 1988. – 168 с.

13. Хвостова, О. В. Биохимические показатели крови при различных функциональных состояниях печени у крупного рогатого скота / О. В. Хвостова // Вестник ВГМУ. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 23–28.

14. Соболева, Ю. Г. Гепатоспецифический метаболический профиль сыворотки крови крупного рогатого скота при фасциолезной инвазии / Ю. Г. Соболева // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2009. – Т. 45, ч. 1, вып. 2. – С. 257–260.

15. Холод, В. М. Рекомендации по использованию в диагностике патологии печени гепатоспецифического метаболического профиля сыворотки крови крупного рогатого скота : утв. ГУВ МСХиП РБ 21.03.2008 г. / В. М. Холод, Ю. Г. Соболева. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 31 с.

16. Номенклатура ферментов. Рекомендации (1972 г.) Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов. – М., 1979. – 320 с.

17. Камышников, В. С. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников. – М. : МедПресс-Информ, 2015. – 736 с.

18. Комаров, Ф. И. Биохимические исследования в клинике / Ф. И. Комаров, Б. Ф. Коровкин, В. В. Меньшиков. – Элиста : АПП «Джангар», 1999. – 250 с.

19. Особенности белкового обмена у коров-первотелок в различные периоды лактации в условиях промышленного производства молока / О. П. Позывайло [и др.] // Весн. Мазыр. дзярж. пед. ун-та. – 2012. – № 3 (36). – С. 45–49.

Поступила в редакцию 22.02.2022

E-mail: ivkotovich@mail.ru; oppozyvailo@mail.ru;

I. V. Kotovich, O. P. Pozyvailo, V. P. Baran, Yu. G. Soboleva, S. V. Petrovsky

HEPATOSPECIFIC ENZYMATIC PROFILE OF FIRST-CALF COWS' BLOOD SERUM

The activity of hepatospecific enzymes (lactate dehydrogenase, aminotransferases, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transpeptidase) in the blood serum of first-calf cows of the Republican Agricultural Unitary Enterprise "Experimental base "Krinichnaya", Gomel region, was studied. It has been established that the activity of enzymes corresponds to the normative values for cattle. The highest positive correlation was noted between the activity of alanine aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase, the average positive correlation was between the activity of lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase, as well as between alanine aminotransferase and alkaline phosphatase.

A positive moderate correlation was found between the activity of alkaline phosphatase and the level of albumins, a negative relationship was revealed between the activity of lactate dehydrogenase and the content of albumin, the activity of aspartate aminotransferase and total protein, the activity of gamma-glutamyl transpeptidase and blood serum albumin.

The data obtained can be used as approximate values for assessing the physiological state of animals at different stages of industrial operation.

Keywords: lactate dehydrogenase, aminotransferases, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transpeptidase, blood serum, cows, first lactation.