

Ветеринария

УДК 577.1:636.3.033

<https://doi.org/10.31857/S2500-26272019256-59>

АТФазная АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ И МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ОВЕЦ

Е.Ю. Федорова¹, В.И. Максимов², доктора биологических наук,
О.В. Смоленкова³, кандидат биологических наук.

¹Московский городской педагогический университет, 129226, Москва, 2-й сельскохозяйственный проезд, 4
²Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина,
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

³Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И.И. Иванова,
305021, Курск, ул. Карла Маркса, 70
E-mail: elefedor@yandex.ru

Цель проведенных исследований – установление особенностей функционирования АТФазных ферментных систем крови и длиннейшей мышцы спины овец двух пород разных возрастов. Объект исследования – отобранные по принципу аналогов ягнята и валухи породы тексель и куйбышевская, условия кормления и содержания которых соответствовали действующим нормативам, разработанным ВИЖ. Установлено, что активность Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} - и Na^+ , K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов ягнят детерминирована возрастом с высокой степенью достоверности ($P < 0,001$) на 99,45; 99,41 и 98,46 % соответственно; активность Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} - и Na^+ , K^+ -АТФазы длиннейшей мышцы спины валухов – соответственно на 81,09, 85,16 и 83,21%. Проведенный авторами корреляционный анализ доказал влияние возраста на АТФазную активность мембраны эритроцитов и длиннейшей мышцы спины. В случае эритроцитов корреляция отрицательная, а в случае мышечной ткани – положительная. Достоверного влияния породной принадлежности животных на активность Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} - и Na^+ , K^+ -АТФаз мембраны эритроцитов и мышечной ткани овец не выявлено.

ATPASE THE ACTIVITY OF RED BLOOD CELLS AND MUSCLE TISSUE OF SHEEP

Fedorova E.Yu¹, Maksimov V.I.², Smolenkova O.V.³

¹Moskovskiy gorodskoy pedagogicheskiy universitet, 129226, Moskva, 2- y sel'skokhozyaystvennyy proezd, 4
²Moskovskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny i biotekhnologii – MVA imeni K.I. Skryabina,
109472, Moskva, ul. Akademika Skryabina, 23

³Kurskaya gosudarstvennaya sel'skokozyajstvennaya akademiya imeni I.I. Ivanova,
305021, Kursk, ul. Karla Marksa, 70
E-mail: elefedor@yandex.ru

The aim of the research was to establish the functioning of the ATPase enzyme systems of the blood and the longest back muscle of sheep of various breeds and ages. The object of the study was selected according to the principle of analogs of lambs and valukha of Texel and Kuibyshev breed, the feeding conditions and content of which corresponded to the current standards developed by the survival permit. It was established that the activity of Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} - and Na^+ , K^+ -ATPases in the membrane of erythrocytes of lambs is determined by age with a high degree of confidence ($P < 0.001$), respectively, at 99.45; 99.41 and 98.46%; the activity of Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} - and Na^+ , K^+ -ATPases of the longest back muscle of the valuch, respectively, by 81.09%; 85.16 and 83.21%. The correlation analysis carried out by the authors proved the effect on the ATPase activity of the erythrocyte membrane and the longest back muscle age; moreover, in the case of erythrocytes, the correlation is negative, in the case of muscle tissue, it is positive. No significant influence of animal species on the activity of Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} - and Na^+ , K^+ -ATPases of the erythrocyte membrane and sheep muscle was not found.

Ключевые слова: Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФаза, Mg^{2+} -АТФаза, Na^+ , K^+ -АТФаза, овцы, кровь, эритроциты, длиннейшая мышца спины, мышечная ткань

Key words: Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, Na^+ , K^+ -ATPase, sheep, blood, red blood cells, the longest back muscle, muscle tissue

В настоящее время очевидной становится важная и многообразная роль ферментов среди различных факторов, участвующих в регуляции и интеграции процессов развития и жизненных отправлениях организма. На механизмах, основу которых составляют ферментные системы, базируется раскрытие путей реализации наследственной информации, регуляции роста и развития, гомеостаза. В частности, характерные периоды более быстрого и замедленного роста и развития

органов и организма в целом в определенной степени связаны с активностью ферментных систем [1-6].

За последние годы накоплено большое количество сведений по изучению транспорта ионов и функционированию Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ -АТФаз. Установлено, что АТФазная активность изменяется с учетом возраста, породной и видовой принадлежности, периодов репродуктивной деятельности, условий кормления животных, соотношения ионов натрия и калия, присут-

ствия специфического ингибитора – оуабаина [7,8], что нашло подтверждение в наших более ранних исследованиях [9,10]. Дальнейшее изучение активности АТФазных ферментных систем крови и тканей различных видов сельскохозяйственных животных позволит шире раскрыть биохимические процессы в организме не только в норме, но и при развитии патологических процессов, в связи с чем проведенные исследования являются актуальными.

Цель работы – установление особенностей функционирования АТФазных ферментных систем крови и длиннейшей мышцы спины овец различных пород и возрастов.

Методика. Для достижения поставленной цели работу с экспериментальными животными выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 7550) и Хельсинской Декларацией 2000 г. Объектом исследования были: ягнята и валухи пород тексель и куйбышевской (n=50). Подбор животных для исследований проводили по принципу аналогов. Все животные находились в одинаковых условиях кормления и содержания, которые соответствовали действующим нормативам, разработанным ВИЖ.

Кровь для исследований отбирали из яремной вены, в качестве антикоагулянта применяли гепарин, который добавляли к пробам из расчета 4-6 единиц на 1 мл крови. Гепаринизированную кровь сразу же помещали в термос со льдом и через 15-20 минут доставляли в лабораторию, где проводили анализы. Материал для исследований длиннейшей мышцы спины отбирали сразу после убоя от 5 валухов в возрасте 8 мес и от 10 голов в возрасте 18 мес. Для изучения АТФазной активности мембраны структурных компонентов мышечной ткани из середины мышечного брюшка из длиннейшей мышцы спины вырезали кусочки размером 1,0×0,5 см и пропускали их через мясорубку.

Выделение мембран эритроцитов проводили гемализом эритроцитарной массы в 0,4 М трис HCl с осаждением мембран центрифугированием при 15 000 мин⁻¹ [11]. АТФазную активность мембран эритроцитов определяли по Keeton K.S. [12], при этом активность общей АТФазы определяли в среде, содержащей 150 mM NaCl; 5,0 mM KCl; 25 mM трис-HCl (pH 8,0), 3 mM Na₂ATФ, 3 mM MgCl₂, пробы инкубировали в течение 45 мин при температуре 37°C. Реакцию прекращали путем добавления 1,8 мл 6%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали при 0°C и в надосадочной жидкости определяли содержание неорганического фосфора. При определении Mg²⁺-АТФазы, то есть оуабаинчувствительной АТФазы в субстратную среду вводили 10⁻⁴ М оуабаина (строфантинaG), который подавлял активность Na⁺, K⁺-АТФазы. Определение АТФазной активности длиннейшей мышцы спины валухов породы тексель и куйбы-

Табл.1. Возрастная динамика содержания мембранного белка в эритроцитах овец

Показатель	Ягнята новорожденные	Ягнята в возрасте 20 суток	Ягнята в возрасте 105 суток	Валухи в возрасте 8 мес.	Валухи в возрасте 18 мес.
Тексель					
Содержание белка, мг	2,330±0,019*	2,248±0,016*	2,154±0,012*	2,110±0,009*	2,089±0,011*
Куйбышевская					
Содержание белка, мг	2,248±0,018	2,113±0,008	2,086±0,016	2,032±0,008	2,026±0,008
*P<0,05 по сравнению с куйбышевской породой					

шевская проводили по методике, представленной в работе [13] при соотношении субстратной среды и гомогената ткани 1:0,01; при этом, состав инкубационной среды включал 5 mM MgCl₂; 5 mM Na₂ATФ; 5 mM трис-буфер; 115 mM NaCl; 20 mM KCl; pH среды 7,5.

Статистическую обработку выполняли программным обеспечением MS Excel 2003 и Statistica 10 («StatSoftInc.», США). Приведены средние арифметические значения параметров (M) и их доверительные интервалы (±SEM) при 95 % уровне вероятности по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Исследованиями установлено, что возрастная динамика содержания белка в мембране эритроцитов овец пород тексель и куйбышевской имеет достоверные (P<0,05) межпородные различия (табл. 1).

Содержание мембранного белка в эритроцитах животных породы тексель было выше во всех возрастных группах: у новорожденных – на 3,65%; 20-ти суточных – на 6,39, 105-ти суточных – на 3,26, 3,8 и 3,11% у 8- и 18-месячных валухов – соответственно. Отмечено, что с возрастом содержание белка в мембранах эритроцитов обеих пород достоверно (P<0,001) снижалось в группе куйбышевской породы на 9,88 %, тексель – на 10,34 %.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что возраст достоверно (P<0,001) детерминирует содержание мембранного белка в эритроцитах на 78,31 %, породная принадлежность – на 21,13 % с достаточно высокой степенью достоверности (P<0,05); совместного влияния факторов не выявлено.

Определено достоверное (P<0,001) возрастное снижение активности Mg²⁺, Na⁺, K⁺-АТФазы (общей АТФазы), Mg²⁺-АТФазы и Na⁺, K⁺-АТФазы мембраны эритроцитов ягнят как породы тексель, так и куйбышевской, что обусловлено конформационными особенностями мембранных белков эритроцитов (табл. 2).

Корреляционный анализ достоверно (P<0,001) доказал полученную взаимосвязь АТФазной активности мембраны эритроцитов овец и возраста животных, при этом наиболее сильно выраженная корреляция отмечена в случае активности Mg²⁺-АТФазы мембраны эритроцитов овец обеих пород (коэффициент корреляции в группе овец породы тексель составил 0,979, в группе овец куйбышевской породы – 0,957); наименее – в случае активности Na⁺, K⁺-АТФазы (коэффициент корреляции в группе овец породы тексель составил 0,958, в группе овец куйбышевской – 0,940).

Табл. 2. Возрастная динамика активности АТФазы мембраны эритроцитов овец

Возраст	Активность АТФазы, нмольФн/мг белка/мин		
	Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ , K ⁺
Тексель			
Ягнята новорожденные:	15,565±0,143*	8,835±0,002	6,730±0,124
20 сут	9,808±0,032*	6,046±0,017	3,762±0,0541
105 сут	2,507±0,082	1,430±0,013	1,078±0,036
Валухи в возрасте:	2,009±0,091	1,042±0,010	0,967±0,016
8 мес			
18 мес	1,982±0,082	1,019±0,013	0,963±0,036
Куйбышевская			
Ягнята новорожденные:	14,909±0,0315	8,729±0,003	6,181±0,047
20 сут	8,921±0,029	5,342±0,044	3,579±0,075
105 сут	2,184±0,007	1,281±0,006	0,903±0,019
Валухи в возрасте	1,998±0,081	1,039±0,010	0,959±0,009
8 мес			
18 мес	1,851±0,079	1,008±0,013	0,843±0,008

*P<0,05- по сравнению с куйбышевской породой.

Табл. 3. Возрастная динамика активности АТФаз мембран структурных компонентов длиннейшей мышцы спины валухов

Возраст, мес	Активность АТФазы, нмольФн/мг белка в мин		
	Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ , K ⁺
Тексель			
8	42,31±3,32	22,49±2,46	19,82±2,99
18	47,12 ± 3,90	25,08 ± 2,12	22,04 ± 2,09
Куйбышевская			
8	40,09±3,14	21,85±2,09	18, 24±2,32
18	45,98 ± 3,56	24,28 ± 2,45	21,70 ± 2,11

С целью установления силы влияния возраста и породы овец на АТФазную активность мембраны эритроцитов был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, который показал, что возраст достоверно (P<0,001) детерминировал активность Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺- и Na⁺, K⁺-АТФазы мембраны эритроцитов овец соответственно на 99,45, 99,41 и 98,46 %. Влияния породной принадлежности овец, совместного влияния факторов на активность всех исследованных АТФаз мембраны эритроцитов не выявлено.

Полученные авторами данные согласуются с предыдущими исследованиями [16], а также имеющимися литературными данными [17-19]. Очевидно, что в процессе постнатального развития животных происходит постепенная замена эритроцитов с высокой активностью АТФаз на клетки с более низкой активностью данного фермента, вследствие чего к 105 – суточному возрасту показатель АТФазной активности мембраны эритроцитов ягнят приближается к уровню валухов 8 и 18 месячного возраста.

Результаты исследований АТФазной активности мембран структурных компонентов длиннейшей мышцы спины валухов свидетельствуют о ее достоверном (P<0,01) возрастном повышении как в группе животных породы тексель, так и куйбышевской породы (табл. 3).

Отмеченное возрастное повышение активности всех исследованных АТФаз мембран структурных компонентов мышечной ткани животных породы тексель находится примерно на одном уровне и составляет 11,2-11,51 %. У животных куйбышевской породы возрастные изменения активности отдельных АТФаз мышечной ткани более неоднородны. Так, в случае Mg²⁺, Na⁺, K⁺-АТФазы возрастное повышение активности составило 14, 69 %, в случае Mg²⁺-АТФазы – 11,10% и в случае Na⁺, K⁺-АТФазы – 18,97 %.

Двухфакторный дисперсионный анализ с независимыми факторами «возраст» и «породная принадлежность» животных показал, что активность Mg²⁺, Na⁺, K⁺-АТФазы длиннейшей мышцы спины валухов достоверно (P<0,001) детерминирована возрастом животных на 76,21%; активность Mg²⁺-АТФазы – на 78,42%, активность Na⁺, K⁺-АТФазы – на 77,12 %. Достоверного влияния породы валухов на активность всех исследованных АТФаз длиннейшей мышцы спины не выявлено.

Приведенные показатели возрастной динамики АТФазной активности мембран структурных компонентов длиннейшей мышцы спины валухов породы тексель и куйбышевская согласуются с имеющимися в литературе данными [20,21], характеризующими возрастные и породные особенности обменных процессов в организме овец. Очевидно, что овцы породы тексель отличаются более высоким генетическим потенциалом и адаптационными возможностями по сравнению с куйбышевской и превосходят их по таким показателям, как среднесуточный прирост живой массы, убойный выход, содержание жира в мышечной ткани и мраморность мяса [23]. Возрастное повышение АТФазной активности мышечной ткани валухов в возрасте физиологической зрелости (18 мес) как породы тексель, так и куйбышевской характеризует завершение формирования организма, приобретение экстерьера и 65-70% живой массы, присущим взрослым животным.

Таким образом, в результате биохимических исследований установлено, что возрастное снижение АТФазной активности мембраны эритроцитов ягнят обеих пород, по-видимому, обусловлено конформационными особенностями белков мембранного компонента эритроцитов. Отмеченное повышение АТФазной активности мембран структурных компонентов длиннейшей мышцы спины валухов обеих пород является критерием физиологической зрелости организма и согласуется с имеющимися в литературе данными. Результатами корреляционного и дисперсионного анализов доказано достоверное влияние на АТФазную активность крови ягнят и мембран структурных компонентов длиннейшей мышцы спины валухов возрастных особенностей, что говорит об определенных различиях в функционировании АТФазных транспортных ионных насосов, локализованных в мембране эритроцитов и мембранах структурных компонентов мышечной ткани. Достоверного влияния породной принадлежности овец на активность АТФаз крови и мышечной ткани не выявлено.

Литература.

1. Skou J.C. The Na, K-ATPase. // *J. Bioenerg. And Biomemb.* – 1992. – V. 24. – P. 249–261.
2. Schiener-Bobis G. Action of palytoxin on apical H⁺/K⁺-ATPase in rat colon // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – V. 269. – P. 3905–3911.
3. Jorgensen P.L. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: Functional sites and their interactions // *Annu. Rev. Physiol.* – 2003. – V. 65. – P. 17–49.
4. Рубцов А.М. Ca²⁺-АТФаза саркоплазматического ретикулума: молекулярная организация, механизм функционирования и особенности регуляции активности // *Успехи биологической химии.* – 2005. – № 45. – С. 235–268.
5. Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на активность Na, K-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии и реперфузии // *Известия Самарского науч. центра РАН.* – 2011. – №. – 13 (1). – С. 260–263.
6. Болдырев А.А. Na⁺, K⁺-АТФаза солевых желез утки // *Биохимия.* – 1981. – № 46 (8). – С. 24–29.
7. Дубровский В.Н., Кыров Д.Н., Силиванова Е.А. Активность Na, K-АТФазы и ацетилхолинэстеразы в надпочечниках и различных регионах головного мозга // Приложение к журналу *Вестник молодых ученых (Серия "Науки о жизни")*, 2005. С. 36.
8. Кривой И.И. Экстракт почек свиньи содержит специфический ингибитор оубаин-чувствительной изоформы Na⁺, K⁺-АТФазы мышечных волокон диафрагмы крысы // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, 2003. № 89 (11). С. 1340–1351.
9. Федорова Е.Ю., Максимов В.И. Породные особенности функционирования АТФазных ферментных систем эритроцитов и молока коров // *Вестник Россельхозакадемии.* – 2012. – № 4. – С. 77–79.
10. Федорова Е.Ю. Особенности функционирования АТФаз крови и молока различных видов сельскохозяйственных животных // *Вестник Курской ГСХА*, 2015 – № 8. – С. 181–184.
11. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan. D.J. The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes *Arch/Biochem. Biophys.*, 1962. – V. – 201. – P. 119–130.
12. Keeton K.S. Characterization of adenosinetriphosphatase in erythrocyte membrane of the cow // *Proc. soc. exp. biol. and med*, 1972. Vol. 1. P. 140.
13. Рыжкова Г.Ф. Активность транспортных АТФаз и межклеточный обмен электролитов у сельскохозяйственных животных в норме и при включении в рацион биологически активных веществ: дис. докт. биол. Наук, 2004. – Курск, 2005. – 333 с.
14. Суворова В.Н., Федорова Е.Ю., Максимов В.И. Особенности функционирования АТФаз овец // *Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM.* 2016. – Том 2. – С. 195–196.
15. Рыжкова Г.Ф. Активность транспортных АТФаз и межклеточный обмен электролитов у сельскохозяйственных животных в норме и при включении в рацион биологически активных веществ // *Вестник Курской ГСХА.* – 2015. – № 9. – С. 88–94.
16. Рыжкова Г.Ф., Лебедева Н.В. АТФазная активность, распределение натрия и калия в тканях свиноматок и поросят-сосунов // *Вестник Курской ГСХА.* – 2012. – № 6. – С. 76–78.
17. Мосягин В.В., Жеребилов Н.И., Максимов В.И., Мосягина И.П., Фурман Ю.В. Биохимия и физиология активного транспорта в организме животных. Монография – М.: Перо, 2018. – 264 с.
18. Никитченко Д.В. Химический и аминокислотный состав мышц валухов куйбышевской породы при разных уровнях кормления // *Вестник РУДН, сер. Агронмия и животноводство.* – 2007. – № 3. – С. 76–80.
19. Никитченко Д.В. Химический и аминокислотный состав мышц баранов в типе тексель // *Вестник РУДН, сер. Агронмия и животноводство.* – 2007. – № 1–2. – С. 43–47.
20. Откормочные и мясные качества овец куйбышевской породы и ее помесей с баранами северокавказская-тексель и ромни-маршетема диссертации и автореферата по ВАК, 2004.
21. Геращенко Леонид Васильевич. Продуктивность, биологические особенности молодняка овец разных пород при откорме: дис. канд. с.-х. наук: 06.02.04. – Ставрополь, 2006 – 134 с.

Поступила в редакцию 30.10.18
После доработки 26.12.18
Принята к публикации 14.01.19