Биология

УДК 535.343.32:577.322.5

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЕМОГЛОБИНА НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ С НОРМОТРОФИЕЙ И ГИПОТРОФИЕЙ

*Волкова В.В., *Вели А.А., */**Сулин В.Ю., */**Мартынова А.В., *Паршин П.А.

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

**ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж, Российская Федерация

В диапазоне длин волн 240-320 нм зарегистрированы и проанализированы спектры светопоглощения водных растворов ароматических аминокислот, гемоглобина коров и новорожденных телят с нормотрофическим и гипотрофическим развитием. Обсуждается, что выявленные особенности светопоглощения гемоглобина коров, телят с нормотрофией и гипотрофией обусловлены различным соотношением в их крови фетального и взрослого гемоглобинов. **Ключевые слова:** спектрофотометрия, максимумы светопоглощения, фетальный и взрослый бычий гемоглобин, новорожденные телята, нормотрофия, гипотрофия, ароматические аминокислоты.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ABSORPTION SPECTRA OF AQUEOUS HEMOGLOBIN SOLUTIONS IN THE NEWBORN CALVES WITH NORMOTROPHY AND HYPOTROPHY

*Volkova V.V., *Veli A.A., *'**Sulin V.Yu., *'**Martynova A.V., *Parshin P.A.

*FSBSI «All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy», Voronezh, Russian Federation

**FSBEI HE «Voronezh State University», Voronezh, Russian Federation

In the wavelength range of 240-320 nm, the light absorption spectra of aqueous solutions of aromatic amino acids, hemoglobin of cows and newborn calves with normotrophic and hypotrophic development were recorded and analyzed. It is discussed that the revealed peculiarities of the light absorption of hemoglobin in cows, calves with normotrophy and hypotrophy are due to the different ratio of fetal and adult hemoglobins in their blood. **Keywords:** spectrophotometry, light absorption maxima, fetal and adult bovine hemoglobin, newborn calves, normotrophy, hypotrophy, aromatic amino acids.

Введение. В последние десятилетия отмечено увеличение количества телят с нарушениями фетального и постнатального развития нутритивного характера, что клинически проявляется в форме гипотрофии [6, 9]. По результатам недавно проведенных исследований в 13 животноводческих хозяйствах Центрально-Черноземного региона установлено, что в зависимости от направления и сезона года антенатальная гипотрофия телят распространена в пределах от 8—21% [8].

Система эритрона непосредственно обеспечивает уровень метаболических возможностей организма с момента рождения. Известно, что к моменту рождения теленка доля фетального гемоглобина (HbF) составляет в среднем около 70%. В норме в течение первых двух месяцев развития происходит постепенная замена HbF на дефинитивный гемоглобин (HbA, adult), что обеспечивает должный уровень метаболизма для роста и развития теленка. В исследованиях ряда авторов отмечено увеличение уровня фетального гемоглобина при хронических гипоксиях различной этиологии [4, 6, 9].

Исходя из вышеизложенного, цель нашей работы заключалась в исследовании структурно-функциональных свойств бычьего гемоглобина на основе спектрофотометрического анализа локальных максимумов светопоглощения водных растворов Нb крови клинически здоровых коров и телят с нормотрофическим и гипотрофическим развитием в диапазоне длин волн 240÷380 нм.

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследования использовали водные растворы гемоглобина крови клинически здоровых 2-летних коров (n=12) и телят с нормотрофией (n=6) и со 2-й (средней) степенью [3] гипотрофии (n=6) ООО «Эконива» с. Коршево Бобровского района. Кровь для исследования брали из яремной вены (*venae jugulares*) у новорожденных телят до первой выпойки молозива и на 30 день утром до кормления животных.

Для выделения эритроцитов венозную кровь телят в объеме 2 мл разбавляли до 10 мл изотоническим раствором NaCl (154 ммоль/л). Полученную суспензию эритроцитов центрифугировали 10 мин. при 5500 об/мин при температуре +12⁰ С, после чего удаляли супернатант. Подобную процедуру отмывания эритроцитов в 10 мл физиологического раствора проводили трижды. Гемоглобин получали осмотическим гемолизом, помещая 0,5 мл отмытых эритроцитов

в 5,5 мл дистиллированной воды в течение 20 минут. Осаждение мембран эритроцитов проводили центрифугированием при 5500 об/мин в течение 30 минут. После центрифугирования супернатант, содержащий гемоглобин, переносили в пробирки и разбавляли до рабочих концентраций свободной от углекислого газа дистиллированной водой.

Растворы ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана) готовили с учетом их растворимости в 0.01 молярном фосфатном буфере с pH=7,0.

Спектры светопоглощения водных растворов гемоглобина и ароматических аминокислот регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 240÷380 нм со спектральной шириной щели 1 нм и шагом сканирования 0.2 нм.

Результаты исследований. По результатам сравнительного анализа первичной структуры β -субъединиц взрослого гемоглобина (HbA, adult) коров (*Bos taurus taurus*) и фетального гемоглобина из базы данных аминокислотных последовательностей Uniprot (β -субъединица HbA - https://www.uniprot.org/uniprot/P02070; β -субъединица HbF - https://www.uniprot.org/uniprot/P02081) установлено, что фетальная β -субъединица отличается от β -субъединицы HbA по остаткам 22 аминокислот, в том числе по 5-ти аминокислотным остаткам ароматических, гетероциклических и серосодержащих аминокислот, которые относят к к хромофорам II типа. В сравнении с β -субъединицей HbA, фетальная β -субъединица содержит на один аминокислотный остаток больше цистеина, но меньше триптофана и гистидина, и на два аминокислотных остатка меньше метионина (10 - фенилаланина, 2 – тирозина, 1 – триптофана, 5 – гистидина, 2 – цистеина и 1 – метионина) (таблица 1).

Таблица 1– Ароматические, гетероциклические и серосодержащие аминокислотные остатки в первичной структуре β- субъединиц HbA и HbF

Аминокислоты		F	Υ	W	Н	С	М
		Phe	Tyr	Trp	His	Cys	Met
β-субъединица HbA	24	10	2	2	6	1	3
β -субъединица HbF	21	10	2	1	5	2	1

По данным ряда исследований установлено, что максимум светопоглощения в области 240÷320 нм обусловлен суперпозицией поглощения гемовой составляющей и хромофоров боковых групп ароматических и гетероциклических аминокислотных остатков, входящих в состав гемоглобина [2, 3]. Из аминокислот, которые поглощают в диапазоне длин волн 240–300 нм, самое интенсивное светопоглощение проявляют боковые группы триптофана, затем - тирозина и фенилаланина [3].

Исходя из вышеуказанного, в наших исследованиях были зарегистрированы спектры поглощения водных растворов ароматических аминокислот - фенилаланина, тирозина и триптофана, которые относят к хромофорам II типа.

По результатам спектрофотометрии установлено, что спектр поглощения водного раствора фенилаланина (Phe) характеризуется тремя последовательными пиками светопоглощения с λ_{max} =251.7 нм, λ_{max} =257.6 нм и λ_{max} 263.7 нм (рисунок 1), что согласуется с ранее полученными данными И.А. Лавриненко с соавторами [2].

Наличие в молекуле тирозина (Туг) гидроксильной группы смещает максимум светопоглощения в длинноволновую область (батохромный сдвиг) с λ_{max} =275.3 нм (рисунок 1). Светопоглощение водного раствора триптофана (Тгр) характеризуется двумя максимумами с λ_{max} =279.6 нм и λ_{max} =287.8 нм, которые относят к π переходам индольного кольца [2, 5].

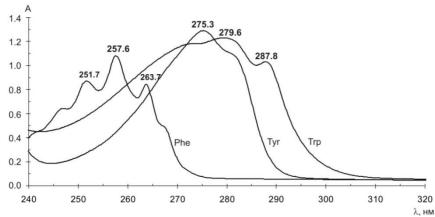


Рисунок 1 – Спектры поглощения водных растворов фенилаланина (Phe), тирозина (Tyr) и триптофана (Trp) в диапазоне 240÷320 нм

Учитывая различия в содержании аминокислотного остатка триптофана в составе β-субъединиц взрослого (HbA) и фетального (HbF) гемоглобинов, логично предположить, что УФ-спектры водных растворов гемоглобина новорожденных телят, содержащих в основном до 70% фетальный гемоглобин (HbF), и взрослый гемоглобин коров (HbA) будут иметь разные максимумы спектров поглощения в области 240÷320 нм.

По результатам спектрального анализа установлено, что водные растворы гемоглобина взрослых коров характеризуются максимумом светопоглощения с λ_{max} =275.4 нм и выраженным переходом с λ =288.2 нм и λ =290.8 нм, который, вероятно, формируется как суперпозиция максимума поглощения триптофана с λ_{max} = 287.8 нм (рисунки 1, 2).

Максимумы светопоглощения растворов гемоглобина новорожденных телят с нормо - и гипотрофическим развитием одинаково характеризуются локальным максимумом, смещенным в сторону коротких волн с λ_{max} =269.8 нм (рисунок 2).

На основании сравнительного анализа пиков поглощения водных растворов ароматических аминокислот и гемоглобина врослых коров и новорожденных телят можно предположить, что выявленные различия в максимумах светопоглощения в диапазоне длин волн $260 \div 280$ нм могут быть обусловлены преимущественным содержанием в крови новорожденных телят фетального гемоглобина, β -субъединица которого в своей первичной структуре содержит меньше аминокислотных остатков триптофана.

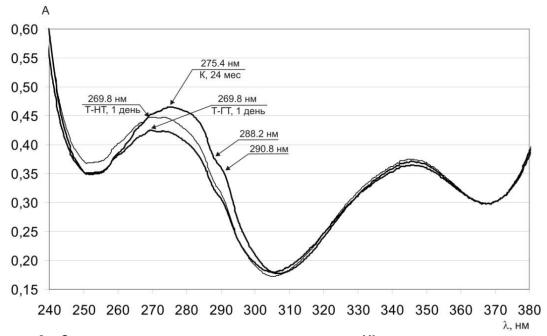


Рисунок 2 – Спектр светопоглощения водных растворов Hb крови новорожденных телят и взрослых коров в диапазоне длин волн 240÷380 нм

Обозначения: Т-НТ - телята-нормотрофики, Т-ГТ - телята-гипотрофики, К - коровы Учитывая, что интенсивность светопоглощения водных растворов гемоглобина в диапазоне 240÷320 нм в значительной мере определяется небелковой (гемовой) компонентой [3], можно предположить, что установленные различия в светопоглощении исследуемых растворов бычьего гемоглобина характеризуют не только их структурные, но и функциональные свойства.

К 1 месяцу развития у клинически здоровых телят (нормотрофиков) максимум спектра светопоглощения в коротковолновом диапазоне смещается с λ_{max} =269.8 нм (рисунок 2) на λ_{max} =274.8 нм и приближается к параметрам светопоглощения гемоглобина взрослых коров (рисунок 3). Также регистрируется переход в области 288÷290 нм, который возникает как суперпозиция максимума светопоглощения триптофана с λ_{max} = 287.8 нм (рисунки 1, 3). Полученные особенности УФ-светопоглощения гемоглобина месячных телят с нормотрофическим развитием могут характеризовать процесс замещения HbF на взрослый HbA.

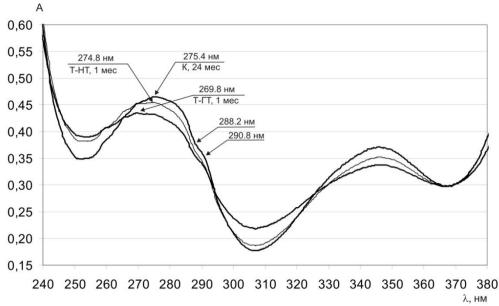


Рисунок 3 – Спектр светопоглощения водных растворов Hb крови месячных телят и взрослых коров в диапазоне длин волн 240÷380 нм

Обозначения: Т-НТ - телята-нормотрофики, Т-ГТ - телята-гипотрофики, К - коровы

У месячных телят с гипотрофическим развитием сохраняется максимум спектра светопоглощения с λ_{max} =269.8 нм и менее выражен переход в диапазоне 288÷290 нм, что, возможно, связано с высоким содержанием в их крови фетального гемоглобина. По данным литературы, высокое содержание HbF в неонатальном периоде развития и задержка в его замене на HbA наблюдаются при гипоксических состояниях, анемиях и иных патологиях, сопряженных с нарушением метаболизма и кислород-транспортной функции крови [4].

Заключение. В последние десятилетия отмечается увеличение количества новорожденных телят с нарушениями нутритивного статуса, что клинически проявляется в форме гипотрофии. Неонатальная смертность при тяжелой степени гипотрофии в отдельных животноводческих хозяйствах может достигать 30%. По результатам многочисленных исследований фетальной и неонатальной гипотрофии предложены различные объяснения нарушений биохимических и физиологических процессов, их взаимосвязи и выраженности, однако полного понимания причин и ключевых механизмов развития данной патологии на сегодняшний день не существует [7, 8].

По результатам клинического анализа крови новорожденных телят установлено, что в 70-80% случаев гипотрофия сочетается с гипохромной анемией [4, 6, 8]. По данным научной литературы высокое содержание фетального гемоглобина (HbF) в неонатальном периоде развития телят и задержка его замены на взрослый гемоглобин (HbA) наблюдаются при гипоксических состояниях, анемиях и иных патологиях, сопряженных с нарушением кислород-траспортной функции крови и метаболизма. В исследовании S. Hara с соавторами были обнаружены бычьи эндотелиальные клетки артерий (bovine arterial endothelial cells), экспрессирующие гипоксия-индуцибельные факторы (hypoxia-inducible factor — HIF) HIF-1альфа и HIF-2-альфа, которые в гипоксических условиях активируют транскрипцию более 40 генов, включая эритропоэтины [10], что способствует усилению синтеза фетального гемоглобина.

По результатам сравнительного спектрофотометрического анализа в диапазоне длин волн $260 \div 290$ нм в нашем исследовании были выявлены различия в параметрах светопоглощения водных растворов гемоглобина крови телят с нормотрофическим и гипотрофическим развитием в раннем постнатальном периоде их онтогенеза. Установлено, что у телятгипотрофиков в первый месяц после рождения сохраняется максимум светопоглощения гемоглобина с λ_{max} =269.8 нм и менее выражен переход в диапазоне $288 \div 290$ нм, что, возможно, свидетельствует о задержке замены их HbF на HbA.

На основе анализа полученных нами результатов и данных литературы, мы предполагаем, что у телят-гипотрофиков низкий уровень их развития и метаболизма сочетается с гипохромной анемией и высоким уровнем в первый месяц их постнатального развития фетального гемоглобина (HbF), связанным с задержкой его замены на HbA.

Литература. 1. Исследование спектров поглощения водных растворов гемоглобина новорожденных телят / В. В. Волкова [и др.] // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 10. — С. 140—153. 2. Лавриненко, И. А. Анализ вклада хромофоров боковых групп аминокислот в спектр погло-

щения гемоглобина / И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, М. К. Рубан // Журнал прикладной спектроскопии. - 2013. - Т. 80, № 6. - С. 907-910. doi.org/10.1007/s10812-014-9862-4. 3. Лавриненко, И.А. Разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240-320 нм : дис. ... канд. биол. наук / И. А. Лавриненко. - Воронеж, 2015. – 217 с. 4. Лощинин, С. О. Клинико-биохимические индикаторы функционального состояния телят в неонатальный период после синдрома «трудные роды» : автореф. дис. ...: канд. ветеринарных наук : 06.02.06 – ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных. – Саратов, 2015. – 122 с. 5. Ляшенко, Д. Ю. Исследование взаимодействия α- и β-циклодекстрина с рядом ароматических аминокислот в водных растворах методом УФ спектроскопии / Д. Ю. Ляшенко // Поверхность. – 2018. – Т. 25. Вып. 10. - С. 153-169. doi: 10.15407/Surface.2018.10.154. 6. Саврасов, Д. А. Этиология и клиникоморфологическая характеристика гипотрофии телят / Д. А. Саврасов, П. А. Паршин // Ветеринарная патология. – 2012. – Вып. 2. – С. 21–25. 7. Саврасов, Д. А. Применение актопротектора таурин при гипотрофии телят / Д. А. Саврасов, П. А. Паршин // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2019. – № 3 (8). – С. 67–76. – DOI: 10.17238/issn2541-8203.2019.3.76. 8. Саврасов, Д. А. Профилактика и терапия гипотрофии телят / Д. А. Саврасов, П. А. Паршин // Вестник Воронежского государственного агарного университета. – 2012. – Вып. 1 (32). – С. 85–90. 9. Шабунин, С. В. Перинатальная патология у крупного рогатого скота - актуальная проблема ветеринарной медицины / С. В. Шабунин, Ю. Н. Алехин, А. Г. Нежданов // Ветеринария. – 2015. – № 1. – С. 3–10. 10. Hara, S. Molecular cloning of DNAs encoding hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and -2alpha of bovine arterial endothelial cells / S. Hara, C. Kobayashi, N. Imura // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – № 1445. – P. 237–243.

Поступила в редакцию 14.09.2020 г.

УДК 619:[637.07:618.19-002:578.245.2]:636.2

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОЛОКА КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ СУБКЛИНИЧЕСКИМ МАСТИТОМ КОРОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТА «АМСФ»

Зимников В.И., Климов Н.Т., Манжурина О.А., Тюрина Е.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

В статье представлены материалы исследований по изучению цитологических и бактериологических показателей секрета вымени клинически здоровых и больных субклиническим маститом коров при применении препарата «АМСФ». Установлено, что трехкратное введение иммунокорригирующего препарата больным субклиническим маститом коровам способствует повышению активности защитных механизмов организма и молочной железы, снижению воспалительной реакции, о чем свидетельствует достоверное возрастание в секрете вымени количества лимфоцитов в 2,3 раза и макрофагов - в 12,8 раза, при снижении нейтрофилов в 4,4 раза, эпителиальных клеток - в 2,2 раза, лизоцима и циркулирующих иммунных комплексов — в 3,25 и 2,81 раза соответственно, контаминации молока микрофлорой - в 39 раз. Применение АМСФ клинически здоровым животным способствовало возрастанию содержания лимфоцитов и макрофагов в 1,3 и 1,2 раза соответственно, снижению нейтрофилов и эпителиальных клеток в 2,2 и 1,8 раза, циркулирующих иммунных комплексов и лизоцима — в 1,38 и 1,34 раза соответственно, микробной контаминации молока - в 8 раз. Ключевые слова: коровы, субклинический мастит, препарат «АМСФ», секрет вымени, цитологические, иммунологические и бактериологические показатели.

THE CHANGE OF CYTOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL INDICATORS OF MILK IN CLINICALLY HEALTHY COWS AND COWS WITH SUBCLINICAL MASTITIS WHEN USING «AMSF» DRUG

Zimnikov V.I., Klimov N.T., Manzhurina O.A., Tyurina E.V.

FSBSI «All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy», Voronezh, Russian Federation

The article presents research materials on the study of cytological and bacteriological indicators of the udder secretion of clinically healthy cows and cows with subclinical mastitis when using «AMSF» drug. It was found that threefold administration of an immunocorrective drug to cows with subclinical mastitis promoted an increase in the activity of the organism and mammary gland defense mechanisms, a decrease in the inflammatory reaction, as evidenced by a significant increase in the udder secretion of the number of lymphocytes by 2,3 times and macrophages - by 12,8 times, with a decrease in neutrophils by 4,4 times, epithelial cells - by 2,2 times, lysozyme and circulating immune complexes - by 3,25 and 2,81 times, respectively, contamination of milk with microfloraby 39 times. The application of AMSF to clinically healthy animals contributed to an increase in the content of lymphocytes and macrophages by 1,3 and 1,2 times, respectively, a decrease in neutrophils and epithelial cells by 2,2 and 1,8 times, circulating immune complexes and lysozyme - by 1,38 and 1,34 times, respectively, microbial contamination of milk - by 8 times. **Keywords:** cows, subclinical mastitis, «AMSF» drug, udder secretion, cytological, immunological and bacteriological indicators.