

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ

Научная статья
УДК 619:612.342.4
doi: 10.26897/2949-4710-2023-1-53-58



Трипсин – новый маркер метаболизма у животных

Владимир Георгиевич Вертипрахов, Марина Ивановна Селионова, Виктор Викторович Малородов

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; г. Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Владимир Георгиевич Вертипрахов; vertiprahov@rgau-msha.ru

Аннотация. Трипсин вырабатывается поджелудочной железой и гидролизует в кишечнике протеин пищи до полипептидов и аминокислот. Однако функция фермента выходит далеко за пределы органов пищеварения, поскольку он участвует в процессах регуляции артериального давления, воспалительных реакций, свертывания крови, функции поджелудочной железы. Установлено, что рецепторы PAR, активируемые трипсином, оказывают влияние на клеточные процессы в организме. Вопросы влияния трипсина на метаболизм животных ранее не изучались. Поэтому целью исследования было сравнение показателей активности трипсина у разных животных и у кур-несушек с разной продуктивностью – для получения новых знаний о сигнальной роли трипсина в регуляции обмена веществ. Результаты исследований на коровах, козах и птице показали, что максимальная активность трипсина в сыворотке крови наблюдается у цыплят-бройлеров, которая превышает уровень кур-несушек, на 385,4% – уровень коров, на 89,4% – коз, на 22,6% – кур-несушек. Анализ активности фермента в крови несушек позволил выявить кур, способных к яйцекладке, по сравнению с теми, у которых кладка яиц еще не наступила. Расчет корреляции указывает на прочную положительную связь между яйцекладкой и активностью трипсина. Следовательно, активность трипсина можно использовать в качестве показателя обменных процессов в организме животных.

Ключевые слова: трипсин, сигнальная роль трипсина, рецепторы PAR, метаболизм животных, сыворотка крови, коровы, козы, куры, цыплята-бройлеры

Для цитирования: Вертипрахов В.Г., Селионова М.И., Малородов В.В. Трипсин – новый маркер метаболизма у животных // Тимирязевской сельскохозяйственной академии. Биологические науки. 2023. № 1. С. 53–58. <http://dx.doi.org/10.26897/2949-4710-2023-1-53-58>

© Вертипрахов В.Г., Селионова М.И., Малородов В.В.

MOLECULAR BIOLOGY, BIOCHEMISTRY

Original article
doi: 10.26897/2949-4710-2023-1-53-58

Trypsin as a New Marker of Metabolism in Animals

Vladimir G. Vertiprahov, Marina I. Selionova, Viktor V. Malorodov

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Corresponding author: Vladimir G. Vertiprahov, vertiprahov@rgau-msha.ru

Abstract. Trypsin is produced by the pancreas and hydrolyzes food protein to polypeptides and amino acids in the intestine. However, the function of the enzyme extends far beyond the digestive organs, as it is involved in the regulation of blood pressure, inflammatory reactions, blood clotting, and pancreatic function. Trypsin-activated PAR receptors have been found to affect cellular processes in the body. The effect of trypsin on animal metabolism has not been studied before. Therefore, the aim of the present study was to compare trypsin activity in different animals and in laying hens of different productivity to gain new knowledge about the signaling role of trypsin in the regulation of metabolism. Results of studies on cows, goats and poultry showed that the maximum trypsin activity in blood serum was observed in broiler chickens, which exceeded the level of laying hens by 385.4% for cows, by 89.4% for goats and by 22.6% for laying hens. An analysis of the enzyme activity in the blood of laying hens has identified the hens capable of laying eggs compared to those that have not yet laid eggs. Calculation of the correlation indicates a strong positive relationship between egg-laying and trypsin activity. Consequently, trypsin activity can be used as an indicator of metabolic processes in animals.

Keywords: trypsin, trypsin signaling role, PAR receptors, animal metabolism, serum, cows, goats, chickens, broiler chickens

For citation: Vertiprahov V.G., Selionova M.I., Malorodov V.V. Trypsin as a New Marker of Metabolism in Animals // Timiryazev Biological Journal. 2023;1:53–58. (In Rus.). <http://dx.doi.org/10.26897/2949-4710-2023-1-53-58>

Введение

Трипсин секретируется поджелудочной железой и гидролизует белок в кишечнике до полипептидов и аминокислот. Кроме того, поступая в кровь, трипсин участвует в работе калликреин-кининовой системы, которая обеспечивает регуляцию артериального давления крови при активации брадикинина [1].

В течение длительного времени считалось, что трипсин в норме синтезируется только в поджелудочной железе. В исследовании N. Koshikawa, S. Hasegawa, Y. Nagashima et al. (1998) показана экспрессия трипсина в тканях человека и мыши в непанкреатических тканях. Было установлено, что ген трипсина экспрессируется на высоком уровне в поджелудочной железе, селезенке, и в значительной степени – в тонкой кишке. Однако гибридизация *in situ* и иммуногистохимия показали, что трипсин широко экспрессируется в эпителиальных клетках кожи, пищевода, желудка, тонкой кишки, легких, почек, печени и внепеченочных желчных протоков, а также в селезенке и нейронах. В селезенке активность трипсина была обнаружена в макрофагах, моноцитах и лимфоцитах в белой пульпе, а в головном мозге – в нервных клетках гиппокампа и коры головного мозга [2].

Нами впервые была определена активность трипсина в молоке коровы, причем установлено значительное повышение активности фермента в период воспаления в молочной железе. Установлено, что трипсин является активатором PAR-рецепторов (*proteinase-activated receptors*), которые передают информацию клетке и обеспечивают изменение ее метаболизма при воспалительных процессах и иммунологических реакциях [3]. Через указанные рецепторы может регулироваться секреторная функция поджелудочной железы, желудка и слюнных желез.

Получены данные о том, что PAR-рецепторы, активируемые трипсином, принимают участие в заболеваниях, связанных с нейродегенеративными изменениями головного мозга [4–7]. Знание механизмов вовлечения трипсина в норму и в развитие патологических процессов является актуальным ввиду распространения заболеваний поджелудочной железы, которые являются источником высокой смертности даже в развитых странах [8]. Результаты исследований, выполненные на птице, показали, что активность трипсина в крови взаимодействует в постпрандиальный период с метаболитами оксида азота, оказывая влияние на процессы усвоения протеина [9]. При замене в рационе белковых компонентов активность трипсина в крови выступает в роли сигнальной молекулы [10]. Однако вопросы влияния трипсина на метаболизм и связи с продуктивностью у сельскохозяйственных животных не нашли в научной литературе широкого отражения.

Цель наших исследований заключалась в том, чтобы сравнить показатели активности трипсина у разных животных и у кур-несушек с разной продуктивностью – для получения новых знаний о сигнальной роли трипсина в регуляции обмена веществ.

Методика исследований

Кровь получали от коров из хвостовой вены, у коз – из яремной вены в вакуумные пробирки для взятия венозной крови с активатором свертывания, которые применяются при исследованиях сыворотки в клинической химии, серологии, иммунологии. Стенки пробирки имели специальный наполнитель, содержащий оксид кремния (SiO₂), обеспечивающий быстрое свертывание крови при действии на тромбоцитарное звено и плазменный гемостаз. За счет наполнителя в пробирке значительно ускоряется процесс свертывания крови, которая полностью сворачивается за 30 мин, что обеспечивает сокращение время приготовления биологической пробы.

Исследования по определению активности трипсина проводились на полуавтоматическом точном биохимическом анализаторе SINNOWA BS-3000M (КНР). Для этого в эппендорф набирали 450 мкл трис-буферного раствора pH = 8,2 (реактив № 1), затем добавляли 50 мкл (реактив № 2), содержащий субстрат для трипсина. Для приготовления реактива № 2 смешивали два компонента: порошок benzoyl – DL – arginine 4 – nitroanilide hydrochloride из расчета 5 мг растворяли в 1,0 мл диметилсульфоксида. Раствор хранили в холодильнике при температуре +4–5°C в течение не более 3 мес. Реактивы № 1 и № 2 тщательно перемешивали, переворачивая закрытый эппендорф 2–3 раза и инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 3 мин. После этого добавляли 10 мкл исследуемого материала (плазма крови, молоко после пробоподготовки) и запускали реакцию определения активности в биохимическом анализаторе кинетическим методом. Активность фермента выражали в единицах в 1 л, что соответствует расщепленному мкмоль субстрата в 1 л за 1 мин: мкмоль/(л/мин) [10].

Статистическую обработку результатов проводили при расчете среднего значения (*M*) и среднеквадратичного отклонения ($\pm m$) с помощью программы Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента, считая статистически значимыми результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований показали, что активность трипсина в сыворотке крови у разных животных имеет отличия (табл. 1).

Результаты исследований показали, что по активности трипсина максимальная активность в сыворотке крови наблюдается у цыплят-бройлеров, которая превышает уровень кур-несушек: на 385,4% – у коров; на 89,4% – у коз; на 22,6 – у кур-несушек. Доминирующее положение птиц по активности данного фермента указывает на более высокий уровень метаболизма по отношению к млекопитающим животным. По активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови лидируют куры-несушки, что можно объяснить высоким уровнем кальциевого обмена, который связан с яйцекладкой. А относительно высокий показатель щелочной фосфатазы у коров можно объяснить потребностью в большом количестве кальция в связи с продукцией молока, когда рацион не может обеспечить в полном объеме потребности организма, и животное вынуждено расходовать запасы из костной ткани.

Вторым фактором, влияющим на обмен веществ, является продуктивность животных. В таблице 2 представлены данные эксперимента по изучению влияния фитазы на фоне бесфосфатного рациона у кур-несушек.

Таблица 1

Активность трипсина в сыворотке крови у коров, коз, кур-несушек и цыплят-бройлеров

Показатель	Экспериментальные животные			
	Коровы, n = 10	Козы, n = 5	Куры-несушки, n = 30	Цыплята-бройлеры, n = 30
Активность трипсина, ед/л	48±2,7	123±3,3	190±12,5	233±12
Активность щелочной фосфатазы, ед/л	148±11,4	137±22,0	450±33,7	286±18,7
Фосфатазно-протеазный индекс	3,08	1,11	2,37	1,23

Таблица 2

Активность трипсина у кур-несушек с разным уровнем продуктивности

Курица, №	Группа			
	К (1)	О (2)	О (3)	О (4)
14	222,7	210,2	134,65	180,4
13	87,9	81,4	123,57	25,9
10	112,9	93,8	85,73	100,8
12	126	243,7	262,4	175,2
7	134,9	226,5	271,64	197,8
9	225,8	224	244,3	403,2
5	218,9	275,9	227,2	270,5
6	82	95	126,5	92,3
4	65	117,2	116,5	170
1	197,3	193,6	251,9	258,5
3	225,5	125,8	169,6	246,5
11	287,4	226,2	260,3	153,9
M±m	165±19,7	181±19,9	189±20	189±28,5

Из 12 гол. активно несли яйцо 6 кур. За 14 сут. опыта было снесено 26 яиц. Низкая яйценоскость в 36-недельном возрасте кур связана со сложной операцией по выведению подвздошной кишки наружу для изучения илеальной доступности минеральных веществ. После хирургической операции и связанных с этим изменений в организме кур они постепенно входили в яйцекладку. Опыт по изучению влияния фитазы на фоне безфосфатного рациона проводился методом периодов, который составлял 8 сут.: 5 сут. – предварительный, 3 сут. – зачетный период. Если проанализировать активность трипсина у кур-несушек, то становится очевидным, что у одних уровень активности фермента превышает 200 ед., а у остальных он значительно меньше. Анализ корреляции указывает на прочную положительную связь между яйцекладкой и активностью трипсина (табл. 3).

Данные таблицы свидетельствуют о наличии прочной положительной корреляции активности трипсина от количества снесенных курицей яиц с коэффициентом, равным 0,81.

Сопоставляя результаты исследований, полученные ранее о механизме действия фермента на организм человека и животных, можно отметить, что впервые объектом изучения стали сельскохозяйственные животные. Установлено, что по показателю активности трипсина в крови можно судить о состоянии здоровья кишечника у птицы [11], а также о процессах адаптации пищеварения к составу рациона [12–14]. Это свидетельствует о практическом применении фундаментальных знаний.

Таблица 3

Корреляция между продуктивностью кур и активностью трипсина

Курица, №	Активность трипсина за опыт, ед/л	Количество снесенных яиц за период, шт.
14	186,9	2
13	79,7	0
10	98,3	0
12	201,8	10
7	207,7	10
9	274,3	10
5	248,1	6
6	98,9	0
4	117,2	0
1	225,3	8
3	191,8	0
11	231,9	8

Выводы

Результаты экспериментов впервые показали роль трипсина в качестве индикатора, способного отражать метаболизм у разных животных, что позволит использовать его в дальнейшем для оценки состояния не только поджелудочной железы, но и обмена веществ в целом.

Список источников

1. Chia E., Kagota S., Wijekoon E., McGuire J. Protection of protease-activated receptor 2 mediated vasodilatation against angiotensin II-induced vascular dysfunction in mice // BMC Pharmacol. – 2011. – № 28 (11). – Pp. 10. Doi:10.1186/1471–2210–11–10.
2. Koshikawa N., Hasegawa S., Nagashima Y. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human

References

1. Chia E., Kagota S., Wijekoon E., McGuire J. Protection of protease-activated receptor 2 mediated vasodilatation against angiotensin II-induced vascular dysfunction in mice. BMC Pharmacol. 2011; 28(11): 10. doi: 10.1186/1471–2210–11–10.
2. Koshikawa N., Hasegawa S., Nagashima Y. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. Pathol. 1998; 153(3): 937–944.

and mouse // *Am.J. Pathol.* – 1998. – № 153 (3). – Pp. 937–944.

3. Яровая Г.А., Блохина Т.Б., Нешкова Е.А. Протеиназа-активируемые рецепторы (PARs) – сигнальный путь, инициируемый ограниченным протеолизом // *Лабораторная медицина.* – 2009. – № 10. – С. 23–34.

4. Luo W., Wang Y., Reiser G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection // *Brain Res Rev.* – 2007. – № 56 (2). – Pp. 331–345. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.08.002.

5. Wang Y., Luo W., Reiser G. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions // *Trypsin Cell Mol Life Sci.* – 2008. – № 65 (2). – Pp. 237–252. doi:10.1007/s00018-007-7288-3.

6. Lohman R., Jones N., O'Brien T., Cocks T. A regulatory role for protease-activated receptor-2 in motivational learning in rats // *Neurobiol Learn Mem.* – 2009. – № 92 (3). – Pp. 301–309. Doi: 10.1016/j.nlm.2009.03.010.

7. Almonte A., Qadri H., Sultan F., Watson J., Mount D., Rumbaugh G., Sweatt J. Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity // *J Neurochem.* – 2013. – № 124 (1). – Pp. 109–122. doi:10.1111/jnc.12075.

8. Zhang L., Sanagapalli S., Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer // *World J Gastroenterol.* – 2018. – № 24 (19). – Pp. 2047–2060. doi:10.3748/wjg.v24.i19.2047.

9. Vertiprakhov V., Ovchinnikova N. The activity of trypsin in the pancreatic juice and blood of poultry increases simultaneously in the postprandial period // *Frontiers in Physiology.* – 2022. – V. 13. – Pp. 874664.

10. Фисинин В.И., Вертипрахов В.Г., Харитонов Е.Л., Грозина А.А. Адаптация панкреатической секреции и метаболизма у животных с разным типом пищеварения при замене белкового компонента рациона // *Сельскохозяйственная биология.* – 2019 – № 54 (6). – С. 1122–1134. doi:10.15389/agrobiology.2019.6.1122rus.

11. Вертипрахов В.Г., Грозина А.А. Оценка состояния поджелудочной железы методом определения активности трипсина в крови птицы // *Ветеринария.* – 2018. – С. 51–54. doi: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.51–54.

12. Вертипрахов В.Г., Гогина Н.Н., Овчинникова Н.В. Новый подход к оценке здоровья кишечника у птиц // *Ветеринария.* – 2020. – № 7. – С. 56–59.

13. Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Кислова И.В. Способ оценки адаптации пищеварения птицы к ингредиентному составу рациона // Патент на изобретение: 2742175 С1, 02.02.2021. – Заяв. № 2019142448 от 19.12.2019.

14. Трухачев В.И., Филенко В.Ф., Поляков В.В. Свиноводство (теория, опыт, практика). – Ставрополь: Ставропольская государственная сельскохозяйственная академия, 1999. – 328 с. – EDN TIFPBV.

3. Yarovaya G.A., Blokhina T.B., Neshkova E.A. Proteinaza-aktiviruemye retseptory (PARs) – signal'nyy put', initsiiroemyy ogranichenным proteolizom [Proteinase-activated receptors (PARs) as a signaling pathway initiated by restricted proteolysis]. *Laboratornaya meditsina.* 2009; 10: 23–34. (In Rus.).

4. Luo W., Wang Y., Reiser G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev.* 2007; 56(2): 331–345. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.08.002.

5. Wang Y., Luo W., Reiser G. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Trypsin Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(2): 237–252. doi: 10.1007/s00018-007-7288-3.

6. Lohman R., Jones N., O'Brien T., Cocks T. A Regulatory role for protease-activated receptor-2 in motivational learning in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92(3): 301–309. doi: 10.1016/j.nlm.2009.03.010.

7. Almonte A., Qadri H., Sultan F., Watson J., Mount D., Rumbaugh G., Sweatt J. Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity. *J Neurochem.* 2013; 124(1): 109–122. doi: 10.1111/jnc.12075.

8. Zhang L., Sanagapalli S., Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2018; 24(19): 2047–2060. doi:10.3748/wjg.v24.i19.2047.

9. Vertiprakhov V., Ovchinnikova N. The activity of trypsin in the pancreatic juice and blood of poultry increases simultaneously in the postprandial period. *Frontiers in Physiology.* 2022; 13: 874664.

10. Fisinin V.I., Vertiprakhov V.G., Kharitonov E.L., Grozina A.A. Adaptatsiya pankreaticheskoy sekretsii i metabolizma u zhivotnykh s raznym tipom pishchevareniya pri zamene belkovogo komponenta ratsiona [Adaptation of pancreatic secretion and metabolism in animals with different types of digestion when replacing the protein component of the diet]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 2019; 54(6): 1122–1134. doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1122rus (In Rus.).

11. Vertiprakhov V.G., Grozina A.A. Otsenka sostoyaniya podzheludochnoy zhelezy metodom opredeleniya aktivnosti tripsina v krovi ptitsy [Evaluation of the pancreas by determination of trypsin activity in poultry blood]. 2018: 51–54. doi: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.51–54 (In Rus.).

12. Vertiprakhov V.G., Gogina N.N., Ovchinnikova N.V. Noviy podkhod k otsenke zdorov'ya kishechnika u ptits [A new approach to evaluating intestinal health in birds]. *Veterinariya.* 2020; 7: 56–59. (In Rus.).

13. Vertiprakhov V.G., Grozina A.A., Kislova I.V. Sposob otsenki adaptatsii pishchevareniya ptitsy k ingredientnomu sostavu ratsiona [Method for evaluating the adaptation of poultry digestion to the ingredient composition of the diet]. *Pat. no. 2742175C1:02.02.2021.* (In Rus.).

14. Trukhachev V.I., Filenko V.F., Polyakov V.V. Svinovodstvo (teoriya, opyt, praktika) [Pig breeding (theory, experience, practice)]. 1999: 328.

Сведения об авторах

Вертипрахов Владимир Георгиевич, профессор кафедры физиологии, этологии и биохимии животных, д-р биол. наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127434, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; vertiprahov@rgau-msha.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3240-7636>.

Селионова Марина Ивановна, заведующий кафедрой разведения, генетики и биотехнологии животных, д-р биол. наук, профессор Российской академии наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127434, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; <https://orcid.org/0000-0002-9501-8080>.

Малородов Виктор Викторович, доцент кафедры частной зоотехнии, канд. с.-х. наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127434, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; <https://orcid.org/0000-0001-9033-7552>.

About the authors

Vladimir G. Vertiprahov, DSc (Bio), Associate Professor, Professor of the Department of Physiology, Ecology and Biochemistry of Animals, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation); E-mail: vertiprahov@rgau-msha.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3240-7636>.

Marina I. Selionova, DSc (Bio), Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Breeding, Genetics and Biotechnology of Animals, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation); <https://orcid.org/0000-0002-9501-8080>.

Viktor V. Malorodov, CSc (Ag), Associate Professor of the Department of Special Animal Husbandry, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation); <https://orcid.org/0000-0001-9033-7552>.