

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 577.32:798.2

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ СПОРТИВНЫХ ЛОШАДЕЙ

© 2023 г. Л. В. Степанова*, @, О. В. Колесник**, О. А. Коленчукова*, ***, А. С. Федотова****, А. В. Коломейцев****, А. В. Макаров***, В. А. Кратасюк*, **

*ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041 Россия

**ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение Институт биофизики СО РАН, ул. Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036 Россия

***ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, ул. Партизана Железняка, 3г, Красноярск, 660022 Россия

****ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», пр. Мира, 90, Красноярск, 660049 Россия
@E-mail: slyudmila@mail.ru

Поступила в редакцию 07.09.2021 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

Проведено биолюминесцентное тестирование слюны спортивных лошадей, отобранной до и после физических нагрузок, с использованием биферментной реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой. Показано ингибирующее воздействие слюны на интенсивность свечения благодаря повышению pH слюны после мышечной работы. Понижение интегрального биолюминесцентного показателя при мышечной работе низкой интенсивности коррелировало с содержанием общего белка и глюкозы в сыворотке крови, повышение биолюминесцентного показателя при высокой интенсивности зависело от понижения креатинина или повышения АСТ и взаимосвязано с повышением частоты сердечных сокращений. Впервые показано, что ингибирование биолюминесцентного свечения может быть показателем функционального состояния лошади в тренинге, что может применяться в спортивном коневодстве для предупреждения перегрузок.

Ключевые слова: спортивные лошади, слюна, NADH:FMN-оксидоредуктаза, люцифераза, бактериальная биолюминесценция

DOI: 10.31857/S1026347023010110, **EDN:** IMZIGX

Конный спорт является очень популярным, но требующим постоянного контроля за состоянием лошади (Герман и др., 2019; Clémence, 2020). Комплексная оценка состояния физиологических систем характеризует общую тренированность организма лошади и служит основанием для дозировки и корректировки нагрузок при тренировке. Физиолого-клинические показатели (температура, частота пульса и дыханий) характеризуются большой динамичностью и являются объективными, простыми и легкодоступными методами исследования функционального состояния спортивных лошадей как во время покоя, так в процессе и после различной мышечной работы. Исследование частоты пульса, дыхания и гематологических показателей животного являются одним из важнейших методов ветеринарной клинической диагностики, позволяющей объективно судить о

функциональном состоянии и пригодности лошади к выполнению мышечной работы (Baevsky, Chernikova, 2017; L. de Mare *et al.*, 2017).

Однако в настоящее время официальные руководства, в том числе правила по конному спорту и пособия по иппологии, рекомендуют для оценки состояния организма спортивной лошади разноречивые нормативные данные или не дают никаких нормативов показателей для оценки состояния спортивной лошади, как во время покоя, так и после мышечной работы (Уоршг, 2009; Szarska *et al.*, 2015; Navas de Solis *et al.*, 2018; Герман и др., 2019). Это не позволяет считать их вполне надежными для использования в практике конного спорта. Поэтому проведение исследований о влиянии различных систем тренинга на

функциональное состояние спортивных лошадей является актуальным.

В настоящее время представляет интерес разработка и внедрение интегральных методов скрининг-тестирования спортивных лошадей. Использование неинвазивного метода, такой как тестирование слюны, имеет преимущества в простоте и безопасности использования (Покровская и др., 2011; Турлак, 2020).

К тому же, слюна — динамичная биологическая жидкость и функционально эквивалентна сыворотке крови, но с низкой концентрацией метаболитов по сравнению с уровнями в крови. Однако с развитием чувствительных методов тестирования низкая концентрация метаболитов в слюне не является ограничением (Вавилова и др., 2014; Турлак, 2020).

В настоящее время разработана биосенсорная биотехнология — биолюминесцентный метод с применением бактериальной ферментативной системы, который оказался эффективным в тестировании состояния организма (Esimbekova *et al.*, 2014; Kratasyuk, Esimbekova, 2015; Kratasyuk *et al.*, 2020). Изменение уровня свечения биолюминесцентной реакции при воздействии на нее слюны в малом количестве может выявить отклонения в организме спортивных лошадей как ответ на предельно допустимые нагрузки. Важной характеристикой биолюминесцентного тестирования слюны лошадей является неинвазивность, позволяющая безболезненно и быстро контролировать изменение состояния организма спортивных лошадей во время тренировок, что значимо для конного спорта.

Поэтому целью исследования явилось выявление возможности использования биолюминесцентного ферментативного биотеста в тестировании слюны лошадей для контроля физической нагрузки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись две группы спортивных лошадей: лошади траккененской породы (специализация “выездка”) ($n = 21$) в возрасте 4–21 лет и рысаки ($n = 20$) в возрасте 2–7 лет. Лошади траккененской породы (тракены) содержались в стандартных условиях учебно-спортивного комплекса коневодства Красноярского государственного аграрного университета (ФГБОУ ВО Красноярский ГАУ), рысаки — в ООО “СПХ “Мустанг” Емельяновского района Красноярского края. Тестирование каждой лошади, отбор проб ее слюны и крови проводили до и после тренировок с низкой, средней и высокой интенсивностями в подготовительный период к

соревнованиям (февраль–июнь 2019–2021 гг.). Согласно тренировочной программе средняя интенсивность физической нагрузки отсутствовала для рысаков.

Физическая нагрузка низкой интенсивности включала тренировку лошади в течение часа, средней интенсивности — в течение полутора часов и высокой интенсивности — в течение двух часов на корде или под седлом. Программа тренировок включала в себя следующие этапы: на свободном поводу, в сборе на рыси с включением боковых элементов, сокращение и раздвижение аллюров и переходы из одного аллюра в другой, заминку на рыси на длинном поводу, шаг.

Отбор проб слюны в количестве 1.0–1.5 мл производили в одноразовые стерильные пластмассовые пробирки. Отбор проб до нагрузки проводили в утренние часы (до кормления). После физической нагрузки слюна лошадей образовывалась в достаточном количестве и отбиралась непосредственно по завершению тренировки. Отбор проб слюны никак не влиял на эмоциональное состояние лошадей.

Функциональные показатели организма лошадей определяли по количеству дыхательных движений (КДД) и частоте сердечных сокращений (ЧСС). КДД определяли визуально, оценку ЧСС проводили по электрокардиограмме (ЭКГ) на электрокардиографе ЭКЗТ-01-Р-Д “Монитор”, Россия) с использованием ферментативно-колориметрического метода с помощью полуавтоматического биохимического анализатора HumaLyzer 3000 (“Human GmbH”, Германия) с применением стандартизированных наборов Human Diagnostics Worldwide (“Human GmbH”, Германия). Биохимический анализ сыворотки крови проводили согласно стандартной общепринятой методике (Кондрахин и др., 2004), тестировали содержание общего белка (ОБ) (г/л), концентрации глюкозы (ммоль/л), мочевины (ммоль/л), креатинина (мкмоль/л), а также активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) (мкмоль/л с) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) (мкмоль/л с). Содержание ОБ исследовали как показатель нарушения питания; концентрацию креатинина — как показатель физической нагрузки и энергетического обмена мышечной ткани; концентрацию глюкозы — как основной показатель углеводного обмена и определения энергозатрат при физической работе лошадей; для определения работы почек, печени и общего состоянии мышц исследовали концентрацию мочевины; активности АЛТ и АСТ — это важные показатели состояния сердечной мышцы и мышц опорно-двигательного аппарата.

Биохимические показатели определяли спектрофотометрически по глюкозооксидазному методу,

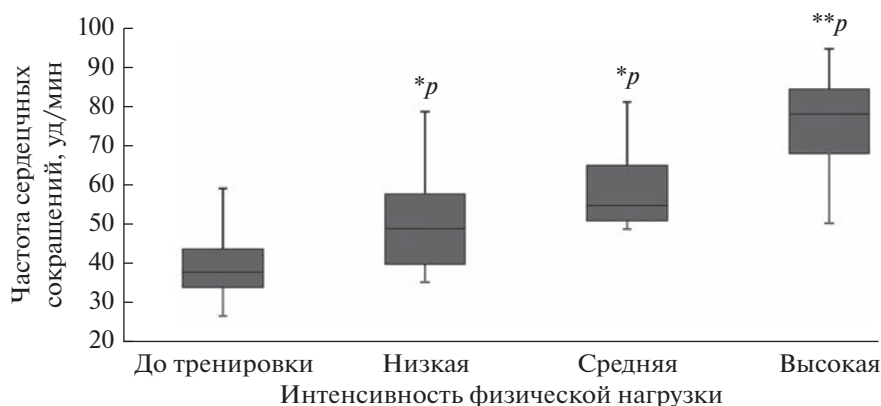


Рис. 1. Изменения ЧСС с повышением интенсивности физических нагрузок для лошадей обеих групп. Примечание: * p – достоверность различий относительно значения “до тренировок” по критерию Вилкоксона, где * p – $p < 0.05$, ** p – $p < 0.001$.

содержание ОБ – биуретовым методом, концентрацию мочевины – уреазным методом по реакции с фенолгипохлоритом, концентрацию креатинина – колориметрическим методом, основанным на реакции Яффе, активности АЛТ и АСТ – методом Райтмана-Френкеля.

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили после ее центрифугирования в течение 15 минут при частоте 5000 об./мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5810 r (“Eppendorf”, Германия). Биолюминесцентное тестирование проводили на планшетном люминометре TriStar LB 941 (“Berthold Technologies”, Германия).

Концентрацию лактата (молочной кислоты) (моль/л) в образцах центрифугированной слюны измеряли фотометрическим методом в соответствии с реакцией Берга (Borshchevskaya *et al.*, 2016) на спектрофотометре UV-1800 (“Shimadzu”, Япония).

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили с использованием комплекта реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ) (ИБФ СО РАН, Красноярск), который содержал лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов люциферазы EC 1.14.14.3 (0.4 мг/мл) из рекомбинантного штамма *E. coli* и NADH: FMN-оксидоредуктазы EC 1.5.1.29 (*Ph. leiognathi*) (0.18 ед. активности).

Реакционная смесь для биолюминесцентной реакции включала в себя 80 мкл 0.05 М калий – фосфатного буфера (pH 6.8–7), 5 мкл раствора КРАБ, 10 мкл 0.0025% раствора тетрадеканала (Merck, Германия), 50 мкл 0.4 мМ раствора NADH (Sigma, США), 10 мкл 0.5 мМ раствора FMN (Serva, Германия).

При проведении биолюминесцентного тестирования в ячейку планшета последовательно вносили реакционную смесь и регистрировали величину

максимальной интенсивности свечения (контрольное измерение). При экспериментальном измерении 40 мкл буфера заменяли на 40 мкл слюны, разведенной в буфере в 60 раз. Измерения интенсивности свечения проводили в 2-х повторностях. По отношению средних максимальных интенсивностей биолюминесценции экспериментального измерения (I) к контрольному (I_0) рассчитывали величину остаточного свечения (T , %).

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (“StatSoft Inc”, США) с подсчетом медианы (Me) и интерквартильных разбросов (C_{25} – C_{75} перцентили). Различия между показателями зависимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона, корреляционную связь – по ранговую критерию Спирмена. Уровень достоверной значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты тестирования функционального состояния показали, что в состоянии покоя (до тренировок) показатели ЧСС и КДД лошадей находились в норме (Baevsky, Chernikova, 2017; Navas de Solis *et al.*, 2018) (рис. 1, 2). Известно, что оптимальными показателями спортивных лошадей в состоянии покоя (в утренние часы до кормления или до работы) принято считать ЧСС – 36 уд./мин (с колебаниями 32–42 уд./мин) и КДД – 13 дых./мин (с колебаниями 6–16 дых./мин) (Кабасова, Петрушко, 2018; Navas de Solis *et al.*, 2018). Выявлено, что медиана ЧСС одинакова для тракенов и рысаков, медиана КДД для рысаков выше по сравнению с тракенами (табл. 1). Различие в показателях КДД может быть обусловлено возрастом лошадей, т.е. количество дыхательных движений у молодых спортивных лошадей было выше по сравнению с

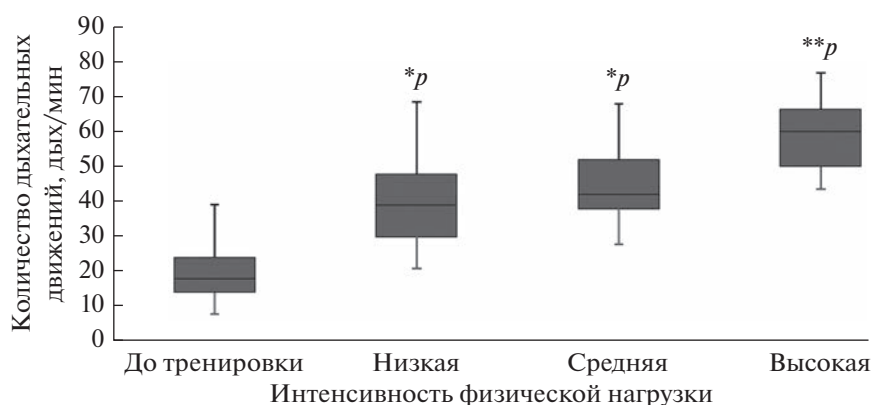


Рис. 2. Изменения КДД с повышением интенсивности физических нагрузок для лошадей обеих групп. Примечание: * p – достоверность различий относительно значения “до тренировки” по критерию Вилкоксона, где * p – $p < 0.05$, ** p – $p < 0.001$.

возрастными в связи с меньшей подготовленностью молодых лошадей к физическим нагрузкам.

С повышением интенсивности мышечной работы величины ЧСС и КДД достоверно возрастали. При этом показатели ЧСС и КДД для рысаков были в 3–4 раза выше по сравнению с тракенами (табл. 1). Однако достоверного различия в показателях ЧСС и КДД между тракенами и рысаками не выявлено. Полученные результаты обеих групп по представленным показателям находились в пределах нормы (Кабасова, Петрушко, 2018). Повышение показателей с увеличением интенсивности мышечной работы свидетельствовало о преодолении физических нагрузок.

Результаты биохимического анализа сыворотки крови спортивных лошадей до тренировок и после мышечной работы показали, что значения большинства биохимических показателей крови были в пределах физиологической нормы (Баран и др., 2010; Андреева и др., 2012; Андрийчук и др.,

2016), кроме активности АСТ, которая была ниже нормы (табл. 2). Показано, что концентрация мочевины существенно не изменялась. Концентрация глюкозы и ОБ проявляли тенденция к возрастанию с повышением интенсивности физической нагрузки, что свидетельствовало о влиянии физических нагрузок на углеводный обмен (Жукова, 2014). Возрастающий белковый обмен свидетельствовал о хорошем питании, которое необходимо для усиления мышечной устойчивости лошадей к физическим нагрузкам (Баран и др., 2010).

Однако после нагрузки низкой интенсивности выявлено резкое повышение концентрации креатинина или активности АЛТ и понижение активности АСТ. С возрастанием интенсивности мышечной работы концентрация креатинина снижалась. Активности АЛТ и АСТ понижались при средней интенсивности и быстро возрастали при высокой интенсивности.

Таблица 1. Функциональные показатели спортивных лошадей до и после мышечной работы разной интенсивности. Результаты представлены в виде Ме [С25–С75]

Функциональный показатель лошадей		Интенсивность физической нагрузки			
		до тренировки	низкая	средняя	высокая
Тракены	ЧСС, уд/мин	40.5 [36.0–46.8]	47.0* [39.8–52.0]	58.0*** [51.0–60.0]	68.0** [62.0–76.0]
	КДД, дых/мин	17.0 [14.0–20.0]	36.0** [30.0–40.0]	42.0*** [38.0–52.0]	54.0** [49.0–63.0]
Рысаки	ЧСС, уд/мин	40.5 [31.5–50.8]	54.0* [45.3–61.0]		96.0*** [82.0–131.3]
	КДД, дых/мин	24.0 [15.8–24.0]	48.0*** [36.0–49.5]		64.5*** [55.5–70.5]

Примечание. * p – достоверность различий относительно значения “до тренировки” по критерию Вилкоксона, где * – $p < 0.001$, ** – $p < 0.0001$, *** – $p < 0.00001$.

Таблица 2. Клинические показатели сыворотки крови спортивных лошадей до и после мышечной работы разной интенсивности. Результаты представлены в виде Ме [С25–С75]

Биохимический показатель	Интенсивность физической нагрузки				Физиологические нормы (Андрейчук и др., 2016)
	до тренировки	низкая	средняя	высокая	
Концентрация ОБ, г/л	62.6 [60.1–64.7]	62.5 [60.8–65.0]	63.6 [61.4–65.6]	66.3 [64.0–69.5]	57–79
Концентрация глюкозы, ммоль/л	4.6 [3.9–5.2]	3.0 [2.4–4.2]	4.5 [4.1–4.6]	4.5 [3.9–5.2]	3.5–6.3
Концентрация мочевины, ммоль/л	5.5 [5.1–6.2]	5.9 [5.0–7.0]	6.0 [4.8–6.7]	5.4 [4.6–6.7]	3.7–8.8
Концентрация креатинина, мкмоль/л	126.8 [108.0–139.0]	150.0 [137.0–161.8]	132.7 [106.1–155.4]	106.6 [99.2–139.9]	77–175
Концентрация АЛТ, мкмоль/л с	0.06 [0.03–0.05]	0.012 [0.006–0.02]	0.008 [0.008–0.02]	0.19 [0.1–0.2]	0.046–0.357
Концентрация АСТ, мкмоль/л с	0.79 [0.51–0.6]	0.38 [0.3–0.4]	0.18 [0.14–0.18]	1.23 [0.7–0.96]	1.972–4.879

Как известно, креатинин — это конечный продукт метаболизма креатина, который отвечает за функциональность мышечных волокон, поэтому количество производимого в организме креатинина зависело от количества мышечной массы и интенсивности физической нагрузки. Ферменты АСТ и АЛТ присутствуют в значительной степени в сердечной мышце и в мышцах опорно-двигательного аппарата, поэтому являются маркерами состояния кардиомиоцитов и миокарда в целом (Рыатnychko *et al.*, 2021). Понижение концентрации креатинина и повышение активности ферментов после мышечной нагрузки низкой и высокой интенсивности свидетельствовало об их расходе организмом при максимальных мышечных работах. Однако стоит отметить, что изменения всех представленных показателей не превышали их физиологической нормы для лошадей, поэтому перегрузок организма не было.

Выявлено, что реакции организма тракенов и рысаков на максимальную мышечную нагрузку проявляются по-разному и характеризуются различной величиной сдвигов клинических показателей (рис. 3, 4). Установлено, что содержание глюкозы, общего белка и мочевины не изменялись с повышением физической нагрузки как для тракенов, так и для рысаков показатели были одинаковые. Для рысаков выявлено достоверное повышение активности ферментов АСТ ($p = 0.00008$) или АЛТ ($p = 0.00008$) и достоверное понижение концентрации креатинина ($p = 0.00008$) с возрастанием интенсивности физической нагрузки (рис. 4). Для тракенов концентрация креатина также достоверно понижалась с повышением физической

нагрузки ($p = 0.01$) (рис. 3). Содержание фермента АЛТ повышалось при низкой или высокой интенсивности и понижалось при средней интенсивности. Активность фермента АСТ при высокой интенсивности была достоверно ниже показателя для низкой интенсивности ($p = 0.007$) и выше — для средней интенсивности ($p = 0.04$).

Выявлен высокий показатель активности АЛТ и АСТ для рысаков после мышечной работы высокой интенсивности на 10 нмоль/л · с (или 100 мкмоль/л с) по сравнению с тракенами. Это может быть обусловлено разной физической подготовкой лошадей. Молодые рысаки менее тренированные, чем возрастные тракены, поэтому активность ферментов при мышечной работе была больше. Достоверного различия между лошадьми обеих групп нет. Полученные результаты в обеих группах по всем показателям находятся в пределах нормы.

Таким образом, функциональные показатели лошадей и показатели биохимического анализа их сыворотки крови указывали на состояние организма, способного выполнять физические нагрузки малой и высокой интенсивности с максимальной мышечной работой.

Как известно, изменения в организме под влиянием физических нагрузок можно определять более доступным для анализа биосубстратом — слюной, состав которой может быстро меняться в ротовой полости в стремлении адаптироваться к меняющемуся состоянию организма (Вавилова и др., 2014; Турлак, 2020).

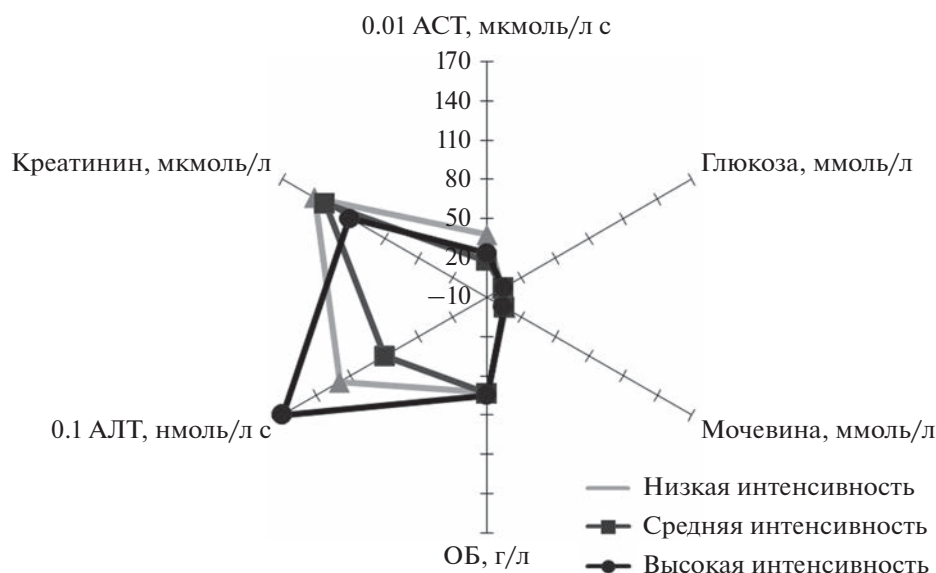


Рис. 3. Диаграмма изменения биохимических показателей сыворотки крови с повышением интенсивности физической нагрузки для тракенов.

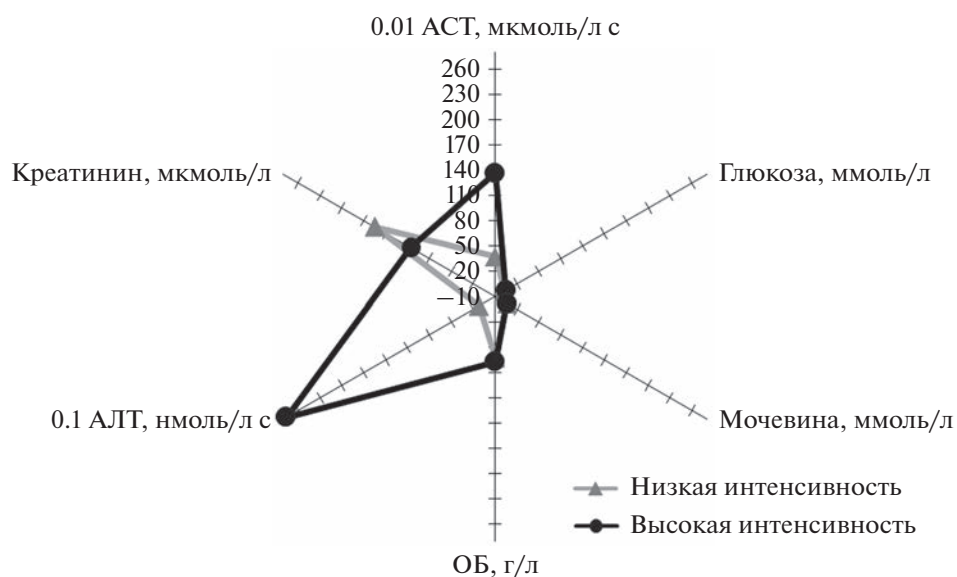


Рис. 4. Диаграмма изменения биохимических показателей сыворотки крови с повышением интенсивности физической нагрузки для рысаков.

Результаты проведенного нами биолуминесцентного тестирования слюны показали, что слюна лошадей после тренировок тушила интенсивность свечения по-разному (рис. 5, 6). Одинаково для обеих групп лошадей наблюдали тенденцию достоверного снижения остаточного свечения (или повышения тушения интенсивности свечения) от состояния покоя (до тренировки) до низкой или средней интенсивности физической нагрузки и повышение остаточного свечения (или уменьшения тушения интенсивности свечения) —

при высокой интенсивности. При этом слюна рысаков до тренировки на 10% сильнее тушила интенсивность свечения по сравнению со скакунами.

Представленный интегральный показатель указывал на общее изменение компонентного состава или свойств слюны лошадей во время мышечной работы. Для выявления изменений в слюне проанализирована чувствительность биолуминесцентной ферментативной системы.

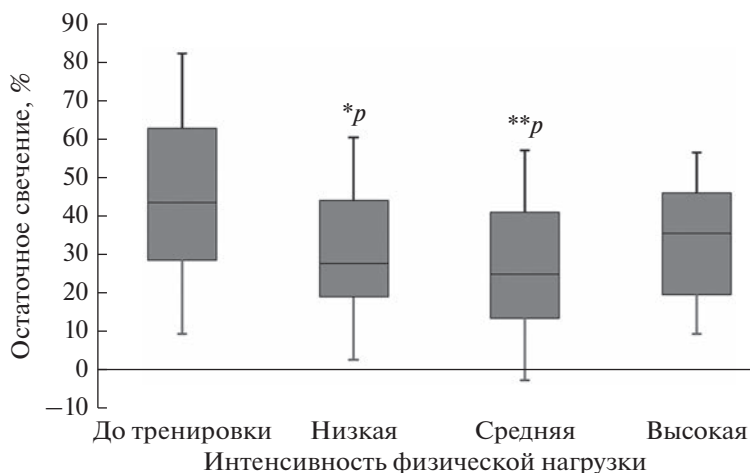


Рис. 5. Изменения остаточного свечения биолуминесцентной ферментативной системы с повышением интенсивности физических нагрузок для тракенов. Примечание: * p – достоверность различий относительно значения “до тренировки” по критерию Вилкоксона, где * $p - p < 0.05$, ** $p - p < 0.001$.

Известно, что используемая для тестирования слюны бактериальная ферментативная система имеет чувствительность к изменению pH и ионной силы между ионами Na^+ и K^+ в анализируемой среде (Bezrukikh *et al.*, 2014; Есимбекова и др., 2015). Определено, что pH слюны лошадей в состоянии покоя (до тренировки) был выше нормы в сторону кислотного показателя (норма pH 7.5 (Покровская и др., 2011)) и не изменялся с повышением интенсивности физической нагрузки, кроме нагрузки средней интенсивности (когда отсутствовала максимальная мышечная работа лошадей), где pH слюны было незначительно понижено (табл. 3). Представленные показатели pH были выше оптимального диапазона функционирования биолуминесцентной системы (pH 6.8–7.0 (Bezrukikh *et al.*, 2014)). Следовательно, pH слюны оказывало ингибирующий эффект на интенсивность свечения бактериальной ферментативной системы.

Ранее было определено, что содержание натрия и калия после физической нагрузки в сыворотке крови спортивных лошадей достоверно снижалось вследствие потери электролитов с потом и развития электролитного дисбаланса (Maksymovych, 2017). Однако изменения концентрации ионов натрия и калия в слюне лошадей достаточно малы (6–23 ммоль/л) и представленные показатели входили в чувствительный диапазон функционирования биолуминесцентной системы (Bezrukikh *et al.*, 2014). Следовательно, изменение ионной силы между ионами Na^+ и K^+ в слюне не могут оказывать влияние на чувствительность биолуминесцентной системы.

В виду того, что уровень лактата является важным параметром, определяющим физическую подготовку спортивного организма (Karatosun *et al.*,

2005), определение лактата в слюне представлялось значимым. Показано, что концентрация лактата в слюне лошадей недостоверно возрастала с повышением интенсивности физической нагрузки, кроме нагрузки средней интенсивности (когда отсутствовала максимальная мышечная работа лошадей), где концентрация лактата было незначительно понижена (табл. 3). Известно, что повышение лактата свидетельствует о недостаточном насыщении организма кислородом во время тренировок. Видимо, незначительный лактат-ацидоз вызывал нарушение кислотно-щелочного баланса в слюне (Скворцов и др., 2020). Однако анализ корреляционных взаимосвязей между величиной остаточного свечения и концентрацией

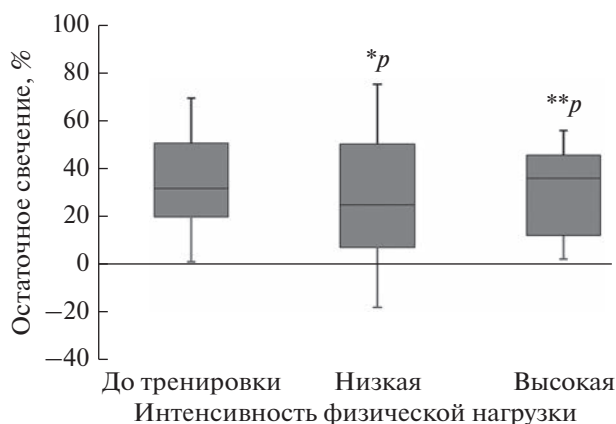


Рис. 6. Изменения остаточного свечения биолуминесцентной ферментативной системы с повышением интенсивности физических нагрузок для рысаков. Примечание: * p – достоверность различий относительно значения “до тренировки” по критерию Вилкоксона, где * $p - p < 0.05$, ** $p - p < 0.001$.

Таблица 3. Физико-химические показатели слюны спортивных лошадей до и после мышечной работы разной интенсивности. Результаты представлены в виде Ме [С25–С75]

Физический и химический показатель	Интенсивность физической нагрузки			
	до тренировки	низкая	средняя	высокая
pH	7.7 [7.5–8.0]	8.0 [7.5–8.0]	7.0 [7.0–8.0]	8.0 [7.5–8.0]
Концентрация лактата, моль/л	4.9 [4.6–5.7]	5.2 [4.9–6.0]	4.5 [4.2–5.0]	5.4 [3.8–7.2]

лактата не показал зависимости. Следовательно, содержание лактата не влияло на ингибирующий эффект биолуминесцентного свечения бактериальной ферментативной системы.

Таким образом, влияние pH слюны на интегральный биолуминесцентный показатель следует рассматривать как индикатор стресса лошадей во время физической нагрузки.

Возможное влияние других биохимических показателей слюны на биолуминесцентное свечение планируется проанализировать в дальнейших исследованиях.

Предварительный анализ корреляционной взаимосвязи между величинами остаточного свечения и биохимическими показателями сыворотки крови показал, что для рысаков после нагрузки высокой интенсивности интегральный биолуминесцентный показатель связан с пониженным содержанием креатинина ($r = -0.5$; $p = 0.05$). Для тракенов интегральный биолуминесцентный показатель взаимосвязан с содержанием общего белка ($r = 0.5$; $p = 0.05$) после нагрузки низкой интенсивности или с содержанием глюкозы – после средней интенсивности ($r = 0.5$; $p = 0.05$) и повышением активности фермента АСТ – после высокой интенсивности ($r = -0.8$; $p = 0.05$). Кроме этого, интегральный биолуминесцентный показатель обеих групп после нагрузки высокой интенсивности связан с повышением ЧСС ($r = -0.5$; $p = 0.05$).

Следовательно, интегральный биолуминесцентный показатель при тестировании слюны может быть сопоставим с таким функциональным показателем как ЧСС для выявления мышечной работы высокой интенсивности. Изменение интегрального биолуминесцентного показателя в зависимости от выполняемой мышечной работы низкой или высокой интенсивности обусловлено изменением pH и может быть зависимо от биохимических показателей слюны, отвечающих за ферментативную активность в сердечной мышце и мышцах опорно-двигательного аппарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стандартные физиолого-клинические методы тестирования лошадей в тренировках с разной интенсивностью показали, что показатели функционального состояния лошадей находились в норме в соответствии с выполняемой мышечной работой низкой или высокой интенсивности. Используемый для тестирования слюны лошадей в тренинге биолуминесцентный ферментативный метод позволил выявить преодолеваемые организмом физические нагрузки по изменению интегрального биолуминесцентного показателя, т.е. снижение интенсивности свечения при мышечной работе низкой интенсивности и повышение интенсивности свечения – при высокой интенсивности. При этом изменение интенсивности свечения зависело от повышения pH слюны с возрастанием физической нагрузки. Изменение интегрального биолуминесцентного показателя коррелировало с физиолого-клиническими показателями, такими как повышенный показатель ЧСС при мышечной работе высокой интенсивности, пониженный показатель активности ферментов сердечной мышцы при мышечной работе низкой и повышенный показатель активности ферментов мышцы опорно-двигательного аппарата в сыворотке крови при мышечной работе высокой интенсивности. Таким образом, доказана возможность неинвазивного тестирования слюны спортивных лошадей для оценки воздействия физической нагрузки на организм лошади в тренинге. Полученные предварительные результаты позволяют определить физиологическое состояние лошадей при физических нагрузках различной интенсивности.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта (19-416-240001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А.Б., Карпенко Л.Ю., Бахта А.А. Белковый обмен у жеребых кобыл // Иппология и ветеринария. 2012. Т. 2. № 4. С. 11–14.
- Андрійчук А.В., Ткаченко Г.М., Ткачова И.В. Гематологические и биохимические изменения в крови выездковых лошадей под влиянием физических нагрузок // Известия КГТУ. 2016. № 43. С. 145–153.
- Баран В.П., Соболева Ю.Г., Жвикова Е.А. Биохимические и гематологические показатели спортивных лошадей // Ученые записки УО “Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины”. 2010. Т. 46. № 2. С. 7–9.
- Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: Издательство БИНОМ, 2014. 312 с.
- Герман Ю.И., Горбуков М.А., Рудак А.Н., Садыков Е.В. Определение морфометрических, экстерьерно-конституциональных, биодинамических признаков лошадей верховых пород и их влияние на спортивную работоспособность. Ч. 1. Определение признаков, выявление имеющихся корреляций с результативностью испытаний по работоспособности // Коневодство и конный спорт. 2019. № 5. С. 37–40.
- Жукова И.А. Динамика физиологического состояния спортивных лошадей при физической нагрузке // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. 2014. № 2. С. 121–124.
- Есимбекова Е.Н., Лоншакова-Мукина В.И., Безруких А.Е., Кратасюк В.А. Принципы конструирования многокомпонентных реагентов для энзимологического анализа // Доклады Российской академии наук. 2015. Т. 461. № 4. С. 472–475.
- Кабасова И.А., Петрушко Н.П. Оценка функционального состояния и степени тренированности спортивных лошадей при применении различных систем тренинга // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. 2018. Т. 21. № 2. С. 306–312.
- Кондрахин И.П., Курилов Н.В., Малахов А.Г. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. М.: Агропромиздат, 2004. 531 с.
- Покровская Е.С., Малев А.А., Гильмутдинов Р.Я. Методологические аспекты получения слюны у сельскохозяйственных животных // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2011. Т. 208. № 4. С. 95–99.
- Скворцов В.В., Скворцова Е.М., Бангаров Р.Ю. Лактатацидоз в практике врача — анестезиолога-реаниматолога // Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2020. Т. 17. № 3. С. 95–100.
- Сорокина Е.В., Зарубина А.П. Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 6. С. 613–620.
- Турлак И.В. Слюна — основные направления исследования ее свойств // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 4. С. 154–164.
- Уоринг Д.Х. Поведение лошадей / Пер. с англ. Т. Ремизовой, Ю. Халфиной. СПб.: ООО “ИКЦ”, 2009. 458 с.
- Baevsky R.M., Chernikova A.G. Heart rate variability analysis: physiological foundations and main methods // Cardiometry. 2017. № 10. P. 66–76.
- Bezrukikh A., Esimbekova E., Nemtseva E., Kratasyuk V., Shimomura O. Gelatin and starch as stabilizers of the coupled enzyme system of luminous bacteria NADH: FMN-oxidoreductase-luciferase // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. P. 5743–5747.
- Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Kalinina A.N., Sinenokii S.P. Spectrophotometric determination of lactic acid // J. Analytical Chemistry. 2016. V. 71. № 8. P. 755–758.
- Clémence L. Indicators of Horse Welfare: State-of-the-Art // Animals. 2020. V. 10. № 2. P. 294–301.
- Esimbekova E., Kratasyuk V., Shimomura O. Application of enzyme bioluminescence in ecology // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2014. V. 144. P. 67–109.
- Karatosun H., Cetin C., Baydar M.L. Blood and saliva lactate levels during recovery from supramaximal exercise // Saudi Medical J. 2005. V. 26. P. 1831–1842.
- Kratasyuk V., Esimbekova E. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2015. V. 18. № 10. P. 952–959.
- Kratasyuk V.A., Stepanova L.V., Ranjan R., Sutormin O.S., Pande S., Zhukova G.V., Miller O.M., Maznyak N.V., Kolenchukova O.A. A noninvasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' responses to physical exertion // Luminescence. 2020. V. 36. № 2. P. 384–390.
- L. de Mare, Boshuizen B., Plancke L., C. de Meeus, M. de Bruijn, Delesalle C. Standardized exercise tests in horses: current situation and future perspectives // Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. 2017. V. 86. № 2. P. 63–72.
- Maksymovych I.A. Exchange of electrolytes in sports horse for exercise // Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj. 2017. V. 19. № 77. P. 100–104.
- Navas de Solis C., Sampson S.N., McKay T., Whitfield-Cargile C. Standardised exercise testing in 17 reining horses: Musculoskeletal, respiratory, cardiac and clinicopathological findings // Equine Vet Educ. 2018. V. 30. P. 262–267.
- Pyatnychko O., Zhyla M., Shkodyak N., Saliy O., Derkach M., Kalynovska L. The efficiency of the drug based on butaphosphane, B vitamins and L-carnitine in the treatment of horses // Scien. Mess. of LNU of Veter. Med. and Biotech. Series: Veterinary Sciences. 2021. V. 23. № 101. P. 31–37.
- Szarska E., Cywińska A., Ostaszewski P., Kowalska A. Effectiveness of training programmes used in two stables of thoroughbred race horses // Polish J. Veterinary Sciences. 2015. V. 17. № 4. P. 681–685.

The Prospects for Using Bioluminescent Enzymatic Analysis to Reveal the Exercise Capacity of Sports Horses

L. V. Stepanova^{1, #}, O. V. Kolesnik², O. A. Kolenchukova^{1, 3}, A. S. Fedotova⁴, A. V. Kolomeytsev¹, A. V. Makarov³, and V. A. Kratasyuk^{1, 2}

¹ Department of Biophysics, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Svobodnii pr., 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

² Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch of the RAS" Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the RAS, 50/50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

³ Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", 3G, Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022 Russia

⁴ Krasnoyarsk State Agrarian University, 90, Mira pr., Krasnoyarsk, 660049 Russia

[#]e-mail: slyudmila@mail.ru

Bioluminescent testing of saliva of sports horses, selected before and after physical exercise, was carried out using a coupled enzyme reaction catalyzed by NADH:FMN-oxidoreductase and bacterial luciferase. The inhibitory effect of saliva on the intensity of the light emission was shown, which depended on an increase in the pH of saliva after muscle work. A decrease in the integral bioluminescent index after low-intensity muscular work correlated with the content of total protein and glucose in the blood and serum increase in the bioluminescent index at high intensity was due to a decrease in creatinine or an increase in aspartate aminotransferase and is correlated with an increase in heart rate. It has been shown for the first time that the inhibition of bioluminescence can be an indicator of the functional state of a horse in training, which can be used in sports horse breeding to prevent overloads.

Keywords: sport horses, saliva, NADH:FMN-oxidoreductase, luciferase, bacterial bioluminescence