

УДК: 636.5:612.34:577.15

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.275

ОЦЕНКА ТРИПСИНА В ДУОДЕНАЛЬНОМ СОДЕРЖИМОМ И КРОВИ КУР БИОХИМИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Полина С.И. – асп., асс. каф. физиологии, этологии и биохимии животных (ORCID 0009-0002-7016-8944); **Вертипрахов В.Г.** – д-р биол. наук, зав. каф. физиологии, этологии и биохимии животных (ORCID 0000-0002-3240-7636); **Карамушкина С.В.** – канд. биол. наук, доц. каф. физиологии, этологии и биохимии животных (ORCID 0009-0009-6485-7146); **Лопатина В.В.** – асп., асс. каф. физиологии, этологии и биохимии животных (ORCID 0009-0000-2562-9137); **Загарин А.Ю.** – асп., асс. каф. разведения, генетики и биотехнологии животных, (ORCID 0000-0002-3782-3903)

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет
– МСХА имени К.А. Тимирязева»

* polina_sveta.93@bk.ru

Ключевые слова: трипсин, куры, экспрессия генов, дуоденальный химус, кровь.
Key words: trypsin, chickens, gene expression, duodenal chyme, blood.

Поступила: 25.04.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025



РЕФЕРАТ

Исследование посвящено оценке активности трипсина в дуоденальном содержимом и крови кур-несушек кросса Hisex White с использованием биохимических и молекулярно-генетических методов. Цель работы — изучение ферментативной активности трипсина и экспрессии его генов (PRSS2, PRSS3) в зависимости от состава рациона. Эксперименты проводились на курах с хронической дуоденальной фистулой, рацион которых соответствовал нормам ВНИТИП (17,7% сырого протеина, 282 ккал/100 г). Все исследования на птице выполняли, руководствуясь требованиями гуманного отношения к животным (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123) [рус., англ.] (Страсбург 18.03.1986). Активность трипсина в дуоденальном химусе через 60 и 120 минут после кормления составила $2249 \pm 118,6$ и $2368 \pm 122,1$ ед/л соответственно, что указывает на адаптацию поджелудочной железы к белковому компоненту корма. В сыворотке крови активность трипсина достигала $298 \pm 59,9$ ед/л, что в 7,5 раз ниже, чем в кишечнике, но свидетельствует о высоком уровне метаболизма. Молекулярно-генетический анализ подтвердил экспрессию генов PRSS2 и PRSS3 в дуоденальном содержимом и PRSS3 в крови, причем активность PRSS3 в крови была выше, чем в кишечнике. Установлена корреляция между трипсиновой активностью в биологических жидкостях и метаболическими процессами, включая белковый и липидный обмен. Результаты подчеркивают роль трипсина как маркера метаболизма и его регуляторных функций, что важно для оптимизации рационов и оценки селекционных показателей птицы.

ВВЕДЕНИЕ/ INTRODUCTION

Изучением вопроса рециркуляции панкреатических ферментов занимаются несколько поколений физиологов и гастроэнтерологов. Однако до сих пор не получен однозначный ответ на вопрос поступают ли панкреатические ферменты в кровь и возможно ли белковой молекуле проникать через мембрану кишечника? Работами Коротько Г.Ф. (2013), Rothman S. (2016), Можейко Л.А. (2017) [1-3] показано, что панкреатические ферменты проникают в кровь и оказывают влияние на метаболизм животных и человека. В научной литературе есть и противоположное мнение, основывается оно на том, что абсорбция целых панкреатических ферментов в кишечнике имеет ряд препятствий. Во-первых, кишечник обладает очень низкой способностью всасывать цельные белки [4]. Во-вторых, всасывание белка из просвета кишечника может быть опасным с иммунологической и метаболической точек зрения [5]. Способ абсорбции целых ферментов глубоко изучен и может быть кратко описан следующим образом: некоторые количества биологически активного белка или олигопептидов абсорбируются из кишечника, например, бромелайн [6] или диетические биологически активные вещества [7]. Поглощенное количество можно назвать уткой из-за биологического несовершенства слизистой оболочки кишечника. Поступление панкреатических ферментов в кровь связано с определенной ролью их в регуляции метаболизма, поскольку в последние годы получены данные о наличии PAR рецепторов, способных изменять функцию клеток в различных органах и тканях организма к норме и патологии [8].

Целью настоящей работы являлось определение активности трипсина в дуоденальном содержимом и крови с последующим подтверждением экспрессии генов трипсина молекулярным методом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования выполнялись на курах-несушках (*Gallus gallus* L.) кросса

HisexWhite (n=5, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2024,2025гг.) с хронической дуоденальной фистулой(n=5). Рацион соответствовал требованиям ВНИТИП (2018), содержание сырого протеина составляло 17,7 %, обменной энергии 282 ккал/100 г.

Все исследования на птице выполняли, руководствуясь требованиями гуманного отношения к животным (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123) [рус., англ.] (Страсбург 18.03.1986).

1. *Хирургические операции* по вживлению дуоденальной фистулы выполняли на курах 20-недельного возраста по методу, разработанному в нашей лаборатории [9]. После восстановления здоровья у кур после хирургической операции, через 3-5 суток приступали к физиологическим опытам. Физиологические опыты выполняли утром натощак. Давали курам по 30 г комбикорма, а через один час собирали дуоденальный химус (0,7-1,0 мл). Центрифугировали с использованием центрифуги erpendorfMiniSpin® plus (Германия) при 7000 об/мин в течение 5 минут и определяли активность ферментов в надосадочной жидкости.

2. Биохимические исследования.

Общий биохимический анализ крови выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе BioChemFC-120 (HTITechnology, США), с использованием реактивов HTI Technology. Активность трипсина определяли по методу Вертипрахова, Грозиной (2018) [10], амилазы и липазы, макроэлементов на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BS 3000M (Sinnova, КНР), с использованием реактивов компании (ДИАВЕТ, РФ).

3. Молекулярно-генетические исследования.

3.1. Отбор образцов

Для проведения молекулярно-генетической идентификации биосинтеза сериновых протеаз трипсина в дуоденальном содержимом и крови у кур при соблюдении стерильных условий отбирали

образцы соответствующих жидкостей и стабилизировали с использованием фиксатора IntactRNA («Евроген», Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя препарата. Образцы хранили до проведения лабораторных анализов при -20 °C.

3.2. Выделение РНК и синтез кДНК

Подготовку проб и анализ относительной экспрессии генов осуществляли на базе Учебно-научного центра коллективного пользования – «Сервисная лаборатория комплексного анализа химических соединений» РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Выделение суммарной РНК из образцов проводили с применением набора RNA Solo («Евроген», Москва, Россия), предварительно осуществив гомогенизацию и лизис тканей с применением прибора TissueLyser II (Qiagen, Venlo, Netherlands).

На матрице выделенной РНК синтезировали кДНК с помощью обратной транскриптазы в составе набора Magnus («Евроген», Москва, Россия) на приборе C1000 Touch (Bio-Rad, Berkeley, California, USA). Качество и количество выделенной РНК и синтезированной кДНК анализировали на приборе Fluor-200 (Allsheng, Hangzhou, Китай) с использова-

нием набора QuDu ssDNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США).

3.3. ПЦР-РВ (количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени)

Реакцию полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) осуществляли с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad, Berkeley, California, USA) и набора 5X qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Москва, Россия). В качестве контрольного гена использовали ген «домашнего хозяйства», кодирующий белок β-актин ACTB. Режим амплификации следующий: 3 минуты при 95 °C (предварительная денатурация); 30 секунд при 95 °C, 30 секунд при 60 °C, 30 секунд при 72 °C (40 циклов). Все лабораторные работы проводили в соответствии с протоколами производителей наборов для молекулярных исследований. Последовательность специфических праймеров, используемых в исследовании, представлена в таблице 1.

4. Статистическая обработка

Весь цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с использованием таблиц Стьюдента. В таблицах представлены средние (M) и стандартные ошибки средних (±SEM).

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность праймеров

Ген	Праймеры
ACTB (β-актин)	F: ATGGATGATGATATTGCTGC R: TTTGCTCTGGGCTTCATC
PRSS2 (сериновая протеаза 2)	F: AGTGCCGACATTCAACCC R: CATTGCTCAGCGTGTTC
PRSS3 (сериновая протеаза 3)	F: TCTCTGGATGGGGCAACAC R: ACTGCTGCACTGGCTTGAG

РЕЗУЛЬТАТЫ/RESULTS

При использовании в рационе кур сбалансированного корма были получены результаты, не имеющие существенных различий по активности трипсина в постпрандиальный период (табл.2).

Результаты исследований показали, что наблюдается тенденция к увеличению

активности трипсина во второй порции дуоденального химуса на 5,3%, что соответствует периоду поступления содержимого желудка в кишечник и регуляция секреторной функции поджелудочной железы нейрогуморальным механизмом, который ориентируется преимущественно на белковый компонент рациона птицы.

При этом уровень щелочной фосфатазы снижается на 22,2% ($p < 0.05$). Количество кальция и фосфора в кишечнике в постпрандиальный период не изменяется и находится в соотношении 5:1, 4:1, что существенно отличается от оптимального соотношения в крови и обусловлено, видимо, быстрым всасыванием в кровь фосфора. Данные по крови представлены в табл.3.

Данные таблицы показали, что куры обладают высокой трипсиновой активностью в сыворотке крови [11], которая в 7,5 раз ниже, чем в дуоденальном содержимом. Между этими показателями обнаружена связь, которая позволяет определить уровень метаболизма в организме курицы [12] и отличает их от других животных. В этом случае наблюдается высокий уровень кальция в крови, что может быть связано с его ингибирующим действием по отношению к протеазам крови [13]. Белковый и липидный обмены имеют

связи в организме, поэтому высокий уровень белкового обмена коррелирует с биомаркерами липидного обмена холестерина и триглицеридами в крови. Для того, чтобы понять взаимодействие трипсина в кишечнике и крови, были выполнены исследования по изучению экспрессии генов трипсина в дуоденальном химусе, полученном от фистульных птиц, и в крови этих кур.

Результаты молекулярно-генетических исследований в определенной степени подтвердили данные биохимического анализа и свидетельствовали о более интенсивной экспрессии генов, кодирующих трипсиновые протеазы, в полости двенадцатиперстной кишки по сравнению с кровью. Экспрессия гена PRSS3 была обнаружена как в крови, так и в дуоденальном содержимом, причем у каждой из подопытных особей активность этого гена в крови была выше, чем в полости кишечника.

Таблица 2 – Активность ферментов и минерального состава дуоденального химуса кур в постпрандиальную фазу

Показатель	Период после кормления	
	через 60 минут	через 120 минут
Активность трипсина, ед/л	2249±118,6	2368±122,1
Активность щелочной фосфатазы, ед/л	5389±379,3	4193±252,3*
Кальций, ммоль/л	50±4,9	41±3,5
Фосфор, ммоль/л	10±0,7	10±0,7

Примечание: * статистически значимые различия между периодами, при $p < 0,05$.

Таблица 3 – Биохимические показатели крови кур при использовании в рационе комбикорма ПК-1 ($M \pm m$, $n=30$)

Показатель	Результаты анализов
Трипсин, ед/л	298±59,9
Амилаза, ед/л	522±43,8
Глюкоза, ммоль/л	11,4±0,20
Щелочная фосфатаза, ед/л	483±139,0
Мочевая кислота, ммоль/л	117±35,3
Общий белок, г/л	64±18,6
Холестерин, ммоль/л	7±0,07
Триглицериды, ммоль/л	4±0,1
Кальций, ммоль/л	6,8±0,50
Фосфор, ммоль/л	2,1±0,70

Таблица 4 – Экспрессия генов, связанных с синтезом трипсина, в крови и дуоденальном содержимом кур ($M \pm m$, $n=5$)

Показатель	Ген				
	<i>ACTB</i>	<i>PRSS2</i>		<i>PRSS3</i>	
	Ct <i>ACTB</i>	Ct <i>PRSS2</i>	Δ Ct	Ct <i>PRSS3</i>	Δ Ct
Кровь	30,1 $\pm$ 0,31	-	-	36,0 $\pm$ 0,10	5,9 $\pm$ 0,80
Дуоденальное содержимое	29,5 $\pm$ 0,52	30,2 $\pm$ 0,34	0,4 $\pm$ 0,04	34,4 $\pm$ 0,37	4,9 $\pm$ 0,51

Примечание: Ct – пороговое значение флуоресценции при амплификации соответствующего гена, Δ Ct – разница пороговых значений флуоресценции при амплификации исследуемого и референсного гена.

Результаты исследований еще раз подтвердили наличие активного трипсина не только в дуоденальном содержимом, но и в сыворотке крови кур.

ВЫВОДЫ/ CONCLUSIONS

При использовании сбалансированного рациона (ПК-1) активность трипсина в дуоденальном химусе у кур, полученном от фистульных птиц, составляет через 60 минут после кормления 2249 $\pm$ 118,6 ед/л, через 120 минут - 2368 $\pm$ 122,1 ед/л.

2. Активность трипсина в сыворотке крови кур составляет 298 $\pm$ 59,9 ед/л, что значительно превосходит показатели млекопитающих животных.

3. Результаты молекулярно-генетических исследований установлена высокая транскрипционная активность генов *PRSS2* и *PRSS3* в содержимом двенадцатиперстного кишечника, *PRSS3* – в крови цыплят-бройлеров.

EVALUATION OF TRYPSIN IN DUODENAL CONTENTS AND CHICKEN CRO- VIE BY BIOCHEMICAL AND MOLECULAR GENETIC METHODS

Polina S.I. – postgraduate student, assistant of the Department of Physiology, Ethology and Biochemistry of Animals (ORCID 0009-0002-7016-8944); **Vertiprakhov V.G.** – Dr. of Biological Sciences, Head of the Department of Physiology, Ethology and Biochemistry of Animals (ORCID 0000-0002-3240-7636); **Karamushkina S.V.** – Ph. Department of Physiology, Ethology and Biochemistry of Animals (ORCID 0009-0009-6485-7146); **Lopatina V.V.** – Ph. -

Postgraduate student, assistant of the Department of Physiology, Ethology and Biochemistry of Animals (ORCID 0009-0000-2562-9137); **Zagarin A.Yu.** – Postgraduate student, assistant of the Department of Animal Breeding, Genetics and Biotechnology, (ORCID 0000-0002-3782-3903).

Russian State Agrarian University-Moscow Timiryazev Agricultural Academy

*polina_sveta.93@bk.ru

ABSTRACT

The study is devoted to the assessment of trypsin activity in the duodenal contents and blood of Hisex White laying hens using biochemical and molecular genetic methods. The aim of the work is to study the enzymatic activity of trypsin and the expression of its genes (*PRSS2*, *PRSS3*) depending on the composition of the diet. The experiments were carried out on hens with chronic duodenal fistula, whose diet complied with the standards of VNITIP (17.7% crude protein, 282 kcal/100 g). All studies on poultry were carried out in accordance with the requirements of humane treatment of animals (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123) [Russian, English] (Strasbourg 18.03.1986). Trypsin activity in duodenal chyme 60 and 120 minutes after feeding was 2249 $\pm$ 118.6 and 2368 $\pm$ 122.1 U/L, respectively, indicating adaptation of the pancreas to the protein component of the feed. In blood serum, trypsin activity reached 298 $\pm$ 59.9 U/L, which is

7.5 times lower than in the intestine, but indicates a high level of metabolism. Molecular genetic analysis confirmed the expression of the PRSS2 and PRSS3 genes in the duodenal contents and PRSS3 in the blood, with the activity PRSS3 in the blood was higher than in the intestine. A correlation was established between trypsin activity in biological fluids and metabolic processes, including protein and lipid metabolism. The results emphasize the role of trypsin as a marker of metabolism and its regulatory functions, which is important for optimizing diets and assessing the selection indicators of poultry.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- 1.Коротко Г.Ф. Формирование ферментного компонента секретов пищеварительных желез (обзор) // Физическая культура, спорт - наука и практика. 2013, 1. С. 51-57.
- 2.Rothman, S. S. Nonparallel transport of enzyme protein by the pancreas / S. S. Rothman // Nature Lond. - 2017. -Vol. 213. - P. 460-462.
- 3.Можейко Л.А. Морфофизиологическое обоснование непараллельной экзокринной секреции ферментов поджелудочной железы // Новости медико-биологических наук, 2017, 15(1). С. 72-76.
- 4.Williams DA. Introduction: exocrine pancreatic insufficiency and pancreatitis // Top Companion Anim Med. 2012.27(3). P.95. doi: 10.1053/j.tcam.2012.05.003. Epub 2012 Sep 5. PMID: 23148847.
- 5.Ballegaard A.-S.R. and Bøgh K.L. Intestinal protein uptake and IgE-mediated food allergy// Food Research International. 2023.163. 112150
- 6.Pavan R, Jain S, Shraddha, Kumar A. Properties and therapeutic application of bromelain: a review // Biotechnol Res Int. 2012;976203. doi: 10.1155/2012/976203. Epub 2012 Dec 10. PMID: 23304525; PMCID: PMC3529416.
- 7.Miyauchia S., Kajiwarab S., Satoa K. Metabolic fate of peptides in a rice protein hydrolysate in rat intestine and blood after oral administration //Journal of Food Bioactives. 2022.Vol 20. P. 40-55. DOI: 10.31665/JFB.2022.18327
- 8.Luo W., Wang Y., Reiser G. (2007). Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection // Brain Res. Rev. 56 (2). P. 331–345. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.08.002
- 9.Вертипрахов В. Г. Физиология кишечного пищеварения у кур (экспериментальный подход). Москва: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. 175 с. ISBN: 978-5-9675-1887-4. EDN: VCFFIY.
- 10.Вертипрахов В. Г., Грозина А. А. Оценка состояния поджелудочной железы методом определения активности трипсина в крови птицы // Ветеринария. 2018. № 6. С. 51–54. DOI: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.51-54.
- 11.Вертипрахов В. Г., Селионова М. И., Малородов В. В. Трипсин – новый маркер метаболизма у животных // Тимирязевский биологический журнал. 2023. № 1. С. 53–58. DOI: 10.26897/2949-4710-2023-1-53-58. EDN: SHJLSJ.
- 12.Вертипрахов В. Г., Грозина А. А., Фисинин В. И., Егоров И. А. Корреляция между активностью пищеварительных ферментов в поджелудочной железе и сыворотке крови у цыплят // Open Journal of Animal Sciences. 2018. Vol. 8, No. 3. P. 215–222. DOI: 10.4236/ojas.2018.83016.
- 13.Вертипрахов В. Г., Грозина А. А., Фисинин В. И. и др. Кальций как ингибитор активности трипсина в панкреатическом соке кур // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2021. Т. 51, № 2. С. 80–86. DOI: 10.26898/0370-8799-2021-2-10. EDN: GONNDL.

REFERENCES

1. Korotko G.F. Formation of the enzyme component of digestive gland secretions (review) // Physical culture, sport - science and practice. 2013, 1. C. 51-57.
2. Rothman, S. S. Nonparallel transport of enzyme protein by the pancreas / S. S. Rothman // Nature Lond. - 2017. -Vol. 213. - P. 460-462.
3. Mozheiko L.A. Morphophysiological substantiation of nonparallel exocrine secretion

- of pancreatic enzymes // *Novosti medicobiologicheskikh nauk*, 2017, 15(1). С. 72-76.
4. Williams DA. Introduction: exocrine pancreatic insufficiency and pancreatitis // *Top Companion Anim Med*. 2012.27(3). P.95. doi: 10.1053/j.tcam.2012.05.003. Epub 2012 Sep 5. PMID: 23148847.
5. Ballegaard A.-S.R. and Bøgh K.L. Intestinal protein uptake and IgE-mediated food allergy// *Food Research International*. 2023.163. 112150
6. Pavan R, Jain S, Shraddha, Kumar A. Properties and therapeutic application of bromelain: a review // *Biotechnol Res Int*. 2012;976203. doi: 10.1155/2012/976203. Epub 2012 Dec 10. PMID: 23304525; PMCID: PMC3529416.
7. Miyauchia S., Kajiwarab S., Satoa K. Metabolic fate of peptides in a rice protein hydrolysate in rat intestine and blood after oral administration // *Journal of Food Bioactives*. 2022.Vol 20. P. 40-55. DOI: 10.31665/JFB.2022.18327
8. Luo W., Wang Y., Reiser G. (2007). Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection // *Brain Res. Rev*. 56 (2). P. 331–345. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.08.002
9. Vertiprakhov V.G. Physiology of intestinal digestion in chickens (experimental approach). Moscow: Russian State Agrarian University - K.A. Timiryazev MSHA, 2022. 175 с. ISBN: 978-5-9675-1887-4. EDN: VCFFIY.
10. Vertiprakhov V. G., Grozina A. A. Assessment of the state of the pancreas by determining trypsin activity in poultry blood // *Veterinary Science*. 2018. № 6. С. 51-54. DOI: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.51-54.
11. Vertiprakhov V. G., Selionova M. I., Malorodov V. V. Trypsin - a new marker of metabolism in animals // *Timiryazevsky Biological Journal*. 2023. № 1. С. 53-58. DOI: 10.26897/2949-4710-2023-1-53-58. EDN: SHJLSJ.
12. Vertiprakhov V. G., Grozina A. A., Fisinin V. I., Egorov I. A. Correlation between the activity of digestive enzymes in the pancreas and blood serum in chickens // *Open Journal of Animal Sciences*. 2018. Vol. 8, No. 3. P. 215-222. DOI: 10.4236/ojas.2018.83016.
13. Vertiprakhov V. G., Grozina A. A., Fisinin V. I. et al. Calcium as an inhibitor of trypsin activity in the pancreatic juice of chickens // *Sibirskiy vestnik agrarnogo nauki*. 2021. T. 51, № 2. С. 80-86. DOI: 10.26898/0370-8799-2021-2-10. EDN: GONNDL.