


БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ СЛЮНЫ СПОРТИВНЫХ ЛОШАДЕЙ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ*

Л.Ю. ШТУМПФ¹, О.В. КОЛЕСНИК^{1, 4}, Л.В. СТЕПАНОВА¹ [✉],
О.А. КОЛЕНЧУКОВА^{1, 2}, А.С. ФЕДОТОВА³, А.В. КОЛОМЕЙЦЕВ³,
А.В. МАКАРОВ¹, В.А. КРАТАСЮК^{1, 4}

Одна из актуальных проблем спортивного коневодства в Российской Федерации и других странах — оценка физиологического состояния лошади в тренировочном процессе. Существующие физиологические и клинические методы тестирования лошадей не дают однозначного представления о функциональном состоянии животных в покое и при физических нагрузках. Сведения, представленные в литературе по нормативам физиологического состояния лошадей и в ветеринарных руководствах по клинической диагностике и конному спорту, противоречивы. Следовательно, необходимы объективные критерии оценки реакции организма на физическую нагрузку. В качестве скринингового тестирования мы предлагаем использовать простой, быстрый, неинвазивный метод на основе ингибирующего влияния слюны на активность ферментов светящихся бактерий. Изменение свечения биоломинесцентной ферментативной системы при воздействии слюны в малом количестве может выявить отклонения в организме спортивных лошадей как ответ на предельно допустимые нагрузки. В настоящей работе впервые показана возможность контролировать изменение состояния организма спортивных лошадей во время тренировок по интегральному биоломинесцентному показателю, который зависит от биохимического состава слюны. Цель работы — доказать возможность использования биоломинесцентного метода для тестирования функционального состояния спортивных лошадей в тренинге. Исследования проводили на группе спортивных лошадей (*Eguus caballus*) тракененской породы ($n = 12$) со специализацией «выездка». Лошади содержались в стандартных условиях учебно-спортивного комплекса коневодства Красноярского ГАУ. Тестирование каждой лошади, сбор образцов слюны и крови проводили до (в утренние часы) и после тренировок с низкой, средней и высокой интенсивностью в период подготовки к соревнованиям (февраль-июнь 2019-2020 годов). Определяли функциональные показатели — частоту дыхательных движений (ЧДД), частоту сердечных сокращений (ЧСС), проводили электрокардиографию; электрокардиограммы (ЭКГ) анализировали по общепринятой методике, включающей определение характера сердечного ритма, систолический показатель желудочков. Выполняли гематологический и биохимический (тестировали содержание белка и глюкозы) анализ крови. Для исследования слюны применяли колориметрический, хими- и биоломинесцентные методы. Показано повышение ЧСС и ЧДД, а также возрастание возбуждения предсердий и сокращение времени сердечной диастолы с увеличением интенсивности физических нагрузок. При этом гематологические и биохимические показатели изменялись в пределах нормы. Влияние слюны на интенсивность свечения биоломинесцентной реакции зависело от степени физической нагрузки. При физических нагрузках низкой и средней интенсивности величина остаточного свечения снижалась, при высокой интенсивности — возрастала. При физической нагрузке низкой интенсивности высокий процент ингибирования свечения коррелировал с увеличением концентрации общего белка ($r = 0,6$, $p = 0,05$), уменьшением содержания глюкозы ($r = -0,7$, $p = 0,05$) и количества эритроцитов ($r = -0,6$, $p = 0,05$) в крови. При физической нагрузке средней интенсивности усиление биоломинесцентного свечения коррелировало с возрастанием ЧДД ($r = 0,5$, $p = 0,1$) и удлинением интервала QRS ($r = 0,8$, $p = 0,05$). При физической нагрузке высокой интенсивности низкий процент ингибирования свечения коррелировал с содержанием лактата в слюне ($r = -0,58$, $p = 0,1$), снижением количества каталазы в слюне ($r = -0,7$, $p = 0,05$) и увеличением амплитуды зубца Р ($r = 0,8$, $p = 0,05$). Таким образом, биоломинесцентное тестирование слюны с использованием биферментной реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой, позволяет выявить влияние стрессовых физических нагрузок разной интенсивности на организм лошади. Степень ингибирования биоломинесцентного свечения определяется функциональным состоянием животного в тренинге. Такой интегральный показатель может применяться в спортивном коневодстве не только для контроля, но и для предупреждения спортивных перегрузок.

Ключевые слова: спортивные лошади, слюна, лактат, каталаза, NADH:FMN-оксидоредуктаза, люцифераза, бактериальная биоломинесценция, функциональное состояние, гематологические показатели, биохимия крови.

Современное отечественное коневодство представляет собой доста-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 19-416-240001.

точно устойчивую, хорошо структурированную отрасль сельского хозяйства, способную уверенно конкурировать как на мировом рынке конских ресурсов, так и среди животноводческих отраслей внутри страны (1-3). В современном мировом рейтинге спортивных лошадей питомцы российских конных заводов занимают достаточно высокое положение. Российские скакуны неоднократно были чемпионами, победителями международных соревнований по конному спорту в США, ОАЭ (4, 5). Во всем мире быстрыми темпами увеличивается численность лошадей и растет интерес к национальным породам (6-8).

Физиолого-клинические методы оценки функционального состояния спортивных лошадей объективны, но длительны и сложны в интерпретации (9-11). Физиологические исследования в целом не дают общей картины состояния лошади (12, 13). При этом сведения, представленные в литературе по нормативам физиологического состояния лошадей и в ветеринарных руководствах по клинической диагностике и конному спорту, весьма противоречивы. Например, имеются значительные расхождения в значениях основных физиолого-клинических показателей (температура, частота сердечных сокращений, количество дыхательных движений) и отсутствуют нормативы для оценки состояния спортивной лошади как во время покоя, так и после различной по напряжению мышечной работы (14, 15).

В настоящее время основные приемы спортивного коневодства подверглись значительной трансформации на основании принципов Welfare Quality®, согласно которым благополучие лошади становится объектом первостепенной значимости и никогда не должно быть подчинено соревновательным или коммерческим интересам (3, 16). В этой связи представляет интерес разработка неинвазивных методов оценки функционального состояния организма (17, 18). Использование слюны в качестве материала для исследований снимает ограничения на частоту и доступность измерений во время тренировочного или соревновательного процесса и позволяет создать удобный инструмент для ежедневной работы всадника, тренера, ветеринарного врача. Также возможен индивидуальный контроль оценки реакции организма на физическую нагрузку и корректировка тренировочного процесса под реакции спортивной лошади в режиме реального времени (19, 20).

В качестве скрининг-тестирования слюны спортивной лошади мы предлагаем использовать биолюминесцентный метод с применением бактериальной ферментативной системы (21, 22), который оказался эффективным в тестировании состояния организма человека (23, 24). Изменение свечения биолюминесцентной тест-системы при воздействии малого количества слюны может указать на отклонения в организме спортивных лошадей, возникающие в ответ на предельно допустимые нагрузки, и дать возможность всаднику перестроить процесс тренинга. Важная характеристика биолюминесцентного тестирования слюны лошадей — неинвазивность, что позволяет безболезненно и быстро проводить тесты во время тренировок.

В настоящей работе впервые показано, что изменение состояния организма спортивной лошади можно контролировать по интегральному биолюминесцентному показателю, который зависит от биохимического состава слюны.

Цель работы — оценить возможность использования биолюминесцентного метода для тестирования функционального состояния спортивных лошадей в тренинге.

Методика. Исследование было выполнено на группе спортивных ло-

шадей (*Eguus caballus*) тракененской породы ($n = 12$) со специализацией «выездка». Лошади содержались в стандартных условиях учебно-спортивного комплекса коневодства Красноярского ГАУ. Тестирование каждой лошади, сбор слюны и крови проводили до и после тренировок низкой, средней и высокой интенсивности в период подготовки к соревнованиям (февраль-июнь 2019-2020 годов).

Физическая нагрузка низкой интенсивности включала тренировку лошади в течение 1 ч, средней — 1,5 ч, высокой — 2 ч на корде или под седлом. Программа тренировок состояла из следующих этапов: 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.

Образцы слюны (1,0-1,5 мл) собирали в одноразовые стерильные пластмассовые пробирки. Отбор проб до нагрузки проводили в утренние часы (до кормления). После физической нагрузки слюну, которая образовывалась в достаточном количестве, отбирали непосредственно по завершении тренировки. В основном эта процедура никак не влияла на эмоциональное состояние лошадей.

Функциональное состояние животного оценивали по частоте дыхательных движений (ЧДД), частоте сердечных сокращений (ЧСС) и электрокардиограмме (ЭКГ). ЧДД определяли визуально, ЧСС — по ЭКГ на электрокардиографе ЭКЗТ-01-Р-Д («Монитор», Россия). ЭКГ снимали в трех стандартных и трех усиленных отведениях от конечностей. Анализ ЭКГ проводили по общепринятой методике, включающей определение характера сердечного ритма: систолический показатель желудочков (СПЖ), высоту и ширину зубцов и продолжительность интервалов (25).

Гематологические исследования выполняли по общепринятой методике с подсчетом эритроцитов и лейкоцитов в камере Горяева, содержание гемоглобина определяли по методу Н. Sahli (25). Биохимический анализ сыворотки крови проводили по общепринятой методике, измеряли содержание белка и глюкозы (25).

Перед исследованием слюны образцы центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин (центрифуга Eppendorf Centrifuge 5810 r, «Eppendorf», Германия).

Концентрацию лактата (молочной кислоты) в образцах слюны измеряли фотометрическим методом (колориметрирование) в соответствии с описанием (26, 27) на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония).

Хемилюминесцентное и биолюминесцентное тестирование слюны выполняли на планшетном люминометре TriStar LB 941 («Berthold Technologies», Германия).

Активность каталазы в слюне определяли H_2O_2 -люминол-зависимым хемилюминесцентным методом с использованием 25 мкл люминола («AppliChem», Германия) и 25 мкл 3 % пероксида водорода (H_2O_2) («MCD Chemical», Россия) (28). Регистрировали динамику свечения в присутствии слюны в течение 5 мин. При анализе активности фермента учитывали время начала хемилюминесцентной реакции (t_0), максимальную интенсивность хемилюминесцентной реакции (I_{max}), максимальную площадь хемилюминесцентной кривой (S_{max}).

При биолюминесцентном тестировании слюны использовали биферментную систему NADH:FMN-оксидоредуктаза + люцифераза, входящую в комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ) (Институт биофизики СО РАН, Красноярск). Комплект содержит лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов люциферазы ЕС 1.14.14.3

(0,4 мг/мл) из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и NADH:FMN-оксидоредуктазы ЕС 1.5.1.29 (*Photobacterium leiognathi*) (0,18 ед. активности). Состав реакционной смеси для биолюминесцентной реакции был следующим: 80 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (pH 6,8-7,0), 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). В ячейку планшета 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. Интенсивность свечения измеряли в двух повторностях. По отношению средней максимальной интенсивностей биолюминесценции экспериментального измерения (I) к контрольному (I₀) рассчитывали величину остаточного свечения (Т, %).

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 («StatSoft, Inc.», США) с подсчетом медианы (Me) и интерквартильных разбросов (С₂₅-С₇₅ перцентили). Различия между показателями зависимых выборок оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test), корреляционную связь — по ранговому критерию Спирмена (Spearman's rank correlation coefficient). Уровень достоверной значимости $p \leq 0,1$.

Результаты. Тестирование функциональных показателей организма спортивных лошадей в тренинге выявило тенденции к достоверному повышению ЧДД ($p = 0,1$) и ЧСС ($p = 0,1$) при возрастании физических нагрузок от низкой к высокой относительно значений, полученных до тренировки (рис. 1).

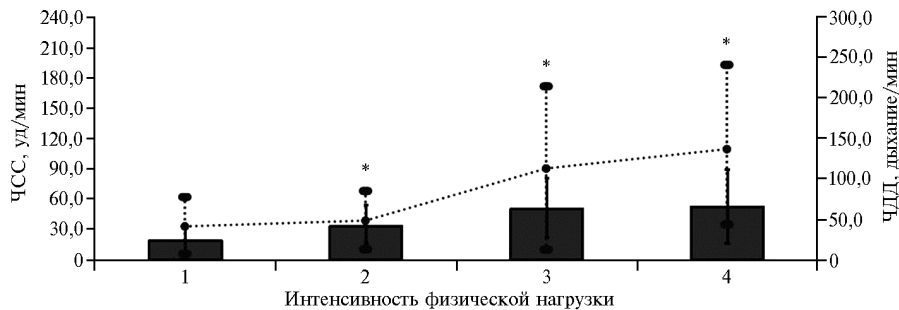


Рис. 1. Частота сердечных сокращений (ЧСС, график) и дыхательных движений (ЧДД, диаграмма) у спортивных лошадей (*Equus caballus*) тракененской породы в зависимости от интенсивности физических нагрузок: 1 — до тренировок, 2 — низкая, 3 — средняя, 4 — высокая интенсивность. Приведены медиана (Me) и перцентили (С₂₅-С₇₅) ($n = 12$).

* Различия относительно значения до тренировок ($p = 0,1$).

Сердечный ритм исследуемых лошадей оставался синусовым регулярным. До начала тренировок электрокардиологические показатели соответствовали средним нормативным.

Физическая нагрузка низкой интенсивности повышала амплитуды зубца Р до 4,0 мм (3,0-4,0 мм) и зубца R до 13,0 мм (12,0-14,0 мм) относительно показателей до тренировок. Также отмечалось укорочение интервалов P-Q до 0,07 с (0,06-0,1 с), QRS — до 0,06 с (0,06-0,08 с), QPST — до 0,5 с (0,5-0,5 с), TP — до 0,6 с (0,5-0,8 с), RR — до 1,3 с (1,0-1,5 с). СПЖ — до 36,1 % (31,1-46,2 %). Физическая нагрузка средней интенсивности не изменяла амплитуду зубца Р, которая равнялась 2,0 мм (2,0-2,0 мм), и увеличивала амплитуду зубца R до 11,0 мм (7,0-12,0 мм) относительно показателей до тренировок. Регистрировали также укорочение интервалов QPST

до 0,4 с (0,4-0,5 с), TP — до 0,4 с (0,01-0,7 с), RR — до 1,2 с (1,1-1,5 с). СПЖ возрастал до 35,9 % (33,3-37,0 %). Физическая нагрузка высокой интенсивности повышала амплитуды зубца P до 4,0 мм (4,0-4,0 мм) и зубца R до 24,0 мм (23,0-26,0 мм) относительно показателей до тренировок. Также укорачивались интервалы TP до 0,2 с (0,2-0,2 с), RR до 0,9 с (0,8-0,9 с). СПЖ возрастал до 49,3 % (31,0-46,9 %).

При физической нагрузке малой интенсивности систолический показатель (зубец P) у лошадей возрастал ($p = 0,004$) относительно такового при нагрузке средней интенсивности. Физическая нагрузка большой интенсивности влияла на систолические и диастолические показатели. Происходило статистически значимое повышение амплитуды зубцов P ($p = 0,0043$) и R ($p = 0,0043$) и сокращение интервалов P-Q ($p = 0,0043$), TP ($p = 0,017$) и RR ($p = 0,017$) относительно соответствующих значений при нагрузке средней интенсивности.

Гематологические и биохимические показатели находились в диапазоне физиологической нормы как до тренировок, так и после физических нагрузок. Количество гемоглобина повышалось до 14,0 г% (11,8-15,6 г%) при нагрузке низкой интенсивности и до 13,1 г% (11,8-13,8 г%) — при высокой интенсивности. Содержание эритроцитов снижалось с повышением нагрузки — до 10,0 млн/мкл (8,6-11,8 млн/мкл) при ее низкой интенсивности и до 7,5 млн/мкл (7,2-9,0 млн/мкл) при средней и высокой интенсивности. Число лейкоцитов, наоборот, возрастало до 5,7 тыс/мкл (4,1-5,8 тыс/мкл) при нагрузке низкой, до 6,8 тыс/мкл (5,9-8,1 тыс/мкл) — средней и до 8,3 тыс/мкл (7,9-9,8 тыс/мкл) — высокой интенсивности. Отмечалось увеличение концентрации общего белка и снижение — глюкозы с возрастанием физической нагрузки. Показатель общего белка после нагрузки низкой, средней и высокой интенсивности составил соответственно 64,4 г/л (61,8-65,1 г/л), 62,5 г/л (60,9-63,6 г/л) и 66,9 г/л (63,9-66,9 г/л), глюкозы — 4,9 ммоль/л (4,8-5,1 ммоль/л) для низкой, 4,4 ммоль/л (4,1-4,8 ммоль/л) для средней и высокой интенсивности. Статистически значимых различий в изменении количественного состава клеток, концентраций общего белка и глюкозы в зависимости от интенсивности нагрузок мы не обнаружили.

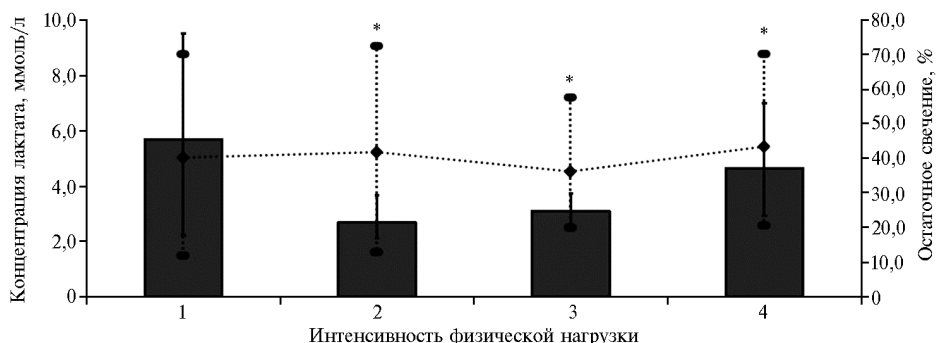


Рис. 2. Остаточное свечение (диаграмма) и концентрация лактата (график) в слюне у спортивных лошадей (*Eguus caballus*) тракененской породы в зависимости от интенсивности физических нагрузок: 1 — до тренировок, 2 — низкая, 3 — средняя, 4 — высокая интенсивность. Приведены медиана (*Me*) и перцентили ($C_{25}-C_{75}$) ($n = 12$).

* Различия относительно значения до тренировок ($p = 0,1$).

Концентрация лактата в слюне имела тенденцию к росту при физических нагрузках низкой и высокой интенсивности и составила 5,2 ммоль/л (4,7-5,9 ммоль/л) и 5,4 ммоль/л (3,8-7,2 ммоль/л), а при средней нагрузке соответствовала показателям, полученным до тренировки — 4,5 ммоль/л (3,8-5,0 ммоль/л) и 5,0 ммоль/л (4,1-5,4 ммоль/л) (рис. 2).

Результаты тестирования слюны также показали зависимость биолюминесцентного свечения от физической нагрузки. Была выявлена тенденция к его уменьшению относительно показателей до тренировки при физической нагрузке низкой интенсивности с последующим возрастанием при повышенной нагрузке (см. рис. 2). Полагаем, что величина тушения биолюминесцентного свечения при физической нагрузке разной интенсивности обусловлена изменением метаболического состава слюны, которое вызвано функциональным состоянием организма лошади при выполнении нагрузок.

При низких, средних и высоких физических нагрузках активировалась выработка каталазы относительно показателей до тренировки. Наибольшую интенсивность люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения наблюдали при низкой нагрузке, тогда как минимальная приходилась на высокую нагрузку. Статистически значимое повышение интенсивности люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения слюны свидетельствовало об усилении процессов свободнорадикального окисления (рис. 3).

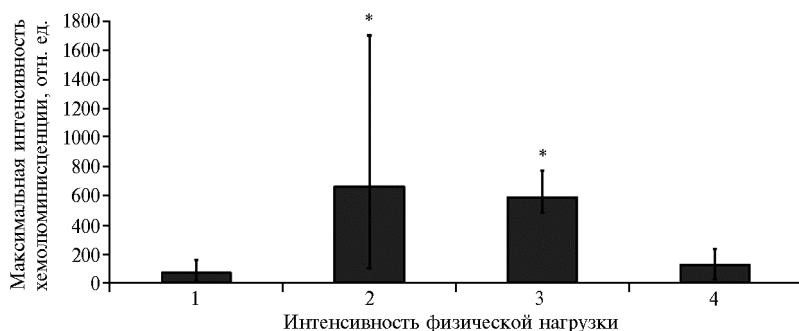


Рис. 3. Интенсивность люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения (в присутствии H_2O_2) в слюне у спортивных лошадей (*Eguus caballus*) тракененской породы в зависимости от интенсивности физических нагрузок: 1 — до тренировок, 2 — низкая, 3 — средняя, 4 — высокая интенсивность. Приведены медиана (*Me*) и перцентили (C_{25} - C_{75}) ($n = 12$).

* Различия относительно значения до тренировок ($p = 0,1$).

Таким образом, у лошадей с возрастанием физических нагрузок функциональные показатели организма повышались, что указывало на активацию дыхательной, сердечно-сосудистой и ферментативной систем в тренинге. Возбуждение предсердий и сокращение времени сердечной диастолы при физических нагрузках свидетельствовало о быстром кровяном заполнении желудочковых объемов сердца, что объяснялось интенсивной работой скелетных мышц. Высокая физическая нагрузка, в отличие от малой, увеличивала скорость распространения возбуждения по мышцам правого и левого желудочка, что характеризовало интенсивную работу здорового сердца лошади в состоянии активного тренинга (29).

Сообщалось, что у выносливых спортивных лошадей гематологические показатели и биохимический состав слюны связаны с сердечным ритмом (30, 31). Наши результаты клинического анализа крови спортивных лошадей тракененской породы подтвердили изменение гематологических показателей в связи с частотой сердечных сокращений или ЧДД при выполнении физических нагрузок. Однако выявленные изменения оставались в пределах нормы, что свидетельствовало о хорошем функциональном состоянии лошадей (30) или, возможно, о высокой степени их подготовленности. Последний факт не отмечен в других исследованиях, поскольку в них рассматривалось влияние физических нагрузок одной интенсивности.

Исследования скаковых лошадей с низкой работоспособностью в

Италии и на Украине показали, что повышенная интенсивность нагрузки влияла на изменение проницаемости кардиомиоцитов и выход ферментов в кровь (32, 33). В наших опытах физические нагрузки разной интенсивности вызывали изменение концентрации глюкозы и общего белка в сыворотке крови, то есть влияли на динамику углеводного обмена (30).

В аналогичных исследованиях лошадей различной спортивной специализации в разные периоды тренировочного цикла было отмечено повышение концентраций лактата и пирувата в крови (11, 12, 32). Наши данные показывают, что в слюне лошадей концентрация лактата оставалась стабильной при низких и высоких нагрузках. Повышение максимальной концентрации лактата с увеличением нагрузки может быть обусловлено недостаточным насыщением организма кислородом, что указывает на низкую работоспособность лошади (8, 11, 32). Следовательно, отмеченное нами стабильное повышение концентрации лактата во время тренинга низкой и высокой интенсивности по сравнению с показателем до тренировки указывало на отсутствие гипоксии и свидетельствовало о высокой тренированности лошадей.

О преодолении организмом лошадей высоких физических нагрузок судят по изменению активности каталазы, которая характеризует состояние окислительных систем и процессы аэробного окисления (14). На лошадях разных пород установлено, что по сниженной, повышенной или разнонаправленной динамике содержания каталазы можно оценивать действующую физическую нагрузку (17-19). Мы выявили усиление выработки каталазы слюны у лошадей при повышении интенсивности физической нагрузки, что можно объяснить активацией свободнорадикальных процессов вследствие окислительного стресса.

Согласно представленным данным, слюна лошадей так же информативна для анализа функционального состояния организма, как кровь. Слюна как динамичная биологическая жидкость быстро изменяет свой состав в зависимости от возрастания физических нагрузок (14, 31). Биолоуминесцентный показатель совокупно учитывает такие изменения. Чтобы выявить факторы, определяющие интенсивность биолоуминесцентного свечения слюны при физических нагрузках и выступающие в качестве причин его изменения, мы проанализировали корреляционные зависимости между величиной остаточного свечения и полученными нами функциональными показателями, гемодинамикой сердца, результатами биохимического анализа сыворотки крови и содержанием лактата и каталазы в слюне.

При физической нагрузке низкой интенсивности высокий процент ингибирования свечения коррелировал с возрастанием концентрации общего белка ($r = 0,6$, $p = 0,05$), уменьшением содержания глюкозы ($r = -0,7$, $p = 0,05$) и количества эритроцитов ($r = -0,6$, $p = 0,05$) в крови. При физической нагрузке средней интенсивности усиление биолоуминесцентного свечения коррелировало с возрастанием ЧДД ($r = 0,5$, $p = 0,1$) и удлинением интервала QRS ($r = 0,8$, $p = 0,05$). При физической нагрузке высокой интенсивности низкий процент ингибирования свечения коррелировал с содержанием лактата в слюне ($r = -0,58$, $p = 0,1$), снижением количества каталазы в слюне ($r = -0,7$, $p = 0,05$) и увеличением амплитуды зубца P ($r = 0,8$, $p = 0,05$).

Итак, биолоуминесцентное тестирование слюны лошадей в тренинге с использованием биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза + люцифераза показало, что наблюдаемая интенсивность свечения взаимосвязана с изменением концентрации метаболитов в слюне и зависит от физической нагрузки, которую испытывает животное. Величина остаточ-

ного свечения уменьшается при низкой физической нагрузке и увеличивается — при высокой. Обнаружено, что интенсивность свечения коррелирует с концентрацией каталазы и лактата в слюне. Таким образом, доказана возможность неинвазивного тестирования спортивных лошадей по реакции слюны для оценки воздействия физической нагрузки на их организм в тренинге. Полученные предварительные результаты позволяют оценить физиологическое состояние лошадей при физических нагрузках разного объема и интенсивности.

¹ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет,
660041 Россия, г. Красноярск, пр. Свободный, 79,
e-mail: liubovs23@mail.ru, olga.kolesnik.krsk@gmail.com,
slyudmila@mail.ru, kalina-chyikova@mail.ru, andmak83@yandex.ru,
valkrat@mail.ru;

Поступила в редакцию
5 мая 2021 года

²ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение
НИИ медицинских проблем Севера,
660022 Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,
e-mail: kalina-chyikova@mail.ru;

³ФГБОУ ВО Красноярский государственный
аграрный университет,
660049 Россия, г. Красноярск, пр. Мира, 90,
e-mail: krasfas@mail.ru, avk1978@list.ru;

⁴ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение
Институт биофизики СО РАН,
660036 Россия, г. Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2021, V. 56, № 6, pp. 1199-1208

BIOLUMINESCENT SPORT HORSE SALIVA TEST: PROSPECTS FOR USE

L. Yu. Shtumpf¹, O. V. Kolesnik^{1, 4}, L. V. Stepanova¹ ✉, O. A. Kolenchukova^{1, 2},
A. S. Fedotova³, A. V. Kolomeytsev³, A. V. Makarov¹, V. A. Kratasyuk^{1, 4}

¹Siberian Federal University, 79, pr. Svobodnii, Krasnoyarsk, 660041 Russia, e-mail liubovs23@mail.ru, olga.kolesnik.krsk@gmail.com, slyudmila@mail.ru (✉ corresponding author), kalina-chyikova@mail.ru, andmak83@yandex.ru, valkrat@mail.ru;

²Research Institute of Medical Problems of the North — Subdivision of Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS, 3G, ul. Partizana Zheleznyaka, Krasnoyarsk, 660022 Russia, e-mail kalina-chyikova@mail.ru;

³Krasnoyarsk State Agrarian University, 90, pr. Mira, Krasnoyarsk, 660049 Russia, e-mail krasfas@mail.ru, avk1978@list.ru;

⁴Institute of Biophysics SB RAS — Subdivision of Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS, 50/50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

ORCID:

Shtumpf L.Yu. orcid.org/0000-0001-6055-963X

Fedotova A.S. orcid.org/0000-0003-1630-2444

Kolesnik O.V. orcid.org/0000-0002-4637-875X

Kolomeytsev A.V. orcid.org/0000-0002-2203-3415

Stepanova L.V. orcid.org/0000-0001-5503-4898

Makarov A.V. orcid.org/0000-0002-2593-207X

Kolenchukova O.A. orcid.org/0000-0001-9552-447X

Kratasyuk V.A. orcid.org/0000-0001-6764-5231

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Funded by the Russian Foundation for Basic Research and the Krasnoyarsk Regional Science Foundation, project No. 19-416-24001

Received May 5, 2021

doi: 10.15389/agrobiol.2021.6.1199eng

Abstract

Assessment of the physiological state of horses in training is a relevant problem of sport horse breeding worldwide. Existing clinical methods do not provide reliable parameters of the functional state of animals at rest and in physical activity. The reported standards of the physiological state of horses and veterinary guidelines for clinical diagnosis and equestrian sports are contradictory. Therefore, objective tests are necessary to assess the body's response to physical activity. We propose simple, fast, non-invasive method based on an inhibitory effect of saliva on the enzyme activity of luminous bacteria as a screening testing. Changes in the luminescence of the bioluminescent enzymatic system under influence of small amounts of saliva can reveal changes in the body of sport horses as a response to the maximum permissible loads. This study proves for the first time that the bioluminescent enzyme test can track changes in the body condition of sport horses during training. The method uses the

integral bioluminescent indicator which depends on the biochemical composition of saliva. The aim of this study is to substantiate suitability of the bioluminescent-based method for testing the functional state of sports horses in training. Trakenen sport horses (*Eguus caballus*) for dressage ($n = 12$) kept under standard conditions in the Training Center of Horse Breeding Complex (Krasnoyarsk State Agrarian University) were subjected to low, medium and high intensity training before the competition (February-June 2019-2020). Saliva and blood were sampled before (in the morning) and after training. The respiratory rate (RR) and heart rate (HR) were measured. The electrocardiography (ECG) was carried out according to a common method, including assessment of the heart rhythm parameters and the ventricular systolic functional parameters. Hematological tests were performed, and blood concentrations of protein and glucose were measured. The saliva was tested by colorimetric, chemi-, and bioluminescent methods. As the intensity of physical activity increased, there was an increase in heart rate, respiration rate, atrial excitation and a decrease in the time of cardiac diastole while hematological and biochemical blood parameters varied within normal limits. The effect of saliva on the intensity of bioluminescence depended on the physical activity. The residual luminescence signal decreased under low and medium intensity training and increased under high intensity training. During low intensity training, a high percentage of luminescence inhibition correlated with an increase in the total blood protein concentration ($r = 0.6$, $p = 0.05$) and a decrease in the blood glucose content ($r = -0.7$, $p = 0.05$) and the number of erythrocytes ($r = -0.6$, $p = 0.05$). Under moderate physical activity, an increase in bioluminescent fluorescence correlated with an increase in RR ($r = 0.5$, $p = 0.1$) and in the QRS interval ($r = 0.8$, $p = 0.05$). Under high intensity training, a low percentage of luminescence inhibition correlated with the lactate concentration in saliva ($r = -0.58$, $p = 0.1$), a reduction in catalase activity in saliva ($r = -0.7$, $p = 0.05$), and a higher amplitude of the P wave on the electrocardiogram ($r = 0.8$, $p = 0.05$). Therefore, the bioluminescent analysis of saliva using a coupled enzyme system, NADH:FMN-oxidoreductase and bacterial luciferase can detect the effect of stressful physical activity during horse training of various intensity. The inhibition of bioluminescence can be an indicator of a horse performance in training. The test can be also applicable in sport horse breeding to prevent overtraining.

Keywords: sport horses, saliva, lactate, catalase, NADH:FMN-oxidoreductase, luciferase, bacterial bioluminescence, functional status, hematological parameters, blood biochemistry.

REFERENCES

1. Korobko A.V., Rachikova O.V. *Aktual'nye problemy intensivnogo razvitiya zhitovnovodstva*, 2013, 16(2): 3-10 (in Russ.).
2. Lutsenko M.V., Petrushko N.P. *Aktual'nye problemy intensivnogo razvitiya zhitovnovodstva*, 2016, 19(1): 281-289 (in Russ.).
3. German Yu.I., Gorbukov M.A., Rudak A.N., Sadykov E.V. *Konevodstvo i konnyi sport*, 2019, 5: 37-40 (in Russ.).
4. Zarubezhnye gastroli rossiiskikh skakunov. *Zolotoi mustang*, 2000, 6. Available: <http://www.gold-mustang.ru/magazine/ippodrom/234.html>. Accessed: 15.06.2020 (in Russ.).
5. de Mare L., Boshuizen B., Plancke L., de Meeus C., de Bruijn M., Delesalle C. Standardized exercise tests in horses: current situation and future perspectives. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2017, 86(2): 63-72 (doi: 10.21825/vdt.v86i2.16290).
6. Allen K.J., van Erck-Westergren E., Franklin S.H. Exercise testing in the equine athlete. *Equine Veterinary Education*, 2016, 28(2): 89-98 (doi: 10.1111/eve.12410).
7. Munsters C.C.B.M., van den Broek J., Welling E., van Weeren R., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M. Prospective study on a cohort of horses and ponies selected for participation in the European Eventing Championship: reasons for withdrawal and predictive value of fitness tests. *BMC Veterinary Research*, 2013, 9(1): 182 (doi: 10.1186/1746-6148-9-182).
8. Kabasova I.A., Petrushko N.P. *Aktual'nye problemy intensivnogo razvitiya zhitovnovodstva*, 2018, 21(2): 306-312 (in Russ.).
9. Hartmann E., Søndergaard E., Keeling L.J. Keeping horses in groups: a review. *Applied Animal Behaviour Science*, 2012, 136(2-4): 77-87 (doi: 10.1016/j.applanim.2011.10.004).
10. Stefánsdóttir G.J., Ragnarsson S., Gunnarsson V., Jansson A. Physiological response to a breed evaluation field test in Icelandic horses. *Animal*, 2014, 8(3): 431-439 (doi: 10.1017/S1751731113002309).
11. Stefánsdóttir G.J., Ragnarsson S., Gunnarsson V., Roepstorff L., Jansson A. A comparison of the physiological response to tölt and trot in the Icelandic horse. *Journal of Animal Science*, 2015, 93(8): 3862-3870 (doi: 10.2527/jas.2015-9141).
12. Larsson J., Pilborg P.H., Johansen M., Christophersen M.T., Holte A., Roepstorff L., Olsen L.H., Harrison A.P. Physiological parameters of endurance horses precompared to post-race, correlated with performance: a two race study from Scandinavia. *International Scholarly Research Notices. Veterinary Science*, 2013, 2013: 684353 (doi: 10.1155/2013/684353).

13. Janczarek I., Wilk I., Zalewska E., Bocian K. Correlations between the behavior of recreational horses, the physiological parameters and summer atmospheric conditions. *Animal Science Journal*, 2015, 86(7): 721-728 (doi: 10.1111/asj.12343).
14. Strzelec K., Kankofer M., Pietrzak S. Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise. *Acta Veterinaria Brno*, 2011, 80(1): 101-105 (doi: 10.2754/avb201180010101).
15. Costa E.D., Dai F., Lebelt D., Scholz P., Barbieri S., Canali E., Zanella A.J., Minero M. Welfare assessment of horses: the AWIN approach. *Animal Welfare*, 2016, 25(4): 481-488 (doi: 10.7120/09627286.25.4.481).
16. Denoix J.-M. *Biomechanics and physical training of the horse*. Manson Publishing Ltd, London, United Kingdom, 2014.
17. Munk R., Jensen R.B., Palme R., Munksgaard L., Christensen J.W. An exploratory study of competition scores and salivary cortisol concentrations in Warmblood horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 2017, 61: 108-116 (doi: 10.1016/j.domaniend.2017.06.007).
18. Janczarek I., Bereznowski A., Strzelec K. The influence of selected factors and sport results of endurance horses on their saliva cortisol concentration. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2013, 16(3): 533-541 (doi: 10.2478/pjvs-2013-0074).
19. Kędzierski W., Cywińska A., Strzelec K., Kowalik S. Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Animal Science Journal*, 2014, 85(3): 313-317 (doi: 10.1111/asj.12146).
20. Palm A.E., Watte O., Lundström T., Watrang E. Secretory immunoglobulin A and immunoglobulin G in horse saliva. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2016, 180: 59-65 (doi: 10.1016/j.vetimm.2016.09.001).
21. Sorokina E.V., Zarubina A.P. *Uspekhi sovremennoi biologii*, 2017, 137(6): 613-620 (doi: 10.7868/s0042132417060084) (in Russ.).
22. Esimbekova E.N., Torgashina I.G., Kalyabina V.P., Kratasyuk V.A. Enzymatic biotesting: scientific basis and application. *Contemporary Problems of Ecology*, 2021, 14(3): 290-304 (doi: 10.1134/S1995425521030069).
23. Kratasyuk V., Esimbekova E. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2015, 18(10): 952-959 (doi: 10.2174/1386207318666150917100257).
24. 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, 36(2): 384-390 (doi: 10.1002/bio.3954).
25. Kovalev S.P., Kurdeko A.P., Bratushkina E.L., Volkov A.A. *Klinicheskaya diagnostika vnutrennikh boleznei zhivotnykh* [Clinical diagnostics of internal diseases of animals]. St. Petersburg, 2016 (in Russ.).
26. Marchik L.A., Martynenko O.S. Effectiveness of different variants of getting sportsmen's skin extract for identifying the concentration of lactate. *Austrian Journal of Technical and Natural Sciences*, 2015, 3-4: 7-9.
27. Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Kalinina A.N., Sineokii S.P. Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 71(8): 755-758 (doi: 10.1134/S1061934816080037).
28. Vinnik Yu.S., Savchenko A.A., Per'yanova O.V., Teplyakova O.V., Yakimov S.V., Teplyakov E.Yu., Meshkova O.S. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*, 2006, 3(40): 3-6 (in Russ.).
29. Chernenok V.V., Simonova L.N., Simonov Yu.I. *Vestnik FGOU VPO Bryanskaya GSKHA*, 2017, 3(61): 41-44 (in Russ.).
30. Andriichuk A.V., Tkachenko G.M., Tkachova I.V. *Izvestiya KGTU*, 2016, 43: 145-153 (in Russ.).
31. Contreras-Aguilar M.D., Cerón J.J., Muñoz A, Ayala I. Changes in saliva biomarkers during a standardized increasing intensity field exercise test in endurance horses. *Animal*, 2021, 15(6): 100236 (doi: 10.1016/j.animal.2021.100236).
32. Maksymovych I., Slivinska L. Metabolic responses in endurance horses at exhausted syndrome. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 2018, 1(1): 17-22 (doi: 10.32718/ujvas1-1.03).
33. Alberti E., Stucchi L., Lo Feudo C.M., Stancari G., Conturba B., Ferrucci F., Zucca E. Evaluation of cardiac arrhythmias before, during, and after treadmill exercise testing in poorly performing standardbred racehorses. *Animals*, 2021, 11(8): 2413 (doi: 10.3390/ani11082413).