УДК 619: 616.155.392: 636.2

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ЗА ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

*Я. В. Кісера**

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Ґжицького

З метою з'ясування динаміки змін, їх взаємозалежності у здорової, інфікованої і хворої лейкозом великої рогатої худоби проведені гематологічні, імунологічні та біохімічні дослідження, що дало можливість прослідкувати за змінами в процесі розвитку запального процесу при лейкозі.

Висока продуктивність тваринництва вимагає обґрунтованого впливу на процеси обміну речовин та розробку методів цілеспрямованого впливу на організм тварин, які розкривають механізм метаболіту у них. Поряд з цим розуміння цих процесів відіграє важливу роль у розшифруванні механізмів виникнення захворювань сільськогосподарських тварин, зокрема захворювань пухлинної природи. Виникнення і розвиток лейкозу пов'язує цілий комплекс морфологічних, цитологічних, імунологічних, біохімічних та інших проявів і реакцій в організмі, механізм яких остаточно ще не вияснений (Кукайн Р. А., 1979; Садаускас П. Б., 1979; Кудрявцева Т. П., 1980; Мандигра М. С.,1998, 2000, 2002; Кісера Я. В., 2000, 2003, 2004).

Кров і кровотворні органи являють собою дуже складну морфологічну і функціональну систему тваринного організму. Склад крові досить повно відображає інтенсивність і характер обміну речовин та функціональний стан організму тварин.

У раніше проведених дослідженнях на хворій лейкозом великій рогатій худобі були представлені результати фізіолого-біохімічних змін у крові, що послужило основою на виділення наступних стадій лейкозного процесу — передлейкозна, рання й активна, що дещо суперечило класичним підходам щодо стадійності, які прийняті вченими лейкозологами.

Отже, метою досліджень було дослідити показники фізіологічного статусу на здоровій, інфікованій (РІД позитивні) і гематологічно хворій лейкозом великій рогатій худобі.

Матеріали і методи. Були проведені дослідження на 24-х клінічно здорових, інфікованих та гематологічно хворих лейкозом коровах молочної чорно-рябої породи, віком 5–8 років.

Для дослідження брали цільну кров з яремної вени (як антикоагулянт використовували 1 % розчин гепарину) і молоко. Досліджували склад периферійної крові, появу чи відсутність антитіл до вірусу лейкозу. У піддослідних тварин гематологічні та серологічні дослідження на лейкоз проводили згідно з «Методическими указаниями по диагностике лейкоза крупного рогатого скота», затвердженими в 1985 році [1]. Наявність інфекції вірусу лейкозу встановлювали виявленням специфічних антитіл за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА), полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і реакції імунодифузії в агаровому гелі з лейкозним антигеном (РІД). Концентрацію загального білка сироватки крові визначали з допомогою рефрактометра УРФ-22 [2], у знежиреному молоці і в сироватці молока — методом Лоурі в модифікації Ж. В. Шишкової [2], співвідношення білкових фракцій досліджували методом електрофорезу [3]. Кількісне визначення імуноглобулінів проводили методом радіальної імунодифузії в гелі [4]. Дослідження циклічних імунних комплексів проводили за методом В. В. Меншикова [5]. Кількість Т- і В-лімфоцитів визначали в реакції спонтанного і комплементарного розеткоутворення [6]. В гідролізатах сироватки молока корів визначали замінні і незамінні амінокислоти [7].

Для визначення активності ферментів як антикоагулянт крові використовували 5 М оксалат калію. Еритроцити одержували шляхом центрифугування крові при 6000 об./хв.

протягом 15 хвилин. Еритроцити гемолізували, гемолізат використовували для інкубації. У фільтратах визначали Г-6-Ф за Hohorstom H. J. [8]; утворення Ф-1,6-Ф і тріоз — за Lowzer R. B., Rowland L. P., Bank W. J. [9]; утворення дефосфорильованої фруктози — за методом Kulka R. J. [10]; неорганічний фосфат — за Lowry O. H., Lopez J. A. [11]. Активність ФФК визначали за утворенням Ф-1,6-Ф і тріоз, активність альдолази — за утворенням тріоз, активність глюкозофосфатізомерази — за утворенням Г-6-Ф, АТФ-азну активність — за утворенням неорганічного фосфату, активність фосфатази Ф-6-Ф — за утворенням дефосфорильованої фруктози. Проведені розрахунки співвідношення Г-6-Ф/Ф-6-Ф. Одержані цифрові дані опрацьовували статистично. Результати середніх значень вважали статистично вірогідними при $P < 0,001$ — *; при $P < 0,01$ — **; при $P < 0,05$ — ***.

Результати та обговорення. Результати гематологічних досліджень показали (табл. 1), що рівень гематокриту, лейкоцитів, лімфоцитів підвищується у інфікованих і

Таблиця 1

Морфологічні показники крові великої рогатої худоби на різних стадіях лейкозного процесу (M±m, n=8)

Назва показників		Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно хворі тварини
Гематокрит		%	38,0±0,900	*45,6±0,635	*49,0±0,894
Еритроцити		$\cdot 10^{12}$/л	7,04±0,212	5,85±0,693	*4,80±0,332
Лейкоцити		$\cdot 10^{9}$/л	7,81±1,129	*16,37±0,270	*97,56±9,306
Гемоглобін		г/л	96,3±11,891	96,87±3,966	***68,90±7,391
Швидкість осідання еритроцитів		мм/год	1,50±0,120	1,67±0,357	2,0±0,988
Формула : бласти	Паличкоядерні	%	5,0±0,216	5,4±0,288	*0,80±0,047
	Сегментоядерні	%	22,0±0,371	**19,3±0,645	*16,0±0,774
	Еозинофільні	%	7,0±0,283	*3,93±0,188	*0,40±0,077
	Моноцити	%	6,0±0,305	*4,33±0,173	*1,0±0,122
	Лімфоцити	%	60,0±0,666	*67,0±0,860	*81,80±0,707

хворих лейкозом корів у порівняні зі здоровими тваринами, тоді як кількість еритроцитів, сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів знижується. Спостерігається зниження гемоглобіну і паличкоядерних нейтрофілів у хворих тварин у порівняні з інфікованими і здоровими тваринами.

Кількість загального білка в сироватці крові (табл. 2.) здорових корів 8,12 г/%.

Таблиця 2

Загальний білок і білкові фракції сироватки крові на різних стадіях лейкозного процесу (M±m, n=8)

Показники	Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно хворі тварини
Загальний білок	г/%	8,120 ± 0,691	7,633 ± 0,538	7,060 ± 0,734
Глобуліни	г/%	4,950 ± 0,178	4,560 ± 0,526	***3,860 ± 0,331
Гамма-глобуліни	г/%	3,040 ± 0,695	2,620 ± 0,490	2,100 ± 0,635

У хворих лейкозом корів відмічається тенденція до його зниження, що складає в гематологічно хворих тварин 7,06 г%. Аналіз показників білкових фракцій показав, що спостерігається зниження глобулінів і гамм-глобулінів на всіх стадіях лейкозного процесу.

Динаміка змін загального білка і білкових фракцій у молоці (табл. 3.) засвідчила, що кількість загального білка в молоці і в сироватці молока знижується на всіх стадіях лейкозного процесу. З показників білкових фракцій сироватки молока суттєві зміни виявлені

у вмісті альфа-лактоальбумінів, кількість яких у інфікованих і гематологічно хворих тварин зменшується порівняно із здоровими тваринами.

Таблиця 3

Загальний білок і білкові фракції молока корів на різних стадіях лейкозного процесу (M±m, n=8)

Показники	Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно хворі тварини
Загальний білок молока	г/%	3,210 ± 0,115	2,938 ± 0,235	2,580 ± 0,364
Загальний білок сироватки молока	г/%	0,930 ± 0,031	0,881 ± 0,049	*0,720 ± 0,022
Альфа-лакто-альбуміни сироватки молока	г/%	0,187 ± 0,025	0,173 ± 0,032	0,157 ± 0,028

За характером кількісних змін амінокислот у групах досліджуваних корів у динаміці розвитку лейкозного процесу можна виділити наступні особливості (табл. 4. і 5.):

— по-перше, збільшення кількості аланіну, гліцину, серину, лізину у інфікованих тварин з наступним зниженням їх показників у гематологічно хворих тварин;

— по-друге, спостерігається наростання кількості аспарагінової і глутамінової кислот, метіоніну, валіну, цистеїну, лейцину, ізолейцину і фенілаланіну в сироватці молока в інфікованих тварин і у гематологічно хворих тварин зниження їх рівня нижче показників здорових тварин, тоді як кількість треоніну в гематологічно хворих тварин вища від показників здорових тварин.

Таблиця 4

Незамінні амінокислоти сироватки молока корів на різних стадіях лейкозного процесу (M±m, n=8)

Показники	Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно Хворі тварини
Аргінін	мг/%	71,48 ± 0,488	**69,10 ± 0,396	*44,19 ± 0,394
Валін	-“-	43,88 ± 0,329	*53,44 ± 0,352	*50,05 ± 0,435
Ізолейцин	-“-	70,64 ± 0,398	*73,51 ± 0,428	*40,72 ± 0,554
Лейцин	-“-	79,14 ± 0,354	*81,97 ± 0,426	*55,46 ± 0,362
Лізин	-“-	103,21 ± 0,316	*116,91 ± 0,441	*68,33 ± 0,328
Метіонін	-“-	39,67 ± 0,291	*49,23 ± 0,309	*45,84 ± 0,258
Треонін	-“-	36,85 ± 0,205	*41,79 ± 0,257	*44,31 ± 0,386
Фенілаланін	-“-	57,72 ± 0,248	*60,78 ± 0,238	*42,90 ± 0,195

Значне зменшення кількості амінокислот у гематологічно хворих тварин порівняно з нормальними показниками відбувається в кількості гліцину на 19,9 мг%, ізолейцину — 29,92 мг%, лейцину — 23,68 мг%, тирозину — 54,52 мг%, аргініну — 27,46 мг%, серину — 21,51 мг% і фенілаланіну — 14,82 мг%, а збільшення в кількості валіну на 6,17 мг%, метіоніну на 6,17 мг%, аланіну на 8,65 мг% і треоніну на 7,46 мг%.

Таблиця 5

Замінні амінокислоти сироватки молока корів на різних стадіях лейкозного процесу (M±m, n=8)

Показники	Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно хворі тварини
Аланін	мг/%	35,26 ± 0,280	*46,21 ± 0,255	*43,91 ± 0,229
Аспарагінова кислота	-“-	58,61 ± 0,347	*61,15 ± 0,267	*51,33 ± 0,247
Гліцин	-“-	66,58 ± 0,244	*73,99 ± 0,247	*46,68 ± 0,257
Глютамінова кислота	-“-	58,96 ± 0,231	*62,57 ± 0,276	*46,73 ± 0,306
Серин	-“-	39,87 ± 0,369	*42,03 ± 0,360	*18,36 ± 0,352
Тирозин	-“-	102,53 ± 0,409	*76,0 ± 0,381	*47,96 ± 0,297
Цистеїн	-“-	45,61 ± 0,329	*48,25 ± 0,271	*39,26 ± 0,336

У хворих тварин залежно від стадії розвитку лейкозного процесу, суттєві зміни проходять і в загальній кількості амінокислот (табл. 6.). Кількість їх у групі здорових тварин склала 910,01±4,838 мг%, у інфікованих — 956,92±4,905 мг%, а у гематологічно хворих

тварин спостерігається різке зниження їх вмісту до 686,03±4,936 мг%, тобто на 223,98 мг% (24,62%) порівняно з показниками у здорових тварин.

Таблиця 6

Динаміка амінокислот сироватки молока у здорових і хворих лейкозом корів (M±m, n=8)

Показники	Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно хворі тварини
Загальна кількість амінокислот	мг/%	910,01 ± 4,838	*956,92±4,905	*686,03 ± 4,936
Замінні амінокислоти	-“-	407,42 ± 2,209	410,20±2,058	*294,23 ± 2,024
Незамінні амінокислоти	-“-	502,59 ± 2,629	*546,72±2,847	*391,80 ± 2,912
Співвідношення замінних і Незамінних амінокислот	%	44,77 x 55,23	42,90 x 57,10	42,89 x 57,11

Подібні зміни відмічені і в сумі замінних та незамінних амінокислот. Так, кількість незамінних амінокислот у середньому по групах корів підвищилась з 502,59±2,629 до 546,72±2,847 мг% у інфікованих тварин. У гематологічно хворих тварин кількість їх знизилась до 391,80±2,912 мг%, тобто на 110,79 мг% (22,07 %).

Показники замінних амінокислот підвищились від рівня здорових корів (407,42±2,209 мг%) до — 410,20±2,058 мг% на 2,78 мг%. Різке зниження кількості замінних амінокислот наступає у гематологічно хворих тварин на 115,97 мг% і складає 294,23±2,024 мг%, що на 113,19 мг% або на 27,77 % нижче показників здорових корів. При цьому необхідно відмітити, що в процентному співвідношенні загальна кількість незамінних амінокислот переважає над замінними. Так, якщо процентне співвідношення замінних і незамінних у групі здорових корів складає 44,77 х 55,23, то в інфікованих (42,90 х 57,10), в той час як у гематологічно хворих тварин (42,89 х 57,11) кількість незамінних амінокислот перевищує показники групи здорових тварин. Зниження кількості замінних амінокислот у інфікованих і гематологічно хворих тварин можна пояснити посиленим використанням їх при розвитку патологічного процесу, коли організм не спроможний виділяти їх у достатній кількості. Можливо також, що в організмі хворої тварини проходить перерозподіл їх співвідношення, що вказує на порушення метаболізму амінокислот.

Кількість імуноглобулінів у сироватці крові в інфікованих корів не значно відрізняється від їх кількості у здорових тварин (табл. 7.). В той же час, зниження кількості імуноглобулінів проходить паралельно з прогресуванням лейкозного процесу і розвитком постійного лімфоцитозу.

Таблиця 7

Кількісні зміни імуноглобулінів сироватки крові великої рогатої худоби при лейкозі (M±m, n=8)

Імуно-глобуліни	Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно хворі тварини
IqG_1	мг/мл	10,7 ± 2,3	9,427 ± 1,19	6,93 ± 1,2
IqG_2	-"-	14,08 ± 1,7	11,793 ± 2,347	***8,34 ± 1,9
IqM	-"-	2,52 ± 0,38	2,32 ± 0,36	***1,63 ± 0,23

Так, у гематологічно хворих тварин, з високими гематологічними показниками кількість імуноглобулінів була значно понижена порівняно із здоровими тваринами. Вміст IqG_2 в сироватці крові у цієї групи тварин знизився в середньому до 8,34 мг/мл; IqG_1 — до 6,93 мг/мл і IqM — до 1,63.

Аналіз одержаних результатів показав (табл. 8.), що рівень циклічних імунних комплексів у інфікованих тварин не змінюється в порівняні з здоровими тваринами, тоді як у гематологічно хворих тварин спостерігається підвищення їх рівня на 2,55 г/л відносно до їх рівня у здорових тварин. Рівень Т- і В-лімфоцитів поступова знижується в інфікованих і гематологічно хворих тварин. Зокрема рівень Т-лімфоцитів відповідно знижується на 0,74 % і 1,47 %, а рівень В-лімфоцитів на 0,25 % і 0,64 %.

Таблиця 8

Динаміка імунологічних показників крові корів при лейкозі (M±m, n=8)

Назва показників	Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно хворі тварини
Циклічні імунні комплекси	г/л	18,53 ± 0,539	18,83 ± 0,524	***21,08 ± 0,752
Т-лімфоцити	%	17,86 ± 0,561	17,12 ± 0,636	16,39 ± 0,718
В-лімфоцити	%	5,30 ± 0,217	5,05 ± 0,409	***4,66 ± 0,231

Дослідження динаміки перетворення Ф-6-Ф гемолізатами еритроцитів хворої лейкозом великої рогатої худоби (табл. 9.) показали зниження активності всіх досліджуваних ферментів. Зокрема активність ФФК у інфікованих тварин достовірно знижується на 30,42 %, а у гематологічно хворих тварин на 60,45 % в порівнянні з її активністю у здорових тварин, активність альдолази відповідно на 21,43 % і 73,21 %, активність глюкозо-фосфатізомерази на 15,19 % і 29,36 %, активність АТФ-ази на 6,95 % і 53,0 %, активність фосфатази Ф-6-Ф на 19,59 % і 54,64 %. Співвідношення Г-6-Ф/Ф-6-Ф з 1,69 у здорових тварин знижується до 1,24 у інфікованих тварин і до 0,89 у гематологічно хворих тварин.

Таблиця 9

Динаміка перетворення Ф-6-Ф гемоліз атами еритроцитів хворої лейкозом великої рогатої худоби (M±m, n=8)

Показники	Одиниця виміру	Здорові тварини	Інфіковані тварини	Гематологічно хворі тварини
ФФК	мкМ/мл.ер./хв інк.	0,355 ± 0,027	***0,247 ± 0,028	*0,112 ± 0,029
Альдолаза	-“-	0,056 ± 0,003	***0,044 ± 0,003	*0,015 ± 0,003
Глюкозо-фосфатізомераза	-“-	4,530 ± 0,657	3,842 ± 0,339	3,200 ± 0,144
АТФ-аза	-“-	0,417 ± 0,027	0,388 ± 0,027	*0,196 ± 0,028
Фосфатаза Ф-6-Ф	-“-	0,097 ± 0,003	*0,078 ± 0,003	*0,044 ± 0,003
Співвідношення Г-6-Ф/Ф-6-Ф	мкМ/проба	1,690 ± 0,214	1,240 ± 0,233	***0,890±0,250
Залишок Ф-6-Ф	-“-	2,008 ± 0,198	2,425 ± 0,176	*3,428 ± 0,130

В И С Н О В К И

1. У хворих лейкозом корів рівень гемоглобіну, еритроцитів, паличкоядерних і сенментоядерних нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів знижується, а гематокрит, лейкоцити, лімфоцити і швидкість осідання еритроцитів підвищується

2. Кількість загального білка, глобулінів, гамм-глобулінів у сироватці крові знижується пропорційно до прогресування захворювання. У хворих лейкозом корів біохімічні зміни в молоці і сироватці молока характеризуються зниженням кількості загального білка і альфа-лактоальбумінів.

3. У хворих тварин наступає зменшення загальної кількості амінокислот на 223,98 мг% за рахунок замінних (аспарагінової і глютамінової кислот, гліцину, серину, тирозину, цистеїну) і незамінних (аргініну, ізолейцину, лейцину, лізину і фенілаланіну) амінокислот.

4. Кількість IqG_1, IqG_2, IqM у хворих тварин знижується, відповідно, на 35,2 %, 40,8 % і 35,3 % порівняно з їх рівнем у сироватці крові здорових тварин, тоді як рівень циклічних імунних комплексів підвищується, а рівень Т- і В-лімфоцитів знижується

5. У хворої лейкозом великої рогатої худоби спостерігається зниження активності досліджуваних ферментів, що свідчить про гальмування початкових етапів гліколітичного шляху перетворення вуглеводів і зниження енергетичних потреб організму.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF INFLAMMATORY PROCESS AT LIVE - STOCK LEUCOSIS

J. V. Kisera

S U M M A R Y

With the purpose of elucidation the change dynamics, their interdependence in the organism of the healthy, leucosis-infected and sick live-stock, the haematological, immunological and biochemical researches were carried out. It allowed observing the changes during the period of the inflammatory process development.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Достоевский П. П.* Организационно-методические основы ликвидации лейкоза крупного рогатого скота. — К., 1982. — 18 с.

2. *Васильева Е. А.* Клиническая биохимия сельскохозяйственных животных. — Москва: Россельхозиздат, 1974. — 192 с.

3. Руководство по клинической лабораторной диагностике. — Ч. 3. Клиническая биохимия: Учебное пособие / Базарнова М. А., Гетте З. П., Кальнова Л. И., Каменецкая Т. И., Циркина А. С. / Под ред. М. А. Базарновой, В. Т. Морозовой. — К.: Выща школа, 1990. — 319 с.

4. *Адаменко Г. П.* Модификация метода Mancini для количественного определения иммуноглобулинов. Лабораторное дело. 1981, № 6. — С. 371–372.

5. Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: «Медицина», 1982. — 575 с.

6. *Чернушенко Е. Ф., Когосова Л. С.* Иммунологические исследования в клинике. — К.: Здоров'я, 1978. — 160 с.

7. *Пасхина Т. С.* Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге методом образования медных производных аминокислот с нингидрином. Методические письма. — М., 1959. — № 1. — С. 12–18.

8. *Hohorst H. J.* D-glucose-6-phosphat and d-Fructose-6-phosphat — Bergmeyer H. «Methoden der enzymatischen Analise». — 1962. — V. 3. ——P. 1238–1242.

9. *Lowzer R. B., Rowland L. P., Bank W. J.* Physical and Kinetic Properties of Human Phosphofructo-kinaze from Skeletal Muscle and Erythrocytes. — The Journal of Biologic Chemistry. — 1969. — V. 244, № 14. — P. 3823–3831.

10. *Kulka R. G.* Colorimetric estimation of ketopentoses and hexoses. — Biochem. J. — 1956. — V. 63. — P. 542.

11. *Lowry O. H., Lopez J. A.* Determination of inorganic phosphate in the present of labeling ester. — J. Biol. Chem., 1946. — V. 162. — P. 421