

6. ІМУНОЛОГІЯ ТА КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ

УДК 619:616.391:612.017.11:577.1.08:636.22/28

DOI 10.36016/VM-2020-106-15

БІОМАРКЕРИ ПРИРОДНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ КОРІВ ЗА А- ТА Е-ВІТАМІННОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Коваленко Л. В., Руденко О. П., Бойко В. С., Пазуцян О. Є.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: larbuko@gmail.com

У статті висвітлені результати досліджень стану природної резистентності великої рогатої худоби з високим генетичним потенціалом продуктивності за порушень вітамінного обміну. Метою досліджень було дослідити вплив гіповітамінозів А та Е різного ступеня вираженості на біомаркери природної резистентності корів. Як матеріал для досліджень використовували сироватку крові від 90 корів з господарств різних областей України. У сироватці крові вимірювали рівень вітамінів А та Е, рівень низки маркерів уродженого імунітету (загальний білок, глобуліни, циркулюючі імунні комплекси, серомукоїди, активність лізоциму) та стану оксидантно-антиоксидантного гомеостазу організму (вміст дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду, активність каталази). Застосовували загальноприйнятні методи на основі спектрофотометрії. Установлено, що у високопродуктивних корів за зниження забезпеченості їхнього організму вітамінами А та Е порівняно з тваринами, які мають їх фізіологічний рівень, відбуваються зрушення маркерів природної резистентності. Так, виражений гіповітаміноз А та Е (зниження на 64,4 і 37,5 % відповідно) супроводжується вірогідним підвищенням глобулінів, циркулюючих імунних комплексів та серомукоїдів на 50,0–71,4 %, а також зниженням активності каталази та накопиченням продуктів ПОЛ на 21,1–28,5 %. За вітамінної недостатності А та Е на рівні 26,4 і 2,5 % відповідно відбуваються підвищення рівня глобулінів (на 24,5 %) та менш виражені зміни (на 18,6–26,4 %) аналогічної направленості в системі ПОЛ-АОЗ. Зниження рівня вітаміну А у сироватці крові корів на 34 % супроводжується лише підвищенням накопиченням малонового діальдегіду на 20,7 %. Активність лізоциму виявилася зниженою у тварин усіх досліджених груп з А- та Е-вітамінною недостатністю, однак ступінь її змін не залежав від вираженості гіповітамінозів

Ключові слова: вроджений імунітет, оксидантно-антиоксидантний гомеостаз, гіповітамінози

Висока продуктивність тварин обумовлена інтенсивним перебігом процесів обміну речовин у клітинах, органах і тканинах. Для забезпечення оптимального, фізіологічного біосинтезу білків, енергії, розвитку організму та ефективного виробництва продукції тваринництва високої якості необхідна обов'язкова умова — в організм тварин з раціоном повинні надходити усі без виключення поживні речовини, що беруть участь у процесах обміну, у біологічно необхідних кількостях і співвідношеннях.

За невідповідності умов годівлі і фізіологічних потреб в організмі тварин виникають глибокі порушення усіх видів обміну речовин, які проявляються зниженням резистентності, клінічно вираженими захворюваннями дорослих тварин і молодняку. Хвороби обміну речовин залишаються одними з найбільш поширених серед сільськогосподарських тварин. Проблема постійного моніторингу метаболічних порушень в організмі продуктивних тварин і пошуку засобів їх корекції є актуальною та має як фундаментальне, так і практичне значення, оскільки в умовах розвитку ринкових відносин у тваринницькому секторі аграрного виробництва, головним завданням є забезпечення високої продуктивності тварин, отримання продукції високої якості з найменшими затратами. [1, 2].

Відомо, що у великої рогатої худоби за інтенсивного промислового використання переважно спостерігається порушення А- і Е-вітамінного обміну. Діагностика порушень їхнього обміну ґрунтується на результатах клінічного дослідження та лабораторного аналізу крові,

оскільки порушення процесів обміну речовин має дуже глибоке відображення в змінах складу крові як внутрішнього середовища організму [3–5].

За результатами наших попередніх досліджень [6] встановлено, що досить часто у дійних корів спостерігається розвиток А-вітамінної недостатності (уміст ретинолу у сироватці крові менше 25 мкг%). Однак вплив порушень обміну вітамінів на стан природної резистентності великої рогатої худоби був вивчений недостатньо, що й визначило **мету** наших досліджень.

Матеріали та методи. Відбір проб крові для біохімічних досліджень проводили у корів з надоєм молока вище 5,0 тис. л/рік ($n = 90$) у стійловий період у господарствах різних регіонів України (Харківська, Вінницька, Черкаська та Кіровоградська області). Стан вітамінного обміну у сироватці крові корів вивчали за рівнем вітамінів А та Е згідно методичних рекомендацій [7]. Спектрофотометрично вимірювали рівень загального білка за біуретовою реакцією, глобулінів [8], циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси — за методом Гриневича та Алферова, серомукоїдів — за методом Веймера та Мошина [9]. Активність лізоциму (КФ 3.2.1.17) визначали турбідиметричним методом за Перрі в модифікації Х. Я. Гранта зі співавт. [10]. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) вивчали за рівнем утворення дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) у гептан-ізопропанольних екстрактах, стан антиокиснювальної системи захисту (АОЗ) оцінювали за активністю ферменту каталази (КФ 1.11.1.6.) з використанням H_2O_2 спектрофотометрично за довжини хвилі 410 нм [8].

Усі маніпуляції з тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти.

Результати досліджень та їх обговорення. За даними В. І. Левченка зі співавт. [11] рівень вітаміну А у сироватці крові дійних корів має бути не нижчим за 25 мкг%, а оптимальний показник вітаміну Е у стійловий період — 4–6 мкг/см³.

У результаті наших досліджень умісту вітамінів А та Е у сироватці крові корів було виявлено різний ступінь гіповітамінозів, на основі чого для аналізу було сформовано 4 групи тварин (табл. 1, 2). Так, найбільш виражені порушення вітамінного обміну відносно мінімальних значень референтних рівнів були виявлені у корів одного з господарств Харківської області, де зниження забезпеченості організму тварин вітамінами А та Е склало відповідно 64,4 і 37,5 % (1-ша група) та у тварин господарства Черкаської області, де рівень цих вітамінів був у середньому знижений на 26,4 і 2,5 % відповідно (2-га група). У двох господарствах з Харківської та Вінницької областей виявлено лише зниження вмісту вітаміну А на 36,8 і 32,8 % відповідно (3-тя група).

У сироватці крові дійних корів із господарства Кіровоградської області рівень вітамінів А та Е знаходився в межах референтних рівнів (4-та група), як і усі визначені показники природної резистентності, тому під час проведення аналізу отриманих результатів корів 1–3-ї груп ми порівнювали їх з показниками 4-ї групи.

Аналіз отриманих результатів щодо маркерів уродженого імунітету, представлених у табл. 1, свідчить, що у корів 1-ї групи максимально виражений «подвійний» гіповітаміноз А та Е супроводжується незначним зниженням умісту загального білка на 1,2 % і активності лізоциму на 6,7 % відносно показників фізіологічної норми та на 11,1 % ($p \leq 0,05$) та 9,6 % щодо показників корів з рівнем вітамінів у межах фізіологічної норми (4-та група). Також статистично вірогідною була різниця між такими показниками 1-ї та 4-ї груп як глобуліни, ЦІК та серомукоїди: їхній рівень був вищим за «подвійного» гіповітамінозу на 36,9, 50,0 і 71,4 % відповідно.

У корів 2-ї групи встановлено зниження концентрації загального білка на 4,0 %, активності лізоциму — на 8,3 % щодо нижньої межі фізіологічної норми. Відносно показників 4-ї групи рівень загального білка був зниженим на 13,6 %, глобулінів — підвищеним на 24,5 %, ступінь пригнічення лізоцимної активності склав 11,3 % ($p \leq 0,05$). При цьому концентрації ЦІК і серомукоїдів не відрізнялися від рівнів у тварин без гіповітамінозу.

Таблиця 1 — Рівень показників уродженого імунітету у сироватці крові корів з різним вітамінним статусом (M ± m)

Група	Загальний білок, г/дм ³	Глобуліни, г/дм ³	Лізоцим, мкг/см ³	ЦІК, мг/см ³	Серомукоїди (Sm), мг/см ³
Група 1. (n = 25) Вітамін А — 8,9 ± 0,3 мкг%, Вітамін Е — 2,5 ± 0,05 мкг/см ³	71,1 ± 1,77*	43,7 ± 2,2*	56,0 ± 0,92*	0,18 ± 0,02*	0,24 ± 0,01*
Група 2. (n = 10) Вітамін А — 17,9 ± 1,4 мкг%, Вітамін Е — 3,9 ± 0,35 мкг/см ³	69,1 ± 0,15*	39,7 ± 0,56*	55,0 ± 1,2*	0,10 ± 0,002	0,12 ± 0,003
Група 3. (n = 40) Вітамін А — 16,3 ± 1,1 мкг%, Вітамін Е — 7,6 ± 0,32 мкг/см ³	70,1 ± 1,1*	35,7 ± 0,35*	54,0 ± 1,4*	0,11 ± 0,002	0,14 ± 0,003
Група 4. (n = 15) Вітамін А — 26,8 ± 0,6 мкг%, Вітамін Е — 8,1 ± 0,15 мкг/см ³	80,0 ± 1,88	31,9 ± 1,1	62,0 ± 1,12	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,011
Норма†	72,0–86,0	28,9–48,6	60,0–71,0	–	–

Примітки: * — різниця вірогідна щодо відповідних показників корів з фізіологічним рівнем вітамінів А та Е; † — «Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин» за ред. В. І. Левченка [9].

У сироватці крові корів з ознаками А-гіповітамінозу (3-тя група) виявлено зниження активності лізоциму на 10,0 % щодо фізіологічних значень. Порівняно з показниками 4-ї групи встановлено вірогідне підвищення вмісту глобулінів на 11,9 % та зниження загального білка на 12,4 % і активності лізоциму — на 12,9 %.

Також було проведено визначення стану системи ПОЛ-АОЗ у корів за різного вітамінного статусу (табл. 2).

Таблиця 2 — Стан системи ПОЛ-АОЗ у сироватці крові корів з різним вітамінним статусом (M ± m)

Група	Каталаза, ммоль Н ₂ О ₂ /с/мг білка	ДК, мкмоль/дм ³	МДА, ΔD/см ³
Група 1. (n = 25) Вітамін А — 8,9 ± 0,3 мкг%, Вітамін Е — 2,5 ± 0,05 мкг/см ³	22,0 ± 0,88*	25,5 ± 1,3	1,8 ± 0,09*
Група 2. (n = 10) Вітамін А — 17,9 ± 1,4 мкг%, Вітамін Е — 3,9 ± 0,35 мкг/см ³	22,7 ± 0,50*	25,2 ± 1,0*	1,77 ± 0,04*
Група 3. (n = 40) Вітамін А — 16,3 ± 1,1 мкг%, Вітамін Е — 7,6 ± 0,32 мкг/см ³	29,05 ± 0,72	22,2 ± 1,0	1,69 ± 0,084*
Група 4. (n = 15) Вітамін А — 26,8 ± 0,6 мкг%, Вітамін Е — 8,1 ± 0,15 мкг/см ³	27,9 ± 1,0	21,0 ± 1,8	1,4 ± 0,07
Норма†	25,0–40,0	12,0–23,0	0,5–1,55

Примітки: * — різниця вірогідна щодо відповідних показників корів з фізіологічним рівнем вітамінів А та Е; † — Методичні рекомендації «Методи перекисного окиснення ліпідів та його регуляція у біологічних об'єктах» [6].

Так, за зниження забезпеченості організму корів вітамінами А та Е на 64,4 та 37,5 % відповідно (1-ша група) щодо референтних значень встановлено зниження активності каталази на 12,0 %, а також підвищення рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів: ДК — на 10,8 % та МДА — на 16,1 %. Менш виражений «подвійний» гіповітаміноз у тварин 2-ї групи супроводжувався незначним зниженням активності каталази (на 9,2 %) та збільшенням концентрації ДК і МДА на 9,6 і 14,2 % відповідно.

У порівнянні з показниками тварин 4-ї групи виявлено вірогідне зниження активності каталази (на 21,1 %) та накопичення продуктів ПОЛ (ДК і МДА) на 21,4 та 28,5 % відповідно. У тварин 2-ї групи встановлено аналогічні зміни — пригнічення каталазної активності склало 18,6 %, а підвищення продуктів ПОЛ — на 20,0 та 6,4 % відповідно.

У корів 3-ї групи з А-гіповітамінозом вірогідні зміни виявлені щодо концентрації МДА, яка була підвищеною щодо рівня тварин 4-ї групи на 20,7 %.

Таким чином, враховуючи результати проведених досліджень і літературних даних [1, 4, 5] можна констатувати, що «подвійний» гіповітаміноз А та Е різного ступеня вираженості та гіповітаміноз А супроводжуються зрушеннями системи природної резистентності в організмі дійних корів. Це, зокрема, проявляється у підвищенні синтезу глобулінів на фоні зниження рівня загального білка, а також пригніченні активності лізоциму сироватки крові, який є одним з факторів уродженої резистентності організму [12]. Зміни концентрації таких медіаторів імунної відповіді, як ЦІК та серомукоїди [13, 14] виявлені лише за найбільш вираженого зниженого рівня вітамінів А та Е (на 64,4 і 37,5 % відповідно). У тварин цієї групи встановлено також і максимальні зрушення оксидантно-антиоксидантної рівноваги — на фоні зниження активності каталази відбувається накопичення продуктів ПОЛ (ДК і МДА). Аналогічні зміни встановлено й у корів за менш вираженого «подвійного» гіповітамінозу, тоді як А-гіповітаміноз супроводжувався накопиченням лише кінцевого продукту ПОЛ — МДА. Таке зрушення оксидантно-антиоксидантного гомеостазу в організмі продуктивних тварин може призводити до порушення їхньої природної резистентності не лише опосередковано через вплив на активність макрофагів та стан біомембран [15–17], а й напряму, через малоновий діальдегід, який, за сучасними даними [18], є лігандом імунних рецепторів, що беруть участь у реакціях уродженого імунітету.

Висновки. У високопродуктивних корів за зниження забезпеченості їхнього організму вітамінами А та Е порівняно з тваринами, які мають їх фізіологічний рівень, відбуваються зрушення маркерів природної резистентності та процесів переокиснення ліпідів різного ступеня. Виразений гіповітаміноз А та Е (зниження на 64,4 і 37,5 % відповідно) супроводжується вірогідним підвищенням глобулінів, циркулюючих імунних комплексів і серомукоїдів на 50,0–71,4 %, а також зниженням активності каталази та накопиченням продуктів ПОЛ на 21,1–28,5 %. За вітамінної недостатності А та Е на рівні 26,4 і 2,5 % відповідно відбуваються менш виражені зміни аналогічної направленості (підвищується рівень глобулінів на 24,5 %, ДК — на 18,6 % і МДА — на 26,4 %). Зниження рівня вітаміну А у сироватці крові корів на 34 % супроводжується лише підвищенням накопичення малонового діальдегіду на 20,7 %.

Активність лізоциму виявилась зниженою у тварин усіх досліджених груп з А- та Е-вітамінною недостатністю, однак ступінь її змін не залежав від вираженості гіповітамінозів.

Відносно показників фізіологічної норми за нестачі вітамінів А та Е у сироватці крові корів знижується рівень загального білка на 11,2–18,0 %, активність лізоциму — на 9,0–10,0 %, активність каталази — на 11,0–12,0 %, та активується перекисне окиснення ліпідів (за показниками ДК і МДА на 4,8–11,0 і 16,0–22,5 % відповідно).

Перспективи подальших досліджень. Планується продовжити вивчення впливу порушень обміну речовин на стан природної резистентності організму високопродуктивних тварин і птиці з метою розробки заходів їх направленої корекції.

Список літератури

1. Politis I. Reevaluation of vitamin E supplementation of dairy cows: bioavailability, animal health and milk quality. *Animal*. 2012. Vol. 6, No. 9. P. 1427–1434. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731112000225>.
2. Безух В. М., Чуб О. В., Надточій В. П. Обмін речовин у високопродуктивних корів та його аналіз. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2011. Вип. 8(87). С. 5–8. URL: <https://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/309>.
3. Ионов И. А. и др. Критерии и методы контроля метаболизма в организме животных и птиц: справ. пособие Харьков: Институт животноводства НААН, 2011. 376 с.
4. Rubin L. P. et al. Metabolic effects of inflammation on vitamin A and carotenoids in humans and animal models. *Advances in Nutrition*. 2017. Vol. 8, No. 2. P. 197–212. DOI: <https://doi.org/10.3945/an.116.014167>.
5. Oliveira L. M., Teixeira F. M. E., Sato M. N. Impact of retinoic acid on immune cells and inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation*. 2018. Vol. 2018. P. 3067126. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/3067126>.
6. Коваленко Л. В. та ін. Діагностика метаболічних порушень у великої рогатої худоби. *Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб.* 2015. Вип. 101. С. 166–168. URL: http://www.jvm.kharkov.ua/sbornik/101/7_48.pdf.
7. Стегній Б. Т. та ін. Методи оцінки перекисного окиснення ліпідів та його регуляція у біологічних об'єктах: метод. реком. Харків: ННЦ «ІЕКВМ», 2009. 64 с.

8. Влізло В. В. (ред.) Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: Сполом, 2012. 764 с.
9. Стегній Б. Т. та ін. Методи досліджень маркерів функціонального стану клітин периферичної крові та кісткового мозку тварин: метод. реком. Харків: ННЦ «ІЕКВМ», 2013. 59 с.
10. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. Москва: Медицина, 1978. 155 с.
11. Левченко В. І. (ред.) Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин. Біла Церква, 2004. 608 с.
12. Мазуркевич А. Й. та ін. Ветеринарна імунологія. Практикум: навч. посіб. Київ: Агроосвіта, 2014. 168 с.
13. Rosales C. Fcγ receptor heterogeneity in leukocyte functional responses. *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8. P. 280. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00280>.
14. Радченко О. М., Стрільчук Л. М. Роль серомукоїдів у патогенезі внутрішньої патології та діагностичне значення їх визначення. *Практикуючий лікар*. 2017. Т. 6, № 2. С. 45–48. URL: <https://plr.com.ua/index.php/journal/article/view/78>.
15. Batista-Gonzalez A. et al. New insights on the role of lipid metabolism in the metabolic reprogramming of macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2020. Vol. 10. P. 2993. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02993>.
16. Barnett K. C., Kagan J. C. Lipids that directly regulate innate immune signal transduction. *Innate Immunity*. 2020. Vol. 26, No. 1. P. 4–14. DOI: <https://doi.org/10.1177/1753425919852695>.
17. Weismann D., Binder C. J. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012. Vol. 1818, No. 10. P. 2465–2475. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.01.018>.
18. Binder C. J. Lipid modification and lipid peroxidation products in innate immunity and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017. Vol. 1862, No. 4. P. 369–370. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.01.006>.

BIOMARKERS OF NATURAL RESISTANCE IN CAWS WITH DEFICIENCY OF VITAMINS A AND E

Kovalenko L. V., Rudenko O. P., Boiko V. S., Pazushchan O. Ye.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The article highlights the results of studies of the state of natural resistance in highly productive cattle with disorders of vitamin metabolism. The aim of the study was to investigate the effect of hypovitaminoses A and E of varying severity on biomarkers of natural resistance in cows. Serum from 90 cows from farms in different regions of Ukraine was used as research material. Levels of vitamins A and E in serum, the levels of some markers of innate immunity (total protein, globulins, circulating immune complexes, seromucoids, lysozyme activity) and the state of oxidative-antioxidant homeostasis (content of diene conjugates and malonic dialdehyde, catalase activity) were measured. Common methods based on spectrophotometry were used. It has been found that in highly productive cows with vitamin A and E deficiency compared to animals with normal physiological level of vitamins, there are shifts in the markers of natural resistance. Thus, severe hypovitaminoses A and E (decrease by 64.4% and 37.5% respectively) is accompanied by a probable increase in globulins, circulating immune complexes and seromucoids by 50.0–71.4%, as well as a decrease in catalase activity and accumulation of lipid peroxidation products by 21.1–28.5%. With vitamin A and E deficiency at the level of 26.4% and 2.5% respectively, there is an increase in the level of globulins (by 24.5%) and less pronounced changes (by 18.6–26.4%) of a similar orientation in the system of lipid peroxidation-antioxidant protection. The decrease in the level of vitamin A in the blood serum of cows by 34% is accompanied only by an increased accumulation of malonic dialdehyde by 20.7%. Lysozyme activity was reduced in animals of all experimental groups with vitamin A and E deficiency, but the degree of its changes did not depend on the severity of hypovitaminoses

Keywords: *innate immunity, oxidative-antioxidant homeostasis, hypovitaminoses*