

Розділ 5. Внутрішні незаразні хвороби та клінічна біохімія

УДК 619:616.98:578.825.1:612.015:615.371:636.52/.58

ЗМІНИ КОНЦЕНТРАЦІЇ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ВАКЦИНОВАНИХ КУРЧАТ ПІСЛЯ ІНФІКУВАННЯ ПАТОГЕННИМ ШТАМОМ ВІРУСУ ХВОРОБИ МАРЕКА

Бойко В. С., Матюша Л. В., Солодянкін О. С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: vika-boyko-1634@mail.ru

У статті представлені дані щодо змін концентрації метаболітів оксиду азоту в сироватці крові курчат, що були попередньо імунізовані, при інфікуванні епізоотичним штамом збудника хвороби Марека.

Ключові слова: метаболіти оксиду азоту, вакцинація, хвороба Марека, птиця, сироватка крові.

Оксид азоту (NO) утворюється різними типами клітин організму та має вільнорадикальні властивості. Він відіграє важливу роль в організмі при запуску широкого спектру метаболічних процесів, приймає участь в регуляції тону судин (має вазодилатуючу дію) та імунної відповіді (вибух макрофагів), вступає в реакції окиснювального стресу [1].

Синтез NO значно посилюється за умов впливу вірусів та інших чужорідних агентів. За останні роки накопичено багато даних, щодо впливу вільних радикалів, зокрема оксиду азоту та його продуктів, на перебіг інфекційного процесу. Показано, що взаємодіючи з киснем, NO[•] утворює надзвичайно потужний окиснювач-пероксинітрит, токсичність якого набагато вища ніж NO, та який здатний ушкоджувати тканини власного організму [2]. NO, супероксид і пероксинітрит у високих концентраціях модифікують білки та ушкоджують нуклеїнові кислоти, що є фактором розвитку ендогенної інтоксикації та медіаторами запалення, які відіграють важливу роль у перебігу та наслідках патологічних процесів.

Проте NO має захисну функцію завдяки окисної модифікації чужорідних елементів у вогнищі запалення, а також компонент імунної реакції організму за розвитку протівірусного захисту, наприклад за перебігу хвороби Марека (ХМ) [3].

Метою роботи було вивчення концентрації метаболітів оксиду азоту (NO), а саме NO₂⁻/NO₃⁻, у сироватці крові курчат за хвороби Марека та після вакцинації проти хвороби Марека.

Матеріали та методи. У досліді використовували інтактних добових курчат породи Білий леггорн з благополучного щодо інфекційних хвороб птахогосподарства. Всі роботи проводили відповідно до принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) і «Спільними принципами експериментів на тваринах», схваленими І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Було сформовано 4 групи курчат-аналогів по 15 голів у кожній.

Курчатам першої групи вводили внутрішньом'язово плазмідну ДНК в дозі 110 нг з ліпосомальним комплексом 10 мМСТАВ-фосфатиділхоліну з молярною долею СТАВ 0,5 % (по 150 мкл), яка розроблена у лабораторії молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ІЕКВМ».

Птиці другої групи вводили плазмідну ДНК у дозі 110 нг з ліпосомальним комплексом 10 мМСТАВ-фосфатиділхоліну з молярною долею СТАВ 0,5 % (по 150 мкл) з одночасним внутрішньом'язовим введенням 100 мкл імуностимулятора Cythosol.

Курчата третьої групи залишилися інтактними до моменту інфікування вірусом ХМ (контроль інфекційної активності).

Птиця четвертої групи була інтактною (контроль фізіологічного розвитку).

На 21-шу добу після щеплення курчат заражали контрольним штамом JM-UA вірусу хвороби Марека (ВХМ) з інфекційною активністю 10000 ФУО/мл у дозі 0,5 мл/курча.

Впродовж 89 дів вели спостереження за поведінкою та клінічним станом птиці. На 47-, 68-, 89-у добу досліджу по 5 голів птиці з кожної групи були еутаназовані та знекровлені. Отримані зразки сироваток крові заморожували за температури мінус (22±1) °С для подальших досліджень.

У сироватці крові вимірювали концентрацію кінцевих метаболітів (NO), а саме NO₂⁻/NO₃⁻ за методом Метельської В.А. та Гуманова Н.Г.(2005) [4]. Сироватку крові депротейнізували етиловим спиртом 96 % (1:1) і центрифугували за 1500 об/хв впродовж 20 хвилин. Концентрацію метаболітів оксиду азоту оцінювали по розвитку забарвлення в реакції діазотирования нітритом сульфаниламідом. Оптичну щільність розчину вимірювали в 96-луночному планшеті за допомогою аналізатора Stat-Fax3200 за довжини хвилі 540 нм. Кількість нітрит-іону розраховували в мкмоль/л за калібрувальною кривою побудованої з використанням стандартного розчину NaNO₂. Лінійність кривої зберігалась в діапазоні концентрацій нітрит-іону від 5 до 250 мкмоль/л.

Математична обробка результатів була проведена за допомогою пакета статистичного аналізу Statistica 6.0. Відмінності між порівнюваними показниками вважали достовірними за $p < 0,05$.

Результати досліджень сироваток крові дослідної птиці наведені в таблиці.

Таблиця – Концентрація метаболітів оксиду азоту в сироватці крові курчат

Групи тварин	Термін дослідження, доба		
	47	68	89
метаболіти оксиду азоту, мкмоль/л			
1	12,10±0,14*	13,60±0,18	14,80±0,16*
2	12,90±0,10*	14,10±0,22*	15,30±0,12*
3	9,12±0,20	11,30±0,16	12,60±0,20
контроль	10,30±0,22	12,90±0,26	13,30±0,12

Примітка: * – різниця значень вірогідна за ($p \leq 0,05$) відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Одержані результати вказують, що на початку дослідного періоду (47-а доба) у сироватці крові курчат першої та другої вакцинованих груп реєстрували підвищення концентрації метаболітів оксиду азоту на 17,4 % та 25,2 % ($p \leq 0,05$) відносно контрольних показників.

У курчат третьої, не вакцинованої групи, реєструється зворотна динаміка утворення метаболітів оксиду азоту. Так, на 47-у добу спостережень встановлено тенденцію до зниження концентрації цього показника на 11,4 % у порівнянні з контролем. На 68-у добу експерименту відмічали зниження концентрації метаболітів у курчат інфікованої групи на 12,4 %. Така спрямованість змін метаболітів NO у сироватці крові хворої птиці може бути зумовлена впливом епітеліотропного вірусу хвороби Марека на ендотелій судин і розвиток атеросклерозу [3], а також вказувати на поглиблення інтоксикації організму курчат цієї групи.

У сироватці крові курчат вакцинованих груп на 68-у добу дослідження концентрація метаболітів оксиду азоту максимально наблизилась до їх рівня у птиці групи фізіологічного контролю. На наступному терміні спостережень

(89 -у добу) у курчат першої та другої дослідних груп визначали підвищення концентрації метаболітів NO на 11,3 % та 15,0 % ($p \leq 0,05$) відповідно контролю. Поступове підвищення концентрації метаболітів азоту впродовж експерименту є ознакою індукції антиокиснювальних ресурсів, а також має імуногенну дію (участь в окиснювальному вибуху макрофагів).

У сироватці крові курчат третьої дослідної групи на кінець дослідження не встановлювали статистичних змін вивченого показника у порівнянні з контролем.

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Встановлено, що концентрація метаболітів оксиду азоту у сироватці крові курчат третьої дослідної групи знижується на тлі розвитку хвороби Марека протягом всього дослідного періоду.

2. У курчат першої та другої дослідних груп визначено поступове зростання концентрації метаболітів оксиду азоту ($p \leq 0,05$) впродовж всього експерименту, що є ознакою індукції антиокиснювальних ресурсів, а також має імуногенну дію (участь в окиснювальному вибуху макрофагів).

3. Представляється перспективним у подальшій роботі більш детальне вивчення впливу ДНК-вакцини ННЦ «ІЕКВМ» на роботу системи антирадикального захисту в організмі курчат.

Список літератури

1. Ветеринарна клінічна біохімія [Текст] / за ред. В.І. Шевченка і В.Л.Галяса. – Біла Церква, 2002. – 400 с.
2. Голиков, П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний [Текст] / П.П. Голиков. – М.: ИД Медпрактика-М, 2004. – 180 с.
3. Красников, Г.А. Иммунологические и гистологические аспекты патогенеза и поствакцинальных изменений при Болезни Марека // Ветеринарна медицина (Актуальні проблеми ветеринарної медицини в умовах сучасного ведення тваринництва) [Текст] / Г.А.Красников, Б.Т. Стегний, П.И. Вербицкий, В.С. Коровин // ІЕКВМ. – Харків, 2003. – Вип.82. – С. 322-328.
4. Метельская, В.А. Скрининг метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови [Текст] / В.А.Метельская, Н.Г.Гуманов// Ж.Клиническая лабораторная диагностика.-№6.-2005.- С.15-18.

CHANGES IN THE CONCENTRATION OF NITRIC OXIDE METABOLITES IN SERUM OF VACCINATED CHICKENS AFTER INFECTION OF PATHOGENIC STRAINS OF MAREK'S DISEASE VIRUS

Boyko V.S., Matyusha L.V., Solodyankin A.S.

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

The article presents data of the nitric oxide content in the chickens blood serum that were infected with a strain of the pathogen epizootic Marek's disease.

The aim of our study was to investigate the role of nitric oxide (NO), namely NO₂-/NO₃-, in the pathogenesis of Marek's disease in terms of vaccination against Marek's disease.

Materials and Methods. Intact chickens White leghorn breed was used in the experiment. Chickens of first and second groups were injected intramuscularly of a plasmid DNA 110 ng dose with liposomal complex of 10 mM phosphatidyl choline CTAB (CTAB 0.5 %). Immunostimulant Cythosol was additionally added intramuscularly in the second group. The third group and the fourth group were intact.

Chickens of first, second and third groups were infected by control strain JM-UA VCM with infectivity 10000 FUO/ml on 21 th day. We observed chickens during 89 days. Blood serum was collected three times.

The level of nitric oxide metabolites was measured by method Metelskaya V.A. and Gumanova N.G. (2005).

Results. We observed high levels of nitric oxide metabolites in vaccinated groups and low levels in non-vaccinated chickens.

Conclusions. 1. Reduced of the nitric oxide metabolites concentration in the chickens serum on the background of the Marek's disease development is maintained throughout the study period.

2. There were observed high concentration of nitric oxide in the chickens blood serum at 47-89th day of the experiment, this is due to activation of the immune system and the antioxidant reactions.

3. It seems promising to further, more detailed study of the DNA vaccines impact to the antiradical defense system work in the chickens body.

Keywords: nitric oxide metabolites, DNA – vaccine, Marek's disease, poultry, serum.

УДК 636.5.034:579.64

ВНЕСЕННЯ КАРОТИНВМІСНОЇ БІОМАСИ СРЕПТОМІЦЕТІВ У РАЦІОН ЯЙЦЕНОСНИХ КУРЕЙ

Голембіовська С.Л., Дворник Т.В., Лавренчук В.Я., Мацелюх Б.П.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ, e-mail: Golembiovaska@ukr.net

Досліджено продуктивність яйценосних курей в зимовий період після внесення каротинвмісних біомас штамів *Streptomyces globisporus* Hp7 та 7Crt у раціон їх харчування. Біомаса стрептоміцетів відрізняється складом каротиноїдів. Штам Hp7 синтезує тільки один каротиноїд – лікопін у кількості $50 \pm 2,5$ мг/л середовища, а 7Crt накопичує $35 \pm 2,0$ мг/л середовища суміші лікопіну та бета-каротину. Дослідження проводилися взимку в умовах «Птахофабрики Київської» та в тих приватних господарствах, де кури не несли яйця. Визначена прямопропорційна залежність отримання яєць від внесення лікопінсинтезуючої біомаси Hp7 у раціон курей приватних господарств. 4–5 разове внесення цієї біомаси в місяць підвищувало несучість до 50 % на добу, що виявилось оптимальним показником несучості у досліджуваних господарствах у зимовий період. При частішому застосуванні продуктивність підвищувалася до 80 % за добу, але мала негативні наслідки: погіршувалася щільність шкарлупи та жовток був ненасиченим. Внесення біомаси цього штаму в раціон курей-несушок в умовах птахоферми збільшувало кількість отриманих яєць на 10 % порівняно з контролем. Результати продуктивності курей після внесення біомаси штаму 7Crt поступаються в кількості вищенаведеному. Її внесення в раціон курей приватних господарств підвищувало несучість до 25 % за добу і не впливало на продуктивність курей-несушок в умовах птахофабрики. Натомість, отриманні яйця мали високі якісні характеристики: щільну яєчну шкаралупу та насиченість жовтка. Отже, лікопінсинтезуючу біомасу штаму Hp7 доцільно вносити в раціон курей для стимуляції репродукції яєць, а біомасу каротинсинтезуючого штаму 7Crt можна рекомендувати як вітамінну добавку для покращення фізіологічних ознак.

Ключові слова: стрептоміцети, лікопін, бета-каротин, отримання яєць.

Каротиноїди лікопін та бета-каротин відомі позитивним впливом на організм тварин, особливо на репродуктивну систему. Профілактична добова норма цих каротиноїдів становить 1–2 мг на 20 кг тварини [7]. На сьогодні каротиноїди отримують з рослинної сировини, таких як томати, гарбузи тощо, з біотехнологічних об'єктів – дріжджів *Phaffia rhodozyma*, мукорового гриба *Blakeslea trispora*, водоростей або хімічним синтезом [2, 3, 5].

З кожним роком коло мікробіологічних продуцентів каротиноїдів розширюється [6]. Зокрема, у нашому відділі в ґрунтовій бактерії *Streptomyces globisporus* 1912 (рис.1 А), виділеної Валагуровою Е.В. із ґрунту Вірменії, 1967 р. отримано серію рожевих і помаранчевих мутантів. Методами ТШХ та ВЕРХ визначено, що рожеві варіанти накопичують 80 % каротиноїду, який відповідає природному аналогу лікопіну томатів, а помаранчеві накопичують 47 % лікопіну та 22 % бета-каротину; решту відсотків складають ізо-форми вищеназваних каротиноїдів [1]. Серед них варіанти Hp7 та 7Crt виявилися найбільш стабільними та продуктивними за ознакою каротиноутворення (рис. 1 Б, В). Синтез лікопіну у штаму Hp7 у середньому становить $50 \pm 2,5$ г/л середовища, а штам 7Crt утворює обидва каротиноїди, сума яких $35 \pm 2,0$ мг/л середовища.