

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТЕОДИСТРОФИИ

Стадник А.М., Федорович В.Л.

Львовская национальная академия ветеринарной медицины имени С.З. Гжицкого, Украина

Львовская национальная академия ветеринарной медицины имени С.З. Гжицкого, Украина

Описаны современные маркеры метаболизма костной ткани: остеокальцин, тартрат-резистентная кислая фосфатаза, пиридинолин и деоксипиридинолин, гликозилгидроксисилин, карбокситерминальные телопептиды коллагена I типа, α_2 HS гликопротеин, сиалогликопротеины, гликозамингликаны и их фракции, цитрат, оксипролин и оксисилин, которые целесообразно использовать в ветеринарной медицине для диагностики остеодистрофии, разработке лечения и профилактики.

Modern markers of a metabolism of a bone fabric are described: osteocalcine, tartrat-resistant acid phosphatase, pyridinoline and deoxypridinoline, carboxyterminal telopeptide of type I collagen, α_2 HS glycoprotein, syaloglycoprotein, glycosaminoglycanum and their fractions, citrate, oxypoline and oxylisinum which are expedient for using in veterinary medicine for diagnostics osteodystrophy, development of treatment and preventive maintenance.

Введение. Проблема остеодистрофии (ОД) в современных условиях у крупного рогатого скота, в частности коров и молодняка на откорме остается и дальше не решенной. Основными факторами данной болезни является неполноценное кормление с нарушением детализированных норм и технологии содержания. Часто корма для скота несбалансированные за остеогенными макро- и микроэлементами (МЭ), витаминами и другими биологически активными веществами (БАВ), которые служат причиной значительного распространения ОД с существенными структурными и необратимыми изменениями, что наносит отрасли значительный экономический ущерб. Области западного региона Украины относятся к биогеохимической зоне с дефицитом и дисбалансом многих МЭ в почвах и растениях, по нисходящей J, Co, Se, Mn, Zn, Cu, Fe, Cr, Mo, что служит причиной развития энзоотической остеодистрофии. Поэтому наряду с исследованиями маркеров нарушения метаболизма костной ткани (КТ) при ОД определяют концентрацию в крови и рационах МЭ [1,2,3,4].

Исходя из вышеизложенного, актуальным есть поиск путей и разработка направленной профилактики и ранней доклинической диагностики ОД, которая основывается на изучении молекулярных нарушений возникающих задолго к проявлению симптомов болезни. Нужно отметить, что субклиническая ОД реально встречается значительно чаще, чем это опубликовано в данных официальной статистики. Эти расхождения связанные с несовершенством доклинической диагностики болезни и пониманием молекулярных механизмов патогенеза, дальнейшее изучение которых может служить факторами к разработке превентивной донологической диагностики, профилактики и лечения [1,2].

Более детально метаболизм КТ может быть оценен с помощью специфических высокоинформативных маркеров, составных ее матрикса, которые изменяются при ОД. Исследования крови и мочи районными и областными лабораториями, сводится преимущественно к определению концентрации общего и ионизированного Са, Рн, общей щелочной фосфатазы, щелочного резерва [1,2]. Однако эти показатели не являются достаточно информативными на ранних стадиях болезни, вследствие адаптации гомеостаза или несовершенного исследования, что послужило основанием к разработке более чувствительных биохимических тестов костного метаболизма. Поэтому на сегодня остаются актуальными определения в сыворотке крови и мочи тех метаболитов, которые являются специфическими составными органического и минерального матрикса кости [5,6].

К таким новым и более информативным показателям относят остеокальцин (ОК), конечные пептиды проколлагена I типа (КТПК), тартрат-резистентная кислая фосфатаза (ТРКФ), пиридиновые поперечные связи ("сшивки") – пиридинолин (П) и деоксипиридинолин (ПД), амино- и карбокситерминальные телопептиды коллагена I типа (АТТПК, КТТПК), галактозилгидроксисилин, α_2 HS гликопротеин, сиалогликопротеины, гликозамингликаны (ГАГ) и их фракции, цитрат, оксипролин и оксисилин [7,8,9].

Исходя из этого, целью данной работы было проведение мониторинга метаболических и структурных изменений КТ и возможность использования их в диагностике ОД, а также обосновать целесообразность применения в практике внутренних болезней.

Биохимические маркеры образования и резорбции костной ткани.

Остеокальцин (ОК) сыворотки крови или костный gla-протеин – это неколагеновый белок небольших размеров, специфический для КТ и дентина. Исследовано, что для его синтеза необходим витамин К. ОК синтезируется преимущественно остеобластами и включается в внеклеточный матрикс костной ткани. ОК является одним из наибольших информативных маркеров оценки процессов остеосинтеза и резорбции КТ. Уровень ОК в сыворотке повышается при ряде заболеваний, которым присущие увеличение скорости ремоделирования кости [8,9].

Среди всех исследуемых маркеров, ОК широко исследуется у всех животных. В литературе описанные данные о метаболизме его у коров, коней, свиней. Тем не менее, еще недостаточно данных для их широкого использования в ветеринарной медицине [10,11,12,13,14,15].

У стельных коров проведенными исследованиями по содержанию ОК было выявлено, что в сухостойный период и перед родами концентрация ОК снижалась, а после родов отмечали его повышение. У коров и лошадей выявлено, что на содержание ОК в сыворотке крови влияет возраст и физиологическое состояние. У молодых лошадей возрастом до 2,5 лет наблюдаются высокие концентрации ОК от 35, 7-47,3 нг/мл, а от 3,5 лет до 20 составляет лишь 6,7 нг/мл [12]. У свиней при снижении Р в рационе уровень ОК повышается [15].

Содержание ОК определяют в сыворотке крови радиоиммунологическим и иммуноферментным анализами с использованием ОК [5,7].

Тартрат-резистентная кислая фосфатаза плазмы – лизосомальный фермент, присутствующий, главным образом в КТ, предстательной железе, тромбоцитах, эритроцитах, макрофагах, селезенке и циркулирует в крови. Активность ее в сыворотке выше, чем в плазме. Остеокласты являются лишь одним из источников этого изофермента. Как лизосомальный фермент ТРКФ принимает непосредственное участие в резорбции КТ и секретируется остеокластами во внеклеточную среду. Активность ТРКФ в плазме повышается при костных заболеваниях, которые сопровождаются увеличением скорости ремоделирования КТ [6,8].

ТРКФ определяют иммунологическим методом с использованием моноклональных антител [9].

Карбокситерминальный телопептид коллагена I типа – продукт распада коллагена в процессе резорбции КТ и выделяются с прикрепленными поперечными "сшивками" с мочой [5,9].

При исследовании коров с надоями более 5000 кг отмечали увеличение данного маркера в сравнении с коровами с низкой продуктивностью. После родов в течении 14 дней уровень КТТПК1 возрастает [16,17].

КТТПК1 определяют иммунологическим методом. Моча является удобным объектом для исследования. В последние годы разрабатываются серологические методы [6,9].

Пиридиновые поперечные связи ("сшивки") коллагена присутствуют в коллагенах типов I (костей, дентина зубов, фасций, сухожилий), II, III во всех соединительных тканях, кроме кожи. В тканях преобладает П, а содержание ДП намного меньше. Наибольшее количество ДП выявлено в КТ и дентине. В кости человека соотношения П/ДП составляет 3,5:1 (22% ДП) [5,6].

Определение пиридинов и пептидов коллагена с пиридинолиновыми сшивками в моче как показателя резорбции КТ более информативен, чем оксипролин. Их уровень в моче не зависит от характера питания. Это связано с тем, что коллагеновый матрикс в наибольшем количестве находится в КТ, в которой скорость метаболизма значительно выше, чем в других видах соединительной ткани (например, в хряще). Доказано, что главным источником П и ДП в биологических жидкостях является именно КТ. Они выводятся с мочой в свободной форме (около 40%) и в связанной с пептидами (60%). Экскреция с мочой пиридиновых "сшивок" повышена при остеопорозе [8,9].

Экскреция П и ДП зависит также от циркадного ритма. Установлено, что максимальное выделение происходит ночью, а минимальное – в дневное время. Подобная зависимость от времени суток выявлена у взрослых лошадей [18].

Концентрация пиридинолинов выше у молодых животных, чем у взрослых. По отношению к креатинину уровень П (П/Креат) составляет 148 нмоль/ммоль, а ДП (ДП/Креат) 29,1 нмоль/ммоль, в то время как у взрослых животных соответственно представляет П 15,5 нмоль/ммоль и ДП 3,2 нмоль/ммоль [16,19].

При исследовании коров с высокой (6500кг) и низкой (4900кг) молочной продуктивностью были выявлены повышенные концентрации П и ДП в обеих группах, что свидетельствует о резорбции КТ [16]. У поросят возрастом до 1 месяца отмечали увеличение концентрации пиридинолинов, что указывает на резорбцию КТ [19].

Таким образом, определение пиридиновых "сшивок" в моче имеет ряд преимуществ перед оценкой экскреции оксипролина [5,6]. В настоящее время разрабатываются иммунологические методы определения у животных, в которых используются антитела против свободного П и против ДП или против отдельных цепочек коллагена I типа, которые содержат перекрестные связи.

Данные о содержании оксипролина в жидкостях и тканях дают представление об интенсивности распада коллагена и широко используются для диагностики патологических состояний скелета, в том числе и ОД. У коров, больных ОД в 2-4 раза повышается выделение оксипролина, что указывает на резорбцию кости [1,2].

При распаде органического матрикса кости в плазме повышается концентрация α_2 HS гликопротеина, который может быть диагностическим тестом остеодистрофических процессов [20].

Физиологическая роль лимонной кислоты (ЛК) в метаболизме КТ обусловлена акцепцией ионов Са. В норме, по мере роста и минерализации КТ, содержание ЛК в ней неуклонно повышается, но при развитии ОД происходит ее уменьшение. Увеличение концентрации ЛК в костях способствует повышению растворимости минерального компонента, и мобилизации Са из кости в кровь. ЛК и остеокальцин тесно связываются с кристаллами гидроксиапатита [8,9].

Наличие в костной ткани гликозамингликанов (ГАГ) имеет непосредственное отношение к процессам минерализации. По мере прогрессирования процессов оссификации концентрация ГАГ, а именно хондроитин 4-, 6-сульфатов, в матриксе снижается. При ОД концентрация ГАГ возрастает несколько раз, и изменяется их фракционный состав [1,2].

Содержание сиалогликопротеинов зависит от степени минерализации костей и прогрессивно уменьшается по мере созревания КТ. В крови коров, больных ОД уровень сиалогликопротеинов увеличивается, что указывает на процессы остеопороза [1,2].

Проводятся поиски возможностей применения радиобиологического метода оценки КТ животных компьютерной программой. Для оценки губчатого вещества кости используется медицинская программа TRABECULA, которая разрешает анализировать кость животных после соответствующей адаптации. Данная методика пока еще применяется только на лошадях. Внедрение такого метода для других животных было бы достижением в ветеринарной диагностике [21].

Выводы. Использование указанных специфических маркеров в ближайшее время разрешит проблему ранней диагностики нарушений метаболизма костной ткани и профилактики остеопатологий. Определение костных маркеров, таких как остеокальцин, тартрат-резистентная кислая фосфатаза, пиридинолин и деоксипиридинолин, карбокситерминальные телопептиды коллагена I типа, гликозилгидроксизин, α_2 HS гликопротеин, сиалогликопро-

теины, гликозаминогликаны и их фракции, цитрат, оксипролин и оксизин целесообразно использовать для доклинической диагностики остеодистрофии на молекулярном уровне, разработке лечения и профилактики болезни.

Литература. 1. Стадник А.М. Остеодистрофія корів і бичків: патогенетична роль глікоконюгантів, рання діагностика та спрямована профілактика // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – 1998. – вип.5. Ч.1. – С.223 – 224. 2. Стадник А.М., Федорович В.Л. Энзоотична остеодистрофія бугайців за жомової відгодівлі: рання діагностика і профілактика // Науковий вісник ЛНАВМ. – Львів, 2005. –Т.7 (№27) Ч.2 – С.91 – 98. 3. Борисевич В.Б., Борисевич Б.В. Энзоотическая остеодистрофия крупного рогатого скота в Полесье // Ветеринария, 2005. - №5. – С.41-43. 4. Кравців Р.Й. Проблеми мікроелементного живлення тварин і птиці, якості виробленої продукції, профілактики мікроелементозів та шляхи їх вирішення // Науковий вісник ЛДАВМ. – Львів, 2000. – Т. 2, (№2). Ч. 4 – С. 86-91. 6. Поворознюк В.В. Остеопороз та біохімічні маркери метаболізму кісткової тканини // Лабораторна діагностика. – 2002. - №1. – С.53-60. 5. Минченко Б.И., Беневоленский Д.С., Тишенина Р.С. Биохимические показатели метаболических нарушений в костной ткани. Часть I. Резорбция кости // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. - №1. – С.8-15. 7 Минченко Б.И., Беневоленский Д.С., Тишенина Р.С. Биохимические показатели метаболических нарушений в костной ткани. Часть II. Образование кости // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. - №4. – С.11-17. 8. Остеопороз: епідеміологія, клініка, діагностика, профілактика і лікування: Монографія / Акад. мед. наук України; под ред. Н.А. Коржа, В.В. Поворознюка, Н.В. Дедух, І.А. Зуланца. – Х.: Золоті сторінки, 2002. – 648с. 9. Ризгз Б.Л., Мелтон III Л. Дж. Остеопороз. Пер. с англ. М. – СПб: ЗАО "Издательство БИНОМ", "Невский диалект", 2000 г. – 560 с. 10. Carter S. D. et al. The Determination of Serum Concentrations of Osteocalcin in Growing Pigs and Its Relationship to End-Measures of Bone Mineralization // J. Anim. Sci. 1996. – Vol. 74. – P.2719–2729. 11. Lepage O.M. et al. Biochemical markers of bone metabolism in draught and warm-blood horses // Vet. J. - 1998. - Vol. 156. - P.169–175. 12. Lepage O.M., Marcoux M., Tremblay A. Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age // Can. J. Vet. Res. – 1990. - Vol. 54(2). – P.223–226. 13. Mosel M., Corlett S.C. Assessment of bone turnover in the dry period of dairy cows by measurement of plasma bone GLA protein, total plasma alkaline phosphatase activity and urinary hydroxyproline // Exp. Physiol. – 1990. - Vol. 75. – P.827–837. 14. Naito Y. et al. Plasma osteocalcin in periparturient and postparturient cows: correlation with plasma 1,25-dihydroxyvitamin D, calcium, and inorganic phosphorus // J. Dairy Sci. - 1990. - Vol. 73. – P.3481–3484. 15. Nicodemo M.L.F. et al. Effects of variations in dietary calcium and phosphorus supply on plasma and bone osteocalcin concentrations and bone mineralization in growing pigs // Exp. Physiol. - 1998. - Vol. 83. – P. 659–665. 16. Liesegang A. et al. Biochemical Markers of Bone Formation and Resorption Around Parturition and During Lactation in Dairy Cows with High and Low Standard Milk Yields // J Dairy Sci. – 2000. - Vol. 83. - P.1773–1781. 17. Liesegang A. et al. The course of selected bone resorption marker concentrations in response to Short-term Hypocalcemia Experimentally Induced with Disodium EDTA Infusions in Dairy Cows // J. Vet. Med. A – 2000. - Vol. 47. – P. 477–487. 18. Black A. et al. Diurnal Variation and Age Differences in the Biochemical Markers of Bone Turnover in Horses // J. Anim. Sci. 1999. – Vol. 77. – P.75–83. 19. Shaw D. T. et al. Impact of supplement withdrawal and wheat middling inclusion on bone metabolism, bone strength, and the incidence of bone fractures occurring at slaughter in pigs // J. Anim. Sci. - 2006. - Vol. 84 – P. 1138–1146. 20. Dickson I.R., Pool A.R., Vels A. Localization in plasma α_2 HS glycoprotein in mineralizing human bone // Nature. – 1975. Vol. 256. – P. 430-442. 21. Dzierzecka Malgorzata, Charuta Anna. Nowe techniki oceny jakosci tkanki kostnej i mozliwosc ich zastosowania w medycynie weterynaryjnej // Medycyna Wet. – 2006. - №62(6). – S.617-620.

ПОСТУПИЛА 25 мая 2007 г

УДК 619:616.34-002:615.322.2

ПРИМЕНЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛИПТА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ТЕЛЯТ, БОЛЬНЫХ АБОМАЗОЭНТЕРИТОМ, ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКОГО СТАТУСА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КРОВИ.

Стоякина Н.А., Севрюк И.З.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», Республика Беларусь

Исследование изменений параметров перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и антиокислительной активности плазмы) и изменений клинического статуса телят, больных абомазоэнтеритом во время комплексной терапии с использованием хлорофиллипта. Состояние больных телят оценивалось по шкале разработанной авторами.

Телята были разделены на две группы. Контрольная и опытная группы включали по 10 животных. В начале лечения группы не имели значимых различий в лабораторных параметрах показателей перекисного окисления липидов и различий в клиническом состоянии. На пятый день проведения терапии группы различались по содержанию малонового диальдегида и антиокислительной активности плазмы (обе $p < 0,01$) и индексам общего состояния и состояния пищеварительной системы (оба $p < 0,05$). В экспериментальной группе изменения были закономерными и значимыми для малонового диальдегида ($p < 0,05$) и антиокислительной активности плазмы ($p < 0,01$). В контрольной группе подобные изменения не выявлены. На пятый день терапии в опытной группе также выявлена значимая корреляция показателей малонового диальдегида и антиокислительной активности плазмы ($r = -0,55$; $p = 0,011$).

The study of lipid peroxidation parameters variation (malonaldehyde and plasma antioxidant activity) and changes of the clinical status in calves with abomasoenteritis during complex therapy including Chlorophylliptum. The state of diseased calves was estimated with the scale developed by the author.

The calves were divided randomly in two groups. The control and experimental set both included 10 animals. The groups had no significant difference in laboratory, lipid peroxidation and clinical parameters from the beginning of the treatment. The groups differed in malonaldehyde and plasma antioxidant activity (both $p < 0,01$) and clinical summary and digestive indices (both $p < 0,05$) at the fifth day of therapy administration. The changes of malonaldehyde ($p < 0,05$) and plasma antioxidant activity ($p < 0,01$) were significant during the five-day therapy in the experi-