

П. В. Усатюк, М. І. Цвіліховський, А. Анієфіок, Д. О. Мельничук

Динаміка білкового спектра плазми крові великої рогатої худоби в ранньому онтогенезі в нормі та при діарейі

В период раннего постнатального онтогенеза в плазме крови новорожденных животных крупного рогатого скота (на момент рождения и возрастом 1, 2, 5 и 10 сут) методом электрофореза в 10 %-ном полиакриламидном геле (0,1% ДДСNa) изучено содержание белковых фракций, а методом радиальной иммунодифузии - содержание отдельных классов иммунных глобулинов - IgG₁, IgG₂, IgM. Показано, что на момент рождения у животных отсутствует белковая фракция плазмы крови в границах 140-160 кДа и отсутствуют иммунные глобулины (G₁, G₂ и M). Физиологический уровень γ -глобулинов и отдельных их классов, IgG₁ и IgG₂, достигается после кормления молозивом на 1-е сутки жизни, а для Ig M - на 2-е сутки. При патологии пищеварительного канала (диарея) после кормления телят молозивом скорость нарастания в плазме их крови общего белка и γ -глобулинов снижена в 2,7 и 1,6 раза соответственно, а максимальное содержание отдельных белковых фракций, включая IgG₁, формируется только на 10-е сутки жизни. Сделано заключение о наличии среди новорожденных животных, которые рождаются с дисфункцией процессов адсорбции в тонком кишечнике иммунных глобулинов и других белков.

ВСТУП

Формування фізіологічного рівня імунних глобулінів (Ig) у плазмі крові новонароджених телят відбувається в першу добу життя при їх годівлі молозивом (колостральний імунітет) завдяки спряженості фізіологічних і біохімічних механізмів новонароджених: високому вмісту імунних глобулінів і інгібіторів протеолітичних ферментів у молозиві [9, 14], а також здатності епітелію тонкого кишечника до всмоктування Ig у нативному вигляді. Передбачається, що низький вміст Ig у плазмі крові новонароджених телят є причиною їх недостатнього розвитку та сприяє започаткуванню респіраторних хвороб, хвороб травного каналу тощо [5, 9, 12]. З іншого боку, патологія травного каналу новонароджених телят може порушувати у них формування білкового спектра крові, пов'язаного зі змінами всмоктування окремих білків, зокрема Ig.

Мета нашої роботи - дослідити білковий склад плазми крові корів та їх новонароджених телят - здорових і хворих на діарею.

МЕТОДИКА

У дослідженнях використовували дорослих тварин віком 5 - 7 років та їх новонароджених телят. Проби крові відбирали безпосередньо після отелення. Через 1 год після народження телятам згодовували 1 л молозива. Наступні проби брали у телят на 1, 2, 5 та 10-ту добу життя в ранковий час, до їх годівлі. До групи хворих відносили тварин з клінічними ознаками гострих розладів травлення з явищем діареї, які спостерігали у телят віком 3-5 діб.

Плазму крові отримували при наявності 50 од/мл гепарину центрифугуванням при 3000 g протягом 5 хв. Кількість білка в про-

бах визначали за допомогою біуретового реактива [12] з використанням стандартного розчину сироваткового альбуміну.

Фракційний склад білків плазми крові визначали методом електрофорезу в 10%-му поліакриламідному гелі при наявності 0,1% додецилсульфату натрію згідно з використанням білків-стандартів молекулярних мас «LMW» і «HMW» (LKB, Швеція) [16]. Молекулярну масу окремих білкових фракцій розраховували за їх електрофоретичною рухомістю (R_f). Денситометрію та математичну обробку вмісту білкових фракцій здійснювали на приладі типу Spescord M 40 (Ge1-scanning, Ge1-iteration).

Індивідуальні класи імунних глобулінів IgG₁, IgG₂ і IgM визначали методом радіальної імунодифузії [17] з використанням моноспецифічних антисироваток.

РЕЗУЛЬТАТИ

Аналіз білкового складу плазми крові великої рогатої худоби (рис.1) дозволив охарактеризувати 12 основних фракцій [4] за їх молекулярними масами: 1 -сумарна фракція

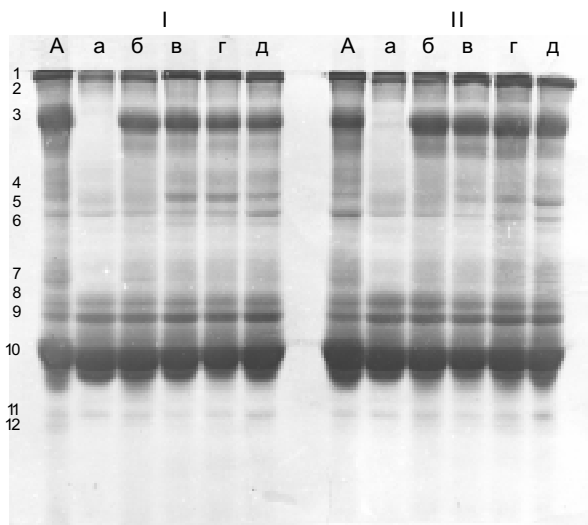


Рис. 1. Електрофореграма білків плазми крові корів-матерів (А) та їх новонароджених телят у нормі (I) та при діареї (II) у динаміці віку: а - на момент народження; б - 1 доба; в - 2 доби; г - 5 діб; д - 10 діб. Цифрами позначено номери білкових фракцій.

високомолекулярних білків (більше ніж 1 млн. Да), якими є β -ліпопротеїд та імуноглобулін М; 2 - α_2 -макроглобулін (близько 700 кДа); 3 - сумарна фракція імунних глобулінів А (160 кДа) та G₁ і G₂ (140-150 кДа); 4 - білок з молекулярною масою 100 кДа (гаптоглобін); 5 - 96 кДа; 6 - 92 кДа; 7-80 кДа; 8,9 - 76 та 72 кДа (трансферини); 10 - 67 кДа альбумін; 11 - 60 кДа (преальбумін); 12-52 кДа.

Білковий спектр плазми крові новонароджених телят до першої годівлі молозивом відрізняється від дорослих (рис. 2) практично повною відсутністю фракції γ -глобулінів, зниженим вмістом (табл.1) високомолекулярної фракції (в 1,6 раза), гаптоглобіна (в 1,4 раза) та білків з молекулярними масами 96, 92 та 80 кДа в 2,5, 3,7 та 4,4 раза відповідно,

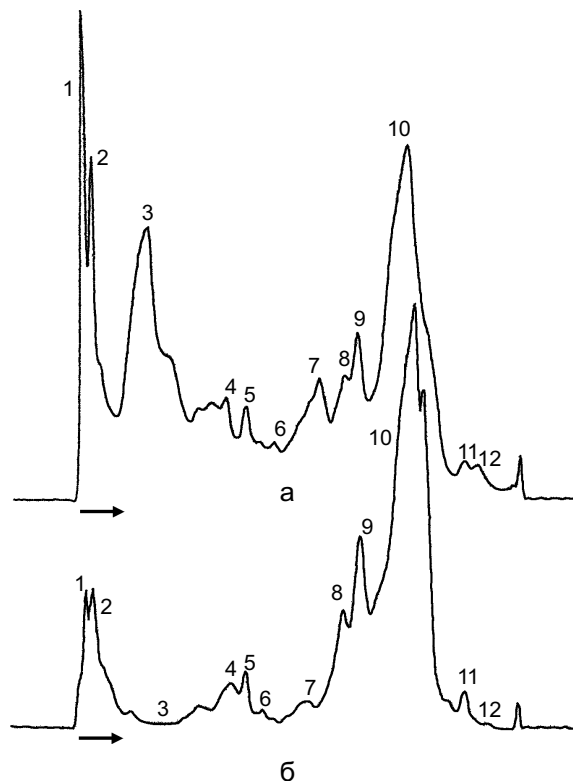


Рис. 2. Денситограми гелів електрофоретичного розділення білків плазми крові корів-матерів (А) та їх телят (а) на момент народження. Стрілкою показано напрямок електрофорезу, цифрами - номери білкових фракцій у гелі.

Таблиця 1. Вміст (г/л) білкових фракцій у плазмі крові тварин (M±m, n=5)

Об'єкт досліджень	Білкові фракції											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Корови-матері	4,7 ±1,5	7,8 ±0,8	21,3 ±0,5	2,9 ±0,8	2,7±0,3	2,6 ±0,5	6,6±0,4	3,6 ±0,1	4,6 ±0,2	30,3 ±0,9	2,0 ±0,6	3,25 ±0,1
Новонароджені телята												
на момент народження												
здорові	1,5 ±0,14	4,7±0,3	1,7±0,4	2,2 ±0,4	1,03 ±0,1	0,7 ±0,04	1,5±0,3	4,2 ±0,3	3,5 ±0,8	27,9 ±0,9	1,25 ±0,2	0,2 ±0,03
хворі	2,9±0,7	4,4 ±0,8	0,2±0,02	1,39±0,1	0,8 ±0,1	0,7 ±0,1	1,7±0,1	3,4 ±0,9	4,96 ±0,1	31,0±1,04	1,6 ±0,5	0,4 ±0,12
1-ша доба												
здорові	2,6 ±0,2	6,5 ±0,8	13,1±1,3	2,3 ±0,2	1,03 ±0,2	1,2±0,2	2,6 ±0,3	3,8 ±0,2	5,5 ±0,2	28,3 ±0,7	1,6 ±0,4	0,4±1,1
хворі	2,3 ±0,1	5,1 ±0,5	9,7 ±1,9	2,7 ±0,4	1,1 ±0,1	0,7 ±0,2	2,8±0,3	3,8±0,5	15,1 ±0,6	24,9 ±1,2	1,3 ±0,3	0,2 ±0,1
2-га доба												
здорові	3,9 ±0,6	7,5 ±0,8	18,3±2,6	2,6 ±0,2	1,7 ±0,5	1,8 ±0,5	3,9±0,3	4,9 ±0,4	6,9 ±0,5	33,5 ±1,5	1,4±0,3	0,4 ±0,1
хворі	4,0±0,7	5,9 ±0,4	13,0 ±2,0	2,5 ±0,1	1,1 ±0,1	1,3 ±0,1	3,2 ±0,2	3,9 ±0,2	6,7±0,5	28,7 ±1,03	1,4 ±0,1	0,3 ±0,1
5-та доба												
здорові	2,7 ±0,3	6,6 ±0,8	12,5 ±1,6	1,9 ±0,2	1,8 ±0,2	1,3 ±0,2	3,1 ±0,2	3,7 ±0,2	5,1 ±0,3	27,0±0,6	1,9 ±0,2	0,5 ±0,2
хворі	3,3 ±0,3	7,1±0,2	15,8 ±2,9	2,9 ±0,5	2,1 ±0,6	1,8 ±0,2	4,1 ±0,2	4,1 ±0,3	6,8±0,5	30,5 ±1,4	2,1 ±0,2	0,5 ±0,1
10-та доба												
здорові	2,8 ±0,4	6,0 ±0,8	10,8 ±1,6	2,3 ±0,4	1,1±0,2	1,1 ±0,2	2,3 ±0,4	3,7±0,3	5,1 ±0,3	26,7 ±0,6	1,9±0,4	0,3 ±0,1
хворі	2,0 ±0,1	7,6 ±0,5	17,5 ±1,3	3,0 ±0,1	1,3 ±0,1	1,5 ±0,1	4,6 ±0,7	3,2 ±0,6	4,1 ±0,9	25,0 ±0,6	2,1 ±0,02	0,4 ±0,01

Таблиця 2. Вміст (г/л) імунних глобулінів у плазмі крові тварин (M±m, n=5-6)

Об'єкт дослідження	1gG ₁	1gG ₂	IgM
Корови-матері	8,6±1,4	14,7±0,4	1,2±0,2
Новонароджені телята			
на момент народження	сліди	сліди	сліди
1-ша доба	9,3 ± 1,4	8,0 ± 0,8	0,6 ± 0,1
2-га доба	9,4 ± 1,9	6,4 ± 1,0	1,1 ±0,2
5-та доба	8,0 ± 1,2	6,8 ± 1,6	1,5 ± 0,1
10-та доба	8,1 ± 0,8	6,2 ± 1,5	1,0±0,3

тоді як білки з молекулярними масами 76, 72 кДа (трансферини) та 67 кДа (альбумін) містяться в однакових кількостях порівняно з такими у матерів. Більше того, при відсутності у новонароджених Ig сироватковий альбумін сягає 52 % від усіх білків, проти 33% у дорослих, а разом з фракціями 76 і 72 кДа досягають рівня 70%.

Годівля новонароджених тварин молозивом, поряд із включенням власних білоксинтетичних процесів, формує у тварин на 1-2-гу добу (див. табл.1) фізіологічний рівень загального білка, вміст окремих білкових фракцій, в тому числі індивідуальних класів [7, 11] імунних глобулінів - IgG₁, IgG₂, Ig M (табл.2).

У групі новонароджених телят, які захворіли у віці 3-5 діб на гострі розлади травлення з явищем діареї, виявлено наступні особливості. За даними динаміки наростання вмісту загального білка його максимум припадає на вік 5 діб, тоді як у здорових - на 2-гу добу життя. Розрахункова швидкість надходження білка в кров'яне русло за 1 добу у дослідній групі (0,026 г білка за 1 год) в 2,7 рази нижча, ніж у здорових тварин (0,072 г білка за 1 год). Істотним є також відставання в швидкості формування фракції γ -глобулінів та IgG₁. Якщо врахувати, що саме фракції γ -глобулінів та імуноглобуліну G₁ належить основна частка в білках, що адсорбуються в кишечнику в першу добу життя, то можна зробити висновок про порушення у таких тварин процесів всмоктування білків при народженні, в тому числі - імунних глобулінів.

ОБГОВОРЕННЯ

Вивченню фракційного складу плазми (сироватки) крові новонароджених телят та його особливостей в ранньому онтогенезі присвячено чисельні дослідження [1, 3, 5, 9, 12, 14]. Це викликано, в першу чергу, двома передумовами. По-перше, телята народжуються з повною відсутністю в плазмі крові імунних глобулінів; по-друге, недостатній рівень Ig у плазмі крові тварин у ранньому віці пов'язують з їх частими захворюваннями ор-

ганів травлення, дихання, летальними випадками тощо [9, 10, 15, 19-22]. Відомо, що захист від інфекції в перші місяці життя забезпечують антитіла матері, які передаються через молозиво і всмоктуються в кишечнику в першу добу життя новонароджених. Причому, лише IgG долає трансплацентарний бар'єр у людини [8], тоді як інші класи (A, M, D, E) та практично всі Ig у тварин (G, M, A) мають всмоктуватись із молозива у кишечнику новонароджених. Цей біологічний механізм обмежений у часі. Через 9 год після народження всмоктується тільки 50% імуноглобулінів, а через 24 год цей шлях практично перестає існувати [9]. За нашими результатами, в першу добу життя в плазматичній мембрані епітелію тонкого кишечника новонароджених телят існують спеціальні білки-рецептори імунних глобулінів, які зникають до 3-добового віку [6, 18].

Тобто невчасна годівля молозивом новонароджених телят призводила до отримання поголів'я з низьким вмістом імуноглобулінів, пониженою резистентністю та недостатнім захистом кишечного тракту від інфекцій. До інших причин, які можуть впливати на формування фізіологічного вмісту білкових фракцій та Ig у новонароджених відносяться фактори утримання та годівлі тварин, якість молозива, розвиненість тонкого кишечника тощо. Особливістю цього дослідження є те, що нами встановлено понижену швидкість формування рівня загального білка, деяких білкових фракцій та імунних глобулінів у новонароджених тварин у першу добу їх життя, коли ще клінічні ознаки гострих розладів травлення не спостерігалися. Це узгоджується з попередніми припущеннями [5, 21, 22], що тварини можуть народжуватись із функціонально недорозвинутим травним каналом, в тому числі - тонким кишечником. Це і буде призводити до порушення процесів абсорбції Ig і появи тварин із низькою резистентністю до вірусних і мікробних захворювань. Причинами цього можуть бути переважно фактори фізіологічного статусу [1] материнського організму, якість утримання та годівлі матерів, хвороби їх у період внутрішньоутробного розвитку плоду тощо.

P.V.Usatyuk, N.I. Tsvilikhovskii, A. Aniefiok, D.O. Melnichuk

DYNAMICS OF PROTEINS SPECTRA OF CATTLE BLOOD PLASMA AT NEONATAL ONTOGENESIS IN NORM AND DIARRHEA

The contents of blood plasma protein fractions and immunoglobulines were studied in adult cattle and in new born calves (just new born and age of 1,2,5 and 10 days) by the 10% PAAG EP (0,1% SDS) and radial immunodiffusion methods. It is shown that protein bands of 140-160 kD and immunoglobulines (G1, G2, M) are absent at the moment of birth. The physiology level of γ -globulines and IgG₁ reach at 1 day of life, while IgM – at second. After colostrum breeding of just new born calves the speed increasing of total plasma protein and γ -globulines fraction are lowest (in 2,7 and 1,7 times respectively) in diarrhoea animals in compare to the health one. The maximum level of IgG₁ concentration forms in disease animals only at 10 days of age. On the date obtained it is concluded the presence such new born calves which have low level of small intestine developing and disturbance of immunoglobulines absorption.

National Agrarian University, Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Галяс В.Л. Фракционный состав белков сыворотки крови новорожденных телят при электрофорезе в полиакриламидном геле // Бюл. УНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. - 1979. - 1, № 1. - С. 17-18.
2. Захаренко Н.А. Механизмы нарушений обмена веществ и способы их коррекции у новорожденных телят: Автореф дисс... д-ра. биол. наук. - Львов, 1993. - 34 с.
3. Кармолиев Р.Х. Возрастные изменения электрохимических свойств белков крови крупного рогатого скота // С.-х. биология. - 1975. - №5. - С. 32-39.
4. Кухта В.К., Олецкий З.И., Стожаров А.Н. Белки плазмы крови: патохимия и клиническое значение. - Минск: Беларусь, 1986. - 80 с.
5. Маслянюк Р.П. Особенности антителообразования у телят на ранних стадиях развития // С.-х. биология. - 1970. - № 6. - С. 893-897.
6. Мельничук Д.О., Усатюк П.В., Цвіліховський М.І. Роль білкових структур плазматичної мембрани кишкового епітелію у формуванні колос-

трального імунітету новонароджених телят // Наук. вісник НАУ. - 1998. - №6. - С. 13-20.

7. Пешкус Ю.К. Иммуноглобулины крупного рогатого скота // С.-х. биология. - 1987. - № 3. - С. 85-88.
8. Ройт А. Основы иммунологии. - М.: Мир, 1991. - 327 с.
9. Besser T.E., Gay C.C. The importance of colostrum to the health neonatal calf // Vet. Clin. North Am. et Food Anim. Pract. - 1994. - 10, №1. - P. 107-117.
10. Bogstedt A.K., Johansen K., Hatta H. et al. Passive immunity against diarrhea // Acta Paediatr. - 1996. - 85, №2. - P. 125-128.
11. Butler T.E. Bovine immunoglobulins: an augmented review // Vet. Immunol. and Immunopatol. - 1983. - 4. - P. 43-152.
12. Gay C.C., McGuire T.C., Parish S.M. Seasonal variation in passive transfer of immunoglobulin G₁ to newborn calves // J. Amer. Veter. Vtd. Assn. - 1983. - 183, № 5. - P. 566-568.
13. Gornall A.J., Bardawill G.G., David M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction // J. Biol. Chem. - 1994. - 177, № 4. - P. 751-752.
14. Husband A.J. Perspectives in mucosal immunity: a ruminant model // Vet. Immunol. and Immunopatol. - 1987. - 17. - P. 357-365.
15. Kasary T.R. Metabolic acidosis in calves // Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 1999. - 15, №3. - P. 473-486.
16. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. - 1970. - 227, № 5259. - P. 680-685.
17. Manchini G., Garbonara A., Heremans J. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // Immunochem. - 1965. - № 2. - P. 235-254.
18. Melnichuk D.A., Usatuk P.V., Tsvilichovskiy N.I., Tereschenko M. Receptor-endocytocical mechanism of the cattle colostrum immunity formation. In: The 2nd Parnas Conference. - Gdansk, 1998. - P. 24.
19. Naylor J.M. Oral electrolyte therapy // Vet. Clin. North. Amer. Food Anim. Pract. - 1999. - 15, №3. - P. 487-504.
20. Perino L.J., Wittm T.E., Ross G.S. Effects of various risk factors on plasma protein and serum immunoglobulin concentration of calves at postpartum hours 10 and 24 // Amer. J.Vet. Res. - 1985. - 56, №9. - P. 1144-1148.
21. Stalley T.E., Bush L.I. Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease // J.Dairy Sci. - 1985. - 1, №1. - P. 184-205.
22. Stott G., Fellan A. Colostrum immunoglobulin absorption linearly related to concentration for calves // J. Dairy Sci. - 1983. - 66, №6. - P. 1319-1328.

Нац. аграр. ун-т, Київ

Матеріал надійшов до редакції 13.07.2000