

МАРКЕРЫ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ГЛУБОКОСТЕЛЬНЫХ КОРОВ КАК ПРЕДИКТОРЫ ПНЕВМОНИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

Е.А. Калаева¹, А.Е. Черницкий², кандидаты биологических наук,
В.Н. Калаев¹, доктор биологических наук, М. Алхамед¹

¹Воронежский государственный университет,
394018, Воронеж, Университетская пл., 1

²Всероссийский научно-исследовательский институт патологии, фармакологии и терапии,
394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 114б
E-mail: kalaevae@gmail.com

Проанализированы показатели эндогенной интоксикации у глубокостельных коров, и выявлена возможность их использования в качестве предикторов бронхолегочной патологии у новорожденных телят. Было обследовано 29 коров на 239-262 день гестации и 29 новорожденных телят красно-пестрой голштинской породы. Бронхит развился у всех телят в течение первого месяца жизни, у 7 новорожденных осложнился пневмонией. Проанализированы маркеры эндогенной интоксикации коров: общая и эффективная концентрация альбумина, содержание среднемолекулярных пептидов (СМП) в сыворотке крови, лейкоцитарный индекс интоксикации Кальф-Калифа (ЛИИ); индекс токсичности (ИТ), коэффициент интоксикации (КИ). Уровень СМП у коров, телята которых не заболели пневмонией, составлял $0,408 \pm 0,152$ у.е. Коровы, телята которых заболели пневмонией, демонстрировали более высокое содержание СМП ($0,615 \pm 0,977$ у.е., $p < 0,05$). Обнаружена корреляция между концентрацией СМП и вероятностью пневмонии ($r_s = 0,536$, $p < 0,005$). Лейкоцитарный индекс интоксикации Кальф-Калифа и индекс токсичности в обеих группах коров значительно варьировали; достоверных различий между группами не обнаружено. Коэффициент интоксикации у коров, телята которых заболели пневмонией, был равен $26,5 \pm 8,4$, статистически достоверно ($p < 0,05$) превышал КИ у коров, потомство которых имело неосложненный бронхит ($КИ = 17,2 \pm 6,8$). Обнаружена корреляция между КИ у коров и пневмонией у их потомства ($r_s = 0,568$, $p < 0,001$). Содержание СМП в крови стельных коров может служить предиктором пневмонии у новорожденных телят ($AUC = 0,782$, чувствительность – 85,71%, специфичность – 81,82%, критическое значение $> 0,547$ у.е.). Диагностическая ценность предиктора КИ оценивается как очень хорошая ($AUC = 0,812$, чувствительность – 71,43%, специфичность – 86,36%, критическое значение $> 22,5$ у.е.). Концентрация среднемолекулярных пептидов в крови и коэффициент интоксикации у коров в период гестации позволяют с высокой точностью предсказать развитие бронхолегочной патологии у их потомства.

ENDOGENOUS INTOXICATION MARKERS OF DEEP-PREGNANT COWS AS PREDICTORS OF PNEUMONIA IN NEWBORN CALVES

Kalaeva E.A.¹, Chernitsky A.E.², Kalaev V.N.¹, Alhamed M.¹

¹Voronezh State University, 394018, Voronezh, Universitetskaya pl., 1;

²All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy,
394087, Voronezh, ul. Lomonosova, 114b

E-mail: kalaevae@gmail.com

The aim of the work was to analyze the indices of endogenous intoxication in deep-pregnant cows and to identify the possibilities of their use as predictors of bronchopulmonary pathology in newborn calves. 29 cows were examined for 239-262 days of gestation and 29 newborn calves of the red-and-white Holstein breed. Bronchitis developed in all calves during the first month of life, and in 7 newborns it was complicated by pneumonia. Markers of endogenous intoxication of cows were analyzed: total and effective albumin concentration, serum MMP content, Kalf-Kalif leukocyte index of intoxication (LI); toxicity index (IT), the ratio of intoxication (CI). The MMP level in cows whose calves did not develop pneumonia was 0.408 ± 0.152 units. Cows whose calves developed pneumonia showed a significantly higher content of SMP (0.615 ± 0.977 units, $p < 0.05$). Correlation between the concentration of the MMP and the probability of pneumonia ($r_s = 0.536$, $p < 0.005$) was found. The leukocyte intoxication index of Kalf-Kalif and the toxicity index (IT) in both groups of cows varied significantly; no differences between groups were found. The coefficient of intoxication in cows whose calves developed pneumonia ($CI = 26.5 \pm 8.4$), statistically significantly ($p < 0.05$) exceeded CI in cows whose offspring had uncomplicated bronchitis ($CI = 17.2 \pm 6.8$). Correlation between the CI in cows and pneumonia in their offspring ($r_s = 0.568$, $p < 0.001$) was found. The content of the MMP in blood of pregnant cows can serve as a predictor of pneumonia in newborn calves ($AUC = 0.782$, sensitivity – 85.71%, specificity – 81.82%, critical value > 0.547 units). The diagnostic value of the CI predictor is rated as very good ($AUC = 0.812$); sensitivity – 71.43%, specificity – 86.36%, critical value > 22.5 . The concentration of SMP in the blood of cows and CI in the period of gestation allows us to predict the development of bronchopulmonary pathology in their offspring with high accuracy.

Ключевые слова: бронхит, гестоз, коровы, пневмония, телята, эндогенная интоксикация

Key words: bronchitis, gestosis, cows, pneumonia, calves, endogenous intoxication

В период гестации даже незначительные воздействия способны нарушить неустойчивый гомеостаз и вызвать сбой в работе систем детоксикации организма матери [1]. Гестоз – патологическое состояние организма беременных животных, проявляющееся эндогенной интоксикацией (ЭИ), генерализованным эндотелиозом, сосудистым спазмом, фетоплацентарной и

полиорганной недостаточностью [2]. Накопление продуктов катаболизма оказывает негативное влияние на организмы стельной коровы и теленка, поскольку все процессы в системе «мать – плод» тесно взаимосвязаны [3]. ЭИ длительное время может протекать скрыто, при этом истощая адаптивный потенциал организма матери и плода, приводя к рождению маложизнеспособных телят.

собного или ослабленного потомства. Инфекции дыхательной системы занимают ведущее место в структуре заболеваний неонатального периода у крупного рогатого скота: до 80-100% новорожденных телят подвержены болезням органов дыхания [4-6].

При исследовании эндогенной интоксикации используют различные маркеры [7]. В качестве одного из первых стали применять лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) Я.Я. Кальф-Калифа [8], отражающий неспецифическую реактивность системы полиморфноядерных гранулоцитов в отношении патогенов различного происхождения [9]. Однако лейкоцитарные индексы (лимфоцитарный, ядерный индекс сдвига и др.) могут не отражать наличия ЭИ [10]. В качестве молекулярного маркера интоксикации используют концентрацию веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ) [11,12]. Вещества с молекулярной массой 300-5000 Да в основном ответственны за негативные эффекты ЭИ [13]. Пул ВНСММ включает в себя пептиды, производные олигоспиртов и глюкуроновой кислоты. Среднемолекулярные пептиды (СМП) с молекулярной массой 500-2000 Да образуются в результате протеолиза в поврежденных тканях и в плазме. Считается, что СМП могут проникать через плацентарный барьер, оказывая непосредственное токсическое влияние на плод, вызывая полиорганные нарушения [14]. Еще одним маркером ЭИ служит концентрация альбумина, так как он осуществляет транспортировку и депонирование слаборастворимых веществ экзогенного и эндогенного происхождения [15,16]. При этом общая концентрация альбумина в сыворотке крови практически не меняется, но резерв его связывающей способности снижается. Другие индексы интоксикации (коэффициент интоксикации, эффективная концентрация альбумина) определяют баланс между накоплением и детоксикацией метаболитов [17].

Диагностическая ценность перечисленных маркеров и возможности их применения для прогнозирования состояния здоровья плода и новорожденных животных изучены недостаточно. Цель настоящей работы – анализ показателей эндогенной интоксикации у коров в поздние сроки гестации и выявления возможностей их использования в качестве предикторов бронхолегочной патологии у новорожденных телят.

Методика. Было обследовано 29 коров на 239-262 день гестации и 29 новорожденных телят красно-пестрой голштинской породы. Все телята в течение первого месяца жизни заболели бронхитом. Были сформированы две группы коров: в I (22 головы) вошли животные, потомство которых заболело бронхитом; во II (7 голов) – коровы, у новорожденных телят которых бронхит осложнился пневмонией. Были соблюдены все применимые международные и национальные руководящие принципы по уходу и использованию животных.

Лейкограмму периферической крови коров рассчитывали после окрашивания мазков крови по Романовскому-Гимза. Концентрацию среднемолекулярных пептидов в сыворотке крови коров определяли на спектрофотометре «Shimadzu UV-1700» (Япония) по разработанной нами методике. Концентрация СМП в сыворотке до 0,400 у.е. соответствовала норме, более 0,400 у.е. – состоянию эндогенной интоксикации [18]. Измерение показателей эффективной концентрации альбумина (ЭКА) и общей концентрации альбумина (ОКА) в сыворотке крови коров проводили с помощью коммерческих наборов НИИ физико-химиче-

ской медицины (Россия) на спектрофлуорофотометре «Shimadzu RF-5301 PC» (Япония). В норме эти величины практически одинаковы, и соотношение ЭКА/ОКА близко к единице.

Интегральные показатели (индексы) рассчитывали по следующим формулам:

Индекс токсичности [4]:

$$ИТ = \frac{ОКА}{ЭКА} - 1 \quad (1)$$

Коэффициент интоксикации [4]:

$$КИ = \frac{СМП}{ЭКА} \times 1000 \quad (2)$$

Лейкоцитарный индекс интоксикации [8]:

$$ЛИИ = \frac{(4МЦ + 3МетаМЦ + 2ПЯН + 1СЯН) \times (ПК + 1)}{(МОН + ЛФ) \times (ЭФ + 1)} \quad (3)$$

где МЦ – миелоциты, МетаМЦ – метамиелоциты, ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы, ПК – плазматические клетки, МОН – моноциты, ЛФ – лимфоциты, ЭФ – эозинофилы (%).

Статистическую обработку результатов проводили в пакетах программ Stadia 7.0 Professional и MedCalc 17.5.3. Распределение большей части показателей не подчинялось нормальному закону (критерии Колмогорова, ω^2 , χ^2), поэтому сравнивали их медианы (Me) с использованием критериев Вилкоксона и Ван дер Вардена. Данные представлены в формате «среднее арифметическое \pm стандартное отклонение», приведены медианы показателей. Связи между случаями пневмонии и показателями эндогенной интоксикации выявляли с помощью непараметрического критерия корреляции Спирмена (r_s). Для выявления среди показателей ЭИ коров предикторов пневмонии у телят использовали ROC-анализ по методу DeLong et al., 1988 [19]. Анализировали следующие параметры ROC-кривой: AUC (area under curve) – площадь под кривой (характеризует диагностическую ценность показателя: 0,9-1,0 – отличная; 0,8-0,9 – очень хорошая; 0,7-0,8 – хорошая, 0,6-0,7 – средняя, 0,6 и меньше – неудовлетворительная), чувствительность (%) и специфичность (%), критические значения («cut-off point»). Нулевую гипотезу при применении всех методов статистической обработки отвергали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Общая концентрация альбумина у коров, телята которых имели как неосложненное, так и осложненное пневмонией течение бронхита, колебалась в пределах нормы [20]. Статистически достоверных различий между группами не обнаружено. Корреляции между ОКА в сыворотке крови коров и случаями пневмонии у их потомства не выявлено. Эффективная концентрация альбумина была ниже общей концентрации (и ниже нормы) в обеих группах, однако достоверных различий между выборками не выявлено (табл.). Уровень СМП у коров, телята которых не заболели пневмонией, составлял 0,354 у.е., что соответствовало норме. У коров II группы содержание СМП достоверно повышалось до уровня 0,674 у.е. ($P < 0,05$). Выявлена корреляция между концентрацией СМП в сыворотке крови коров и случаями

Маркеры эндогенной интоксикации у коров

Показатель	Группа					
	I			II		
	диапазон	среднее ± стандартное отклонение	медиана	диапазон	среднее ± стандартное отклонение	медиана
Общая концентрация альбумина, г/л	27,46 – 48,87	38,11 ± 4,67	37,63	28,36 – 48,27	37,61 ± 6,08	37,04
Эффективная концентрация альбумина, г/л	14,76 – 36,00	24,52 ± 4,44	24,21	16,20 – 30,45	23,27 ± 5,04	21,75
Концентрация среднемолекулярных пептидов, у.е.	0,229 – 0,757	0,408 ± 0,152	0,354	0,200 – 0,779	0,615 ± 0,197	0,674*
Лейкоцитарный индекс интоксикации	0,02 – 0,40	0,15 ± 0,09	0,15	0,02 – 0,73	0,16 ± 0,25	0,07
Индекс токсичности	0,07 – 0,86	0,58 ± 0,18	0,60	0,37 – 0,80	0,64 ± 0,15	0,70
Коэффициент интоксикации	7,2 – 32,2	17,2 ± 6,8	16,0	12,3 – 33,9	26,5 ± 8,4	26,8*

* P < 0,05 по сравнению с I группой

бронхопневмонии у их потомства ($r_s=0,536$; $p<0,005$). ЛИИ и ИТ у коров обеих групп существенно варьировали (табл.), различий между группами не обнаружено. ЛИИ не демонстрировал корреляции со степенью тяжести протекания респираторного заболевания у телят, для ИТ выявлена положительная связь между величиной анализируемого показателя и случаями пневмонии ($r_s=0,337$; $p<0,05$).

Коэффициент интоксикации у коров, телята которых заболели пневмонией, статистически достоверно ($p<0,05$) превышал таковой показатель в группе коров-матерей, потомство которых имело неосложненное течение бронхита. Обнаружена корреляция между КИ у коров и пневмонией у их потомства ($r_s=0,568$; $p<0,001$).

ROC-анализ (рис.1) позволил установить, что содержание СМП в сыворотке крови коров может служить предиктором пневмонии у новорожденных телят.

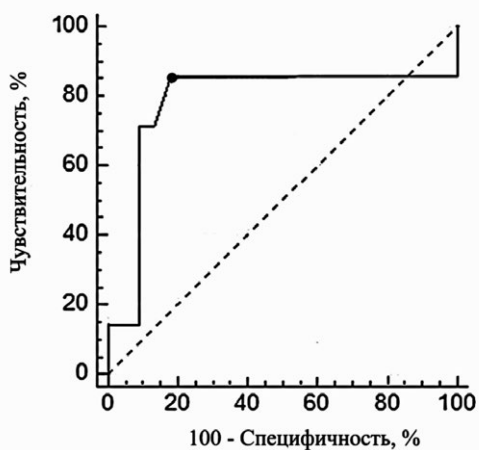


Рис. 1. ROC-кривая содержания среднемолекулярных пептидов в сыворотке крови коров.

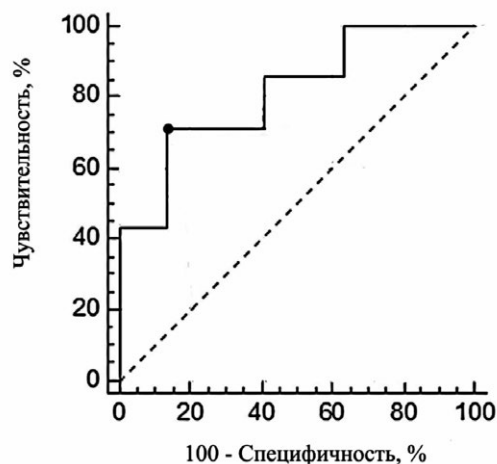


Рис. 2. ROC-кривая коэффициента интоксикации коров.

Данный показатель характеризовался хорошей диагностической ценностью ($AUC=0,782$), высокой чувствительностью (85,71%) и специфичностью (81,82%). Критическое значение концентрации СМП, отсекающее группу риска по развитию пневмонии – $> 0,547$ у.е.

Однако диагностически более информативным являлся коэффициент интоксикации ($AUC=0,812$ – информативность показателя очень хорошая), чувствительность – 71,43%, специфичность – 86,36%, критическое значение – $> 22,5$ у.е. (рис.2).

Клеточные компоненты крови матери в норме не проникают через фетоплацентарный барьер и не оказывают непосредственного воздействия на плод. Поэтому параметры лейкограммы коров и лейкоцитарный индекс интоксикации не позволяли прогнозировать исход бронхолегочных заболеваний у телят в период новорожденности и не могли быть использованы в качестве предикторов пневмонии.

Гидрофобные малорастворимые соединения, преимущественно связываемые альбумином, также не оказывали непосредственного влияния на плод, так как проницаемость фетоплацентарного барьера для них невысока. Альбумин (при нормальном содержании в сыворотке крови коров) успешно связывал токсические вещества, хотя на эту систему приходилось повышенной нагрузка, о чем свидетельствовало снижение эффективной концентрации белка. Загруженность альбумина лигандами выше нормы могла отражать недостаточную состоятельность систем печеночной и почечной экскреции у коров-матерей, которая опосредованно сказывалась на состоянии плода. Снижение содержания альбумина, в особенности его эффективной концентрации, могло стать критическим фактором, способным нарушить гомеостаз обменных процессов и вызвать ухудшение состояния как плода, так и новорожденного теленка. Тем не менее этот показатель не являлся информативным в отношении оценки состоятельности систем специфической и неспецифической резистентности по отношению к респираторным инфекциям у новорожденного молодняка.

СМП как преимущественно гидрофильные соединения способны проникать через плаценту в кровотоки плода и негативно влиять на формирование систем и органов, являясь одной из причин рождения ослабленного потомства. Возможно, СМП накапливались в организме теленка и продолжали воздействовать на него после рождения. Результаты ROC-анализа продемонстрировали четкую связь между случаями развития пневмонии у телят и концентрацией СМП у коров.

Сочетанное воздействие на организм плода гидрофобных и гидрофильных токсикантов носило выраженный негативный характер. Основная роль в развитии внутриутробной предрасположенности к пневмонии принадлежала среднемолекулярным пептидам. Однако гидрофобные метаболиты при отсутствии выраженного воздействия на организм коров-матерей также способствовали ослаблению резистентности плода и новорожденных животных к бронхолегочным заболеваниям. Интегральные показатели (например, КИ) оказались более чувствительными предикторами бронхолегочной патологии, поскольку основываются на учете совокупного негативного воздействия токсикантов различной природы на развивающийся организм даже при отсутствии статистически значимого изменения ЭКА у коров. Таким образом, концентрация среднемолекулярных пептидов в крови и коэффициент интоксикации в период гестации позволили не только оценить степень тяжести интоксикации у коров, но и с высокой точностью прогнозировать развитие бронхолегочной патологии у их потомства.

Литература.

1. Сидельникова В.И., Черницкий А.Е., Рецкий М.И. Эндогенная интоксикация и воспаление: последовательность реакций и информативность маркеров // *Сельскохозяйственная биология*. – 2015. – №2. – С.152-161.
2. Gutty B., Grymak Y., Drach M., Bilyk O., Matsjuk O., Magrelo N., Zmiya M., Katsaraba O. The impact of endogenous intoxication on biochemical indicators of blood of pregnant cows // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2017. – Vol.8. – №3. – P.438-443.
3. Mainardes G.A., DeVries T.J. Effect of social feeding

environment on the feeding behaviour of dairy cows and their willingness to consume a novel feed // Applied Animal Behaviour Science. – 2016. – Vol.185. – P. 23-29.

4. Лисицын В.В. Заболевания молодняка КРС вирусной этиологии. Средства профилактики // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. – 2013. – №3. – С.6-12.
5. Мосейчук В.В., Ермаков А.М. Изменения состава периферической крови телят в зависимости от тяжести течения инфекционного ринотрахеита // *Ветеринария Кубани*. – 2008. – №6. – С.22-24.
6. Шабунин С.В., Шахов А.Г., Черницкий А.Е., Золотарев А.И., Рецкий М.И. Респираторные болезни телят: современный взгляд на проблему // *Ветеринария*. – 2015. – №5. – С.3-13.
7. Onasanya G.O., Oke F.O., Sanni T.M. Muhammad A.I. Parameters Influencing Haematological, Serum and Bio-Chemical Referenes in Livestock Animals under Different Management Systems // *Open Journal of Veterinary Medicine*. – 2015. – Vol.5. – P.181-189.
8. Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении // *Врачебное дело*. – 1941. – №1. – С.31-35.
9. Власов В.В. Реакция организма на внешние воздействия: общие закономерности развития и методические проблемы исследования. Иркутск. Изд-во Иркутского университета, 1994. – 343 с.
10. Roland L., Drillich M., Iwersen M. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2014. – Vol.26. – №5. – P.592-598.
11. Великанов В.В., Василевская Е.М. Влияние препарата из диатомовых водорослей на общее состояние здоровых поросят и качество свинины // *Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. – 2013. – № 49. – С. 23-26.
12. Semenenko M.P., Kuzminova E.V., Tyapkina E.V., Abramov A.A., Semenenko K.A. Molecules of Medium Mass as an Integral Indicator of Endogenous Intoxication in the Diagnosis of Hepatopathy and its Effect on Improving the Economic Efficiency of Veterinary Measures in the Field of Dairy Farming // *J. Pharm. Sci. & Res*. – 2017. – Vol.9. – No9. – P.1573-1575.
13. Малахова М.Я., Зубаткина О.В. Методы верификации донозологических состояний организма // *Эфферентная терапия*. – 2006. – №1. – С.43-50.
14. Аксенова В.М. Биохимические методы диагностики эндогенной интоксикации // *Режим доступа: <http://www.gastroportal.ru/php/content.php?id=111393>* (дата обращения 28.10.2018)
15. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. Под ред. Ю.А. Грызунова, Г.Е. Добрецова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 1998. – 226 с.
16. Борченко Р.В., Киселева Р.Е., Макогон И.П. Связывающая способность альбумина и концентрация молекул средней массы в сыворотке крови телят при диарее // *Сельскохозяйственная биология*. – 2007. – №2. – С.82-86.
17. Матвеев С.Б., Клычкова Е.В., Гришин А.В., Богданова А.С., Годков М.В. Сравнительная ха-

- рактеристика коэффициентов эндогенной интоксикации при тяжелом остром панкреатите // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №5. – С.5-7.
18. Черницкий А.Е., Сидельникова В.И., Рецкий М.И. Модифицированный метод определения среднемолекулярных пептидов в биологических жидкостях // Ветеринария. – 2014. – №4. – С.56-58.
19. DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach // Biometrics. – 1988. – Vol.44. – P.837-845.
20. Горелик А.С. Биохимические показатели крови коров // Вестник биотехнологии. – 2016. – №1. – С.3-7.

Поступила в редакцию 20.12.18

После доработки 15.02.19

Принята к публикации 09.05.19