

УКРАЇНЬСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

*На правах рукопису*

**ПО П О В А**

**Елеонора Михайлівна**

**БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ  
ПАТОГЕННОЇ ДІЇ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ ТВАРИН**

03.00.04 - біохімія

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Львів 1994



00756392 (W)

Робота виконана в Інституті фізіології і біохімії тварин та Інституті ветеринарної медицини Української академії аграрних наук протягом 1982-1994 років.

**Офіційні опоненти:**

ГЕРАСИМЕНКО Віктор Григорович,  
член-кореспондент УААН, доктор біологічних наук,  
професор;  
ВЕЛИКИЙ Микола Миколайович,  
доктор біологічних наук, професор;  
РОЗГОНІ Іван Іванович,  
доктор біологічних наук, професор.

**Провідна організація** - Київський державний університет ім. Т.Г.Шевченка, кафедра біохімії.

Захист дисертації відбудеться "12" листопада 1994р. о "10" год. на засіданні спеціалізованої ради Д 020.14.01 при Інституті фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

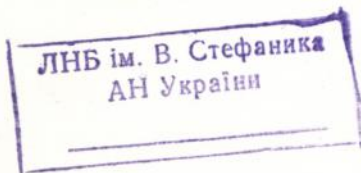
Адреса Інституту: 290034, м. Львів-34, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Автореферат розісланий "10" березня 1994р.

*Вчений секретар  
спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук*

Я.І. Кирилів



AB - 30.539

## Загальна характеристика роботи

Актуальність проблеми. Однією з центральних проблем інфекційної патології є глибоке і всебічне вивчення біохімічних шляхів формування патологічної картини, яка визначається, з одного боку, імунологічними особливостями макроорганізму, а з другого - специфікою дії таких важливих факторів патогенності ентеробактерій як токсини, які продукуються збудником в певних фазах розвитку інфекційного процесу (Петровская, 1967; Finkelstein, 1983; Езепчук, 1985; Olsness, 1980; Авцин, 1987).

Нині в бактеріальній токсикології існує концепція, згідно з якою багатогранність патогенних змін в організмі, які виникають внаслідок дії ендотоксинів, обумовлено вивільненням з клітин медіаторів (Suzuki, 1986; Varizanova, 1989; Шенкман, 1991). Так, експериментально показано, що взаємодія ендотоксинів ентеробактерій з клітинами макроорганізму призводить до стимуляції синтезу і вивільненню простагландинів, які мають широкий спектр біологічної дії (Fink, 1984; Титов, 1987; Hamilton, 1988).

Проте особливості метаболізму окремих класів простагландинів та посередників їх дії в тканинах макроорганізму на фоні патогенного впливу ентеробактерій, а також особливості функціонування систем регуляції метаболічних процесів, обміну ліпідів, білків, структурно-функціональної організації мембран при цьому з'ясовані вкрай недостатньо.

Сальмонельоз як одне з найбільш поширених захворювань людини і тварин, які викликаються ентеробактеріями, сальмонельоз становить сьогодні серйозну медико-біологічну та ветеринарну проблему (Покровський, 1981; Фролов, 1985; Пак, 1988; Рахманін, 1989). У зв'язку з цим проведення досліджень, спрямованих на вивчення біохімічних і молекулярно-біологічних основ патогенезу сальмонельозу, як і подальше вивчення факторів патогенності сальмонел можуть скласти науково-обґрунтовану базу для розробки та вдосконалення існуючих діагностичних, профілактичних і лікувальних засобів.

Мета і завдання досліджень. Метою даної роботи було вивчення біохімічних механізмів, за допомогою яких можна інтегрально охарактеризувати стан зовнішніх і внутрішніх регуляторних процесів у клітинах, що зазнали патогенного впливу сальмонел. Завданнями роботи були:

1. З'ясувати роль простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  в формуванні запалення слизової тонкого і товстого відділів кишечника у поросят, викликаних експериментальним сальмонельозом.

2. Вивчити метаболізм циклічних нуклеотидів у тканинах поросят при дії патогенних факторів сальмонел.

3. Дослідити особливості обміну ліпідів, кількісні і якісні зміни фосфоліпідів і нейтральних ліпідів у тканинах тварин в процесі розвитку сальмонельозу, їх взаємозв'язок із синтезом простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$ .

4. Вивчити вплив патогенних факторів сальмонел на процеси перекисного окислення ліпідів та стан антиоксидантної системи в тканинах поросят.

5. Дослідити інтенсивність синтезу й активність ферментів катаболізму білків у тканинах поросят на різних стадіях розвитку сальмонельозу.

6. Вивчити вплив сальмонельозної токсикоінфекції на метаболічний гомеостаз у крові.

7. Розробити методологію нейтралізації ентеротоксигенності ентеробактерій.

Наукова новизна. Розроблено експериментальну модель сальмонельозу у поросят. Вперше проведено комплексне дослідження ряду показників білкового, ліпідного, вуглеводного і мінерального обмінних процесів у тканинах поросят на різних стадіях гострого захворювання сальмонельозом, в результаті чого одержано нові дані про біохімічні механізми, які лежать в основі інтоксикації. Зокрема, показано, що при цьому захворюванні підвищується інтенсивність синтезу простагландинів  $E_2$  і знижується інтенсивність синтезу простагландинів  $F_{2\alpha}$  у слизовій 12-палій кишки і печінці поросят тоді у слизовій сліпій кишки інтенсивності синтезу цих медіаторів залишається без змін.

Встановлено взаємозв'язок між інтенсивністю синтезу простагландинів  $E_2$  та активністю фосфоліпази  $A_2$  при розвитку ендотоксемії, про що свідчить підвищення інтенсивності синтезу зазначених простагландинів з фосфатидилхолін - [2- $^{14}C$ ] - арахідонату, зменшення вмісту фосфатидилхоліну, збільшення частки лізофосфатидилхоліну і вільних жирних кислот, зменшення вмісту лінолевої і арахідонової кислот у складі фосфоліпідів.

Показано пряму залежність між інтенсивністю синтезу простагландинів  $E_2$  і функціонуванням системи циклічних нуклеотидів у тканинах поросят при експериментальному сальмонельозі. Одержані

результати дають підстави зробити висновок про порушення систем регуляції метаболізму в ентероцитах і гепатоцитах на рівні первинних і вторинних месенжерів при інтоксикації, викликаній персистенцією сальмонел в організмі.

Показано значне підвищення рівня метаболітів перекисного окислення ліпідів, фазові зміни активності ключового ферменту антиоксидантної системи - супероксиддисмутази та інверсію корелятивного зв'язку між ферментами антирадикального захисту в організмі поросят, що свідчить про формування стану окислювального стресу на ранніх стадіях розвитку експериментального сальмонельозу.

Показана можливість нейтралізації ентеротоксигенної дії ентеробактерій шляхом блокування взаємодії акцепторної частини молекули ентеротоксину з відповідним рецептором на ентероцитах. Це забезпечується пероральним введенням потенційно вакцинного штаму *S.cholerae suis* В-9, в який клоновано плазмиду з генами синтезу В-субодиниці термолабільного ентеротоксину *E.coli*.

Одержані результати і встановлені закономірності розкривають біохімічні механізми, які лежать в основі порушень функцій шлунково-кишкового тракту у тварин при ентеральних захворюваннях і дозволяють сформулювати концепцію патогенної дії сальмонел.

#### Практична цінність роботи.

1. Апробовані методи досліджень інтенсивності обміну ліпідів, нуклеотидів, мінеральних речовин, стану системи антиоксидантного захисту в тканинах поросят можна рекомендувати до широкого застосування в науково-дослідних установах при дослідженні стадій патологічного процесу та розробці засобів корекції порушень, викликаних патогенною дією збудника.

2. З метою підвищення ефективності визначення факторів патогенності ентеробактерій, зокрема здатності синтезувати термолабільний ентеротоксин, пропонується спосіб визначення ентеротоксигенності у польових культур ентеробактерій за допомогою *Viken-test* у нашій модифікації.

3. Розроблено методичні основи нейтралізації ентеротоксигенності ентеробактерій шляхом блокування фіксації ентеротоксинів на відповідних рецепторах ентероцитів, що досягається пероральним введенням потенційно вакцинного штаму В-9. Запропонований спосіб заслуговує широкого виробничого випробування.

Основні положення, які виносяться на захист:

- система поглядів на патогенну дію сальмонел як на комплекс порушень ліпідного, білкового, вуглеводного і мінерального обміну в тканинах тварин;

- концепція, згідно з якою в основі патогенної дії сальмонел лежить активація синтезу та вивільнення простагландинів  $E_2$  що призводить до порушення регуляторних механізмів клітин, функціонування яких починає здійснюватись по аномальному типу;

- порушення механізмів функціонування системи циклічних нуклеотидів в тканинах поросят під впливом патогенних факторів сальмонел є множинні; при цьому відбуваються зміни в функціонуванні ферментів метаболізму циклічних нуклеотидів, що призводить до збільшення внутріклітинної концентрації цАМР і цГМР;

- патогенна дія сальмонел призводить до порушень структурно-функціональної організації мембранних комплексів внаслідок кількісних і якісних змін фосфоліпідів, нейтральних ліпідів, співвідношення в них жирних кислот, фракційного складу та катаболізму білків;

- порушення балансу процесів перекисного окислення ліпідів і системи антиоксидантного захисту, що свідчить про наявність стану окиснювального стресу в організмі поросят в процесі розвитку ендотоксемії;

- спосіб нейтралізації ентеротоксигенності ентеробактерій за рахунок індукції синтезу антитіл, здатних блокувати взаємодію акцепторної частини токсичної молекули ентеротоксину з відповідними рецепторами на ентероцитах.

Апробація роботи і публікації. Основні результати дисертаційної роботи опубліковані в 28 наукових працях. Матеріали дисертації доповідались і обговорювались на V Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1987), Всесоюзній конференції "Применение биотехнологий в животноводстве, растениеводстве и ветеринарной медицине" (Львів, 1988), республіканській конференції "Состояние и развитие биотехнологии в животноводстве" (Харків, 1988), Всесоюзній конференції "Эпизоотология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней, общих для человека и животных" (Львів, 1988), VII з'їзді мікробіологів (Чернівці, 1989), 2-й Всесоюзній конференції "Бактериальные токсины" (Юрмала, 1989), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), конференції "Биотехнология ветеринарных препаратов" (Харків, 1993), на семінарах і засіданнях Вченої ради Інституту ветеринарної медицини та Інституту фізіології і біохімії тварин.

Структура і об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису методів досліджень, викладення результатів досліджень та їх обговорення, заключення, висновків і списку літератури (534 першоджерел). Робота викладена на 317 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 36 таблицями, 1 схемою, 10 рисунками.

### **Зміст роботи**

Матеріали і методи. Вивчення біохімічних аспектів патогенної дії ентеробактерій проводили на поросятах 45–50-денного віку великої білої породи, безпородних білих мишах, кролях. Для цього тваринам інтраорально вводили суспензію добової культури *S. cholerae suis* №370 в дозі 500 млрд. мікроорганізмів на голову. В динаміці патологічного процесу проводили контроль за клінічним станом тварин.

Досліджували ряд показників, які інтегрально характеризують різні аспекти обміну білків, ліпідів, вуглеводів і мінеральних речовин у тканинах (слизовій 12-палоті і сліпої кишок, печінці й крові) поросят на різних стадіях захворювання сальмонельозом. Дослід проведено на 4-х групах тварин, по 3 голови в кожній. Тварини 1-ї групи - клінічно здорові - служили контролем, поросят 2-, 3- і 4-ї груп забивали шляхом декапітації через 24, 48, 72 і 96 годин після введення патогенної культури.

З метою розробки методології патогенетичної корекції порушень процесів перекисного окиснення ліпідів та системи антиоксидантного захисту за 10 днів до введення патогенної культури сальмонел та в динаміці інфекційного процесу окремій групі поросят щоденно випоювали комплекс препаратів наступного складу: органічні солі міді і заліза (диглутамінати) та сукцинат натрія в дозах 5; 5· та 25 мг/кг маси тіла відповідно.

В тканинах тварин досліджували:

- інтенсивність синтезу простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  шляхом інкубації гомогенатів тканин з  $[1-^{14}C]$ -арахідоновою кислотою і фосфатидилхолін- $[2-^{14}C]$ -арахідонатом з послідуєчим виділенням вказаних простагландинів (Помойнецкий и др., 1979) і визначенням їх радіоактивності на рідинному сцинтиляційному лічильнику LKB (Швеція);

- вміст цАМР і цГМР визначали за допомогою наборів фірми Amersham (Англія);

- активність аденілатциклази при 30°C в інкубаційному середовищі: 50 мМ трис-НCl, рН 7,5 , 5 мМ MgCl<sub>2</sub> , 10 мМ теофілін,

0,5 мМ АТФ, 20 мМ креатинфосфат, 0,5 мг/мл креатинфосфокінази. Продукт реакції визначали за методом White (1974);

- активність гуанілатциклази при 37°C в інкубаційному середовищі: 50 мМ трис-НСІ, рН 7,7, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мМ теофілін, 15 мМ креатинфосфат, 0,5 мг/мл креатинфосфокінази, 1 мМ ГТР. Продукт реакції виділяли за допомогою хроматографії на колонках Dowex AG 1x4 (200-400 меш) (Nakasawa, 1979);

- активність фосфодіестерази циклічних нуклеотидів при 30°C в інкубаційному середовищі: 10 мМ трис-НСІ, рН 8,0, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5·10<sup>-5</sup> М цАМР (цГМР), 2-8·10<sup>4</sup> Бк/мл <sup>3</sup>H-цАМР (<sup>3</sup>H-цГМР). Продукт реакції виділяли за допомогою хроматографії на пластинках Silufol UV<sub>254</sub>, з шаром, просоченим розчином тетраборату натрія (Upton, 1970);

- вміст та співвідношення окремих класів ліпідів методом тонкошарової хроматографії на силікагелі в системі розчинників петролейний ефір-диетиловий ефір-оцтова кислота 70:30:1 (Folch, 1957; Кейтс, 1975);

- фосфоліпідний склад шляхом двомірної тонкошарової хроматографії на силікагелі у системах розчинників хлороформ-метанол-вода 65:25:40 і хлороформ-метанол-25% водний розчин аміаку 14:6:1 (Кейтс, 1975) з послідуочим визначенням кількості фосфору за методом Фіске і Суббароу у модифікації Бартлета (1959);

- жирнокислотний склад фосфоліпідів методом газорідної хроматографії (Стефанік и др., 1985);

- інтенсивність синтезу ліпідів шляхом інкубації гомогенатів тканин з [1-<sup>14</sup>C]-ацетатом і [2-<sup>14</sup>C]-лейцином з послідуочим визначенням радіоактивності ліпідів (Вовк, 1992);

- інтенсивність синтезу білків шляхом інкубації гомогенатів тканин з [2-<sup>14</sup>C]-лейцином з послідуочим визначенням їх радіоактивності після екстракції ліпідів (Вовк, 1992);

- інтенсивність окислення [1-<sup>14</sup>C]-ацетату і [2-<sup>14</sup>C]-лейцину в тканинах з послідуочим визначенням радіоактивності <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (Вовк, 1992);

- активність кислих (рН - 3,0) і нейтральних протеїназ (рН - 7,0) визначали шляхом інкубації гомогенатів тканин відповідно у ацетатному і фосфатному буфері, субстратом для протеолізу був 1% казеїн і 3% гемоглобін з наступним визначенням вмісту тирозину (Балаян, 1982);

- лужної фосфатази, холінестерази, креатинкінази, аланін- і аспартатамінотрансфераз за допомогою набору Bio Test (Чехословаччина);

- фракційний склад білків методом електрофорезу на агар-агарі (Илков, Николов, 1959);

- концентрацію глюкози (Hooftman, 1959), НЕЖК (Прохоров и др., 1977);

- вільних амінокислот (Muting, Kaiser, 1963);

- вміст в крові заліза, цинку, міді, магнію методом атомноабсорбційної спектроскопії (Хавелов, Цалев, 1983; Вайнфорднер, 1979);

- концентрацію натрію і калію в плазмі крові визначали на алкалімікроаналізаторі "Раделкис";

- вміст кальцію в плазмі крові за методом Словак (1974);

- вміст гідроперекисів ліпідів (Романова, Стальна, 1977);

- малонового диальдегіду (Бенисович, Идельсон, 1973);

- активність супероксиддисмутази (Руда, Сокирко, 1991);

- каталази (Архипова, 1988);

- глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Асатіані, 1960);

- вміст розчинних білків визначали за методом Лоурі (Lowry, 1951);

- В-субодиницю отримували шляхом афінної хроматографії на агарозних гелях (Воронов, 1987);

- моноспецифічні сироватки до В-субодиниці отримували шляхом імунізації кролів очищеними препаратами (Вертиев, 1981);

- індукцію антитіл, здатних нейтралізувати ентеротоксигенність ентеробактерій, викликали шляхом двократної пероральної імунізації безпородних білих мишей штамом В-9, в який клоновано плазмиду з генами синтезу В-субодиниці термолабільного токсину E.coli;

- для оцінки активності місцевого імунітету визначали коефіцієнт ентеросорбції при введенні ентеротоксигенних культур ентеробактерій в ліговані петлі тонкого кишечника вакцинованих мишей (Гайлонская, 1985; Полоцкий, 1991);

- здатність до синтезу термолабільного токсину у польових культур ентеробактерій визначали в реакції імунодифузії (Bikentest) (Takeda, 1983) в нашій модифікації.

Одержані дані опрацьовували статистично (Урбах, 1975).

**1. Інтенсивність синтезу простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$   
in vitro в тканинах поросят на різних стадіях  
розвитку експериментального сальмонельозу**

Метою даного етапу роботи було з'ясування ролі ПГЕ<sub>2</sub> і ПФГ<sub>2 $\alpha$</sub>  у біохімічному генезі запалення слизової тонкого кишечника та в печінці шляхом порівняльного дослідження інтенсивності їх синтезу в умовах in vitro у зазначених тканинах здорових поросят і через різні строки після зараження патогенною культурою сальмонел. При цьому використовували як попередники, з одного боку, [1-<sup>14</sup>C]-арахідонову кислоту, а з другого - фосфатидилхолін [2-<sup>14</sup>C]-арахідонат.

З наведених в таблиці 1 даних видно, що інтенсивність синтезу простагландинів у досліджуваних тканинах залежить від їх метаболічних особливостей, хімічної природи попередника, класу простагландинів, стадії захворювання.

При цьому звертає на себе увагу значно вища інтенсивність синтезу простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  у досліджуваних тканинах поросят при використанні як попередника фосфатидилхолін [2-<sup>14</sup>C]-арахідонату, ніж при використанні [1-<sup>14</sup>C]-арахідонової кислоти. Як буде показано нижче, це зумовлено тим, що вільна [1-<sup>14</sup>C]-арахідонова кислота інтенсивно використовується в синтезі ліпідів, що, очевидно, обумовлено більшою спорідненістю арахідонової кислоти до ферментів, які каталізують використання її в синтезі гліцерофосфоліпідів, ніж до простагландинсинтетази, яка каталізує використання арахідонової кислоти в синтезі простагландинів.

Встановлено, що захворювання поросят сальмонельозом супроводжується різким підвищенням інтенсивності синтезу простагландинів  $E_2$  в печінці і слизовій 12-палій кишки, тоді як у слизовій сліпій кишки інтенсивність цього процесу істотно не змінюється (табл.1).

Інтенсивність синтезу простагландинів  $F_{2\alpha}$  у печінці і слизовій 12-палій кишки з обох досліджуваних попередників через 24, 48 і 72 години після зараження сальмонельозом була нижча від його інтенсивності в тканинах поросят контрольної групи, а в слизовій оболонці сліпій кишки - істотно не змінювалась.

Дані, наведені в таблиці 2, свідчать про протилежний характер змін інтенсивності синтезу простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  у печінці і слизовій 12-палій кишки і відсутність істотних змін у синтезі зазначених простагландинів у слизовій сліпій кишки поросят при дії сальмонельозного ендотоксину.

Таблиця 1

Радіоактивність простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , тис.  $\beta$ -розп./хв./100 мг тканини,  $n=3$ )

Досліджувані тканини	Групи поросят			
	здорові	хворі; години після зараження		
		24	48	72
<b>ПРОСТАГЛАНДИНИ <math>E_2</math></b>				
[1- $^{14}C$ ]- арахідонова кислота				
Печінка	2,4±0,09	2,5±0,1	3,7±0,1*	3,8±0,1*
12-пала кишка	2,5±0,1	3,7±0,1*	4,8±0,2*	4,8±0,1*
Сліпа кишка	3,6±0,1	3,6±0,1	3,6±0,07	3,4±0,07
Фосфатидилхолін- [2- $^{14}C$ ] -арахідонат				
Печінка	3,8±0,2	5,0±0,1*	6,3±0,2*	6,6±0,3*
12-пала кишка	4,2±0,3	5,8±0,3*	6,7±0,2*	7,8±0,5*
Сліпа кишка	4,7±0,2	5,0±0,3	4,9±0,1	5,1±0,4
<b>ПРОСТАГЛАНДИНИ <math>F_{2\alpha}</math></b>				
[1- $^{14}C$ ]- арахідонова кислота				
Печінка	1,8±0,1	1,6±0,08	1,3±0,1*	1,0±0,05*
12-пала кишка	1,7±0,1	1,4±0,08	1,5±0,07	1,5±0,1
Сліпа кишка	1,8±0,1	1,7±0,09	1,8±0,08	1,6±0,1
Фосфатидилхолін- [2- $^{14}C$ ] -арахідонат				
Печінка	3,3±0,2	2,8±0,1	2,4±0,09*	2,0±0,1*
12-пала кишка	3,5±0,1	3,0±0,2	2,9±0,2	2,9±0,08
Сліпа кишка	2,5±0,09	2,7±0,2	2,7±0,2	2,5±0,1

## 2. Особливості метаболізму арахідонової кислоти в тканинах поросят в процесі розвитку сальмонельозної токсикоінфекції

Арахідонова кислота посідає одне з провідних місць серед хімічних речовин, які регулюють активність біологічних систем через синтез таких активних медіаторів як простагландини, тромбоксани, лейкотрієни (Smith, 1991).

Одержані нами дані свідчать про істотні зміни метаболізму арахідонової кислоти в тканинах поросят при захворюванні сальмонельозом, які не пов'язані з синтезом простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$ . Зокрема, як видно з даних, наведених у таблицях 2 і 3, в печінці, слизовій 12-палії і сліпій кишках, заражених сальмонельозом у порівнянні із здоровими виявляються істотні відмінності в інтенсивності окислення арахідонової кислоти і використання її в синтезі ліпідів.

З даних таблиці 2 видно, що радіоактивність  $^{14}CO_2$ , який утворився внаслідок окислення [1- $^{14}C$ ] арахідонової кислоти, в печінці і слизовій 12-палії кишки через 48 і 72 години після зараження сальмонельозом значно вища, а при окисненні в сліпій кишці, навпаки, нижча від радіоактивності  $^{14}CO_2$ , утвореного при окисненні [1- $^{14}C$ ] арахідонової кислоти в тканинах здорових поросят.

Радіоактивність  $^{14}CO_2$ , що утворився при окисненні арахідонової кислоти, яка входить до складу фосфатидилхолін [2- $^{14}C$ ] арахідонату і звільняється в результаті дії фосфоліпази  $A_2$  через 24, 48 і 72 години після зараження сальмонельозом у печінці була відповідно в 2,84, 2,12 і 1,56, в 12-палій кишці - в 1,56, 1,78 і 1,99 і в сліпій кишці - у 1,89, 1,79 і 1,89 раза менша, ніж радіоактивність  $^{14}CO_2$ , що утворився при окисненні арахідонової кислоти, яка входить до складу фосфатидилхолін [2- $^{14}C$ ] арахідонату, зазначеними тканинами здорових поросят.

Наведені дані свідчать про те, що метаболізм вільної арахідонової кислоти, а також кислоти, що входить до складу гліцефосфоліпідів у тканинах поросят при сальмонельозі неоднаковий. Це, очевидно, може зумовлюватися спільною локалізацією фосфоліпази  $A_2$ , яка вивільнює арахідонову кислоту з фосфатидилхоліну, і простагландинсинтетази, яка використовує цю кислоту для синтезу простагландинів. Метаболізм вільної арахідонової кислоти на відміну від етерифікованої може проходити не тільки в плазматичних мембранах гепатоцитів і еритроцитів, у яких локалізуються зазначені ферменти, а й у мітохондріях, де локалізуються ферменти  $\beta$ -окиснення жирних кислот.

Таблиця 2

Радіоактивність  $^{14}\text{C}_2$ , що утворився при окисленні  $[1-^{14}\text{C}]$  арахідонової кислоти  
і фосфатидилхолін-  $[2-^{14}\text{C}]$ -арахідонату *in vitro* в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , тис.  $\beta$ -розп./хв./100 мг тканини,  $n=3$ )

Досліджувані тканини	Групи поросят		
	здорові	хворі; години після зараження	
		24	48

$[1-^{14}\text{C}]$ - арахідонова кислота

Печінка	$2,8 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,07$	$4,0 \pm 0,1^*$	$4,0 \pm 0,05^*$
12-пала кишка	$2,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,09$	$5,0 \pm 0,1^*$	$5,0 \pm 0,09^*$
Сліпа кишка	$4,7 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,08^*$	$2,1 \pm 0,1^*$	$3,2 \pm 0,1^*$

Фосфатидилхолін-  $[2-^{14}\text{C}]$ -арахідонат

Печінка	$6,4 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,09^*$	$3,0 \pm 0,1^*$	$4,1 \pm 0,1^*$
12-пала кишка	$7,0 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,1^*$	$3,9 \pm 0,1^*$	$3,5 \pm 0,07^*$
Сліпа кишка	$6,8 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2^*$	$3,8 \pm 0,09^*$	$3,6 \pm 0,1^*$

Таблиця 3

Радіоактивність ліпідів, синтезованих тканинами поросят при інкубації з  $[1-^{14}\text{C}]$ -арахідоною кислотою і фосфатидилхолін-  $[2-^{14}\text{C}]$ -арахідонатом ( $M \pm m$ , тис.  $\beta$ -розп./хв./100 мг тканини,  $n=3$ )

Досліджувані тканини	Групи поросят			
	здорові	хворі; години після зараження		
		24	48	72
$[1-^{14}\text{C}]$ -арахідонова кислота				
Печінка	11,7 $\pm$ 0,2	11,7 $\pm$ 1,1	12,0 $\pm$ 0,8	12,1 $\pm$ 0,9
12-пала кишка	11,9 $\pm$ 0,9	11,4 $\pm$ 1,0	11,4 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 0,8
Сліпа кишка	11,8 $\pm$ 0,9	12,1 $\pm$ 0,8	11,7 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 1,0
Фосфатидилхолін- $[2-^{14}\text{C}]$ -арахідонат				
Печінка	13,5 $\pm$ 1,2	15,6 $\pm$ 1,3	18,5 $\pm$ 1,3*	19,7 $\pm$ 1,4*
12-пала кишка	15,0 $\pm$ 1,2	19,7 $\pm$ 1,3*	19,0 $\pm$ 1,4*	17,2 $\pm$ 0,8
Сліпа кишка	20,1 $\pm$ 1,4	19,9 $\pm$ 0,3	19,0 $\pm$ 1,2	17,3 $\pm$ 1,2

• При аналізі даних таблиці 2 звертають на себе увагу також відмінності в метаболізмі  $[1-^{14}\text{C}]$ -арахідонової кислоти у печінці і слизовій 12-палій кишки в порівнянні з її метаболізмом у слизовій сліпої кишки.

Наведені в таблиці 3 дані свідчать про те, що ступінь використання  $[1-^{14}\text{C}]$ -арахідонової кислоти в синтезі ліпідів у тканинах здорових поросят у 3-5 разів вищий від ступеня використання її у синтезі простагландинів (табл. 1) і в 2,5-4 рази вищий від ступеня її окислення (табл. 2). З цих даних випливає, що використання  $[1-^{14}\text{C}]$ -арахідонової кислоти в синтезі ліпідів у тканинах поросят при сальмонельозі може бути лімітуючою стадією, яка визначає метаболізм зазначеної кислоти іншими шляхами.

Радіоактивність ліпідів, синтезованих в тканинах з  $[1-^{14}\text{C}]$ -арахідонової кислоти після зараження сальмонельозом, істотно не відрізняється від радіоактивності ліпідів, синтезованих гомогенатами тканин здорових тварин (табл. 3). Ці дані свідчать про те, що в синтезі ліпідів у печінці, слизовій тонкого і товстого відділів кишечника при захворюванні сальмонельозом, як і в зазначених тканинах здорових поросят використовується арахідонова кислота, яка утворюється *de novo* з лінолевої кислоти в реакціях елонгації і десатурації, які подібно до синтезу ліпідів відбуваються в цитоплазматичних структурах гепатоцитів і ентероцитів. У синтезі простагландинів, як згадувалося вище, використовується, головним чином, арахідонова кислота, яка вивільнюється з фосфатидилхоліну при дії фосфоліпази  $A_2$ . Радіоактивність ліпідів, синтезованих гомогенатами печінки і слизової 12-палій кишки, після інкубації з фосфатидилхолін  $[2-^{14}\text{C}]$ -арахідонатом через 24, 48 і 72 години після зараження сальмонельозом підвищувалась. При інкубації гомогенатів сліпої кишки із зазначеним вище гліцерофосфоліпідом була нижчою порівняно з радіоактивністю ліпідів, синтезованих гомогенатами тканин здорових поросят (табл. 4).

З наведених даних видно, що при інкубації гомогенатів печінки і 12-палій кишки з фосфатидилхолін  $[2-^{14}\text{C}]$ -арахідонатом вивільнюється більша кількість арахідонової кислоти, від кількості, яка необхідна для синтезу простагландинів  $E_2$ , внаслідок чого зазначена поліненасичена жирна кислота знову використовується для синтезу ліпідів.

### 3. Вміст окремих класів ліпідів і жирнокислотний склад в тканинах поросят при експериментальному сальмонельозі

Одночасно з вивченням інтенсивності синтезу простагландинів у слизовій 12-палої і сліпої кишок поросят при захворюванні сальмонельозом ми досліджували співвідношення окремих класів ліпідів і їх жирнокислотного складу.

Дані таблиці 4 свідчать про те, що співвідношення деяких класів ліпідів у печінці, слизовій тонкого і товстого відділів кишечника поросят після зараження їх сальмонельозом помітно змінюється. Ступінь цих змін специфічний для кожного з досліджуваних органів, проте напрямом цих змін у ряді випадків у всіх досліджуваних органах однаковий.

У зв'язку з виявленими відмінностями в загальному вмісті фосфоліпідів у печінці і слизовій 12-палої кишки здорових і хворих сальмонельозом поросят, а також у зв'язку з важливим значенням деяких гліцерофосфоліпідів, зокрема фосфатидилхоліну, у субстратному забезпеченні синтезу простагландинів, становлять інтерес представлені в таблиці 5 дані щодо вмісту деяких класів фосфоліпідів у тканинах хворих і здорових поросят.

Оскільки лізофосфатидилхолін у клітинах тварин утворюється в результаті відщеплення ацилу в молекулі фосфатидилхоліну і цей процес каталізується фосфоліпазою  $A_2$ , то одержані дані дозволяють зробити висновок про посилення цього процесу в печінці, слизовій тонкого і товстого відділів кишечника поросят при дії сальмонельозного ендотоксину як етапу, який забезпечує синтез простагландинів  $E_2$ .

Результати дослідів по вивченню фосфоліпідного складу тканин поросят на фоні розвитку сальмонельозного процесу свідчать про те, що посилення синтезу простагландинів у слизовій 12-палої кишки поросят при сальмонельозі - спряжене з посиленням розщеплення фосфатидилхоліну і використанням звільненої арахідонової кислоти у синтезі простагландинів. З таким висновком узгоджується виявлене нами зменшення вмісту арахідонової кислоти, що входить до складу фосфоліпідів слизової 12-палої кишки хворих на сальмонельоз поросят (табл. 6).

Аналіз жирнокислотного складу фосфоліпідів слизової тонкого відділу кишечника поросят показав, що вміст лінолевої і арахідонової кислот у складі загальних фосфоліпідів слизової 12-палої кишки після зараження сальмонельозом знизився порівняно із вмістом цих кислот у слизовій 12-палої кишки здорових поросят (табл.6). Пояснення цих відмінностей слід, очевидно, шукати, з одного боку, у зменшенні

Таблиця 4

Співвідношення окремих класів ліпідів у тканинах поросят  
( $M \pm m$ , %,  $n=3$ )

Класи ліпідів	Групи поросят			
	здорові	хворі; години після зараження		
		24	48	72
1	2	3	4	5

## Слизова 12-палої кишки

Фосфоліпіди	47,26±1,69	46,28±2,15	45,74±1,83	45,58±2,12
Триацилгліцероли	20,12±1,31	21,17±1,48	19,60±1,23	20,59±1,42
Диацилгліцероли	4,81±0,24	6,22±0,47	7,81±0,56*	7,04±0,63*
НЕЖК	8,92±0,63	9,23±0,75	10,11±0,47	9,95±0,55
Вільний холестерол	12,08±1,84	10,81±0,93	10,42±0,78	10,56±0,83
Ефіри холестеролу	16,81±0,84	6,29±0,56*	6,32±0,49*	6,28±0,43*

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Слизова сліпої кишки

Фосфоліпіди	41,08±2,31	40,28±3,18	40,52±2,49	41,26±2,80
Триацилгліцероли	33,07±2,05	34,01±2,21	33,35±2,81	32,53±1,79
Диацилгліцероли	3,48±0,23	3,72±0,19	4,48±0,24	5,08±0,38*
НЕЖК	4,86±0,37	4,83±0,24	5,24±0,44	5,38±0,42
Вільний холестерол	12,44±1,26	10,88±1,86	11,07±0,75	10,19±1,36
Ефіри холестеролу	5,07±0,89	6,28±1,16	5,34±0,73	5,56±0,81

Печінка

Фосфоліпіди	44,28±1,84	40,82±0,97	38,04±2,37*	39,51±2,88
Триацилгліцероли	22,56±1,46	24,51±1,83	24,55±1,27	23,27±1,65
Диацилгліцероли	5,83±0,21	6,14±0,38	8,03±0,33*	7,75±0,41*
НЕЖК	3,22±0,15	4,58±0,20	5,31±0,35*	5,54±0,27*
Вільний холестерол	8,46±0,73	7,70±0,94	8,04±0,53	8,21±1,01
Ефіри холестеролу	15,65±0,84	16,25±0,56	16,03±0,48	15,72±0,75

Таблиця 5

Співвідношення окремих класів фосфоліпідів в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , %,  $n=3$ )

Класи фосфоліпідів	Групи поросят			
	здорові	хворі; години після зараження		
		24	48	72
1	2	3	4	5

## Слизова 12-палої кишки

Фосфатидилхолін	58,37 $\pm$ 2,37	54,28 $\pm$ 3,85	53,41 $\pm$ 2,48	52,32 $\pm$ 4,24
Лізофосфатидилхолін	1,03 $\pm$ 0,12	3,04 $\pm$ 0,16*	3,73 $\pm$ 0,28*	4,82 $\pm$ 0,25*
Фосфатидилетаноламін	5,97 $\pm$ 0,42	6,15 $\pm$ 0,56	8,03 $\pm$ 0,72	8,32 $\pm$ 0,68*
Фосфатидилсерин	14,93 $\pm$ 0,93	15,25 $\pm$ 1,16	16,01 $\pm$ 0,84	16,90 $\pm$ 1,08
Фосфатидилінозитол	3,18 $\pm$ 0,29	5,34 $\pm$ 0,25*	4,74 $\pm$ 0,36*	5,13 $\pm$ 0,41*
Сфінгомелін	15,15 $\pm$ 0,34	14,00 $\pm$ 0,28	12,67 $\pm$ 0,32*	10,85 $\pm$ 0,37*
Фосфатидна кислота	1,74 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,10*	0,73 $\pm$ 0,09*	0,61 $\pm$ 0,06*
Кардіоліпін	1,32 $\pm$ 0,10	0,93 $\pm$ 0,07	0,82 $\pm$ 0,08*	0,80 $\pm$ 0,09*

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Слизова сліпої кишки

Фосфатидилхолін	56,18±3,87	54,28±3,43	54,34±4,48	51,72±2,89
Лізофосфатидилхолін	0,82±0,08	2,48±0,10*	2,45±0,21*	6,75±0,49*
Фосфатидилетаноламін	4,52±0,82	5,08±0,65	6,91±0,72	7,49±0,91
Фосфатидилсерин	9,38±0,76	9,61±0,64	8,87±0,73	9,26±0,65
Фосфатидилінозитол	6,42±0,54	7,54±0,37	9,06±0,85*	8,36±0,70*
Сфінгомієлін	12,52±1,46	10,86±0,92	10,43±0,97	8,70±0,95*
Фосфатидна кислота	0,62±0,07	0,86±0,09	0,75±0,09*	0,81±0,09*
Кардіоліпін	0,10±0,02	0,09±0,02	0,07±0,02	0,08±0,01

Печінка

Фосфатидилхолін	55,55±2,02	52,28±2,45	50,85±3,44	49,41±3,67
Лізофосфатидилхолін	1,32±0,11	2,58±0,17*	3,23±0,20*	3,08±0,12*
Фосфатидилетаноламін	9,38±9,57	9,59±0,65	8,93±0,74	10,02±0,83
Фосфатидилсерин	8,54±0,61	8,21±0,43	8,09±0,37	8,63±0,44
Фосфатидилінозитол	7,34±0,42	9,58±0,78	12,32±0,95*	14,43±0,85*
Сфінгомієлін	6,53±0,52	7,09±0,46	6,86±0,23	6,92±0,49
Фосфатидна кислота	6,82±0,42	7,29±0,46	4,61±0,28*	3,27±0,21*
Кардіоліпін	4,52±0,27	4,38±0,36	5,11±0,40	4,24±0,38

Таблиця 6

Жирнокислотний склад загальних фосфоліпідів  
слизової 12-палої кишки поросят  
( $M \pm m$ , %,  $n=3$ )

Назва жирної кислоти	Код жирної кислоти	Групи поросят		
		здорові	хворі; години після зараження	
			48	72
Капринова	C <sub>10:0</sub>	0,36±0,01	0,24±0,01	0,39±0,02
Лауринова	C <sub>12:0</sub>	0,35±0,01	0,39±0,02	0,47±0,02
Трициклова	C <sub>13:0</sub>	0,41±0,02	0,48±0,03	0,50±0,02
Міристинова	C <sub>14:0</sub>	1,64±0,07	1,65±0,04	0,80±0,03*
Пентадецилова	C <sub>15:0</sub>	0,32±0,01	0,21±0,01	0,34±0,01
Пальмітинова	C <sub>16:0</sub>	28,4±1,08	30,4±1,26	29,9±1,30
Пальмітолеїнова	C <sub>16:1</sub>	5,38±0,22	5,50±0,18	5,16±0,20
Маргарінова	C <sub>17:0</sub>	0,28±0,01	0,29±0,01	0,21±0,01
Гептадециєнова	C <sub>17:1</sub>	0,73±0,04	0,73±0,03	0,91±0,03*
Стеаринова	C <sub>18:0</sub>	20,4±0,76	22,8±0,84	23,3±1,10*
Олеїнова	C <sub>18:1</sub>	19,7±0,60	22,7±0,70	24,0±1,35*
Лінолева	C <sub>18:2</sub>	11,1±0,59	5,90±0,30*	5,64±0,32*
Нонадецилова	C <sub>19:0</sub>	1,11±0,05	1,00±0,01	1,15±0,05
Арахінова	C <sub>20:0</sub>	1,31±0,07	1,33±0,01	1,19±0,05
Гадолеїнова	C <sub>20:1</sub>	3,02±0,11	3,13±0,20	2,90±0,10
Арахідонова	C <sub>20:4</sub>	5,49±0,25	3,25±0,13*	3,14±0,19*
Жирні кислоти:				
Насичені		54,58±5,0	58,79±10,1	58,25±10,1
Мононенасичені		28,83±1,2	32,06±2,1	32,97±1,1
Поліненасичені		16,59±0,7	9,15±1,1*	8,78±0,55*

Жирнокислотний склад загальних фосфоліпідів  
слизової сліпої кишки поросят  
( $M \pm m$ , %,  $n=3$ )

Назва жирної кислоти	Код жирної кислоти	Групи поросят		
		здорові	хворі; години після зараження	
			48	72
Капринова	C <sub>10:0</sub>	0,21±0,01	0,13±0,01*	0,19±0,00
Лауринова	C <sub>12:0</sub>	0,40±0,02	0,39±0,01	0,42±0,01
Трициклова	C <sub>13:0</sub>	0,54±0,02	0,48±0,02	0,37±0,01*
Міристинова	C <sub>14:0</sub>	1,55±0,07	1,77±0,04	1,82±0,06*
Пентадецилова	C <sub>15:0</sub>	0,48±0,02	0,37±0,01	0,45±0,01
Пальмітинова	C <sub>16:0</sub>	28,2±1,01	29,6±0,77	28,7±0,63
Пальмітолеїнова	C <sub>16:1</sub>	4,30±0,17	4,11±0,11	4,32±0,12
Маргарінова	C <sub>17:0</sub>	0,45±0,02	0,49±0,02	0,64±0,02
Гептадешієнова	C <sub>17:1</sub>	0,51±0,02	0,37±0,02*	0,59±0,03
Стеаринова	C <sub>18:0</sub>	21,9±0,84	23,9±0,56	22,6±0,90
Олеїнова	C <sub>18:1</sub>	20,2±0,76	22,6±0,88	24,9±1,12*
Лінодева	C <sub>18:2</sub>	9,95±0,40	6,38±0,92*	6,12±0,25*
Нонадещієлова	C <sub>19:0</sub>	1,10±0,05	1,42±0,06	1,56±0,95*
Арахінова	C <sub>20:0</sub>	1,79±0,05	1,90±0,09	1,82±0,04
Гадолеїнова	C <sub>20:1</sub>	3,89±0,14	3,48±0,09	3,37±0,06
Арахідонова	C <sub>20:4</sub>	4,53±0,13	2,61±0,11*	2,13±0,15*
Жирні кислоти:				
Насичені		56,62±1,5	60,45±1,1	58,57±2,1
Мононенасичені		28,90±1,0	30,56±0,7	33,18±0,9*
Поліненасичені		14,48±0,6	8,99±0,5*	8,25±0,7*

частки лінолевої кислоти у складі фосфоліпідів слизової 12-палої кишки внаслідок перетворення її, головним чином, у арахідонову кислоту, а з другого - у підвищенні використання останньої для синтезу простагландинів.

Зміни жирнокислотного складу фосфоліпідів сліпої кишки поросят після зараження збудником сальмонельозу в основному характеризуються такими ж закономірностями, як і в слизовій 12-палої кишки (табл. 7).

Слід зазначити, що патогенна дія сальмонел супроводжується значним зменшенням у фосфоліпідах слизової кишечника поросят вмісту поліненасичених жирних кислот, що істотно впливає на плинність мембран і визначає функціональні особливості тканин в процесі розвитку патології.

#### 4. Особливості функціонування системи циклічних нуклеотидів у тканинах поросят на фоні розвитку експериментального сальмонельозу

Для оцінки чутливості системи циклічних нуклеотидів окремих тканин до дії ендотоксину, який вивільнюється із сальмонел в процесі їх персистенції в організмі після зараження поросят, вивчали ряд показників, які інтегрально характеризують стан цієї системи як вторинного месенджера в регуляції метаболізму клітини.

Через 72 години після зараження поросят збудником сальмонельозу вміст цАМР у слизовій 12-палої кишки поросят був у 1,23 раза більший ( $P < 0,05$ ), ніж у здорових поросят (табл. 8).

Таблиця 8

Концентрація цАМР і цГМР в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , нмоль/г,  $n=3$ )

Групи тварин	Години після зараження	Слизова 12-палої кишки		Печінка	
		цАМР	цГМР	цАМР	цГМР
Здорові		2,70±0,20	0,38±0,04	2,85±0,08	0,45±0,03
Хворі:	24	2,75±0,10	0,32±0,01	2,90±0,10	0,40±0,01
	48	2,42±0,10	0,50±0,10*	3,45±0,01*	0,55±0,05
	72	3,50±0,05*	0,56±0,07*	3,41±0,01*	0,75±0,01*

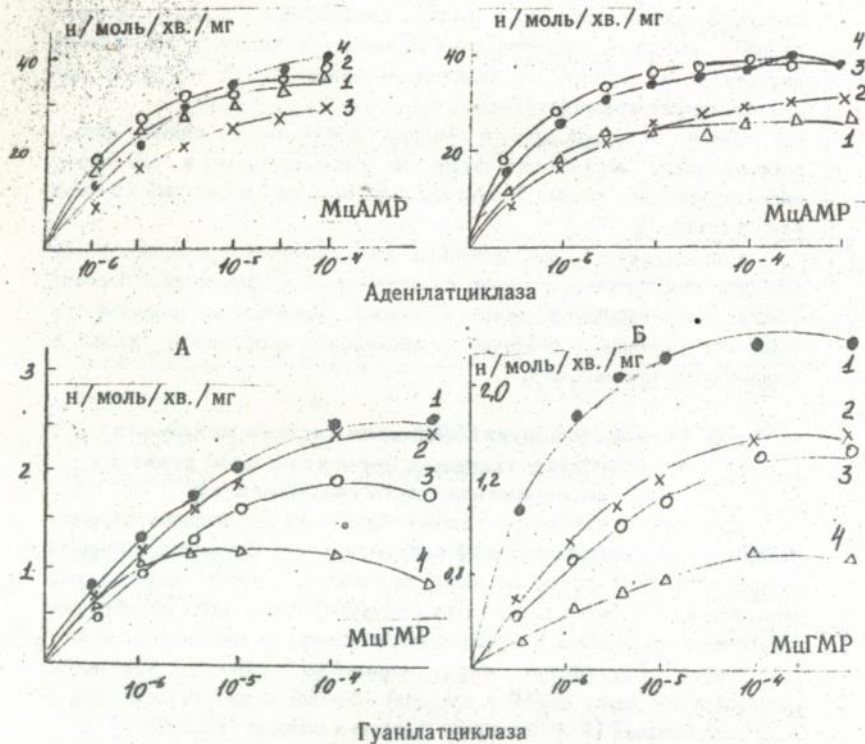


Рис. 1 Активність аденілат- і гуанілатциклази в залежності від концентрації циклічних нуклеотидів в слизовій 12-палої кишки (А) і печінці (Б).

Групи тварин:

1 - здорові

хворі, години після зараження:

2 - 24

3 - 48

4 - 72

У печінці через 48 і 72 години після зараження сальмонельозом вміст цАМР був відповідно в 1,20 і 1,19 раза більший ( $P < 0,001$ ), ніж у слизовій 12-палої кишки здорових поросят.

З наведених даних випливає, що пряма залежність між інтенсивністю синтезу простагландинів  $E_2$  і вмістом цАМР у слизовій 12-палої кишки і печінці тварин виявляється лише через 72 години після зараження їх сальмонельозом.

Концентрація цГМР у слизовій 12-палої кишки через 72 години після зараження була в 1,47 раза більша ( $P = 0,05$ ), ніж у слизовій здорових поросят.

У печінці через 72 години після зараження концентрація цГМР була в 1,66 раза більша порівняно до вмісту цього нуклеотиду в печінці здорових тварин.

Дослідження молекулярних механізмів, що лежать в основі змін активності аденілатциклази в мембранах ентероцитів і гепатоцитів поросят при сальмонельозі ми проводили шляхом оцінки активності аденілатциклази при різній концентрації цАМР (рис. 1).

Отримані результати вказують на підвищення активності аденілатциклази в слизовій 12-палої кишки і печінці поросят у всі досліджувані строки після зараження їх сальмонельозом. Виявлені зміни активності фермента в зазначених органах через 24, 48 і 72 години після зараження обумовлені, в основному, зменшенням уявної швидкості реакції, спорідненість ферменту до субстрату при цьому зменшується, на що вказують величини уявних констант Міхаеліса (табл. 9).

Дослідження чутливості аденілатциклазного комплексу до факторів її активації при дії сальмонельозної токсикоінфекції проводили з додаванням до інкубаційного середовища дофаміну, норадреналіну, синтетичного антагоніста  $\beta$ -рецепторів - ізопроterenолу (рис. 2).

Результати досліджень свідчать про те, що вже через 24 години після зараження поросят сальмонельозом відбуваються істотні зміни чутливості аденілатциклази печінки до регуляторних впливів зазначених біологічних активаторів. При цьому виявлено як зниження чутливості аденілатциклазного комплексу до її активаторів, так і зменшення ступеня активації ними фермента.

Таким чином, під впливом патогенних факторів сальмонел аденілатциклаза в ентероцитах і гепатоцитах зазнає глибоких змін, які обмежуються не лише амплітудою відповіді, але й поширюються на процеси, що здійснюють регуляторну дію на активність фермента або його каталітичного комплексу.

Таблиця 9

Значення уявних констант Міхаеліса ( $K_m$ ) для аденілатциклази і гуанілатциклази в тканинах поросят при захворюванні сальмонельозом ( $M \pm m$ , нмоль/г.  $n=3$ )

Групи тварин	Години після зараження	Аденілатциклаза		Гуанілатциклаза	
		Печінка	12-пала кишка	Печінка	12-пала кишка
Здорові		0,80±0,04	0,50±0,02	0,50±0,03	1,30±0,08
Хворі:	24	0,80±0,05	0,50±0,03	0,90±0,07*	1,25±0,09
	48	0,93±0,07	1,00±0,06*	0,93±0,07*	1,00±0,07*
	72	1,00±0,06	1,00±0,07*	0,90±0,05*	1,00±0,06*

Таблиця 10

Значення уявних констант Міхаеліса ( $K_m$ ) для фосфодіестерази цАМР і цГМР в тканинах поросят при захворюванні сальмонельозом ( $M \pm m$ , мкМ,  $n=3$ )

Групи тварин	Години після зараження	Фосфодіестераза цАМР		Фосфодіестераза цГМР	
		Печінка	12-пала кишка	Печінка	12-пала кишка
Здорові		0,50±0,02	1,00±0,07	1,60±0,13	1,25±0,08
Хворі:	24	1,00±0,08*	1,50±0,09*	0,70±0,05*	1,20±0,09
	48	1,00±0,12*	1,60±0,10*	0,50±0,04*	1,25±0,12
	72	0,50±0,05	1,60±0,12*	0,50±0,05*	1,25±0,09

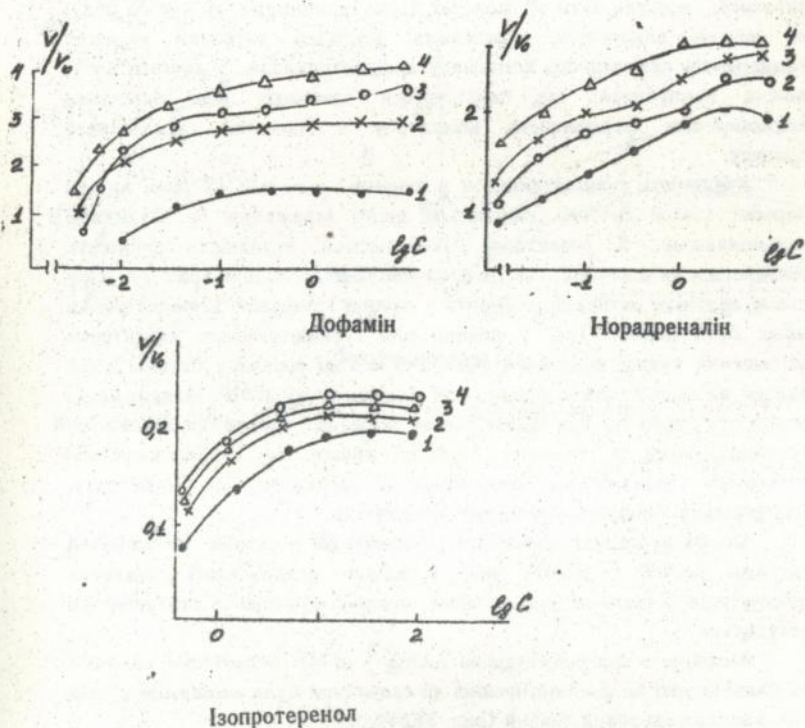


Рис. 2. Активация аденілатциклази слизової 12-палої кишки здорових (1) і хворих тварин через 24, 48 і 72 години після зараження (2,3,4).

Описані ефекти, що розвиваються в процесі сальмонельозної патології, можуть бути обумовлені двома причинами. З одного боку, не можна виключити можливість постійної активації окремих компонентів олігомірного комплексу аденілатциклази. З другого боку, можна припустити, що порушується взаємодія між окремими компонентами ферментного комплексу в динаміці інфекційного процесу.

Активність гуанілатциклази у печінці і слизовій 12-палої кишки поросят також суттєво змінюється після зараження їх збудником сальмонельозу. З розвитком захворювання активність фермента знижується як в печінці, так і в слизовій 12-палої кишки (рис. 1). При цьому механізм активації фермента у печінці і слизовій 12-палої кишки може бути різний. Так, у печінці для гуанілатциклази характерне збільшення уявної константи Міхаеліса в ході розвитку патології, що вказує на зменшення спорідненості фермента до цГМР. Максимальна швидкість фермента при цьому також знижена. Зниження активності гуанілатциклази у слизовій 12-палої кишки не супроводжується суттєвими змінами в спорідненості фермента до субстрату, максимальна швидкість при цьому знижується.

Фосфодіестераза циклічних нуклеотидів - єдина метаболічна система цАМР і цГМР, яка каталізує розщеплення вказаних нуклеотидів, а також в ряді випадків виконує функцію їх центрального регулятора.

Активність фосфодіестерази цАМР і цГМР в печінці і слизовій 12-палої кишки на фоні патогенної дії сальмонел була вища, ніж у цих же тканинах здорових тварин (рис. 3).

Особливо виразно при цьому змінюється активність фосфодіестерази цАМР. Механізми активації фермента в печінці і слизовій 12-палої кишки, очевидно, різні (табл. 10)

Результати проведених нами досліджень свідчать про чутливість циклонуклеотид- залежної системи регуляції метаболічних процесів до дії сальмонельозної токсикоінфекції в печінці і слизовій 12-палої кишки поросят. Зміни активності ферментів метаболізму цАМР і цГМР в клітинних печінки і слизовій 12-палої кишки поросят під впливом патогенних факторів зумовлюють підвищення вмісту циклічних нуклеотидів в тканинах.

На даний час відомо, що розвиток діареї у тварин при дії різних бактеріальних агентів пов'язаний з активацією аденілатциклази і наступним збільшенням внутріклітинного вмісту цАМР у слизовій тонкого кишечника. Виявлене нами підвищення активності

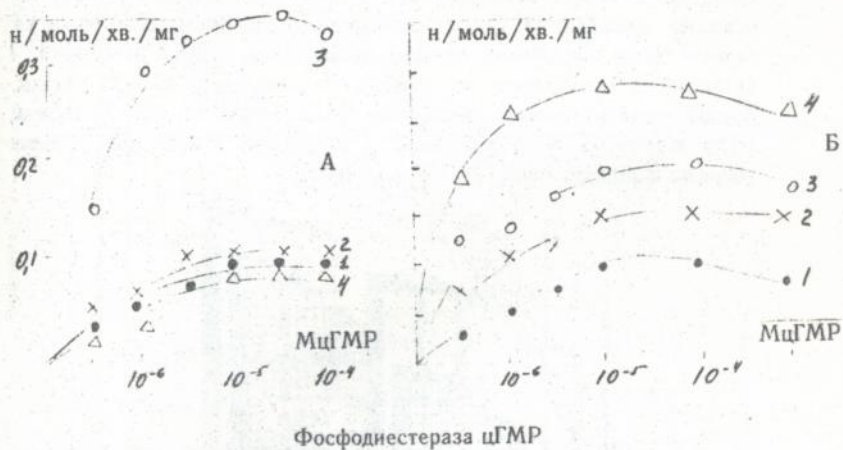
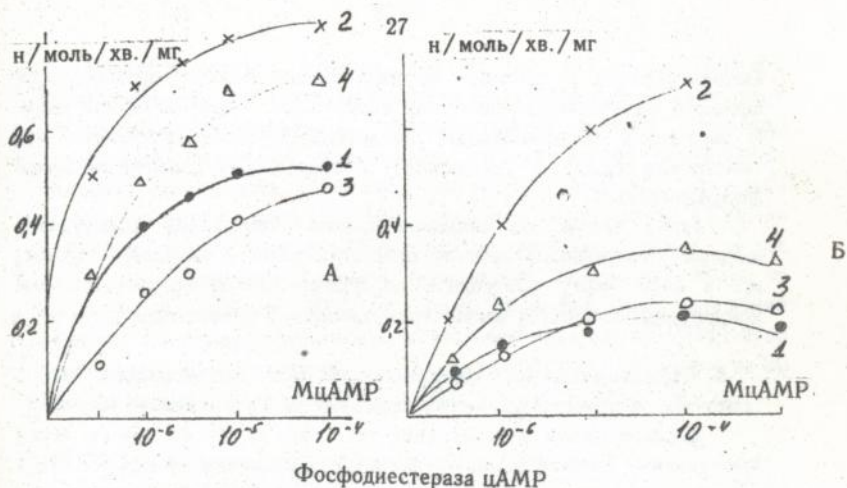


Рис. 3. Активність фосфодиестераз в залежності від концентрації циклічних нуклеотидів в слизовій 12-палой кишки (А) і печінці (Б).

Групи тварин:

1 - здорові

хворі, години після зараження:

2 - 24

3 - 48

4 - 72

аденілатциклази у слизовій 12-палії кишки поросят приводить до значного підвищення концентрації цАМР лише через 72 години після їх зараження сальмонельозом, що можна пояснити активацією на початкових стадіях розвитку сальмонельозу цАМР-залежної фосфодіестерази.

Таким чином, дія сальмонельозного ендотоксину реалізується шляхом інтенсифікації синтезу простагландинів у тканинах поросят, що в свою чергу призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації вторинних месенжерів - циклічних нуклеотидів.

### 5. Стан перекисного окислення ліпідів і антиоксидантної системи в процесі розвитку ендотоксемії в організмі поросят

Дослідженнями встановлено, що вже через 24 години після інфікування тварин реакції перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в еритроцитах значно активуються, а в наступний період змінюються відносно мало (рис.4). Так, рівень гідроперекисів ліпідів (ГЛ) через 24 години після зараження зростає більш, ніж удвічі ( $P < 0,001$ ) і залишається приблизно на такому ж рівні через 48 і 72 години. Концентрація малонового діальдегіду (МДА) через 24, 48 і 72 години після зараження була відповідно у 2,65, 2,68 і 2,87 раза більша відносно вихідного рівня ( $P < 0,001$ ) (рис.4).

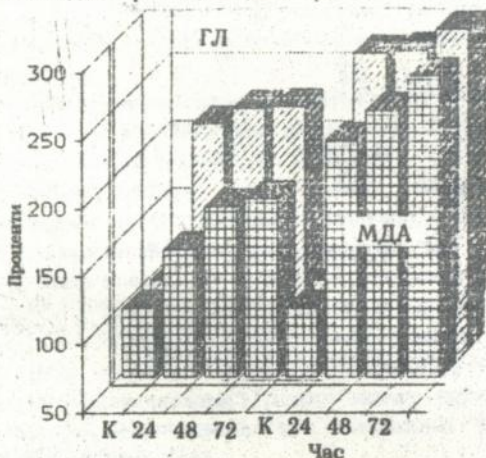


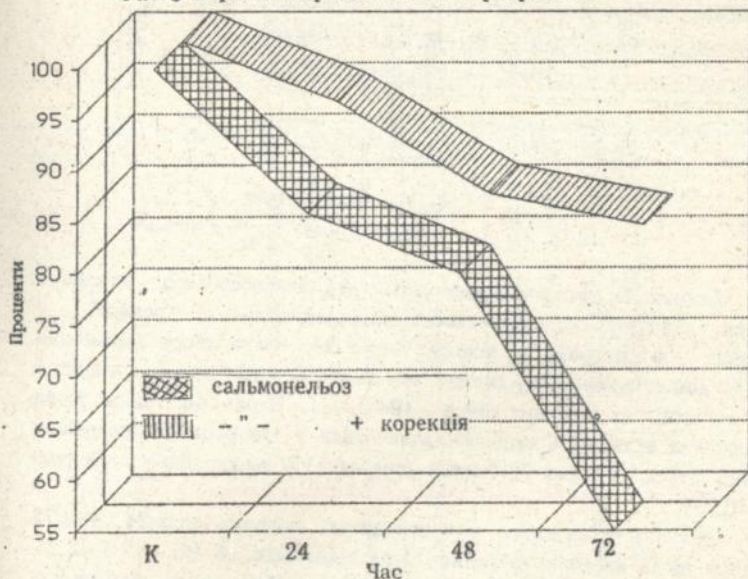
Рис. 4 Вміст гідроперекисів ліпідів (ГЛ) і малонового діальдегіду (МДА) в еритроцитах.

▨ сальмонельоз

▧ " " + корекція

Дані досліджень свідчать про те, що дія сальмонельозної токсикоінфекції на організм поросят спостерігається відносно рано після зараження тварин і проявляється в значній стимуляції перекисного окислення ненасичених жирних кислот фосфоліпідів мембран еритроцитів. Останнє, як відомо, приводить до змін фізико-хімічних властивостей мембран еритроцитів. Ступінь перекисної деструкції мембранних структур еритроцитів настє не так швидко, як активація процесів перекисного окислення ліпідів та накопичення продуктів ПОЛ. Так, через 24 години після зараження поросят зниження перекисної резистентності еритроцитів (ПРЕ) було незначним, а вже в наступні 48 і 72 години ПРЕ була відповідно на 20 і 45 % менша, ніж в контролі ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,001$ ) (рис 5). Все це

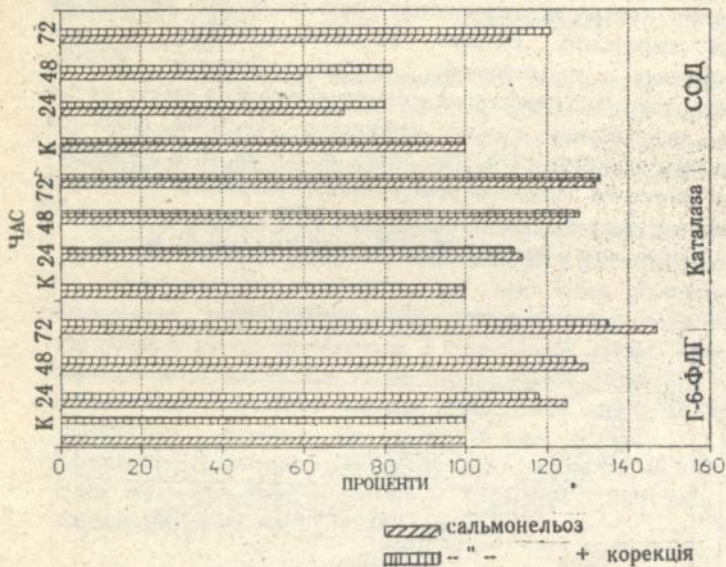
Рис. 5 Перекисна резистентність еритроцитів



свідчить про порушення ультраструктури мембран еритроцитів поросят при експериментальному сальмонельозі внаслідок стимуляції ПОЛ.

Встановлено, що при експериментальній ендотоксемії у поросят підвищення інтенсивності реакцій ПОЛ в еритроцитах спричиняє порушення системи його регуляції (рис. 6).

Рис.6. АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ



Активність супероксиддисмутази, яка безпосередньо каталізує обрив ланцюгів кисневозалежних вільнорадикальних реакцій у клітині, в еритроцитах поросят через 24 години після зараження збудником сальмонельозу знижується на 30 % порівняно з активністю її в еритроцитах здорових тварин ( $P < 0,001$ ). Через 48 годин після зараження активність супероксиддисмутази в еритроцитах продовжує знижуватись, а через 72 години вона на 11% вища, ніж у контролі ( $P < 0,001$ ).

Активність каталази в еритроцитах поросят через 24, 48 і 72 години після введення збудника була відповідно на 14, 25 і 32 % вища порівняно з активністю її у контролі. Оскільки за нормальних умов у клітині між активністю супероксиддисмутази і каталази відмічається висока ступінь кореляції (Ашґа, 1978), то порушення кореляції між активністю зазначених ферментів в еритроцитах поросят, заражених сальмонельозом, вказує на неоднакову їх чутливість до дії сальмонельозної токсикоінфекції.

Таблиця 11

Вміст малонового диальдегіду в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , мкМ/г/хв.,  $n=3$ )

Досліджувані тканини	Групи поросят			
	здорові	хворі; години після зараження		
		24	48	72
Плазма крові	0,052±0,001	0,051±0,001	0,053±0,002	0,070±0,003*
Печінка	0,032±0,001	0,046±0,001*	0,070±0,008*	0,075±0,009*
12-пала кишка	0,037±0,003	0,031±0,001	0,041±0,004	0,064±0,006* ↗
Сліпа кишка	0,050±0,002	0,045±0,005	0,067±0,003*	0,116±0,012*

Дані таблиці 11 свідчать про специфічний вплив сальмонельозної токсикоінфекції на ПОЛ у плазмі крові, печінці, слизовій тонкого і товстого відділів кишечника поросят. Зокрема, концентрація малонового діальдегіду в плазмі крові через 24 і 48 годин після зараження тварин істотно не відрізнялась від контрольного рівня, а через 72 години - підвищувалась в 1,34 раза. Отже вплив сальмонельозної токсикоінфекції на стан перекисного окиснення ліпідів в мембранах еритроцитів проявляється значно більшою мірою, ніж у плазмі крові. Це пояснюється високим вмістом ненасичених ацилів у фосфоліпідах мембран еритроцитів і їх більш тривалим періодом життя, тоді як ліпіди плазми крові швидко поглинаються тканинами.

Концентрація малонового діальдегіду в печінці через 24, 48 і 72 години після зараження сальмонельозом була відповідно в 1,43, 2,18 і 2,34 раза більша, ніж у печінці здорових поросят. Це свідчить про високу чутливість структурних ліпідів мембран гепатоцитів до ПОЛ, ініційовану сальмонельозною токсикоінфекцією.

Рівень МДА в слизовій 12-палої кишки через 24 години після зараження був дещо менший, а через 72 години - в 1,73 раза більший ( $P=0,01$ ), ніж у слизовій 12-палої кишки здорових поросят.

Вміст МДА у слизовій сліпої кишки через 48 і 72 години після зараження був відповідно в 1,42 і 2,32 раза більший, ніж у слизовій сліпої кишки здорових тварин.

З наведених даних випливає, що збільшення концентрації малонового діальдегіду у слизовій кишечника виявляється лише через 48 і 72 години після зараження їх сальмонельозом, причому ступінь збільшення у слизовій товстого кишечника виражений значно більшою мірою, ніж у слизовій тонкого кишечника. Ці дані узгоджуються з результатами інших етапів досліджень, які свідчать про істотні відмінності в обміні речовин у слизовій тонкого і товстого відділів кишечника поросят при дії сальмонельозної токсикоінфекції.

Щоб встановити можливість корекції патохімічних змін, які відбуваються в організмі тварин внаслідок пошкоджуючої дії сальмонельозного ендотоксину, було проведено дослід із застосуванням комплексу лікувально-профілактичних препаратів (КЛПП), на протязі 10 днів до зараження сальмонелами та в процесі розвитку патології. Слід відзначити, що клінічна картина захворювання інфікованих тварин, які отримували КЛПП, відрізнялася менш вираженими ознаками інтоксикації, ніж тварини, які не отримували КЛПП.

Ступінь активації ПОЛ в еритроцитах інфікованих тварин, які отримали КЛПП, дещо знижений (рис. 4). Так, вміст гідроперекисів ліпідів в еритроцитах через 72 години після зараження збільшився на 80 % в той час, як кількість ГЛ збільшилась на 127% в еритроцитах тварин, які не отримували КЛПП.

Корегуючий вплив КЛПП позначався і на вмісті в еритроцитах МДА, концентрація якого мала тенденцію до зниження.

Перекисна резистентність мембран еритроцитів тварин, які отримували КЛПП, змінюється повільніше і в меншій мірі: зниження цього показника на 18 % відбувається лише через 72 години після зараження тварин сальмонельозом (рис. 5).

Значні зміни спостерігаються в динаміці активності СОД в еритроцитах тварин досліджуваної групи в порівнянні з показниками активності СОД у інфікованих тварин, які не отримували КЛПП. Відмінності полягали, головним чином, в різкому адаптивному підвищенні активності фермента через 72 години після зараження. Ступінь пригнічення еритроцитарної СОД через 24 години після зараження тварин була менш значною, ніж у групі тварин, які не отримували препаратів (рис. 6).

Таким чином, застосування КЛПП з метою корекції порушень, викликаних токсикоінфекцією, свідчить про їх позитивний вплив, механізм якого можна пояснити підвищенням рівня поліненасичених жирних кислот, що відображає зміни ліпідного мікрооточення сукцинат-дегідрогенази, який сприяє її активації при надлишку субстрату (Максимова, 1982).

Антиоксидантна дія КЛПП пов'язана із здатністю метаболітів ЦТК активувати мікосомальне окислення за рахунок посилення міжмембранного переносу відновлюючих еквівалентів з мітохондрій на ендоплазматичний ретикулум (Малюк, 1988), що посилює процеси детоксикації в печінці.

## **6. Інтенсивність синтезу білків і ліпідів у тканинах поросят в процесі розвитку сальмонельозної токсикоінфекції**

У зв'язку з важливою роллю білків у забезпеченні ультраструктурної організації та метаболічної активності клітин органів із специфічними функціями (Simon, 1989), до яких належать печінка і слизова кишечника, метою даного етапу роботи було проведення порівняльного аналізу інтенсивності синтезу білків у тканинах поросят в динаміці розвитку експериментального сальмонельозу.

Тенденція до підвищення та однонаправленість змін інтенсивності

Таблиця 12

Радіоактивність білків, синтезованих в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , тис.  $\beta$ -розп./100 мг тканини/хв.,  $n=3$ )

Досліджувані органи	Групи поросят			
	здорові	хворі; години після зараження		
		24	48	72
Печінка	28,5 $\pm$ 3,7	35,8 $\pm$ 6,2	38,4 $\pm$ 5,3	35,7 $\pm$ 2,2
12-пала кишка	23,2 $\pm$ 4,2	25,7 $\pm$ 3,1	28,4 $\pm$ 2,1	27,4 $\pm$ 3,6
Сліпа кишка	18,4 $\pm$ 2,3	23,7 $\pm$ 4,7	27,5 $\pm$ 4,7	29,6 $\pm$ 2,7*

Таблиця 13

Радіоактивність ліпідів, синтезованих в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , тис.  $\beta$ -розп./100 мг сирої тканини/хв.,  $n=3$ )

Досліджувані тканини	Групи поросят			
	здорові	хворі; години після зараження		
		24	48	72
		[1- $^{14}$ C]-ацетат		
Печінка	8,5 $\pm$ 1,3	5,3 $\pm$ 1,0	6,2 $\pm$ 1,8	6,8 $\pm$ 0,7
12-пала кишка	12,4 $\pm$ 1,2	9,4 $\pm$ 0,8	9,7 $\pm$ 0,6	8,6 $\pm$ 0,5*
Сліпа кишка	9,5 $\pm$ 0,8	8,6 $\pm$ 0,8	8,2 $\pm$ 0,5	7,5 $\pm$ 0,2
		[2- $^{14}$ C]-лейцин		
Печінка	1,2 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,08
12-пала кишка	0,8 $\pm$ 0,05	1,3 $\pm$ 0,08*	1,2 $\pm$ 0,3*	1,2 $\pm$ 0,15*
Сліпа кишка	1,6 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,7

синтезу білків у печінці, слизовій 12-палої і сліпої кишок на досліджуваних стадіях захворювання сальмонельозом свідчать про таку дію сальмонельозного ендотоксину на синтез білків у різних тканинах поросят, яку можна розглядати як загальну реакцію тканин (табл. 12).

Ліпіди, як і білки, відіграють важливу роль у забезпеченні ультраструктурної організації клітин тварин, а вміст та інтенсивність синтезу ліпідів в різних тканинах знаходяться у певному взаємозв'язку з їх метаболічною і функціональною активністю (Янович, Лагодюк, 1991).

В результаті дослідження інтенсивності синтезу ліпідів у досліджуваних тканинах поросят, заражених збудником сальмонельозу, виявлено, що радіоактивність ліпідів при інкубації гомогенатів тканин з  $[1-^{14}\text{C}]$ -ацетатом через 24, 48 і 72 години після введення патогенної культури сальмонел дещо менша, ніж при інкубації гомогенатів тканин здорових тварин (табл. 13).

Аналіз даних таблиці 13 показує, що інтенсивність синтезу ліпідів у тканинах хворих тварин при застосуванні як попередника  $[2-^{14}\text{C}]$ -лейцину підвищується. Цей факт заслуговує на увагу з ряду причин.

По-перше, у зв'язку з різким зменшенням споживання хворими поросятами корму їх потреба в амінокислотах забезпечується недостатньо. По-друге, використання  $[2-^{14}\text{C}]$ -лейцину в синтезі білків у досліджуваних тканинах поросят після зараження сальмонельозом збільшується. По-третє, як буде далі показано, активність протеїназ в тканинах хворих сальмонельозом поросят значно зменшується.

Виходячи з цього, наведені дані підтверджують наше припущення, що в синтезі ліпідів у печінці, слизовій 12-палої і сліпої кишок хворих сальмонельозом поросят використовуються амінокислоти, які вивільнюються в результаті розщеплення білків в інших органах і тканинах, зокрема у скелетних м'язах.

### **7. Інтенсивність енергетичних процесів в тканинах поросят при захворюванні сальмонельозом**

З наведених у таблиці 14 даних видно, що ступінь окислення  $[1-^{14}\text{C}]$ -ацетату і  $[2-^{14}\text{C}]$ -лейцину в печінці, слизовій тонкого і товстого кишечника поросят після зараження сальмонельозом специфічне для кожного досліджуваного субстрату і для стадії захворювання.

Так, наявність  $^{14}\text{CO}_2$  що утворюється внаслідок окислення  $[1-^{14}\text{C}]$ -ацетату в тканинах через 24, 48 і 72 години після зараження збудником сальмонельозу істотно не відрізняється від його кількості

Таблиця 14

Радіоактивність  $\text{CO}_2$  утвореного при окисленні  $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -ацетату  
і  $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -лейцину в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , тис.  $\beta$ -розп./100 мг сирової тканини/хв.,  $n=3$ )

Досліджувані тканини	Групи поросят			
	здорові	хворі; години після зараження		
		24	48	72
$[1\text{-}^{14}\text{C}]$ ацетат				
Печінка	9,6 $\pm$ 3,2	10,3 $\pm$ 3,0	10,5 $\pm$ 2,4	10,2 $\pm$ 2,0
12-пала кишка	7,4 $\pm$ 1,8	8,2 $\pm$ 3,5	6,4 $\pm$ 3,4	7,2 $\pm$ 2,9
Сліпа кишка	5,7 $\pm$ 2,2	4,2 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 1,4	5,0 $\pm$ 0,3
$[2\text{-}^{14}\text{C}]$ лейцин				
Печінка	1,25 $\pm$ 0,12	-	1,23 $\pm$ 0,25	2,13 $\pm$ 0,24*
12-пала кишка	1,43 $\pm$ 0,17	-	1,34 $\pm$ 0,17	3,19 $\pm$ 0,37*
Сліпа кишка	1,25 $\pm$ 0,12	-	1,23 $\pm$ 0,25	2,13 $\pm$ 0,24*

при окисленні зазначеного субстрату в досліджуваних тканинах здорових поросят. Оскільки основним джерелом  $\text{C}_2$ -одиниць, які окислюються в циклі трикарбонових кислот у тканинах нежуйних тварин у вигляді ацетил- $\text{CoA}$  є глюкоза і довголанцюгові жирні кислоти (Hanson, Bellard, 1967), то з наведених даних випливає, що субстратне забезпечення енергетичних процесів у тканинах поросят при захворюванні сальмонельозом не порушується.

З інших аспектів результатів досліджень, поданих у таблиці 14, заслуговує на увагу виявлена нами значно більша кількість  $^{14}\text{CO}_2$  що утворюється в результаті метаболізму  $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -лейцину в тканинах поросят через 72 години після зараження сальмонельозом, ніж у тканинах здорових поросят.

Наведені дані свідчать про те, що і ацетил- $\text{CoA}$ , який утворюється в результаті метаболізму лейцину використовується як в синтезі ліпідів, так і в енергетичних процесах. У зв'язку з цим виникає питання про джерело лейцину в печінці, слизовій тонкого і товстого відділів кишечника поросят при дії сальмонельозного ендотоксину, оскільки за нормальних фізіологічних умов джерелом лейцину в тканинах може бути амінокислота, яка всмоктується у тонкому кишечнику або вивільнюється в процесі протеолізу м'язових білків. Відповідно до сучасних уявлень, посилення використання лейцину в енергетичних процесах тканин спостерігається при більш інтенсивному метаболізмі глюкози і жирних кислот (Янович, Вовк, 1989; Янович, 1992), у зв'язку з чим можна зробити висновок, що та ж

закономірність характерна і для обміну речовин в тканинах поросят, хворих сальмонельозом.

### **8. Фракційний склад білків та їх катаболізм в тканинах поросят при експериментальному сальмонельозі**

У зв'язку з виявленими змінами інтенсивності синтезу білків і ступеня використання вуглецевих метаболітів, які утворюються в результаті метаболізму амінокислот, в енергетичних процесах і синтезі ліпідів у тканинах поросят при експериментальному сальмонельозі, становило інтерес дослідити особливості складу білків, інтенсивність синтезу та їх катаболізм при зазначеній патології.

З даних таблиці 15 випливає, що підвищення інтенсивності синтезу білків у тканинах поросят при дії сальмонельозного ендотоксину супроводжується певними змінами їх фракційного складу, насамперед поступовим збільшенням вмісту альбумінів і зменшенням кількості  $\gamma$ -глобулінів. Зміни співвідношення  $\alpha$ -глобулінів,  $\beta$ -глобулінів і  $\gamma$ -глобулінів при цьому специфічні для кожної з досліджуваних тканин.

виникає питання про стан оновлення білків у тканинах в процесі розвитку сальмонельозу. Щоб одержати відповідь на це питання ми провели дослідження активності протеїназ у тканинах поросят.

Дані таблиці 16 свідчать про те, що активність кислих протеїназ у печінці і слизовій оболонці 12-палої кишки поросят починає знижуватись вже через 24 години після впровадження збудника і це зниження продовжується в наступні періоди захворювання.

Зміни в активності кислих протеїназ у слизовій сліпої кишки поросят, на відміну від печінки і слизової 12-палої кишки, виявляються у більш пізні строки після зараження сальмонельозом.

В цілому наведені вище дані свідчать про зниження активності кислих протеїназ у тканинах поросят в процесі розвитку ендотоксемії.

Активність нейтральних протеїназ у печінці і слизовій 12-палої кишки поросят значно знижується вже через 24 години після зараження сальмонельозом, а в наступний період активність нейтральних протеїназ практично не змінюється.

На відміну від зазначених тканин, у слизовій сліпої кишки під впливом сальмонельозного ендотоксину змін в активності нейтральних протеїназ нами не виявлено.

Одержані дані в цілому свідчать про те, що підвищення інтенсивності синтезу білків у печінці, слизовій 12-палої і сліпої кишок при сальмонельозі не пов'язані з оновленням білків, оскільки цей процес супроводжується посиленням процесів протеолізу, який

Таблиця 15

Співвідношення білкових фракцій в тканинах поросят  
( $M \pm m$ , %,  $n=3$ )

Групи тварин	Години після зараження	Білкові фракції			
		альбуміни	глобуліни		
			$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Печінка					
Здорові		22,50 $\pm$ 0,27	31,67 $\pm$ 0,31	35,80 $\pm$ 1,10	10,03 $\pm$ 1,06
Хворі:	24	23,45 $\pm$ 0,59	30,99 $\pm$ 0,97	38,36 $\pm$ 0,25	7,21 $\pm$ 1,81*
	48	27,96 $\pm$ 0,69*	30,51 $\pm$ 1,30	34,86 $\pm$ 1,21	8,62 $\pm$ 0,0
	72	26,08 $\pm$ 0,83*	35,68 $\pm$ 0,73*	32,27 $\pm$ 0,71	7,39 $\pm$ 0,0*
12-пала кишка					
Здорові		37,52 $\pm$ 1,13	31,35 $\pm$ 0,14	27,61 $\pm$ 0,74	3,54 $\pm$ 0,52
Хворі:	24	41,38 $\pm$ 1,58	29,48 $\pm$ 0,04	25,40 $\pm$ 1,08	3,74 $\pm$ 0,46
	48	46,33 $\pm$ 0,39	29,11 $\pm$ 0,52	21,54 $\pm$ 0,89*	2,53 $\pm$ 0,02
	72	42,97 $\pm$ 1,44*	31,82 $\pm$ 0,87	24,03 $\pm$ 0,12	2,38 $\pm$ 0,0*
Сліпа кишка					
Здорові		43,19 $\pm$ 1,31	36,36 $\pm$ 0,00	18,00 $\pm$ 0,00	4,55 $\pm$ 0,27
Хворі:	24	43,38 $\pm$ 0,61	29,28 $\pm$ 0,86	22,65 $\pm$ 0,25*	4,70 $\pm$ 0,50
	48	43,00 $\pm$ 0,52	31,65 $\pm$ 0,04	21,60 $\pm$ 1,20	3,76 $\pm$ 0,65
	72	46,87 $\pm$ 0,61	30,67 $\pm$ 0,21*	22,47 $\pm$ 1,03*	-

Таблиця 16

Активність ферментів катаболізму білків у тканинах поросят  
( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Групи тварин	години після зараження	АЛТ	АСТ	Кислі протеїнази	Нейтральні протеїнази
		мкМ пірвіноградної кислоти		мкМ тирозину/г білка	
Печінка					
Здорові		6070±235	10461±70	131,43±5,23	21,10±1,30
Хворі:	24	5133±81	7600±212*	111,70±3,50*	10,00±0,58*
	48	2886±432*	7020±362*	76,87±9,05*	9,87±1,97*
	72	2213±228*	6646±134*	68,30±5,72*	7,90±0,09*
12-пала кишка					
Здорові		4146±164	6793±134	153,23±10,93	23,73±2,11
Хворі:	24	3550±53*	6066±145*	121,63±3,21*	13,97±2,55*
	48	2796±414*	4786±338*	116,40±5,81*	10,93±1,83*
	72	2386±166*	5133±81*	108,87±4,77*	9,51±1,75*
Сліпа кишка					
Здорові		3460±60	5786±185	23,10±1,68	11,57±2,20
Хворі:	24	2806±29*	4643±219*	25,53±3,59	11,00±1,20
	48	3100±202	4400±342*	17,30±1,37	11,57±1,23
	72	2140±239*	4066±196*	15,20±0,60	12,10±2,50

каталізується протеїназами (Simon, 1989).

Представлені в таблиці 16 результати свідчать також про те, що активність протеїназ, особливо кислих, у слизовій 12-палій кишки значно вища, ніж у слизовій сліпій кишки, що, очевидно, обумовлено різницею у функції тонкого і товстого відділів кишечника, а саме: неоднаковою їх роллю в розщепленні білків, які всмоктуються з хімуса. Разом з тим заслуговує на увагу виявлена нами висока активність обох протеїназ у печінці поросят, що говорить про важливу роль цього органа в обміні білків.

У зв'язку з виявленим нами посиленням використання вуглецевих метаболітів, що утворюються в результаті розщеплення лейцину в тканинах поросят при захворюванні сальмонельозом, у субстратному забезпеченні циклу трикарбонових кислот і синтезу ліпідів, становило інтерес визначити ступінь використання інших амінокислот у субстратному забезпеченні вказаних процесів. З цією метою ми провели дослідження активності аланін- і аспаратамінотрансфераз в тканинах поросят на фоні розвитку патологічного процесу.

З наведених у таблиці 16 даних видно, що активність ферментів переамінування в печінці, слизовій 12-палій і сліпій кишок поросят зменшується, починаючи з 24 години після зараження сальмонельозом. Та ж сама тенденція спостерігається і в наступні 48 і 72 години розвитку інфекційного процесу. Через 72 години після зараження сальмонельозом активність аланінамінотрансферази в печінці, слизовій 12-палій і сліпій кишок була відповідно у 2,74, 1,74 і 1,61 раза, аспаратамінотрансферази - в 1,57, 1,32 і 1,42 раза нижча, ніж у зазначених тканинах здорових поросят.

Оскільки амінотрансферази займають ключове положення в метаболізмі амінокислот в тканинах тварин, то з одержаних нами даних випливає, що в синтезі амінокислот використовуються лише деякі амінокислоти, зокрема розгалужені, до яких відноситься і лейцин. Джерелом цих амінокислот є м'язові білки, а їх посилене використання в енергетичних процесах у тканинах тварин відбувається при голодуванні (Smith, 1983; Woolfson, 1983), зокрема, при гострій формі сальмонельозу.

### **9. Нейтралізація ентеротоксигенності у ентеробактерій**

У патогенезі кишкових інфекцій тварин важлива роль належить термолабільному ентеротоксину, який, як зазначалося вище, можуть продукувати ентеробактерії. Ефективність специфічної профілактики

ентеральних захворювань повною мірою залежить від визначення не тільки збудника, але й від ідентифікації типу ентеротоксину, що продукується цим збудником.

Це викликало необхідність дослідити частоту виявлення польових культур ентеробактерій здатних синтезувати термолабільний ентеротоксин. Нами модифіковано метод визначення термолабільного ентеротоксину *Biken-test*, за допомогою якого проведено аналіз польових культур ентеробактерій на здатність утворювати токсини.

Таблиця 17

Ентеротоксигенність живих культур ентеробактерій в реакції імунодифузії і в дослідях на перев'язаних петлях тонкого кишечника мишей

Культури ентеробактерій	Досліджено культур	Ентеротоксигенність культур		
		в реакції імунодифузії	коефіцієнт ентеросорбції	
		позитивна реакція / %	г/см	позитивна реакція / %
<i>S.cholerae suis</i> № 370	контроль	+	1,36	+
<i>S.cholerae suis</i>	89	28/31	1,27±0,34	51/58
<i>S.tiphymurium</i>	12	3/25	1,09±0,23	6/50
<i>E.coli</i> H-74 114	контроль	+	1,87	+
<i>E.coli</i> H-74 114	213	94/44	1,93±0,46	186/85

Наведені в таблиці 17 дані свідчать про більш високу специфічність методу імунодифузії (*Biken-test*) при визначенні термолабільного ентеротоксину у ентеробактерій.

Слід відзначити, що 31% польових культур сальмонел здатні синтезувати ентеротоксин, імуногенно споріднений термолабільним токсином *E. coli*.

В результаті досліджень встановлено, що 44% *E. coli*, виділених з тканин хворих і загинлих поросят з діарейним синдромом, синтезують термолабільний токсин.

Таким чином, отримані нами дані щодо широкого розповсюдження ентеробактерій, здатних синтезувати термолабільний ентеротоксин, дозволяють зробити висновок про необхідність профілактики діарейних захворювань, яка може забезпечити нейтралізацію ентеротоксинів ентеробактерій.

З метою розробки способу нейтралізації ентеротоксигенності у ентеробактерій досліджували протективну активність потенційно

вакцинного штаму В-9, в який клоновано плазмиду з генами синтезу В-субодиниці термолабільного токсину *E.coli*, при пероральній імунізації мишей. Здатність системи місцевого імунітету вакцинованих мишей до нейтралізації ентеротоксигенної дії ентеропатогенних бактерій оцінювали в дослідіах з перев'язаними петлями кишечника.

Перш за все слід зазначити, що вакцинний штам В-9 нешкідливий і не здатний синтезувати ентеротоксини, про що свідчить невисокий коефіцієнт ентеросорбції рідини в лігованих петлях кишечника контрольних мишей після інокуляції в них штаму В-9 (табл. 18). І, навпаки, введення в кишечні петлі контрольних мишей ентеропатогенних штамів *S.cholerae suis* № 370 і *E.coli* Н-74 114 призводить до накопичення рідини, на що вказує високий коефіцієнт ентеросорбції (1,08 і 2,06).

Після дворазової імунізації мишей вакцинним штамом В-9, ентеросорбція рідини в тонкому кишечнику під дією патогенних культур ентеробактерій, що продукують термолабільний ентеротоксин, значно понижувалась. Слід відмітити, що вже одноразова пероральна імунізація мишей захищає їх від ентеротоксигенних бактерій, які вводились у кишкові петлі (табл. 18).

Таблиця 18

Ентеротоксигенність живих культур досліджуваних ентеробактерій в дослідіах на перев'язаних петлях тонкої кишки контрольних і перорально імунізованих білих мишей ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Ентеробактерії	Коефіцієнт ентеросорбції рідини, г/см		
	контроль	одноразово імунізовані	дворазово імунізовані
<i>S.cholerae suis</i> В-9	0,20±0,06	0,21±0,06	0,19±0,05
<i>S.cholerae suis</i> № 370	1,08±0,21	0,42±0,16	0,27±0,07
<i>E.coli</i> Н-74 114	2,06±0,25	0,38±0,12	0,29±0,09

Наявність генів синтезу В-субодиниці термолабільного ентеротоксину *E.coli* у вакцинному штамі В-9 дозволяє застосовувати його для профілактики шлунково-кишкових захворювань поросят у перші дні їх життя, коли етіологічним агентом діарейних захворювань служать ентеротоксигенні ентеробактерії. В цьому випадку методологія профілактики діарейних захворювань повинна базуватися на створенні у них колострального імунітету (Сидоров, 1983).

Дослідження здатності вакцинного штаму В-9 з клонованою плазмидою, що містить гени, які кодують синтез В-субодиниці термолабільного ентеротоксину показали, що в процесі персистенції в

організі імунізованих тварин вакцинний штам здатний продукувати таку кількість В-субодиниць, яка може ініціювати синтез достатнього рівня специфічних антитіл. З цією метою свиноматок за 35 і 10 днів до опоросу імунізували вакцинним штамом В-9. Визначення рівня специфічних до В-субодиниці антитіл показали, що дворазова імунізація поросніх свиноматок штамом В-9 забезпечує синтез антитіл до В-субодиниці термолабільного токсину; титр останніх у молозиві становить 1:32, тоді як у молозиві невакцинованих свиноматок антитіл до В-субодиниці не виявлено.

Одержані дані свідчать про те, що ентеросорбція рідини в лігованих відрізках кишечника мишей, викликана патогенними ентеробактеріями, культивованими в молозиві вакцинованих свиноматок, у 3-4 рази менша, ніж при введенні бактерій, суспензованих в молозиві контрольних тварин. Це дозволяє зробити висновок про те, що імунізація тварин вакцинним штамом В-9 формує досить високий титр колостральних антитіл, здатних нейтралізувати токсигенні функції ентеробактерій.

Таким чином, пероральне введення бівалентного вакцинного штаму В-9, в який клоновано плазмиду з генами синтезу В-субодиниці термолабільного ентеротоксину *E.coli*, забезпечує синтез антитіл, які блокують зв'язування В-субодиниці термолабільного ентеротоксину збудника з рецепторами на епітеліальних клітинах кишечника.

### Висновки

1. Патогенна дія сальмонел інтенсифікує синтез простагландинів  $E_2$  в слизовій 12-палої кишки і печінці, тоді як у слизовій сліпої кишки хворих тварин інтенсивність синтезу простагландинів істотно не змінюється. Інтенсивність синтезу простагландинів  $F_{2a}$  в слизовій 12-палої кишки і печінці на досліджуваних стадіях розвитку сальмонельозу нижча, а в слизовій сліпої кишки хворих тварин вона істотно не відрізняється від інтенсивності їх синтезу у здорових поросят.

2. Патогенний вплив сальмонел супроводжується посиленням метаболізму  $[1-^{14}C]$ -арахідонової кислоти як циклооксигеназним шляхом, так і шляхом  $\beta$ -окислення, тимчасом як ступінь використання її для синтезу ліпідів істотно не змінюється. Метаболізм  $[1-^{14}C]$ -арахідонової кислоти у слизовій сліпої кишки порослят, хворих на сальмонельоз, залишається на рівні норми.  $[2-^{14}C]$ -арахідонова кислота, яка вивільнюється з фосфадилхолін- $[2-^{14}C]$ -арахідонату при дії

фосфоліпази  $A_2$  у слизовій 12-палої кишки і печінці хворих поросят використовується, головним чином, у синтезі простагландинів.

3. У складі ліпідів тканин після зараження сальмонельозом зменшується частка фосфоліпідів і збільшується частка вільних жирних кислот та діацилгліцеролів, у складі фосфоліпідів зменшується відносний вміст фосфатидилхоліну і фосфатидної кислоти та збільшується вміст лізофосфатидилхоліну. Жирнокислотний склад фосфоліпідів зазначених тканин поросят, хворих на сальмонельоз у порівнянні з жирнокислотним складом фосфоліпідів тканин здорових тварин характеризується меншим вмістом лінолевої і арахідонової кислот і значним зменшенням загальної кількості поліненасичених жирних кислот.

4. Інтенсивність синтезу ліпідів у слизовій 12-палої і сліпої кишок, а також у печінці хворих поросят  $[1-^{14}C]$ -ацетату знижується, а при використанні як попередника  $[2-^{14}C]$ -лейцину - зростає.

5. Система обміну циклічних нуклеотидів під впливом патогенних факторів сальмонел підлягає множинним змінам, які проявляються в зміні активності аденілат- і гуаденілатциклаз, кінетичний механізм яких обумовлений, в основному, зменшенням уявної швидкості реакції та чутливості аденілатциклазного комплексу до дії природних активаторів. Підвищення гідролізу цАМР і цГМР зумовлено активацією обох фосфодіестераз, але механізм цієї активації в тканинах печінки і слизової 12-палої кишки різний. Зміни активності ферментів метаболізму циклічних нуклеотидів приводять до збільшення внутріклітинної концентрації циклічних нуклеотидів.

6. Патогенна дія сальмонел приводить до окислювального стресу в організмі поросят, про що свідчить значна активація процесів пероксидації ліпідів та порушення корелятивного зв'язку між ферментами антирадикального захисту в еритроцитах. Розроблено методичні підходи до корекції згаданих порушень шляхом застосування профілактично-лікувальних засобів.

7. Патогенна дія сальмонел виявляється в підвищенні інтенсивності синтезу білків, збільшенні вмісту в тканинах альбумінів та зменшенні  $\gamma$ -глобулінів, різкому зниженні активності ферментів катаболізму білків.

8. У плазмі крові поросят при захворюванні їх сальмонельозом змінюється концентрація ряду метаболітів і активність ферментів білкового, ліпідного, вуглеводного і мінерального обмінних процесів.

9. Гістологічні дослідження дозволили виявити у поросят, хворих на сальмонельоз, зернисту дистрофію гепатоцитів, дистрофічні

зміни і десквамацію епітеліальних клітин, слизової 12-палої кишки, некротичні зміни в слизовій сліпої кишки.

10. Нейтралізація ентеротоксигенної дії ентеробактерій досягається пероральним введенням потенційно вакцинного бівалентного штаму *S.cholerae suis* В-9, в який клоновано плазмиду з генами синтезу В-субодиниці термолабільного токсину *E.coli*. Персистенція в організмі штаму В-9 індукуює синтез специфічних антитіл, здатних зв'язуватись із В-субодиницею ентеротоксину збудника, що блокує рецепцію токсичної молекули на ентероцитах макроорганізму.

11. Патогенна дія сальмонел на організм поросят супроводжується значними змінами в функціонуванні регуляторних систем на рівні первинних і вторинних месенджерів, що призводить до порушень на клітинному і органному рівнях та всього організму.

Висловлюю щиро подяку своєму наставнику професору В.Г.Яновичу, моїм колегам В.М.Бондаренку, С.В.Бродіну, Г.В.Дроніку, О.Я.Захаріву, Ю.В.Єзепчуку, М.В.Матузенку, Ю.М.Романовій, В.І.Силці, Т.О.Сокирко, В.Я.Шаблю за допомогу, яку вони надавали мені під час проведення досліджень та оформлення дисертаційної роботи.

#### Список робіт, опублікованих по темі дисертації.

Коррекция метаболитами трикарбонового цикла токсического воздействия инфекционного процесса в эксперименте // Фармакология и токсикология, 1985, № 21, с. 85-89. Співавт. Малюк В.І.

Метаболиты трикарбонового цикла как средство патогенетической профилактики // Пульмонология, 1987, № 8, с. 84-86. Співавт. Малюк В.І., Сокирко Т.О.

Енергетичний обмін при експериментальній гіпоксії // V Укр. біохім. з'їзд, Київ, 1987, с.87. Співавт. Туманова Т.О.

Изучение свойств *E.coli*, выделяемых при диареях поросят // Респ. конф. "Повышение эффективности материального обеспечения промышленного свиноводства", Киев, 1987, с. 60-61. Співавт. Л.В. Пархоменко, Л.В. Тимохіна.

Методические подходы к конструированию вакцины против колибактериоза // Всесоюз. конф. "Применение биотехнологий в животноводстве, растениеводстве и ветеринарной медицине", Л., 1988, с. 115-117.

Принципы конструирования вакцин против колибактериоза // Респ. конф. "Состояние и развитие биотехнологии в животноводстве", Харьков, 1988, с. 244-245.

Создание антитоксического иммунитета и профилактика колиинфекций // Всесоюз. конф. "Эпизоотология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней, общих для человека и животных", Львов, 1988, с. 367-368. Співавт. А.І. Собко.

Стимулирующий эффект ЛПС эшерихий на трансформационную активность предшественников макрофагов свиней // Там же, с. 353-354. Співавт. В.Г. Квачов.

Протективные свойства термолabileного токсина E.coli // VII Съезд микробиологов, Черновцы, 1989, с. 55-57. Співавт. В.П. Івасюк.

Роль эндотоксинов сальмонелл в нарушении обмена липидов в тканях животных // 2-я Всесоюз. конф. "Бактериальные токсины", Юрмала, 1989, с. 86.

Ідентифікація термолabileного токсину у ентеробактерій // Конф. "Біотехнологія ветеринарних препаратів", Харків, 1993, с.96.

Вміст циклічних нуклеотидів та активність циклонуклеотидзалежних протеїназ у слизовій тонкого кишечника свиней в динаміці інфекційного процесу // VI Укр. біохім. з'їзд, Київ, 1992, с. 66. Співавт. О.П. Матишевська, Л.І. Остапченко.

Вміст циклічних нуклеотидів в слизовій тонкого кишечника та печінці свиней в динаміці інфікування // Вісник Київ. Універ., сер. Біологія, 1992, с. 37-40. Співавт. О.П. Матишевська, Л.І. Остапченко.

Методические рекомендации по определению термолabileного токсина у энтеробактерий // Киев, 1993.

Методические рекомендации по оценке уровня свободнорадикального окисления в крови животных // Киев, 1993. Співавт. В.Я. Шаблій, Т.О. Сокирко.

Сальмонеллезная инфекция и особенности оксидантно-антиоксидантной системы крови // Междунар. конф. "Актуальные вопросы микробиологии, эпидемиологии, иммунологии и инфекционных болезней", Харьков, 1993, с. 56. Співавт. В.Я. Шаблій, Т.О. Сокирко, В.Н. Созонюк.

Окисления [6-C<sup>14</sup>]-глюкози, [1-C<sup>14</sup>]-арахідонової кислоти і вуглецевого ланцюга [2-C<sup>14</sup>]-лейцину в слизовій оболонці тонкого і товстого відділів кишечника поросят при гострому запаленні // Науково-техн. бюл. інституту фізіології і біохімії тварин, 1993, 15(1), с. 39-51. Співавт. С.В. Бродін.

Ліпідний склад слизової оболонки тонкої кишки поросят при гострому запаленні // Там само, 1993, 15(1), с. 43-45. Співавт. О.Я. Захарів.

Зміни інтенсивності синтезу білків і ліпідів в слизовій кишечника і печінці поросят при експериментальному сальмонельозі в умовах *in vitro* // Там само, 1993, 15(2), с. 20-22. Співавт. С.В. Бородін.

Синтез простагландинів і вміст цАМФ в слизовій 12-палі кишки і печінці поросят при експериментальному сальмонельозі // Там само, 1993, 15(2), с. 35-37. Співавт. О.Я. Захарів.

Особливості функціонування ферментів синтезу та гідролізу циклічних нуклеотидів в гомогенатах печінки та слизовій тонкого кишечника свиней в умовах зараження сальмонельозом // Вісник Київ. Універ., сер. Біологія, 1994. Співавт. Л.І. Остапченко, О.Є. Нальовіна, О.І. Долішняк.

Макро- та мікроелементи при сальмонельозі у свиней // Тваринництво України, 1994, № 4, с. 24. Співавт. Т.О. Сокирко, В.Я. Шаблій, М.В. Тибеш.

Состав фосфолипидов слизистой кишечника и печени свиней // Сборник "Актуальные проблемы ветеринарной медицины в новых хозяйственно-экономических условиях ведения животноводства", Харьков, 1994, с. 34. Співавт. О.Я. Захарів, Т.О. Сокирко.

Процессы ПОЛ и антиоксидантной защиты в крови при моделировании сальмонеллёза у свиней // Там само, с. 36. Співавт. Т.О. Сокирко.

Профилактика сальмонеллёза в свиноводческих хозяйствах // Там само, с. 14. Співавт. Н.В. Матузенко, А.А. Кучерявенко.

Протективна активність та імуногенність потенційно вакцинного маркерного бівалентного штаму *S. cholerae suis* В-9 // Вісник аграрної науки, 1994, № 5, с. 78-84. Співавт. Д.А. Євтушенко, Н.В. Матузенко, В.М. Бондаренко, Ю.В. Єзепчук, Ю.М. Романова, С.Є. Воронов.

Влияние сальмонеллезной инфекции на уровень метаболитов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов крови поросят // Сборник научных трудов, Витебск, 1994, с. 33-34. Співавт. Т.О. Сокирко.

Особенности функционирования аденилатциклазной системы в тонком кишечнике поросят при экспериментальном сальмонеллёзе // Сборник научных трудов, Витебск, 1994, с. 59-60. Співавт. Л.І. Остапченко.



la 422-100.

AB 30.539

**AB 30.539**