

УДК 619:636.1:591.478:577.175.1:616-097

АКТИВНІСТЬ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ТА ВМІСТ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ В КОПИТНІЙ ДЕРМІ ЗА ХРОНІЧНИХ ЛАМІНІТІВ У КОНЕЙ

А. Лазоренко¹, М. Брошков², І. Бондаренко².

¹Сумський національний аграрний університет, ²Одеський державний аграрний університет;

Ламініт у коней є складним, поширеним та часто рецидивуючим захворюванням, що характеризуються порушенням прикріплення епідермоцитів епідермальних ламел до основної мембрани дермальних пластинок, незважаючи на різноманітність причин, що викликають захворювання

Механізми, залучені в патогенез ламініту, до кінця не з'ясовані і, швидше за все, є численними та взаємопов'язаними.

Метою наших досліджень було визначити активність лактатдегідрогенази як індикаторного ензиму енергетичного обміну та гліколізу, а також концентрацію церулоплазміну як реактанту запальної реакції у основі шкіри копит коней за гострих пододерматитів і хронічних ламінітів.

Встановлено, що в умовах запального процесу в копитній дермі, спостерігається істотне зростання активності лактатдегідрогенази, очевидно, через розвиток лактоацидозу, енергоцефіциту, порушення гліколітичних процесів та тканинної метаболічної адаптації. Дослідження дермальної концентрації церулоплазміну за гострого пододермату та хронічного ламініту, є інформативним біоіндикатором оцінки інтенсивності запалення.

Ключові слова: *коні, ламініт, пододерматит, лактатдегідрогеназа, церулоплазмін.*

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ, АНАЛІЗ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ.

Ламініт у коней є складним, поширеним та часто рецидивуючим захворюванням, що характеризуються порушенням прикріплення епідермоцитів епідермальних ламел до основної мембрани дермальних пластинок, незважаючи на різноманітність причин, що викликають захворювання [1,2].

Виникнення ламінітів відбувається за дії низки чисельних етіологічних та сприяючих факторів, що передусім пов'язано з порушенням умов годівлі, утримання та експлуатації коней [3].

За даними Eustace, and Cripps, 1999, серед загального числа ламінітів у коней майже 67,6-70% випадків зумовлено аліментарними чинниками з розвитком супутніх метаболічних розладів [4].

Серед аліментарних факторів, що ініціюють порушення обміну речовин й розвиток ламінітів у коней головними вважаються надлишок розчинних неструктурованих вуглеводів у раціоні, що спостерігається при згодовуванні

великої кількості концентрованих зернових кормів із значним умістом крохмалю та фруктану в складі свіжої трав'яної маси та концентратів [5-8].

Надлишок неструктурованих депонованих у зерні або траві вуглеводів у незміненому вигляді потрапляє до товстого кишечника де вони зазнають ферментації мікрофлорою з утворенням великої кількості летких жирних кислот, токсичних метаболітів і бактеріальних токсинів, що потрапляють до загального кровообігу та викликають пошкодження листочків копитної дерми яка є надзвичайно чутливою до дії подразників екзо- та ендогенного походження [48, 9-11].

Дослідження проведені Pollitt, and Davies, 1998, свідчать, що одним із головних індукторів ламініту за вуглеводного перевантаження в коней є розвиток метаболічного лактоацидозу з накопичення D-лактату, концентрація якого в крові корелює з тяжкістю запального процесу в копитній дермі [12]. Експериментально було встановлено, що клінічна маніфестація ламініту після згодовування надлишку фруктану спостерігається вже в перші 18-24 години, що співпадає за часом з максимальною продукцією D-лактату в сліпій кишці коней та появою типових ультраструктурних змін листочків копитної дерми [13-15].

Ферментація вуглеводів у сліпій кишці коней, за надмірного їх надходження з раціоном, окрім накопичення органічних кислот, призводить й до бурхливого розмноження мікроорганізмів із утворенням бактеріальних токсинів та вазоактивних амінів, які безпосередньо здатні викликати пошкодження основи шкіри копита [12,14,15].

Ферментація вуглеводів у сліпій кишці коней, за надмірного їх надходження з раціоном, окрім накопичення органічних кислот, призводить й до бурхливого розмноження мікроорганізмів із утворенням бактеріальних токсинів та вазоактивних амінів, які безпосередньо здатні викликати пошкодження основи шкіри копита [16-18].

Пошкодження ендотоксинами бактерій, що містяться в товстому кишечнику, листочків основи шкіри за вуглевод-залежної ініціації ламініту реалізується через низку патогенетичних ефектів – розвиток ішемічних змін копитної дерми, гіперпродукція біогенних амінів, дисфункція ендотелію судин, підвищення концентрації інформаційної РНК прозапальних цитокінів, експресії циклооксигенази, порушення регуляції молекул епітеліальної адгезії, виникнення лактоацидозу та надмірна активація протеїназ [17-20].

Механізми, залучені в патогенез ламініту, до кінця не з'ясовані і, швидше за все, є численними та взаємопов'язаними.

МЕТА ДОСЛІДЖЕНЬ.

Метою наших досліджень було визначити активність лактатдегідрогенази (LDH) як індикаторного ензиму енергетичного обміну та гліколізу, а також концентрацію церулоплазміну (ЦП) як реактанту запальної реакції у основи шкіри копит коней за гострих пододерматитів і хронічних ламінітів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Матеріалом для досліджень були ділянки ламелярної та сосочкової основи шкіри копит коней без ортопедичної патології ($n=12$), із гострим асептичним пододерматитом ($n=10$) та хронічним ламінітом ($n=8$).

Фрагменти зразків основи шкіри (2-4 г вологої тканини), що були відібрані після загибелі тварин, відмивали у 0,9% розчині натрію хлориду, гомогенізували на холоді у PBS буфері (pH 7,4), з 1% розчином тритону X-100 у співвідношенні 1:40 та залишали при $+4^{\circ}\text{C}$ на 2 години, надалі гомогенат тканин центрифугували при 3000 об/хв. протягом 15 хв. після чого супернатант піддавали кріоконсервації в пластикових мікропробірках типу Eppendorf при -20°C (Lazorenko, and Izdepskyi, 2012), [22].

В отриманих гомогенатах копитної дерми визначали активність LDH у реакції з 2,4-динітрофенілгідразином за методом Севела-Товарека згідно інструкції до діагностичного набору реактивів («ЛДГ» АФ 004-01) виробництва ПрАТ «Реагент», м. Дніпро, Україна, з наступною фотометрією на ФЕК за довжини хвилі 540 нм та концентрацію ЦП в тесті з окисленням *p*-фенілендіаміну з наступною зупинкою ферментативної реакції фтористим натрієм і фотометрією на ФЕК з довжиною оптичного шляху 10 мм із світлофільтром у 540 нм (Ragan, et al., 1969), [21].

Активність LDH та вміст ЦП у тканинних зразках дермальних гомогенатів розраховували з урахуванням співвідношення (тканина–PBS буфер, 1:40).

Отриманий цифровий матеріал оброблено методами варіаційної статистики з використанням параметричного *t*-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з даних наведених у таблиці, за гострого пододерматиту активність LDH в гомогенатах основи шкіри зростає на 77,6% ($p<0,001$), тоді як за хронічного ламініту зростання було менш виразним і склало 34,9 ($p<0,001$). Зростання активності LDH в копитній дермі за гострої запальної реакції при пододерматиті, перевищувало показник хронічного запалення на 31,7% ($p<0,001$).

Зростання тканинної активності LDH може, бути зумовлене дефіцитом або резистентністю до інсуліну та збільшеним утворенням NADH, який разом із надмірною продукцією ацетил-КоА може інгібувати активність піруватдегідрогеназного комплексу [23].

Відомо, що основа шкіри копит коней для підтримання метаболізму поглинає велику кількість глюкози через GLUT 1 залежний шлях транспорту, тоді як інкубація експлантатів копитної дерми за відсутності глюкози або у присутності інгібітору її поглинання, швидко призводить до некрозу листочків та руйнації дермо-епідермального з'єднання [24, 25].

За умов інсулін-резистентності основа шкіри втрачає здатність поглинати глюкозу, через блокаду як інсулін-залежного, так і GLUT 1 опосередкованого

механізму транспорту глюкози в клітини, з наступним розвитком ламініту [25, 26].

Таким чином, в умовах запального процесу в копитній дермі, спостерігається істотне зростання активності LDH, очевидно, через розвиток лактоацидозу, енергодефіциту, порушення гліколітичних процесів та тканинної метаболічної адаптації.

Таблиця

Активність лактатдегідрогенази та вміст церулоплазміну в копитній дермі коней за гострих асептичних пододерматитів та хронічних ламінітів

Показник		Клінічно здорові, (n=12)	Гострий пододерматит, (n=10)	Хронічний ламініт, (n=8)
LDH, Од/л	M±m	105280,0±8585,0	187000,0±13580,0 <i>p<0,001</i>	141988,0±7264,0 <i>p<0,001</i>
	lim	70600,0-145400,0	130600,20-247080,0	111280,0-165280,0
ЦП, мг/мл	M±m	539,67±50,28	1470,0±91,12 <i>p<0,001</i>	853,23±90,02 <i>p<0,05</i>
	lim	350,0-875,2	1050,0-1925,0	525,20-1225,0

Примітка. *p* – порівняно з клінічно здоровими.

У коней, з порушеним вуглеводним обміном, виникає ламініт через зміни рН сліпої кишки та мікробіоти, що супроводжується збільшенням трансмурального поглинання вмісту кишечника, включаючи бактеріальні токсини. У відповідь на надходження токсичних продуктів у печінці відбувається реактивний синтез глобулінів, відомих як білки гострої фази [27]. Швидкість синтезу деяких протеїнів гострої фази, і зокрема, церулоплазміну, пов'язується з розвитком клінічних ознак ламініту і зазвичай відображає незворотні зміни в ламінарній тканині [28-30].

В наших дослідженнях тканинна концентрація ЦП, відносно референсних значень за гострого пододерматиту досягає максимальних значень, зростаючи майже у 2,7 рази, (*p<0,001*), тоді як за хронічного ламініту це зростання склало 58,0%. Зростання вмісту ЦП в копитній дермі за гострої запальної реакції при пододерматиті, перевищувало показник хронічного запалення у 1,7 рази (*p<0,001*).

Відомо, що ЦП відіграє важливу роль у метаболізмі та транспортуванні міді, а його підвищення пов'язане зі збільшенням активних форм кисню, що утворюються під час запалення [27]. Окислювальний стрес безпосередньо пов'язаний з патогенезом ламінарних уражень, особливо під час сепсису або у разі використання моделі гіперінсулінемії для індукції ламініту [31,32]. Таким

чином, дослідження дермальної концентрації ЦП за гострого пододермату та хронічного ламініту, є інформативним біоіндикатором оцінки інтенсивності запалення.

ВИСНОВКИ

1. Активність лактатдегідрогенази в гомогенатах копитної дерми коней за гострого пододерматиту та хронічного ламініту зростає до $187000,0 \pm 13580,0$ Од/л і $141988,0 \pm 7264,0$ Од/л, проти $105280,0 \pm 8585,0$ Од/л у клінічно здорових тварин, відповідно.

2. Концентрація церулоплазміну в гомогенатах копитної дерми коней за гострого пододерматиту та хронічного ламініту зростає до $1470,0 \pm 91,12$ мг/мл і $853,23 \pm 90,02$ мг/мл, проти $539,67 \pm 50,28$ мг/мл у клінічно здорових тварин, відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mitchell, C., Fugler, L.A., Eades, S. (2014). The management of equine acute laminitis. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 2015:6, 39–47. doi: 10.2147/VMRR.S39967.
2. Orsini, J.A. (2014). Science-in-brief: Equine laminitis research: milestones and goals. *Equine Vet. J.*, 46(5), 529–33. doi: 10.1111/evj.12301.
3. Yang, Q., Lopez M.J. (2021). The Equine Hoof: Laminitis, Progenitor (Stem) Cells, and Therapy Development. *Toxicol Pathol*, 49(7), 1294–1307. doi: 10.1177/0192623319880469.
4. Eustace, R.A., Cripps, P.J. (1999). Factors involved in the prognosis of laminitis in the UK. *Equine vet. J.*, 31(5), 433–442.
5. Alford, P., Geller, S., Richardson, B. (2001). A multicenter, matched case-control study of risk factors for equine laminitis. *Prev. Vet. Med*, 49, 209–222.
6. Bailey, S.R., Menzies-Gow, N.J., Harris, P.A. (2007). Effect of dietary fructans and dexamethasone administration on the insulin response of ponies predisposed to laminitis. *JAVMA*, 231, 1365–1373.
7. Harris, P., Bailey, S.R., Elliot, J.P. (2006). Countermeasures for pasture associated laminitis in ponies and in horses. *J. Nutr*, 136, 2114–2121.
8. Longland, A.C., Byrd, B.M. (2006). Pasture nonstructural carbohydrates and equine laminitis. *J. Nutr*, 136, 2099–2102.
9. Van Eps, A.W., Pollitt, C.C. (2006). Equine laminitis induced with oligofructose. *Equine vet. J.*, 38, 203–208.
10. de Laat, M.A., McGowan, C.M., Sillence, M.N., Pollitt, C.C. (2010). Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Vet J*, 42(2), 129–135.
11. Pollitt, C.C., Visser, M.B., Visser, M.B. (2010). Carbohydrate alimentary overload laminitis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 26(1), 65–78.
12. Pollitt, C.C., Davies, C.T. (1998). Equine laminitis: its development post alimentary carbohydrate overload coincides with increased sublamellar blood flow. *Equine vet. J.* 26, 125–132.

13. French, K.R., Pollitt, C.C. (2004). Equine laminitis: loss of hemidesmosome ultrastructure correlates to dose in an oligofructose induction model. *Equine vet. J.*, 36, 230–235.
14. Milinovich, G.J., Trott, D.J., Burrell, P.C. (2006). Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environ. Microbiol.*, 8, 885–898.
15. Nourian, A.R., Baldwin, G.I., Van Eps, A.W. (2007). Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24–30 hours after induction with oligofructose. *Equine vet. J.*, 39, 360–364.
16. Zerpa, H., Vega, F., Vasquez, J. (2005). Effect of acute sublethal endotoxaemia on in vitro digital vascular reactivity in horses. *J. Vet. Med. a Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 52, 67–73.
17. Bailey, S.R., Baillon, M.L., Rycroft, A.N. (2003). Identification of equine cecal bacteria producing amines in an in vitro model of carbohydrate overload. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2087–2093.
18. Al Jassim, R.A., Scott, P.T., Trebbin, A.L. (2005). The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.*, 248, 75–81.
19. Belknap, J.K., Black, S.J. (2012). Sepsis-related laminitis. *Equine Vet J.*, 44(6):738–740.
20. Kyaw-Tanner, M.C., Pollitt, C.C. (2004). Equine laminitis: increased transcription of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) occurs during the developmental phase. 36, 221–225.
21. Ragan, H.A., Nacht, S., Lee, G.R., Bishop, C.R., Cartwright, G.E. (1969). Effect of ceruloplasmin on plasma iron in copper deficit swine. *Amer. J. Physiology*, 217, 5, 1320–1323. doi: 10.1152/ajplegacy.1969.217.5.1320.
22. Lazorenko, A.B., Izdepskyi, V.Y. (2012). Rol faktorů nekrozu pukhlyn ta modyfikovanoho tsytrulinovanoho vimentynu v rozvytku imunozelezhnoho zapalennia spoluchnotkanyynykh utvoren kopyt u konei [Tumor necrosis factor and the modified citrullinated vimentin in developing immunodependent inflammation of connective tissue formations of the horses' hoofs]. *Vet. medytsyna Ukrainy*, 1, 27–29 [in Ukrainian].
23. Шатинська, О.А., Іскра, Р.Я., Сварчевська, О.З. (2017). Активність ензимів вуглеводного обміну у м'язовій тканині щурів із експериментальним цукровим діабетом за комплексної дії цитратів магнію і хрому. *Біологічні системи*, 9(1), 23–27.
24. Wattle, O.A., Pollitt, C.C. (2004). Lamellar metabolism. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 13, 22–33.
25. Asplin, K.E., Curlewis, J.D., McGowan, C.M. (2011). Glucose transport in the equine hoof. *Equine vet. J.*, 43, 196–201.
26. Treiber, K.H., Kronfeld, D.S., Geor, R.J. (2006). Insulin resistance in equids: possible role in laminitis. *J. Nutr.*, 136, 2094–2098.

27. Peixoto Rabelo, Barroco de Paula, Carvalho Bustamante, Santana, Gomes da Silva, Baldassi, Canola and Araújo Valadão. (2023). Acute phase proteins levels in horses, after a single carbohydrate overload, associated with cecal alkalization. *Front Vet Sci*, 2(10), 1–11. doi: 10.3389/fvets.2023.1043656.
28. van Eps, A.W. General clinical aspects of the laminitis case. In: Belknap JK, Geor, R., editors. *Equine Laminitis*. (2016). Oxford: Wiley-Blackwell 183–190. doi: 10.1002/9781119169239.ch21.
29. Fagliari, J.J., McClenahan, D., Evanson, O.A., Weiss, D.J. (1998). Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *Am J Vet Res*, 10, 1234–1237.
30. Leise, B. (2018). The role of neutrophils in equine laminitis. *Cell Tissue Res*, 3, 541–550. doi: 10.1007/s00441-018-2788-z.
31. Laskoski, L.M., Dittrich, R.L., Valadão, C.A., Brum, J.S., Brandão, Y., Brito, H.F. (2016). Oxidative stress in hoof laminar tissue of horses with lethal gastrointestinal diseases. *Vet Immunol Immunopathol*, 171, 66–72. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.00841.
32. McGowan, C., Patterson-Kane, J. (2016). Experimental models of laminitis: Hyperinsulinemia. In: Belknap, J.K., Geor, R., editors. *Equine Laminitis*. Oxford: Wiley-Blackwell, 68–74. doi: 10.1002/9781119169239.ch10

ACTIVITY OF LACTATE DEHYDROGENASE AND CONTENT OF CERULOPLASMIN IN HOOF DERMIS WITH CHRONIC LAMINITIS IN HORSES

A. Lazorenko¹, M. Broshkov², I. Bondarenko².

¹ Sumy National Agrarian University, ² Odesa State Agrarian University;

Laminitis in horses is a complex, widespread and often relapsing disease characterized by a violation of the attachment of epidermocytes of the epidermal lamellae to the main membrane of the dermal plates, despite the variety of causes that cause the disease.

The mechanisms involved in the pathogenesis of laminitis are not fully understood and, most likely, are numerous and interrelated.

The aim of our research was to determine the activity of lactate dehydrogenase as an indicator enzyme of energy metabolism and glycolysis, as well as the concentration of ceruloplasmin as a reactant of the inflammatory reaction in the base of the skin of the hooves of horses with acute pododermatitis and chronic laminitis.

It was established that in the conditions of the inflammatory process in the hoof dermis, a significant increase in the activity of lactate dehydrogenase is observed, apparently due to the development of lactic acidosis, energy deficiency, disruption of glycolytic processes and tissue metabolic adaptation. The study of the dermal

concentration of ceruloplasmin in acute pododerma and chronic laminitis is an informative bioindicator for assessing the intensity of inflammation.

Key words: horses, laminitis, pododermatitis, lactate dehydrogenase, ceruloplasmin.