

ЗМІНИ РІВНІВ АУТОАНТИТІЛ ДО КЛІТИННИХ ФОСФОЛІПІДІВ, ЦИТОПЛАЗМИ НЕЙТРОФІЛІВ ТА НУКЛЕАРНИХ АНТИГЕНІВ ЗА ХРОНІЧНОГО ЛАМІНІТУ В КОНЕЙ

Лазоренко Андрій Борисович

кандидат ветеринарних наук

Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна

ORCID: 0000-0002-0916-3901

Lazorenkoandrej@gmail.com

Бондаренко Ірина Вікторівна

кандидат ветеринарних наук

Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна

ORCID :0000-0002-1019-3446

bondarenkoirina173@gmail.com

Мусієнко Юрій Володимирович

кандидат ветеринарних наук

Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна

ORCID: 0000-0002-9735-4758

musik_ne@ukr.net

Патогенетичні механізми, що беруть участь у виникненні ламініту відрізняються на основі теорій, які ґрунтуються на запальних, судинних, ферментативних, метаболічних або травматичних факторах. Стосовно двох механізмів, які в минулому користувалися великою прихильністю, тобто запалення та дисфункції пальцевих судин, точаться дискусії щодо того, який є основним або вони є взаємозалежні та мають одночасний початок, маючи на увазі, що мікроциркуляція в дистальній фаланзі завжди відіграє вирішальну роль в ініціації ламініту.

Згідно останніх досліджень за хронічного ламініту, в окремих гіперреактивних ділянках дермальних ламел, відбуваються епізоди субклінічного перебігу та загострень, після впливу антигенної стимуляції від вакцинацій або алергенів навколишнього середовища, а також, аутоімунними компонентами запальної реакції, що посилює індукцію хемокінів для нейтрофілів, чим пролонгує запалення та імунологічну гіперреактивність.

Метою наших досліджень було визначити рівні аутоантитіл до фосфоліпідів, дезоксирибонуклеїнової кислоти, цитоплазми нейтрофілів, як маркерів хронічного імунозалежного запалення сполучної тканини та мікроциркуляторного русла в сироватці крові та гомогенатах основи шкіри копита за гострих пододерматитів і хронічних ламінітів.

Матеріалом для досліджень була сироватка крові, а також фрагменти листочкової та сосочкової основи шкіри копит коней без ортопедичної патології, із гострим асептичним пододерматитом та хронічним ламінітом.

З метою збільшення інформативності, кров для дослідження відбирали з регіонарних вен відповідних кінцівок – підшкірна вена передпліччя (грудна кінцівка) та підшкірна вена гомілки (тазова кінцівка).

Наважки зразків копитної дерми відмивали у фізіологічному розчині, гомогенізували на холоді у PBS буфері (рН 7,4), з 1% розчином тритону X-100 у співвідношенні 1:40 та залишали при +4°C на 2 години, надалі гомогенат тканин центрифугували при 3000 об/хв. протягом 15 хв. після чого надосадову рідину піддавали криоконсервації.

В сироватці крові та гомогенатах копитної дерми визначали рівень антифосфоліпідних антитіл класів APHL IgG, APHL IgM методом твердо фазного імуноферментного ELISA аналізу, аутоантитіл до нативної, двохланцюгової дезоксирибонуклеїнової кислоти (dsDNA) та аутоантитіл до одностанцюгової, денатурованої дезоксирибонуклеїнової кислоти (ssDNA), а також антицитоплазматичних антитіл до нейтрофілів (ANCA) – автоматизованим імуноферментативним методом ELIA Phadia.

Уміст аутоантитіл до APHL, dsDNA, ssDNA та sANCA у тканинних зразках гомогенатів дерми копита розраховували з урахуванням співвідношення (тканина–PBS буфер).

Встановлено, що а хронічного ламініту в коней рівень APHL класів IgM зростає в сироватці крові та гомогенатах копитної дерми до $5,43 \pm 0,70$ IU/ml та $33,95 \pm 7,63$ IU/ml, відповідно, а для класу IgG до $9,43 \pm 1,22$ IU/ml в сироватці крові та до $77,50 \pm 10,06$ IU/ml.

Рівень аутоантитіл до dsDNA та ssDNA в сироватці крові коней з хронічним ламінітом підвищується до значень $20,18 \pm 1,92$ IU/ml і $19,55 \pm 2,66$ IU/ml, проти $5,68 \pm 0,82$ IU/ml і $5,19$ IU/ml у клінічно здорових тварин, відповідно.

Концентрація аутоантитіл до dsDNA та ssDNA в гомогенатах копитної дерми коней за хронічного ламініту зростає до $270,0 \pm 25,11$ IU/ml і $305,50 \pm 26,48$ IU/ml, проти $78,80 \pm 14,21$ IU/ml і $68,80 \pm 12,22$ IU/ml у клінічно здорових тварин, відповідно.

Сироваткові антицитоплазматичні антитіла ANCA, у клінічно здорових коней не виявлялися у 100% тварин, тоді як за гострого пододерматиту позитивна реакція виявлена в 20%, а за хронічного ламініту в 62,5% випадків.

Перспективою подальших досліджень, є дослідження функціонування імунної системи та патогенетичних механізмів формування імунозалежного запалення за хронічних ламінітів у коней.

Ключові слова: APHL IgM, APHL IgG, dsDNA, ssDNA, ANCA, сироватка крові, копитна дерма, ламініт, коні.

DOI <https://doi.org/10.32782/bsnau.vet.2023.1.9>

Вступ. Ламініт, як дифузне асептичне запалення основи шкіри стінок і підшви копит із прогресуючою руйнацією дермо-епідермального з'єднання та втратою фіксації копитної кістки, через низку складних патогенетичних механізмів, призводить до істотних патоморфологічних змін та функціональних розладів усіх анатомічних елементів копита (French, 2004).

Ключовою патогенетичною ланкою ламініту в коней є дезорганізація базальної мембрани (lamina densa), що міцно з'єднує між собою дермальні та епідермальні ламели (листочки) шкіри копита, формуючи ламінарний фіксуючий апарат для дистальної фаланги (Pollitt, 1994; Pollitt and Daradka, 1998; Morgan, et al., 1999).

Патогенетичні механізми, що беруть участь у виникненні ламініту відрізняються на основі теорій, які ґрунтуються на запальних, судинних, ферментативних, метаболічних або травматичних факторах. Стосовно двох механізмів, які в минулому користувалися великою прихильністю, тобто запалення та дисфункції пальцевих судин, точаться дискусії щодо того, який є основним або вони є взаємозалежні та мають одночасний початок, маючи на увазі, що мікроциркуляція в дистальній фаланзі завжди відіграє вирішальну роль в ініціації ламініту (Baxter, 1999; Johnson, et al., 2010).

За даними (Moore, 2020), близько 75% випадків гострого ламініту набуває хронічної форми перебігу захворювання, в результаті чого більшість уражених коней залишаються постійно кульгаючими.

Декілька досліджень патофізіології хронічного ламініту стосуються змін у морфології листочків копитної дерми, метаболізмі та експресії генів у хворих коней (Faleiros, et al., 2004; Johnson, et al., 2004; Kuwano, et al., 2005; Carter, et al., 2011).

Wagner, et al., 2003, виявили, що в коней з хронічним ламінітом спостігається надмірна дермальна запальна реакція на панель алергенів, що свідчить про невідповідно істотну активацію системної імунної відповіді.

Незважаючи на інтенсивні спроби зрозуміти першопричину гострого ламініту, значно менше уваги приділяється патофізіології хронічного ламініту а, ці дослідження є єдиними опублікованими звітами, що описують основні наукові дослідження хронічного ламініту (Steelman, and Chowdhary, 2012).

Згідно останніх досліджень Lecchi, et al., 2018; Marcato, et al., 2022, за хронічного ламініту, в окремих гіперреактивних ділянках дермальних ламел, відбуваються епізоди субклінічного перебігу та загострень, після впливу антигенної стимуляції від вакцинацій або алергенів навколишнього середовища, а також, аутоімунними компонентами запальної реакції, що посилює індукцію хемокінів для нейтрофілів, чим пролонгує запалення та імунологічну гіперреактивність.

Окрім цього, в дослідженнях Steelman, and Chowdhary, 2012, показано істотну зміну протеома плазми крові коней з хронічним ламінітом і, зокрема, зростання рівня аполіпопротеїду А-IV, експресії білків комплементу, коагуляції та кініногенезу, що на думку авторів пов'язано з загальносистемними змінами в імунній функції.

Дослідження проведені Lazorenko, and Izdepskyi, 2012 свідчать, що за хронічного ламініту спостерігається пролонгація експресії прозапальних цитокінів та накопичення у дермальних ламелах маркерів апоптозу макрофагів і фібробластів – модифікованого цитрулінованого віментину (Sa-антиген) та аутоантитіл до нього, що пролонгує запальну реакцію та модулює її за імунозалежним типом.

Мета досліджень. Метою наших досліджень було визначити рівні аутоантитіл до фосфоліпідів, дезоксирибонуклеїнової кислоти, цитоплазми нейтрофілів, як маркерів хронічного імунозалежного запалення сполучної тканини та мікроциркуляторного русла в сироватці крові та гомогенатах основи шкіри копита за гострих пододерматитів і хронічних ламінітів.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для досліджень була сироватка крові, а також фрагменти листочкової та сосочкової основи шкіри копит коней без ортопедичної патології (n=10), із гострим асептичним пододерматитом (n=10) та хронічним ламінітом (n=8).

З метою збільшення інформативності, кров для дослідження відбирали з регіонарних вен відповідних кінцівок – підшкірна вена передпліччя (грудна кінцівка) та підшкірна вена гомілки (тазова кінцівка).

Наважки зразків копитної дерми по 2-3г, які були відібрані після забою тварин, відмивали у фізіологічному розчині, гомогенізували на холоді у PBS буфері (pH 7,4), з 1% розчином тритону X-100 у співвідношенні 1:40 та залишали при +4°C на 2 години, надалі гомогенат тканин центрифугували при 3000 об/хв. протягом 15 хв. після чого надосадову рідину піддавали кріоконсервації в пластикових мікропробірках при -20°C (Lazorenko, and Izdepskyi, 2012).

В сироватці крові та гомогенатах копитної дерми визначали рівень антифосфоліпідних антитіл класів APHL IgG, APHL IgM методом твердо фазного імуноферментного ELISA аналізу, аутоантитіл до нативної, двохланцюгової дезоксирибонуклеїнової кислоти (dsDNA) та аутоантитіл до одностанцюгової, денатурованої дезоксирибонуклеїнової кислоти (ssDNA), а також антицитоплазматичних антитіл до нейтрофілів (ANCA) – автоматизованим імуноферментативним методом ELIA Phadia.

Уміст аутоантитіл до APHL, dsDNA, ssDNA та cANCA у тканинних зразках гомогенатів дерми копита розраховували з урахуванням співвідношення (тканина–PBS буфер).

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

Результати досліджень. Як видно з даних, наведених у таблиці 1, рівень APHL IgG і APHL IgM у сироватці крові коней із хронічним ламінітом зростає майже в 2,9 та 5,4 рази ($p < 0,001$), порівняно з клінічно здоровими тваринами, тоді як за гострого пододерматиту лише проявляє тенденцію до зростання, істотно не відрізняючись від референсних значень.

Вміст аутоантитіл до APHL (IgG, IgM), dsDNA та ssDNA в сироватці крові коней за гострих асептичних пододерматитів та хронічних ламінітів

Показник		Клінічно здорові, (n=10)	Гострий пододерматит, (n=10)	Хронічний ламініт, (n=8)
APHL, IgG, IU/ml	M±m	3,30±0,63	3,44±0,42	9,43±1,22 <i>p</i> <0,001
	lim	1,30-7,50	1,20-5,40	4,60-14,6
APHL, IgM, IU/ml	M±m	1,27±0,30	1,71±0,28	5,43±0,70 <i>p</i> <0,001
	lim	0,3-3,2	0,6-3,20	2,6-8,1
Антитіла до dsDNA, IU/ml	M±m	5,68±0,82	9,12±1,07 <i>p</i> <0,01	20,18±1,92 <i>p</i> <0,001
	lim	2,50-10,10	3,90-14,3	12,90-30,10
Антитіла до ssDNA, IU/ml	M±m	5,19±0,71	6,44±0,86	19,55±2,66 <i>p</i> <0,001
	lim	2,50-10,20	3,20-12,30	9,60-30,50

Примітка. *p* – порівняно з клінічно здоровими.

Концентрація APHL IgG і APHL IgM у гомогенатах копитної дерми за хронічного ламініту мала подібне спрямування до сироваткових значень, зростаючи відносно показника інтактних коней в 2,9 (*p*<0,002) та 2,8 (*p*<0,001) рази, відповідно. Водночас, перебіг гострого пододерматиту в коней, не супроводжувався істотним зростанням рівнів APHL IgG і APHL IgM, (1,2 та 1,1 рази, відповідно), що не мало статистично значимої різниці порівняно з показником клінічно здорових тварин, (табл.2).

Рівень аутоантитіл до dsDNA в сироватці крові коней із гострим пододерматитом зростає, відносно клінічно здорових тварин у 1,6 рази (*p*<0,01) а до ssDNA лише в 1,2 рази, без статистично вірогідної різниці відповідно.

Щодо тканинної концентрації аутоантитіл до dsDNA та ssDNA за гострого запалення дерми підошви, то показник лише мав тенденцію до зростання без вірогідної різниці порівняно з інтактними тваринами, зростаючи в 1,4 і 1,1 рази, відповідно.

Водночас, сироватковий рівень аутоантитіл до dsDNA та ssDNA за хронічного ламініту зазнає істотного

зростання майже в 3,6 та 3,8 рази (*p*<0,001), відносно показника клінічно здорових коней. Подібне спрямування мали й тканинні рівні аутоантитіл для обох типів DNA. Зокрема, для dsDNA це зростання в копитній дермі склало 3,4 рази (*p*<0,001), а для ssDNA – 4,4 рази (*p*<0,001), відповідно.

Відносно, рівнів ANCA, слід відмітити, що у клінічно здорових коней вони були відсутні в сироватці крові у 100% досліджуваних, тоді як за гострого пододерматиту позитивну реакцію виявлено в 20% а за хронічного перебігу в переважній більшості тварин – 62,5%.

Таким чином, за хронічного ламініту в коней, відбуваються істотні зміни в функціонуванні імунної системи, що пролонгує запальну реакцію та поглиблює структурні зміни в сполучнотканинному матриксі копитної дерми, тоді як за гострого асептичного пододерматиту, ці зміни є помірно вираженими, мають тенденційне спрямування і, очевидно, не відіграють ключової ролі в патогенетичних ланках гострого запалення.

Обговорення. Характерними імунобіологічними аспектами хронічного ламініту в коней є істотне

Таблиця 2

Вміст аутоантитіл до APHL (IgG, IgM), dsDNA та ssDNA в копитній дермі коней за гострих асептичних пододерматитів та хронічних ламінітів

Показник		Клінічно здорові, (n=10)	Гострий пододерматит, (n=10)	Хронічний ламініт, (n=8)
APHL, IgG, IU/ml	M±m	26,96±8,52	31,36±8,74	77,50±10,06 <i>p</i> <0,002
	lim	2,40-84,0	3,20-92,0	36,0-124,0
APHL, IgM, IU/ml	M±m	12,24±5,36	13,28±5,53	33,95±7,63 <i>p</i> <0,001
	lim	0,80-48,0	1,20-28,0	3,6-60
Антитіла до dsDNA, IU/ml	M±m	78,80±14,21	110,0±18,59	270,0±25,11 <i>p</i> <0,001
	lim	24,0-144,0	36,0-204,0	192,0-404,0
Антитіла до ssDNA, IU/ml	M±m	68,80±12,22	77,60±11,14	305,50±26,48 <i>p</i> <0,001
	lim	28,0-136,0	32,0-136,0	180,0-416,0

Примітка. *p* – порівняно з клінічно здоровими.

зростання рівнів APHL типів IgG і IgM, антитіл до нативної та денатурованої DNA, а також позитивна реакція більшості тварин на антицитоплазматичні антитіла до нейтрофілів (cANCA).

Антифосфоліпідні аутоантитіла (APHL) являють собою гетерогенну групу класів IgM, IgG виробляються проти антигенів структурних компонентів клітинної мембрани – фосфоліпідів (кардіоліпіну, фосфатидилсерину, фосфатидилінозиту, фосфатидної кислоти), зв'язуючись з якими у присутності бета-2-глікопротеїну, призводять до порушення синтезу ендотеліоцитами простагландинів і тромбоксану та функції тромбоцитів із змінами їх здатності до агрегації, активуючи процеси зсідання крові, що може призвести до утворення тромбів (Miyakis, et al., 2006; Ortel, 2012; Merashli, et al., 2017).

Результати проведених досліджень, виявили істотне зростання рівня APHL за хронічного ламініту, як в сироватці крові, так і в копитній дермі, що, очевидно поглиблює перебіг запальної реакції та ішемічні зміни дермальних ламел.

Слід відмітити, що за хронічного ламініту, поряд із зростанням рівня APHL, копитна дерма втрачає фосфоліпідні та тригліцеридні ліпідні комплекси, рівень яких істотно знижується порівняно із клінічно здоровими кінями, тоді як за гострого запалення їх вміст, навпаки, зростає.

Зокрема, за результатами атомно-адсорбційної мас-спектрометрії копитної дерми коней при хронічному ламініті, відмічається зростання піків квазімолекулярних іонів фосфорилхоліну (m/z 184), холестеролу (m/z 370), залишків пальмітинової кислоти (m/z 551), пальмітинової та олеїнової кислот (m/z 578), олеїнової та стеаринової кислот (m/z 606), проте за гострого запалення зазначені піки істотно перевищують (Lazorenko, 2011).

Подібна тенденція, може бути визначена як посилення елімінації фосфоліпідних комплексів за дії APHL в умовах хронічного ламініту та відсутності антифосфоліпідного пресингу при гострому пододерматиті.

В процесі розвитку багатьох патологічних станів відбувається сенсibiliзація лімфоцитів до власних білків організму та синтез аутоантитіл, спрямованих проти антигенів компонентів клітинних ядер та цитоплазми. Утворені імунні комплекси аутоантиген-аутоантитіло, депонуються на базальних мембранах різних тканин, а також судин, що входять до складу їх мікроциркуляторного русла, активують систему комплементу і ініціюють запалення і альтеративні зміни сполучної тканини, з підвищенням лизосомальної активності та вивільненням медіаторів запалення.

Останнім часом виникає зацікавленість дослідників до вивчення процесів пошкодження нуклеарних клітинних антигенів при запаленні з посиленням утворенням антитіл до нативної, двохранцюгової дезоксирибонуклеїнової кислоти (dsDNA) та протеїнової складової нуклеосоми (ssDNA).

Сумарні аутоантитіла до dsDNA є одним із видів антинуклеарних антитіл проти структур ядра клітини, тоді як антигенами для анти-ssDNA, виступають азотисті основи, нуклеозиди та нуклеотиди в її складі. Вони виявляються

при різних патологічних станах сполучної тканини та мікровазулітах (Sun, et al., 2000; Yung, et al., 2010).

Модифікація dsDNA із збільшенням її імуногенності в умовах хронічного запалення, відбувається за рахунок активних форм кисню, що продукується фагоцитуючими клітинами, тоді як ssDNA з'являється при апоптозі та некрозі клітин (Blount, et al., 1992).

За хронічного ламініту в коней відбувається істотне зростання рівня аутоантитіл до dsDNA та ssDNA як у сироватці крові, так і у гомогенатах копитної дерми, що, очевидно може бути пов'язане із формуванням запальної реакції з аутоімунним компонентом та посиленням апоптозом клітин копитної дерми, оскільки відповідно до зростання анти-ds(ss)DNA, попередніми нашими дослідженнями було встановлено підвищення рівня антитіл до модифікованого цитрулінованого віментину, (Lazorenko, and Izdepskyi, 2012).

Окрім цього, в сироватці крові коней був виділений аніонний білок, що здатен специфічно реагувати з dsDNA, але значно меншою мірою зв'язуватись з ssDNA і не реагувати з монодезоксирибонуклеотидами, гомополірибонуклеотидами або дуплексами гомополірибонуклеотидів (Thoburn, et al., 1972).

Ряд авторів пов'язує активний синтез аутоантитіл до dsDNA та ssDNA з індукцією стресу ендоплазматичного ретикулуму в умовах хронічного запалення (Kaneko, et al., 2003; Zhang, and Kaufman, 2008).

Ендоплазматичний ретикулум являє собою велику мембранну органелу, що відіграє найважливішу роль у життєзабезпеченні еукаріотичної клітини, через синтез та модифікацію білків, буферизацію кальцію, участь в утворенні внутрішньоклітинних мембран, а також бере участь в багатьох сигнальних шляхах, що регулюють експресію генів та апоптоз (Todd, et al., 2008).

Мембрана ендоплазматичного ретикулуму становить єдине ціле з оболонкою клітинного ядра, а його порожнина відкривається безпосередньо в перинуклеарний простір, що сприяє контакту сигнального апарату ретикулуму з генетичним матеріалом (Todd, et al., 2008; Zhang, and Kaufman, 2008).

Було показано, що індукований гомоцистеїном білок ендоплазматичного ретикулуму в умовах запалення, здатен зв'язуватися з антитілами до dsDNA і є потенційним антигеном, що запускає анти-dsDNA відповідь (Hirabayashi et al., 2007; Hirabayashi, et al., 2010).

ANCA – комплекс антицитоплазматичних антитіл різних класів до компонентів цитоплазматичних гранул нейтрофілів та моноцитів, де головними антигенними мішенями стають лізосомальна протеїназа і мієлопероксидаза та здатні викликати некротичні васкуліти (Gilligan, et al., 1996).

Mallolas, et al., 2000 припускають, що ANCA можуть зв'язуватися з антигенами нейтрофілів, які зазнали апоптозу, а антигени-мішені для цих антитіл, розташовані в цитоплазмі нейтрофілів, транслокуються на зовнішню поверхню мембрани клітин і можуть стимулювати продукцію ANCA.

У більшості коней з хронічними ламінітами було виявлено позитивну реакцію на наявність ANCA в сироватці

крові, що, очевидно, пов'язане з наявністю хронічного віскуліту в ламінарній дермі копит.

Окрім цього, комплекси ANCA з антигенами цитоплазми гранулоцитів, являють собою істотний імуногенний матеріал та здатні посилювати запальну реакцію (Kallenberg, et al., 1994).

Висновки.

1. За хронічного ламініту в коней рівень APHL класів IgM зростає в сироватці крові та гомогенатах копитної дерми до $5,43 \pm 0,70$ IU/ml та $33,95 \pm 7,63$ IU/ml, відповідно, а для класу IgG до $9,43 \pm 1,22$ IU/ml в сироватці крові та до $77,50 \pm 10,06$ IU/ml.

2. Рівень аутоантитіл до dsDNA та ssDNA в сироватці крові коней з хронічним ламінітом підвищується до значень $20,18 \pm 1,92$ IU/ml і $19,55 \pm 2,66$ IU/ml, проти

$5,68 \pm 0,82$ IU/ml і $5,19$ IU/ml у клінічно здорових тварин, відповідно.

3. Концентрація аутоантитіл до dsDNA та ssDNA в гомогенатах копитної дерми коней за хронічного ламініту зростає до $270,0 \pm 25,11$ IU/ml і $305,50 \pm 26,48$ IU/ml, проти $78,80 \pm 14,21$ IU/ml і $68,80 \pm 12,22$ IU/ml у клінічно здорових тварин, відповідно.

4. Сироваткові антицитоплазматичні антитіла ANCA, у клінічно здорових коней не виявлялися у 100% тварин, тоді як за гострого пододерматиту позитивна реакція виявлена в 20%, а за хронічного ламініту в 62,5% випадків.

Перспективою подальших досліджень, є дослідження функціонування імунної системи та патогенетичних механізмів формування імунозалежного запалення за хронічних ламінітів у коней.

Бібліографічні посилання:

1. Baxter, G.M. (1999). Aggiornamenti clinico-terapeutici sulla laminitis equina. *Equine laminitis*. Ippologia, 10, 5–31.
2. Blount, S., Griffiths, H.R., Staines, N.A., Lunec, J. (1992). Probing molecular changes induced in DNA by reactive oxygen species with monoclonal antibodies. *Immunology Letters*, 34, 115–126. DOI: 10.1016/0165-2478(92)90237-I
3. Carter, R.A., Engiles, J.B., Megee, S.O., Senoo, M., Galantino-Homer, H.L. (2011). Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. *Equine veterinary journal*, 43(5), 543–551.
4. Faleiros, R.R., Stokes, A.M., Eades, S.C., Kim, D.Y., Paulsen, D.B., Moore, R.M. (2004). Assessment of apoptosis in epidermal lamellar cells in clinically normal horses and those with laminitis. *Am J Vet Res*, 65(5), 578–585.
5. French, K.R. (2004). Equine laminitis: cleavage of laminin 5 associated with basement membrane dysadhesion. *Equine vet. J*, 36, 242–247.
6. Gilligan, H.M., Bredy, B., Brady, H.R., Hubert, M.J., Slayter, H.S. (1996). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming. *J. Exp. Med*, 184 (6), 2231–2241.
7. Hirabayashi, Y., Oka, Y., Tada, M., Takahashi, R., Ishii, T. (2007). A potential trigger of nephritogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis. *Ann NY Acad Sci*, 1108, 92–95.
8. Hirabayashi, Y., Oka, Y., Ikeda, T., Fujii, H., Ishii, T., Sasaki, T. (2010). The endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, is a potential triggering antigen for anti-DNA response. *J Immunol*, 184, 3276–3283.
9. Johnson, P.J., Wiedmeyer, C.E., LaCarrubba, A., Ganjam, V.K., Messer, N.T. (2010). Laminitis and the equine metabolic syndrome. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, 26, 239–255.
10. Johnson, P.J., Ganjam, V.K., Slight, S.H., Kreeger, J.M., Messer, N.T. (2004). Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in equine laminitis. *Equine Vet J*, 36(1), 41–45.
11. Kaneko, M., Niinuma, Y., Nomura, Y. (2003.) Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull*, 26, 931–935.
12. Kallenberg, C.G., Brouwer, E., Weening, J.J., Tervaert, J.W. (1994). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int*, 46 (1), 1–15.
13. Kuwano, A., Ueno, T., Katayama, Y., Nishiyama, T., Arai, K. (2005). Unilateral basement membrane zone alteration of the regenerated lamellar region in equine chronic laminitis. *J Vet Med Sci*, 67(7), 685–691.
14. Lazorenko, A.B. (2012). Rol фактору некрозу пухлын та модифікованого цитрулінованого виментину в розвитку імунозалежного запалення сполучно тканинних утворень копит у коней [Tumor necrosis factor and the modified citrullinated vimentin in developing immunodependent inflammation of connective tissue formations of the horses' hoofs]. *Vet. medycyna Ukrainy*, 1, 27–29 [in Ukrainian].
15. Lazorenko, A.B. (2011). Zminy lipidnoho spektru klitynykh membran kopytnoi dermy za aseptychnoho yii zapalennia v konей [Lipids metabolism spectrum of cellular membranes of hoof derma at its aseptic inflammation for horse]. *Visnyk Sumsk. natsion. ahrar. un-tu*, 1 (28), 102–105 [in Ukrainian].
16. Lecchi, C., Dalla, C., Lebelt, D., Ferrante, V., Canali, E., Cecilian, F. (2018). Circulating miR-23b-3p, miR-145-5p and miR-200b-3p are potential biomarkers to monitor acute pain associated with laminitis in horses. *Animal*, 12(2), 366–375.
17. Morgan, S.J., Grosenbaugh, D.A., Hood, D.M. (1999). The pathophysiology of chronic laminitis. Pain and anatomic pathology. *Vet. Clin. Equine Pract*, 15, 395–417.
18. Moore, R.M. (2010). Vision 20/20 – conquer laminitis by 2020. *J Eq Vet Sci*, 30(2), 74–76.
19. Merashli, M., Alves, J., Ames, P. (2017). Clinical relevance of antiphospholipid antibodies in systemic sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*, 46, 615–624. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2016.10.004.
20. Marcato, P.S., Perillo, A. (2020). Equine laminitis. New insights into the pathogenesis. *Large Animal Review*, 26, 353–363.
21. Miyakis, S., Lockshin, M., Atsumi, T. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*, 4, 295–306. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x.
22. Mallolas, J., Esteve, M., Rius, E., Cabré, E., Gassull, M.A. (2000). Antineutrophil antibodies associated with ulcerative colitis interact with the antigen(s) during the process of apoptosis. *Gut*, 47 (1), 74–78. DOI: 10.1136/gut.47.1.74

23. Ortel, T.L. (2012). Antiphospholipid syndrome: laboratory testing and diagnostic strategies. *Am J Hematol*, 87(1), 75–81. DOI: 10.1002/ajh.23196.
24. Pollitt, C.C. (1994). The basement membrane at the equine hoof dermal epidermal junction. *Equine vet. J.*, 26, 399–407. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1994.tb04410.x.
25. Pollitt, C.C., Daradka, M.P. (1998). Equine laminitis basement membrane pathology: loss of type IV collagen, type VII collagen and laminin immunostaining. *Equine vet. J.*, 30, 139–144. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1998.tb05133.x.
26. Steelman, S.M., Chowdhary, B.P. (2012). Plasma proteomics shows an elevation of the anti-inflammatory protein APOA-IV in chronic equine laminitis *BMC. Veterinary Research*, 8, 179.
27. Sun, K.H., Yu, C.L., Tang, S.J., Sun, G.H. (2000). Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expression and release of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis. *Immunology*, 99, 352–360. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2000.00970.x.
28. Thoburn, R., Hurvitz, I., Kunkel, H. (1972) A DNA-Binding Protein in the Serum of Certain Mammalian. *Proc Natl Acad Sci USA*. 69(11), 3327–3330. DOI: 10.1073/pnas.69.11.3327
29. Todd, D.J., Lee, A.H., Glimcher, L.H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 8, 663–674. DOI: 10.1038/nri2359.
30. Wagner, I.P., Rees, C.A., Dunstan, R.W., Credille, K.M., Hood, D.M. (2003). Evaluation of systemic immunologic hyperreactivity after intradermal testing in horses with chronic laminitis. *Am J Vet Res*, 64(3), 279–283. DOI: 10.2460/ajvr.2003.64.279.
31. Yung, S., Cheung, K., Zhang, Q., Chan, T. (2010). Anti-dsDNA antibodies bind to mesangial annexin II in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*, 21, 1912–1927. DOI: 10.1681/ASN.2009080805.
32. Zhang, K., Kaufman, R. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454, 455–462. DOI: 10.1038/nature07203.

Lazorenko A. B., Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Bondarenko I. V., Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Musiienko Yu. V., Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Changes in the levels of autoantibodies to cellular phospholipids, cytoplasm of neutrophils and nuclear antigens during chronic laminitis in horses

Pathogenetic mechanisms involved in the development of laminitis differ based on theories based on inflammatory, vascular, enzymatic, metabolic, or traumatic factors. Regarding the two mechanisms that have enjoyed great favor in the past, i.e., inflammation and digital vascular dysfunction, there is debate as to which is primary or whether they are interdependent and of simultaneous onset, implying that the microcirculation in the distal phalanx always plays a critical role in initiating laminitis. According to the latest studies, in chronic laminitis, in certain hyperreactive areas of the dermal lamellae, episodes of subclinical course and exacerbations occur after exposure to antigenic stimulation from vaccinations or environmental allergens, as well as autoimmune components of the inflammatory reaction, which enhances the induction of chemokines for neutrophils, which prolongs inflammation and immunological hyperreactivity.

The aim of our research was to determine the levels of autoantibodies to phospholipids, deoxyribonucleic acid, cytoplasm of neutrophils as markers of chronic immune-dependent inflammation of connective tissue and microcirculatory bed in blood serum and hoof skin homogenates in acute pododermatitis and chronic laminitis. The material for the research was blood serum, as well as fragments of the foliar and papillary base of the hoof skin of horses without orthopedic pathology, with acute aseptic pododermatitis and chronic laminitis. In order to increase informativeness, blood for the study was collected from the regional veins of the respective limbs – the subcutaneous vein of the forearm (thoracic limb) and the subcutaneous vein of the lower leg (pelvic limb). Samples of hoof dermis were washed in physiological solution, homogenized in the cold in RVS buffer (pH 7.4), with a 1% solution of Triton X-100 in a ratio of 1:40 and left at +4°C for 2 hours, then the tissue homogenate was centrifuged at 3000 rpm. within 15 min. after which the supernatant was subjected to cryopreservation. In blood serum and hoof dermis homogenates, the level of antiphospholipid antibodies of the APHL IgG, APHL IgM classes was determined by the method of solid-phase immunoenzymatic ELISA analysis, autoantibodies to native, double-stranded deoxyribonucleic acid (dsDNA) and autonuclear antibodies to single-stranded, denatured deoxyribonucleic acid (ssDNA), as well as anticytoplasmic anti-neutrophil antibodies (ANCA) – automated immunoenzymatic method ELIA Phadia. The content of autoantibodies to APHL, dsDNA, ssDNA and cANCA in tissue samples of hoof dermis homogenates was calculated taking into account the ratio (tissue–RVS buffer). It was established that with chronic laminitis in horses, the level of APHL classes of IgM increases in blood serum and hoof dermis homogenates to 5.43±0.70 IU/ml and 33.95±7.63 IU/ml, respectively, and for the IgG class to 9.43±1.22 IU/ml in blood serum and up to 77.50±10.06 IU/ml. The level of autoantibodies to dsDNA and ssDNA in the blood serum of horses with chronic laminitis increases to the values of 20.18±1.92 IU/ml and 19.55±2.66 IU/ml, against 5.68±0.82 IU/ml and 5.19 IU/ml in clinically healthy animals, respectively. The concentration of autoantibodies to dsDNA and ssDNA in hoof dermis homogenates of horses with chronic laminitis increases to 270.0±25.11 IU/ml and 305.50±26.48 IU/ml, against 78.80±14.21 IU/ml and 68,80±12,22 IU/ml in clinically healthy animals, respectively. Serum anticytoplasmic ANCA antibodies in clinically healthy horses were not detected in 100% of animals, while a positive reaction was detected in 20% of cases of acute pododermatitis, and in 62.5% of cases of chronic laminitis. The perspective of further research is the study of the functioning of the immune system and the pathogenetic mechanisms of the formation of immune-dependent inflammation in chronic laminitis in horses.

Key words: APHL IgM, APHL IgG, dsDNA, ssDNA, ANCA, blood serum, hoof dermis, laminitis, horses.