

ДИНАМІКА ВІДНОСНИХ ПОКАЗНИКІВ ІМУНОГРАМИ У СУК ЗА ЕСТРУСУ

В. Кириченко, М. Брошков

Одеський державний аграрний університет

У статті наведені дані щодо динаміки відносної кількості нейтрофілів, їх здатності до фагоцитозу та основних популяцій імунокомпетентних клітин за еструсу у сук. Порівнюючи динаміку відносної кількості нейтрофілів з їх фагоцитарною активністю, слід зазначити, що відсоток активних нейтрофілів мав протилежну тенденцію. Так, протягом фолікулярної фази статевого циклу, а саме з 1 по 15 день відносна кількість нейтрофілів, здатних до фагоцитозу, достовірно збільшилась з $60,0 \pm 3,09$ до $65,333 \pm 4,52$ ($P \leq 0,05$). Динаміка відносної кількості лімфоцитів та їх регуляторних субпопуляцій за еструсу показує, що з 1 до 10 доби (фолікулярна фаза естрального циклу) відбувалось достовірне зменшення показника - на 2.7%. В нашому експерименті кількість моноцитів мала сталу тенденцію до збільшення не залежно від фази статевого циклу. Встановлено, що під час овуляції зменшується кількість природних кілерів, а кількість T- та B-лімфоцитів навпаки збільшується.

Ключові слова: *еструс, фагоцитарна активність нейтрофілів, лімфоцити, природні кілери.*

Постановка проблеми. Багато аспектів імунної системи собак залишаються невідомими, зокрема характеристика вродженої імунної відповіді та внесок запалення в розвиток запальних, аутоімунних і неопластичних захворювань у літніх собак. Також невідомий вплив поліпшення умов життя та регулярної вакцинації на активність імунної системи собаки. Знання функціональної здатності імунної системи на різних етапах життя може допомогти ветеринарам визначити профілактичні та терапевтичні підходи до покращення здоров'я та довголіття собаки. Особливо важливо вивчати неонатальну та геріатричну імунну систему та її здатність реагувати на різноманіття антигенів, які загрожують життю новонароджених та літніх собак відповідно. Крім того, собаки представляють потужну важливу тваринну модель для людей, у яких розвиваються подібні імунні, неопластичні, інфекційні та паразитарні захворювання, що дозволяє вивчати багато імунних аспектів за короткий період.

Аналіз актуальних досліджень. Подібність між імунодефіцитом людини та собаки робить собаку важливою моделлю для вивчення, що дозволяє науковцям розробляти стратегії для покращення життя, особливо

літніх людей [1]. Встановлено, що однією з дисфункцій репродуктивної системи у собак є піометра. Її розвиток починається під час еструсу і напряму залежить від адекватного стану адаптивного імунітету [2].

Комплексний патогенез піометри ще не повністю вивчений науковою спільнотою, але включає як гормональні, так і бактеріальні фактори. Середовище матки протягом лютеїнової фази підходить для вагітності, а також для росту мікробів. Прогестерон стимулює ріст і проліферацію ендометріальних залоз, підвищену секрецію, закриття шийки матки, і пригнічення скорочень міометрію. Доведено, що місцева реакція лейкоцитів і стійкість матки до бактеріальної інфекції також знижуються [3].

Отже для розробки орієнтувальних ефективних схем профілактики дисфункції репродуктивної системи з застосуванням фармакологічних засобів імунотропної дії актуальним є дослідження особливостей показників імунограм в різні фази естрального циклу.

Метою досліджень стало встановлення динаміки відносних показників імунограм у сук протягом естрального циклу.

Матеріали та методи досліджень. В дослід були залучені вісім сук породи лабрадор віком від 3 до 5 років. Для дослідження використовували стабілізовану кров, яку відбирали в пробірки з латеральної підшкірної вени передпліччя в 1-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25 доби естрального циклу. В стабілізованій крові визначали абсолютний вміст лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів та фагоцитарну активність нейтрофілів (ФАН). Визначення відносної кількості лейкоцитів, нейтрофілів, моноцитів та лімфоцитів проводили за допомогою гематологічного аналізатора BC-2800Vet фірми MINDRAY. Клітини підраховувались і вимірялись інпедансним методом. Цей метод заснований на визначенні електричного опору, який виникає при проходженні часток крізь апертуру. Визначення відносної кількості Т- та В- лімфоцитів проводили методом розеткоутворення з еритроцитами барана в якості маркерів. Кількість кілерних клітин підраховували за допомогою універсального методу морфологічного дослідження формених елементів крові. Відносну кількість лімфоцитів в 1 мкл крові визначали шляхом відсоткового підрахунку великих широкоплазмених лімфоцитів (з азурофільною зернистістю) із загальної кількості лімфоцитів. Підрахунок проводили з використанням імерсійної олії та імерсійного об'єктиву (окуляр $\times 15$, об'єктив $\times 90$).

Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів (ФАН). Реакцію з визначення фагоцитарної активності нейтрофілів проводили в 96-коміркових планшетах для імунологічних реакцій з комірками місткістю 0,2 мл та круглим дном. Тест фагоцитозу проводять з додаванням 0,06 мл 0,1%-ої суспензії клітин пекарських дрожжей, що були попередньо вбиті нагріванням. В препаратах підраховували кількість фагоцитуючих нейтрофілів на 50

нейтрофілів. За фагоцитуючу вважали клітину - нейтрофіл, що поглинув 1 та більше дріжджову клітину.

Статистичне опрацювання отриманих даних у серіях дослідів проводилось за методом Ст'юдента-Фішера, відмінності вважали достовірними при $p \leq 0,05^*$ та $p \leq 0,01^{**}$. Дані наведено як середнє арифметичне значення та похибка середнього ($M \pm m$).

Результати власних досліджень. Аналіз динаміки відносної кількості нейтрофілів (таблиця 1) показав, що в інтервалі 1 - 5 день еструсу популяція цих клітин збільшилась на 4,3%. Подальша оцінка кількості вищевказаних клітин показала, що вона мала тенденцію до зниження протягом наступних періодів спостереження. Значне зниження (на 5%) цього показника відбулося з 15 до 20 дня еструсу. Саме в цей період в яєчниках собак відбувається активне утворення жовтих тіл, на місці постовуляторних фолікулів. Порівнюючи динаміку відносної кількості нейтрофілів з їх фагоцитарною активністю, слід зазначити, що відсоток активних нейтрофілів мав протилежну тенденцію. Так, протягом фолікулярної фази статевого циклу, а саме з 1 до 15 дня відносна кількість нейтрофілів, здатних до фагоцитозу, достовірно збільшилась з $60,0 \pm 3,09$ до $65,333 \pm 4,52$ ($P \leq 0,05$). Такий рівень функціональної активності нейтрофілів зберігався до 20 дня еструсу, на 25 цей показник виріс ще на 3%. Окрім нейтрофілів в забезпеченні адекватності місцевого імунітету відіграють макрофаги.

Таблиця 1. Динаміка відносної кількості нейтрофілів, їх фагоцитарної активності та моноцитів у сук за еструсу (n=8)

Імунологічні показники, %	Доби еструсу					
	1 доба	5 доба	10 доба	15 доба	20 доба	25 доба
Нейтрофіли	48,7±10,33	53,0±12,43	52,0±10,88*	50,333±9,1	45,0±12,62	47,3±4,41*
Моноцити	6,7±0,516	7,0±0,68*	7,0±1,54	7,0±1,78	7,3±0,516	8,0±1,54**
Фагоцитоз нейтрофілів	60,0±3,09	66,0±3,09*	65,333±4,5*2	64,667±5,45	65,0±6,73	68,0±6,19

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняно з першим днем еструсу

Попередниками цих клітин в крові є моноцити, їх кількість також має значення для упередження розвитку дисфункцій в органах репродукції. Нашими дослідженнями встановлено, що популяція відповідних клітин протягом еструсу мала чітку тенденцію до збільшення, особливо у лютеальну фазу. Так з 1 до 5 день відбулося достовірне ($P \leq 0,05$) збільшення відсотку цих клітин на 0,3%, становив $7,0 \pm 0,68$ та зберігався на такому рівні до 15 дня. На 25 день досліджень кількість моноцитів достовірно збільшилась до $8,0 \pm 1,54$ ($P \leq 0,01$).

Динаміка відносної кількості лімфоцитів та їх регуляторних субпопуляцій за еструсу (таблиця 2) вказує на те, що з 1 до 10 доби (фолікулярна фаза естрального циклу) відбувалось достовірне ($P \leq 0,05$) зменшення відповідного показника - на 2.7%. В подальшому з 15 до 20 доби включно їх кількість збільшилась до $33,7 \pm 3,14$ % з послідуочим зменшенням на 25 добу - до $31,7 \pm 5,95$. Досліджуючи субпопуляції Т-лімфоцитів, варто відзначити, що ці клітини з 1 до 5 дня мали тенденцію до збільшення, з 5 до 15 включно - до зменшення. На 20 добу, в порівнянні 15 добою встановлено збільшення Т – лімфоцитів з подальшим зменшенням на 25 добу.

Схожу динаміку протягом еструсу встановлено і у вмісті відносної кількості Т-хелперних клітин, а саме двократне збільшення цих клітин на 5 та 15-20 доби та двократне зменшення на 10 та 25 доби. Протилежну динаміку встановлено при визначенні вміст Т-супресорних клітин. Так, протягом фолікулярної фази еструсу кількість цих клітин достовірно ($P \leq 0,01$) зменшувалась до 10 доби і була відносно сталою до 20 доби, з подальшою тенденцією до збільшення – на 25 добу.

Таблиця 2. Динаміка відносної кількості лімфоцитів та їх регуляторних субпопуляцій за еструсу (n=8)

Імунологічні показники, %	Доби еструсу					
	1 доба	5 доба	10 доба	15 доба	20 доба	25 доба
Лімфоцити	32,7±2,56	30,0±2,42	30,0±7,64*	33,6±5,82	33,7±3,14	31,7±5,95
Т-лімфоцити	57,3±2,73	62,0±3,52*	60,0±1,78	59,33±1,0	63,7±3,38	60,7±5,75
Т-хелпери	43,3±2,07	50,0±1,78*	48,6±1,03	50,0±6,45	51,30±2,06	47,3±6,81
Т-супресори	13,0±0,89	11,3±1,03**	11,0±0,89	11,7±1,03	11,66±1,03	12,7±0,56
В-лімфоцити	9,7±0,51	12,0±1,54*	10,66±1,33	11,66±1,36	11,33±1,03	10,7±0,56
Природні кілери (NK - клітини)	10,3±0,51	10,7±1,03	11,0±0,84**	10,0±0,84	11,7±1,03	11,7±1,82**

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняно з першим днем еструсу

Щодо іншої субпопуляції лімфоцитів, а саме В - лімфоцитів – їх динаміка в цілому була схожа з динамікою Т-хелперів. Природні кілери хоча і відносяться до лімфоцитів, але на відміну від Т- та В-лімфоцитів є представниками вродженого імунітету. Вміст цих клітин в динаміці з 1 до 15 доби достовірно ($P \leq 0,01$) збільшувався з $10,3 \pm 0,51$ до $11,0 \pm 0,84$. На 15 добу вищевказаних показник зменшився до $10,0 \pm 0,84$ з поступовим достовірним збільшенням до 25 доби.

Обговорення результатів дослідження. Проведене дослідження мало на меті встановити динаміку показників клітинної ланки імунітету для більш

кращого розуміння імунофізіологічних процесів, що відбуваються в організмі сук за еструсу. Еструс, як і багато інших періодів онтогенезу, є одним з критичних періодів, оскільки за достатньо короткий часовий період відбувається значні активні фізіологічні процеси, які часто порушуються та викликають дисфункції репродуктивної системи.

Авторськими дослідженнями встановлено, що протягом еструсу відносна кількість нейтрофілів мала тенденцію до незначного збільшення протягом фолікулярної фази та значне зменшення протягом лютеальної фази статевого циклу. Проте така динаміка не кореспондувалася з фагоцитарною активністю цих клітин, яка мала сталу тенденцію до збільшення. Тобто зменшення кількості нейтрофілів не вплинуло на здатність до фагоцитозу. Нейтрофіли є найпоширенішими білими кров'яними клітинами, що становлять до 75% загальної кількості лейкоцитів у дорослої собаки. Ці відносно короткі живі клітини чинять основний захист від мікробних інфекцій. Хоча нейтрофіли залишають кістковий мозок, попередньо оснащені цитоплазматичними гранулами, що містять різноманітні антимікробні молекули, вони циркулюють у кровотоці у якості сплячих клітин. При належній стимуляції нейтрофіли мігрують до тканин, де вони запускають різноманітні механізми, здатні стримувати інфекцію, а саме фагоцитоз, вивільнення позаклітинних пасток нейтрофілів та екзоцитоз гранульованих молекул [4, 5, 6]. Виходячи з отриманих результатів та даних літературних джерел, ФАН є відносно сталим показником і не корелює з загальною кількістю нейтрофілів, тому за їх кількістю неможливо визначати функціональний стан імунної системи.

Іншими клітинами, які також відносяться до вродженого імунітету, є моноцити. Моноцити крові містять до 5% від загальної кількості лейкоцитів у дорослої собаки. Моноцити мігрують із кровотоку в тканини, набуваючи специфічних фенотипів і функціональних характеристик. Ці клітини можуть виконувати різноманітні дії, такі як фагоцитоз, вивільнення позаклітинних пасток макрофагів, презентацію антигену, відновлення тканин, а також функціонувати у якості клітин-поглиначів [7,8,9]. В нашому експерименті кількість вищевказаних клітин мала сталу тенденцію до збільшення не залежно від фази статевого циклу. За результатами досліджень, можна зробити припущення, що кількість цих клітин протягом еструсу не залежить від концентрації статевих стероїдів а регулюється іншими біологічно активними ко-стимулюючими молекулами.

Субпопуляція Т-клітин має II класи клітин: Т-хелпери (CD4+) та Т-супресори (CD8+). Диференціація CD4+ Т-клітин на окремі субпопуляції (або клітинні фенотипи) визначається природою та концентрацією антигену, типом антигенпрезентуючих клітин та станом їх активації, цитокіновим мікрооточенням, яке супроводжує антигенну презентацію, а також наявністю та кількістю ко-стимулюючих молекул разом з іншими змінами [10]. Коли

CD8+T-клітина розвиває свої ефекторні функції, вона перетворюється на цитотоксичну T-клітину, здатну безпосередньо атакувати клітини та знищувати ті, які є злоякісними або інфікованими вірусом. Щоб виконати цю функцію, цитотоксична T-клітина індукує апоптоз у своїх клітинах-мішенях шляхом вивільнення цитолітичних гранул або шляхом експресії лігандів для рецепторів смерті, таких як FasL (CD95) [11]. За еструсу в наших дослідженнях T-хелпери та супресори мали різну динаміку. Так вміст в крові T-хелперів змінювався залежно від фази статевого циклу, що імовірно свідчить про гармонозалежність ефектів цих клітин під час еструсу. Оскільки основним ефектом T-супресорної клітини є цитотоксичність, імовірно протягом 20 діб еструсу ця субпопуляція позбавлена специфічної антигенної стимуляції.

B-лімфоцити є менш потужними антигенпрезентуючими клітинами. Перші етапи розвитку B-клітин відбуваються в складних мікросередовищах, створених стромальними клітинами кісткового мозку, відомими як «ніші», з яких надходять стимули та фактори, необхідні для ініціювання серії клітинних сигналів. Вони, у свою чергу, активують фактори транскрипції, які індукують або пригнічують експресію різних цільових генів, які модулюють виживання, проліферацію та диференціювання клітин [12]. Специфічна динаміка B-лімфоцитів в нашому досліді імовірно свідчить про те, що активність і кількість цих клітин є гормонозалежними процесами. Фізіологічна роль цього процесу може бути пов'язана, з необхідністю пригнічення антитілоутворення вразі майбутньої вагітності або синтезу специфічних антитіл проти антигенів самця.

Хоча роль усіх різних популяцій імунних клітин для жіночої репродуктивної системи повністю не вивчена, деякі, такі як НК, мають вирішальне значення для настання вагітності. У матці людини та миші вони необхідні для формування високоінвазивної (гемохоріальної) децидуальної плаценти [1, 13]. Динаміка цих клітин протягом еструсу мала специфічні особливості, що характеризувалося зниженням їх кількості під час овуляції, а саме з 10 до 15 доби. Пояснення такої закономірності потребує змістовних подальших досліджень, але була встановлена залежність між великою кількістю цих клітин в цервікальній рідині та неплідністю у жінок [14]. Отже, отримані авторські дані аказують на чітку залежність між фазами статевого циклу та кількісними показниками імунокомпетентних клітин. В подальшому є необхідність в дослідженнях, пов'язаних з застосуванням фармакологічних засобів імунорегуляторної дії з метою упередження дисбалансу між клітинами імунної системи і, як наслідок, недопущення розвитку запальних процесів в репродуктивній системі.

Висновки. Встановлено, що за естрального циклу відносна кількість нейтрофілів збільшується в динаміці у фолікулярну фазу і зменшується у

лютеальну фазу. Здатність нейтрофілів до фагоцитозу не залежить від зміни кількості цих клітин.

Доведено, що динаміка субпопуляції лімфоцитів за еструсу залежно від типу клітин має різну закономірність. Визначено, що під час овуляції зменшується кількість природних кілерів, а кількість Т- та В-лімфоцитів навпаки збільшується.

Список використаних джерел

1. Pereira M., Bolas A., Marques C., Alexandre-Pires G., Fonseca I., Santos-Gomes G. (2019). Development of Dog Immune System: From in Uterus to Elderly. *Veterinary Sciences*, 6. 83. [10.3390/vetsci6040083](https://doi.org/10.3390/vetsci6040083).
2. Hagman R. (2022). Pyometra in Small Animals 2.0. *Vet Clin Small Anim* 52 631–657 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.01.004>
3. Wijewardana, V., Sugiura, K., Wijesekera, D. P., Hatoya, S., Nishimura, T., Kanegi, R., Ushigusa, T., & Inaba, T. (2015). Effect of ovarian hormones on maturation of dendritic cells from peripheral blood monocytes in dogs. *The Journal of veterinary medical science*, 77(7), 771–775. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0558>
4. Borregaard N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33 (5), 657-670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>.
5. Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A., Tesselaar, K., & Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116(4), 625–627. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
6. Bekkering S, Torensma R. (2013) Another look at the life of a neutrophil. *World J Hematol*, 2(2). 44-58. <https://doi.org/10.5315/wjh.v2.i2.44>
7. Gordon, S., & Martinez-Pomares, L. (2017). Physiological roles of macrophages. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 469(3-4), 365–374. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1945-7>
8. Heinrich, F., Lehmbecker, A., Raddatz, B. B., Kegler, K., Tipold, A., Stein, V. M., Kalkuhl, A., Deschl, U., Baumgärtner, W., Ulrich, R., & Spitzbarth, I. (2017). Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages in vitro. *PloS one*, 12(8), e0183572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183572>
9. Pereira, M. A., Alexandre-Pires, G., Câmara, M., Santos, M., Martins, C., Rodrigues, A., Adriana, J., Passero, L. F. D., Pereira da Fonseca, I., & Santos-Gomes, G. (2019). Canine neutrophils cooperate with macrophages in the early stages of *Leishmania infantum* in vitro infection. *Parasite immunology*, 41(4), e12617. <https://doi.org/10.1111/pim.12617>

10. Cox, M. A., Kahan, S. M., & Zajac, A. J. (2013). Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology*, 435(1), 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.012>
11. Lieberman J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews. Immunology*, 3(5), 361–370. <https://doi.org/10.1038/nri1083>
12. Cano RLE, Lopera HDE. (2013) Introduction to T and B lymphocytes. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editors. *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet].5*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471>
13. Tizard I.R. (2017) *Veterinary Immunology. 10th ed.* Elsevier; Amsterdam, The Netherlands.
14. Ulčová-Gallová, Z., Mukenšnabl, P., Haschová, M., Pešek, M., Chaloupka, P., Lošan, P., Bibková, K., Mičanová, Z., Cibulka, J., & Švecová, M. (2019). NK cells not only in endometrium but also in ovulatory cervical mucus in patients with decreased fertility. NK buňky nejen v endometriu, ale i v ovulačním cervikálním sekretu u žen se sníženou plodností. *Ceska gynekologie*, 84(3), 184–189.

DYNAMICS OF COMPARATIVE IMMUNOGRAM INDICATORS IN FEMALE DOGS DURING THE ESTROUS CYCLE

V. Kyrychenko, M. Broshkov

The article presents data on the dynamics of the comparative number of neutrophils, their ability to phagocytosis and the main populations of immunocompetent cells in terms of estrus in female dogs. Comparing the dynamics of the quantity of neutrophils with their phagocytic activity, it should be noted that the percentage of active neutrophils had the opposite trend. Thus, during the follicular phase of the sexual cycle, namely from days 1 to 15, the number of neutrophils capable for phagocytosis significantly increased from 60.0 ± 3.09 to 65.333 ± 4.52 ($P \leq 0.05$). The dynamics of the comparative number of lymphocytes and their regulatory subpopulations per estrous shows that from days 1 to 10 (the follicular phase of the estrous cycle) there was a significant ($P \leq 0.05$) decrease - by 2.7%. In our experiment, the number of monocytes had a constant tendency to increase, regardless of the phase of the sexual cycle. It has been determined that during ovulation the number of natural killers decreases, while the number of T- and B-lymphocytes, on the contrary, increases.

Key words: estrus, phagocytic activity of neutrophils, lymphocytes, natural killers.