

УДК 612.112.94.001

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ  
РОЗЕУТВОРЕННЯ ТА ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ ЛІМФОЦИТІВ ЗА  
ДОПОМОГОЮ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ У КОНТРОЛІ ЗА СТАНОМ  
ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ТА ХВОРИХ НА  
ДЕРМАТИТИ СОБАК

М. М. БРОШКОВ, кандидат ветеринарних наук, доцент  
Одеський державний аграрний університет  
[monsieur-michael@rambler.ru](mailto:monsieur-michael@rambler.ru)

*У статті представлені дані порівняльного аналізу визначення  
кількості Т-лімфоцитів з використанням методів розеткоутворення  
та імунотипуювання за допомогою моноклональних антитіл. Показано,*

---

© М. М. Брошков, 2015

*що у практично здорових собак значних відмінностей відносної кількості Т-лімфоцитів у периферичній крові не відзначається. Згідно отриманих даних можливість використання «розеткових» тестів є об'єктивною у контролі за станом імунної системи собак.*

*Ключові слова: собаки, імунітет, Т-лімфоцит, Т-хелпер, Т-супресор, імунофенотипування*

Відомо, що найбільш інформативними тестами, які характеризують потенційну здатність системи імунітету до адекватної імунної відповіді, є аналіз кількості Т- і В-лімфоцитів, активованих Т-лімфоцитів в периферичній крові хворих. Протягом 30-ти років найбільш важливими показниками кількісної характеристики популяції Т- і В-лімфоцитів вважалася кількість Е-розеткоутворюючих клітин, метод визначення яких базується на факті наявності поверхневих рецепторів лімфоцитів до гетерологічних еритроцитів (для Т-лімфоцитів- це еритроцити барана (Е-РУК), для В-лімфоцитів -еритроцити миші [2,10].

Відкриття гібридної технології отримання моноклональних антитіл і впровадження в широку практику клініко-діагностичних лабораторій автоматичного аналізу на базі кількісної проточної цитофлюориметрії сприяло поступовому витісненню «розеткових» тестів. Бурхливий розвиток цієї галузі сприяв відкриттю великої кількості нових фенотипів імунокомпетентних клітин, значимість яких в оцінці стану імунної системи за різних дисфункцій активно вивчається. Разом з тим, загальновідомо, що не зважаючи на виражену клінічну картину, яка свідчить про наявність порушень в імунній системі, у хворих собак нерідко складно виявити будь-які значні відхилення в отриманих результатах. У зв'язку з цим слід згадати про значущість тесту спонтанного розеткоутворення, який не обмежується лише підрахунком кількості Т- і В- клітин [5, 7, 8, 9, 11]. Зокрема, модифікації тесту дозволяють з Е-РУК відокремити різні «корисні» варіанти, наприклад, сенсibiliзованих Т-лімфоцитів до різних антигенів органів і тканин. Це дозволяє досить легко характеризувати модуляцію експресії поверхневих структур лимфоцита під *in vitro* впливом різних стимулів, оскільки кількість розеткоутворюючих клітин здатна порівняно швидко змінюватися під дією безлічі сполук: медіаторів нервової системи, ендогенних і екзогенних імуномодуляторів, гормонів тощо [1, 3, 4].

Мета досліджень – провести порівняльний аналіз визначення кількості Т-, Т- активованих лімфоцитів за результатами двох тестів: спонтанного розеткоутворення (Е-РУК) і CD- типування (популяції CD3 +, CD4 +, CD8 +) з метою оцінки найбільш інформативного методу для контролю за станом імунної системи у здорових і хворих на дерматит собак.

Матеріал і методика досліджень. Робота виконана на кафедрі фізіології, біохімії і мікробіології Одеського державного аграрного університету спільно з лабораторією імунології інституту очних хвороб ім. акад. В. П Філатова. Клінічний огляд собак і відбір проб крові проводили в умовах приватної ветеринарної клініки м. Одеси.

Матеріалом для досліджень була попередньо стабілізована периферична кров собак, віком 1-9 років ( $n = 38$ ), які мали однакові умови утримання та годівлі. Тварини були розділені на три групи: 1-а група ( $n = 14$ ) – практично здорові собаки віком 1-5 років; 2-а група ( $n = 11$ ) – практично здорові собаки віком 6-9 років; третя група ( $n = 13$ ) – собаки з дерматитами.

Кров відбирали вранці на голодний шлунок з ліктьової вени в пробірку з ЕДТА. У тварин одночасно проводили оцінку популяції лімфоцитів в тестах розеткоутворення та імунофенотипування. У крові визначали абсолютний і відносний вміст лімфоцитів та їх субпопуляцій в реакції розеткоутворення з еритроцитами барана (Е-тф.р.-ПУЛ, Е-тф.ч.-ПУЛ) [1].

Імунофенотип оцінювали згідно рекомендації фірми AbD Serotec (Великобританія) з використанням реакції імунофлюорисценції. Для цього після забору крові розводили кров у 2 рази середовищем 199 і обережно нашаровували на 1,5 мл розчином фікол-урографіну щільністю 1,077, потім центрифугували 40 хвилин при 400 G, обережно збирали кільце лімфоцитів в окрему пробірку, відмивали лімфоцити 2 рази від залишків філолу розчином PBS з 1% BSA або середовищем 199 (4-5 мл), центрифугували при 400 G 10 хвилин, відбирали надосадову рідину, а до осаду клітин додавали 1мл PBS з 1% BSA. Добре перемішували і підраховували кількість клітин в камері Горяєва, після чого готували робочу концентрацію клітин -  $1 \times 10^6$  клітин / мл. Розводили моноклональні антитіла 1: 100 розчином PBS з 1% BSA (попередньо їх відтитрували) і відбирали аліквоту 100 мкл клітинної суспензії  $1 \times 10^6$  клітин / мл і додавши 100 мкл розведених (1: 100) моноклональних антитіл. Добре перемішували, потім залишали для контакту на 30 хвилин за кімнатної температури. Відмивали 2 рази імунні комплекси, що утворилися від надлишку флуоресцентного барвника (FITC) - 2мл розчину PBS з 1% BSA і центрифугували при 400 G 5 хв. Видаляли супернатант і ресуспендували в 200 мкл розчину PBS з 1% BSA з додаванням 50% гліцерину в якості монтажного середовища. Розміщували краплю ресуспендованих клітин на предметне скло, накривали покривним склом і переглядали під люмінесцентним мікроскопом, використовуючи об'єктив x40 і відповідний FITC набір світлофільтрів. Отримані дані статистично обробляли з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень. Як показали результати досліджень (табл.) в крові практично здорових собак (група 1) циркулює  $62,0 \pm 4,0\%$  - CD3 + -лімфоцитів і практично така ж кількість  $61,33 \pm 15,14\%$  - E-ПУК. Відомо, що антиген CD3 + є основною частиною антигенспецифічного T-клітинного рецептора (TcR- CD3+), що запускає процеси антигензалежної активації T-клітин. Цей маркер дозволяє досить надійно ідентифікувати зрілі інтактні T-клітини і досить повною мірою визначати їх кількість. У той же час, реакція розеткоутворення не дає однозначної відповіді про кількісну характеристику T-лімфоцитів, а лише дозволяє відокремити популяцію клітин переважно з функціями T-лімфоцитів. Результати імунологічних досліджень у собак після 6 років показали, що відносна кількість T-лімфоцитів в реакції розеткоутворення на 2% більше, ніж в реакції імунофенотипування T-клітин за допомогою моноклональних антитіл.

**Імунологічні показники практично здорових и хворих  
на дерматит собак**

Показники	1-а група	2-а група	3-я група
CD3 <sup>+</sup> Тест розеткоутверення,%	61,33±15,14	58,0±5,29	59,5±9,14
Реакція імунотипуння,%	62,0±4,0	56,0±8,18	52,25±12,66*
CD4 <sup>+</sup> Тест розеткоутверення,%	48,0±14,0	41,3±9,02	44,0±9,9
Реакція імунотипуння,%	34,67±2,52	27,67±5,13	27,5±8,34
CD8 <sup>+</sup> Тест розеткоутверення,%	14,6±3,46	16,0±6,42	14,0±1,63*
Реакція імунотипуння,%	28,0±2,64	24,75±4,5	27,3±3,05

У собак з дерматитами різниця у відносній кількості Т-лімфоцитів в реакції розеткоутворення на 7,25% більше, ніж кількість цих же клітин в реакції з моноклонами CD3 +. Однією з причин відмінності в кількості Т-лімфоцитів, можливо, є зміна активності Т-клітинного імунітету у собак з віком у зв'язку з інволюцією тимуса, а також більшою активністю Е-РУК клітин в крові за патологічного стану.

Кількісна характеристика субпопуляції Т-клітин з хелперною (CD4 +) активністю свідчить про істотно підвищений їх відносний рівень щодо показника у собак в старечому періоді і за дерматитів у відповідності до результатів реакції розеткоутворення. Отримані ж за допомогою реакції розеткоутворення результати щодо вмісту Т-клітин з супресорною (CD8 +) активністю свідчать про низький вміст цих клітин в реакції імунофенотипування.

Разом з тим, слід зазначити, що впровадження методу імунофенотипування за допомогою моноклональних антитіл замість «розеткових» тестів суттєво не вплинуло на загально визнані положення про зміни в стані імунної системи за різних дисфункціональних станів. Отже, можна стверджувати, що застосування методу розеткоутворення дозволяє певною мірою виявляти і кількісно оцінювати популяції лімфоцитів, які несуть маркери і володіють функціями, характерними переважно для Т-лімфоцитів.

### Висновки

Виходячи з проведених досліджень, аналізуючи визначення кількості Т-лімфоцитів з використанням методів розеткоутворення та імунотипуння за допомогою моноклональних антитіл встановлено, що у практично здорових собак до 6 років відносна кількість цих клітин знаходиться в межах 60%, з віком (після 6 років) вміст Т-лімфоцитів в периферичній крові знижується. У той же час відносна кількість Т-лімфоцитів у собак з дерматитами також знижується і більш виражене зниження цих клітин відзначено в реакції імунофенотипування. Отримані дані можуть бути використані в інтерпретації показників імунограм в клінічній ветеринарній практиці дрібних домашніх тварин за оцінювання імунофізіологічної реактивності організму та проведення імунотерапевтичного лікування.

## Список літератури

1. Влізло В. В. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / В. В. Влізло // Львів: СПОЛОМ, 2012. – С. 234–237.
2. Донник И. М. Экология и здоровье животных / И. М. Донник, П. Н. Смирнов. — Екатеринбург : УТК, 2001. — 331 с.
3. Дрожжина Г. И. Состояние иммунологической реактивности организма у больных с наследственными стромальными дистрофиями роговицы и ее особенности при наличии воспалительного компонента / Г. И. Дрожжина, Т. В. Дегтяренко // Офтальмологічний журнал. – 2004. – № 5. – С. 10–16.
4. Лебедев К. А. Иммунология образраспознающих рецепторов: Интегральная иммунология / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013. – 256 с.
5. Новиков Д. К. Медицинская иммунология / Д. К. Новиков. – Минск.: «Высшая школа», 2005. – С. 116–119.
6. Новиков Д. К. Оценка иммунного статуса / Д. К. Новиков, В. И. Новикова. – Витебск–Москва: Высшая школа, 1996. – С. 90–97.
7. Покровский В. И. Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс / В. И. Покровский, М. М. Авербах, В. И. Литвинов, И. В. Рубцов // Медицина. – М. – 1979. – С. 189–213.
8. Ройт А. Основы иммунологии / А. Ройт. – М.: Эксмо, 1996. – С. 127–167.
9. Хаитов Р. М. Иммунология / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. – М.: Эксмо, 2000. – С. 57–64.
10. Чередеев А. Н. CD-маркеры в практике клинко-диагностических лабораторий / А. Н. Чередеев, Н. К. Горлина, И. Г. Козлов. - Клин. лаб. диагностика. - 1999. - №6. - С25-329.
11. Ярилин А. А. Иммунология / А. А. Ярилин // Медицина. – М. – 1999. – С. 76–83.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ РОЗЕТКООБРАЗОВАНИЯ И ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В КОНТРОЛЕ ЗА СОСТОЯНИЕМ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ДЕРМАТИТОМ СОБАК

М. М. Брошков

*В статье представлены данные сравнительного анализа определения количества Т-лимфоцитов с использованием методов розеткообразования и иммунофенотипирования с помощью моноклональных антител. Показано, что у практически здоровых собак значительных различий относительного количества Т-лимфоцитов в периферической крови не отмечается. Согласно полученным данным возможность использования «розеточных» тестов является объективной в контроле за состоянием иммунной системы собак.*

*Ключевые слова: собаки, иммунитет, Т-лимфоцит, Т-хелпер, Т-супрессор, иммунофенотипирование*

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFICIENCY OF USING THE "ROSETTE"  
METHOD AND THE METHOD OF IMMUNOTYPING BY MONOCLONAL  
ANTIBODIES TO CONTROL THE STATE OF THE IMMUNE SYSTEM OF THE  
ALMOST HEALTHY DOGS AND THE DOGS WITH DERMATITIS

M. M. Broshkov

*The article presents the data of comparative analysis for determining the number of T-lymphocytes using the "rosette" method and the method of immunotyping by monoclonal antibodies. It's proved that almost healthy dogs don't have significant differences in the relative number of T-lymphocytes in the peripheral blood.*

*The keywords: dogs, immunity, T-lymphocyte, T-helper, T-suppressor, immunophenotyping*