

УДК 616.009:616.8:612.017.1

Брошков М.М., к.вет.н., доцент ©

E-mail: dolinavet@gmail.com

Одеський державний аграрний університет
65012, Одеса, вул. Пантелеймонівська 13**ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО І ГУМОРАЛЬНОГО
ИМУНІТЕТУ У ЦУЦЕНЯТ ЗАЛЕЖНО ВІД СТУПЕНЯ СТРЕСОВАНОСТІ
ОРГАНІЗМУ**

У статті представлено динаміку змін абсолютної кількості лейкоцитів, лімфоцитів та їх субпопуляцій, фагоцитарної активності нейтрофілів, а також титру специфічних антитіл проти основних вірусних захворювань за введення полівалентної вакцини з врахуванням індивідуальної стрес реактивності організму. Встановлено, що цуценята у яких відсоток інверсії «активних» Т-лімфоцитів більше ніж 10 % (в реакції розеткоутворення з нейромедіатором адреналіном) абсолютна кількість лейкоцитів, лімфоцитів та їх субпопуляцій нижча ніж у тварин в яких відсоток інверсії складав менше 10%. Введення полівалентної вакцини цуценятам з високою сенсibiliзацією до нейромедіатору адреналіну (% інверсії більший за 10) спричинило більш виражений проліферативний ефект, що проявляється у збільшенні кількості лейкоцитів, лімфоцитів та їх субпопуляцій. За введення вакцини тваринам з низькою сенсibiliзацією встановлено відсутність проліферативного ефекту на лейкоцити і лімфоцити, що в результаті відобразилося на більш низькому синтезі специфічних антитіл проти парвовірусного ентериту та чуми всеїдних.

Ключові слова: лейкоцити, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, фагоцитарна активність нейтрофілів, інверсія, специфічні антитіла, імунорегуляторний індекс, НК-клітини, адренорецепція.

УДК 616.009:616.8:612.017.1

Брошков М.М.Одеський державний аграрний університет
65012, Одеса, вул. Пантелеймоновская 13**ДИНАМІКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛІТОЧНОГО І ГУМОРАЛЬНОГО
ИМУНІТЕТА У ЩЕНКОВ В ЗАВИСИМОСТІ ОТ СТЕПЕНІ
СТРЕССИРОВАННОСТІ ОРГАНІЗМА**

В статті представлена динаміка змін абсолютного числа лейкоцитів, лімфоцитів та їх субпопуляцій, фагоцитарної активності нейтрофілів, а також титру специфічних антитіл проти основних вірусних захворювань при введенні полівалентної вакцини з урахуванням індивідуальної стрес реактивності організму. Встановлено, що щенки у яких відсоток інверсії «активних» Т-лімфоцитів більше 10% (в реакції

розеткообразования с нейромедиатором адреналином) абсолютное количество лейкоцитов, лимфоцитов и их субпопуляций ниже чем у животных у которых процент инверсии составлял менее 10%. Введение поливалентной вакцины щенкам с высокой сенсibilизацией к нейромедиатору адреналину (% инверсии больше 10) повлекло более выраженный пролиферативный эффект, проявляющийся в увеличении количества лейкоцитов, лимфоцитов и их субпопуляций.

При введении вакцины животным с низкой сенсibilизацией установлено отсутствие пролиферативного эффекта на лейкоциты и лимфоциты, что в результате отразилось на более низком синтезе специфических антител против парвовирусного энтерита и чумы всеядных.

Ключевые слова: лейкоциты, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, фагоцитарная активность нейтрофилов, инверсия, специфические антитела, иммунорегуляторный индекс, НК-клетки, адренорецепция

UDC 616.009:616.8:612.017.1

Broshkov MM

*Odessa State Agrarian University
65012, Odessa, st.Panteleymonovskaya 13*

DYNAMIC OF INDICATORS CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN PUPPIES DEPENDING ON THE DEGREE OF THE BODY STRESSING

The article presents the dynamics of changes in the absolute number of leukocytes, lymphocytes and their subpopulations, phagocytic activity of neutrophils, as well as the titer of specific antibodies against the major viral diseases when administered to a multivalent vaccine based on individual stress reactivity. It has been established that puppies which the inversion percentage of "active" T-lymphocytes more than 10% (reaction rosettecreation with neurotransmitter adrenaline) absolute number of leukocytes, lymphocytes and their subpopulations lower than the percentage of animals in which the inversion of less than 10%. Administration a multivalent vaccine puppies with high sensitization to neurotransmitter adrenaline (% inversion over 10) led a more pronounced proliferative effect, which manifests itself in the increase in the number of leukocytes, lymphocytes and their subpopulations.

When administered to an animal vaccine with low sensitization established the absence of a proliferative effect on leukocytes and lymphocytes, resulting in a lower impact on the synthesis of specific antibodies against parvovirus and canine distemper virus.

Key words: *white blood cells, T-lymphocytes, B-lymphocytes, the phagocytic activity of neutrophils, inversion, specific antibodies, immunoregulatory index, NK cells, adrenoretseption*

Встановлено, що вплив стресових агентів на розвиток імунної відповіді залежить не тільки від стресу (його характеристик), але і від чутливості до нейромедіаторів та гормонів (зокрема до катехоламінів) тих клітин нервової та імунної систем, які безпосередньо приймають участь в реалізації імунної

реакції організму на вплив стресового чинника[1]. В теперішній час доведено можливість абсорбції катехоламінів поверхнею активованих імункомпетентних клітин, що свідчить про експресію або афінність адренорецепторів на поверхню цих клітин в процесі імунізації або інших процесів [2]. Мішенями імунної системи для впливу нейромедіатора адреналіну є Т-лімфоцити. Встановлено, що рівень Т-адренорецепції відображає ступінь активності симпатoadреалової (САС) системи у відповідь на дію стресорного фактору [3,4,5]. Є підстави вважати, що рецепція активних Т-лімфоцитів до нейромедіатора адреналіну дозволяє оцінити, за відсотком інверсії, стресорну реакцію організму, оскільки характеризує ступінь участі САС в реактивних змінах адаптативних механізмів імунного гомеостазу[6]. Результати експериментальних досліджень, які були проведені в НДІ ім. Філатова на моделі стрес-індукованої імуносупресії, дозволили визначити, що в динаміці розвитку стресової реакції організму відбувається підвищення рівня адренорецепції тимусзалежних лімфоцитів [7]. Ці дослідження показали, що розвиток адреналін-індукованої імуносупресії починається вже після трьох внутрішньовенних ін'єкцій адреналіну і її прояв позначається на зниженні вмісту абсолютної кількості лімфоцитів, зниженні кількості Т, і В-лімфоцитів і фагоцитарної активності нейтрофілів. Хатні тварини, на відміну від сільськогосподарських, піддаються набагато частіше впливу стресорів, оскільки частіше змінюють місце перебування, умови існування та годівлі та інш. В зв'язку з цим актуальним є визначення особливостей імунофізіологічного статусу собак залежно від ступеня стресованості організму, що необхідно враховувати під час проведення заходів імунoproфілактики.

Метою наших досліджень було визначення впливу ступеня стресованості організму цуценят, за відсотком інверсії Т-активних лімфоцитів, на утворення специфічних антитіл при введенні полівалентної вакцини.

Матеріали і методи досліджень. Для досліджень використовували периферичну стабілізовану кров та сироватку цуценят 2-х місячного віку (9 голів). Тварин розділили на дві групи після першого дослідження ступеня сенсibilізації до нейромедіатора адреналіну. Перша група (n-5): з низькою сенсibilізацією (% інверсії до 10). Друга група (n-4) з високою сенсibilізацією (% інверсії 10 і вище). Кров відбирали вранці натщесерце двічі: до та через 14 днів після введення вакцини. В крові визначали кількість лейкоцитів, лімфоцитів та їх субпопуляцій, фагоцитарну активність нейтрофілів а також реакцію рецепторів Т-активних лімфоцитів на додавання нейромедіатора адреналіну. Абсолютний та відносний вміст лімфоцитів та їх субпопуляції визначали в реакції розеткоутворення з еритроцитами барана(Е тф. р.-РУЛ, Етф.ч-РУЛ)Підраховували відносну кількість «активних» Е-РУЛ на 100 клітин лімфоїдного ряду в контрольних і дослідних зразках, різниця у відсотку «активних» Т-клітин у дослідних і контрольних зразках відображає рівень стресованості організму тварини. Результати оцінюють на підставі порівняння % інверсії «активних» Е-РУЛ в дослідних і контрольних пробах. Відсоток інверсії «активних» Т-лімфоцитів в дослідних пробах (з додаванням адреналіну)

до 10% по відношенню до контрольних проб (з додаванням фізіологічного розчину) оцінювалась як легка ступінь супресованості; від 10 і вище, ступінь супресованості розцінювалась як висока. Суть даної реакції полягає в тому, що під час попередньої інкубації лейкоцитарно-лімфоцитарної суміші клітин з адреналіном частина активних рецепторів на поверхні імунокомпетентних клітин з'єднуються з цим нейромедіатором, що веде до зменшення «активних» розеткоутворюючих клітин. Фагоцитарну активність нейтрофілів визначали використовуючи суспензію клітин пекарських дріжджів. В лунку імунологічної планшети заливаємо 0,05 мл суспензії лейкоцитів, потім додаємо 0,06 мл 0,1 % суспензії пекарських дріжджів вбитих нагріванням. Після інкубації 30 хв. при $t 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в приготуванних мазках проводимо підрахунок фагоцитуючих клітин. За фагоцитуючу вважали клітину – нейтрофіл, який захопив одну і більше кількість дріжджових клітин.

Титр специфічних антитіл проти парвовірусного ентериту та вірусу чуми всеїдних визначали методом ІФА використовуючи тест системи фірми «Хема».

Результати досліджень та їх обговорення. На першому етапі досліджень визначили наявність різниці в стані клітинного імунітету у цуценят з низьким (до 10%) та високим (більше 10%) ступенем сенсibiliзації до нейромедіатору адреналіну (таблиця1).

Таблиця 1

Зміни показників клітинного імунітету у цуценят за введення вакцин

Показники	Стан клітинного імунітету залежно від % інверсії, (M±m)				Фізіологічні межі
	1-група - до 10% (n-5)		2-група (n-4)		
	до вакцинації	після вакцинації	до вакцинації	після вакцинації	
Лейкоцити, $\cdot 10^9$ /л	8,2±3,043	8,15±2,07	6,5±1,84	8,825±1,11	6,0-16,0
Лімфоцити, $\cdot 10^9$ /л	2,75±1,029	2,51±0,64	1,99±0,76	2,79±0,84	1,78-4,2
T-лімфоцити, кл/мкл	1632,75±424,7	1814,6±407,8*	1324,0±515,9	1901,5±614,1*	810-3020
T-хелпери/індуктори, кл/мкл	1496,0±625,48	1385,2±325,7	934,0±448,48	1393,4±454,4	480-1380
T-супресори/цитотоксичні, кл/мкл	467,5±185,44	489,5±190,73**	409,75±247,71	508,13±211,1**	302-756
B-лімфоцити, кл/мкл	186,5±134,87	222,0±112,62	185,9±113,35	321,5±147,12	124-1260
Імунорегуляторний індекс, Tх/Tс	3,77±1,33	3,35±1,26	3,675±1,26	2,96±0,98	2-4
НК-клітини, кл/мкл	287,5±99,69	231,67±58,8	188,63±77,47	306,25±114,9	150-600
Фагоцитоз нейтрофілів, кл/мкл	2164,2±686,5	2510,7±563,4	2186,14±753,2	2695,25±850,4	1600-4000

При високому ступені сенсibiliзації до адреналіну (друга група) встановлено нижчі в порівнянні з першою групою слідуючих показників

імунологічної реактивності організму (ІРО): лейкоцитів, абсолютної кількості лімфоцитів, абсолютну кількість Т-хелперів та Т-супресорів, абсолютну кількість НК-клітин та фагоцитуючих клітин. Зниження показників ІРО в цій групі скоріш за все пов'язані з пригніченням проліферативних процесів внаслідок постійної сенсibiliзації організму нейромедіатором адреналіном, що опосередковано може відображати тип вищої нервової діяльності.

Наступним етапом наших досліджень було співставлення станів ІРО в двох групах тварин до та після введення полівалентної вакцини. Для вивчення особливостей реакції організму у цуценят с високим ступенем сенсibiliзації до нейромедіатору адреналіну, в порівнянні з тваринами із низьким ступенем на введення імуногену, була використана полівалентна вакцина «Дураму». Її вводили в рекомендованих виробником дозах, підшкірно. Достовірні різниці між групами були встановлені: по абсолютній кількості лімфоцитів (* $p < 0,05$), абсолютній кількості Т-супресорів (** $p < 0,05$).

При вивченні реакції імунокомпетентних клітин у цуценят з різним ступенем сенсibiliзації на введення полівалентної вакцини встановлено, що у тварин з високим ступенем значно збільшилась абсолютна кількість лейкоцитів та лімфоцитів. У тварин з низьким рівнем сенсibiliзації відсутні суттєві зміни в абсолютній кількості лейкоцитів та лімфоцитів. Не встановлено також достовірної різниці між кількістю Т-супресорів до та після введення вакцини.

Найбільш вираженим було підвищення абсолютної кількості Т-хелперних клітин: в першій групі їх кількість знизилась, а в другій, навпаки, збільшилась. Тобто реакція імунокомпетентних клітин на введення полівалентної вакцини залежить від первісної кількості клітин.

Оцінка показника величини імунорегуляторного індексу (ІРІ) показала, що полівалентна вакцина чинить імунорегуляторний вплив. У тварин другої групи ІРІ знизився в більшій мірі, ніж у тварин першої групи. Як відомо, підвищений ІРІ свідчить про дисбаланс між імунорегуляторними субпопуляціями лімфоцитів (переважанням Т-хелперної активності над Т-супресорною).

Таблиця 2

Динаміка титру специфічних антитіл проти основних вірусних захворювань за введення полівалентної вакцини. (M±m)

Показники	Групи тварин			
	1 група (n-5)		2 група (n-4)	
	до вакцинації	після вакцинації	до вакцинації	після вакцинації
Титр специфічних антитіл проти чуми, ОД	9,0±2,44	27,4±9,2*	10,74±6,65	27,2±7,99
Титр специфічних антитіл проти парвовірусного ентериту, ОД	27,24±11,88	340,5±11,48	33,56±16,1	370,26±19,11

Оцінка стану гуморального імунітету, а саме: динамики утворення титру специфічних антитіл у цуценят після введення полівалентної вакцини, залежно від ступеня стресованості організму та кількості В-лімфоцитів показав достовірне підвищення субпопуляції В-клітин у тварин обох груп. Найбільш вираженим підвищення абсолютної кількості В – лімфоцитів спостерігалось у тварин другої групи. Збільшення титру специфічних антитіл (таблиця 2) виявлено у тварин обох груп. У тварин другої групи наростання титру специфічних антитіл проти чуми всеїдних відбулося в 2, 53 (* $p < 0,05$) рази проти 3,0 в першій. Наростання титру специфічних антитіл проти парвовірусного ентериту у цуценят першої групи відбулося в 12,5 разів проти 11,0 в другій.

Висновки.

1. При високому ступені сенсibiliзації організму собак до нейромедіатору адреналіну в організмі відмічається зниження кількості: лейкоцитів, абсолютної кількості лімфоцитів, абсолютної кількості Т-хелперів та Т-супресорів, абсолютної кількості НК-клітин та фагоцитуючих клітин.

2. Встановлено, що введення полівалентної вакцини мало більш виражений проліферативний ефект на лейкоцити та лімфоцити у цуценят з високим ступенем сенсibiliзації до нейромедіатору адреналіну, але це суттєво не вплинуло на утворення специфічних антитіл.

Перспектива подальших досліджень. Перспективою подальших досліджень є вивчення змін імунологічної реактивності організму собак за введення засобів для імунокорекції.

Література

1. Абрамов В. В. Взаимодействие иммунной и нервной систем / Абрамов В.В. — Новосибирск: Наука, 1988.
2. Петров Р. В. Иммунология / Петров Р. В. М.: Медицина, 1987.
3. Корнева Е. А. Гормоны и иммунная система / Е. А. Корнева, Э. К. Шхинек. — Л.: Наука, 1988.
4. Маррак Ф. Т-клетка и ее рецепторы / Ф. Маррак, Дж. Каплер // В мире науки. — 1986. — № 4.
5. Половцева Т. В. Понятие о структуре и функциях иммунной системы / Т.В. Половцева // Гематология и трансфузиология. — 1993. — №3.
6. Афанасьева М. А. Развитие иммунной системы в онтогенезе крыс: нейроэндокрино-иммунные взаимодействия: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.13 „Физиология” / М. А. Афанасьева — Москва, 2009.
7. Дегтяренко Т.В. Биогенные стимуляторы и иммунореактивность/ Т.В. Дегтяренко, Р.Ф. Макулькин //Биогенные стимуляторы и иммунореактивность Т.2-Одесса.-Маяк.- 1997.

Рецензент – д.вет.н., професор Стояновський В.Г.