

ДИНАМИКА МАРКЕРОВ ИММУНИТЕТА У КОТОВ С ГНОЙНЫМ КЕРАТОКОНЪЮНКТИВИТОМ***Масликов С.Н., **Издепский В.И.**

*Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепропетровск, Украина

**Луганский национальный аграрный университет, Луганск, Украина

Развитие гнойного кератоконъюнктивита у котов сопровождается выраженной активацией системы клеточного и гуморального иммунитета, что проявляется достоверным ростом количества Т-супрессоров и натуральных киллеров, выраженным увеличением количества НСТ-положительных нейтрофилов, интенсификацией фагоцитарной активности; увеличением содержания иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов, выраженной активацией системы комплемента преимущественно классическим путем.

Development of purulent keratoconjunctivitis in cats is accompanied by significant activation of cellular and humoral immunity, which is manifested significant increase in the number of T-suppressor and natural killer cells, marked increase in the number of NBT-positive neutrophils, intensification of phagocytic activity, the increase of immunoglobulins and circulating immune complexes, pronounced activation of the complement system mainly classical way.

Ключевые слова: кот, кератоконъюнктивит, система иммунитета, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, иммуноглобулины, система комплемента.

Keywords: cat, keratoconjunctivitis, immunity system, T-lymphocytes, B-lymphocytes, immunoglobulins, complement system.

Введение. Основной функцией иммунной системы является защита организма от всего генетически чужеродного. Эта функция обусловлена способностью системы иммунитета распознавать «свое» и «чужое», в результате чего на действие антигена в организме развивается сложная реакция иммунного ответа. Известны многочисленные публикации по оценке иммунного статуса человека при различных патологических состояниях, а в последние годы исследования системы иммунитета стали приоритетными и для ветеринарии. Ветеринарная медицина изучает норму и патологию различных видов животных, причем, у каждого вида есть свои особенности строения и функции системы иммунитета. Как правило, в случае терапевтической, акушерско-гинекологической, хирургической и других видов патологии в организме животных происходят значительные изменения в функционировании системы иммунитета, что часто определяет течение болезни, обуславливает развитие осложнений и рецидивы. Показатели состояния системы иммунитета имеют большое диагностическое и прогностическое значение, особенно в случаях присутствия микробного фактора. Сегодня не только ученые, но и квалифицированные врачи ветеринарной медицины все чаще используют в своей повседневной работе результаты биохимических и иммунологических исследований. Однако, надо отметить, что более или менее полно система иммунитета изучена только у продуктивных животных. У мелких животных, а именно у котов, показатели системы иммунитета изучены недостаточно как в норме, так и в случаях локальных инфекций [1, 2, 4].

Целью наших исследований является изучение динамики основных маркеров клеточного и гуморального иммунитета у котов, больных гнойным кератоконъюнктивитом.

Материал и методы исследований. Исследования проводили на 5 клинически здоровых и 10 больных гнойным кератоконъюнктивитом котах, возрастом 3-4 года и массой тела 3,5-4,0 кг.

У здоровых котов проводили клиническое исследование по общепринятой методике. В крови животных определяли показатели морфологического статуса: лейкоциты - меланжерным методом в счетной камере Горяева; лейкоцитарную формулу выводили подсчетом в мазках, окрашенных по Романовскому - Гимзе 200 лейкоцитов. Фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) периферической крови изучали пробирочным способом (со *Staphylococcus epidermidis* шт. 9198) с последующим подсчетом в окрашенных мазках фагоцитарного числа (ФЧ), индекса завершеного фагоцитоза (ИЗФ). НСТ спонтанный тест оценивали по восстановлению нитросинего тетразолия. Процент Т - лимфоцитов, их субпопуляций и В- лимфоцитов определяли с помощью реакции розеткообразования с эритроцитами, на которых адсорбированы моноклональные антитела против рецепторов CD3 (Т- лимфоциты), CD4 (Т-хелперы), CD8 (Т- супрессоры), CD16 (натуральные киллеры), CD19 (В- лимфоциты) [3, 6, 7]. Белоксинтезирующую функцию печени оценивали по уровню общего белка (рефрактометрически) и белковых фракций (нефелометрическим методом). Содержание иммуноглобулинов классов А, Е, G и М определяли иммуноферментным методом; содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли методом преципитации с полиэтиленгликолем (Гриневиц Ю.А., Алферов А.Н., 1981) [3]. Активность общего комплемента оценивали по его гемолитической активности (50 % гемолиза) унифицированным методом с эритроцитами барана в присутствии сыворотки кролика. Активность С3 компонента комплемента определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа; активность С4 компонента комплемента - иммунотурбидиметрическим методом на анализаторе Cobas 6000.

У котов с гнойным кератоконъюнктивитом проводили такие же исследования: на первые, третьи и седьмые сутки течения болезни. Все полученные цифровые данные подвергали обработке методом вариационной статистики с использованием программы Microsoft Office Exel «Statistica 7».

Результаты исследований. Во время оценки морфологических маркеров ответа животных на развитие гнойного воспаления конъюнктивы и роговицы, мы не наблюдали слишком выраженных их изменений, кроме достоверного увеличения количества лейкоцитов на третьи сутки исследований (на 7,5

%), преимущественно, за счет моноцитов (количество которых уже на третьи сутки возрастало в три раза) и палочкоядерных гранулоцитов. Кроме этого наблюдали тенденцию к эозинофилии и лимфопении.

Динамика иммунокомпетентных клеток отличалась достоверным уменьшением общего количества Т-лимфоцитов на третьи и седьмые сутки наблюдения (на 13,5 и 27,3 % соответственно) на фоне снижения представительства Т-хелперов (на 11,8-15,4 %), роста количества Т-супрессоров (на 19,0-43,3 %) и натуральных киллеров (на 31,4-42,2 %), причем указанные изменения имели соответствующую корреляцию с длительностью течения воспалительного процесса. Процентное содержание В-лимфоцитов практически не менялось, хотя прослеживалась тенденция к уменьшению данного показателя на третьи и седьмые сутки течения патологического процесса.

Определение активности и интенсивности фагоцитоза и НСТ-теста позволяет оценить состояние фагоцитарной системы, возможность участия фагоцитирующих клеток в патогенезе заболевания и определить тактику лечения.

В результате проведенных исследований выяснилось, что в первые сутки развития кератоконъюнктивита у котят наблюдалась тенденция к увеличению количества НСТ-положительных нейтрофилов. На третьи сутки этот показатель достоверно увеличивался на 31,5 %, а к седьмым суткам превышал начальный уровень лишь на 8,5 % (таблица 1). Учитывая, что у здоровых животных количество НСТ-положительных нейтрофилов составляет до 10 %, возникающий на третьи сутки респираторный взрыв можно связать с формированием клеточного ответа на фоне интенсивно развивающегося гнойного воспаления [4, 5].

Таблица 1 – Динамика показателей клеточного иммунитета

Показатели	Животные			
	Клинически здоровые, n=5	С гнойным кератоконъюнктивитом, n=10		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
	M±m	M±m	M±m	M±m
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,91±0,42	7,96±0,27	8,5±0,19*	8,35±0,11
Еозинофилы, %	3,4±1,08	3,5±0,67	3,7±0,22	3,8±0,26
Палочкоядерные, %	3,2±0,73	3,8±0,26	3,6±0,23	4,0±0,22
Сегментоядерные, %	53,9±1,78	53,2±1,59	55,9±1,24	54,0±0,94
Лимфоциты, %	38,8±2,33	38,6±1,58	34,6±1,08	36,0±0,90
Моноциты, %	0,7±0,32	1,1±0,25	2,3±0,16*	2,2±0,14*
CD3, %	52,1±2,83	48,1±1,69	45,1±1,21*	37,9±1,94*
CD4, %	33,9±1,88	28,7±0,89	29,9±0,89	29,4±1,18
CD8, %	21,0±2,3	25,0±0,83	27,7±1,03	30,1±0,66
CD16, %	22,3±2,28	29,3±1,04	31,0±0,94*	31,7±1,49*
CD19, %	22,2±0,86	23,3±0,89	21,7±1,09	20,5±1,32
НСТ спонтанный, %	4,47±0,15	4,64±0,32	5,88±0,44*	4,85±0,16*
ФАН, %	34,2±3,31	37,7±1,33	40,5±1,52*	45,7±1,18*
ФЧ	4,3±0,32	4,0±0,31	3,6±0,17	7,6±0,32*
ИЗФ	1,8±0,21	2,2±0,14	2,5±0,18*	2,7±0,16*

* - P < 0,05

Фагоцитоз является важным компонентом антимикробной защиты организма, и полученные нами результаты свидетельствуют о заметной активации этого компонента клеточного ответа, а именно: количество фагирующих нейтрофилов постепенно возрастало на 10,2-18,4 %, достигая максимума на седьмые сутки развития гнойного кератоконъюнктивита (133,6 %). Показатель фагоцитарного числа в первые трое суток наблюдений имел тенденцию к уменьшению (на 7-16,3 %), а на седьмые сутки был достоверно выше начального на 76,7 %. Несмотря на неоднозначную динамику фагоцитарного числа, по мере развития воспалительного процесса, в крови больных котят мы наблюдали рост индекса завершеного фагоцитоза (до 50 % на седьмые сутки).

При оценке биохимических маркеров ответа животных на развитие гнойного воспаления конъюнктивы и роговицы, мы не наблюдали слишком выразительных их сдвигов, однако, прослеживалась тенденция к уменьшению уровня альбуминов и рост уровня глобулинов на фоне недостоверного увеличения содержания общего белка (таблица 2).

Организм животных способен реагировать на действие антигенов синтезом белков, имеющих специфическое сродство к антигену, который стимулировал этот синтез. В состав антител входят иммуноглобулины. Мы изучали иммуноглобулины классов: М, А, Е и G. Динамика исследуемых иммунологических показателей была достаточно наглядной, и у больных гнойным кератоконъюнктивитом котят характеризовалась на третьи сутки воспалительного процесса достоверным (кроме IgG) ростом содержания иммуноглобулинов и ЦИК: IgA - на 102,0 %, IgE - на 40,3 %, IgM - на 54,2 %; ЦИК - на 64,2 %, а также выраженной активацией системы комплемента. На седьмые сутки исследований были отмечены аналогичные сдвиги уровня ЦИК (на 74,5 %) и иммуноглобулинов, однако рост уровня IgG (на 36,2 %) уже был достоверным.

Таблица 2 – Динамика показателей гуморального иммунитета

Показатели	Животные			
	Клинически здоровые, n=5	С гнойным кератоконъюнктивитом, n=10		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
	M±m	M±m	M±m	M±m
Общий белок, г/л	60,16±1,13	61,5±1,15	63,34±1,05	65,0±1,04
Альбумины, г/л	29,97±0,97	29,61±0,98	27,68±0,99	28,88±1,24
Глобулины, г/л	30,2±0,89	32,19±0,87	35,66±1,43	36,17±1,52
IgA, г/л	1,96±0,17	2,34±0,07	3,96±0,52*	3,79±0,33
IgE, МЕ/мл	2,88±0,04	3,35±0,107	4,04±0,059	4,0±0,10*
IgG, г/л	6,9±0,19	7,04±0,15	7,37±0,14	9,4±0,37*
IgM, г/л	2,14±0,28	2,52±0,13	3,3±0,11*	3,6±0,11*
ЦИК, у.е	28,2±2,70	29,8±1,79	46,3±1,55*	49,2±1,41*
Активность общего комплемента, у.е	57,4±2,79	61,99±2,36	66,3±1,19	62,5±1,31
С3 компонент комплементу, г/л	0,79±0,02	0,81±0,02	0,72±0,02	0,82±0,02
С4 компонент комплементу, г/л	0,325±0,02	0,333±0,01	0,281±0,01*	0,329±0,01

* - P < 0,05

Из защитных белков у животных раньше всех начинается синтез IgM, которые блокируют распространение возбудителя в организме.

IgA являются основными иммуноглобулинами слизистых оболочек (в виде димера), однако имеются они и в крови (в виде мономеров). Димерные IgA имеют секреторный компонент, обеспечивающий проникновения молекулы через эпителий. IgA обычно вызывают агглютинацию и не способны к преципитации, они защищают слизистые оболочки от проникновения антигенов. В наших исследованиях рост содержания IgA у котиков с гнойным кератоконъюнктивитом считаем естественной защитной реакцией.

IgE находятся в сыворотке крови в небольшой концентрации, однако она возрастает при аллергических реакциях немедленного типа. Достоверный рост уровня IgE на третьи и седьмые сутки исследований может быть свидетельством развития умеренной сенсibilизации организма больных котиков.

Имуноглобулины класса G составляют около 75-80 % всех иммуноглобулинов и синтезируются зрелыми В- лимфоцитами. К этому классу иммуноглобулинов относятся основные антитела, обеспечивающие длительный гуморальный иммунитет к инфекциям. IgG участвуют в стимуляции фагоцитоза и нейтрализации бактериальных токсинов, способны к связыванию комплемента, могут действовать как опсоины. Синтез IgG и их концентрация в сыворотке крови растут из-за хронических и возвратных инфекций. Результаты наших исследований по данному показателю мы связываем с тем, что в период жизни исследуемые животные уже имели неоднократный контакт со *Staphylococcus sp.*

Таким образом, развитие гнойного кератоконъюнктивита у котиков происходит на фоне выразительной гуморальной реакции на инфекционный агент, что согласуется с результатами других исследователей [5, 6, 8, 14].

Образование циркулирующих иммунных комплексов является естественным процессом завершения гуморального иммунного ответа организма на антиген. Повышение уровня ЦИК происходит при многих аутоиммунных, онкологических и инфекционных болезнях. Известно, что одним из важных факторов, имеющих значение для проявления патогенности ЦИК, является их размер. От размера иммунного комплекса зависят его важнейшие биологические свойства - способность к активации комплемента и взаимодействию с Fc - рецепторами, что определяет безопасное удаление агрегатов системой мононуклеарных фагоцитов [12]. В наших исследованиях уже с первых суток развития гнойного кератоконъюнктивита происходило незначительное увеличение уровня ЦИК (на 5,7 %), и, хотя на третьи и седьмые сутки наблюдений этот показатель достоверно возрастал на 64,2 и 74,5 % соответственно, такая динамика является естественной и позитивной, ибо негативное влияние ЦИК наблюдают из-за кратного увеличения их уровня [13].

Система комплемента представляет собой каскад 20 белков - ферментов плазмы крови, обеспечивающих иммунную реакцию в ответ на взаимодействие антигена с антителом. Эта система отвечает за фагоцитоз, разрушения чужеродных бактерий и поддерживает воспалительную реакцию. Активация каскада комплемента может осуществляться классическим путем, при котором стимулирующим фактором является взаимодействие антигена с антителом или альтернативным путем, когда в роли этих факторов выступают полисахариды, эндотоксины или иммуноглобулины. Независимо от исходного фактора конечным продуктом активации комплемента представляет собой сложный белок, который способен разрушать мембраны клеток, содержащих антигены. Компоненты системы комплемента входят в систему врожденного иммунитета. Известны девять главных компонентов комплемента (С1 - С9), однако для оценки функционирования его системы мы проводили определение только двух С3 и С4, потому что в крови они представлены в максимальном количестве. С3 - является ключевым компонентом комплемента, участвующего в обеспечении неспецифической резистентности организма к бактериальным инфекциям. Под влиянием С3 повышается проницаемость стенок сосудов, лейкоциты мигрируют в очаги воспаления, происходит их дегрануляция, из-за чего высвобождается значительное количество биологически активных веществ. Фиксация С3 -компонента комплемента на стенке бактериальной клетки (опсонизация) усиливает фагоцитоз. Кроме того, С3 -компонент входит в состав иммунных комплексов. С3 -компонент

синтезируется в различных тканях и органах и составляет до 70 % от всех белков комплемента. Он участвует как в классическом (активируется комплексами антигена с IgG и IgM), так и в альтернативном путях активации (активируется комплексами антигена с IgA, IgE, Fab-фрагментами Ig, полисахаридными антигенами бактерий). В отличие от C3, компонент комплемента C4 синтезируется в легких и костях и участвует только в классическом пути активации системы комплемента [11]. В результате проведенных нами исследований у больных котом мы отмечали недостоверное повышение активности общего комплемента, причем, максимального показателя (115,5 %) он достигал на третьи сутки наблюдений. Что касается динамики C3-компонента, то она была волнообразной, но изменения были недостоверными, а именно: в первые сутки исследований уровень C3 вырос на 2,5 %, на третьи сутки наблюдений был на 8,9 % меньше начального, а на седьмые сутки снова превышал его на 3,8 %. Показатели C4 почти повторяли общую динамику C3, однако этот показатель в первые сутки увеличивался на 2,5 %, на третьи сутки уменьшался на 13,6 %, а на седьмые сутки только на 1,0 % превышал исходный показатель. C3 относят к белкам острой фазы и поэтому понятно повышения его уровня уже в первые сутки воспалительного процесса. Уменьшение уровня C3 на третьи сутки исследований, скорее всего, связано с его адсорбцией на иммунных комплексах. Одновременное снижение уровня C3 и C4 является признаком активации системы комплемента по классическому пути, тем более, что эти изменения совпадают с началом интенсивного образования иммунных комплексов [7, 9].

Заключение. Проведенными исследованиями установлено, что развитие гнойного кератоконъюнктивита у котом сопровождается выраженной активацией системы клеточного и гуморального иммунитета и проявляется достоверным ростом количества Т-супрессоров и натуральных киллеров, выраженным увеличением количества НСТ-положительных нейтрофилов (респираторный взрыв), интенсификацией фагоцитарной активности; увеличением содержания иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов; выраженной активацией системы комплемента преимущественно классическим путем.

Литература. 1. Алтухов Б.Н. *Этиология заболевания глаз у животных* / Б.Н. Алтухов // *Ветеринария*. – 1997 – №6. – С. 53. 2. Вельбри С.К. *Одновременная оценка уровня иммунных комплексов и иммуноглобулинов для характеристики патологического процесса* / А.М. Лиллеорг, С.Л. Линдстрем // *Лаб. дело*. — 1988. — № 5.1. — С. 7-11. 3. Гриневич Ю.А. Алферов А. Н. *Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных*. - *Лаб. дело*. 1981. 14 8. С.493-496. 4. *Іздебський В.І. Хірургічні хвороби котів* / В.І. Іздебський, С.М. Масліков, П.А. Руденко та ін. / Луганськ, «Елтон-2», 2012. — С.51-72. 5. Кишкун А. А. *Иммунологические и серологические исследования в клинической практике* / А.А. Кишкун. — М.: «Медицинское информационное агентство», 2006. — 536 с. 6. *Клиническая иммунология и аллергология* / Под ред. Г. Лора-младшего, Т. Фишера, Д. Адельмана. Пер. с англ. — М. Практика. 2000. — 806 с. 7. Насонов Е.И. *Методические аспекты определения циркулирующих иммунных комплексов с использованием полиэтиленгликоля* // *Тер. архив*. — 1987. — Т. LIX, № 4. — С. 38-45. 8. Руденко П.А. *Цитокіновий профіль сироватки крові котів за умов гнійного запалення* / П.А. Руденко // *Ветеринарна медицина України*. — 2011. — №7. — С. 25-28. 9. Новиков Д.А. *Оценка иммунного статуса* / Д.А. Новиков, В.И. Новикова. — М. — Витебский мединститут, 1996. — 282 с. 10. Чайковская А.О. *Видовой состав стафилококков в бактериальной составляющей патологии мелких домашних животных* / А.О. Чайковская, Н.А. Кузнецов // *Современные тенденции и перспективы развития животноводства: материалы XI международной конференции студентов и магистрантов «Научный поиск молодежи XXI века», посвященной 170-летию Белорусской государственной сельскохозяйственной академии*. — Горки, 2010. — С. 134. 11. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition* // Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. / New York: Garland Science; 2001. — 928 p. 12. Nangaku M., Couser W.G. *Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury* // *Clin. Exp. Nephrol.* — 2005. — V. 9. — P. 183-191. 13. Williams R.C. *Immune complexes in human diseases* // *Ann. Rev. Med.* — 1981.—V. 32. —P. 13-28. 14. Goodman J. W. *The immune response*. In: D. P. Stites, A. I. Terr (eds.), *Basic and Clinical Immunology (7th ed.)*. East Norwalk, Conn.: Appleton and Lange, 1991. Pp. 34-44.

Статья передана в печать 06.03.2014 г.

УДК 636.2:612.323/33

ОСОБЕННОСТИ ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА У КОРОВ РАЗНЫХ ВОЗРАСТОВ

Мотузко С.Н., Субботин А.М., Мотузко Н.С.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Липолитическая активность протекает интенсивно в тонком кишечнике, но более выражена была у коров после второго отела, а у молодых животных гидролиз липидов также продолжается в начале толстого кишечника.

Lipolytic activity proceeds readily in the small intestine, but was more pronounced after the second cows calving and in young animals lipid hydrolysis proceeds also at the beginning of the colon.

Ключевые слова: липолитическая активность, слизистая, содержимое, желудочно-кишечный тракт, коровы, возраст.

Keywords: lipolytic activity, mucosa, contents, gastrointestinal tract, cows, age.