

## ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЖИВОТНЫХ

**Беляева С.Н., Тучков Н.С., Деринг К.А.**

ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина», п. Майский, Российская Федерация

*Метод проточной цитометрии в иммунологической диагностике животных открывает путь к познанию нейроиммуноэндокринологии. Иммунологические тесты, проводимые на проточном цитометре, должны внедряться в практическую ветеринарную деятельность врача для постановки точного диагноза животного и определения его иммунного статуса. Установлено, что при снижении функциональной активности иммунной системы (иммуносупрессиях, иммунодефицитах) снижалось как относительное, так и абсолютное количество Т- и В-лимфоцитов и их кластеров дифференцировки (TCR, CD4 и CD8); регуляторный индекс (CD4+/CD8+), количество естественных киллерных клеток (TCR). Таким образом, иммунологические показатели цыплят в разные периоды онтогенеза необходимо использовать в сравнительном аспекте при испытании новых препаратов в птицеводстве и для изучения механизмов развития иммунного ответа. **Ключевые слова:** проточная цитометрия, иммунная система, иммунофенотипирование лимфоцитов, диагностика, птицы.*

## FLOW CYTOMETRY IN IMMUNOLOGICAL DIAGNOSTICS OF ANIMALS

**Belyaeva S.N., Tuchkov N.S., Dering K.A.**

Belgorod State Agrarian University, Maysky village, Russian Federation

*The method of flow cytometry in the immunological diagnosis of animals opens the way to the knowledge of neuroimmunoendocrinology. Immunological tests carried out on a flow cytometer should be more widely implemented in the practical veterinary activities of a doctor to make an accurate diagnosis of an animal and determine its immune status. It was found that with a decrease in the functional activity of the immune system (immunosuppressions, immunodeficiencies), both the relative and absolute number of T and B lymphocytes and their differentiation clusters (TCR, CD4 and CD8) decreased; regulatory index (CD4 +/CD8 +), natural killer cell count (TCR). Thus, the immunological indices of chickens at different periods of ontogenesis should be used in a comparative aspect when testing new drugs in poultry farming and to study the mechanisms of the development of an immune response. **Keywords:** flow cytometry, immune system, lymphocyte immunophenotyping, diagnostics, birds.*

**Введение.** Иммунологическая диагностика животных на современном этапе развития требует внедрения новых методов исследований и расширения спектра лабораторной диагностики, которые будут внедрены в производственный процесс и клиническую ветеринарную практику для оценки состояния животных (здоровья) и определения их иммунного статуса [1].

Известно, что проточная цитометрия (ПЦ) – это современная технология быстрого измерения характеристик клеток, их органелл и происходящих в них процессов. Она представляет собой эффективный подход к решению многих важных задач биологии клетки, иммунологии и клеточной инженерии. Возможности ПЦ очень широки как в клинических, так и в фундаментальных исследованиях: иммунология, трансплантация, цитология, гематология, неврология, ревматология, микробиология, вирусология, исследование стволовых клеток, онкология, клеточная и молекулярная биология, разработка лекарственных препаратов, фармакология. В молекулярной биологии ПЦ используется для изучения клеточного цикла с применением ядерных красителей, РНК- и ДНК-диагностики в виде методов флюоресцентной гибридизации [2, 4].

Цель исследования – рассмотреть возможности использования и внедрения метода проточной цитометрии для ветеринарии. В задачи исследований входило:

1. ознакомиться с применением метода проточной цитометрии в иммунологической диагностике животных;
2. определить иммунологические тесты, которые могут быть использованы для определения иммунного статуса организма птицы.

**Материалы и методы исследований.** Объектом исследования служили цыплята-бройлеры кросса Ross-508 с суточного до 42 дня откорма в условиях вивария. Были созданы несколько групп птицы по 3-6 гол. Условия содержания – клеточное. Кормление, поение и содержание согласно ветеринарно-санитарным правилам, предусмотренным для птицы. Для функциональной идентификации субпопуляций Т- и В-лимфоцитов использовали коммерческий набор моноклональных антител, направленных на обнаружение поверхностных маркеров лимфоцитов - CD3, CD4, CD8, TCR; и CD19. Определяли их методом проточной цитофлюориметрии в реакции иммунофлюоресценции, которая наблюдается непосредственно в проточном цитометре (FACSCalibur, фирмы «Becton Dickinson», USA при использовании программы CellQuest) [1].

**Результаты исследований.** Выяснено, что методом проточной цитометрии можно определять следующие важные составляющие в иммунологической диагностике животных:

- *Исследование фагоцитоза.* Метод проточной цитометрии даёт возможность оценить практически все параметры фагоцитарного звена иммунной системы, где наряду с идентификацией поверхностных рецепторных молекул фагоцитов, широко применяют и иные подходы к изучению функционального состояния клеток [3]. Также один из распространённых показателей, применяемых для оценки фагоцитарного звена – это оценка поглотительной активности моноцитов периферической крови и фагоцитов.

- *Тест на аллергическую реакцию.* Использование данного метода дало недоступную ранее возможность - определять наличие сенсибилизации к аллергенам (например, таким как лекарственные препараты), выявлять аллергические состояния, не связанные со специфическим IgE-ответом, диагностировать и дифференцировать псевдоаллергические реакции и т.д. [6]

- *Имунофенотипирование лимфоцитов.* Можно дифференцировать лимфоциты, связавшие на своей поверхности различные антигены. В ряде случаев важно также определение интенсивности свечения анализируемых лимфоцитов, что отражает выраженность экспрессии антигена на поверхности клеточной мембраны [7].

- Оценка функциональной активности натуральных киллерных клеток (NK). Анализ может быть количественным – идентификация NK и функциональным – определять способности NK лизировать клетки-мишени. Метод показывает высокую степень корреляции с классическим радиоизотопным цитотоксическим тестом.

В ходе лабораторного опыта в условиях вивария нами были апробированы основные диагностические тесты, изученные методом проточной цитометрии для определения функциональной активности иммунной системы птицы: количественная оценка Т- и В-лимфоцитов (CD3 и CD19) в крови и лимфоидных органах птицы (тимус, бурса, селезенка) и кластеров дифференциации Т-клеток (TCR, CD4 и CD8); определение иммунорегуляторного индекса (CD4+/CD8+).

Установлено, что при снижении функциональной активности иммунной системы (иммуносупрессиях, иммунодефицитах) снижалось как относительное, так и абсолютное количество Т- и В-лимфоцитов и их кластеров дифференцировки (TCR, CD4 и CD8); регуляторный индекс (CD4+/CD8+), количество естественных киллерных клеток (TCR).

Объективным тестом, позволяющим оценить активность лимфоцитов, служит регуляторный индекс CD4 + /CD8 + (соотношение хелперов к супрессорам). Снижение иммунорегуляторного индекса свидетельствует об иммунодефицитах. Повышение иммунорегуляторного индекса – это благоприятный тест, который происходит за счет увеличения CD4+ Т-лимфоцитов, что свидетельствует об увеличении как клеточного иммунитета через 1-й класс Т-хелперов (Th1) по линии активации макрофагов с помощью секреции цитокинов, так и гуморального звена в виде продукции антител через участие 2-го класса Th2 [8].

В процессе становления морфофункциональной зрелости иммунной системы птиц, к третьей неделе жизни, у цыплят начинает более активно включаться гуморальный иммунитет: с 15-х по 35-е сутки (таблица).

**Таблица - Количество Т- и В-лимфоцитов в периферической крови цыплят-бройлеров**

Группы, n=3-6	Лейкоциты, тыс/мкл	Кол-во лимфоцитов крови, % (всего)		Т-лимфоциты, % (CD3+)		В-лимфоциты, % (CD19+)	
		(%)	(тыс/мкл)	(%)	(тыс/мкл)	(%)	(тыс/мкл)
<b>На 15-е сутки исследований</b>							
Ik	20,28±2,79	71,84±3,87	14,57±0,79	19,94±1,59	2,91±0,18	3,70±0,61	0,54±0,13
II	26,70±2,35	73,0±1,98	19,49±0,53	20,37±1,97	3,97±0,53	3,90±0,35	0,76±0,09
IIa	27,80±1,77	60,83±8,28	16,91±2,30	17,29±4,72	2,92±1,31	5,07±0,27	0,86±0,02
III	21,33±3,11	72,67±3,20	15,50±0,26	22,82±2,34	3,54±0,49	3,68±0,61	0,57±0,13
IIIa	20,97±1,56	70,59±2,85	14,80±0,61	19,50±1,63	2,89±0,20	3,80±2,04	0,56±0,04
IV	21,80±1,62	69,67±6,64	15,19±1,45	22,51±2,14	3,42±0,44	3,86±0,72	0,59±0,05
IVa	22,67±2,89	72,11±4,21	16,35±1,03	20,0±2,43	3,17±0,23	3,59±1,11	0,59±0,03
<b>На 21-е сутки исследований</b>							
III	25,01±1,27	71,77±4,06	17,95±1,01	16,23±1,20*	2,91±0,30	4,90±0,29*	0,88±0,10
IIIa	24,17±2,82	59,10±3,18	14,28±0,77	13,56±2,34*	1,94±0,57	4,32±1,66	0,62±0,40
IV	23,40±2,17	70,68±6,34	16,54±1,48	19,30±2,69	3,19±1,24	8,44±1,65*	1,40±0,39

IVa	33,78±3,06	69,67±0,33	23,53±0,11	9,47±1,29**	2,23±0,44	5,12±0,64	1,20±0,22
<b>На 26-е сутки исследований</b>							
Ik	29,99±3,33	65,0±3,01	19,49±1,11	20,0±1,91	3,90±0,71	9,0±1,0***	1,77±0,38
II	34,77±4,24	69,50±2,79	24,16±0,97	22,85±1,56	5,52±0,54	9,07±0,31**	2,19±0,11
III	30,82±1,74	70,83±4,39	21,83±1,35	19,35±1,31	4,22±1,09	8,90±0,99*	1,94±0,31
IIIa	28,57±2,30	60,50±7,92	17,29±2,26	15,84±1,33	2,74±0,36	8,32±0,96*	1,44±0,27
IV	27,10±2,62	67,17±3,42	18,20±0,93	22,29±3,40	4,06±1,43	9,76±1,71	1,78±0,46
IVa	34,73±2,3	65,83±3,96	22,86±1,37	15,43±1,69*	3,53±1,38	8,77±1,47*	2,0±0,90
<b>На 35-е сутки исследований</b>							
Ik	30,25±1,98	61,17±4,27	18,50±1,29	21,28±1,93	3,94±0,44	8,35±0,60	1,54±0,53
II	31,90±2,09	64,40±2,94	20,54±1,03	24,89±4,12	5,11±1,32	8,37±1,11	1,72±0,35
III	36,27±4,34	65,0±5,26	23,58±1,59	20,04±2,79	4,73±0,71	8,49±1,32	2,0±0,33
IV	27,17±2,42	69,84±2,94	18,98±0,90	21,24±1,88	4,03±0,51	8,36±1,35	1,59±0,37

Все Т-лимфоциты, имеют на своей поверхности TCR – пептид, отвечающий за специфическое распознавание комплекса МНС I класса. Показатели корцептора CD3 (Т-лимфоциты) цыплят состоят из двух популяций CD4 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) и CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>).

В процессе онтогенеза птицы соотношение Т- и В- лимфоцитов в крови оставалось постоянным: Т – (65-85 %) / В – (15-35 %) (таблица).

**Заключение.** Таким образом, метод проточной цитометрии в иммунологической диагностике животных являются объективным, точным и быстрым, открывающий путь к познанию нейроиммуоэндокринологии. Иммунологические тесты, проводимые на проточном цитометре, должны прочно внедряться в практическую ветеринарную деятельность врача для постановки точного диагноза животного и определения его иммунного статуса. Иммунологические показатели цыплят в разные периоды онтогенеза необходимо использовать в сравнительном аспекте при испытании новых препаратов в птицеводстве и для изучения механизмов развития иммунного ответа в процессе роста и развития организма птицы.

**Литература.** 1. Беляева, С. Н. Иммунобиохимические показатели крови у цыплят в разные периоды онтогенеза / С. Н. Беляева // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2019. – № 1. - С. 223–226. 2. Деринг, К. А. Фундаментальные и прикладные области применения проточной цитометрии / К. А. Деринг, С. Н. Беляева // Горинские чтения. Инновационные решения для АПК : материалы Международной студенческой научной конференции. - Майский : Изд-во ФГБОУ ВО Белгородский ГАУ, 2023. – С. 83-84. 3. Применение проточной цитометрии в иммунодиагностике / Д. В. Мазуров [и др.] // Медицинская иммунология. - 2002. - № 4-5. – URL : <https://cyberleninka.ru/article/n/primeneniye-protocnoy-tsitometrii-v-immunodiagnostike>. - Дата обращения : 27.09.2023. 4. Тучков, Н. С. Возможности использования проточной цитометрии / Н. С. Тучков, С. Н. Беляева // Горинские чтения. Инновационные решения для АПК : материалы Международной научной конференции, Майский, 14–15 марта 2023 года. Том 2. – Майский : Белгородский государственный аграрный университет имени В. Я. Горина, 2023. – С. 85-86. 5.

Хайдуков, С. В. Расширение возможностей метода проточной цитометрии для клинико-иммунологической практики / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка // Медицинская иммунология. - 2008. - № 1. - URL : <https://cyberleninka.ru/article/n/rasshirenije-vozmozhnostey-metoda-protocnoy-tsitometrii-dlya-kliniko-immunologicheskoy-praktiki>. - Дата обращения : 27.09.2023. 6. Boumiza, R. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives / R. Boumiza, A.-L. Debard, G. Monneret // Clin. Mol. Allergy. - 2005. - Vol. 3, № 9. - P. 1-8. 7. Lazda, V. Participation of different cell population in antigen- and mitogen-induced lymphocyte proliferation / V. Lazda, P. Baram // J. of Immunology. - 1974. - V. 12. - P. 1705-1717. 8. Jeurissen, S. H. M. Structure and function of lymphoid tissue of the chicken / S. H. M. Jeurissen, L. Vervelde, E. M. Jansen // Poultry. Sci. Rev. - 1994. - Vol. 5. - P. 183-207.

УДК 619:616,15+619:636.2

## **МОРФОЛОГИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ТЕЛЯТ ПРИ ГАСТРОЭНТЕРИТЕ**

**Бибикова В.Р., Шарафутдинова Е.Б., Жуков А.П.**

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет»,  
г. Оренбург, Российская Федерация

Целью исследования явилось изучение особенностей структуропостроения фации сыворотки крови (СК) телят 3-недельного возраста, больных острым катаральным гастроэнтеритом, на высоте развития патологического процесса. Для исследования СК использовали метод клиновидной дегидратации, при котором получали исходную (И) и суточную (С) фации СК. Методом клиновидной дегидратации СК создаются условия для системной и локальной самоорганизации этих молекул, которые формируют в ФСК специфические образования – маркёры, доступные для визуального анализа. Установлен маркёр; который выявлен во всех И-фациях СК больных телят – это языковые структуры, которые в большинстве случаев были представлены фракталами Арнольда и реже Серпинского.

Наиболее частыми сочетаниями маркёров являлись: языковые структуры + двойная линия + трещины закрутки и шипы в 53,3 % случаев, токсические бляшки + языковые структуры + штриховые и широкие трещины в 40 %.

И первое, и второе сочетание маркёров сопровождалось яркими клиническими симптомами и характеризовало высоту развития патологического процесса. **Ключевые слова:** телята, гастроэнтерит, сыворотка крови, клиновидная дегидратация, фация, маркёры, фракталы, морфотипы.

## **MORPHOLOGIA OF THE SERUM FACIES IN CALVES WITH GASTROENTERITIS**

**Bibikova V.R., Sharafutdinova E.B., Zhukov A.P.**

Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russian Federation

The aim of the study was to study the structural features of the blood serum facies of SC of calves of 3 weeks of age, patients with acute catarrhal gastroenteritis, at the