



УДК 616-006.04/616.155.32

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОДЕРЖАНИЯ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ, ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ОСНОВНЫХ КЛАССОВ И ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ (ЦИК) У ИНФИЦИРОВАННЫХ BLV И УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРОЙ КОРОВ

¹А.И.Павлова, доктор ветеринарных наук, профессор

²П.Н. Смирнов, доктор ветеринарных наук, профессор

¹Л.П. Корякина, кандидат ветеринарных наук, доцент

²Т.В. Гарматарова, кандидат биологических наук, доцент

²О.С. Котлярова, кандидат биологических наук, доцент

²В.Е. Разумная, магистрант

²П.Л. Романов, магистрант

¹Якутская государственная сельскохозяйственная академия

²Новосибирский государственный аграрный университет

E-mail: ngaufiziologi@mail.ru

Ключевые слова: крупный рогатый скот, инфицированные BLV коровы, иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы, Т- и В-лимфоциты.

Для проведения данных исследований, в рамках изучения влияния биотических (вирусной природы) факторов на иммунную систему крупного рогатого скота, была подобрана панель наиболее информативных тестов, включающих количественное содержание Т- и В-лимфоцитов, показатели синтеза иммуноглобулинов основных классов, концентрацию циркулирующих иммунных комплексов.

COMPARATIVE INDICES OF T-AND B-LYMPHOCYT CONTENT, IMMUNOGLOBULINS OF MAIN CLASSES AND CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES (CIC) IN INFECTED BLV AND CONDITIONLY-PATHOGENIC MICROFLOROUS OF COWS

¹Pavlova A.I., Doctor of Veterinary Science, Professor

²Smirnov P.N., Doctor of Veterinary Science, Professor

¹Koriakina L.P., Candidate of veterinary sciences, assistant professor

²Garmatarova T.V., Candidate of Biological Sciences, assistant professor

²Kotliarova O.S., Candidate of Biological Sciences, assistant professor

²Razymnaia V.E., Graduate student

²Romanov P.L., Graduate student

²Reasonable B.E., undergraduate

²Novels P.L., master student

¹Yakut State Agricultural Academy

²Novosibirsk State Agrarian University

Key words: cattle, Infected BLV cows, Immunoglobulins, circulating immune complexes, T- and B-lymphocytes.

To carry out these studies, as part of the study of the influence of biotic (viral nature) factors on the immune system of cattle, a panel of the most informative tests was selected, including the quantitative content of T and B lymphocytes, the immunoglobulin synthesis of the main classes, and the concentration of circulating immune complexes.

Одной из актуальных проблем эпизоотического благополучия продуктивного животноводства в стране является компрометация дойных стад к лейкозной (BLV) инфекции. В связи с тем, что в соответствии с действующими Правилами о мероприятиях по борьбе и профилактике лейкоза крупного рогатого скота от инфицированных BLV коров молоко подлежит промпереработке, таких животных в принципе в стадах не должно быть. Этого требуют и надзорные органы в рамках ГОСТов, предусмотренных Всемирной торговой организацией (ВТО). BLV-носительство не только сказывается на качестве молока, но одновременно приводит к снижению резистентности коров. Следовательно, такие животные составляют группу риска. Отсюда возникла задача получения объективных научных знаний о влиянии BLV на организм вирусоносителей.

Для этого нами была поставлена цель провести сравнительные исследования содержания Т- и В-лимфоцитов, основных классов иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов у инфицированных BLV и условно-патогенной микрофлорой коров.

Для реализации поставленной цели были использованы коровы одного из хозяйств Якутии. Животных распределили на три группы. Коровы всех групп были подобраны по принципу аналогов (3–4-й лактации, примерно одинаковой продуктивности и одной породной принадлежности – голштинизированные помеси).

В 1-ю группу вошли 36 клинически здоровых коров, интактных в отношении BLV, во 2-ю группу – 42 инфицированные BLV коровы, т. е. с бессимптомной инфекцией, и в 3-ю группу – 18 инфицированных BLV и одновременно гинекологически больных (с послеродовыми осложнениями – эндометритами, вульвовагитами), сопровождавшимися, безусловно, контаминацией условно-патогенной микрофлорой.

Сравнительные исследования животных всех трех групп проводили в одно и то же время (в один и тот же день).

Для определения циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) мы использовали один из наиболее распространенных методов выявления иммунных комплексов – осаждение в ПЭГ молекулярной массой 6000 (ПЭГ 6000) [1]; 0,01 М боратный буфер использовали для приготовления 3%-х и 4%-х растворов ПЭГ 6000.

Для иммунологических реакций применяли плоскодонные 96-луночные планшеты.

Сыворотку крови испытуемых животных в объеме 0,0035 мл добавляли в 3 лунки планшета: 1) 0,3 мл боратного буфера (контроль); 2) 0,3 мл 3%-го р-ра ПЭГ6000; 3) 0,3 мл 4%-го раствора ПЭГ6000. Инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Величину оптической плотности учитывали против контроля при длине волны 450 нм в режиме абсорбции на вертикальном спектрофотометре Multiskan MCC 340. Количество ЦИК выражали в условных единицах.

Определение концентрации Т-лимфоцитов осуществляли по методике Р.В. Петрова и Р.М. Хаитова [2] в нашей модификации, адаптированной на биоматериале от крупного рогатого скота.

Концентрацию иммуноглобулинов основных классов в сыворотке крови животных определяли по методике В. М. Чекишева [3] в нашей модификации [4, 5] в горизонтальном электрофорезе в геле агарозы марки В.

Сравнительные исследования животных всех трех групп показали, что наиболее высокое содержание Е-РОК (Т-клеток) имело место в периферической крови серопозитивных гинекологически больных коров, т.е. BLV-инфекция в ассоциации с условно-патогенной микрофлорой ($67,2 \pm 5,4\%$ и $2,8 \pm 0,5 \times 10^9/\text{л}$ против $57,6 \pm 2,1\%$ и $1,8 \pm 0,3 \times 10^9/\text{л}$ клеток в контроле).

Выявленная разница позволяет сделать заключение (с учетом тропизма BLV-клеток к В-клеткам) о том, что у гинекологически больных коров происходит стимуляция клеточного звена ИКС. При этом возможная иммуностимулирующая роль BLV исключена, поскольку достоверной разницы в данном показателе ИКС между инфицированными BLV (2-я группа) и инактными в отношении вируса (1-я группа – контроль) не выявлено, хотя и отмечено некоторое снижение уровня Е-РОК у серопозитивных к данному вирусу животных (табл. 1).

Таблица 1

Показатели относительного и абсолютного содержания Т- и В- лимфоцитов в крови коров

Группа	Т-лимфоциты		В-лимфоциты	
	%	$\times 10^9$	%	$\times 10^9$
1-я	$64,0 \pm 3,6$	$2,4 \pm 0,2$	$31,5 \pm 2,2$	$1,3 \pm 0,3$
2-я	$57,6 \pm 2,1^*$	$1,8 \pm 0,3$	$25,4 \pm 3,6$	$1,0 \pm 0,1$
3-я	$67,2 \pm 3,1^*$	$2,8 \pm 0,2^*$	$28,7 \pm 3,8$	$0,8 \pm 0,1^*$

* Разница с контролем достоверна.

Таким образом, мы предполагаем, что активизация синтеза Т-лимфоцитов (суммарный показатель) у гинекологически больных (РИД+) коров явилась естественной адаптационной реакцией организма на «букет» экологических (бактериально-вирусной природы) факторов.

В определенной мере это подтверждается показателями пролиферации В-лимфоцитов (ЕАС-РОК). У коров, инфицированных BLV и одновременно с послеродовыми осложнениями (3-я группа), этот показатель снижен. При этом абсолютно исключать роль BLV в снижении продукции В-лимфоцитов мы не вправе. Следовательно, патологические процессы органов репродукции стимулируют ингибицию гуморального звена ИКС.

В данном случае мы фиксируем факт стимуляции клеточного звена (за счет активации пролиферации Е-РОК) и ингибицию гуморального звена (снижение ЕАС-РОК).

Данную количественную перестройку в продукции иммунокомпетентных клеток мы рассматриваем отнюдь не как патологию, а как адаптивную (более того, компенсаторную) реакцию организма на восстановление функционального гомеостаза организма в конкретных экологических условиях. Поэтому, допустим, если бы в данном случае мы не обнаружили какой-то заметной количественной перестройки продукции иммунокомпетентных клеток (у гинекологически больных, тем более инфицированных BLV) животных, то это могло бы служить основанием квалифицировать данное состояние как иммунодефицитное (в худшем варианте) или же как гипофункцию ИКС (в «лучшем» варианте).

Резюмируя изложенное, следует сказать, что данным опытом мы еще раз подтвердили относительно высокую приспособительную (адаптационную) гибкость ИКС животных в ответ на BLV-инфекцию и другую (воспалительного характера) патологию.

Для получения более полной информации об изменении концентрации ЦИК в сыворотке крови коров под влиянием некоторых факторов опытные группы коров были исследованы на

Т- и В-лимфоциты. Интервалы между исследованиями составили 8–10 дней. Причем через 9 дней после первого исследования животным всех трех групп ввели препарат цидектин (противопаразитарное средство с широким спектром действия) (табл. 2).

Таблица 2

Динамика средних показателей содержания ЦИК в сыворотке крови коров

Группа	Среднее содержание ЦИК, ед. опт. плотн. $\times 10^3$			
	до обработки цидектином	после обработки цидектином		
		через 8 дней	через 10 дней	через 45 дней
1-я	47,0 $\pm$ 6,0	58,0 $\pm$ 6,0	61,0 $\pm$ 5,0	76,0 $\pm$ 4,0
2-я	62,0 $\pm$ 6,0	73,0 $\pm$ 4,0	53,0 $\pm$ 4,0	60,0 $\pm$ 6,0
3-я	65,0 $\pm$ 12,0	77,0 $\pm$ 8,0	69,0 $\pm$ 9,0	71,0 $\pm$ 8,0

Из табл. 2 видно, что при первом и втором исследованиях тенденция к некоторому увеличению массы ЦИК имела место у животных всех подопытных групп, что, по-видимому, являлось результатом воздействия на организм коров какого-то общего иммуностимулирующего фактора в этот период. А вот после введения цидектина иммунный ответ у животных каждой группы имел свои тенденции. Так, масса ЦИК у здоровых серонегативных к BLV коров в течение 10 дней сохранялась практически на том же уровне, а через 30 дней достоверно повышалась (с 61,0 $\pm$ 5,0 до 76,0 $\pm$ 4,0 усл. ед.), что указывало на активную иммунологическую реакцию организма на заданный ксенобиотик (цидектин). Однако у коров, скомпрометированных в отношении BLV, ответ на цидектин был слабее, чем до введения препарата, во все периоды исследований (с 73,0 $\pm$ 4,0 до 53,0 $\pm$ 4,0 и 60,0 $\pm$ 6,0 усл. ед.). У коров 3-й группы выявилась та же тенденция в динамике ЦИК, что и во 2-й группе, но на несколько более высоком уровне (на 12 единиц).

Для достоверного подтверждения результатов мы провели исследование концентрации иммуноглобулинов G₁ и G₂ в сыворотке крови этих же животных.

Таблица 3

Динамика показателей IgG₁ и IgG₂ в сыворотке крови коров, г/л

Показатель		Группа		
		1-я	2-я	3-я
До введения цидектина	IgG ₁	18,3 $\pm$ 3,0	15,8 $\pm$ 2,2	16,4 $\pm$ 2,6
	IgG ₂	13,7 $\pm$ 1,7	14,0 $\pm$ 2,8	14,4 $\pm$ 2,3
После введения цидектина через 8 дней	IgG ₁	14,0 $\pm$ 1,3	15,8 $\pm$ 2,7	19,4 $\pm$ 1,8
	IgG ₂	14,2 $\pm$ 2,2	15,2 $\pm$ 2,1	13,6 $\pm$ 1,6
через 10 дней	IgG ₁	17,6 $\pm$ 2,8	16,1 $\pm$ 3,0	19,3 $\pm$ 3,6
	IgG ₂	18,6 $\pm$ 0,9*	12,4 $\pm$ 3,4	14,6 $\pm$ 1,2
через 45 дней	IgG ₁	15,7 $\pm$ 1,8	16,0 $\pm$ 2,4	12,3 $\pm$ 1,7
	IgG ₂	15,8 $\pm$ 3,1	13,3 $\pm$ 3,8	15,6 $\pm$ 0,9

*Разница в показателе IgG₂ с другими сравниваемыми группами животных достоверна.

До обработки цидектином уровень IgG₁ в сыворотке крови коров 1-й группы (табл. 3) был несколько выше, чем в среднем по группам животных, но разница недостоверна. Через 8 дней достоверной разницы в концентрации IgG₁ и IgG₂ также не выявлено. Но через 10 дней после введения цидектина в сыворотке крови серонегативных, клинически здоровых коров содержание IgG₂ достоверно превышало таковое у животных двух других групп (18,6 $\pm$ 0,9 против 12,4 $\pm$ 3,4 и 14,6 $\pm$ 1,2). В более отдаленные сроки каких-то различий в концентрации IgG₁ и IgG₂ не

установили. По всей вероятности, к этому периоду (через 47 дней после инъекции цидектина) иммунная система у животных всех подопытных групп в функциональном отношении пришла в относительную норму.

Итак, динамические исследования позволяют нам сделать заключение о том, что изменение количественного состава иммунокомпетентных клеток в сторону повышения или снижения не есть нарушение клеточного гомеостаза, пусть даже кратковременное, а не что иное, как структурная реакция организма на поддержание его функционального гомеостаза. В данном случае – обеспечение иммунологической защиты от вредных (биологической природы) факторов окружающей среды.

Клинически здоровые, нескомпрометированные в отношении ВЛКРС животные наиболее активно отвечают на цидектин формированием иммунных комплексов, в то время как у инфицированных вирусом лейкоза, и тем более гинекологически больных, иммунный ответ на ксенобиотик, в данном случае цидектин, проявляется более вяло. Последнее, по-видимому, сопровождается затяжным иммунодепрессивным состоянием, вызванным, к тому же, самим ксенобиотиком, как было подтверждено и по концентрации иммуноглобулинов G_1 и G_2 в сыворотке крови животных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Трунов А. Н. Фазность продукции иммуноглобулинов и образование циркулирующих иммунных комплексов при инфекционно-воспалительных заболеваниях гениталий женщин: дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 1990. – 140 с.
2. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии // Иммунология. – 1994. – № 6. – С. 6–9.
3. Чикишев В. М. Количественное определение иммуноглобулинов в сыворотке крови животных: метод. указания / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 1977. – 20 с.
4. Панель наиболее информативных тестов для оценки резистентности животных: метод. рекомендации / П. Н. Смирнов, Н. В. Ефанова, В. В. Храмцов [и др.]. – Новосибирск, 2013.
5. Смирнов П. Н., Гарматарова Т. В. Показатели естественной резистентности у инфицированных BLV и интактных к вирусу телок случного возраста // Вестн. НГАУ. – 2014. – № 4 (33). – С. 146–149.

REFERENCES

1. Trunov A. N. The power phase of the production of immunoglobulins and the formation of circulating immune complexes in infectious and inflammatory diseases of women's genitals: dis... Cand. med. Sciences. – Novosibirsk, 1990. – 140 c.
2. Petrov R. V., Khaitov R. M., Pinegin B. V. Assessment of human immune status in health and disease // Immunology. – 1994. – No. 6. – C. 6–9.
3. Chikishev V. M. Quantitative determination of immunoglobulins in the blood serum of animals: method. instructions / agricultural Sciences Sib. otd., Novosibirsk, 1977. – 20 c.
4. A panel of the most informative tests to assess the resistance of animals: method. recommendations/Smirnov P. N., Efanova, N. V., Khramtsov [et al].- Novosibirsk, 2013.
5. Smirnov P. N., Garmatron T. V. Indicators of natural resistance in intact and infected with BLV virus heifers slucero age//Vestn. Ngau. – 2014. – № 4 (33). – P. 146–149.