

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

<http://nvlvet.com.ua/>

УДК 619:636.71:616-03:616-036:616-097:521.27

Стан клітинної ланки імунітету у цуценят за умов вакцинації та дії нового комплексного препарату у формі ліпосомальної емульсії

М.М. Брошков¹, О.І. Віщур², І.В. Кичун², С.І. Федоришин², В.В. Парченко³
vishchur_oleg@ukr.net

¹Одеський національний медичний університет,
вул. Ольгіївська, 2, м. Одеса, 65082, Україна;

²Інститут біології тварин НААН,
вул. В.Стуса, 38, м. Львів, 79024, Україна;

³Запорізький державний медичний університет,
пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035, Україна

Пошук нових імуноактивних препаратів як і способів їх застосування для підвищення імунного потенціалу організму тварин за умов вакцинації є актуальною проблемою для тваринництва. Мета досліджень полягала у з'ясуванні впливу введення цуценятм нового комплексного препарату, що містить піперидиній 2-[5-(фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілтіо] ацетат, жиророзчинні вітаміни, твін, лецитин у формі ліпосомальної емульсії на стан клітинної ланки імунної відповіді організму за умов вакцинації. Дослід проведено на двох групах одномісячних цуценят по чотири тварини у кожній, породи лабрадор. Після попередньої дегельмінтизації і клінічного огляду всіх цуценят імунізували вакциною Nobivac Puppy DP (A139c01) згідно настанови для застосування. Дослідній групі цуценят додатково вводили вказаний препарат підшкірно, дворазово: перший раз разом з вакциною окремою ін'єкцією і вдруге через 72 години після вакцинації.

Кров у тварин брали двічі: перший раз безпосередньо перед вакцинацією і вдруге через 14 днів після імунізації. У крові визначали абсолютну кількість лейкоцитів та відносну кількість Т- і В-лімфоцитів та їх імунорегуляторних популяцій, фагоцитарну активність нейтрофілів та кількість НК-клітин.

Дослідження показали, що імунізація цуценят контрольної групи вакциною проти парвовірусного ентериту та чуми м'ясоїдних призводить до підвищення абсолютної кількості лейкоцитів, зниження відносної кількості Т- і В-лімфоцитів, фагоцитарної активності нейтрофілів та істотно не впливає на число НК-клітин.

Підшкірне введення цуценятм дослідній групі досліджуваного препарату у формі ліпосомальної емульсії за умов вакцинації спричиняє тенденцію до зростання відносної кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-резистентних) та НК-клітин і зниження на 4,6% фагоцитарної активності нейтрофілів крові.

Отже, застосування цуценятм нового комплексного препарату у формі ліпосомальної емульсії на тлі їх вакцинації проти парвовірусного ентериту та чуми м'ясоїдних спричиняє стимулювальний вплив на клітинну ланку імунної відповіді організму, про що свідчить більша кількість Т-лімфоцитів та їх регуляторних популяцій і НК-клітин. Водночас констатовано інгібуєчий вплив досліджуваного препарату на процеси фагоцитозу нейтрофілів крові.

Ключові слова: лейкоцити, лімфоцити, фагоцитарна активність нейтрофілів, nk-клітини, імунорегуляторний індекс.

Status of the cellular link of immunity in dogs under conditions of vaccination and action of «Trifusol» in the form of liposomal emulsion

М.М. Broshkov¹, O.I. Vishchur², I.V. Kychun², S.I. Fedoryshyn², V.V. Parchenko³
vishchur_oleg@ukr.net

¹Odessa National Medical University, Ukraine

Citation:

Broshkov, M.M., Vishchur, O.I., Kychun, I.V., Fedoryshyn, S.I., Parchenko, V.V. (2017). Status of the cellular link of immunity in dogs under conditions of vaccination and action of «Trifusol» in the form of liposomal emulsion. *Scientific Messenger LNUVMB*, 19(82), 166–169.

2, Olgievskaya st., Odessa, 65082, Ukraine;

²Institute of Animal Biology NAAS, Ukraine

38, V.Stusa st., Lviv, 79034, Ukraine;

³Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

26, Majakovskogo, Zaporizhzhia, 69035, Ukraine

The investigations for new immunoactive drugs as well as the methods of their use to increase the immune potential of animals in the context of vaccination is a actual problem for livestock breeding. The aim of the research was to find out the effect of the introduction of new complex drug piperidiny 2- [-5-(furan-2-il)-4-fenil-1,2,4-triazol-3-iltio] acetate fat-soluble vitamins, twin, lecithin in the form of a liposomal emulsion to the puppies on the state of the cellular link of the immune response of the body under vaccination conditions.

The experiment was conducted on two groups of one-month Labrador puppies per four animals in each. After a preliminary deworming and clinical examination all puppies were immunized with the Nobivac Puppy DP (A139c01) vaccine according to the manual. The experimental puppy group was additionally administered the this drug in the form of a liposomal emulsion subcutaneously, twice: the first time with the vaccine by separate injection and the second time 72 hours after vaccination.

Blood in animals was taken twice: the first time immediately before vaccination and the second time in 14 days after immunization. In the blood the absolute amount of leukocytes and the relative number of T- and B-lymphocytes and their immunoregulatory populations, the phagocytic activity of neutrophils, and the number of NK cells were determined.

Studies have shown that the immunization of puppies in the control group with the vaccine against parvovirus enteritis and plague of carnivores leads to an increase in the absolute amount of leukocytes, a reduction in the relative number of T- and B-lymphocytes, phagocytic activity of neutrophils, and does not significantly affect the number of NK cells.

Subcutaneous administration to the puppies of the experimental group of preparation in the form of liposomal emulsion under vaccination causes a probable increase in the relative number of T-lymphocytes (common and theophylline-resistant) and NK-cells and a 4.6% decrease in the phagocytic activity of neutrophils of blood.

Thus, the use of new drug in the form of a liposomal emulsion for puppies under vaccination against parvovirus vulgaris and plague of carnivores causes stimulatory action on the cellular link of the immune response of the organism, as evidenced by a greater number of T-lymphocytes and their regulatory populations and NK cells. At the same time, the inhibitory effect of the drug on the processes of phagocytosis of blood neutrophils was confirmed.

Key words: leukocytes, lymphocytes, phagocytic activity of neutrophils, NK-cells, immunoregulatory index.

Вступ

Відомо, що одним з критичних періодів розвитку у собак є 2-3 місячний вік. Це пов'язано, по-перше, з тим, що у цей період здійснюються заходи щодо імунізації і зазвичай дво- або триразової, що може спричинити імуносупресивний вплив на організм. По-друге, саме в цьому віці в організмі тварин відбувається зміна фетального гемоглобіну на власний, що призводить до виникнення фізіологічної анемії (Tizard and Saunders, 1996).

З огляду на це, пошук шляхів для підвищення імунного потенціалу тварин і зниження побічних впливів вакцинації на організм у цей період, а також оптимізація фармакологічних засобів, використовуваних для проведення імунокорекції, є актуальними як у науковому так і практичному значенні.

Включення лікарських препаратів у ліпосоми може значно підвищити їх терапевтичну ефективність, оскільки, з одного боку, препарат, який міститься в ліпосомі, захищений її мембраною від дії несприятливих факторів, а з іншого – сама мембрана не дозволяє токсичному препарату перевищити припустиму концентрацію в біологічних рідинах організму (Varpachovskaja, 1999; Ohorodnyk et al., 2016). Ліпосома при цьому виконує роль транспортера, з якого препарат вивільняється поступово, у потрібних дозах та місцях і впродовж певного проміжку часу.

Як носії лікарських препаратів ліпосоми, мають низку переваг: вони захищають клітини організму від токсичної дії лікарських засобів, пролонгують дію введеного в організм лікарського засобу, захищають лікарські речовини від деградації, сприяють спрямованій специфічності за рахунок селективної проник-

ності з крові в тканини, змінюють фармакокінетику лікарських препаратів, підвищуючи їх фармакологічну ефективність, дозволяють створювати водорозчинну форму низки лікарських субстанцій, таким чином збільшуючи їх біодоступність (Juliano and Stamp, 1975; Goren et al., 1996).

Корекція імунної системи шляхом використання нових імуноактивних препаратів з метою підвищення специфічної імунної відповіді організму тварин за умов вакцинації є перспективним напрямом досліджень, а пошук таких препаратів, як і методів їх застосування – актуальною проблемою для тваринництва, про що висловлюється багато авторів (Israfi et al., 1996; Zhiljakova, 2006; Ohorodnyk et al., 2016).

В Україні вітчизняними вченими розроблений препарат – «Трифузол». Діюча речовина препарату – піперидиний 2-[5-(фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо] ацетат належить до похідних тріазолу. Механізм дії активної діючої субстанції полягає в активізації біохімічних процесів у клітинах тканин. Препарат має антиоксидантну, імуномодулюючу, протизапальну, гепатопротекторну та детоксикаційну дію.

З огляду на це мета досліджень полягала у з'ясуванні впливу парентерального введення цуценят нового комплексного препарату, що містить піперидиний 2-[5-(фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо] ацетат, жиророзчинні вітаміни, твін, лецитин у формі ліпосомальної емульсії на формування клітинної ланки імунної відповіді організму за умов вакцинації.

Матеріал і методи досліджень

Для дослідження використовували периферичну кров одномісячних цуценят з одного гнізда, породи лабрадор, яку брали з ліктьової вени в пробірці з антикоагулянтом (EDTA). Всього в досліді використовували кров від восьми цуценят: 4 дослідна група і 4 контрольна. Після попередньої дегельмінтизації і клінічного огляду всім цуценят проводили вакцинацію з використанням вакцини Nobivac Puppy DP (A139c01) згідно настанови для застосування. Дослідній групі цуценят додатково вводили новий комплексний препарат, що містить піперидиній 2-[5-(фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілтіо] ацетат, жиророзчинні вітаміни, твін, лецитин у формі ліпосомальної емульсії підшкірно, дворазово: перший раз разом з вакциною окремою ін'єкцією і вдруге через 72 години після вакцинації.

Кров у тварин брали двічі: перший раз безпосередньо перед вакцинацією і вдруге через 14 днів після вакцинації. У крові визначали абсолютну кількість лейкоцитів, відносну кількість лімфоцитів та їх імунорегуляторних популяцій, фагоцитарну активність нейтрофілів, а також кількість кілерних клітин (НК-клітин).

Відносну кількість Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій визначали методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана в якості маркерів. Підраховували розетки у пофарбованих за Романовським-Гімзою та висушених мазках. До Т-розеткоутворюючих лімфоцитів відносили клітини, які приєднали до себе не менше трьох еритроцитів барана. Відносну кількість В-лімфоцитів визначали методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами миші в якості маркерів.

Кількість кілерних клітин (НК-клітин) підраховували за допомогою універсального методу морфологічного дослідження формених елементів крові (Liddell and Weeks, 1995).

Реакцію для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів (ФА) проводили у 96-пористих планше-

тах для імунологічних реакцій з осередками, ємністю 0,2 мл і круглим дном. Тест фагоцитозу проводили з додаванням до клітин 0,06 мл 0,1%-ої суспензії клітин пекарських дріжджів, попередньо інактивованих шляхом нагрівання. У препаратах підраховували кількість фагоцитуючих нейтрофілів на 50 нейтрофілів. За фагоцитуючу клітину вважали нейтрофіл, який поглинув одну і більше дріжджових клітин.

Результати та їх обговорення

Важливе значення при вивченні імунної відповіді організму за умов вакцинації має дослідження кількісного складу лейкоцитів, і зокрема Т- і В-лімфоцитів, як провідних імунокомпетентних клітин крові, оскільки вони характеризують рівень захисних сил організму та стан специфічного імунітету.

Результати досліджень кількості Т- і В-лімфоцитів і їх імунорегуляторних субпопуляцій у периферичній крові досліджуваних тварин наведені у таблиці. Як бачимо з отриманих даних, імунізація тварин спричиняє зміни у периферичній крові кількості лейкоцитів, Т- і В-лімфоцитів та їх імунорегуляторних субпопуляцій. Зокрема, у крові цуценят контрольної групи на 14-ту добу після введення вакцини зафіксовано збільшення абсолютної кількості лейкоцитів з $6,17 \pm 0,9$ до $7,1 \pm 0,81$ Г/л та зниження відносної кількості лімфоцитів з $40,7 \pm 4,85$ до $36,3 \pm 4,04\%$. При цьому у крові цуценят контрольної групи після введення вакцини кількість Т-хелперів і Т-супресорів також була меншою, ніж до вакцинації. Констатовано зниження показника імунорегуляторного індексу у тварин контрольної групи через 14 днів після вакцинації.

Таким чином у крові тварин на 14-ту добу після вакцинації збільшувалася абсолютна кількість лейкоцитів і зменшувалася відносна кількість Т- і В-лімфоцитів та їх регуляторних популяцій. Ці дані свідчать про імуносупресивний вплив вакцинації на Т- і В-клітинну ланку імунної відповіді організму цуценят і стимулювальний на кількість лейкоцитів крові.

Таблиця

Кількість лейкоцитів, Т- і В-лімфоцитів і їх імунорегуляторних субпопуляцій у крові цуценят за умов вакцинації та дії комплексного препарату у формі ліпосомальної емульсії ($M \pm m$, $n = 4$)

Показники	До введення		Після введення	
	контроль	дослід	контроль	дослід
Лейкоцити, Г/л	$6,17 \pm 0,9$	$7,03 \pm 0,26$	$7,1 \pm 0,81$	$7,0 \pm 1,01$
Лімфоцити, %	$40,7 \pm 4,85$	$38,7 \pm 3,50$	$36,3 \pm 4,04$	$41,0 \pm 2,64$
Т-лімфоцити, %	$64,0 \pm 8,71$	$57,3 \pm 5,03$	$60,0 \pm 6,00$	$64,0 \pm 2,00$
Т-хелпери, %	$50,0 \pm 5,71$	$44,0 \pm 4,21$	$46,0 \pm 5,29$	$50,0 \pm 4,46$
Т-супресори, %	$16,0 \pm 1,00$	$12,0 \pm 2,00$	$14,0 \pm 2,00$	$12,7 \pm 1,15$
В-лімфоцити, %	$15,0 \pm 2,64$	$15,3 \pm 1,15$	$14,0 \pm 0,89$	$15,7 \pm 1,52$
Імунорегуляторний індекс	$3,8 \pm 0,72$	$3,13 \pm 0,40$	$3,3 \pm 0,52$	$3,96 \pm 0,55$

Підшкірне введення цуценят дослідної групи нового комплексного препарату у формі ліпосомальної емульсії за умов вакцинації спричинило тенденцію до збільшення відносної кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-резистентних) та зростання імунорегуляторного індексу на тлі зниження Т-супресорів. Ці дані свідчать про стимулювальний

вплив досліджуваного препарату на Т-клітинну ланку імунної відповіді організму цуценят.

Зміни кількості В-лімфоцитів у крові цуценят за умов вакцинації та дії досліджуваного препарату були подібні, але виражені меншою мірою. Ці дані можна пояснити тим, що у цуценят відносна кількість Т-лімфоцитів, а саме CD-4, була більшою мірою схильна до проліферації, ніж В-лімфоцити. Ймовірно це

пов'язано з тим, що Т-лімфоцити належать до клітинної ланки імунітету, які першими вступають у контакт з імуногеном, на відміну від В-лімфоцитів яких відносять до гуморальної ланки імунітету.

При дослідженні показників фагоцитозу (рис.1) звертає на себе увагу зниження фагоцитарної активності нейтрофілів крові у цуценят контрольної та дослідної груп через 14 діб після імунізації, відповідно на 2 та 4,6%. Проте результати цих досліджень не вірогідні. Разом з тим, ці дані свідчать про імуносупресивну дію вакцинації на клітинну ланку неспецифічної резистентності організму тварин і відсутність суттєвого впливу досліджуваного препарату на процеси фагоцитозу. Більш виражене зниження фагоцитарної активності нейтрофілів крові у цуценят дослідної групи може бути пов'язано зі зменшенням кількості поверхневих рецепторів на мембранах нейтрофілів внаслідок специфічної дії досліджуваного препарату на ці клітини.

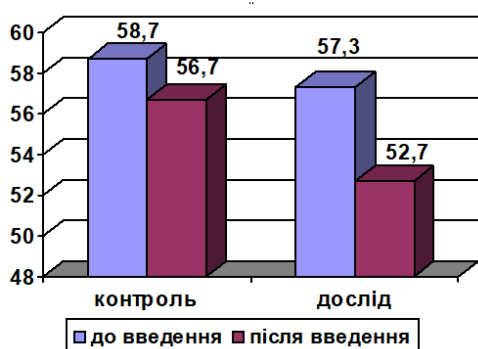


Рис.1. Динаміка відносної кількості фагоцитуючих нейтрофілів у крові цуценят

При дослідженні у крові цуценят НК-клітин (рис.2), яка також як і нейтрофіли відноситься до вродженого клітинного імунітету, звертає на себе увагу те, що у тварин контрольної групи кількісних змін популяції цих клітин практично не відбулося. Водночас у крові цуценят дослідної групи зафіксовано зростання кількості НК-клітин з $7,33 \pm 0,51$ до $9,0 \pm 1,0\%$. Збільшення кількості НК-клітин у крові цуценят дослідної групи ймовірно обумовлено компенсаторною реакцією організму на зниження ФА нейтрофілів. Відсутність кількісних змін НК-клітин у контрольній групі тварин свідчить про те, що ці клітини меншою мірою реагують на вакцинний антиген.



Рис. 2. Динаміка відносної кількості НК-клітин у крові цуценят

Висновки

1. Імунізація цуценят контрольної групи вакциною проти парвовірусного ентериту та чуми м'ясоїдних призводить до підвищення у крові абсолютної кількості лейкоцитів, зниження відносної кількості Т- і В-лімфоцитів, фагоцитарної активності нейтрофілів та істотно не впливає на число НК-клітин.

2. Введення цуценятам нового комплексного препарату у формі ліпосомальної емульсії на тлі вакцинації сприяє проліферативним процесам клітин адаптивного імунітету та інгібує процеси фагоцитозу нейтрофілів крові, про що вказує збільшення відносної кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-резистентних) та НК-клітин і зниження фагоцитарної активності нейтрофілів.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно дослідити вплив нового комплексного препарату у формі ліпосомальної емульсії на біохімічні показники крові та стан антиоксидантної системи цуценят.

Бібліографічні посилання

- Tizard, I.R., Saunders, W.B. (1996). *Veterinary Immunology. An Introduction.* Toronto.
- Varpahovskaja, I. (1999). *Liposomal'nye formy lekarstvennyh sredstv.* Remedium. 5, 26–34 (in Russian).
- Ohorodnyk, N.Z., Kychun, I.V., Vishchur, O.I., Yasnyskiy, R.S. (2016). *Zastosuvannia novykh kompleksnykh preparativ u formi liposomalnoi emulsii u veterynarnii medytsyni.* Naukovo-praktychni rekomendatsii (in Ukrainian).
- Juliano, B.L., Stamp, D. (1975). *The effect of particle size and change on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs.* Biochem. Biophys. Res. Com. 63, 651–658.
- Goren, D., Horowitz, A.T., Zalipsky, S. (1996). *Targeting of stealth liposomes to er-B2 (Her/2) receptor: in vitro and in vivo studies.* Br. J. Cancer. 74, 1749–1756.
- Liddell, E., Weeks, I. (1995). *Antibody Technology.* BIOS Scientific Publisher. 8, 40–103.
- Ohorodnyk, N.Z., Kychun, I. V., Vishchur, O.I., Yasnyskiy, R.S. (2016). *Zastosuvannia novykh kompleksnykh preparativ u formi liposomalnoi emulsii u veterynarnii medytsyni.* Naukovo-praktychni rekomendatsii. Lviv (in Ukrainian).
- Zhiljakova, T.P. (2006). *Povyshenie rezistentnosti organizma zhivotnyh putem primeneniya preparata gumiton: Avtoref. diss. na soiskanie uch. stepeni kand. biol. nauk: spec. 03.00.13 «Fiziologija cheloveka i zhivotnyh».* Tomskij gos. un–t. Tomsk, 20 (in Russian).
- Israf, D.A., Coop, R.L., Stevenson, L.M. (1996). *Dietary protein influences upon immunity to Nematodirus battus infection in lambs.* Veterinary Parasitology. 61(3–4), 273–286.

Received 5.10.2017

Received in revised form 3.11.2017

Accepted 7.11.2017