

**ПОКАЗНИКИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ БЛАСТТРАНСФОРМАЦІЇ МОНОЯДЕРНИХ КЛІТИН КРОВІ,
РІВЕНЬ Т- І В-ЛІМФОЦИТІВ Й ФАГОЦИТОЗУ ПРИ ІНФЕКЦІЙНІЙ АНЕМІЇ КОНЕЙ***Кривошия П. Ю., Кот Л.Б.**Інститут сільського господарства Західного Полісся НААН, м. Рівне*

Однією із більш поширених хвороб коней є інфекційна анемія (ІНАН). Її основними клінічними ознаками є ураження серцево-судинної, ретикулоендотеліальної системи та органів кровотворення. Супроводжується лихоманкою та анемією. Розповсюджена в більшості країн світу. Завдає значних економічних збитків господарствам через загибель коней, зниження їх продуктивності та плеємної цінності [10]. При інфекційній анемії коней імунітет нестерильний [1, 4, 8, 13]. Коні, які перехворіли з явними клінічними ознаками, не реагують на нові введення вірусу, а в прихованій формі легко інфікуються знову [5]. Багато авторів вважають, що ураження при ІНАН коней в значній мірі обумовлені імунopatологічними реакціями з утворенням комплексу антиген-антитіло [3, 12]. Так, було доведено, що імунодепресивна терапія клінічно хворих коней профілакує розвиток характерних патологічних змін, а у коней з прихованим перебігом хвороби обумовлювало появу лихоманки, при цьому вірус не був нейтралізований антитілами і розмножувався без зниження титру антитіл [3]. Результати дослідів V. Копо та співавторів [14] підтверджують, що основну роль в імунітеті при інфекційній анемії виконують лімфоцити. К.П. Юров [12] вказує, що роль Т-лімфоцитів в імунітеті при ІНАН недостатньо зрозуміла, а імунізація коней інактивованим вірусом була безуспішною.

За результатами досліджень I. Valpotic et. al. [15] було встановлено, що на ранніх стадіях хвороби лімфоїдні клітини та одноподібні фагоцити реагують на вірус і це проявляється збільшенням кількості фагоцитів, Т- і В-лімфоцитів і моноцитів. У крові містилася рівна пропорція Т- і В-лімфоцитів і збільшена кількість еозінофілів і нейтрофілів. Ці зміни автори пов'язують з імунними феноменами: підвищенням фагоцитарної активності, синтезом антитіл, диференціацією лімфоїдних клітин і їх участю в імунологічних реакціях. Результати досліджень функціональної активності лімфоцитів у здорових і інфікованих ІНАН коней на різні антигени та мітогени показали однаковий їх рівень. На основі цих дослідів автори [16] стверджують, що персистенція вірусу пов'язана не з дефектом клітинного ланцюга імунітету, а з пригніченням чутливості імунної системи до вірусного антигену. Імунні реакції за прихованого перебігу інфекції недостатньо чітко проявляються і не завжди несуть високу специфічність [9].

Таким чином, підсумовуючи вище викладений матеріал, потрібно відмітити, що чинники клітинного захисту при інфекційній анемії коней недостатньо вивчені та є дискусійними. Механізм патогенезу недостатньо розкритий.

Мета досліджень. Провести вивчення показників неспецифічної бласттрансформації моноядерних клітин крові, а також рівень Т- і В-лімфоцитів і фагоцитозу при ІНАН коней.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили на конях одного з господарств Західного Полісся України, неблагополучного щодо інфекційної анемії. Визначення специфічних антитіл до вірусу ІНАН у сироватці крові коней проводили в РДП (реакція дифузної преципітації) [2]. Дослідження виконані на 27 непородних коней, з яких 10 були вільні від вірусу інфекційної анемії та 17 – з прихованим перебігом хвороби та титром антитіл до вірусу ІНАН від 1:2 до 1:32. У піддослідних тварин у процесі виконання роботи не було виявлено інших інфекційних захворювань. На підставі одержаних серологічних досліджень були сформовані дослідна та контрольна групи. Гематологічні дослідження (підрахунок кількості лейкоцитів, лімфоцитів і нейтрофілів) проводили за методичними вказівками В.Е. Чумаченка [6]. Імунологічні дослідження – визначення Т-лімфоцитів та В-лімфоцитів - виконували згідно з уніфікованим нами методом Є.Ф. Чернушенко [11], враховуючи особливості фізіології крові коней. Показники фагоцитозу нейтрофілів визначали за рекомендаціями В.О. Бусола [7]. Неоднаразово в процесі проведення гематологічних досліджень проб крові коней було помічено, що при їх довготривалій інкубації та проведенні після цього обліку клітин спостерігається перехід малих лімфоцитів із стану спокою в бластні форми, які в подальшому здатні до проліферації та подальшої диференціації. Все це супроводжувалося морфологічними змінами клітин. На нашу думку, це пов'язано з накопиченням в «переживаючій» тканині крові неспецифічних стимуляторів, що спонукали лімфоцити крові до бласттрансформації. Тому було вирішено використати даний підхід при дослідженні функціональної здатності лімфоцитів у коней як здорових, так і хворих ІНАН, не використовуючи при цьому речовин, що стимулюють мітоз лімфоцитів (мітогени), які є різноманітними за своїм походженням і хімічним складом. На нашу думку, таке визначення бласттрансформації лімфоцитів у культурі клітин крові дає змогу зберегти вихідні пропорції взаємодіючих клітин крові, що забезпечує фізіологічні умови для виявлення реактивності лімфоцитів.

Бласттрансформацію лімфоцитів і показники фагоцитозу визначали в динаміці часу спостережень. Так, облік результатів проводили через 5, 9 та 13 годин інкубації в термостаті за температури +37 °С. З відібраних проб готували мазки крові. Фіксували їх 96° етиловим спиртом протягом однієї хвилини. Фарбували розведеним розчином фарби Романовського – Гімза протягом 15–20 хвилин. Реакцію бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) оцінювали морфологічно (визначення відсотка бластів у мазку у відношенні до загальної кількості лімфоцитів) та загальну кількість лімфоцитів у динаміці періоду їх інкубації.

Результати досліджень. При оцінці фагоцитарного ланцюга імунітету (табл. 1.) було встановлено, що перебіг хвороби призводить до зниження фагоцитарної активності (ФА). Так, ФА у здорових коней через 5 годин інкубації після взяття проб крові для досліджень становила $76,81 \pm 2,57$ %, при перегляді через 9 годин фагоцитарна активність підвищилась і була $80,43 \pm 5,43$ %, що на $3,62$ % вища і вказує на включення у фагоцитоз інтактних нейтрофілів, через 13 годин ФА була знижена і становила $76,81 \pm 3,27$ %, що вказує не на зниження ФА, а лізис бактеріальних клітин в певній частині нейтрофілів. Така подібна закономірність простежується і щодо фагоцитарного числа (ФЧ). На один фагоцитуючий нейтрофіл кількість бактерій *St. Albus* при обліку через 5 годин становила $50,0 \pm 3,34$, через 9 – $(121,2 \pm 7,8)$, через 13 – $(82,8 \pm 4,72)$. Так, на 9-ту годину інкубації було встановлено не тільки підвищення фагоцитарної активності, але й загальну кількість захоплених бактерій, що вказує на те, що в даний період інкубації не тільки проходить активація інтактних нейтрофілів крові, але й підвищення загальної активності фагоцитуючих нейтрофілів, що підтверджується збільшенням загальної кількості захоплених бактерій. На 13 годині інкубації вміст бактерій був знижений з $121,2 \pm 7,8$ до $82,8 \pm 4,72$, що вказує на лізис третини бактерій за досить короткий період часу. У свою чергу в коней, інфікованих вірусом ІНАН, фагоцитарна активність була знижена в порівнянні з контрольною групою і через 5 годин становила $56,0 \pm 4,34$ %, що було на $20,8$ % нижче від контрольної групи, через 9 годин показник фагоцитозу досяг величини $76,8 \pm 4,51$ % і різниця з контрольною групою становила лише $3,6$ %, через 13 годин інкубації рівень фагоцитуючих нейтрофілів був знижений лише на 1 %. За кількістю захоплених бактерій на один нейтрофіл (ФЧ) простежується низький їх рівень в порівнянні з контрольною групою. Так, захоплююча здатність нейтрофілів у хворих тварин через 5 годин інкубації була знижена в 3 рази ($p < 0,01$), через 9 годин – у $1,5$ ($p < 0,05$), через 13 годин – у $2,5$ ($p < 0,01$) в порівнянні з контрольною групою. Підсумовуючи вище викладений матеріал необхідно відмітити, що функціональна активність нейтрофілів знижена в інфікованих коней, що підтверджує факт низького рівня захоплених бактерій, хоча рівень лізису бактерій був вищий в порівнянні з контрольною групою. На нашу думку, це пов'язано з низьким вмістом бактерій на один нейтрофіл, що дає можливість використання більшої кількості ферментів, які будуть приймати участь у розщепленні одного мікроба. Встанов-

Розділ 6. Внутрішні незаразні хвороби та клінічна біохімія

лено, що фагоцитоз нейтрофілів крові коней серологічно позитивних на інфекційну анемію характеризується зменшенням рівня фагоцитарної активності та фагоцитарного числа.

Таблиця 1 – Показники фагоцитозу в здорових і хворих на інфекційну анемію коней в динаміці проведених досліджень

Дослідні групи	Нейтрофіли, %	Фагоцитарна активність, %			Фагоцитарне число, ум. од.		
		Період досліджень після взяття проб крові (години).					
		5	9	13	5	9	13
здорові	39,75±3,34	76,81±2,57	80,43 ± 5,43	76,81±3,27	50,0 ±3,34	121,2± 7,8	82,8± 4,72
хворі	45,29 ±4,15	56,0± 4,34	76,80±4,51	75,83±3,11	17,44± 2,71**	82,58± 6,13*	31,9 ±2,59**

Примітка: ступінь вірогідності: ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ у порівнянні із здоровими тваринами

При порівняльному аналізі неспецифічної функціональної активності популяції лімфоцитів у здорових коней та хворих на ІНАН встановлено, що у останніх значно знижений бластогенез, який був у три рази нижчим від контрольної групи. Результати досліджень наведено в таблиці 2. Так, загальна кількість облікованих лімфоцитів через 5 годин інкубації становила у здорових коней 56,41±2,57 %, а у хворих коней 40,0±3,24 %, що суттєво не відрізнялось від показників перед проведенням дослідів. І лише через 9 годин інкубації кількість підрахованих лімфоцитів в обох дослідних групах почала поступово знижуватись, і на 13-ту годину інкубації становила в контрольній групі 32,3±2,08 %, що було на 25,45 % нижчим за початкову їх кількість. У хворих коней цей показник становив лише 7,34 %. Так, на один лімфоцит у контрольній групі було нараховано через 13 годин інкубації 1,74 бластні форми лімфоцита, а у хворих, відповідно, лише 0,45.

Таблиця 2 – Показники неспецифічної бласттрансформації лімфоцитів крові коней у здорових і хворих на ІНАН у динаміці проведених досліджень

Дослідні групи	Лімфоцити, %	Лімфоцити, %			Кількість бласттрансформованих лімфоцитів на один лімфоцит, ум. од.		
		Період досліджень після взяття проб крові (години)					
		5	9	13	5	9	13
здорові	57,75±3,34	56,41±2,57	52,61 ± 4,43	32,3±2,08	0	0,3±0,07	1,74±0,22
хворі	42,09± 4,15	40,0± 3,24	32,25±3,31	34,75±2,17	0	0,2±0,04	0,45±0,13*

Примітки: ступінь вірогідності: * – $p < 0,05$ в порівнянні із здоровими тваринами

Для детальнішого аналізу було проведено дослідження кількості імунокомпетентних клітин Т- і В-лімфоцитів. У коней серологічно негативних в РДП-тесті на ІНАН в периферичній крові відносна та абсолютна кількість Т-лімфоцитів становила відповідно 23,21±5,07 % та 0,71±0,21 Г/л. У серологічно позитивних у даному тесті ці показники становили: 18,0±3,03 % та 0,63±0,13 Г/л. Таким чином, кількість Т-лімфоцитів у хворих коней була знижена на 5,21 %, а абсолютна – 0,08 Г/л. Кількість В-лімфоцитів у дослідних групах коней суттєво не відрізнялась. У здорових коней в периферичній крові відносна та абсолютна кількість В-лімфоцитів становила відповідно 15,15±3,07 % та 0,37±0,08 Г/л, у коней хворих на ІНАН 14,81±2,05 % та 0,39±0,11 Г/л. Як бачимо по кількості імунокомпетентних клітин суттєвих змін не було встановлено, лише деяке зниження Т- лімфоцитів.

Висновок. 1. У хворих на ІНАН коней виявлено функціональне пригнічення клітинного ланцюга імунітету.

2. Захворювання ІНАН коней викликає ряд змін в системі циркулюючих імунокомпетентних клітин: зниження кількості Т-лімфоцитів.

3. Встановлено пригнічення неспецифічної функціональної активності лімфоцитів у хворих коней в реакції бласттрансформації, а також зниження фагоцитарної та функціональної активності нейтрофілів, що підтверджується кількістю захоплених бактеріальних клітин та участю нейтрофілів у цьому процесі.

Список літератури

- Апатенко, В.П. Особо опасные вирусные инфекции сельскохозяйственных животных [Текст] / В.П. Апатенко. – К. : Урожай, 1991. – С. 205.
- Диагностика вирусных болезней животных [Текст] : справочник / В.Н. Сюрин [и др.]. – М. : Агропромиздат, 1991. – 528 с. 3. Зуев, В.А. Медленнее вирусные инфекции человека и животных [Текст] / В.А. Зуев, АМН СССР. – М. : Медицина, 1988. – 256 с. 4. Инфекционная анемия лошадей [Текст] / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Н.В. Фомина // Вирусные болезни животных. – М. : ВНИТИБП, 2001. – С. 407–421. 5. Муратов, С.И. Некоторые новые данные по иммунитету при ІНАН [Текст] // Тр. Воронежской НИВС. – Воронеж, 1955. – Т. 4. – С. 75–79. 6. Определение естественной резистентности и обмена веществ у сельскохозяйственных животных [Текст] / В.Е. Чумаченко [и др.]. – К. : Урожай, 1990. – 136 с. 7. Оцінка імунного статусу коней в нормі і за прихованого перебігу інфекційної анемії [Текст] : метод. реком. / В.О. Бусол [та ін.] ; Ін-т епізоотології. – Рівне, 1996. – 25 с. 8. Особенности диагностики прихованого перебігу інфекційної анемії коней [Текст] / О.Е. Галатюк, М.С. Мандигра // Інформ. листок Рівненського ЦНТЕІ. – 1993. – № 19–93. 9. Прикладная иммунология [Текст] / Г.М. Бутенко [и др.]. – К. : Здоровье, 1984. – 320 с. 10. Старчеус, А.П. Вірусні хвороби коней [Текст] / А.П. Старчеус, А.Ф. Ображей. – К. : Київська правда, 1999. – 102 с. 11. Уніфіковані імунологічні методи дослідження хворих на стаціонарному і амбулаторному етапі лікування [Текст] / Є.Ф. Чернушенко [та ін.]. – К., 1988. – 20 с. 12. Юров, К.П. Инфекционная анемия [Текст] // Инфекц. болезни лошадей. – М., 2000. – С. 37–57. 13. Бабкін А.Ф., Олійник М.К. Ензоотія інфекційної анемії коней в племінному господарстві замкнутого типу. // Ветеринарія. – 1975. – № 49. – С. 74–81. 14. Kono, V. Development of specific in vitro lymphocyte stimulation responses in horses infected with equine infectious anaemia virus [Text] / V. Kono, H. Sentsui, Y. Murakami // Vet. Microbiol. – 1976. – Vol. 1. – P. 31–34. 15. Histochemical demonstration of immunocompetent cells in horses with acute type equine infectious anaemia [Text] / I.Jr. Valpotic [at al.] // Vet. arh. – 1986. – Vol. 55, № 6. – P. 267–276. 16. Valpotic, I. In vitro reactivity of lymphocytes in horses affected by equine infectious anaemia to mitogens and specific antigens / I. Valpotic, M. Gerencer, B. JuRic // Periodicum. biologorum. – 1983. – Vol. 85, № 3. – P. 233–235.

THE INDICATORS OF NON-SPECIFIC BLAST TRANSFORMATION OF MONONUCLEAR BLOOD CELLS AND THE LEVEL OF T-AND B-LYMPHOCYTES, PHAGOCYTOSIS AT EQUINE INFECTIOUS ANEMIA

Kryvoshyya P.Y., Kot L.B.

Institute of Agriculture of Western Polissya NAAS, Rivne

This paper presents experimental studies on the cellular immunity of non-pedigree horses with equine infectious anemia. It has been observed inhibition of the functional activity of lymphocytes and phagocytosis of blood neutrophils, and also a quantitative reduction in the population of T-lymphocytes in sick horses compared with healthy horses.