

Туяхов М. Ф.

УДК: 619:616.288:579.7

**ВИЗНАЧЕННЯ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ СОБАК
ЗА ГЛИБОКОЇ ПІОДЕРМІЇ****М. Ф. ТУЯХОВ**, лікар ветеринарної медицини, здобувач

E-mail: vetmeddpss@ukr.net

Національний університет біоресурсів та природокористування[https://doi.org/10.31548/dopovidi6\(106\).2023.022](https://doi.org/10.31548/dopovidi6(106).2023.022)

Анотація. У статті наведені результати визначення ряду показників клітинного імунітету собак за глибокої піодермії.

Як показали результати досліджень, загальний вміст лейкоцитів у тварин з піодермією складав $11,84 \pm 1,06$ Г/л, що на $1,19 \times 10^9$ /л перевищувало аналогічний показник здорових тварин. Підвищення вмісту лейкоцитів відзначалося за рахунок нейтрофілії.

Встановлено, що абсолютний вміст нейтрофілів у тварин з генералізованою піодермією достовірно перевищував аналогічний показник здорових тварин контрольної групи ($< 0,05$), в той же час вміст лімфоцитів і еозинофілів був вищим у тварин контрольної групи і складав $2,98 \pm 1,16$ та $0,64 \pm 0,11$ відповідно.

Також встановлено, що за глибокої генералізованої піодермії спостерігалось пригнічення активності ряду ключових елементів клітинного імунітету, а саме: показників фагоцитозу, показника вмісту Т-лімфоцитів крові. Вміст Т-хелперних клітин у собак контрольної групи перевищував аналогічний показник тварин з піодермією, тоді як вміст Т-супресорів був вищим саме у хворих тварин, що свідчить про розвиток помірної імуносупресії.

Отримані результати свідчать про необхідність подальшого вивчення клітинного імунітету собак за піодермії з метою розробки новітніх протоколів лікування тварин із застосуванням засобів імункорекції.

Ключові слова: собаки, клітинний імунітет, піодермія, т-лімфоцити, в-лімфоцити, фагоцити

Вступ. Глибоку піодермію цілком обґрунтовано можна розглядати як комплекс вторинних клінічних симптомів основних захворювань (атопічного дерматиту, ектопаразитозів, кормової алергії, гормональних порушень тощо), адже гомеостаз шкіри як середовища існування різноманітних мікроорганізмів, можливий лише за умов певної фізіологічної рівноваги між численними представниками мікробіоти. Вплив вищезгаданих

чинників призводить до подразнення шкірних покривів, зміни показника рН та інших явищ, що врешті призводять до колонізації шкіри у тому числі представниками патогенної мікрофлори [5]. Бактеріальна мікрофлора, особливо патогенні стафілококи і стрептококи, поглиблюють первинний патогенний процес шляхом продукування токсинів, екзогенні суперантигенів, поглиблюючи важкість симптомів та замикаючи порочне коло.

Туяхов М. Ф.

Серед так званих піодермо-асоційованих мікроорганізмів у собак виділяють певні види стафілококів, зокрема коагулазо-позитивні *Staphylococcus pseudintermedius*, раніше відомі як *S. Pseudintermedius* [1, 2, 5]. *S. pseudintermedius* традиційно присутній на шкірі здорових собак, і, крім піодермії, є збудником інфекцій сечовивідних шляхів, рогівки ока, зовнішнього слухового каналу і ендокарду. Крім того, повідомляється про зоонозний потенціал *S. Pseudintermedius* [8].

Серед важливих чинників, притаманних вищезазначеним мікроорганізмам, слід відзначити стафілококовий ентеротоксин, так звані токсини синдрому токсичного шоку, коагулазу [2]. В результаті дії суперантигенів, відбувається інтенсивне вивільнення цитокінів TNF- α та IL-2 з Т-лімфоцитів [4]. Існують також суперантигени, що активують систему В-лімфоцитів відповідь на стафілококовий протеїн А, який є частиною стінки бактерії і здатний взаємодіяти з Fc-фрагментом імуноглобуліну [6]. Отже, зважаючи на широкий спектр екзогенних мікробних факторів та їх різноманітний вплив на регуляторні ланки клітинного імунітету, доцільним є вивчення ключових показників останнього за глибокої піодермії у собак.

Мета роботи. Визначення кількісного складу субпопуляцій лімфоцитів та фагоцитарної активності

поліморфонуклеарних лейкоцитів у собак за глибокої піодермії.

Матеріали і методи. Для дослідження використали 20 собак обох статевих груп, віком від 10 міс. до 7 років, різних порід. Тварин розподілили на дві групи: у дослідну групу включили 10 собак із ознаками генералізованої піодермії, у контрольну – тварин без ознак ураження шкіри.

Від тварин обох груп відібрали по 3,0 мл крові, додаючи до кожної проби 20 МО гепарину, на роздільному розчині Фікол-Пак отримували суспензію лімфоцитів. Концентрація клітин у суспензії складала 4×10^7 клітин/мл, відсоток живих клітин при фарбуванні трипановим синім – 98 %. Для ідентифікації Т-лімфоцитів готували робочу суспензію лімфоцитів з концентрацією 4×10^6 кл/мл, розводячи її відповідною кількістю середовища 199. Еритроцити барана відмивали двічі середовищем 199 і готували 0,5 % суспензію. Потім до 0,2 мл робочої суспензії лімфоцитів додавали 0,2 мл 0,5% суспензії еритроцитів. Центрифугували протягом п'яти хвилин при 200 g. Потім пробірки витримували в термостаті протягом 30 хвилин при 37⁰ С і 18 годин в холодильнику. На всіх етапах інкубації пробірки знаходились під кутом 45⁰ зі сторони осаду. Підрахунок розеткоутворюючих клітин проводили у камері Горяєва. Підраховували відсоток РУК на 200 клітин. Для ідентифікації В-лімфоцитів використовували 2,5% суспензію еритроцитів барана (ЕБ), 2 мл якої

Тухов М. Ф.

змішували з 2 мл гемолітичної сироватки в субгемолітичній концентрації. Суміш інкубували 30 хвилин при 37° С, обережно струшуючи кожні 5 хвилин. Після інкубації суспензію ЕБ двічі відмивали середовищем 199. Потім до ЕБ додавали 5 мл комплементу у розведенні 1 : 120. Після 30-хвилинної інкубації ЕБ відмивали триразово в тих же умовах. Для постановки реакції готували 0,5 %-у суспензію еритроцитів барана і змішували з лімфоцитами у співвідношенні 50:1. Інкубували клітини 30 хвилин при 37° С, центрифугували 5 хвилин при 200 g, витримували 1 годину в холодильнику і в той же день підраховували кількість розеток у камері Горяєва. Для виявлення спонтанних аглютинацій еритроцитів, ЕБ також інкубували за відсутності лімфоцитів. Лімфоїдні клітини, що не утворюють розеток, відносили до нульових клітин (О-лімфоцитів). Кількість Т-теофілінрезистентних та Т-теофілінчутливих лімфоцитів визначали за їх здатністю до Е-розеткоутворення після обробки 0,2 % розчином теофіліну на середовищі 199.

Фагоцитарну активність нейтрофілів визначали, додаючи до 0,2 мл гепаринізованої крові додавали 0,1 мл тест-культури дріжджів. Пробірки з приготованою сумішшю обережно струшували і поміщали в термостат на 30 хвилин. Струшування пробірок

повторювали кожні 10 хвилин для кращого контакту клітин крові з тест-мікроорганізмами. Після 30-хвилинної інкубації пробірки із сумішшю центрифугували при 2000 об/хв., відбирали верхній шар плазми, а із лейкоцитарного прошарку робили по 3 мазки на предметних скельцях, які висувували, фіксували метанолом та фарбували за методом Романовського. В пофарбованих мазках підраховували 200 лейкоцитів і кількість мікробних тіл, фагоцитованих ними. Фагоцитарну активність нейтрофілів (ФА) та фагоцитарний індекс (ФІ) визначали за класичною методикою. Кількість природних кілерів встановлювали за класичною методикою за Дж. Клаусом.

Результати досліджень та їх обговорення. Як показали результати досліджень (табл. 1), загальний вміст лейкоцитів у тварин з піодермією складав $11,84 \pm 1,06$ Г/л, що на $1,19 \times 10^9$ /л перевищувало аналогічний показник здорових тварин. Підвищення вмісту лейкоцитів відзначалося за рахунок нейтрофілії: абсолютний вміст нейтрофілів у тварин з генералізованою піодермією достовірно перевищував аналогічний показник у тварин контрольної групи ($< 0,05$).

У той же час вміст лімфоцитів і еозинофілів був вищим у тварин контрольної групи і складав відповідно $2,98 \pm 1,16$ та $0,64 \pm 0,11$.

1. Вміст лейкоцитів та їх субпопуляцій у собак, Г/л

Показник	Дослідна група	Контрольна група	P
Г/л	(n = 10)		
Лейкоцити	11,84 ± 1,06	10,65 ± 1,12	< 0,05
Лімфоцити	2,41 ± 0,66	2,98 ± 1,16	< 0,05
Нейтрофіли	8,17 ± 0,45	6,59 ± 1,27	< 0,05
Моноцити	0,65 ± 0,09	0,51 ± 0,13	< 0,05
Еозинофіли	0,39 ± 0,03	0,64 ± 0,11	< 0,05

Подібна тенденція спостерігалась і щодо показників відносного вмісту поліморфонуклеарів (табл. 2).

2. Відносний вміст поліморфонуклеарів, %

Показник	Дослідна група	Контрольна група	P
%	(n = 10)		
Лімфоцити	23,4 ± 1,4	30,0 ± 2,0	< 0,05
Нейтрофіли	69,0 ± 0,9	59,0 ± 2,2	< 0,05
Моноцити	4,4 ± 0,5	4,1 ± 0,7	< 0,01
Еозинофіли	4,4 ± 0,3	6,2 ± 0,4	< 0,01

Дослідження ключових показників клітинного імунітету собак за глибокої піодермії показало, що

За даними таблиці 3, у тварин за глибокої генералізованої піодермії спостерігалось пригнічення активності ряду ключових елементів клітинного імунітету, а саме: показників фагоцитозу – у здорових тварин показник фагоцитарної активності нейтрофілів на 4,3 % перевищував аналогічний показник тварин з піодермією, вміст Т-лімфоцитів крові у здорових тварин був на 7,4 % вищим. Водночас, за даними табл. 3, вміст Т-хелперних клітин у собак контрольної групи перевищував аналогічний показник тварин з піодермією, тоді як вміст Т-супресорів був вищим саме у хворих тварин – різниця із аналогічним показником здорових собак складала 3,4 % (p < 0,05).

Суттєвою виявилася різниця у кількості природних кілерів, зокрема різниця у показниках здорових тварин у порівнянні з аналогічним показником собак з піодермією складала 43,0 %.

Отримані результати імунологічних досліджень достовірно свідчать про селективне пригнічення окремих ланок клітинного імунітету, що згідно літературних даних може бути спричинене тривалою дією бактеріальних токсинів, що у великих кількостях виділяються Грам-негативними мікроорганізмами-збудниками піодермії [7]. Слід відзначити активацію імуносупресорної ланки клітинного імунітету, що збігається з даними літератури щодо інших гнійничкових захворювань шкіри [1,2].

3. Показники клітинного імунітету собак за глибокої піодермії

Показник	Дослідна група	Контрольна група	Р
	n = 10		
Фагоцитарна активність, %	59,7±1,19	64,0±3,02	p <0,05
Фагоцитарне число, кл.	12,8±1,01	14,3±0,47	p <0,05
Т-лімфоцити, %	41,6±0,13	49,0±0,98	p <0,05
Т-хелпери, %	37,0±0,94	41,0±1,87	p <0,05
Т-супресори, %	32,2±0,54	28,8±1,84	p <0,05
Імунорегуляторний індекс, %	1,14±0,04	1,42±0,07	p <0,05
В-лімфоцити, %	19,1±0,16	22,0±1,14	p <0,05
Природні кілери, абс. число	8,5±0,76	15,0±0,61	p <0,05

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. Генералізована глибока піодермія у собак супроводжується лейкоцитозом і нейтрофілією: загальний вміст лейкоцитів у тварин з піодермією складав $11,84 \pm 1,06$ Г/л, що на $1,19 \times 10^9$ /л перевищувало аналогічний показник здорових тварин.

2. За генералізованої піодермії спостерігається селективна супресія ряду показників клітинного імунітету: показників фагоцитозу, вмісту

Т-лімфоцитів, вмісту Т-хелперних клітин

3. Через активізацію супресорної ланки клітинного імунітету вміст Т-супресорів був вищим саме у хворих тварин – різниця із аналогічним показником здорових собак складала 3,4 % (p <0,05).

Перспективи досліджень

Подальше вивчення клітинного імунітету собак за піодермії з метою розробки новітніх протоколів лікування тварин із застосуванням засобів імунотерапії.

companion animals (dog and cat). - Methods Cell Sci., 22 pp. 199-207.

4. Deboer D.J., Ihrke P.J., Stanndard A.A. (2008). Circulation immune complex concentrations in selected cases of skin disease in dogs. Am J Vet Res, № 49 pp. 143-146.

5. Denerolle P., Bourdoiseau G., Magnol J.P. et al. (1998). German Shepherd dog pyoderma: a prospective study of 23 cases. Vet Dermatol., №9 pp. 243-248.

6. Faldyna M., Laznicka A., Toman M.

References

1. Borysevich V. B., Borysevich B. V., Kulida M. A. (2009). Cellular immunity in case of purulent otitis externa in dogs. Veterinary medicine of Ukraine No. 5, pp. 32-33.

2. Kulida M.A. (2010). Cellular immunity in otitis media Abstracts of reports. Kyiv, March 10-11, K.: NUBiP of Ukraine, 2010. P. 110-111.

3. Chabanne L., Bonnefont C., Bernaud J., Rigal D. (2000). Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to

Туяхов М. Ф.

(2001). Immunosuppression in bitches with pyometra. J Small Anim Pract, № 45. pp. 5-10.

7. Foster A.P. (2004). Immunomodulation and immunodeficiency. Vet Dermatol., 15. pp. 115-126.

8. Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. (2001). In: Small animal dermatology. 6th edition, W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 230-232, 274-335, 647-650.

DETERMINATION OF SOME INDICATORS OF CELLULAR IMMUNITY IN DOGS WITH DEEP PYODERMIA

M. F. Tuyakhov

Abstract. *The article presents the results of determining of selected indicators of cellular immunity in dogs with deep pyoderma..*

As the research results showed, the total content of leukocytes in animals with pyoderma was 11.84 ± 1.06 G/l, which was $1.19 \times 10^9/l$ higher than the similar indicator of healthy animals. An increase in the content of leukocytes was caused by neutrophilia.

As was established that the absolute neutrophils count in animals with generalized pyoderma significantly exceeded the similar indicator of healthy animals of the control group (< 0.05), at the same time, the content of lymphocytes and eosinophils was higher in animals of the control group and amounted to 2.98 ± 1.16 and 0.64 ± 0.11 , respectively.

It was also established that in dogs with deep generalized pyoderma, suppression of the activity of a number of key elements of cellular immunity was observed: indicators of phagocytosis, content of blood T-lymphocytes. The number of T-helper cells in dogs of the control group exceeded the similar indicator of animals with pyoderma, while the content of T-suppressors was higher in affected animals, which indicates the development of moderate immunosuppression.

The obtained results indicate a necessity for further study of the cellular immunity of dogs with pyoderma in order to develop novel protocols for the treatment of animals with the use of means of immunocorrection.

Key words: *dogs, cellular immunity, pyoderma, t-lymphocytes, b-lymphocytes, phagocytes*