ing dogs with protein-losing enteropathy / P. Gianella, U. Lotti, C. Bellino, et al // Schweiz Arch Tierheilkd. – 2017. – Vol. 159 (3). – P. 163-169
7. Gladwin, N.E. Ultrasonographic evaluation of the thickness of the wall layers in the intestinal tract of dogs / N.E. Gladwin, D.G. Penninck, C.R. Webster // American Journal of Veterinary Research. – 2014. –Vol. 75(4). – P. 349-53.
8. Heilmann, R.M. Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs / R.M. Heilmann, J.M.Steiner // J Vet Intern Med. – 2018. – Vol. 32(5). – P. 1495-1508
9. Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group / M.J. Day, T. Bilzer, J. Mansell, B. Wilcock // Journal of Comparative Pathology. – 2008. – Vol. 138 (1). – P. 1-43
10. Menozzi, A. Rifaximin is an effective alternative to metronidazole for the treatment of chronic enteropathy in dogs: a randomised trial / A. Menozzi, M. Dall'Aglio, F. Quintavalla, et al // BMC Vet Res. – 2016. – Vol. 12(1). – P. 217

УДК 616.993.192.1:636.934.57
DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.2.188

ДИНАМИКА КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЗДОРОВЫХ НОРОК, БОЛЬНЫХ ЭЙМЕРИИДОЗАМИ И НА ФОНЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ И ИММУНОКОРРЕКТИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ

Кузнецов Ю.Е.- канд. вет. наук, доцент каф. паразитологии, Кузнецова Н.В., канд. вет наук, асс. каф. фармакологии и токсикологии
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Ключевые слова; норки, иммунная сист ема, Т-лимфоциты, кокцидиоз, эймериоз. ***Key words***; minks, immune system, T-lymphocytes, coccidiosis, emeriosis.

РЕФЕРАТ
Иммунный ответ у животных и человека является биологическим механизмом защиты от негативных факторов внешней окружающей среды. Иммунитет представляет собой комплекс органов и клеток организма, и реагирует (защищает) его против чужеродных объектов – простейших и гельминтов. В связи с этим целью исследования стало изучение динамики клеточных факторов иммунной системы у здоровых, зараженных эймериидозами пушных зверей и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии. Для изучения динамики Т-лимфоцитов в крови при кокциидозах норок и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии было проведено одноцентровое проспективное слепое рандомизированное сравнительное исследование в параллельных группах. На начальном этапе исследования из общей популяции были выделены 56 самцов норок. Первая группа, клинически здоровых животных, была контролем. Со второй по шестую группы составляли

спонтанно зараженные эймериями и изоспорами, норки. Животные из третьей и пятой групп были обработаны кокцидиостатиком «Стоп-кокцид». Норки из 4-ой и 6-ой групп получали препарат «Эйметерм 5%». Норкам в 5-ой и 6-ой группы после обработки кокцидиостатиком задавали иммуномодулирующий препарат растительного происхождения «Фитодок-иммуностим». 7-ая группа служила дополнительным контролем и получала плацебо – воду с крахмалом. Таким образом, анализ полученных результатов клинического исследования показал, что применение специфической и иммунокорректирующей терапии оказывает положительное влияние на динамику уровней Т-лимфоцитов в крови больных эймериидозами норок. В группе №3, где больные эймериидозами норки, были обработаны «Стоп-кокцид», уровень Т-лимфоцитов вырос 35,8% до 41,1%; в 4-ой группе (больные эймериидозами норки, обработанные «Эйметерм 5%») уровень Т-лимфоцитов поднялся с 35,2% до 42,3%; в 5-й группе (больные эймериидозами норки, обработанные Стоп-кокцид и иммуномодулятором) уровень Т-лимфоцитов изменился с 36,5% до 43,0%; в 6-й подопытной группе (больные эймериидозами норки, обработанные «Эйметерм 5%» и иммуномодулятором) уровень Т-лимфоцитов вырост с 38,6% до 43,9 %.

ВВЕДЕНИЕ

У животных и человека существует несколько биологических механизмов защиты от негативных факторов внешней окружающей среды, один из них – иммунитет [1, 3]. Организм работает, как единое целое, использует различные свои функции, в том числе и защитные механизмы, которые взаимосвязаны, и дополняют друг друга, одной из важнейших составляющие такой защиты, является иммунитет. Который представлен комплексом органов и клеток организма, и реагирует (защищает) его против чужеродных объектов – простейших и гельминтов [2, 4].

Одна популяция клеток – В-лимфоциты – формирующаяся под влиянием костного мозга, трансформируется в плазматические клетки, продуцирующие антитела (гуморальный иммунитет), а другая – Т-лимфоциты – (тимус зависимая) формирующаяся под контролем тимуса, трансформируется в малые лимфоциты, участвующие в реакциях клеточного иммунитета. Иммунные малые лимфоциты выделяют в кровь множество медиаторов, представляющих собой гуморальные факторы клеточного иммунитета. В процессе иммунного ответа В-лимфоциты активируются и превращаются, в плазматические клетки, после чего начинается выработка антител, которые связываются с антигенами чужеродного происхождения (гельминтами, простейшими), и обуславливающих различные реакции, приводящие к разрушению агента. Впоследствии связывание антигена с Т-клетками приводит к развитию клеточного иммунного ответа, происходят различные реакции в организме больного животного, приводящие к его блокировке, а затем разрушению [2, 5].

В ходе проведенных нами ранее исследований установлено, что пик инвазии эймериидами среди молодняка пришелся на двух и трех месячный возраст (июнь-июль месяц), ЭИ у молодняка составила 60%, в этот период количество зараженных животных среди щенков доходило до 30, из 50 обследованных животных. Учитывая короткий жизненный цикл норок, в качестве критерия для объективной оценки результатов вмешательства, был использован тест, с помощью которого оценивается динамика уровня Т-лимфоцитов в крови животных по результатам общего (клинического) анализа крови. Поэтому именно в этот период нами начато изучение процессов супрессии Т-лимфоцитов и их субпопуляций у зараженных норок и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии, при этом контролем (в обоих группах контроля) служили здоровые животные [1, 6].

В связи с внедрением в практическую ветеринарию принципов доказательной медицины рекомендуется проведение хорошо спланированных, контролируе-

мых клинических исследований. Исходя из нашего целеполагания, а именно исследования эффективности новых лекарственных препаратов, необходимо организовать и выполнить экспериментальные клинические исследования препаратов, используемых для лечения эймериидозов.

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования стало изучение динамики клеточных факторов иммунной системы у здоровых, зараженных эймериидозами пушных зверей и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения динамики Т-лимфоцитов в крови при кокциидозах норок и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии было проведено одноцентровое проспективное слепое рандомизированное сравнительное исследование в параллельных группах.

Для клинических испытаний необходимо из общей популяции сформировать несколько подопытных групп животных, составляющих предмет исследования и принимающих участие в экспериментах. Чтобы уменьшить разницу между этими подопытными группами, включаемых в исследование, был использован метод стратификации (stratification) или стратификационной рандомизации.

На начальном этапе исследования из общей популяции были выделены 58 самцов норок примерно одного возраста (86±12 дней). В результате внешнего осмотра 2-х животных отбраковали. У оставшихся 56-ти норок, внешне не различимых, взяты пробы фекальных масс для проведение флотационных исследований и объективного выявления зараженных эймериидами животных. Диагноз на кокцидиидозы устанавливали стандартными флотационными методами по Фюллеборну, Дарлингу, а также усовершенствованными нами флотационными жидкостями.

Первая группа, клинически здоровых животных, была контролем. Со второй по шестую группы составляли спонтанно зараженные эймериями и изоспорами, норки. Животные из третьей и пятой групп были обработаны кокцидиостатиком «Стоп-кокцид». Норки из 4-ой и 6-ой групп получали препарат «Эймеретерм 5%». Норкам в 5-ой и 6-ой группы после обработки кокцидиостатиком задавали иммуномодулирующий препарат растительного происхождения «Фитодок-иммуностим». 7-ая группа служила дополнительным контролем и получала плацебо – воду с крахмалом. Сотрудники зверохозяйства закрепленные за животными не знали, какой препарат получала та или иная группа животных. Для оценки динамики Т-лимфоцитов и их субпопуляции определяли общее количество Т-лимфоцитов (Е-РОК) методом спонтанного розеткообразования по M. Jondal et al. (1972), определение теофиллинрезистентных и теофиллинчувствительных Т-лимфоцитов и их субпопуляции проводили по методам В.И. Новиковой, Д.К Новикова (1983). Взятие крови осуществляли на 10, 20, 40, 80 и 120 дни от начала эксперимента. Диагностическая ценность данного теста значительно возрастает при регулярных повторных анализах, т.е. при оценке напряжённости иммунитета в динамике. Поэтому контроль осуществлялся на 10, 20, 40, 80 и 120 день. В дальнейшем они интерпретируются как 1, 2, 3, 4 и 5 опыт (k=5 замеров).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенного нами клинического исследования было установлено, что животные, которым примяли специфическую и иммунокорректирующую терапию оказывает положительное влияние на динамику уровней Т-лимфоцитов в крови больных эймериидозами норок. Эти изменения за время эксперимента составили:

в 3-й группе, уровень Т-лимфоцитов вырос 35,8% до 41,1%;

в 4-ой группе уровень Т-лимфоцитов повысился с 35,2% до 42,3%;

в 5-й группе уровень Т-лимфоцитов изменился с 36,5% до 43,0%;

в 6-й подопытной группе уровень Т-лимфоцитов вырост с 38,6% до 43,9%.

Таблица 1

Динамика Т-лимфоцитов в крови здоровых норок, больных эймериидозами и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии, %

Группы животных и использованные препараты	Средние фоновые показатели крови	Среднее ± стандартное отклонение (M±m)	Время контроля в днях от начала опытов				
		Коэффициент вариации (Cv)	10	20	40	80	120
1-я группа – контроль (здоровые животные) n=8	40,8±1,6	M±m	41,3±0,8	39,8±2,7	40,9±1,3	41,1±1,8	40,8±1,6
	1,4	Cv	1,5	2,7	1,8	2,4	2,4
2-я группа – больные эймериидозами норки, n=8	31,7±0,73	M±m	32,3±0,66	31,8±0,52	31,7±0,87	31,5±0,43	31,2±0,70
	1,3	Cv	2,1	1,6	2,7	1,4	2,2
3-я группа- больные эймериидозами норки, обработанные Стоп-кокцид, n=8	37,8±2,29	M±m	35,8±1,84	36,2±0,84	37,3±1,18	38,6±1,13	41,1±1,24
	5,7	Cv	5,1	2,3	3,2	2,9	3,0
4-я группа- больные эймериидозами норки, обработанные Эйметерм 5%, n=8	39,0±2,61	M±m	35,2±1,08	37,8±0,72	39,3±0,62	40,6±1,00	42,3±1,48
	6,9	Cv	3,1	1,9	1,6	2,5	3,5
5-я группа больные эймериидозами норки, обработанные Стоп-кокцид и иммуномодулятором, n=8	40,1±2,4	M±m	36,5±0,99	39,1±0,80	40,3±0,55	41,7±0,93	43,0±0,95
	6,2	Cv	2,7	2,0	1,4	2,2	2,2
6-я группа больные эймериидозами норки, обработанные Эйметерм 5% и иммуномодулятором, n=8	41,7±2,40	M±m	38,6±1,10	39,7±0,98	42,9±0,82	43,5±1,25	43,9±1,45
	5,7	Cv	2,8	2,5	1,9	2,9	3,3
7-я группа- контроль, норки, получающие плацебо, n=8	40,5±1,18	M±m	40,4±1,25	39,7±0,54	41,3±1,09	40,5±1,62	40,8±0,74
	1,4	Cv	3,1	1,4	2,6	4,0	1,8

P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001

Таблица 2

Результаты регрессионной статистики динамики уровня Т-лимфоцитов в крови при эймериидозах норок и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии

Номер подопытной группы	Коэффициенты					
	свободный	регрессии	корреляции	детерминации	Фишера	
	a	b	R_{xy}	R^2	$F_{фак}$ >	< $F_{таб}$
1	40,70	0,0022	0,17	0,03	1,38<3,18	
2	32,10	-0,0082	-0,92	0,84	8,44>3,18	
3	35,30	0,0466	0,99	0,99	99,49>3,18	
4	36,00	0,0557	0,94	0,88	10,82>3,18	
5	37,40	0,0508	0,93	0,86	9,50>3,18	
6	39,30	0,0456	0,87	0,75	5,04>3,18	
7	40,28	0,005	0,38	0,14	1,55<3,18	

Результаты исследования представлены в Таблице 1.

Дополнительно следует установить степень однородности признаков совокупности. Поэтому в Таблице 1 приведены расчетные коэффициенты вариации (Cv), которые показывают отклонение от среднего значения рассматриваемого показателя. Чем меньше его величина, тем меньше разброс значений признаков вокруг среднего, тем более однородна совокупность по своему составу и, следовательно, надежна и представительна средняя. В общем массиве полученных показателей вариация составляет 9,3%, для средне-групповых значений она равна 8,7%, средне-фоновых от 1,4% до 6,9%, а в зависимости от времени вариация колеблется от 1,5% до 5,1%. Таким образом, совокупность показателей абсолютно однородна, средние значения надежны и, значит, их можно использовать для анализа полученных результатов исследования.

Динамику Т-лимфоцитов в крови при эймериидозах норок и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии можно оценить с помощью корреляционного анализа. Для этого необходимо построить регрессионную модель изменения во времени Т-лимфоцитов в крови каждой группы животных. В данном случае создание модели заключается в подборе графика и уравнения, которые отражают изменение во времени наблюдаемого показателя.

По каждой исследуемой подопытной группе представлены расчетные коэффициенты для построения уравнений регрессии, которые выглядят следующим образом: Y=a+b*X. Здесь переменная Y- уровень Т-лимфоцитов в крови животных, который выражается через константу a и угловой коэффициент b, умноженный на значение переменной X-время. Коэффициент корреляции Rxy характеризует наличие линейно связи и отражает степень зависимости между переменными Y и X. Чем ближе Rxy к единице, тем теснее связь и ближе зависимость к линейному закону. Для анализа общего качества уравнения линейной регрессии используют множественный коэффициент детерминации R2=Rxy2.

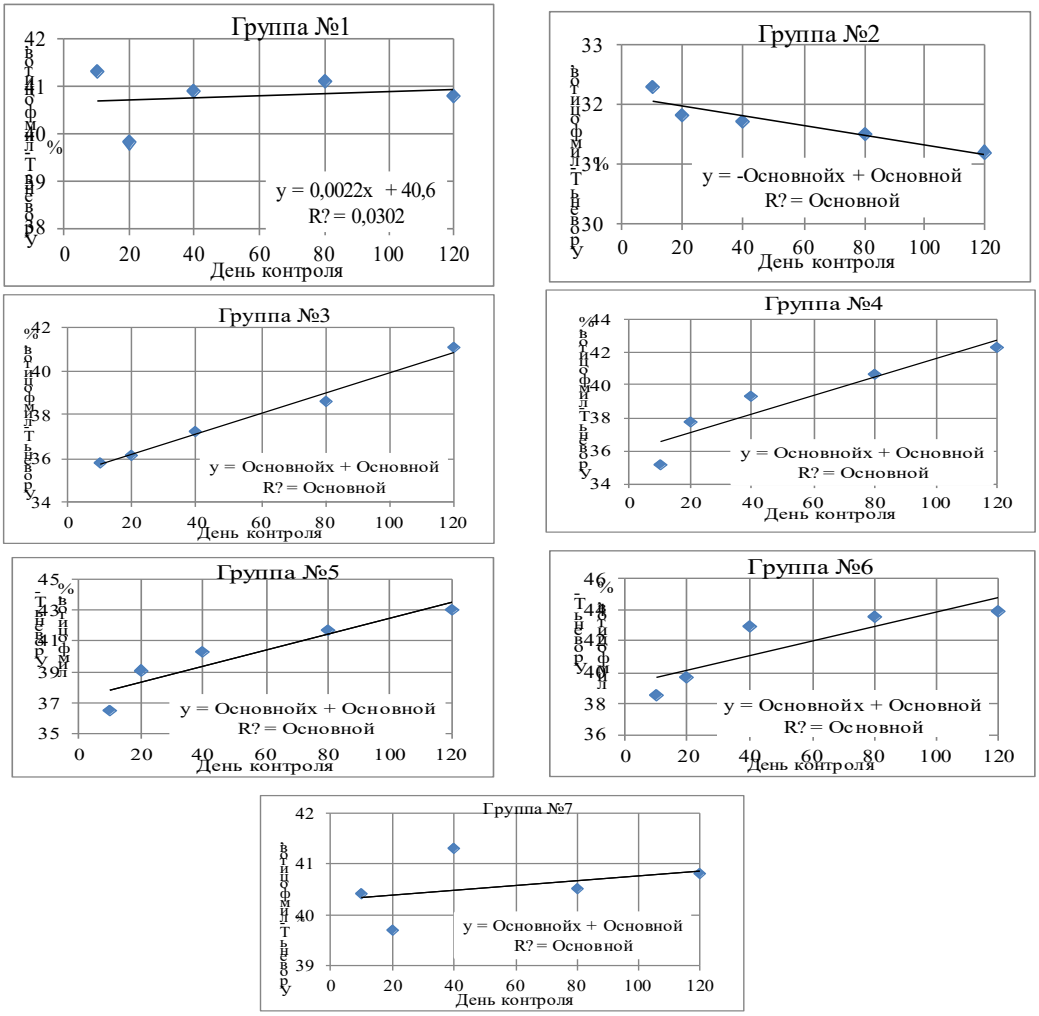

Рисунок 1 – Динамика уровня Т-лимфоцитов в крови здоровых и больных эймериидозами норок на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии

Для наглядности на рисунке 1 представлены графики, отражающие динамику изменения уровня Т-лимфоцитов в крови при кокцидиидозах норок и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии.

ВЫВОДЫ

1. Анализ полученных зависимостей показывает, что в подопытных группах, представленных клинически здоровыми норками, №1 (y1=0,0022x+40,6) и №7 (y7=0,0048x+40,3) с течение времени не происходит значительных изменений. Это дает возможность предположить, что при соблюдении стандартных условий содержания, когда не происходит спонтанного заражения норок эймериидами, уровень Т-лимфоцитов у них был стабилен на всем протяжении эксперимента.

2. Следует обратить внимание, что группа №2 (y2 = -0,0082x + 32,1) выпадает из общей тенденции. Результирующий показатель снижается во времени с 32,3% до 31,2%, что подтверждают отрицатель-

ные значения коэффициентов регрессии (b=-0,0082) и корреляции (Rxy=-0,92). Высокое значение коэффициента детерминации (R2=0,84) свидетельствует о статистической значимости полученных результатов. Напомним, что в контрольной группе №2 находились больные эймериидозами норки, которые не получали специфической терапии. В результате в данной подопытной группе наблюдается устойчивая тенденция снижения уровня Т -лимфоцитов, следовательно, состояние их иммунной системы ухудшается.

3. Группы №3 (y3=0,0466x+35,3, R2=0,99), №4 (y4=0,0557x+36,034, R2=0,88), №5 (y=0,0514x +37,548, R^2=0,8057) и №6 (y=0,0456x+39,256, R^2=0,7488), в которых норки получали препараты «Стоп-кокцид», «Эйметерм 5%», и этиже препараты с иммуномодулятором «Фитодок иммуностим» имеют четкую зависимость роста уровня Т-лимфоцитов в крови по временной шкале. Чем длительный процесс испытаний, тем выше значения результирующего показателя. При этом сами группы ранжируются по росту среднего значения этого показателя (a3=35,3; a4=36,0; a5=37,4; a6=39,3).

4. По значениям угловых коэффициентов уравнений регрессии для данных групп (b3=0,0466; b4=0,0557; b5=0,0508; b6=0,0456) можно оценить темпы изменения результирующего показателя во времени. Это даёт возможность, в первом приближение, сопоставить и оценить эффективность применяемых препаратов и предложенных схем лечения.

Наиболее высокие темпы роста уровня Т-лимфоцитов наблюдаются в группе №4 (b4=0,0557, Rxy=0,94; R2=0,88), где больные эймериидозами норки были обработаны препратом – Эйметерм суспензия 5%.

Следующая по темпам роста уровня Т-лимфоцитов, как показал эксперимент, стала группа №5 (b5=0,0508; Rxy=0,94; R2=0,88), в которой больные эймериидозами норки были обработанные «Стопкокцид» и иммуномодулятором.

Применение такого же препарата в группе №3, но без иммуномодулятора, показало более слабые результаты (b3=0,0466; Rxy=0,99; R2=0,99).

В группе №3 больные эймериидозами норки, обработанные препаратом «Стопкокцид», так же как и животные из подопытной группы №6 обработанные «Эйметерм 5%» и иммуномодулятором показали положительную динамику роста уровня Т-лимфоцитов с почти одинаковым темпом (b3,4=0,046¸ 0,047).

Таким образом, анализ полученных результатов клинического исследования показал, что применение специфической и иммунокорректирующей терапии оказывает положительное влияние на динамику уровней Т-лимфоцитов в крови больных эймериидозами норок. Эти изменения за время эксперимента составили:

в группе №3, где больные эймериидозами норки, были обработаны Стопкокцид, уровень Т-лимфоцитов вырос 35,8% до 41,1%;

в 4-ой группе (больные эймериидозами норки, обработанные Эйметерм 5%) уровень Т-лимфоцитов поднялся с 35,2% до 42,3%;

в 5-й группе (больные эймериидозами норки, обработанные Стоп-кокцид и иммуномодулятором) уровень Т-лимфоцитов изменился с 36,5% до 43,0%;

в 6-й подопытной группе (больные эймериидозами норки, обработанные Эйметерм 5% и иммуномодулятором) уровень Т-лимфоцитов вырост с 38,6% до 43,9 %.

Следует отметить, что рост уровня Т-лимфоцитов у больных животных, которые получили терапию, в конце эксперимента (на 80-120 день) достигли уровня Т -лимфоцитов у здоровых норок.

The dynamics of cellular factors of the immune system of healthy minks, experimentally infected with eimeriidosis, under specific therapy. Kuznetsov Y. E., Ph.D., Associate Professor parasitologist, Kuznetsova N.V., Ph.D.of veterinary sciences, assistant of the Department Pharmacology and toxicology FSBEI HE "St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine"

ABSTRACT

The immune response in animals and humans is a biological defense mechanism against negative environmental factors. The immune system is a complex of organs and cells of the body, that reacts (protects) against foreign objects-protozoas and helminths. The aim of the study was to investigate the dynamics of cellular factors of the immune system of healthy minks, experimentally invaded with eimeriidosis against the background of specific immunocorrective therapy. To study the dynamics of T-lymphocytes in the blood of animals, being at the specific immunocorrective therapy, a single-center prospective blind randomized comparative study was conducted in parallel groups. At the initial stage of the study, 56 male minks were isolated from the general population. The first group of clinically healthy animals was the control group. From the second to the sixth groups, animals were spontaneously infected with eimerias and isospores. Animals from the third and fifth groups were treated with coccidiostatic "Stop-coccid". Mink of the 4th and 6th groups received the drug "Ametherm 5%". Minks in the 5th and 6th groups after treatment with coccidiostatic were adninistered an immunomodulatory drug of plant origin "Phytodoc-immunostim". The 7th group served as an additional control and received a placebo-water with starch. Thus, the analysis of the results of the clinical study showed that the use of specific and immunocorrective therapy has a positive effect on the dynamics of T-lymphocyte levels in the blood of animals with eimeriidosis. In group 3, where infected minks were treated with "Stop-coccid", the level of T-lymphocytes increased by 35.8% to 41.1%; in the 4th group (administered "Ametherm 5%") the level of T-lymphocytes rose from 35.2% to 42.3%; in the 5th group (administered "Stop -coccid" and immunomodulator) the level of T-lymphocytes changed from 36.5% to 43,0% in the 6-th experimental group (treated "Ametherm 5%" and immunomodulator) the level of T-lymphocyte growth from 38.6% to 43.9 per cent.

ЛИТЕРАТУРА

1.Актуальные проблемы подавления иммунитета при гельминтозах / Ю.Б. Лазарева, А.В. Филиппова, Л.М. Романова, Е.А. Гришина // Фундаментальные науки и практика : сб. науч. тр. - Москва, 2010. - Вып. 2. - С. 70-71.

2.Иммунитет и его коррекция в ветеринарной медицине / под общ. ред. П.А. Красочко. – Смоленск, 2001. - 322 с.

3.Кузнецов, Ю.Е. Бактерицидная активность крови при эймериидозах норок и на фоне специфической и иммунокорректирующей терапии // Ю.Е. Кузнецов // Международный вестник ветеринарии. – 2016. - №4. – С. 34-39.

4.Сергиев, Е.Ю. Медицинская паразитология: лабораторная диагностика / Е.Ю. Сергеев. – Москва, 2017. – 250 с.

5.Kuznetsov, Yu. Dynamics of cellular factors of the immune system of arctic foxes (vulpes lagopus) on the background of mixtinvasion / Yu. Kuznetsov, N. Kuznetsova // International scientific and practical conference “Agrosmart – Smart solutions for agriculture”. - 2019. - P. 674-681.

6.Randomized placebocontrolled clinical trial of high-dose interleukin-2 in combination with a soluble p75 tumor necrosis factor receptor immunoglobulin G chimera in patients with advanced melanoma and renal cell carcinoma /J.S. Du-Bois, E.G. Trehu, J.W. Mier [et al.] // Journal of Clinical Oncology. - 1997. - Vol.15, № 3. - P.1052-1063.