Иммунореактивность, морфологические и биохимические показатели крови зараженных эхинококкозом собак при дегельминтизации

Immunoreactivity, morphological and biochemical values of blood in Echinococcosis infested dogs during dehelmintization

Успенский А.В.

г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-7-1
УДК 619:616.995.1

Ключевые слова: эхинококкоз, иммунореактивность, морфологические показатели, биохимические показатели, кровь, дегельминтизация, собаки.

Key words: Echinococcosis, immunoreactivity, morphological values, biochemical values, blood, dehelmintization, dogs.

Резюме. Нами изучены параметры иммунобиологической реактивности, морфологические и биохимические показатели крови собак, естественно зараженных *E. granulosus*, до и после обработки лекарственным препаратом для ветеринарного применения "Гельминтал таблетки". До дегельминтизации у собак опытной группы показатели Т- и В-лимфоцитов находились на нижнем уровне референсных значений. В сравнении с животными контрольной группы у собак опытной группы количество гемоглобина и эритроцитов в крови было понижено. На фоне существенного снижения количества сегментоядерных нейтрофилов у инвазированных животных отмечалось повышение количества палочкоядерных нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов и моноцитов. Также у больных животных был снижен уровень содержания глюкозы, белка в сыворотке крови. Отмечалось повышение активности ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), альфа-амилазы и креатинфосфокиназы (КФК). Дегельминтизация больных собак комбинированным противопаразитарным препара-

том способствовала постепенному восстановлению клеточного иммунитета, нормализации морфологических и биохимических показателей крови к 30 суткам исследования, что свидетельствует о развитии репаративных процессов в организме животных.

Summary. We have studied parameters of immunoreactivity, morphological and biochemical values of blood of the dogs who are naturally infested with *E. granulosus* before and after treatment by a medicinal product for veterinary use "Gelmintal tablets". Before dehelmintization at dogs of experimental group indexes of T- and B-lymphocytes were at the lower level of reference range. In comparison with animals of control group at dogs of experimental group quantity of hemoglobin, erythrocytes in blood were reduced. Against the background of significant decrease in quantity of segmented neutrophils at infested animals increase in quantity of stab neutrophils, eosinocytes, lymphocytes, monocytes was noted. Also at sick animals the level of glucose, protein in blood serum was reduced. Increase in activity of alanineaminotransferase (ALT), aspartateaminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), alpha-amylases and creatine phosphokinase (CPK) was noted. Dehelmintization of sick dogs with the combined antiparasitic medicinal product contributed to gradual restitution of cellular immunity, normalization of morphogematological and blood chemistry values within 30 days of a research work which demonstrates development of reparative processes in animals organism.

Введение

В комплексе мероприятий, направленных на ликвидацию ларвальных цестодозов человека и животных, одну из ведущих мест занимает дегельминтизация собак, которая предотвращает рассеивание яиц гельминтов и возможное заражение людей и животных [1-3].

По мнению Скрябина (1935), для того чтобы дегельминтизация достигла радикального оздоровления от глистной инвазии, она должна соответствовать следующим требованиям: быть специфической, периодической, массовой, планомерной, рациональной и обязательной. Успех дегельминтизации зависит от наличия высокоэффективных, малотоксичных, общедоступных, простых и удобных по способу применения антигельминтиков [3].

Морфологический и химический состав крови индикаторно отражает процессы, происходящие в организме [5, 6]. Соответственно физиолого-биохимический фон крови имеет важное диагностическое значение для оценки здоровья и степени воздействия определённого фактора на организм животных.

Материалы и методы

В опыте по определению иммунобиологической реактивности, морфологических и биохимических показателей крови собак при эхинококкозе с применением опытного образца препарата "Гельминтал таблетки" участвовало 16 животных разного возраста, массы и пород на базе ветеринарных клиник г. Черкесск (2017 г.), которые были разделены на 2 группы: опытная (естественно инвазированные эхинококком собаки) и контрольная (клинически здоровые

Авторы / Authors

Успенский А.В., доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, г. Москва, e-mail: uspensky@vniigis.ru.

Арисов М.В., доктор ветеринарных наук, профессор РАН, руководитель филиала, заведующий лабораторией эктопаразитозов, г. Москва, e-mail: director@vniigis.ru.

Болатчиев К.Х., кандидат медицинских наук, начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Карачаево-Черкесской Республике, г. Черкесск, e-mail: ker-bol@mail.ru.

Uspensky A.V., Arisov M.V., Bolatchiev K.H.

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук"; 117218 г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28, Российская Федерация, телефон: 8 (499) 124-56-55

собаки). Зараженность эхинококком животных до эксперимента определяли гелинотоскопически. Препарат применяли собакам опытной и контрольной групп однократно в минимальной терапевтической дозе 0,2 мг оксидектина и 5 мг празиквантела на 1 кг массы животного согласно инструкции по применению. Отбор проб крови у животных проводили до дегельминтизации, затем на 10, 20 и 30 сутки после дегельминтизации для определения динамики соответствующих показателей в результате применения препарата. Определение некоторых биохимических показателей сыворотки крови собак проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Siemens Dimension RL Max (Германия, США), морфогематологические исследования – на автоматическом гематологическом анализаторе PCE 90-vet (США). Подсчет лейкоцитарной формулы проводили в счетной камере Горяева с использованием 11-клавишного счетчика при иммерсионной микроскопии (МБИ-11 с объективом 40х0,65 и окуляром х7) окрашенных мазков по Романовскому - Гимзе с использованием набора для фиксации и окраски препаратов для гематологических и цитологических исследований Наемосграфix (Россия).

Фракции лимфоцитов выделяли методом центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фикоколл-верографин.

Гепаринизированную кровь (2 мл) разводили средой 199 (1:2), осторожно насаивали пастеровской пипеткой на фикоколл-верографин в центрифужную пробирку и сразу же центрифугировали 40 минут при 1500 об/мин и температуре 18°C. После центрифугирования лимфоциты собирались в узкой интерфазной полоске между плазмой и градиентом. Слой лимфоцитов отбирали пастеровской пипеткой и переносили в другую пробирку. Затем добавляли среду 199 и отмывали лимфоциты от градиента плотности трехкратным центрифугированием по 10 минут при 1500 об/мин.

Для определения концентрации лимфоцитов к осадку отмытых лимфоцитов добавляли среду 199 (до 1 мл). Осадок ресуспендировали. Из полученной взвеси брали 0,1 мл лимфоцитов и смешивали с 4,9 мл 3% раствора уксусной кислоты. Подсчет клеток проводили в камере Горяева в верхней правой или левой четверти больших квадратов. Полученное число делили на 2.

Жизнеспособность лимфоидных клеток определяли под световым микроскопом с предварительной витальной окраской клеточной суспензии 0,1% раствором трипанового

синего. К 0,25 мл суспензии лимфоцитов добавляли 1–2 капли красителя и заправляли камеру Горяева. Подсчитывали не менее 100 клеток и определяли среди них процент жизнеспособных лимфоцитов (прозрачные клетки). Ядра мертвых клеток имеют голубоватый оттенок.

Определение Т-лимфоцитов в крови собак проводили методом теста розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами барана. Оценку субпопуляции Т-лимфоцитов, различающихся по чувствительности Е-розеткообразования к теофиллину, осуществляли по методу S. Limatibuletal, (1978). Для выделения В- лимфоцитов у собак применяли метод выявления В-клеток по их способности образовывать розетки с эритроцитами барана, нагруженными антителами в среде комплемента (Меньшиков, 1988; Симонян, 1995).

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования иммунобиологической реактивности крови больных эхинококкозом собак представлены в таблице 1.

По данным таблицы 1 до дегельминтизации у собак опытной группы показатель Т-лимфоцитов ($46,2 \pm 1,3\%$) находился на нижнем уровне референсных значений и был ниже контроля на $16,7\%$ ($P \leq 0,05$), соответственно показатель субпопуляции Т-хелперов – на $10,3\%$ ($P \leq 0,05$). Уровень В-лимфоцитов в опытной группе ($8,5 \pm 0,2\%$) был ниже в 2,0 раза ($P \leq 0,05$) по отношению к контролю.

После дегельминтизации к 30 суткам исследования уровень Т и В-клеток в опытной группе животных восстановился до показателей здоровых собак и составил $51,4 \pm 1,3\%$ (CD3), $31,2 \pm 1,1\%$ (CD4) и $16,2 \pm 0,6\%$ (CD19) соответственно.

Патологические изменения морфологических показателей крови установлены у животных, инвазированных Е. granulosus. По сравнению с показателями животных контрольной группы у собак опытной группы гемоглобин был ниже на $46,1\%$ ($P \leq 0,05$), количество эритроцитов – на $41,8\%$ ($P \leq 0,05$). На фоне существенного снижения количества сегментоядерных нейтрофилов до $22,2 \pm 1,3\%$ у инвазированных животных отмечалось повышение количества палочкоядерных нейтрофилов до $3,2 \pm 0,1\%$, эозинофилов – до $19,6 \pm 1,1\%$, лимфоцитов – до $43,6 \pm 1,2\%$, моноцитов – до $8,7 \pm 0,52\%$. При этом у животных контрольной группы аналогичные показатели находились в пределах физиологической нормы.

Через 30 суток после дегельминтизации морфотологические показатели животных опытной группы статистически достоверно не отличались от показателей животных контрольной группы, за исключением уровня гемоглобина – ниже контроля на $26,2\%$ ($P \leq 0,05$). Количество лейкоцитов у собак опытной группы уменьшилось на $39,7\%$ по сравнению с фоновыми данными. Процентное соотношение лейкоцитов нормализовалось к 30 суткам исследования у опытной группы животных в результате применения антигельминтика.

Результаты биохимических исследований свидетельствуют об изменениях в биохимическом статусе собак, инвазированных эхинококками. Было установлено у больных животных снижение содержания глюкозы на $84,0\%$ ($P \leq 0,05$), белка – на $11,2\%$ по сравнению с показателями животных контрольной группы, что связано с получением питательных веществ взрослой особью эхинококка из крови definitivoного хозяина в результате прикрепления ее к стенке кишечника. Также отмечалось повышение активности ферментов АЛТ, АСТ, ЩФ, альфа-амилазы и КФК на $22,1\%$; $28,2\%$; $27,6\%$; $39,7\%$ и $38,6\%$ ($P \leq 0,05$) соответственно. Причиной повышения активности внутриклеточных ферментов аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы является выделение паразитом продуктов жизнедеятельности, которые вызывают интоксикацию организма животного. Повышение активности щелочной фосфатазы может быть обусловлено повреждением эпителия тонкого отдела кишечника, что ведет к нарушению транспорта фосфора через мембрану клеток и соответственно дисбалансу фосфорно – кальциевого обмена. Повышение активности альфа-амилазы и креатинфосфокиназы свиде-

Таблица 1. Результаты иммунологических исследований крови (клеточные факторы защиты) собак до и после дегельминтизации

Наименование показателя	Группа животных		Референсные значения по I.R. Tizard, 2000
	Опыт (n=8) Больные	Контроль (n=8) Здоровые	
1	2	3	4
1 сутки (фоновые данные) до дегельминтизации			
Т - лимфоциты (CD3), %	$46,2 \pm 1,3^*$	$53,9 \pm 1,2$	46-72
Т - хелперы (CD4), %	$27,3 \pm 0,2^*$	$30,1 \pm 1,0$	27-33
Т - супрессоры (CD8), %	$18,6 \pm 0,3$	$17,3 \pm 0,5$	17-18
В - лимфоциты (CD19), %	$8,5 \pm 0,2^*$	$16,6 \pm 0,7$	7-30
Через 10 суток после дегельминтизации			
Т - лимфоциты (CD3), %	$48,2 \pm 1,2$	$54,6 \pm 1,1$	46-72
Т - хелперы (CD4), %	$29,2 \pm 0,2$	$30,3 \pm 0,9$	27-33
Т - супрессоры (CD8), %	$18,1 \pm 0,1$	$17,6 \pm 0,7$	17-18
В - лимфоциты (CD19), %	$9,3 \pm 0,5$	$17,1 \pm 0,9$	7-30
Через 20 суток после дегельминтизации			
Т - лимфоциты (CD3), %	$49,3 \pm 1,1$	$52,7 \pm 1,3$	46-72
Т - хелперы (CD4), %	$30,1 \pm 0,7$	$31,4 \pm 1,2$	27-33
Т - супрессоры (CD8), %	$17,7 \pm 0,4$	$17,4 \pm 0,6$	17-18
В - лимфоциты (CD19), %	$12,4 \pm 0,9$	$18,1 \pm 1,0$	7-30
Через 30 суток после дегельминтизации			
Т - лимфоциты (CD3), %	$51,4 \pm 1,3$	$55,7 \pm 1,2$	46-72
Т - хелперы (CD4), %	$31,2 \pm 1,1$	$32,1 \pm 1,0$	27-33
Т - супрессоры (CD8), %	$17,9 \pm 0,5$	$17,4 \pm 0,4$	17-18
В - лимфоциты (CD19), %	$16,2 \pm 0,6$	$17,8 \pm 0,7$	7-30

Прим.: * $p \leq 0,05$ – степень достоверности по отношению к контролю

тельствует о нарушении катализа гидролитического распада крахмала, гликогена, поли- и олигосахаридов в организме инвазированных животных и энергетического обмена клеток мышечной, нервной и других тканей. Заболеваемость эхинококкозом у собак сопровождалась увеличением содержания мочевины на 22,0% по отношению к здоровым животным за счет распада белка.

Через 30 суток после дегельминтизации установлено повышение концентрации глюкозы в сыворотке крови опытных животных по сравнению с фоновыми данными на 76,0 %, содержания общего белка – на 10,3 %, снижение активности АЛТ, АСТ, ЩФ, альфа-амилазы и КФК – на 10,7 %; 16,9 %; 15,6 %; 25,4 % и 22,8 % соответственно. Следует отметить, что к концу исследования значения показателей АСТ, ЩФ, альфа-амилазы и КФК не имели статистически достоверных отличий от показателей животных контрольной группы.

Заключение

Эхинококкоз вызывает значительное торможение естественных защитных механизмов организма, которые постепенно восстанавливаются после устранения эхинококковой инвазии в организме собак в результате дегельминтизации. Не установлено отрицательного влияния препарата на анализируемые морфологические и биохимические показатели крови клинически здоровых животных, обработанных с профилактической целью. Введение опытного образца лекарственного препарата для ветеринарного применения "Гельминтал таблетки" больным животным положи-

тельно влияет на некоторые биохимические показатели сыворотки крови: нормализуется обмен белков, углеводов, снижается активность внутриклеточных ферментов, что свидетельствует о развитии репаративных процессов в организме дегельминтизированных собак.

Список литературы

1. Арисов, М.В. Эффективный метод борьбы с гельминтозами плотоядных животных / М.В. Арисов, Е.А. Кузнецова, Г.Б. Арисова, В.А. Степанов, А.А. Степанов // Материалы IV Межд. конф. "Инновационные разработки молодых ученых - развитию агропромышленного комплекса : Сборник науч. трудов ФГБНУ ВНИИОК, Ставрополь, 2015. - Т. 1. - Вып. 8. С. 391-394.
2. Арисов, М.В. Эффективность нового комплексного препарата "Гельминтал" (таблетки) при нематодозах и цестодозах собак / М.В. Арисов, Е.С. Смирнова, В.А. Степанов, Д.Н. Поселов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. - 2016. - № 7. - С. 83 -88.
3. Архипов, И.А. Стандартизация методов испытаний и оценка эффективности антгельминтиков / И.А. Архипов, М.Б. Мусаев, В.Е. Абрамов // Ветеринария. - 2004. - № 5. - С. 31-35.
4. Збарский А.И. Оценка состояния Т- и В-системы иммунитета у больных эхинококкозами с помощью клеточных и гуморальных тестов / А.И. Збарский, Н.И. Тумольская // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. 1983. - № 2. -С. 15-20.
5. Иванченко, А.Г. Сравнительные аспекты гематологических и биохимических показателей крови собак при эхинококкозе (экспериментальные данные) / А.Г. Иванченко [и др.] // Проблемы современной ветеринарии: мат. региональной науч.-практ. конф. молодых ученых, НГСХА. - Н. Новгород, 2004. - С. 17-19.
6. Koshchaev A.G., Inyukina T.A., Guguchvili N.N., Makarov Y.A., Gulyukin A.M., Neverova O.P., ShevkoPljas V.N. The influence of metabolic products of echinococcusgranulosus on the oxidation processes in the organism of pigs // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2018. Т. 10. № 9.С. 2317-2325.