

КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК
КРОВИ ТЕЛЯТ ПРИ БРОНХОПНЕВМОНИИ

E.G. Turitsyna, G.V. Makarskaya, M.I. Vitkovsky, S.V. Tarskikh

CLINICAL ASPECTS OF CHEMILUMINESCENCE OF CALVES'
BLOOD CELLS DURING BRONCHIAL PNEUMONIA

Турицына Е.Г. – д-р ветеринар. наук, проф. каф. анатомии, патологической анатомии и хирургии Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск.

E-mail: turitsyna@mail.ru

Макарская Г.В. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела технологий мониторинга природной среды Института вычислительного моделирования – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

E-mail: mgv@icm.krasn.ru

Витковский М.И. – асп. каф. анатомии, патологической анатомии и хирургии Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск.

E-mail: maksim2005ostrovsci@mail.ru

Тарских С.В. – вед. инженер сектора иммунологии Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма при Президиуме ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

E-mail: s.tarskikh@inbox.ru

Turitsyna E.G. – Dr. Veterinary Sci., Prof., Chair of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk.

E-mail: turitsyna@mail.ru

Makarskaya G.V. – Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Department of Technologies of Environment Monitoring, Institute of Computing Modeling – Separate Division FRC KRC SB RAS, Krasnoyarsk.

E-mail: mgv@icm.krasn.ru

Vitkovsky M.I. – Post-Graduate Student, Chair of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk.

E-mail: turitsyna@mail.ru

Tarskikh S.V. – Leading Engineer, Sector of Immunology, International Scientific Center of Researches of Extreme Conditions of an Organism for Presidium of FRC KRC SB RAS, Krasnoyarsk.

E-mail: s.tarskikh@inbox.ru

Цель исследования – изучить клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа клеток крови телят, больных неспецифической бронхопневмонией. Объектом исследования являлись клинически здоровые и больные бронхопневмонией телята 1,5–2-месячного возраста, голштинизированной породы, черно-пестрой масти, содержащиеся в условиях АО АПХ «АгроЯрск» Сухобузимского района Красноярского края. При клиническом исследовании молодняка крупного рогатого скота (17 гол.) определены следующие параметры: состояние видимых слизистых оболочек, температура тела, пульс, частота дыхательных движений, результаты аускультации легких. Температуру тела определяли ректально, пульс – по хвостовой артерии. По

результатам обследования всех животных разделили на две группы – здоровые (5 гол.) и больные бронхопневмонией (12 гол.). Материалом для хемилюминесцентного анализа служила цельная венозная гепаринизированная кровь. Проанализировано клиническое состояние здоровых и больных животных и хемилюминесцентный анализ крови с помощью 36-канального аппаратно-программного комплекса «Хемилюминометр CL-3604». Определено общее содержание лейкоцитов крови, их фагоцитарный индекс, суммарные объемы активных форм кислорода при спонтанной и активированной *in vitro* частицами латекса люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции. На основании полученных данных рассчитан индекс активации, удельная антиге-

нактивированная продукция свободных радикалов лейкоцитами и фагоцитами крови. Установлено, что при бронхопневмонии телят наблюдается повышение общего содержания лейкоцитов крови, которое сопровождается усилением их фагоцитарной активности и повышением продукции свободных кислородных радикалов. Значения параметров хемилуминесцентной кинетики генерации радикалов клетками крови зависят от степени тяжести течения болезни. При тяжелом течении заболевания отмечается быстрое метаболическое истощение радикалообразующей активности клеток неспецифической резистентности, участвующих в защитных реакциях организма. Хемилуминесцентная оценка кинетики респираторного взрыва при активации *in vitro* фагоцитирующих клеток крови и без нее позволяет охарактеризовать фундаментальные механизмы реагирования клеток неспецифической врожденной защиты организма при воспалительных процессах.

Ключевые слова: телята, бронхопневмония, фагоцитоз, кровь, хемилуминесценция.

The research objective was to study clinical aspects of application of chemiluminescent analysis of blood cells of the calves sick with nonspecific bronchial pneumonia. The objects of the research were the calves of 1.5–2-month age, holsteinized breed of black and motley color, clinically healthy but sick with bronchial pneumonia kept in the conditions of JSC APH Agroyarsk of Sukhobuzimsky area of Krasnoyarsk Region. At clinical trial of young growth of cattle (17 heads) the following parameters were determined: visible mucous membranes condition, body temperature, pulse, respiratory movements' frequency and the results of lung auscultation. Body temperature was determined rectally; the pulse – by a tail artery. According to the results of the examination all the animals were divided into two groups – healthy (5 heads) and patients with bronchial pneumonia (12 heads). As material for the chemiluminescent analysis whole venous heparinized blood served. Clinical condition of healthy and sick animals and chemiluminescent blood test by means of 36-channel hardware and program complex "Hemilyuminometr CL-3604" was analyzed. General content of leukocytes of blood, their phagocytic index, total volumes of active forms

of oxygen at the spontaneous and activated *in vitro* was determined by latex particles lyuminol-and lucigenin-dependent chemiluminescence. On the basis of obtained data the activation index, specific antigenactivated production of free radicals was calculated by blood leukocytes and phagocytes. It was established that at bronchial pneumonia of calves the increase of general content of leukocytes of blood was followed by strengthening of their phagocytic activity and the increase of production of free oxygen radicals was observed. The values of parameters of chemiluminescent kinetics of generation of radicals' blood cells depended on the severity of a course of disease. At heavy course of a disease fast metabolic exhaustion of radical forming activity of the cells of nonspecific resistance participating in protective reactions of an organism was noted. Chemiluminescent assessment of kinetics of respiratory explosion at activation of *in vitro* of phagocytic blood cells and without it allows characterizing fundamental mechanisms of reaction of cells of nonspecific congenital protection of an organism at inflammatory processes.

Keywords: calves, bronchial pneumonia, phagocytosis, blood, chemiluminescence.

Введение. Одной из наиболее актуальных проблем ветеринарной медицины является бронхопневмония телят, что обусловлено ее значительным распространением среди других патологий молодняка крупного рогатого скота и риском развития тяжелых осложнений [5]. По данным ряда авторов, болезни органов дыхания у телят регистрируются до 20–30 % от общей заболеваемости молодняка крупного рогатого скота [9]. В настоящее время высокий уровень заболеваемости бронхопневмонией сохраняется среди всех возрастных групп телят, придавая проблеме диагностики, терапии и профилактики особую значимость и актуальность [1].

Патогенез бронхопневмонии отличается сложностью и многообразием, а тяжесть течения и исход заболевания во многом зависят от состояния иммунной системы и неспецифической резистентности животного. Первую линию защиты организма составляют лейкоциты крови, особенно нейтрофильные гранулоциты, обладающие высокой реактивностью, способностью отвечать на дестабилизацию внутренней среды и регулировать развитие воспаления [8].

Изменение метаболических процессов в нейтрофилах при воспалительных реакциях сопровождается развитием «респираторного взрыва» с последующей продукцией активных форм кислорода (АФК), обладающих выраженным цитотоксическим эффектом [7]. Степень развития кислородного взрыва при различных заболеваниях и уровень продукции АФК фагоцитами крови определяется методом хемилюминесцентного анализа [4], который может служить объективным критерием оценки тяжести воспалительного процесса.

Цель исследования: изучить клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа клеток крови телят, больных неспецифической бронхопневмонией.

Материал и методы исследования. Исследование проведено на кафедре анатомии, патологической анатомии и хирургии Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Красноярский ГАУ и на базе Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма Красноярского научного центра СО РАН. Объектом исследования являлись клинически здоровые и больные бронхопневмонией телята 1,5–2-месячного возраста, голштинизированной породы, черно-пестрой масти, содержащиеся в условиях АО АПХ «АгроЯрск» Сухобузимского района Красноярского края.

При клиническом исследовании молодняка крупного рогатого скота (17 гол.) определены следующие параметры: состояние видимых слизистых оболочек, температура тела, пульс, частота дыхательных движений, результаты аускультации легких. Температуру тела определяли ректально, пульс – по хвостовой артерии. По результатам обследования всех животных разделили на две группы – здоровые (5 гол.) и больные бронхопневмонией (12 гол.).

Материалом для хемилюминесцентного анализа служила цельная венозная гепаринизированная кровь. Течение свободнорадикальных процессов в клетках крови изучено в хемилюминесцентной реакции по методу Топо-Оке в модификации А.М. Земскова с соавт. (1994) и И.Ю. Ерёмной с соавт. (2010) с использованием 36-канального аппаратно-программного комплекса «Хемилюминометр CL-3604», совмещенного с ПЭВМ. Исследована хемилюминесценция (ХЛ) клеток нефракционированной крови в состоянии покоя (спонтанная) и при

стимуляции клеток *in vitro* частицами латекса (активированная). В качестве хемилюминесцентных зондов, усиливающих хемилюминесценцию клеток, использованы люцигенин, обладающий селективностью в отношении первичных радикалов (супероксиданион) и люминол, реагирующий с большинством кислородных радикалов, особенно вторичных (гипохлорид, гидроксил, пероксидный радикал, перекись водорода).

Из каждого образца крови готовили четыре пробирки с реакционной смесью, в состав которой входила гепаринизированная кровь в объеме 100 мкл, разведенная раствором Хенкса без фенолового красного в соотношении 1:1; 200 мкл раствора люцигенина (Sigma-Aldrich, Switzerland). 10^{-4} М на растворе Хенкса или люминола (Sigma, USA) в концентрации $2,2 \cdot 10^{-4}$ М при pH=7,4; 50 мкл взвеси частиц латекса в концентрации $5 \cdot 10^8$ частиц/мл, опсонизированных белками пуловой сыворотки крови крупного рогатого скота. Время записи хемилюминесцентной кривой составляло 180 мин при температуре в регистрационной камере +38 °С, практически соответствующей температуре тела клинически здоровых животных.

Об уровне продукции активных форм кислорода (АФК) судили по суммарной продукции свободных кислородных радикалов, генерируемых клетками крови в течение всей ХЛ-реакции (S, импульсов за 180 мин). Определение количества лейкоцитов и активных фагоцитов в периферической крови телят выполняли с помощью камеры Горяева при окрашивании образцов крови 0,25 %-м генцианвиолетом в 3 %-й уксусной кислоте. Фагоцитарный индекс определяли, как отношение лейкоцитов с частицами латекса в цитоплазме к общему содержанию лейкоцитов, выраженное в процентах [6]. Учитывая суммарную продукцию АФК, степень разведения крови в составе реакционной смеси, общее содержание лейкоцитов и фагоцитарный индекс, рассчитывали удельную антигениндуцированную продукцию радикалов на один лейкоцит и фагоцит (S/лейкоцит и S/фагоцит, имп./клетку).

Степень достоверности различий сравниваемых показателей оценивали методом вариационной статистики, используя t-критерий Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. При клиническом обследовании больных бронхопневмонией

телят установлена одышка, повышение температуры от 39,2 до 41,5 °С, дыхание поверхностное, переходящее в брюшное, частота дыхательных движений до 35–40 в минуту, пульс учащен до 115–130 ударов в минуту, при аускультации – дыхание жесткое и везикулярное. Кроме того, наблюдались серозные, а у отдельных телят слизисто-гнойные истечения из носа и сухой отрывистый кашель. Больные телята вялые, с пониженным аппетитом, шерсть тусклая и взъерошенная.

На рисунке 1 представлено общее содержание лейкоцитов в крови здоровых и больных телят и их фагоцитарная активность в отношении частиц латекса. Количество лейкоцитов у больных животных более чем в два раза превысило показатели здорового молодняка и составило $24,26 \pm 2,75 \cdot 10^9/\text{л}$ ($P \leq 0,01$). Заболевание стимулировало фагоцитарную активность лейкоцитов, о чем свидетельствовал рост фагоцитарного индекса в 2,6 раза – с $21,78 \pm 2,26$ до $53,99 \pm 5,18 \%$ ($P \leq 0,001$).

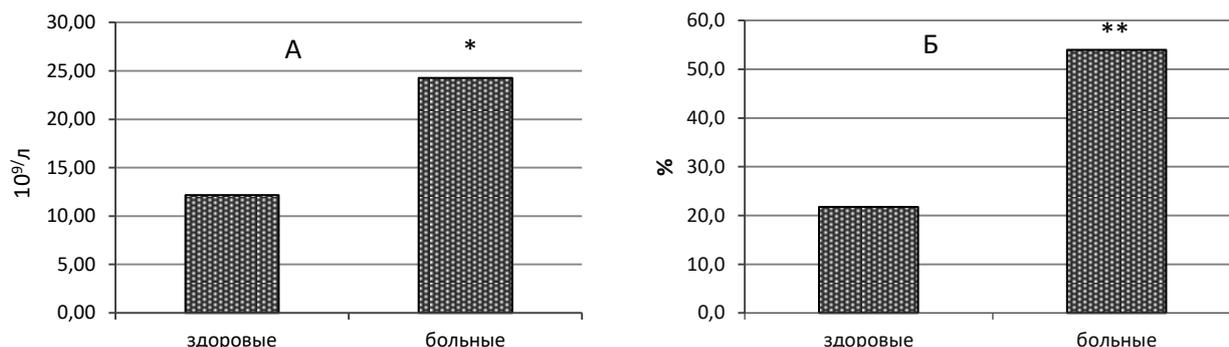


Рис. 1. Общее содержание лейкоцитов (А) и их фагоцитарный индекс (Б) в отношении частиц латекса у здоровых телят и больных бронхопневмонией; * $P \leq 0,01$, ** $P \leq 0,001$ относительно здоровых животных

Хемилюминесцентный анализ клеток крови показал, что у больных телят суммарные объемы активированных и спонтанных люминолзависимых АФК, продуцированные на протяжении ХЛ-реакции, почти в два раза превысили показатели здоровых животных (табл. 1). Очевидно, что увеличение генерации вторичных люминолзависимых радикалов, таких как гидропероксид, гидроксил радикал, гипохлорит и другие, неизбежно ведет к усилению процессов перекисного окисления липидов и повреждению клеточных мембран, что играет существенную роль в патогенезе бронхопневмонии.

Генерация активированных латексом клеток первичных люцигенинзависимых радикалов у больных телят превысила показатели здоровых животных всего на 17 %, в то время как объемы АФК, образованные при спонтанной продукции, были почти в четыре раза больше, чем у здоровых телят. При этом отмечены значительные колебания индивидуальных показателей хемилюминесценции клеток крови, что указывало, на наш взгляд, на разную степень тяжести течения болезни.

Анализ результатов хемилюминесцентного анализа и клинического обследования позволил выявить особенности генерации клетками крови свободных радикалов в зависимости от степени тяжести бронхопневмонии (см. табл. 1). Объемы первичных люцигенинзависимых АФК при спонтанной генерации увеличились при легкой степени болезни почти на 66 %, а при средней – более чем в 10 раз. При этом тяжесть течения бронхопневмонии практически не влияла на продукцию люцигенинзависимых радикалов клетками, антигенактивированными *in vitro* частицами латекса.

Тяжесть течения бронхопневмонии значительно влияла на продукцию вторичных люминолзависимых АФК. Объемы спонтанных люминолзависимых радикалов при легкой и средней степени болезни увеличились на 74 % ($P \leq 0,05$) и в 2,65 раза ($P \leq 0,01$) соответственно. Активированная латексом продукция люминолзависимых АФК при легкой тяжести заболевания выросла на 21 %, а при средней – более чем в 4 раза ($P \leq 0,01$).

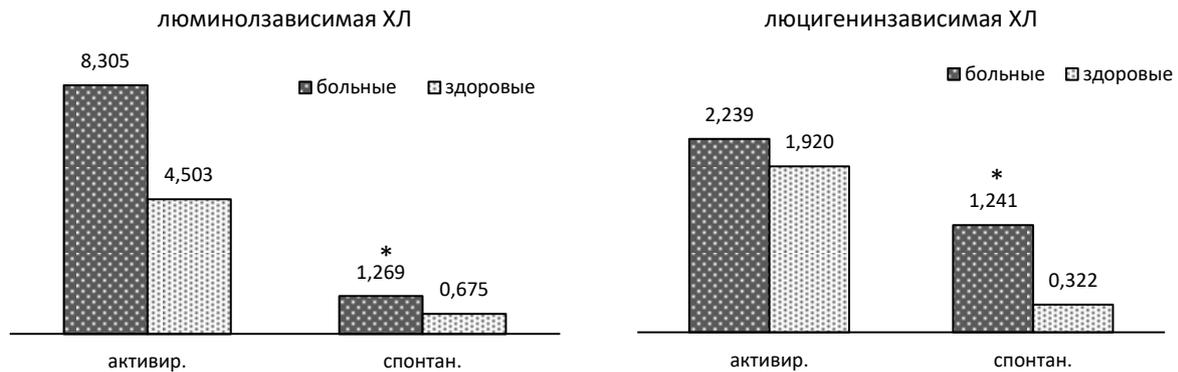


Рис. 2. Суммарная продукция АФК клетками крови здоровых и больных бронхопневмонией телят при люминол- и люцигенинзависимой ХЛ-реакции, млн имп. за 180 мин;
* $P \leq 0,05$ относительно здоровых животных

Низкие значения суммарных объемов продукции всех видов свободных кислородных радикалов при тяжелой степени болезни указывали, по нашему мнению, на истощение функциональных возможностей лейкоцитов крови как факторов неспецифической защиты организма.

При этом у телят с тяжелой степенью течения бронхопневмонии наблюдались повышение температура тела до 41,0–41,5 °С, одышка, брюшной тип дыхания, слизисто-гнойные истечения из носовых отверстий, сухой отрывистый кашель, вялость, сниженный аппетит.

Таблица 1

Суммарная продукция (S, млн имп. за 180 мин) люминол- и люцигенинзависимых АФК клетками крови больных телят при разной степени тяжести бронхопневмонии

Степень тяжести болезни	n, гол.	Люминолзависимая ХЛ		Люцигенинзависимая ХЛ	
		активир.	спонтан.	активир.	спонтан.
Контроль	5	4,50±0,62	0,68±0,11	1,92±0,36	0,32±0,06
Легкая	5	5,46±0,52	1,18±0,18*	2,12±0,05	0,53±0,08
Средняя	4	18,20±2,25**	1,80±0,23**	3,02±1,59	3,51±2,19
Тяжелая	3	2,84±0,31*	0,67±0,14	1,29±0,17	0,25±0,07

Примечание: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ относительно контрольных здоровых телят.

Значение индекса активации, определяемое как соотношение между суммарными объемами хемилюминесценции при активированной и спонтанной продукции АФК, отражает потенциальные возможности лейкоцитов крови к индукции «респираторного взрыва» при дополнительных антигенных нагрузках. Усиление свободнорадикальных процессов в нестимулированных клетках крови, находящихся в состоянии «покоя», привело к снижению индекса активации у больных телят по сравнению со здоровыми животными, при генерации люминолзависимых радикалов на 9,3 % – с 6,88±0,99 до 6,24±0,23 усл. ед., а люцигенинзависимых на 27 % – с 5,28±0,51 до 3,86±0,70 усл. ед.

У больных животных отмечены достоверные отличия от здоровых в показателях удельной антигенактивированной продукции радикалов на один лейкоцит и фагоцит (табл. 2). Удельная продукция люминолзависимых вторичных радикалов на один лейкоцит при активированной латексом ХЛ-реакции на 61 % превысила показатели здоровых животных ($P \leq 0,05$), в то время как показатели первичных люцигенинзависимых АФК упали более, чем на 35 % ($P \leq 0,05$). Удельный объем продукции свободных люминол- и люцигенинзависимых радикалов на один фагоцит при индуцированном латексом респираторном взрыве сократился на 70 % ($P \leq 0,01$) и в 4,5 раза ($P \leq 0,001$) соответственно.

Удельная продукция люминол- и люцигенинзависимых АФК лейкоцитом (S, имп./кл. за 180 мин) при антигенной активации in vitro в крови здоровых телят и больных бронхопневмонией

Состояние телят	S/лейкоцит		S/фагоцит	
	люминол	люцигенин	люминол	люцигенин
Здоровые	2,92±0,18	14,34±0,77	3,10±0,21	14,40±0,71
Больные	4,69±0,71*	9,27±1,72*	1,82±0,23**	3,21±0,49***

Примечание: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001 относительно здоровых животных.

Выводы. При бронхопневмонии телят наблюдается повышение общего содержания лейкоцитов крови, что сопровождается усилением их фагоцитарной активности и повышением продукции свободных кислородных радикалов.

Значения параметров хемилюминесцентной кинетики генерации АФК клетками крови зависят от степени тяжести течения болезни. При тяжелом течении заболевания отмечается быстрое метаболическое истощение радикалообразующей активности клеток неспецифической резистентности, участвующих в защитных реакциях организма.

Хемилюминесцентная оценка кинетики респираторного взрыва при активации in vitro фагоцитирующих клеток крови и без нее позволяет охарактеризовать фундаментальные механизмы реагирования клеток неспецифической врожденной защиты организма при воспалительных процессах.

Литература

1. Данилов С.Ю. Респираторные заболевания телят в промышленном животноводстве // Ветеринария. – 2011. – № 3. – С. 12–15.
2. Ерёмкина И.Ю., Макарская Г.В., Тарских С.В. Возрастные особенности кислородного метаболизма клеток крови крупного рогатого скота // Вестн. КрасГАУ. – 2010. – № 11. – С. 128–135.
3. Земсков А.М., Земсков В.М. Дополнительные методы оценки иммунного статуса // Клиническая лабораторная диагностика. – 1994. – № 3. – С. 34–35.
4. Земсков В.М., Барсуков А.А., Гнатенко Д.А. и др. Фундаментальные и прикладные аспекты анализа кислородного метаболизма фагоцитарных клеток // Успехи современ-

ной биологии. – 2013. – Т. 133, № 5. – С. 469–480.

5. Капюжный И.И. Технологические принципы использования ДЭНС-терапии при бронхопневмонии у молодняка крупного рогатого скота // Аграрный научный журнал. – 2018. – № 11. – С. 12–14.
6. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследований в клинике: справочник / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
7. Проскурнина Е.В. Фагоциты крови как источники и мишени свободных радикалов // Источники и мишени свободных радикалов в крови человека / под ред. Ю.А. Владимировой. – М., 2017. – С. 86–139.
8. Савченко А.А., Гринштейн Ю.И., Дресвянкина Л.Б. и др. Хемилюминесцентная и ферментативная активность нейтрофилов крови у больных с разной степенью тяжести внебольничной пневмонии // Сибирское медицинское обозрение. – 2015. – № 5. – С. 55–61.
9. Сазонова В.В., Сахно Н.В., Скребнев С.А. и др. Новое в лечении телят при острой катаральной бронхопневмонии // Вестн. ОрелГАУ. – 2017. – № 3 (66). – С. 94–99.

Literatura

1. Danilov S.Ju. Respiratornye zabojevanija teljat v promyshlennom zhivotnovodstve // Veterinarija. – 2011. – № 3. – С. 12–15.
2. Erjomina I.Ju., Makarskaja G.V., Tarskih S.V. Vozrastnye osobennosti kislorodnogo metabolizma kletok krovi krupnogo rogatogo skota // Vestn. KrasGAU. – 2010. – № 11. – С. 128–135.

3. Zemskov A.M., Zemskov V.M. Dopolnitel'nye metody ocenki immunnogo statusa // Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. – 1994. – № 3. – S. 34–35.
4. Zemskov V.M., Barsukov A.A., Gnatenko D.A. i dr. Fundamental'nye i prikladnye aspekty analiza kislorodnogo metabolizma fagocitarnyh kletok // Uspehi sovremennoj biologii. – 2013. – T. 133, № 5. – S. 469–480.
5. Kaljuzhnyj I.I. Tehnologicheskie principy ispol'zovanija DJeNS-terapii pri bronhopnevmonii u molodnjaka krupnogo rogatogo skota // Agrarnyj nauchnyj zhurnal. – 2018. – № 11. – S. 12–14.
6. Men'shikov V.V., Delektorskaja L.N., Zolotnickaja R.P. i dr. Laboratornye metody issledovanij v klinike: spravochnik / pod red. V.V. Men'shikova. – M.: Medicina, 1987. – 368 s.
7. Proskurnina E.V. Fagocity krovi kak istochniki i misheni svobodnyh radikalov // Istochniki i misheni svobodnyh radikalov v krovi cheloveka / pod red. Ju.A. Vladimirova. – M., 2017. – S. 86–139.
8. Savchenko A.A., Grinshtejn Ju.I., Dresvjankina L.B. i dr. Hemiljuminescentnaja i fermentativnaja aktivnost' nejtrofilov krovi u bol'nyh s raznoj stepen'ju tjazhesti vnebol'ничной pnevmonii // Sibirskoe medicinskoe obozrenie. – 2015. – № 5. – S. 55–61.
9. Sazonova V.V., Sahnо N.V., Skrebnev S.A. i dr. Novoe v lechenii teljat pri ostroj kataral'noj bronhopnevmonii // Vestn. OrelGAU. – 2017. – № 3 (66). – S. 94–99.

