

Василий Сергеевич Власенко

Омский аграрный научный центр, главный научный сотрудник отдела ветеринарии, доктор биологических наук, доцент, Россия, Омск

E-mail: vvs-76@list.ru

Евгений Алексеевич Вишневский

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, аспирант кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней, Россия, Омск

E-mail: kirito_2025@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КИСЛОРОДЗАВИСИМОЙ И КИСЛОРОДНЕЗАВИСИМОЙ БАКТЕРИЦИДНЫХ СИСТЕМ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ЛЕЙКОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Цель исследования – сравнительное изучение активности ферментных (миелопероксидаза) и неферментных (катионные белки) бактерицидных систем нейтрофильных гранулоцитов с помощью цитохимических методов исследования у крупного рогатого скота с разной степенью компроматации к лейкозной инфекции. Проведен эксперимент на 25 коровах неблагополучного по лейкозу стада. По результатам диагностических исследований с помощью реакции иммунодиффузии (РИД), а также гематологического метода было сформировано 3 группы: 1-я – отрицательно реагирующие в РИД (контроль, $n = 10$), 2-я – положительно реагирующие в РИД ($n = 10$), а также 3-я – больные и подозрительные по заболеванию лейкозом согласно «лейкозному ключу» ($n = 5$). В результате проведенного исследования установлено, что у животных, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), наблюдается снижение нейтрофильных гранулоцитов с высокой, средней и низкой степенью содержания лизосомальных катионных белков (ЛКБ) и активности миелопероксидазы (МПО) и их общей величины, выраженной в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). По мере прогрессирования лейкозного процесса происходило усиление дефицита антимикробных пептидов, на что указывало более выраженное уменьшение коэффициента у больных и подозрительных по заболеванию лейкозом животных. СЦК ЛКБ и МПО у носителей ВЛКРС относительно контрольной группы снижался соответственно в 1,7 и 1,4 раза, тогда как у животных при переходе в гематологическую стадию – в 2,1 и 1,8 раза ($p < 0,05$). Выявлена тесная корреляционная зависимость ($r \geq 0,70$) между активностью ферментных и неферментных бактерицидных систем у РИД-отрицательных коров, а также инфицированных ВЛКРС.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, лейкоз, ВЛКРС, миелопероксидаза, лизосомальные катионные белки, нейтрофилы, средний цитохимический коэффициент.

Vasily S. Vlasenko

Omsk Agrarian Scientific Center, chief researcher of the department of veterinary science, doctor of biological sciences associate professor, Russia, Omsk

E-mail: vvs-76@list.ru

Evgeny A. Vishnevsky

Omsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin, post-graduate student of the chair of veterinary microbiology, infectious and invasive diseases, Russia, Omsk

E-mail: kirito_2025@mail.ru

COMPARATIVE ANALYSIS OF OXYGEN-DEPENDENT AND OXYGEN-INDEPENDENT BACTERICIDAL SYSTEMS OF NEUTROPHILES IN LEUKEMIC INFECTIOUS DISEASE

The research objective is comparative study of enzymatic (myeloperoxidase) and nonenzymatic (cationic proteins) bactericidal systems activity of neutrophil granulocytes in the cattle with different compro-

mise degree of leukemic infectious disease with the help of cytochemical research methods. The experiment with 25 cows from leukemia contaminated herd has been performed in this regard. 3 groups have been formed under the diagnostic studies of the results with the help of the reaction of immunodiffusion test (RID) and hematological method, i.e. the 1st group includes the animals with negative RID result (control, n=10), the 2nd group includes the animals with positive RID result (n=10) and the 3d group includes sick and leukemia suspected animals under the "leukemic key" (n=5). It is established under the result of the studies performed that decreased neutrophilic granulocytes with high, medium and low degrees of lysosomal cationic proteins (LCP) and myeloperoxidase activity (MPO), and their total number expressed as a middle cytochemical coefficient (MCC) has been observed in bovine leukemia virus (BLV) infected animals. The antimicrobial peptides deficiency increases so far as the leukemic process progress demonstrating more significant coefficient decrease in sick and leukemia suspected animals. The MCC of LCP and MPO decreases by 1.7 and 1.4, respectively, in the BLV carriers as compared with the control group and by 2.1 and 1.8 ($p<0.05$) in animals transferred to the hematological stage. Close correlation ($r\geq 0.70$) has been found between the enzymatic and nonenzymatic bactericidal systems activity in RID negative and BLV infected cows.

Keywords: *cattle, leukemia, BLV, myeloperoxidase, lysosomal cationic protein, neutrophils, average cytochemical coefficient.*

Введение. Лейкоз крупного рогатого скота, несмотря на существующие программы профилактики, является эндемическим заболеванием для большинства территориальных единиц Российской Федерации, представляя серьезную проблему для скотоводства [1, 2].

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что развитие лейкозного процесса происходит на фоне глубоких дефектов иммунных механизмов, при этом вирус оказывает воздействие на клетки как врожденной, так и адаптивной иммунной системы, нарушая нормальное функционирование неинфицированных клеток [3, 4].

Первой линией защиты при встрече организма с инфекционным возбудителем является фагоцитоз с последующей ликвидацией бактерий, воплощаемой с помощью двух принципиально различных механизмов. Один из них осуществляется при участии лизоцима, катионных белков и гидролитических ферментов и именуется кислороднезависимым метаболизмом. Другой – кислородзависимый, реализуемый посредством кислородного взрыва, в процессе которого образуются активные формы кислорода (АФК), такие как супероксиданион, перекись водорода, гидроксильный анион и гипохлорный анион [5, 6].

Исследования внутриклеточных бактерицидных систем нейтрофильных гранулоцитов довольно широко отражены при изучении патогенетических механизмов многих инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии. Однако до настоящего времени остаются малоизученными процессы, связанные с работой ферментных и особенно неферментных

систем нейтрофилов, и их возможные взаимоотношения в механизмах развития лейкоза крупного рогатого скота, и публикации по данной проблеме немногочисленны [7, 8].

Расширить знания об особенностях патогенетических механизмов при лейкозной инфекции возможно изучением активности антимикробных пептидов с помощью цитохимических методов исследований, являющихся информативным критерием оценки функционирования системы нейтрофильных гранулоцитов.

Предметом нашего исследовательского интереса стало изучение активности катионных белков и миелопероксидазы, содержащихся соответственно в первичных (азурофильных) и вторичных (специфических) гранулах нейтрофилов и являющихся основными факторами бактерицидной защиты среди компонентов нейтрофильных гранулоцитов [9].

Цель исследования: изучить в сравнительном аспекте активность кислороднезависимых (катионные белки) и кислородзависимых (миелопероксидаза) бактерицидных систем нейтрофильных гранулоцитов с помощью цитохимических методов исследования у клинически здорового, инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) и больного (подозрительного по заболеванию) лейкозом крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследования. Для эксперимента было отобрано 25 коров в возрасте от 3 лет и старше из сельхозпредприятия Омской области, неблагополучного по лейкозу, которых по результатам диагностических исследований разделили на 3 группы: 1-я группа – 10 клинически

здоровых животных, отрицательно реагирующих в реакции иммунодиффузии с гликопротеидным антигеном ВЛКРС (контроль); 2-я – 10 положительно реагирующих в РИД и 3-я – 5 больных и подозрительных по заболеванию, положительно реагирующих в РИД и подтвержденных гематологическим методом согласно «лейкозному ключу». Реакцию иммунодиффузии (РИД) и гематологический метод исследования проводили в соответствии с Методическими указаниями по диагностике лейкоза крупного рогатого скота, утвержденными ДВ МСХ РФ.

Цитохимически в нейтрофильных гранулоцитах определяли активность миелопероксидазы (МПО) по методу Грэхем-Кнолля с использованием бензидаина [10]; содержание лизосомально-катионных белков (ЛКБ) – по методу М.Г. Шубича с бромфеноловым синим [11].

Процент положительно прореагировавших клеток оценивали полуколичественно (низкая, средняя и высокая) в 100 нейтрофилах на один мазок крови, и в соответствии со стандартными методиками рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле

$$\text{СЦК} = \frac{1 \times \text{Н1} + 2 \times \text{Н2} + 3 \times \text{Н3}}{100},$$

где Н1, Н2, Н3 – количество нейтрофилов с низкой (1), средней (2) и высокой (3) активностью соответственно.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с определением средних арифметических (М), расчетом ошибок средних арифметических (m) и коэффициента корреля-

ции Пирсона (r). Существенность различий полученных результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ изменений содержания катионных белков в нейтрофилах, представленный в таблице 1, показал, что в крови носителей ВЛКРС происходит достоверное снижение ЛКБ-содержащих гранулоцитов со средним и высоким уровнем этого компонента микробицидной системы соответственно на 47 и 39 % относительно значений в группе РИД-отрицательных животных. Помимо этого, уменьшалось и количество нейтрофилов с низким содержанием ЛКБ, но не достигало достоверной разницы. Вследствие этих преобразований общая величина катионных белков, выраженная в виде среднего цитохимического коэффициента, также подверглась падению до $0,84 \pm 0,08$ у.е. против $1,45 \pm 0,13$ у.е. ($p < 0,01$) в группе интактного крупного рогатого скота.

По мере прогрессирования лейкозного процесса происходит углубление выраженности дефицита кислороднезависимых систем, о чем свидетельствовали более интенсивные сдвиги изучаемых параметров у больных и подозрительных по заболеванию лейкозом. Так, относительно показателей РИД-негативных животных происходило снижение числа циркулирующих гранулоцитов со средним и высоким содержанием ЛКБ, соответственно на 63,1 и 49,3 % ($p < 0,01$), а также СЦК на 51,7 % ($p < 0,001$).

Таблица 1

Изменения количества нейтрофильных гранулоцитов крови и содержания лизосомальных катионных белков в них у животных с разной степенью компрометации к лейкозу, $M \pm m$

Параметр	Группа животных		
	РИД-отрицательные	РИД-позитивные	Больные лейкозом и подозрительные
Количество нейтрофилов с низким содержанием ЛКБ, %	$11,50 \pm 2,00$	$6,50 \pm 1,39$	$7,60 \pm 2,60$
Количество нейтрофилов со средним содержанием ЛКБ, %	$21,70 \pm 3,32$	$11,50 \pm 2,22^*$	$8,00 \pm 1,14^*$
Количество нейтрофилов с высоким содержанием ЛКБ, %	$30,0 \pm 2,71$	$18,30 \pm 1,49^*$	$15,20 \pm 1,83^*$
СЦК, у. е.	$1,45 \pm 0,13$	$0,84 \pm 0,08^*$	$0,70 \pm 0,05^{**}$

Примечание: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Траектория изменений, наблюдаемая нами при изучении катионных белков, также была характерна для показателя активности МПО. Однако сдвиги внутри популяции циркулирующих гранулоцитов не достигали достоверной разницы (табл. 2). Так, относительно значений РИД-отрицательных животных у инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом коров наблюдалось недостоверное снижение числа нейтрофилов с высокой ферментной активностью на

24,7 и 45,6 %, со средней – на 31 и 36,9 и с низкой активностью МПО – на 40,4 и 49 % соответственно.

Несмотря на отсутствие статистически значимых отличий в количестве циркулирующих гранулоцитов с разной степенью ферментной активности, наблюдалось достоверное снижение СЦК, выраженность сдвигов которого усиливалась при переходе в гематологическую стадию заболевания.

Таблица 2

Изменения количества нейтрофильных гранулоцитов крови и активности миелопероксидазы в них у животных с разной степенью компрометации к лейкозу, М±m

Параметр	Группа животных		
	РИД-отрицательные	РИД-позитивные	Больные лейкозом и подозрительные
Количество нейтрофилов с низкой активностью МПО, %	30,20±6,68	18,00±2,17	15,40±4,55
Количество нейтрофилов со средней активностью МПО, %	18,40±2,15	12,70±2,17	11,60±2,40
Количество нейтрофилов с высокой активностью МПО, %	20,60±4,24	15,50±2,48	11,20±3,62
СЦК, у.е.	1,29±0,08	0,90±0,08*	0,72±0,09*

Примечание: *р < 0,01.

Необходимо отметить, что суммарные показатели (СЦК) содержания ЛКБ и ферментной активности МПО как у интактного, так и у инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота находились в сильной прямой корреляционной связи (соответственно: $r = 0,75$, $r = 0,77$). В то же время выраженные сдвиги этих параметров у больных и подозрительных по заболеванию лейкозом носили хаотичный характер: у одних особей более интенсивно снижался СЦК ЛКБ, у других преобладало угнетение СЦК МПО. По этой причине в этой группе животных отмечалась обратная корреляция слабой силы ($r = -0,06$).

Заключение. На основании проведенного исследования можно прийти к заключению о том, что у коров, инфицированных ВЛКРС, имеют место дефекты кислороднезависимых и кислородзависимых механизмов, характеризующиеся снижением реализации бактерицидного потенциала нейтрофильных гранулоцитов и усиливающиеся при переходе в гематологическую стадию заболевания.

Неферментные и ферментные антимикробные системы не обособлены и тесно взаимодействуют, что подтверждается наличием тесной корреляционной связи ($r \geq 0,70$) между ними у РИД-отрицательных и РИД-положительных жи-

вотных. Исчезновение корреляционной зависимости между суммарными показателями (СЦК) содержания ЛКБ и ферментной активности МПО у больных и подозрительных по заболеванию лейкозом коров указывает на возникновение нарушений в последовательности воздействия бактерицидных систем на вирусную инфекцию, что возможно является одним из важных механизмов прогрессирования лейкозного процесса.

Литература

1. Zubova T.V., Pleshkov V.A., Chalova N.A., Prokhorov O.N. et al. Biotechnology methods for cattle leukemia elimination (experience of the Kemerovo region, Russia) // IOP Conference Series: Earth and environmental science. 12th International scientific conference on agricultural machinery industry. 2019.
2. Fogel L., Kozyrenko O., Kuzmin V., Dzhabadov E., Danko Yu. Analytical review of current state the epizootic situation of cattle leukemia in the Russian Federation // Indo Amer. J. of Pharmaceutical Sciences. 2019. Vol. 6 (3). P. 5278–5281.
3. Gillet N., Florins A., Boxus M. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine

- leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // *Retrovirology*. 2007. Vol. 4 (18). P. 1–32.
4. Konnai S., Murata S., Ohashi K. Immune exhaustion during chronic infections in cattle // *Journal of Veterinary Medical Science*. 2017. Vol. 79 (1). P. 1–5.
 5. Бердюгина О.В., Скорняков С.Н., Медвинский И.Д. и др. Функционально-метаболические изменения иммунокомпетентных клеток при туберкулезе легких (обзор литературы) // *Уральский медицинский журнал*. 2013. № 2. С. 121–127.
 6. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // *Free Radical Biol. Med*. 2010. Vol. 48. N 6. P. 749–762.
 7. Иванов А.И., Власенко В.С. Применение теста с нитросиним тетразолием для выявления животных с повышенной чувствительностью к лейкозной инфекции // *Достижения науки и техники АПК*. 2015. Т. 29, № 4. С. 61–62.
 8. Гуськова Т.В., Лапшанков С.Г., Гугушвили Н.Н., Инюкина Т.А. и др. Состояние клеточного иммунитета при лейкозе крупного рогатого скота // *Научное обеспечение агропромышленного комплекса: мат-лы X Всерос. конф. молодых ученых, посвящ. 120-летию И.С. Косенко (Краснодар, 26–30 ноября 2016 г.)*. Краснодар, 2017. С. 177–178.
 9. Borregaard N., Cowland J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // *Blood*. 1997. Vol. 89 (10). P. 3503–3521.
 10. Hrycek A. Functional characterization of peripheral blood neutrophils in patients with primary hypothyroidism // *Folia Biol. (Praha)*. 1993. № 39 (6). S. 304–310.
 11. Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // *Цитология*. 1974. Т. 16, № 10. С. 1321–1322.
 - 12th International scientific conference on agricultural machinery industry. 2019.
 2. Fogel L., Kozyrenko O., Kuzmin V., Dzhavadov E., Danko Yu. Analytical review of current state the epizootic situation of cattle leukemia in the Russian Federation // *Indo Amer. J. of Pharmaceutical Sciences*. 2019. Vol. 6 (3). P. 5278–5281.
 3. Gillet N., Florins A., Boxus M. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // *Retrovirology*. 2007. Vol. 4 (18). P. 1–32.
 4. Konnai S., Murata S., Ohashi K. Immune exhaustion during chronic infections in cattle // *Journal of Veterinary Medical Science*. 2017. Vol. 79 (1). P. 1–5.
 5. Berdjugina O.V., Skornjakov S.N., Medvinskij I.D. i dr. Funkcional'no-metabolicheskie izmenenija immunokompetentnyh kletok pri tuberkuleze legkih (obzor literatury) // *Ural'skij medicinskij zhurnal*. 2013. № 2. S. 121–127.
 6. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // *Free Radical Biol. Med*. 2010. Vol. 48. N 6. P. 749–762.
 7. Ivanov A.I., Vlasenko V.S. Primenenie testa s nitrosinim tetrazolijem dlja vyjavlenija zhitovnyh s povyshennoj chuvstvitel'nost'ju k lejkoznoj infekcii // *Dostizhenija nauki i tehniky APK*. 2015. T. 29, № 4. S. 61–62.
 8. Gus'kova T.V., Lapshankov S.G., Gugushvili N.N., Injukina T.A. i dr. Sostojanie kletocznego immuniteta pri lejkoze krupnogo rogatogo skota // *Nauchnoe obespechenie agropromyshlennogo kompleksa: mat-ly X Vseros. konf. molodyh uchenyh, posvjashh. 120-letiju I.S. Kosenko (Krasnodar, 26–30 nojabrja 2016 g.)*. Krasnodar, 2017. S. 177–178.
 9. Borregaard N., Cowland J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // *Blood*. 1997. Vol. 89 (10). P. 3503–3521.
 10. Hrycek A. Functional characterization of peripheral blood neutrophils in patients with primary hypothyroidism // *Folia Biol. (Praha)*. 1993. № 39 (6). S. 304–310.
 11. Shubich M.G. Vyjavlenie kationnogo belka v citoplazme lejkocitov s pomoshh'ju bromfeno-lovogo sinego // *Citologija*. 1974. T. 16, № 10. S. 1321–1322.

Literatura

1. Zubova T.V., Pleshkov V.A., Chalova N.A., Prokhorov O.N. et al. Biotechnology methods for cattle leukemia elimination (experience of the Kemerovo region, Russia) // *IOP Conference Series: Earth and environmental science*.