

На правах рукописи

ЯКОВЛЕВ ЮРИЙ ЮРЬЕВИЧ



ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
ГЛУТОКСИМА У СВИНЕЙ С ПАРВОВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИЕЙ

16 00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией
16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Троицк- 2004

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины»

Научные руководители: доктор ветеринарных наук, профессор
Ермолин Александр Васильевич;
доктор медицинских наук, профессор
Зурочка Александр Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Исмаилова Асия Фахретдиновна

кандидат ветеринарных наук, доцент
Петров Анатолий Антонович

Ведущая организация - Оренбургский государственный аграрный университет

Защита состоится « *22 декабря* » в *13⁰⁰* часов
на заседании диссертационного совета Д 220.066.01 при ФГОУ ВПО
«Уральская государственная академия ветеринарной медицины» по
адресу: 457100 г. Троицк, Челябинская область, ул. Гагарина, 13; тел.
2-19-89, 2-64-75.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО
«Уральская государственная академия ветеринарной медицины»

Автореферат разослан « *18* » « *ноябре* » 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Прокофьева Т.В.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Неблагоприятная экологическая ситуация, которая сложилась на территориях многих промышленных центров России, в частности, на Южном Урале оказывает весьма негативное влияние на состояние здоровья животных, способствует повышению уровня их заболеваемости и летальности. В значительной степени воздействие экологического прессинга реализуется через изменения функций иммунной системы. Развивающиеся при этом вторичные иммунодефицитные состояния, в свою очередь, обуславливают повышенную восприимчивость организма к вирусным и бактериальным инфекциям, развитие аллергических реакций, хронизацию воспалительных процессов (В.А.Черешнев с соавт., 1997).

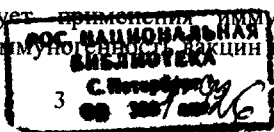
Исследования последних лет свидетельствуют о широком распространении заболеваний, вызываемых вирусами, к числу которых относится и парвовирусная инфекция свиней (Б.Г. Орлянкин, 1986; В.А.Сергеев, Б.Г.Орлянкин,1991; О.Г.Петрова с соавт.,1995; А.А.Новых с соавт., 1996; С.М.Усов, 1998).

Применяемая специфическая профилактика не всегда предупреждает развитие вирусной инфекции, поскольку одним из ведущих звеньев патогенеза развития заболевания, является формирование состояния иммунодепрессии (В.М.Апатенко,1992; В.В.Бурдейный, 1998; С.М.Усов, 1998).

Вакцинопрофилактика при ряде болезней не всегда достаточно эффективна по той причине, что поголовье животных после вакцинации не однородно по иммунному ответу. В стаде, всегда присутствуют особи с низкими титрами специфических антител (Л.А.Ладыгина, 1985; А.Х.Аракелян с соавт., 1999). Кроме того, сами вакцины в определенные фазы иммунизации способны подавлять сопротивляемость организма к инфекциям (Л.П. Горшунова с соавт.,1980; В.А.Романов, 1980). Титры антител при вакцинации на фоне иммунодефицита часто не достигают необходимых значений, что требует увеличения дозы вводимого антигена (Е.Ф. Касьяненко, С.И. Михлина, 1992; А.М.Земсков с соавт., 1994).

С учетом этого ветеринарная иммунофармакология в последнее время привлекает все большее внимание специалистов различного профиля, поскольку без глубокого знания иммунных реакций в организме в ответ на тот или иной фактор невозможно адекватно раскрыть этиопатогенез болезни, точно провести индикацию возбудителя и обеспечить разработку и внедрение более совершенных методов и средств профилактики и лечения болезней животных. Поэтому тесты иммунологического анализа реально можно использовать для оценки выраженности воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды на состояние здоровья животных и для оценки эффективности действия лекарственных препаратов.

Такая ситуация требует применения иммунокорректирующих средств, способных повысить иммунитет животных, вакцин и снять вакцинный



стресс. В то же время иммуномодулирующие средства при вирусных инфекциях должны избирательно и специфически подавлять репродукцию вирусов и не затрагивать процессов жизнедеятельности клеток и систем организма.

В настоящее время в ветеринарной практике для лечения вирусных инфекций широко применяют различные иммуномодуляторы, иммуноглобулины и интерфероны (В.Г. Богуш, 1993; И.В. Волген, 1998; Ф.Г. Гизатуллина и соавт., 1998; Ф.И. Ершов, 1994; В.Н. Жуленко и соавт., 1998"; М.В. Михайлова, 1999; Б.Г. Орлянкин и соавт., 1999; Н.Д. Придыбайло, 1991; В.С. Прудников, Ю.Т. Земотнов, 1999 и др.). Однако многие иммуномодуляторы в настоящее время остаются еще недостаточно изученными. К их числу относится новый синтетический иммуномодулятор, принадлежащий к классу лекарственных средств тиопозтинов - глутоксим. В гуманитарной медицине препарат с успехом прошел широкие клинические испытания в комплексной терапии вирусных гепатитов В и С, для сопровождения химио- и радиотерапии в онкологии (В.Е. Жемчугов, А.Г. Румянцева, Л.А. Кожемякин, 2001)..

Цель и задачи исследований. Целью работы являлось изучение влияния глутоксима на иммунную систему супоросных свиноматок и родившихся от них поросят, с подтвержденным диагнозом на парвовирусную инфекцию.

На разрешение были поставлены следующие задачи:

1. Изучить эпизоотическую обстановку в хозяйстве, провести клиническое обследование поголовья свиней и с помощью ИФА уточнить диагноз на ПВС.
2. Оценить влияние глутоксима на общее состояние и иммунную систему супоросных свиноматок с парвовирусной инфекцией.
3. Определить действие глутоксима на иммунокомпетентные клетки крови у инфицированных поросят *in vitro*.
4. Установить действие глутоксима на элиминацию вируса, иммунную систему у инфицированных поросят *in vivo*, их сохранность и продуктивность.
5. Рассчитать экономическую эффективность терапевтического действия глутоксима у свиней с парвовирусной инфекцией.

Научная новизна. Впервые изучено влияние глутоксима на состояние иммунокомпетентных клеток и активность гуморальных факторов иммунитета у инфицированных супоросных свиноматок и изученных от них поросят. Выявлены ряд общих черт и различий в действии глутоксима на клетки иммунной системы *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что глутоксим как *in vitro*, так и *in vivo* вызывает снижение активности Тх и Тс, НСТ реакции нейтрофилов, Ig G, СН50 активности комплемента. В тоже время показано, что глутоксим *in vitro* обладает Лолее выраженным влиянием на иммунокомпетентные клетки животных. Помимо однонаправленных изменений системы иммунитета,

отмечено и разнонаправленное влияние препарата на ЦИК и C1 - C5 компоненты комплемента.

На основе данных *in vitro* (активности Т звена иммунитета и метаболической активности нейтрофилов) разработаны подходы по назначению и оценке эффективности препарата *in vivo*.

Практическая значимость работы. Применение глутоксима свиньям с парвовирусной инфекцией способствует снижению выявляемости АГ вируса в крови, воспалительной реакции иммунной системы за счет уменьшения активности Тх, Тс, ЦИК, НСТ реакции нейтрофилов и комплемента. Это позволяет существенно снизить летальность нарождающегося потомства и повысить его продуктивность.

Полученные данные могут быть использованы специалистами ветеринарных лабораторий для верификации диагноза на ПВС, в учебном процессе на кафедрах фармакологии и эпизоотологии, а также написании монографий, справочников и учебных пособий.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Инкубации глутоксима *in vitro* с цельной кровью от свиней с парвовирусной инфекцией вызывает изменения как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета, проявляющихся снижением количества лейкоцитов, лимфоцитов, количества Тх, Тс, фагоцитоза, НСТ реакции нейтрофилов, В-лимфоцитов, СН50 - комплемента, повышением числа эозинофилов, нейтрофилов, лизосомальной активности нейтрофилов, ЦИК, дисбалансом активности C1 -C5 компонентов комплемента.

2. Действие глутоксима *in vivo* сопровождается элиминацией АГ вируса из крови и изменениями параметров иммунной системы во многом схожими с его действием *in vitro*, однако степень этих изменений была менее выражена.

3. Механизм действия глутоксима связан с его регулирующей ролью на редокс-систему клеток иммунитета, наиболее значимым звеном которой является снижение активности Т-клеток и метаболических функций нейтрофилов.

4. Глутоксим *in vivo* снижает инфицированность супоросных свиноматок, летальность потомства, а при лечении поросят увеличивает их выживаемость и продуктивность.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на 14 Российской научной конференции "Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях" (Челябинск, 2000); научной конференции, посвященной 20-летию ЦНИЛ ЧелГМА "Современные технологии в биологии и медицине" (Челябинск, 2000); Межвузовской научно-практической и научно-методической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, животноводства, товароведения,

обществознания и подготовки кадров на Южном Урале на рубеже веков (Троицк, 2002); на Международной научно-практической конференции "Новые энтеросорбенты и фармакологически активные вещества и их применение в ветеринарии и животноводстве", посвященной 80-летию Заслуженного деятеля науки РФ, доктора ветеринарных наук, профессора Рабинович М.И. (Троицк, 2002); на международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», Троицк, 2004 г., на расширенном заседании кафедры фармакологии УГАВМ, ноябрь, 2004 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано пять научных статей.

Объем, и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований и их результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка литературы. Она изложена на 118 страницах, иллюстрирована 13 таблицами и 11 рисунками. Список литературы включает 183 источника, в том числе 58 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1 Материалы и методы исследования

Экспериментальную часть работы выполняли на базе межкафедральной лаборатории ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины» и ЦНИЛ ГОУ ВПО "Челябинская государственная медицинская академия». Она входит в план НИР УГАВМ (номер государственной регистрации 01.9.90002362).

Материалом для исследования служили препарат глутоксим и цельная кровь, стабилизированная гепарином, а объектом наблюдения - подопытные свиноматки и полученные от них поросята, с подтвержденным ИФА парвовирусной инфекции.

Глутоксим представляет собой химически синтезированное в НИИ особо чистых биологически активных препаратов (г.С.-Петербург) соединение - гексапептид (бис-гамма- L-глутамил) - L- цистеинил-бис-глицин динатриевая соль с суммарной формулой $(C_2OH_{32}O_{16}N_6S_2)$. Выпускается в ампулах по 1 мл с содержанием 1 мкг препарата.

Научно-производственный опыт проводили в колхозе им. Ленина Увельского района Челябинской области в период 2002-2003 годов.

Клиническому обследованию было подвергнуто 150 поросят возрастом от 1 месяца и старше и 50 основных свиноматок, по результатам которого формировали группы подопытных животных (по 10 голов в каждой). Первоначальный диагноз на ПВС устанавливали с учетом эпизоотической ситуации в хозяйстве: процента яловости, количества относительно здоровых, слабых и мертворожденных поросят в помете, симптомов проявления болезни, их дальнейшей сохранности.

Окончательный диагноз на ПВС осуществляли методом ИФА с

использованием тест-системы для определения антигена в крови на приборе РА-LAB.

В качестве тестов оценки иммунного статуса у животных до и после иммунокоррекции использовали:

- подсчет количества лейкоцитов меланжерным способом в камере Горяева;

- выведение лейкограммы в окрашенных по Романовскому-Гимза мазках крови с использованием трехпольного метода по Филиппченко;

С целью получения популяции нейтрофилов периферической крови от подопытных животных гепаринизированную (из расчета 20-25 ЕД гепарина фирмы "Гедеон-Рихтер" на 1 мл) венозную кровь отстаивали с 6%-ным раствором деаэрагента Т-500 (производство Швеция) в соотношении 10:1 при 37 °С в течение 30 минут для осаждения эритроцитов. Плазму с лейкоцитами переносили в пробирки и центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об./мин. Затем надосадочную жидкость убирали и добавляли к осадку 1 мл дистиллированной воды для лизирования эритроцитов. После этого в пробирки приливали по 2 мл среды 199 и снова центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об./мин. В дальнейшем надосадочную жидкость убирали и добавляли к осадку 0,7-1,0 мл среды 199, ресуспендировали и получали клеточную взвесь (А.В. Зурочка, 1984).

Все манипуляции с клетками периферической крови проводили в дважды силиконизированной посуде.

Изучение способности крови к фагоцитозу проводили на модели поглощения частиц полистерольного латекса диаметром 1,7 мкм по методу И.С.Фрейдлин с соавт. (1976) в модификации Л.Я. Эберта с соавт. (1983).

Для оценки фагоцитоза 0,2 мл суспензии клеток смешивали с 20 мкл взвеси частиц латекса в концентрации 10 частиц/мл. После 30-и минутной инкубации при 37 °С из клеток готовили препараты, которые высушивали, фиксировали 96%-ным спиртом и окрашивали по Романовскому - Гимза.

С помощью иммерсионной системы микроскопии оценивали активность фагоцитоза (АФ) - процент нейтрофилов, захвативших хотя бы одну частицу латекса и интенсивность фагоцитоза (ИФ) - число поглощенных микросфер латекса в расчете на 100 подсчитанных нейтрофилов.

Лизосомальную активность нейтрофилов определяли по суммарному свечению числа лизосом в цитоплазме клеток, окрашенных акридиновым оранжевым, при люминисцентной микроскопии в модификации Л.Я. Эберта и соавт. (1983)..

Подсчет лизосом вели полуколичественно в "крестах" (И.С. Фрейдлин, 1986)..

Исследование внутриклеточного кислородозависимого метаболизма фагоцитов проводили, используя НСТ-тест (В. Park et al, 1968; А.Н. Маянский, М.Е. Вискман, 1979), в модификации А.В.Зурочка

(1984)..

Определение Т- и В-лимфоцитов в крови осуществляли в реакции спонтанного розеткообразования по методу М. Jondal et al. (1972) в модификации Р.В. Петрова с соавт. (1984) и А.В. Зурочка (1984).

Учет реакции осуществляли с помощью иммерсионной микроскопии, определяя количество образуемых розеток из 100 сосчитанных лимфоцитов в каждом мазке.

Определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови проводили по методике, предложенной В. Гашковой с соавт. (1978), основанной на том, что полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 при добавлении к сыворотке крови приводит к осаждению белков, пропорционально концентрации циркулирующих иммунных комплексов.

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием пакета прикладных программ "Statistica for Windows 5.0" (В.П. Боровиков, 2001).. О достоверности различий между группами судили по критерию Стьюдента (t). Различия считали значимыми при $P < 0,05$ (В.А.Медик и соавт., 2000).

2.2. Влияние глутоксима на состояние иммунной системы супоросных свиноматок

Прежде, чем приступить к изучению влияния глутоксима на иммунную систему новорожденных поросят, были проведены опыты на супоросных свиноматках, у которых в крови ИФА выявляли антиген парвовируса. Это было сделано с несколькими целями.

Во-первых, считается (А.А. Новых с соавт.,1996; Б.Г. Орлянкин, 1986;; О.Г. Петрова с соавт.,1995; В.А. Сергеев, Б.Г. Орлянкин, 1991; С.М.Усов, 1998), что вирус способен проходить через гемато-плацентарный барьер, поэтому большинство поросят рождается уже инфицированными, что и приводит к их значительной ранней летальности.

Во-вторых, как правило, взрослые свиньи не имеют клинических признаков болезни, но являются носителями этого вируса.

В третьих, необходимо было выяснить возможные негативные последствия глутоксима на животных в период супоросности.

С учетом вышесказанного сформировали две группы : опытную и контрольную (по 10 животных в каждой). Опытным свиноматкам за 1 месяц до предполагаемого опороса внутримышечно один раз в сутки вводили глутоксим в дозе 0,1 мкг/кг массы в течение 5 дней, контрольным - физиологический раствор натрия хлорида в том же объеме (для исключения реакции на процесс введения).

За животными вели наблюдение, в процессе которого учитывали их общее состояние, количество народившихся от них поросят: относительно здоровых, слабых, мертвых. В качестве дополнительного критерия эффективности действия препарата определяли наличие

антигена вируса в крови у родившихся живыми поросят.

Наблюдения показали, что введение глутоксима супоросным свиноматкам не вызвало видимых отклонений в их общем состоянии и поведении. От них родились поросята живыми, в то время как в контроле 16% - мертвыми. Проведенная оценка обсемененности выживших поросят составила в опыте 42, а в контроле -100%. В течение первого месяца жизни в опытной группе свиноматок погибло 5% поросят, а в контрольной - 28%.

Таким образом, применение глутоксима супоросным свиноматкам не оказало негативного действия на плод, а, наоборот, в условиях развития вирусной инфекции, снижало показатели мертворожденности, обсемененности и гибели потомства.

Полученные данные позволили предположить, что положительный эффект после применения глутоксима возможно связан с его действием на иммунную систему свиноматок.

Проведенные в этом направлении исследования подтвердили наши предположения. Так, при отсутствии существенных изменений в формуле крови у опытных свиноматок по сравнению с контролем, за исключением снижения процентного содержания базофилов и эозинофилов, отмечено достоверные изменения в показателях лимфоцитарного звена иммунитета. Так, на 10 сутки после проведенного курса глутоксिमом в крови, по сравнению с контролем, достоверно возрастал процент содержания Т-лимфоцитов, в основном за счет Т-хелперов. В тоже время количество Т-цитотоксических клеток снижалось (рис. 1).

Со стороны гуморального звена иммунной системы под влиянием глутоксима при некотором росте В-лимфоцитов происходило снижение показателей Ig A, M и G, активности комплимента СН50 и возрастание циркулирующих иммунных комплексов (рис. 2).

Более существенные изменения под влиянием глутоксима были отмечены со стороны фагоцитарных реакций нейтрофилов: снижались активность и интенсивность фагоцитоза, их фагоцитарное число, спонтанная НСТ-активность и возрастала индуцированная НСТ-реактивность (рис. 3).

Отмеченные изменения в изучаемых показателях свидетельствуют о повышении бактерио- и вирусоцидном потенциале фагоцитарных клеток, снижении воспалительной реакции, улучшении процессов регуляции иммунной системы, усилении биоцидного их потенциала.

В тоже время остается ряд вопросов, которые требуют формирования дополнительных подходов.

Например, у 42% поросят, в крови которых даже после применения глутоксима свиноматкам, выявляется АГ парвовируса. Значит, эти поросята могут в дальнейшем погибнуть и максимально положительный эффект не будет получен. Учитывая это обстоятельство, важно было определить влияние глутоксима на иммунную систему

поросят in vitro и in vivo, так как основная летальность приходится на первые месяцы жизни поросят. Важно отметить и то, что такие поросята служат потом источником эпизоотии.

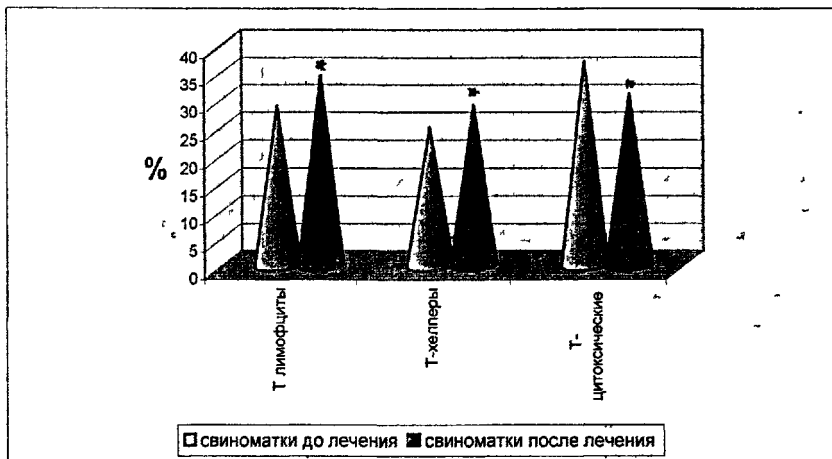


Рис.1. Активность лимфоцитарного звена иммунной системы свиноматок с ПВС

Примечание: * - $P < 0,05$.

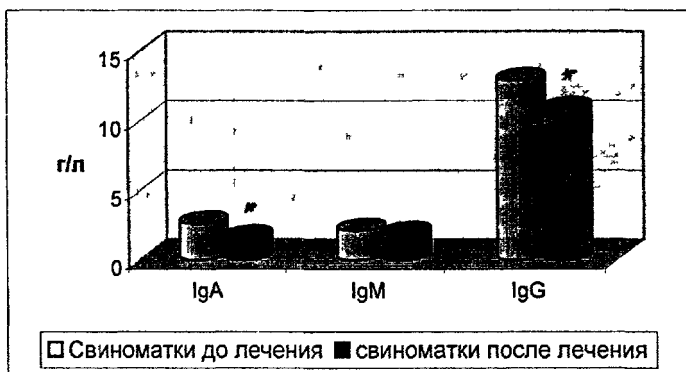


Рис.2. Влияние глутоксима на гуморальный иммунитет свиноматок с ПВС

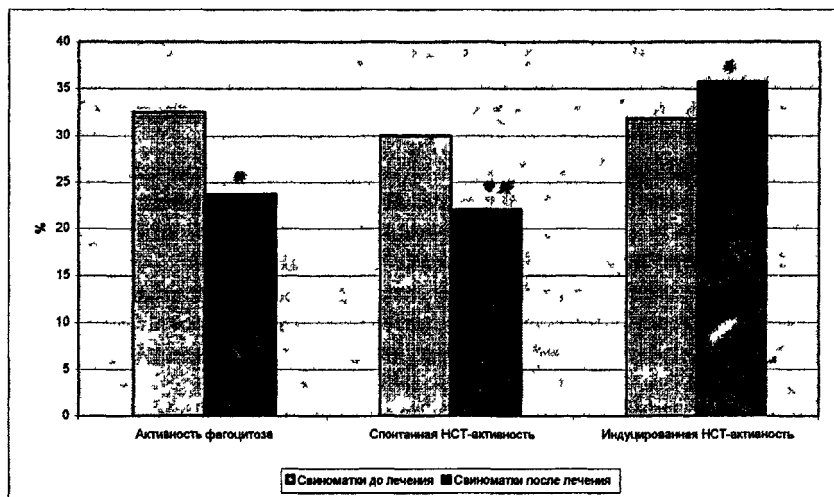


Рис. 3. Влияние глутоксима на фагоцитоз свиноматов с ПВС

Примечание: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$

2.3. Оценка влияния глутоксима на иммунную систему инфицированных поросят *in vitro*

Учитывая, что с помощью ИФА определение АГ не всегда доступно (нужен ИФА анализатор), а выявить животных для назначения препарата только клинически не всегда возможно, особенно в инкубационный период, возникает ряд моментов, требующих формирования нового подхода для решения задачи снижения инфицирования животных. Одновременно это ставит перед нами вопрос о ранней коррекции и выработке критериев назначения глутоксима поросятам из инфицированных пометов.

В начале оценивали действие глутоксима на иммунокомпетентные клетки крови *in vitro*. Для этого от инфицированных поросят брали кровь и делили на две части; одну часть инкубировали с 0,05 мкг глутоксима, другую - с физиологическим раствором в течение 1 часа. После чего оценивали состояние иммунной системы поросят.

Инкубация крови от больных поросят с глутоксимом вызывала существенные изменения в формуле крови. По сравнению с контролем отмечено снижение количества лейкоцитов, преимущественно за счет лимфоцитов и в меньшей степени за счет моноцитов, что привело к относительному росту количества нейтрофилов. В лимфоцитарном звене наблюдали снижение как абсолютных, так и относительных показателей Т-лимфоцитов и их субпопуляций, в частности, Т-хелперов и Т-

цитотоксических клеток, а также индекса Тх/Тс (рис. 4).

В гуморальном звене иммунной системы без особых изменений со стороны В-лимфоцитов, отмечено достоверное снижение содержания Ig A, циркулирующих иммунных комплексов и возрастание отдельных фрагментов комплимента.

Со стороны фагоцитарного звена иммунитета при стабильных показателях в количестве нейтрофилов, достоверно снижались активность и интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число нейтрофилов, спонтанная и индуцированная НСТ-реактивность фагоцитов.

Таким образом, полученные нами данные по оценке влияния глутоксима на состояние иммунокомпетентных клеток крови *in vitro* во многом сходны с его действием на иммунную систему свиноматок.

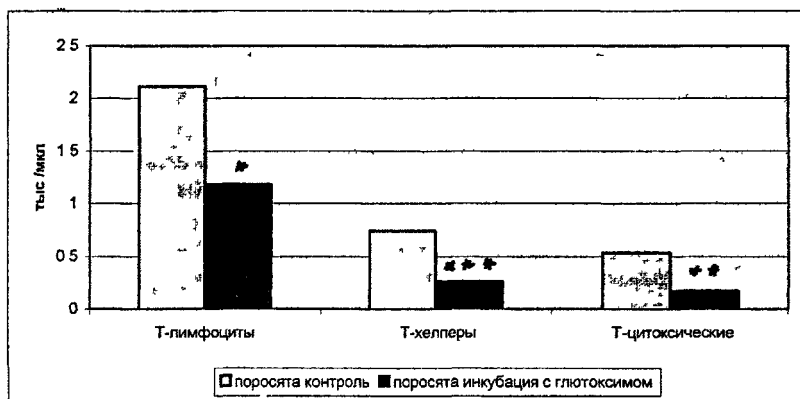


Рис. 4. Влияние глутоксима *in vitro* на клеточный иммунитет

Примечание: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; - $P < 0,001$.

2.4. Оценка влияния глутоксима на иммунную систему инфицированных поросят *in vivo*

Полученные данные о влиянии глутоксима на иммунную систему больных поросят *in vitro*, поставили перед нами следующий вопрос - осуществляет ли глутоксим подобное действие после его применения *in vivo* и положительны или отрицательны полученные данные о снижении активности иммунной системы у поросят с парвовирусной инфекцией?

Кроме того, необходимо было оценить клиническую и иммунологическую эффективность глутоксима на поросятах, а также разработать критерии диагностики иммуотропного действия глутоксима, путем сопоставления изменений в иммунной системе *in vitro* и *in vivo*.

Для этого выбрали по принципу аналогов две группы больных поросят (по 10 в каждой): опытную и контрольную. Опытной группе животных ежедневно внутримышечно вводили глутоксим из расчета 0,05

мкг/кг массы в течение 10 дней, контрольной - физиологический раствор натрия хлорида в том же объеме. За животными вели клинические наблюдения, учитывали их общее состояние, развитие, прирост живой массы, процент выживаемости. После окончания курса введения глутоксима брали кровь для проведения иммунологического анализа.

Введение глутоксима предотвращало гибель инфицированных поросят в течение периода наблюдения (3 месяца). В этой группе клинически не выявляли признаков диареи, в то время как в контрольной группе у 40% поросят отмечали явления энтерита. Было выявлено, что введение глутоксима поросятам привело к снижению вирусемии, что не могло не сказаться на приросте их живой массы. К концу периода наблюдения прирост живой массы в опытной группе поросят превысил контроль в два раза.

Проведенные иммунологические исследования показали, что при многократном введении глутоксима формула крови также не изменяется. В то же время отмечено, снижение количества Т-хелперов и индекса T_x/T_c , за счет незначительного снижения числа цитотоксических лимфоцитов. Со стороны гуморального звена иммунитета отмечено четкое отличие от данных *in vitro*. Здесь, наоборот, наблюдали падение ЦИК и повышение активности C1-C5 компонентов комплемента (рис. 5 и 6).

При оценке фагоцитарной реакции нейтрофилов также выявлены некоторые отличия: при отсутствии изменений в фагоцитарных реакциях, наблюдается четкое снижение спонтанной и индуцированной НСТ реактивности фагоцитов и снижение их лизосомальной активности

Таким образом, полученные данные о влиянии глутоксима на иммунокомпетентные клетки крови *in vitro* и *vivo* имеют ряд схожих черт и ряд явных отличий. С чем это может быть связано?

Во-первых, глутоксим *in vitro* действует кратковременно, а *in vivo* - длительно и возможно в результате он оказал действие на различные механизмы иммунной системы.

Так, *in vitro* его действие связано с подавлением лимфоцитарного звена и частично фагоцитарного, вследствие чего снижается активность гуморального звена иммунной системы и в целом достигается депрессивный эффект (по-видимому связанный с регуляцией редокс-системы). Второй момент может быть связан с уходом инфицированных клеток в апоптоз (второй механизм действия глутоксима), а в условиях *in vitro*, нет выхода новых (неинфицированных клеток) из костно-мозгового депо, тимуса и других органов кроветворения.

За эту гипотезу свидетельствует и тот факт, что и *in vivo* так же отмечается снижение числа Т-хелперов и НСТ активности фагоцитов. Но в отличие от *in vitro*, имеет место активация системы комплемента, снижение ЦИК, что, по-видимому, связано с элиминацией вируса из крови, что, естественно, не может произойти за 1 час инкубации крови с препаратом *in vitro*

Одновременно следует отметить и тот факт, что в целом

отмечается снижение активности клеточного звена иммунной системы как *in vivo*, так и *in vitro*. Такое снижение, по-видимому, связано с уменьшением воспалительного процесса у поросят. Так как клинически отмечено снижение вирусемии и летальности, очевидно "депрессивное" действие глутоксима, по-видимому, свидетельствует о нормализации состояния иммунной системы поросят, то есть глутоксим ведет себя *in vitro* и *in vivo* как истинный "иммуномодулятор" (что подтверждается и данными, полученными нами при исследовании свиноматок). При повышении показателей иммунной системы он их снижает, а при понижении - повышает.

Кроме полученных ранее данных о механизмах действия глутоксима *in vitro* и *in vivo*, просматривается и ещё одно важное решение полученное нами, а именно, об однотипности действия глутоксима на Тх и НСТ-реакции нейтрофилов *in vitro* и *in vivo*.

На наш взгляд, эти иммунологические параметры могут служить критериями для назначения глутоксима после оценки его *in vitro*, для лечения животных с парвовирусной инфекцией.

Итак, проведенные нами исследования показали, что глутоксим можно применять супоросным свиноматкам без ущерба последним и приплоду. Поросятам с парвовирусной инфекцией также можно применять глутоксим для достижения максимального клинического и иммунологического эффекта. Одним из иммунологических критериев положительного, пролонгированного иммуностропного действия глутоксима может служить оценка его иммуностропной активности *in vitro* по снижению количества Т-хелперов и спонтанной и индуцированной НСТ реакции нейтрофилов, что можно использовать в качестве наиболее информативных тестов для иммунологической и клинической оценки лечебной эффективности препарата. Тесты оценки количества Т-хелперов и НСТ- активности нейтрофилов просты в исполнении и легко доступны в обычной ветеринарной лаборатории и могут быть успешно применены не только в крупных городских центрах, но и в отдаленных районах, так как для их выполнения требуется только термостат, центрифуга и обычный световой микроскоп.

Таким образом, проведенное исследование в целом позволило выявить клиническую и иммунологическую эффективность глутоксима и разработать дополнительные иммунологические критерии для его назначения у поросят с парвовирусной инфекцией.

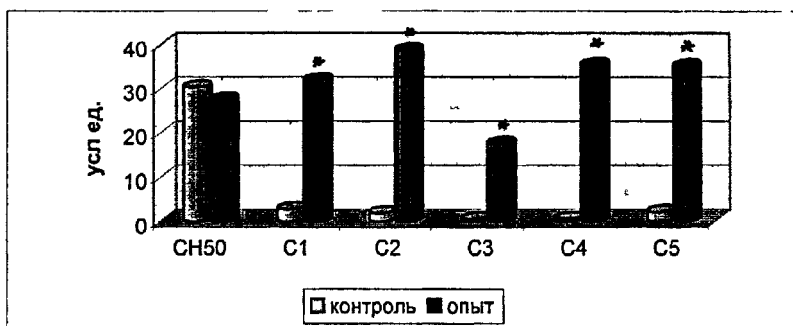


Рис.5. Влияние глутоксима in vivo на показатели комплемента у поросят с ЛВС

Примечание: * - $P < 0,001$

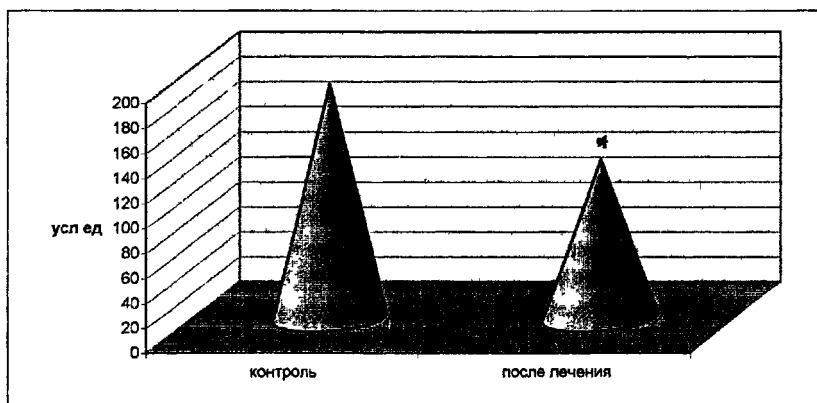


Рис.6. Показатели ЦИК у поросят до и после лечения глутоксимом

Примечание. * - $P < 0,05$.

Экономическая эффективность применения глутоксима супоросным свиноматкам и полученным от них поросят с парвовирусной инфекцией составила 9,8 рубля на 1 рубль ветеринарных затрат.

ВЫВОДЫ

1. 5-кратное введение глутоксима супоросным свиноматкам с парвовирусной инфекцией в дозе 0,1 мкг/кг массы снижает инфицированность приплода и его внутриутробную гибель

2. Изменения в иммунной системе у свиноматок после введения глутоксима выражаются в активации Тх, метаболической реактивности фагоцитов и снижении показателей гуморального звена.

3'. Инкубация цельной крови с глутоксिमом *in vitro*, полученной от поросят с продуктивной парвовирусной инфекцией приводит к выраженному снижению активности клеточного звена иммунной системы, механизм супрессии которой связан с активацией редокс-системы лейкоцитов и уходом пораженных вирусом клеток в апоптоз.

4. 10- кратное введение глутоксима поросятам с парвовирусной инфекцией в дозе 0,05 мкг/кг массы вызывает сходное действие на иммунную систему с его влиянием *in vitro*, но в условиях рекрутации лейкоцитов из органов кроветворения, степень "депрессивного" действия глутоксима менее выражена.

5. Применение глутоксима поросятам с парвовирусной инфекцией сопровождается элиминацией вируса из крови, снижением процента летальности и увеличением прироста их живой массы.

6. Снижение Т-хелперной активности лимфоцитов и НСТ-реактивности нейтрофилов под влиянием глутоксима *in vitro* может служить дополнительным критерием для его назначения свиньям, больным парвовирусной инфекцией.

7. Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий при парвовирусной инфекции свиней с применением глутоксима на 1 рубль затрат составила 9,8 рубля.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Иммунокорригирующую терапию свиней глутоксимом проводить с учетом выявления антигенемии.

2. При отсутствии возможности ИФА верификации диагноза на ПВС проводить пробу с глутоксимом *in vitro* из расчета 0,05 мкг препарата, на 10 мл крови, после часовой инкубации, при температуре 37°C, с учетом уровней Тх и НСТ - реакции нейтрофилов.

3. При снижении уровней Тх и НСТ - активности нейтрофилов у поросят с ПВС и ликвидации вирусемии рекомендуем назначать глутоксим из расчета 0,05 мкг/кг массы тела 10-кратно в течение 10 дней.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Степовой И.В. Влияние комбинированной специфической профилактики и иммунотерапии на иммунную систему свиней с парвовирусной инфекцией / Степовой И.В., Ермолин А.В., Зурочка А.В., Яковлев Ю.Ю. // Тезисы докладов XIV Российской научной конференции. - Челябинск, 2000. - С. 110-111.

2. Яковлев Ю.Ю. Методические подходы к изучению влияния глутоксима на иммунную систему свиней с парвовирусным энтеритом *in vitro* и *in vivo* / Яковлев Ю.Ю., А.В.Ермолин., А.В. Зурочка, К.В.

Никушкина, И.Ю. Мельников // Материалы конференции, посвященной 20 летию ЦНИЛ ЧелГМА «Современные лабораторные технологии в биологии и медицине». - Челябинск. - 2000. - С. 98.

3. Яковлев Ю.Ю. Оценка действия глутоксима *in vitro* на иммунную систему свиней с парвовирусной инфекцией / Яковлев Ю.Ю., Ермолин А.В., Зурочка А.В. // Материалы международной науч.-практ. конф. «Новые энтеросорбенты и фармакологически активные вещества и их применение в ветеринарии и животноводстве», посвященной 80-летию Заслуженного деятеля науки РФ, доктора ветеринарных наук, профессора М.И.Рабиновича (26-27 июля 2002 г), Троицк, 2002. - С.123-125.

4. Яковлев Ю.Ю. Иммуотропное действие глутоксима у свиней с парвовирусной инфекцией / Яковлев Ю.Ю., Ермолин А.В., Зурочка А.В. // Мат-лы межд. науч.-практ. конф. « Новые энтеросорбенты и фармакологически активные вещества и их применение в ветеринарии и животноводстве», посвященной 80-летию Заслуженного деятеля науки РФ, доктора ветеринарных наук, профессора М.И.Рабинович (26-27 июля 2002 г.), Троицк, 2002. - С. 125-127.

5. Яковлев Ю.Ю. Глутоксим - активный корректор иммунной системы у свиней с парвовирусной инфекцией // Мат-лы международной научно-практич. конф. «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», Троицк, 2004. - С.204-206.

ЯКОВЛЕВ ЮРИЙ ЮРЬЕВИЧ

**ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ГЛУТОКСИМА У
СВИНЕЙ С ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и ИММУНОЛОГИЯ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Сдано в набор 15.11.2004 г. Подписано к печати 17.11.2004 г.

Формат 60х84/16. Печать офсетная. Объем 1 печ. л.

Тираж 100 экз. Заказ №902

Гарнитура "Times New Roman"

Отпечатано в типографии УГАВМ. Лицензия ЛР №021252

457100, г. Троицк, Челябинская область

#23 128