

АКТИВНОСТЬ ГУМОРАЛЬНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У МЕСТНЫХ ПОРОД ЖИВОТНЫХ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ ТЫВА

Р.Б. ЧЫСЫМА¹, Ю.Н. ФЕДОРОВ², Е.Ю. МАКАРОВА¹, Г.Д. КУУЛАР³

Гуморальные и клеточные факторы естественной резистентности животных представлены разнообразными белками, пептидами, лизосомальными ферментами, иммунокомпетентными клетками, содержащимися в крови. Обладая антимикробными свойствами, факторы естественной резистентности дополнительно активируют другие гуморальные и клеточные механизмы иммунитета. Система естественной резистентности, сформированная в процессе эволюции и микроэволюции пород домашних животных, обуславливает их приспособленность к биотическим и абиотическим стрессам, вызываемым действием патогенов, неблагоприятных природно-климатических условий, что особенно важно в отношении животных в условиях круглогодичного пастбищного содержания. Ландшафт Республики Тыва гористый, это территория с резко континентальным климатом, морозами до -50°C зимой, прохладным летом в горах и жарким — в котловинах. Тем не менее, регион считается благоприятным для разведения местных пород лошадей (*Equus ferus caballus*), овец (*Ovis aries*), коз (*Capra aegagrus hircus*) и высокогорных яков (*Poephagus grunniens*), которые хорошо приспособлены к таким сложным условиям. Из перечисленных видов только яки были ранее изучены в отношении оценки состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Сравнительное исследование показателей естественной резистентности у местных тувинских лошадей, высокогорных яков, тувинских короткожирнохвостых овец и коз тувинской популяции нами выполнено впервые. Проведенная оценка гуморальных и клеточных факторов естественной резистентности выявила видовые различия. Так, местные тувинские лошади по активности фагоцитоза превосходили коз тувинской популяции и тувинских короткожирнохвостых овец в 1,38 и 1,43 раза ($P < 0,001$). Максимальный фагоцитарный индекс отмечали у лошадей местной породы ($P < 0,001$ и $P < 0,01$). У высокогорных яков показатели активности и индекса фагоцитоза были выше таковой у коз и овец ($P < 0,001$). Определение содержания лизосомально-катионных белков показало межвидовые различия, которые наиболее выражены у местных тувинских лошадей и высокогорных яков. У лошадей и яков концентрация лизосомально-катионных белков в сыворотке крови характеризовалась максимальными значениями, тогда как у коз и овец этот показатель был ниже ($P < 0,001$). У всех изученных животных между фагоцитарной активностью, индексом фагоцитоза и количеством лизосомально-катионных белков имелась положительная коррелятивная связь ($r = 0,86-0,98$). Отметим, что в доступных нам источниках литературы данные относительно такой взаимосвязи у сельскохозяйственных животных крайне ограничены. Нами также выявлено межвидовое разнообразие по продукции иммуноглобулинов основных изотипов (IgG, IgM, IgA), высокое содержание которых отмечали у коз и овец.

Ключевые слова: естественная резистентность, тувинская лошадь, высокогорный як, тувинская популяция коз, тувинская короткожирнохвостая овца, фагоцитоз, лизосомально-катионные белки, иммуноглобулины.

Естественная резистентность — генетически унаследованная способность противостоять неблагоприятным факторам окружающей среды. У животных гуморальные и клеточные факторы естественной резистентности представлены разнообразными белками, пептидами, иммунокомпетентными клетками, содержащимися в крови. Обладая антимикробными свойствами, они способны активировать другие гуморальные и клеточные механизмы иммунитета. Активностью гуморальных и клеточных факторов защиты в основном определяется способность макроорганизма противостоять абиотическим и биотическим стрессорам, в том числе патогенам. Механизмы резистентности могут быть статическими или динамическими, специфическими или неспецифическими, при инфекции они могут реализовываться до ее начала или в ответ на ее развитие, приводить к гибели патогена или ограничению его способности воздействовать на хозяина. Иными словами, для реализации механизмов естественной резистентности важны различные приспособо-

бительные реакции клеточной и гуморальной природы, сложившиеся в процессе эволюции, с чем связан фундаментальный интерес к проблеме (1).

В то же время вопрос о естественной резистентности важен в практическом аспекте, поскольку здоровье, репродуктивная функция, продуктивное долголетие поголовья и, в конечном итоге, рентабельность животноводства зависят от способности особи противодействовать агрессивным биотическим и абиотическим агентам. От систем естественной резистентности, сформированных в процессе эволюции и микроэволюции, зависит приспособленность к специфическим природно-климатическим условиям, что особенно важно в отношении видов и пород, которые находятся на круглогодичном пастбищном содержании, а также в случае, когда переход к такому способу разведения представляется целесообразным в силу местных особенностей. Более того, вопрос благополучия сельскохозяйственных животных стал актуален в отношении видов, которых традиционно выращивали в закрытых помещениях. Дискутируется положительное влияние условий, близких к естественным, на общее состояние, устойчивость к патологиями (2-4) и, как следствие, на продуктивность поголовья, хотя признаются и сопутствующие этому риски, в частности угроза инфекций (5, 6).

Республика Тыва считается благоприятным регионом разведения локальных пород лошадей, овец, коз и высокогорных яков. Эти животные хорошо приспособлены к суровым условиям региона, обладают удивительной выносливостью и адаптированы к круглогодичному использованию пастбищного корма (7). Для решения практических задач сохранения здоровья, разведения и совершенствования этих животных важно учитывать физиологические возможности их организма, в том числе состояние естественной резистентности. В настоящее время установлены особенности иммунного статуса у большинства пород сельскохозяйственных животных, предложены методы его оценки (8-11). Однако естественная резистентность локальных пород и аборигенных популяций животных в экстремальных условиях Республики Тыва исследована недостаточно, при этом большее внимание уделено якам с оценкой их физиолого-биохимического статуса в связи с природно-климатической и экологической спецификой региона (12).

Целью работы стало изучение особенностей естественной резистентности местных пород лошадей, аборигенных пород овец, коз и высокогорных яков в условиях Республики Тыва, выполненное нами впервые.

Методика. Работу проводили в 2013-2014 годах на базовых предприятиях Тувинского НИИ сельского хозяйства — ГУП «Бай-Тал» и ГУП «Малчын» (Бай-Тайгинский и Монгун-Тайгинский районы, Республика Тыва). Объектами исследований были тувинская популяция шерстных коз (*Capra aegagrus hircus*), овцы (*Ovis aries*) тувинской грубошерстной короткожирнохвостой породы, лошади (*Equus ferus caballus*) местной тувинской породы и тувинские высокогорные яки (*Poephagus grunniens*) породы Сарлык. Группы формировали с учетом возраста, физиологического состояния, живой массы и продуктивности. Животных весь год содержали на подножном корме.

Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли с использованием бактериальной взвеси суточной культуры *Escherichia coli*. Вычисляли фагоцитарный индекс (ФИ) — среднее число микробных тел, поглощенных одним активным нейтрофилом, и процент фагоцитоза — долю нейтрофилов, способных к поглощению микроорганизмов с использованием светового микроскопа Biolar IDP5AZ («Zeiss AG», Германия) (13). О степени насыщения гранулоцитов крови катионными белками судили на основании лизосомально-катионного теста (ЛКТ, полуколичественный метод, который позволяет выявлять в нейтрофилах гранулы, содержащие катионные

белки) — посредством микроскопирования мазков крови, окрашенных бромфеноловым синим, и расчета по формуле Астальди-Верга; гранулы лизосомальных катионных белков (ЛКБ) подсчитывали по методу В.Е. Пигаревского (14) с использованием ЛКТ. Концентрацию сывороточных иммуноглобулинов (Ig) G-, M- и A-изотипов оценивали методом радиальной иммунодиффузии (РИД) с охарактеризованными моноспецифическими антитисыворотками и моноклональными антителами против каждого изотипа иммуноглобулинов, а также со стандартными сыворотками крови животных с известным содержанием иммуноглобулина соответствующего изотипа (15).

Данные подвергали статистическому анализу с использованием пакетов программ Microsoft Excel и SNEDECOR V4 (16).

Результаты. В республике животных местных тувинских пород в теплое время года выпасают на альпийских пастбищах, с сентября постепенно перегоняют в горные ущелья ближе к местам зимовки. Зимой и весной (до апреля) животные находятся на зимних пастбищах, которые главным образом расположены в горах средней высоты, где пастьба в это время возможна только в местах с невысоким снежным покровом. Для подкормки ослабленных и больных животных в холодное время года на пастбищах создаются страховые запасы кормов, молодняку и маточному поголовью дополнительно дают сено и соль-лизунец.

В основе защитной функции лейкоцитов лежит фагоцитарный процесс, заключающийся в их способности распознавать, поглощать, убивать и переваривать чужеродные клетки (17). Величина ФА позволяет оценить резервные возможности нейтрофилов по поглощению и нейтрализации микробов. При оценке этого показателя у местных пород лошадей, овец, коз и высокогорных яков были выявлены существенные видовые различия (табл. 1). Так, по ФА тувинские лошади превосходили тувинских коз и тувинских короткожирнохвостых овец соответственно в 1,38 и 1,43 раза ($P < 0,001$). Обнаружены также межвидовые различия по ФИ: у лошадей местной породы по сравнению с овцами и козами отмечали наибольшие значения ($P < 0,001-0,01$). Фагоцитарная активность нейтрофилов и индекс фагоцитоза у яков были несколько ниже, чем у лошадей, но достоверно выше таковых у коз и овец ($P < 0,001$). Наименьшие значения фагоцитарной активности (38,6 и 37,3 %) и индекса фагоцитоза (4,0 и 3,8 микробных тел/нейтрофил) выявили у коз и овец ($P < 0,001$).

1. Фагоцитарная активность (ФА), фагоцитарный индекс (ФИ) и содержание лизосомально-катионных белков (ЛКБ) в нейтрофилах крови у животных местных тувинских пород ($X \pm x$, ГУП «Бай-Тал», ГУП «Малчын», Бай-Тайгинский и Монгун-Тайгинский районы, Республика Тыва)

Показатель	Козы	Овцы	Лошади	Яки
ФА, %	38,60±0,43	37,30±0,42	53,50±0,82	49,60±0,32
ФИ, микробных тел/нейтрофил	4,00±0,08	3,80±0,09	4,60±0,11	4,20±0,04
ЛКБ, усл. ед.	1,14±0,04	1,00±0,04	1,71±0,02	1,61±0,01

Содержание неферментных катионных белков в лизосомах нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов выявляли в лизосомально-катионном тесте, результаты которого принято считать одним из основных показателей бактерицидной активности нейтрофилов и естественной резистентности организма. Гранулоциты проявляют протеолитические и биоцидные свойства, а по содержанию в них гранул и интенсивности их окрашивания можно судить о состоянии кислородзависимой биоцидной системы нейтрофилов. Ее действие основано на нарушении структуры и функций мембран микробной клетки. Антимикробные катионные белки лизосомного аппарата относятся к особому классу физиологически активных веществ, возникших в

процессе эволюции биохимических механизмов антимикробной защиты (17).

Оценка количества ЛКБ у местных пород лошадей, овец, коз и высокогорных яков также выявила межвидовые различия, наиболее выраженные у лошадей местной породы и высокогорных яков с максимальными значениями этого показателя относительно коз и овец, у которых он был достоверно ниже ($P < 0,001$). У всех животных местных пород активностью фагоцитоза положительно коррелировала ($r = 0,86-0,98$) с содержанием ЛКБ. Вероятно, у обследованных особей с увеличением количества ЛКБ фагоцитоз активизировался. Сведения о подобной связи у сельскохозяйственных животных в специальной литературе до сих пор крайне ограничены, хотя имеются сообщения о том, что лизосомально-катионные белки, обладая широким спектром активности, участвуют в реализации многих защитно-приспособительных реакций (клеточная проницаемость, хемотаксис, опсонизация, фагоцитоз и воспаление) (18, 19).

К информативным характеристикам состояния естественной резистентности и иммунного статуса относится количественное содержание иммуноглобулинов изотипов IgG, IgM, IgA в сыворотке крови. Эти показатели служат важнейшим критерием при оценке функциональной активности В-системы иммунитета и диагностике различных иммунодефицитов (20, 21).

Наибольшая роль в защите организма против инфекции отводится IgG. Эти иммуноглобулины участвуют в нейтрализации вирусов, микробов, токсинов и предотвращают развитие инфекции (22-24). Наибольшую концентрацию IgG в сыворотке крови отмечали у коз ($23,05 \pm 0,17$ мг/мл), что выше, чем у овец и яков, соответственно на 4,40 и 9,02 % ($P < 0,001$). При этом самый низкий показатель по IgG отмечали именно у высокогорных яков — на 2,08 и 1,08 мг/мл меньше, чем у коз и овец ($P < 0,001$) (табл. 2).

2. Содержание разных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови у животных местных тувинских пород ($X \pm x$, ГУП «Бай-Тал», ГУП «Малчын», Бай-Тайгинский и Монгун-Тайгинский районы, Республика Тыва)

Концентрация, мг/мл	Козы	Овцы	Яки
IgG	$23,05 \pm 0,17$	$22,05 \pm 0,18$	$20,97 \pm 0,53$
IgM	$2,28 \pm 0,16$	$3,07 \pm 0,05$	$2,54 \pm 0,11$
IgA	$0,81 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$

Имуноглобулины М-изотипа синтезируются плазматическими клетками во вторичных лимфоидных органах. Это основной класс антител, играющих важную защитную роль на более ранних этапах антигенного воздействия и образующихся при первичном иммунном ответе. Несмотря на то, что IgM синтезируется в небольших количествах, он эффективнее IgG в активации комплемента, опсонизации, нейтрализации вирусов и агглютинации (22-24). В наших исследованиях достоверно высокую концентрацию IgM обнаружили в сыворотке крови овец: превышение аналогичного показателя у яков и коз составило соответственно 25,7 и 17,3 % ($P < 0,001$).

IgA — основной иммуноглобулин секретов слизистых оболочек и главный фактор их специфической защиты (22-24). Назначение сывороточного IgA, представленного в основном мономерной формой, менее понятно вследствие того, что он слабо участвует в активации комплемента, не связывает комплемент по классическому типу, не обладает способностью преципитировать растворимые, а также агглютинировать и лизировать корпускулярные антигены. Его биологическая роль в организме определяется взаимодействием всех изотипов иммуноглобулинов. Количественно он значительно уступает другим изотипам. Однако видовые особенности проявлялись и по этому показателю. Так, у овец и коз концентрация IgA не различалась, была в 3,7 раза выше, чем у высокогорных яков ($P < 0,001$),

и составила соответственно $0,83 \pm 0,02$ и $0,81 \pm 0,02$ мг/мл.

В целом у тувинских лошадей и высокогорных яков было выявлено увеличение показателей активности клеточного звена иммунитета, у местных пород коз и овец — гуморального.

Таким образом, выполненные исследования позволили охарактеризовать основные особенности естественной резистентности и ее межвидовые различия у местных пород животных в особых экологических условиях Республики Тыва. У всех видов обнаружена положительная корреляция между фагоцитарной активностью, индексом фагоцитоза и количеством лизосомально-катионных белков ($r = 0,86-0,98$). По сравнению с козами и овцами лошади местной породы и высокогорные яки характеризовались более высокими значениями активности и индекса фагоцитоза, а также увеличением количества лизосомально-катионных белков. Обнаруженное видовое разнообразие по иммуноглобулиновому профилю у изученных групп проявилось, в частности, в наиболее высоких значениях содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови у коз тувинской популяции и овец тувинской короткожирнохвостой породы. Наблюдаемые у местных пород особенности естественной резистентности можно объяснить межвидовыми различиями по функциональной активности систем регуляции гомеостаза, сформированными в процессе эволюции в экстремальных природно-климатических условиях.

¹ФГБНУ Тувинский НИИ сельского хозяйства,
667005 Россия, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Бухтуева, 4,
e-mail: chysyma@mail.ru;

²ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт биологической
промышленности,

141142 Россия, Московская обл., Щелковский р-н, пос. Биокombината, 17,
e-mail: fun181@mail.ru;

³ФГБОУ ВПО Тувинский государственный университет,
667000 Россия, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Ленина, 36,
e-mail: kuularg@mail.ru

Поступила в редакцию
10 августа 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 6, pp. 847-852

HUMORAL AND CELL FACTORS OF NATURAL RESISTANCE IN THE ANIMALS OF LOCAL BREEDS IN SPECIFIC ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF THE TYVA REPUBLIC

R.B. Chysyma¹, Yu.N. Fedorov², E.Yu. Makarova¹, G.D. Kuular³

¹Tuva Research Institute of Agriculture, Federal Agency of Scientific Organizations, 4, ul. Bukhtueva, Kyzyl, Tuva Republic, 667005 Russia, e-mail chysyma@mail.ru;

²All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry, Federal Agency of Scientific Organizations, 17, pos. Biokombinata, Shchelkovskii Region, Moscow Province, 141142 Russia, e-mail fun181@mail.ru;

³Tuva State University, 36, ul. Lenina, Kyzyl, Tyva Republic, 667000 Russia, e-mail kuularg@mail.ru

Received August 10, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.847eng

Abstract

Humoral and cellular factors of natural resistance of animals are represented by diverse proteins, peptides, lysosomal enzymes, and immunocompetent cells contained in blood. The natural resistance factors possessing antimicrobial properties additionally activate the other humoral and cellular immunity mechanisms. The natural resistance system formed during the process of evolution and microevolution of domesticated animals determines their fitness to biotic and abiotic stresses caused by the action of pathogens, unfavorable natural-climatic conditions that is most importantly for animals under all-year-round pasture keeping conditions. The landscapes of the Republic of Tuva are mountainous; this is a territory with sharply continental climate, frosts of down to -50 °C in winters, cool summer in highlands and hot in depressions. Nevertheless, the region is thought favorable for rearing native breeds of horses (*Equus ferus caballus*), sheep (*Ovis aries*), goats (*Capra aegagrus hircus*), and highland yaks (*Poephagus grunniens*), which are well fit to such complex conditions. Of the species listed, only the yaks were earlier studied with regard to evaluating the state of their cellu-

lar and humoral immunity. A comparative study on natural resistance parameters in native Tuvian horses, highland yaks, Tuvian short-fat-tailed sheep and goats of Tuvian population was performed by us for the first time. The evaluation of humoral and cellular factors of natural resistance revealed specific distinctions. Thus, the native Tuvian horses are superior to goats of Tuvian population and Tuvian short-fat-tailed sheep in phagocytosis activity as much as 1.38 and 1.43 times, respectively ($P < 0.001$). The maximum phagocytal index was observed in horses of native breeds ($P < 0.001$ and $P < 0.01$). Highland yaks showed parameters of phagocytosis activity and phagocytal index higher than those in goats and sheep ($P < 0.001$). The determination of the content of lysosomal-cationic proteins showed interspecific distinctions, which were most expressed in native Tuvian horses and highland yaks. Concentration of lysosomal-cationic proteins in blood serum of horses and yaks was characterized by the maximum values, while this index in goats and sheep was lower ($P < 0.001$). Positive correlation ($r = 0.86-0.98$) between phagocytosis activity, phagocytal index and the level of lysosomal-cationic proteins was found to be in the all animals studied. It should be noted that the data from available literary sources on such a relationship in agricultural animals are extremely limited. We also revealed interspecific diversity in the content of immunoglobulins of primary isotypes (IgG, IgM, IgA), the high values of which were observed in goats and sheep.

Keywords: natural resistance, local Tuva horses, high-mountain yak, Tuva goat population, Tuva short-fat-tailed sheep.

REFERENCES

1. Bertok L. *Natural immunity*. Elsevier-Press, The Netherlands, 2010.
2. Thamsborg S.M. Organic farming in the Nordic countries — animal health and production. *Acta Vet. Scand.*, 2001 Suppl, 95: 7-15 (doi: 10.1186/1751-0147-43-S1-S7).
3. Sørensen J.T., Edwards S., Noordhuizen J., Gunnarsson S. Animal production systems in the industrialised world. *Rev. Sci. Tech.*, 2006, 25(2): 493-503.
4. Mench J.A., Sumner D.A., Rosen-Molina J.T. Sustainability of egg production in the United States — the policy and market context. *Poult. Sci.*, 2011, 90(1): 229-240 (doi: 10.3382/ps.2010-00844).
5. Kijlstra A., Eissen O.A., Cornelissen J., Munnikma K., Eijck I., Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004, 45(9): 3165-3169.
6. Kijlstra A., Meerburg B.G., Bos A.P. Food safety in free-range and organic livestock systems: risk management and responsibility. *J. Food Prot.*, 2009, 72(12): 2629-2637.
7. Chysyma R.B., Makarova E.Yu. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki*, 2013, 5: 39-43.
8. Fedorov Yu.N. *Faktory immunologicheskoi zashchity u ovets v sisteme mat'—plod—novorozhdennyi. Doktorskaya dissertatsiya* [Factors of immune defense in sheep ewe—foetus—newborn lamb. DSc Thesis]. Moscow, 1984.
9. Fedorov Yu.N. V sbornike: *Strategiya razvitiya zhivotnovodstva Rossii — XXI vek* [In: Strategy for animal husbandry in Russia in XXI century]. Moscow, 2001: 337-346.
10. Fedorov Yu.N. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2004, 2: 3-9.
11. Neustroev M.P., Malysheva V.I. *Otsenka estestvennoi rezistentnosti loshadei (metodicheskie rekomendatsii)* [Estimation of natural resistance in horses: recommendations]. Novosibirsk, 1995.
12. Chysyma R.B. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2005, 4: 11-13.
13. Emel'yanenko P.A., Gryzlova O.N., Denisenko V.N. et al. *Metodicheskie rekomendatsii po testirovaniyu estestvennoi rezistentnosti telyat* [Manual for estimation of natural resistance in calves]. Moscow, 1980.
14. Pigarevskii V.E. *Lizosomal'no-kationnyi test (metodicheskie rekomendatsii)* [Lysosome cation test: guideline]. Moscow, 1978.
15. Manchini G., Carbonara A.O., Heremans I.P. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 1965, 2(3): 235-254.
16. Sorokin O.D. *Prikladnaya statistika na komp'yutere* [Applied statistics on PC]. Novosibirsk, 2008.
17. Khaïtov R.M. *Immunologiya*. Moscow, 2015.
18. Bezrukova E.V., Simbirtsev A.S., Khmel'nitskaya N.M. *Tsitokiny i vospalenie*, 2013, 12(1-2): 137-142.
19. Berezhnaya N.M., Chekhun V.F., Sepiashvili R.I. *Allergologiya i immunologiya*, 2005, 6(1): 38-49.
20. Khaïtov R.M., Pinegin B.V., Yarin A.A. *Rukovodstvo po klinicheskoi immunologii: diagnostika zabolevaniï immunnoi sistemy* [Manual for clinical immunology: diagnostics of immune diseases]. Moscow, 2009.
21. Petrov R.V., Khaïtov R.M., Pinegin B.V. *Immunologiya*, 1997, 4: 4-7.
22. Tizard I.R. *Veterinary immunology*. Elsevier-Press, The Netherlands, 2013.
23. Yarin A.A. *Immunologiya* [Immunology]. Moscow, 2010.
24. Gerald N.C., Robin M.Y. *Basis veterinary immunology*. University Press of Colorado, Boulder, 2014.