

# AR IMUNOPATOĻĪJĀM SAISTĪTĀS DERMATĪTU KOMPLIKĀCIJAS

## DERMATITIS COMPLICATED IMMUNOPATHOLOGY

**Gulžana Omarbekova<sup>1</sup>, Karimhans Muralinovs<sup>1</sup>, Oskars Kozinda<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Kazahijas nacionālā agrārā universitāte, Kazahstāna

<sup>2</sup>LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

<sup>1</sup>Kazakh National Agrarian University, Kazakhstan

<sup>2</sup>LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

muralinov-50@mail.ru

### ABSTRACT

The article presents the data on immunological studies of the pathogenesis of allergic dermatitis dogs of different breeds and ages to identify titers of autoantibodies in the reaction of indirect agglutination, the staging of a skin test and research in the truest test of Shelley. It is established, in the immunological phase allergic processes are developed autoantibodies in high titer, a skin test and test Shelley showed a high level of allergization.

**KEY WORDS:** immunology, allergic, autoantibodies.

### IEVADS

Atopiskais jeb alerģiskais dermatīts ir ādas iekaisums, kas rodas kā atbildes reakcija uz kairinājuma faktoru (alerģēnu). Iedzimts, imuno-neiro-alerģisks, hroniski recidivējošs ādas iekaisums, kas saistīts ar atopiju izpaužas kā intensīva nieze, simpaterģiska ādas reakcija (baltais dermatogرافisms), eritrematoziem izsitumiem un citām atopijas pazīmēm (Иванов, 2007; Медведев, 1999).

Aizsargreakcija iestājas tad, kad imūnsistēma ar pirmo mēģinājumu nav spējīga padarīt nekaitīgu (neīstīzēt) patogēnu. Tieši šādos gadījumos, kad imunitāte nedod vēlamu rezultātu (nenostrādā) iestājas alerģija, ko var nosaukt par imunoaisardzības otro ešelonu (posmu), jo tās efektorais mehānisms realizējas tikai uz atkārtotu kontaktu ar antigēnu. Principiālas atšķirības starp imunitāti un alerģiju nav. Jēdziens "alerģija" norāda uz imunoloģijas attīstības vēsturisko posmu, t.i. posmu, kad nebija pietiekošu zināšanu, lai izskaidrotu šo parādību kā tipisku imūnsistēmas atbildi un tādejādi radās šis termins "alerģija" (cita iedarbība).

Alerģisko dermatītu attīstībā liela loma ir organisma predispozīcijai uz alerģiskajām reakcijām. Reakcija uz kairinātāja iedarbību var attīstīties dažu dienu laikā vai ilgt pat vairākas nedēļas. Atopiskais dermatīts parasti izpaužas kā II tipa alerģiskā reakcija (citotoksiskā tipa alerģija). Par citotoksisku to dēvē tādēļ, ka pret antigēnu izveidotām šūnām antivielas savienojas ar organisma šūnām izraisot tajās bojājumus vai pat to līzi (citolītiskā iedarbība).

Citotoksiskās reakcijas cēlonis saistīts ar šūnām kas rodas organismā, kurām izmainīti šūnas membrānas komponenti. Nozīmīga loma šūnu autoalerģēno īpašību iegūšanai ir dažādu ķīmisku vielu nokļūšanai organismā, kas bieži saistīts ar medikamentu izmantošanu. Tās var izmainīt šūnu membrānu antigēno struktūru, kas saistīts ar konformatīvām izmaiņām šūnu antigēnos, šūnu membrānu bojājumiem un jaunu antigēnu veidošanos, kompleksu antigēnu veidošanos ar membrānu, kuros ķīmiskās vielas spēlē kaptēna lomu (piem. 2-metildofa-hipotensīvais preparāts) (Беренбейн, 1996; Студницин, 1989).

Alerģiskās reakcijas attīstību iedala trīs stadijās. Procesi sākas ar pirmo organisma reakciju ar alerģēnu un noslēdzas ar alerģisko antivielu vai sensibilizētu limfocītu veidošanos

organismā. Tā rezultātā notiek organisma sensibilizācija jeb tas kļūst jūtīgs pret specifisko alergēnu.

Pēc atkārtotas specifiskā alergēna nokļūšanas organismā notiek AG – AT kompleksa veidošanās, kas nosaka alergiskās reakcijas nākamo stadiju.

Klīniskās pazīmes saistītas ar organisma audu un orgānu atbildes reakciju uz iepriekšējā stadijā izveidotajiem mediatoriem.

Balstoties uz anamnēzes datiem, klīniskajām pazīmēm un veicot intradermālos testus, tiek uzstādīta diagnoze. Izmantojot imunoloģiskās laboratoriskās izmeklēšanas metodes, nosaka IgE ar radioalergosorbento (RAST) testu vai veic imunofēnotīvo analīzi, nosakot specifiskās autoantiviēlas skartajiem orgāniem un audiem (Шкаренко, 2012; Федоскова и др., 2002; . Фицпатрик и др., 1999; Алексеева, 1963).

Izmeklējuma mērķis bija, noskaidrot biežāk sastopamākās imunoloģiskās stadijas pazīmes dažādu formu alergiskajiem dermatītiem, kas sastopami dažāda vecuma un šķirņu suņiem.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Izmeklējumi veikti dzemdniecības, ķirurģijas un atražošanas biotehnoloģijas fakultātē, fakultātes veterinārajā klīnikā, kā arī dažādās Almatas veterinārajās klīnikās 16 suņiem, kas griezušies pēc palīdzības ar dažādu formu un gaitu alergiskajiem dermatītiem.

Lai diagnosticētu alergisko dermatītu un noteiktu autoantiviēlas pret ādas audu komponentiem un zemādas audiem, tika izmantota netiešā hemaglutinācijas reakcija (NHAR). Netiešās hemaglutinācijas reakcijas princips pamatojas uz eritrocītu spēju aglutinēties imūnā seruma klātbūtnē, kad tie adsorbējuši specifiskos antigēnus. Zināms, ka izmantojot tanīnu izgatavojot eitrocitāro diagnostiskumu, tiek paaugstināta NHAR specifika, bet ar formalīnu apstrādātie sensibilizētie eritrocīti ilgāk uzglabājas.

NHAR tika veikta sekojoši. Teļa eritrocītus fiksējām 3% formalīna šķīdumā pēc Weinback metodes. Eritrocītu masu trīs reizes skalojām ar 0.85% nātrija hlorīda šķīdumu un suspendējām līdz 10% suspensijai, sajaucām ar vienādu daudzuma formalīna šķīduma, kura sastāvā bija 3% CH<sub>3</sub>O<sub>4</sub> un 0.85% nātrija hlorīda šķīdums ar pH – 7.2. Suspensija tika izturēta 37° temperatūrā 30 minūtes. Lai veikt taninizāciju, sajaucām vienādās daļās 5% formalinizēto eritrocītu suspensiju ar tanīna šķīdumu attiecībā 1:50000 ar pH 7.2. Maisījumu izturējām 37° temperatūrā 30 minūtes.

Lai iegūtu eritrocitāro diagnostiskumu, vienādās daļās samaisījām 5% tanenizēto eritrocītu suspensiju un olbaltumvielu ekstraktu, kas iegūts no epidermas, dermas un zemādas audiem atšķaidījumā 1:20. Iegūtais reaģents, periodsiki to sajaucot, izturēts 56° temperatūrā 120 minūtes. Pēc tam eritrocītus, kas sensibilizēti ar antigēnu, trīs reizes skalojām ar 0.9% nātrija hlorīda šķīdumu (pH – 7.2), kura sastāvā bija 0.4% normāla truša asins seruma Šo maisījumu resuspendējām līdz 2.5% suspensijai un konservējām 0.05% nātrija azīda šķīdumā.

Ar iegūto diagnostikumu veicām netiešās hemaglutinācijas reakciju. Makrometodei izmantojām polisterola plātnītes. Mikrometodei izmantojām mikrotitrētās Tkači tipa plātnītes. Abas metodes izmantojām laboratorija apstākļos, kā arī veterinārajās klīnikās, kā „ekspres metodi”. Ar netiešās hemaglutinācijas reakciju tiek noteikta aktivitāte un specifiskums. Lai to varētu noteikt, astoņās polisterola plātnītes iedobēs iepilda 0.5 ml stabilizatora (tvin šķīdums-60 atšķaidījumā 1:25000). Pirmajā iedobē pievieno 0.5 ml pozitīva seruma atšķaidījumā 1:40, pēc tam veic divkārsu atšķaidījumu 8 iedobēs. Analogisku atšķaidījumu sagatavo negatīvajam kontroles serumam. Pēc atšķaidījumu sagatavošanas katrā iedobē iepilina 0.05 ml 2.5% diagnostiskuma. Plātnīti sakrata un atstāj uz 2 – 3 stundām 20° – 21° temperatūrā. Rezultāts tiek uzskatīts par pozitīvu, ja eritrocīti izklāj iedobi līdzīgu „lietussarga” formai. Reakcijai jābūt pozitīvai vismaz 6 iedobēs. Negatīva rezultāta gadījumā eritrocīti nosēžas iedobē

„pogai” līdzīgā formā. Pozitīvs hemaglutinācijas rezultāts ir tādā gadījumā, ja reakcija novērojama 6 iedobēs, kas atbilst titram 1:1280. Kontroles iedobēs visi rezultāti ir negatīvi (Муралинов, 1999; Царевский, 1982; Кузьмин, 1982; Robey, Allison, 1995; Шамардин, Каральник, 1997).

Netiešais bazofīlais tests (Šelli tests) pamatojas uz bazofīlo leukocītu morfoloģisko izmaiņu izpēti mijiedarbībā ar specifisko alergēnu (Кузьмин и др., 2002). Bazofīlo leukocītu procentuālais daudzums asinīs suņiem ir no 0 līdz 1.

Sarkanā neitrālā krāsviela izlases kātā nokrāso bazofīlo leukocītu granulas ķieģeļsarkanā krāsā, kas ļauj tās atšķirt no citām šūnām. Rekciju novēro mikroskopā, izmantojot eļļas imersijas metodi. Neizmainītajiem bazofīlajiem leukocītiem ir ieapaļa forma un iekrāsotās granulas atrodas šūnas iekšpusē. Pozitīvas reakcijas gadījumā novēro šūnu deformāciju, pseidopodiju veidošanos, izteiktu granulu kustību un atsevišķos gadījumos novēro šūnu plīsumus un granulu izklūšanu no šūnām. Katrā paraugā uzskaita 40 bazofīlos leukocītus, nosaka morfoloģiski izmainīto šūnu procentuālo sastāvu normā un patoloģijas gadījumā.

Nosacīti reakcija tiek iedalīta 3 pakāpēs, vāja (izmainīto bazofīlo leukocītu skaits pārsniedz 10% salīdzinot ar normu), mērena (15%) un izteikti pozitīva (vairāk par 20%). Visos gadījumos tiek ņemti vērā rezultāti, kas saistīti ar kontroles grupas bazofīlo leukocītu nespecifiskās reakcijas augstākajiem rādītājiem.

Intrakutānās alergiskās raudzes metodei izmantojām epidermas, dermas un zemādas audu ekstraktu atšķaidījumā 1:50. Ciskas apvidus mediālajā pusē intrakutāni ievadījām 0.5 ml ekstrakta. Otrās kājas simetriskajā apvidū intrakutāni ievadījām 0.1 ml fizioloģiskā šķīduma vai ekstrahēto šķīdumu. Rekciju novērtējām pēc 24 stundām. (kavētā reakcija). Tūlītējas reakcijas gadījumā injekcijas vietā uz ādas novērojām hiperēmijas zonu, kas maksimālo izmēru sasniedza 15 – 30 minūšu laikā. Pēc dažām stundām reakcija pilnībā izzuda.

Novērtējot reakciju, mērījām hiperemētās zonas diametru un salīdzinājām ar kontroli. Ja apsārtuma diametrs injekcijas vietā bija lielāks par 0.5 mm, reakciju vērtējām kā pozitīvu.

Autoloģisko sensibilizēto limfocītu raudze (ādas iekaisuma reakcija pēc autolimfocītu ievadīšanas). Lai atdalītu eritrocītus no leukocītiem asinis tika nostādinātas. Iegūto asins serumu atdalīja ar Pastēra pipetes palīdzību un centrifugēja 10 minūtes (1000 apgr./min.). Nostādināto šķīdumu atsūca, bet šūnu nosēdumu divkārti skaloja izotoniskajā nātrija hlorīda šķīdumā un nobeigumā resuspendēja 2 ml šajā paša šķīdumā. Iegūtajā suspensijā šūnu skaitu noteica izmantojot Gorjajeva kameru, bet vajadzības gadījumā suspensiju atšķaidīja līdz  $2 \times 10^6$  šūnu 1 ml. Veicot suspensiju uztriepju kontroles apskati, limfocītu sastāvam jābūt 88—94 % robežās.

Ādas raudzes metodika pamatojās uz 0.1 mll intrakutāno limfocītu suspensijas ievadīšanu ciskas apvidus mediālajā pusē un 0.1 mll. nātrija hlorīda vai ekstrahētā šķīduma ievadīšanu pretējā pusē. Rekciju novērtēja pēc 24 stundām (palēninātā reakcija). Rekcija tika vērtēta nosakot hiperēmijas zonas diametru salīdzinot to ar kontroles puses diametru. Ja apsārtuma diametrs suspensijas ievadīšanas vietā bija lielāks par 0.5 centimetriem, tā tika vērtēta kā pozitīva.

Ja hiperēmijas izmērs un ārējais izskats bija tāds pats kā kontroles pusē, reakcija tika vērtēta kā negatīva (—).

Ja hiperēmija bija nebūtiska un tās intensitāte (krāsa) bija bāli sārta un tā izzuda lēnāk par 24 stundām, salīdzinot ar kontroles pusi, tad tādu reakciju vērtēja kā šaubīgu (±).

Ja hiperēmijas zona bija 4 - 5 mm, apsārtusi un vāji izteiktu infiltrāciju, reakcija tika vērtēta kā vāji pozitīva (+).

Pie skaidri izteikta hiperēmijas ar 6 - 8 mm diametru un mēreni sāpīgu infiltrātu, kas ilga vairāk par 24 - 48 stundām, reakcija tika vērtēta kā vidēja (++)

Ja hiperēmija bija spilgti izteikta ar skaidri redzamu infiltrātu, tās diametrs bija vairāk par 10 - 15 mm, kā arī tā izzuda pēc 24 - 48 stundām vai ilgāk, reakcija tika vērtēta kā izteikti pozitīva (+++).

Kā alergēns netiešajai hemaglutinācijas reakcijai (NHAR) tika izmantoti ādas slāņi, kurus skāris dermatīts (epiderma, derma un zemādas audi). Iegūto materiālu homogonizēja līdz suspensijai, centrifugēja un pievienoja asins serumu, lai sensitivizētu formalizētos eritrocītus.

## PĒTĪJUMU REZULTĀTI

Suņiem, kas slimoja ar atopisko dermatītu, tika veikts pētījums saistībā ar asins serumu un noteikti antivielu titri pret aberētiem ādas audiem, noteikts tiešais Šelli tests, kā arī veikta ādas raudze ar sensibilizēto limfocītu palīdzību, lai noteiktu alergijas pakāpi. Iegūtie rezultāti apkopoti tabulā 1.

1. tabula/ Table 1

### Alerģijas pakāpes noteikšana suņiem Determination of allergic grade in dogs

N.p.k. Numb.	Suņu šķirnes Dog breeds	Vecums gados Age	NHAR Antivielu titri IRHA titres of antibodies	Šelli tests (pakāpe) Shelli test (degree)	Ādas raudze Skin reaction
1	Pūdelis Poodle	4	1:640	izteikta	+++
2	Boloņas zīda suns Bologna silk dog	5	1:320	izteikta	+++
3	Pūdelis Poodle	5	1:160	vāja	++
4	Kollijs Collie	7	1:160	vidēja	++
5	Šarpejs Shar-pei	2	1:80	vidēja	++
6	Dogs Great Dane	4	1:80	vāja	+
7	Vācu aitu suns German Shepherd	5	1:640	izteikta	+++
8	Kaukāza aitu suns Caucasian Sheep dog	4	1:1280	izteikta	+++
9	Šarpejs Shar-pei	7	1:640	izteikta	+++
10	Mopsis Pug	5	1:80	vidēja	+
11	Pekiniētis Pekignes	3	1:640	izteikta	+++
12	Vācu aitu suns German Shepherd	8	1:160	vidēja	++
13	Keri-blu terjers Kerry blue terrier	6	1:640	izteikta	+++
14	Bulterjers Bull-terrier	3	1:320	izteikta	++
15	Franču buldogs	6	1: 640	izteikta	+++

	French bulldog				
16	Toiterjers Toy terrier	5	1:640	izteikta	+++

Vāja alergiskā reakcija novērojama 2 suņiem izmantojot Šelli testu, 3 suņiem izmantojot intrakutāno raudzi un 3 suņiem nosakot antivielu titru 1:80.

Vidēja alergiskā reakcija novērojama 4 suņiem izmantojot Šelli testu, 2 suņiem izmantojot intrakutāno raudzi un 3 suņiem nosakot antivielu titru 1:160.

Izteikta alergiskā reakcija novērojama 10 suņiem izmantojot Šelli testu, 9 suņiem izmantojot intrakutāno raudzi un 11 suņiem nosakot antivielu titru 1:320 – 1:1280

## REZULTĀTU ANALĪZE

Izvērtējot pētījuma rezultātus, konstatēts, ka alergiskā dermatīta imunoloģiskās norises fāzē slimajiem dzīvniekiem veidojas autoantivielas pret ādas audiem un spēcīga limfocītu sensibilizācija. Noskaidrots, ka autolimfocītu sensibilizācijas un autoantivielu sintēzes rezultātā sākas imūnās reakcijas antigēns + antiViela un veidojas imūnie kompleksi, pret kuriem izstrādājas antivielas un process iegūst noslēgtu ciklu, bet slimība ilgstošu formu. Imunoloģisko procesu dinamika noskaidrota un apstiprināta ar tiešo Šelli testu, ādas raudzi un autoantivielu noteikšana ar NHAR. Rezultāti sakrīta ar alergizācijas līmeni jeb pakāpi.

No visām pielietotajām metodēm visjūtīgākā bija NHAR, pārējā metodes tikai apstiprināja organisma alergisko stāvokli.

Mūsu pētījumu rezultātā alergiskajām reakcijām predisponētākās suņu šķirnes bija šarpejs, pekīnietis un kerī-blu terjers. Mazjūtīgākas suņu šķirnes bija vācu aitu suns, dogs un kollijs.

Statistiskā datu apstrāde netika veikta tādēļ, ka katrs izmeklējamais dzīvnieks tika vērtēts individuāli. Datu apstrādi var veikt, ja katrā grupā ir ne mazāk par trīs dzīvniekiem.



1.attēls. Alerģiskais dermatīts cirkšņa apvidū  
Figure 1. Allergic dermatitis at inguinal region

## SECINĀJUMI

1. Alerģisko reakciju patogēnēzē vadošā loma ir imunoloģiskajai stadijai, kuras rezultātā veidojas autoantivielas pret savas ādas audu ekstraktu ar dermatītu slimojošiem suņiem, ko nosaka ar NHAR ar titru no 1:80 līdz 1:1280.
2. Alerģiskā dermatīta attīstības gaitā notiek limfocītu sensibilizācija, aktivizējas alerģiskie procesi, kas apstiprinās ar pozitīviem Šelli testa rezultātiem un ādas raudzi.
3. Alerģiskā dermatīta ārstēšana būs mazefektīva bez autoantivielu sintēzes nomākšanas. Autoantivielas, kas izstrādājušās pret ādas komponentiem sekmēs imūnās reakcijas, veidojot imūnos kompleksus pret sensibilizētiem limfocītiem un tādejādi sekmēs patoloģisko procesu attīstību.

## LITERATŪRA

1. Robey, E., Allison, J. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecule. *Immunology Today*. Vol. 16, №7. 1995; 306-310.
2. Фицпатрик, Т., Джонсон Т., Вулф, К., Сюрмонд, Д. Дерматология атлас-правочник. 1999.
3. Алексеева, Т.А. Иммунологические методы обнаружения аутоантител в сыворотке крови. Современная практическая аллергология. 1963; 11 - 46.
4. Беренбейн, Б.А., Студницин, А.А. Диагностика кожных болезней. 1996.
5. Иванов, О.Л., Львов, А.Н. Справочник дерматолога. 2007.
6. Дифференциальная диагностика кожных болезней под ред. Б.А. Беренбейна, А.А. Студницин. 1989.
7. Кузьмин, Ю.А., Шамардин, В.А., Каральник, Б.В. Применение амидола для получения эритроцитарного диагностикума. *Лабораторное дело*. 1982; 4: 53 - 55.
8. Медведев, К.С. Болезни кожи собак и кошек. 1999.
9. Муралинов, К.К., Сайдулдин, Т. Способы получения эритроцитарных диагностикумов аутоиммунных болезней органов дыхания. Патент № 7059 от 15.02.99 г. Авт.свидет. № 20860 от 15.02.99 г.
10. Федоскова, Т. Г., Ильина, Н. И., Лусс, Л. В. Принципы диагностики аллергических заболеваний. *Consillium medicum*. Том 2., 2002.
11. Царевский, Ю.П. Основы конструирования эритроцитарных антигенных белковых диагностикумов: Автореф, дис. докт. Ростов-на-Дону. 1982.
12. Шамардин, В.А., Каральник, Б.В. Способ сенсibilизации эритроцитов: А.С. 614377. СССР Б.и. 178. № 25, 1997.
13. Шкаренко, А.В. Дерматит у собак. Алгоритм диагностики и лечения атопического дерматита. Санкт-Петербург. 2012.