

ВПЛИВ ФІЛЬТРАЦІЙНОГО ПЛАЗМАФЕРЕЗУ НА ПОКАЗНИКИ СИРОВАТКИ КРОВІ У СЕРОПОЗИТИВНИХ НА ТОКСОПЛАЗМОЗ СОБАК

В. Кустуров, М. Брошков

Одеський державний аграрний університет

*В роботі представлені дані досліджень впливу фільтраційного плазмаферезу на біохімічні та імунологічні показники в сироватці крові серопозитивних на токсоплазмоз собак. Дослідження були проведені на трьох серопозитивних до *T. gondii* на собаках віком від двох до п'яти років, середня маса тіла яких становила 16 кг. У всіх тварин під час обстеження встановлені клінічні ознаки гепатопатії, пригнічення, в анамнезі персистуючі ознаки уражень шкіри у вигляді висипів, свербіння. Одноразове проведення процедури плазмаферезу сприяло значному зниженню титру IgG з 1,5 до процедури до 0,8 після процедури. Разом з тим значна кількість антитіл була визначена у самому фільтраті. Плазмаферез позитивно відображається на активності трансаміназ у плазмі крові пацієнтів. Так, уже після першої процедури активність ензимів зменшується приблизно удвічі і повертається до норми.*

Ключові слова: *T. gondii*, імунітет, плазмаферез, титр антитіл G, трансамінази, білкові фракції.

Токсоплазмоз викликає поширений внутрішньоклітинний найпростіший паразит *Toxoplasma gondii* (тип Apicomplexa, родина Sarcocystidae). Захворювання має складну епідеміологію; паразит здатний інфікувати практично всіх теплокровних тварин і має життєвий цикл з двох господарів [1]. Домашні кішки та інші котяті є остаточними господарями. Усі некошачі тварини, включаючи собак і людей, є проміжними господарями, однак *T. gondii* також може піддаватися безстатевому розмноженню у Felidae, які діють як проміжні господарі. У теплокровних проміжних господарів (включаючи людей) паразит зазнає стадії перетворення між швидко проліферуючим тахізоїтом, який вважається відповідальним за гострий токсоплазмоз, і відносно спокійним, повільно реплікованим, інцистованим бразидіоїтом, який може зберігатися все життя. Вважається, що взаємоперетворення тахізоїту в бразидіоїт відіграє центральну роль не лише у встановленні хронічної інфекції, але й у рецидиві захворювання [2]. Однак фактори, що відповідають за реактивацію хронічної інфекції *in vivo*, залишаються недостатньо вивченими [3].

Враховуючи, що діючі препарати проти *T. gondii* токсичні та неефективні щодо стадії паразита з бразидіоїтом [4, 5], глибоке розуміння механізму виснаження Т-клітин під час хронічного токсоплазмозу має вирішальне значення для розробки вдосконаленої імунотерапії проти цього патогену [6]. Існуючі схеми лікування мають побічні ефекти через мієлотоксичність (не кажучи вже про більш серйозні, які можуть бути небезпечними для життя), і вимагають припинення терапії або, що частіше, не мають терапевтичного ефекту. Це є серйозним недоліком, оскільки пацієнти (вроджено інфіковані новонароджені, пацієнти з ослабленим імунітетом) зазвичай потребують тривалих курсів лікування. Насамперед, жоден сучасний препарат не здатний усунути цисти *T. gondii* з інфікованого господаря, які залишаються в стані спокою, за умови, що імунна система достатньо сильна, щоб перешкодити їх реактивації в тахізоїти. [7]

Основною причиною розвитку та хронізації інфекцій, певною мірою навіть умовно-патогенних, вважають ослаблення захисних сил організму внаслідок перенесених раніше захворювань та різних видів екзо- та ендотоксикозів. Однак призначення імунотерапії та біогенних стимуляторів, зокрема нераціональне застосування цитомединів (тималіну, тимогену, тимоптину) створює загрозу складноконтрольованих аутоімунних процесів у зв'язку з надмірною стимуляцією Т-лімфоцитів, а використання ліпополісахаридів (пірогенал, протидіоган) стимулює В-лімфоцити з підвищеною продукцією імуноглобулінів та антитіл, що може стимулювати аутоімунні процеси [8].

Без ліквідації причин депресії або спотворених імунних реакцій важко розраховувати на стійку імунокорекцію. Якщо не провести санацію внутрішнього середовища, не вивести патологічні продукти, не відновити нормальний перебіг метаболічних процесів, зокрема

перекисного окиснення ліпідів або протеоліза, тобто, якщо не ліквідувати «токсичний прес» на імунітет то важко розраховувати на відновлення тільки за допомогою медикаментозної стимуляції [9].

Показанням для виконання плазмаферезу, а також плазмосорбції є недостатність дії аферентних методів детоксикації (лікарська терапія, інфузійна терапія у поєднанні з форсованим діурезом) [10]. У лікувальних цілях плазмаферез проводять при багатьох захворюваннях і патологічних станах (наприклад, при екзогенних інтоксикаціях – харчових отруєннях, передозування медикаментами, після хімотерапії; при ендогенних інтоксикаціях – важкі захворювання, які супроводжуються вираженою інтоксикацією, а саме: остеомієліт, паранеопластичний синдром, важкі інфекційні процеси) [11-14]. Було проведено подвійний фільтраційний плазмаферез у собак, хворих на лейшманіоз, внаслідок чого спостерігали швидке усунення ознак гіперпротеїнемії [15]. Показано ефективність застосування процедури плазмаферезу у собак при бабезіозі [16].

Отже розробка нетоксичних і добре переносимих терапевтичних методів, які б запобігли реактивації збудника *T. gondii*, скоротили тривалість лікування особливо за хронічного токсоплазмозу, є достатньо актуальним питанням в сучасній ветеринарній клінічній практиці.

Матеріали і методи. Дослідження були проведені на 3 серопозитивних до *T. gondii* собаках віком від двох до п'яти років, середня маса тіла яких становила 16 кг (рис. 1). У всіх тварин під час обстеження встановлені клінічні ознаки гепатопатії, пригнічення, в анамнезі персистуючі ознаки уражень шкіри у вигляді висипів, свербіння. У тварин тричі з інтервалом 48 годин (безпосередньо перед кожним проведенням процедури плазмаферезу) та тричі відразу після проведенням процедури плазмаферезу відбирали кров з ліктьової вени (фото 1-2). Також для дослідження використовували фільтрат який був отриманий під час процедури. Перед забором крові тварин утримували від прийому їжі 8 годин. Для дослідження вмісту IgG до токсоплазмозу, загального протеїну, білкових фракцій, активності аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), відбирали цільну кров у пробірки з активатором згортання крові (SiO_2), сироватка була ретельно відокремлена від формених елементів не пізніше, ніж через 1 годину після взяття крові.



Рис. 1. Собаки під час плазмаферезу

Визначення концентрації загального протеїну, білкових фракцій, активності аланін- (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ) в сироватці крові проводили з використанням тест-систем фірми DAC (Молдова). Дослідження проводилось на біохімічному аналізаторі Evolution 3000 (Італія). IgG *Toxoplasma gondii* визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу на ІФА-аналізаторі Multiskan FC (Фінляндія) за допомогою тест-системи фірми «Хема» (Росія).

Для проведення процедури плазмаферезу використовували апарат АПФ-1 «Гемофер», який являє собою камерний насос шлуночкового типу з впускаючими та випускаючими клапанами, що в період «діастоли» засмоктують кров з вени, а в період «систоли» – виштовхують її далі. При здійсненні плазмаферезу використовували магістраль та плазмафільтр (ПМФ-800) одноразового використання. В якості плазмазамінника застосовували ізотонічний розчин NaCl, як антикоагулянт – розчин гепарину (5000 МО/мл), в середньому 3 мл на тварину. Антикоагулянт додавали поступово в розчин NaCl з розрахунку 1 мл на 200 мл ізотонічного розчину. В середньому на одну процедуру плазмаферезу витрачалося 600 мл ізотонічного розчину NaCl. Кожній тварині процедуру плазмаферезу проводили тричі, з інтервалом 48 год.

Результати власних досліджень. В табл. 1 представлені данні отримані при проведенні процедури плазмаферезу у серопозитивних до *Toxoplasma gondii* собак. Ми намагалися визначити як буде змінюватися титр специфічних IgG за проведення процедури плазмаферезу а саме, чи проходять антитіла через плазмафільтр і їх динаміка в подальшому. Слід також зазначити, що в середньому тривалість однієї процедури дорівнює трьом годинам.

Таблиця 1. Динаміка титру IgG проти *Toxoplasma gondii* у собак за процедури плазмаферезу Median[minimum-maximum] n=3

Процедури	Періоди визначення показників	Титр специфічних IgG	Референтні значення
I процедура	Перед I процедурою	1,5[1,4-1,6]	< 0,9 - негативний результат 0,9-1,1 – сумнівний результат >1,1 - позитивний результат
	Фільтрат	1,4[1,3-1,4]	
	Після I процедури	0,8[0,8-0,9]	
II процедура	Перед II процедурою	1,4[1,4-1,4]	
	Фільтрат	1,3[1,2-1,3]	
	Після II процедури	0,7[0,6-0,7]	
III процедура	Перед III процедурою	1,5[1,4-1,5]	
	Фільтрат	1,3[1,2-1,3]	
	Після III процедури	0,8[0,7-0,8]	

Одноразове проведення процедури плазмаферезу сприяло значному зниженню титру IgG з 1,5 до процедури до 0,8 після процедури. Разом з тим значна кількість антитіл була визначена у самому фільтраті. Аналізуючи динаміку титру специфічних антитіл протягом двох послідовних процедур, слід зазначити, що подібна тенденція зберіглася.

Оцінка такої динаміки титру може вказувати на те, що відновлення після кожної процедури рівня антитіл відбувається за рахунок їх міграції, з тканин де вони депонуються, до кровоносних судин. Вочевидь сталість цього показника регулюється за принципом від'ємного зв'язку і є важливою ланкою в механізмі імунної відповіді проти цього збудника. Імовірно для підтримки напруженості імунної відповіді, в крові циркулює певний (сталий) титр антитіл який визначається індивідуально, залежно від антигенного навантаження.

В подальшому була проведена оцінка динаміки біохімічних показників сироватки крові за проведення процедури плазмаферезу. Внутрішньоклітинні ферменти трансамінування є маркерами токсичного навантаження на організм та деструктивних процесів в певних органах чи тканинах. Аналізі результатів біохімічних показників сироватки крові у собак перед процедурою плазмаферезу вказує на те, що у тварин вища за фізіологічні межі активність АЛАТ, АсАТ (табл. 2). Збільшення цих показників вказує на те, що в організмі дослідних тварин розвиваються явища метаболічного ацидозу та пошкодження гепатоцитів.

Проведення одноразової процедури плазмаферезу сприяло зменшенню активності АЛАТ майже вдвічі 42,0 проти 88,6 Од\л перед процедурою при цьому у самому фільтраті цей показник складав 82 Од\л. Трансамінази є внутрішньоклітинними ензимами печінки, серця, м'язів та ін. тканин і зростання їх активності у крові вказує на наявність деструктивних процесів у відповідних тканинах і органах. Так, за токсоплазмозу собак встановлено перевищення норми показників активності цих ензимів у плазмі крові що вказує на гепатотоксичний стан в організмі цих тварин.

Таблиця 2. Динаміка біохімічних показників сироватки крові серопозитивних на *Toxoplasma gondii* у собак за процедури плазмаферезу Median[minimum-maximum] n=3

Процедури	Періоди визначення показників	Показники				
		АлАТ, од/л (10-55)	АсАТ, од/л (10-25)	Загальний протеїн, г/л (55-75)	Альбумін, г/л (26-40)	γ-глобуліни, г/л
I процедура	Перед I процедурою	88,6 [74,0-116,0]	54,0 [44,0-62,0]	74,6 [62-92]	30,1 [27,2-34,1]	10,9 [8,9-13,2]
	Фільтрат	82 [72,0-104,0]	36,0 [32,0-40,0]	65,3 [48-84]	19,6 [16,2-24,1]	9,1 [7,1-11,3]
	Після I процедури	42,0 [35,0-51,0]	22,3 [18,0-25,0]	62,7 [44-80]	28,2 [24,3-31,9]	10,7 [9,0-12,1]
II процедура	Перед II процедурою	76,0 [65,0-88,0]	21,0 [16,0-25,0]	71,3 [58-87]	26,8 [22,4-31,7]	14,6 [12,2-15,4]
	Фільтрат	33,0 [25,0-38,0]	23,3 [20,0-25,0]	48 [39-68]	13,6 [12,0-16,4]	9,5 [8,4-10,0-]
	Після II процедури	23,3 [14,0-32,0]	12,6 [12,0-14,0]	60,4 [57-72]	26,1 [23,9-30,0]	12,8 [11,6-14,3]
III процедура	Перед III процедурою	52,3 [44,0-58,0]	30,6 [24,0-35,0]	69,2 [59-78]	29,4 [27,0-32,4]	21,3 [16,9-26,4]
	Фільтрат	40,3 [28,0-50,0]	28,0 [22,0-33,0]	61,6 [51-74]	18,0 [16,4-19,5]	16,0 [13,5-19,1]
	Після II процедури	13,6 [11,0-18,0]	17,7 [15,0-19,0]	63,3 [58-70]	27,1 [25,4-30,4]	20,6 [16,4-24,5]

Трекова лавсанова мембрана у плазмафільтрі (ПМФ-800) має пори діаметром біля 0,4 мкм, що дозволяє вільно переходити усім рідким компонентам крові та затримує лише формені елементи. Очевидно тому активність трансаміназ у фільтраті істотно не відрізняється від такої у плазмі крові тварин. Виявлена тенденція щодо меншої активності цих ензимів у фільтраті пояснюється використанням плазмазаміного розчину, що потрапляючи у кровоток змінює гемодинаміку в бік більшого розведення крові (загальна активність ензимів при цьому не змінюється, однак активність відносно одиниці об'єму зменшується за рахунок зростання кількості рідини).

Плазмаферез позитивно відображається на активності трансаміназ у плазмі крові пацієнтів. Так, уже після першої процедури активність ензимів зменшується приблизно удвічі і повертається до норми. Після наступних процедур встановлену подібну закономірність. З одного боку такі зміни пояснюється вилученням ензимів з кров'яного руслу у фільтрат, а з іншого, можна припустити, що внаслідок детоксикаційної дії плазмаферезу на організм тварин покращується детоксикаційна функція печінки (внаслідок зменшення токсичного навантаження) і підвищується здатність синусоїдних клітин знешкоджувати трансамінази плазми крові.

Потрібно відмітити, що від першої до другої і від другої до третьої процедури плазмаферезу активність цих ензимів у плазмі крові збільшується і подекуди виходить за фізіологічні межі, що вказує на наявність деструктивних процесів в організмі, однак якщо порівняти стаціонарну активність АлАТ та АсАТ до першої і до третьої процедури, то вона менша приблизно у 1,5 раза. Такі зміни свідчать про ефективність детоксикаційної дії плазмаферезу за токсоплазмозу у собак

Аналіз динаміки показників загального протеїну, альбуміну та γ-глобуліну в сироватці крові собак за трьох процедур плазмаферезу вказує на тенденцію до зниження рівня загального протеїну та альбуміну та збільшення рівня γ-глобуліну. Так показник загального протеїну в середньому перед процедурою складав 74,6[62-92] г/л після другої 71,3[58-87] та 69,2[59-78] після третьої. Слід зазначити, що незважаючи на масивні обсяги переробленої плазми (2,0 л в

середньому), у крові собак зберігався достатній рівень альбуміну, що не вимагало введення будь-яких розчинів.

Після першого сеансу спостерігається зниження концентрації загального протеїну в середньому на 12,0 г/л. Проте вже за кілька днів вміст його у крові наближається до початкового рівня. Отримані дані збігаються з дослідженнями проведеними Воиновим В.А. при процедурах плазмаферезу у людей [17].

На відміну від динаміки рівня загального протеїну в сироватці крові рівень фракції γ – глобулінів мав тенденцію до збільшення під час процедури плазмаферезу. Так протягом трьох процедур рівень γ -глобулінів збільшився з 10,9[8,9-13,2] до 21,3[16,9-26,4]. Швидке відновлення рівня γ -глобулінової фракції білків може бути пов'язане з активацією антигенів в організмі внаслідок зниження токсичного «пресу» продуктами метаболізму. Отримані дані кореспондують з динамікою титру специфічних IgG проти *Toxoplasma gondii*. Підвищення γ -глобулінів зазвичай вказує на позитивні зміни в організмі які здебільшого викликані активацією захисних процесів імунної системи [18] Тому найбільш патогенетично обґрунтованим підходом до лікування цієї хронічної інфекції є еферентна терапія, спрямована на виведення тих патологічних продуктів, що сприяють вторинній імунодепресії [10].

Також слід зазначити, що вже після другої процедури плазмаферезу у всіх трьох тварин значно покращилися клінічні ознаки, що виражалося в збільшенні рухової активності, апетиту та зниження ознак свербіння.

Висновок. Дослідження продемонстрували, що ознаки порушення функції печінки та наявність уражень шкіри можуть бути спричинені збудником токсоплазмозу. Результати отримані при дослідженні сироватки крові в динаміці за проведення процедури плазмаферезу підкреслюють необхідність застосування цього методу в практиці ветеринарних лікарів. Важливим також є те, що не встановлено побічного впливу на організм собак процедури плазмаферезу та швидке відновлення біохімічних показників сироватки крові.

Список використаних джерел

1. Dubey, J. (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans* (2nd ed., Vol. 340). CRC Press.
2. Lyons, R. E., McLeod, R., & Roberts, C. W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends in Parasitology*, 18(5), 198–201. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02248-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02248-1)
3. Craver, M. P. J., Rooney, P. J., & Knoll, L. J. (2010). Isolation of *Toxoplasma gondii* development mutants identifies a potential proteophosphoglycan that enhances cyst wall formation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 169(2), 120–123. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2009.10.006>
4. Bhadra, R., & Khan, I. A. (2012). Redefining Chronic Toxoplasmosis—A T Cell Exhaustion Perspective. *PLOS Pathogens*, 8(10), e1002903. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002903>
5. Bhadra, R., Gigley, J. P., & Khan, I. A. (2011). The CD8 T-cell road to immunotherapy of toxoplasmosis. *Immunotherapy*, 3(6), 789–801. <https://doi.org/10.2217/IMT.11.68>
6. Bhadra, R., Gigley, J. P., Weiss, L. M., & Khan, I. A. (2011). Control of *Toxoplasma* reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9196–9201. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1015298108>
7. Konstantinovic, N., Guegan, H., Stājner, T., Belaz, S., & Robert-Gangneux, F. (2019). Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives. *Food and Waterborne Parasitology*, 15. <https://doi.org/10.1016/J.FAWPAR.2019.E00036>
8. Кісіна, В. І. (1998) Про тактику уrogenитального хламідіозу. *Вісник дерматології*, 3. 12-16
9. Ражева, І.В., Налівкін, А.Е., Мельнікова, Е.В. (2002) Екстракорпоральна детоксикація в інтенсивній терапії гнійно-септичних захворювань у дітей. *Тези доповіді X конференції московського товариства гемаферезу*. 104-105
10. Безін А.Н., Володін І.А. (2015) Порівняльна ефективність різних варіантів плазмаферезу при метростатіях у собак. *Збірник матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 85-річчю Уральської державної академії ветеринарної медицини та*

100-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора Василя Григоровича Мартинова. 4-6. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23478107> (дата звернення: 20.12.2021)

11. Кривонос, В.І. (2007) Проблема токсоплазмозу. Україна: Слобожанщина.
12. Atmaca, H. T., Gazyagci, A. N., Canpolat, S., & Kul, O. (2013). Hepatic stellate cells increase in *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-135/FIGURES/8>
13. Patitucci, A. N., Alley, M. R., Jones, B. R., & Charleston, W. A. G. (1997). Protozoal encephalomyelitis of dogs involving *Neosporium caninum* and *Toxoplasma gondii* in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 45(6). <https://doi.org/10.1080/00480169.1997.36035>
14. Gerhold, R., Newman, S. J., Grunenwald, C. M., Crews, A., Hodshon, A., & Su, C. (2014). Acute onset of encephalomyelitis with atypical lesions associated with dual infection of *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii* in a dog. *Veterinary Parasitology*, 205(3–4), 697–701. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2014.09.008>
15. Cohen, T. M., Blois, S., & Vince, A. R. (2016). Fatal extraintestinal toxoplasmosis in a young male cat with enlarged mesenteric lymph nodes. *The Canadian Veterinary Journal*, 57(5), 483-486
16. Біломитцева Є.С., Сафіуллін Р.Т. (2018). Плазмаферез при комплексній терапії бабезіозу собак. *Теорія та практика боротьби з паразитарними хворобами*, (19), 50-53. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/plazmaferez-pri-kompleksnoy-terapii-babezioza-sobak/viewer> (дата звернення: 20.12.2021)
17. Воїнов, В.А. (2009) *Ефферентна терапія. Мембранний плазмаферез*. Москва: Новини, 304. URL: <https://kingmed.info/media/book/1/399.pdf> (дата звернення: 20.12.2021)
18. O'connell, T. X., Horita, T. J., & Kasravi, B. (2005). Understanding and Interpreting the Serum Protein Electrophoresis. *American Family Physician*, 71(1), 105–112. URL: www.aafp.org/afp/AmericanFamilyPhysician105

THE EFFECT OF FILTRATION PLASMAPHERESIS ON SERUM PARAMETERS IN SEROPOSITIVE TOXOPLASMOSIS DOGS

V. Kusturov, M. Broshkov

The paper presents data of studying the effect of filtration plasmapheresis on biochemical and immunological parameters in serum of dogs that are seropositive for toxoplasmosis. The studies were carried out on 3 seropositive for T. Gondii dogs between the ages of two and five years, the average body weight of which was 16 kg. During the examination, all animals showed clinical signs of hepatopathy, depression, anamnesis showed persistent signs of skin lesions in the form of rashes, itching. A single plasmapheresis procedure contributed to a significant decrease in the IgG titer from 1.5 to 0.8 after the procedure. At the same time, a significant number of antibodies was detected in the filtrate itself. Plasmapheresis has a positive effect on the activity of transaminases in patients' blood plasma. So, after the first procedure, the activity of enzymes has decreased by about half and returned to normal.

Keywords: *T. gondii, immunity, plasmapheresis, antibody titer, G, transaminases, protein fractions*