

Список літератури

1. Баковецкая, О.В., Еремін, А.А., Пилипенко, Р.М. Модифицирующее влияние наночастиц металлов на репродуктивную функцию коров в послестельный период. Веткорм – 2009 – № – с. 14-15. 2. Величко, Г.Н. Противовирусное и иммуномодулирующее действие бетулина при вирусных респираторных инфекциях крупного рогатого скота. Диссертация. – 2008. 3. Кучерук, О.Д., Жукова, Е.В., Устинова Г.И. Применение гликопина с вакциной для профилактики инфекционного ринотрахеита. Труды ВИЭВ – 2009 – т.75 – с. 135-137. 4. Федоров, А.И., Искандарова, С.С., Искандаров, М.И. и др. Иммунотропное действие миопрола на модели белых мышей и клеток эндотелия кровеносных сосудов. Труды ВИЭВ – Т.76 – с. 241-245.

INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF METALS ON THE VACCINE-CHALLENGED REACTION OF CATTLE, IMMUNIZED AGAINST IBR

Shulyak A.F., Velichko G.N.

SRE All Russian Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow

Вукова С. Ю.

Mogilev State University named after A/A/ Kuleshov, Byelarus, Mogilev

UDS of Fe, Cu and Zn influenced negatively on the antibody response and syntheses of interferon in cattle inoculated with live vaccine against IBR. There was observed correlation "dose-effect".

УДК 619:591.8:616-097.3:578.832.1

**ВИВЧЕННЯ МУКОЗАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ КУРЧАТ
ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАРАЖЕННЯ ВІРУСОМ ІНФЕКЦІЙНОГО ЛАРИНГОТРАХЕЇТУ**

Шутченко П.О.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Птахівництво в країнах з інтенсивним розвитком тваринництва надають особливо великого значення, вважаючи його одним з основних чинників у проблемі забезпечення населення м'ясопродуктами. Вирішення цієї важливої проблеми пов'язано зі стійким благополуччям господарств стосовно захворювань інфекційної етіології [4]. Вірусні хвороби, які проявляються масовим ураженням респираторних органів та органів травлення домінують у їх загальній патології. Особливе місце серед них займають хвороби інфекційної етіології, які спричиняють великі економічні збитки господарствам. Основними такими хворобами у курей є грип птиці, мікоплазмоз, ларинготрахеїт, інфекційний бронхіт курей, ньюкаслська хвороба, вивченню яких у останні роки приділяється зростаюча увага. Ці хвороби відносять до мукозальних захворювань. Тому, разом із загальним – клітинним та гуморальним імунітетом, доцільно вивчати локальний, або мукозальний імунітет слизових оболонок респираторного, шлунково-кишкового тракту, а також кон'юнктиво-асоційовану лімфоїдну тканину. Слизова оболонка із-за її топографічної позиції є першою для ураження патогенами та взаємодіє з екзогенними антигенами [1]. Вона містить комплекс факторів неспецифічного та специфічного імунного захисту, що в більшості випадків забезпечує надійний бар'єр від проникнення патогенів. Імунітет слизової оболонки являє собою складну систему, який включає структуровані та лімфоїдні тканини, епітеліальні клітини, дендритні клітини, макрофаги, нейтрофіли [3]. Вивченню мукозального імунітету разом із загальним приділяється окрема увага дослідниками усього світу. З цієї метою використовують найсучасніші методи гістохімії та імуногістохімії, що ґрунтуються на імуноферментному виявленні імунокомпетентних клітин та антигенів збудників за допомогою специфічних або антивидових сироваток у зрізах тканини [2]. Проте такі дослідження загального та мукозального імунітету в Україні не проводяться. Застосування імуногістохімічних методів дозволяє вивчити динаміку імунної відповіді у домашньої птиці та тварин на рівні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів і макрофагів та М-клітин (мембранних клітин) шлунково-кишкового тракту.

Матеріали і методи. У досліді використовували 2 групи птиці: перша група курчат була заражена епізоотичним штамом вірусу інфекційного ларинготрахеїту інтратрахеально у дозі 100 ЕІД₅₀/гол. Друга група курчат слугувала інтактним контролем. Від курчат на 1-у, 3-ю, 5-у, 7-у, 10-у, 14-у та 21-у добу відібрано зразки внутрішніх органів – сліпа кишка, трахея, легені. Матеріал фіксували у рідкому азоті. Проведено виготовлення гістологічних препаратів із застосуванням кріостату, фарбування зрізів імуногістохімічним методом із застосуванням міченого стрептавідин-біотину.

З метою імуногістохімічних досліджень вивчення формування імунної відповіді курчат були застосовані моноклональні антитіла до субпопуляцій імунокомпетентних клітин: CD4, CD8, IgM, IgG, IgA, макрофаги.

Імуногістохімічний облік клітинних субпопуляцій Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, макрофагів у внутрішніх органах було здійснено за допомогою комп'ютерної програми «ВідеоТест Морфологія – 5.0». У цих органах було підраховано відсоткове співвідношення зон позитивно фарбованих клітин до всіх клітин зрізу (незabarвлених). Отримані дані обробляли статистично.

Результати досліджень. При детальному вивченні динаміки формування імунної відповіді у інфікованих та контрольних курчат були встановлені наступні зміни.

У легенях при дослідженні субпопуляцій Т-лімфоцитів з поверхневим маркером CD8 було встановлено різке збільшення їх активності майже у 2 рази у 1-й групі курчат. Так, на 3-ю добу вміст клітин-хелперів становив (4,170±0,205) % при (2,416±0,335) % у контролі. Але на 7-у добу спостерігали різке збільшення клітин у групі контролю до (4,026±0,123) % (Рис. 1). Таким чином, вірус стимулює активізацію процесу накопичення клітин-кілерів набагато раніше. Стимуляція імунної відповіді мала місце у курчат 1-ї групи до 14-ї доби досліджень, коли вміст кілерів набував максимальних показників і становив (5,920±0,703) % проти (3,676±0,182) % у контролі.

Схожа динаміка була і у клітин з поверхневим маркером CD4. Так, збільшення клітин по відношенню до контролю спостерігалось у курчат 1-ї групи з 3-ї доби (2,976±0,261) % при (2,963±0,977) % у групі контролю та тривало до 5-ї доби з показником (3,063±0,933) % при (3,036±0,449) % у групі інтактних курчат. Але з 7-ї доби процес збільшення активності клітин набував різкого характеру та становив (3,843±0,222) % при (3,410±0,266) % у курчат контрольної групи. Максимальних вірогідних показників CD4 досягало у курчат 1-ї групи на 10-у добу (5,476±0,250) % при (3,080±0,540) % – у групі інтактних курчат. На 14-у добу та до кінця строку спостережень відбувалося дуже повільне зменшення відсоткової кількості CD4, на відміну від контрольних курчат, де спад активності був значним на 21-у добу (2,214±0,813) % при (3,173±0,200) % – на 14-у добу досліджень.

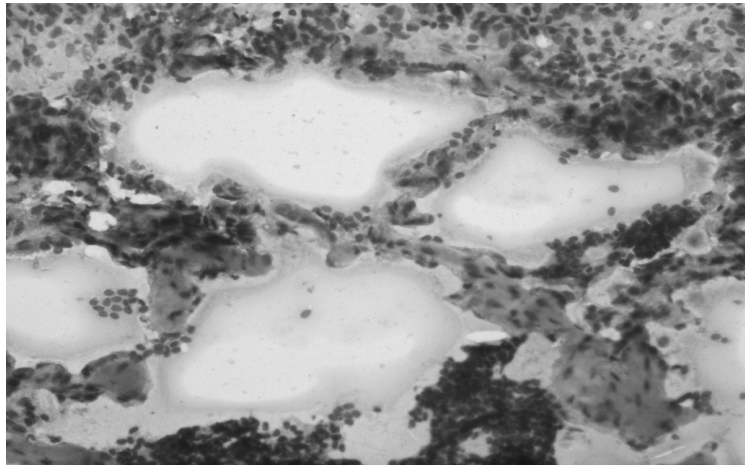


Рис. 1 Скупчення CD8 у легенях курчат на 7-у добу після інфікування вірусом інфекційного ларинготрахеїту. LSAB-метод. x 200

При дослідженні клітин з маркером IgG встановлено незначну його кількість у перші п'ять днів спостережень. Проте на 7-у добу у курчат 1-ї групи відзначалося різке вірогідне збільшення відсотку їх клітин на фоні різкого зменшення клітин з маркером IgM ($5,653 \pm 0,139$) % при ($4,113 \pm 0,133$) % у інтактної птиці, причому рівень їх у контрольній групі був значно нижчим протягом 7-ї – 21-ї доби досліджу ($6,032 \pm 0,235$) % при ($4,540 \pm 0,214$) % у контролі на кінець спостережень.

Коливання відсоткової кількості клітин в сторону збільшення або зменшення спостерігали й при вивченні субпопуляції клітин з поверхневим маркером IgA. Чітка тенденція до збільшення відсотку клітин відзначалася з 10-ї доби досліджень ($2,023 \pm 0,800$) % у курчат 1-ї групи при ($1,846 \pm 0,290$) % у інтактних курчат. Підвищення активності клітин тривало до кінця строку спостережень на 21-у добу та набувала максимального рівня з показником ($3,614 \pm 0,124$) % при ($3,412 \pm 0,135$) % у групі контрольних курчат.

Динаміка накопичення клітин з поверхневим маркером CD8 у сліпій кишці курчат 1-ї групи характеризувалася незначним, поступовим збільшенням відсоткової кількості з 1-ї доби ($11,716 \pm 2,855$) % при ($4,853 \pm 1,834$) % у групі контрольних курчат до 10-ї доби включно ($15,356 \pm 3,933$) % при ($10,763 \pm 1,168$) % в контролі. Максимальних значень відсоток клітин досяг на 14-у добу з показником ($19,833 \pm 0,245$) % при ($12,143 \pm 0,149$) % у інтактних курчат, після чого спостерігався незначний спад активності цих клітин, який все ж був значно вищим, ніж у попередні строки досліджень.

При вивченні вмісту макрофагів у курчат 1-ї дослідної групи показники відсоткової кількості макрофагів також були вище, ніж у курчат 2-ї групи ($9,95 \pm 0,655$) % на 5-у добу спостережень. Після цього відбувався процес повільного зменшення активності макрофагів до кінця строку спостережень на 21-у добу ($6,99 \pm 1,539$) % при ($4,521 \pm 0,452$) % у курчат 2-ї групи.

Кількість лімфоцитів з поверхневим маркером IgM у курчат 1-ї групи характеризувалась підйомом функціональної активності з 3-ї доби ($1,866 \pm 0,190$) % при ($1,343 \pm 0,669$) % у контролі по 10-у добу включно з максимальним показником ($2,463 \pm 0,193$) % при ($1,833 \pm 0,162$) % у інтактної птиці. У подальшому спостерігали період спаду активності до кінця строку спостережень на 21-дому ($2,178 \pm 0,184$) % при ($0,896 \pm 0,254$) % у групі контролю.

Ці дані корелювали із даними зміни вмісту клітин з маркером IgG. Так, у період, коли спостерігався підйом активності IgM (тобто з 1-ї по 10-у добу досліджень), то рівень IgG коливався в сторону підвищення та зменшення активності. Проте, на 10-у добу, коли відсоткова кількість IgM зменшувалася, мала місце активізація виробітки IgG. У курчат 1-ї групи процес зростання відсоткової кількості набував різкого характеру, ніж у курчат 2-ї групи, з максимальним показником ($4,983 \pm 0,128$) % на 21-у добу спостережень.

При дослідженні динаміки накопичення лімфоцитів з поверхневим маркером IgA не спостерігали чіткої динаміки до збільшення або зменшення відсоткової кількості цих клітин. Крім того рівень IgA у курчат 1-ї групи майже не відрізнявся від показників у контрольних курчат ($3,960 \pm 0,310$) % при ($3,486 \pm 0,244$) % у інтактної птиці на 5-у добу досліджень. Лише починаючи з 14-ї доби спостережень у курчат 1-ї групи було встановлено чітке збільшення вмісту клітин з маркером до ($4,533 \pm 0,538$) % при ($3,826 \pm 0,615$) % у контролі, яке тривало до кінця строку спостережень на 21-у добу та становило ($5,146 \pm 0,394$) % при ($4,124 \pm 0,407$) % у інтактної птиці.

Таке незначне збільшення IgA може свідчити про другорядне значення гуморального імунітету, що має місце на слизових оболонках респіраторного та шлунково-кишкового трактів при інфекційному ларинготрахеїті.

У трахеї курчат 1-ї групи при дослідженні субпопуляції Т-лімфоцитів з поверхневим маркером CD4 крива змін динаміки накопичення характеризувалася значною кількістю клітин по відношенню до курчат 2-ї групи протягом усього періоду спостережень. Так на 1-у добу кількість клітин становила ($3,41 \pm 0,617$) % при ($0,526 \pm 0,255$) % – у курчат 2-ї групи відповідно. Максимального показнику клітини з маркером CD4 досягали на 10-у добу ($7,686 \pm 0,282$) % (рис.2). На 14-у – 21-у добу спостережень у курчат 1-ї групи відбувався процес повільного зменшення кількості клітин.

Майже така ж картина відбувалася й у випадку з клітинами IgM. Тут також зареєстрована значна кількість цих клітин у курчат 1-ї групи порівняно до групи контролю більш ніж у 2 рази протягом п'яти днів. Так, на 2-у добу вміст IgM у курчат 1-ї групи становив ($1,943 \pm 0,350$) % при ($0,996 \pm 0,136$) % у контрольній групі. Максимальних значень у 1-й і 2-й групах цей показник досягав на 7-у добу ($2,583 \pm 0,516$) % при ($2,316 \pm 0,103$) % у контрольній групі. У подальшому спостерігали значне зменшення кількості цих клітин до кінця строку дослідів на 21-у добу.

При дослідженні клітин з маркером IgG у курчат 1-ї групи встановлено незначну його кількість у перші сім днів спостережень ($0,396 \pm 0,044$) % при ($0,196 \pm 0,042$) % у птиці контрольної групи. Саме на 10-у добу відзначалося різке вірогідне збільшення відсотку їх клітин на фоні різкого зменшення клітин з маркером IgM ($0,970 \pm 0,183$) % при ($0,343 \pm 0,117$) % – у інтактних курчат. Збільшення тривало до кінці строку спостережень на 21-у добу, коли показник набував максимальних значень – ($1,542 \pm 0,162$) % при ($0,984 \pm 0,416$) % – у контрольній групі курчат.

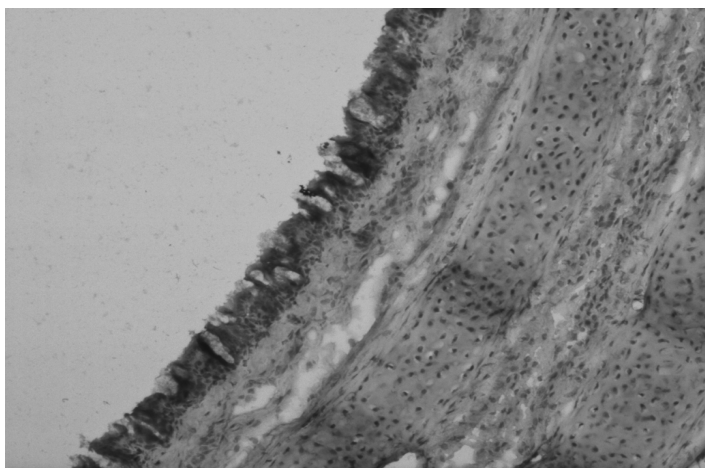


Рис. 2 Скупчення CD4 у трахеї курчат на 10-у добу після інфікування вірусом інфекційного ларинготрахеїту. LSAB-метод. x 200

Коливання відсоткової кількості клітин у сторону збільшення або зменшення спостерігали при вивченні субпопуляції клітин з поверхневим маркером IgA. Чітка тенденція до збільшення відсотку клітин відзначалася з 10-ї доби досліджень ($1,640 \pm 0,160$) % у курчат 1-ї групи при ($1,076 \pm 0,218$) % у контрольної птиці та до кінця строку спостережень з максимальним рівнем на 21-у добу – ($2,312 \pm 0,185$) % у курчат 1-ї групи при ($1,554 \pm 0,156$) % у групі інтактних курчат. Причому, як і в попередньому випадку кількість клітин у курчат 1-ї групи була набагато вище, ніж у курчат 2-ї групи.

Висновки. 1. При проведенні імуногістохімічних досліджень у курчат 1-ї дослідної групи встановлено, що у перші доби спостережень у легенях, трахеї та сліпій кишці відмічалось пригнічення імунної відповіді на рівні всіх субпопуляцій імунокомпетентних клітин.

2. Зростання субпопуляції мононуклеарів (макрофагів) відзначалось в більш ранні строки, ніж інших субпопуляцій, тобто вже на 2-ю добу спостережень та зберігалось до 7-ї доби. Це пояснюється їхньою найбільш ранньою взаємодією з антигеном як ланки, що забезпечує подання переробленої антигенної субстанції виконавчим клітинам.

3. У формуванні імунної відповіді на зараження курчат вірусом інфекційного ларинготрахеїту найбільш активно приймають участь елементи клітинної ланки імунітету (клітини з маркерами CD4, CD8, макрофаги). При інфікуванні птиці вірусом інфекційного ларинготрахеїту найбільш активно спрацьовує клітинна ланка імунітету; у трахеї разом з цим виявився активний стан і гуморального імунітету.

Список літератури

1. Caldwell, D.J., Danforth H.D., Morris B.C., Ameiss K.A., and McElroy A.P. Participation of the intestinal epithelium and mast cells in local mucosal immune responses in commercial poultry. 2004 Poultry Science 83:591–599.
2. Pantin-Jackwood, MJ, Swayne DE. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. Rev Sci Tch. 2009 Apr; 28(1): 113-36.
3. Sung-Hyen Lee, Hyun S. Lillehoj, Soo-Muk Cho, et al. Immunostimulatory effects of oriental plum (*Prunus salicina* Lindl.) // Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 32 (2009) 407–417.
4. Sung-Hyen Lee, Hyun S. Lillehoj, Robert A. Heckert, et al. // Immune enhancing properties of Safflower leaf (*Carthamus tonctorius*) on chicken lymphocytes and macrophages // J. Poult. Sci., 45: 147–151, 2008

STUDY OF CHICKEN MUCOSAL IMMUNITY AFTER EXPERIMENTAL INFECTION WITH THE INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS

Shutchenko P.O.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

The investigations of 7 clusters of immunocompetent cells that applied to basic stages of immunity development, led to determine activity (percent amount) and character of accumulation of immunocompetent cells of basic stages of forming of immune protection specifically on the stage of early direct influence on agents – natural killers – CD8, on the stage of cooperation and transmission of antigenic products – T-helpers CD4, on the stage of its processing and presenting – macrophages and on the stage of specific immunoglobulins creation – cells with superficial markers IgG, IgM and IgA. They give the information about general parameters of immune activity of organism. At the carrying out immunohistochemical researches in chickens of infected and control experimental groups there was determined that in first day of observations in lungs, trachea, and caecum registered inhibition of immune reaction on the level of all subpopulations of immunocompetent cells.