

нических осложнений сахарного диабета [Текст] / А. Ефимов [и др.] // Вісн. фармакол. та фармації. – 2007. – № 11. – С. 27–34. 7. Штрыголь, С.Ю. Повышенное потребление натрия хлорида модулирует мочегонное действие энalapрилата у интактных крыс и на модели отекающего синдрома [Текст] / С.Ю. Штрыголь, В.А. Шумакова // Эксперим. и клин. фармакол. – 2006. – Т.63, № 3. – С. 32–34. 8. Hypoglycemic effects and mechanisms of action of Cortex Lycii Radicis on alloxan-induced diabetic mice [Text] / G. Davei [et al.] // Yakugaku Zasshi. – 2007. – Vol. 127, № 10. – P. 1715–1721. 9. Rios, L. Feline diabetes mellitus: diagnosis, treatment, and monitoring [Text] / L. Rios, C. Ward // Compend. Contin. Educ. Vet. – 2008. – №30 (12). – P. 626–639. 10. Rock, M. Diabetes in people, cats, and dogs: biomedicine and manifold ontologies [Text] / M. Rock, P. Babinec // Med. Antropol. – 2008. – №27 (4). – P. 324–352.

THE FUNCTIONAL STATE AND HISTOLOGICAL STRUCTURE OF KIDNEY IN MICE WITH DIABETIC NEPHROPATHY MODEL TREATED WITH DIACAMPH AND ENALAPRILATE

Shtrygol' V.S., Kutsan A.T., Shutchenko P.A.

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

Merzlikin S.I.

National Pharmaceutical University, Kharkiv

In experiments on mice with the model of alloxan-induced diabetes mellitus the novel antihyperglycemic medicine diacamph in a dose 25 mg/kg improves the functional and morphological state of the kidneys. Manifestations of the nephroprotective effect are reduction of polyuria and proteinuria, normalization of creatinine level in the blood, prevention of decline in glomerular filtration and tubular reabsorption, reduction of kidneys histostucture violations. The effectiveness of diacamph is higher than that of the known nephroprotector in diabetes mellitus – angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilate in a dose 2,5 mg/kg.

УДК 619:591.8:616-097.3:578.832.1

СТАН МУКОЗАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ КУРЧАТ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІНФІКУВАННЯ ВІРУСОМ НИЗЬКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ

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 респіраторних 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 в останні роки приділяється зростаюча увага. Ці хвороби відносять до мукозальних захворювань. Тому, разом із загальним – клітинним і гуморальним імунітетом, доцільно вивчати локальний, або мукозальний імунітет слизових оболонок респіраторного, шлунково-кишкового тракту, а також кон'юнктивно-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 всього світу. З цією 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 і М-клітин (мембранних клітин) шлунково-кишкового тракту.

Матеріали та методи. У досліді використовували 2 групи птиці: перша група – курчата, інфіковані вірусом низькопатогенного грипу птиці A/Garganey/Chervonooskilske/4-11/2009 (H4N6). 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 в 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 (незабарвлених). 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 вивченні динаміки накопичення Т-лімфоцитів з поверхневим маркером CD4 у інфікованих курчат встановлено процес супресивного спаду активності даних клітин з 1-ї по 5-у добу ($1,113 \pm 0,017$ % при $3,036 \pm 0,449$ % – у контролі). На 7-у добу зареєстровано процес збільшення клітин з максимальним показником на 10-у добу на рівні $2,360 \pm 0,011$ % при $3,08 \pm 0,540$ % – у контрольній птиці. Процес спадання активності клітин тривав з 10-ї по 21-у добу, причому рівень відсоткової кількості клітин у заражених курчат був нижчим за контрольну групу протягом усього періоду спостережень.

При вивченні динаміки змін імунокомпетентних клітин з маркером CD8 (Т-кілери) упродовж п'яти діб спостерігали процес супресивного зниження відсотку цих клітин у інфікованих курчат на фоні підйому їх відсоткової кількості у контрольній групі

($1,406 \pm 0,028$ % при $2,57 \pm 0,338$ % у контролі). Лише на 7-у добу було зафіксовано період збільшення кількості клітин з максимальним показником на 10-у добу – $6,036 \pm 0,877$ % при $3,93 \pm 0,472$ % у групі контрольної птиці. Після цього відбувалося повільне зменшення відсотку цих клітин, причому рівень їх був вище, ніж у групі контрольної птиці. Такий незначний період збільшення кількості клітин з маркерами CD4 та CD8 можливо пояснюється слабкою участю легень у формуванні клітинного імунітету при зараженні птиці низькопатогенним грипом птиці.

Рівень макрофагів у легенях інфікованої птиці був вищим, ніж у контрольної птиці. Максимального показника кількості макрофагів досягали на 5-у добу – $6,816 \pm 0,167$ % при $3,7 \pm 0,365$ % – у контрольних курчат. Після цього, на 7-у добу відбувався процес повільного зниження кількості клітин і на кінець спостережень їх кількість була на рівні 1-ї доби (рис. 1).

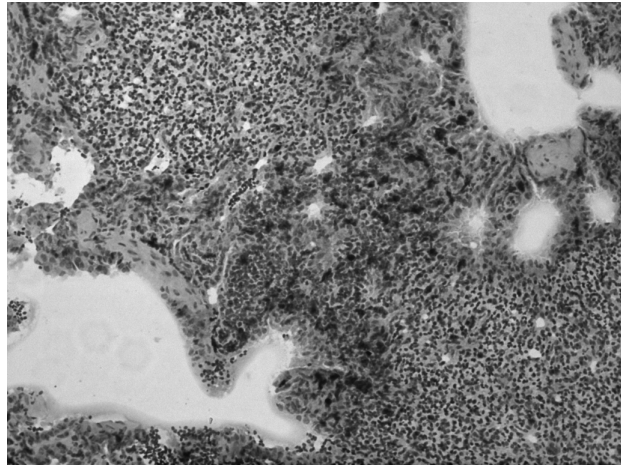


Рис. 1. Скупчення макрофагів у легенях курчат на 5-у добу після інфікування вірусом низькопатогенного грипу птиці. LSAB-метод. x 200

Характер накопичення глобулінпродукуючих клітин з поверхневим маркером IgM у інфікованих курчат характеризувався процесом повільного підвищення активності з 1-ї по 7-у добу досліджень. Рівень клітин на цей період був значно нижчим, ніж у контрольної птиці. Проте на 10-у добу процес підвищення кількості клітин набув різкого характеру та становив $1,97 \pm 0,223$ % при $1,546 \pm 0,811$ % у групі контрольної птиці. У подальшому відбувалося зниження відсоткової кількості цих клітин до кінця строку спостережень, причому рівень клітин у інфікованих курчат був вищим майже у 2 рази, ніж у контрольної птиці.

Рівень IgG у легенях інфікованих курчат знижувався протягом семи діб спостережень, причому показники були нижчими за контрольні. Але на 10-у добу спостерігався процес різкого збільшення активності клітин, який тривав до кінця строку спостережень і набував максимальних показників $5,52 \pm 0,208$ % на 21-у добу.

При вивченні характеру накопичення IgA у легенях встановлено супресивний спад активності цих клітин протягом семи діб спостережень. Але, якщо у селезінці у цей період кількість IgA була нижче, ніж у контролі, то у легенях навпаки, кількість клітин у інфікованих курчат, була більше за контрольну. На 10-у добу встановлено процес підйому відсоткової кількості цієї субпопуляції імунокомпетентних клітин, що тривав до кінця строку спостережень на 21-у добу з максимальним показником $5,566 \pm 0,375$ %. Причому цей показник був у 2 рази вищим за контрольний.

У сліпій кишці рівень клітин з маркером CD8 протягом періоду досліджень був вищим у групі інфікованих курчат, ніж у групі контролю. Так, на 1-у добу досліджень кількість клітин становила $17,1 \pm 0,820$ % при $4,853 \pm 1,834$ % – у контролі. Після невеликого спаду активності цих клітин на 3–5-у добу спостерігали незначне підвищення цих клітин на 10-у добу, проте рівень всеж був нижчим, ніж на 1-у добу спостережень – $13,94 \pm 1,969$ %. Високі показники CD8 залишалися до кінця строку спостережень, причому вони підвищилися й у контролі і залишалися майже на одному рівні (рис. 2).

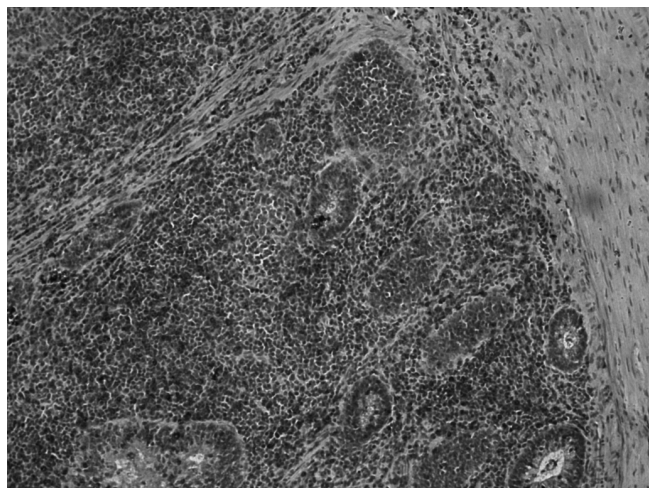


Рис. 2. Скупчення CD8 у сліпій кишці курчат на 14-у добу після інфікування вірусом низькопатогенного грипу птиці. LSAB-метод. x 200

При вивченні кривої кількісних змін клітин, що продукують IgM, встановлено певну тенденцію до зростання відсотку цих клітин у інфікованої птиці вже з першої доби досліджень. В інфікованої птиці встановлено чітке збільшення клітин з 1-ї по 10-у добу з максимальним показником $1,906 \pm 0,116$ % при $1,833 \pm 0,162$ % у курчат контрольної групи. Починаючи з 10-ї доби спостерігався процес зниження активності цих клітин. Кількість М-клітин збільшувалася до 10-ї доби спостережень, досягаючи максимального показнику $2,323 \pm 0,097$ % при $1,963 \pm 0,291$ % – у контролі. На 14-у добу встановлено різке зниження відсотку цих клітин до $1,003 \pm 0,402$ % на 21-у добу досліджень, причому рівень їх у інфікованої птиці був майже однаковим з контролем.

Відсоткова кількість клітин з маркером IgG починала зростати на 10-у добу після періоду коливань в бік зростання або зменшення. На 14-у добу підвищення набуло різкого характеру та досягало максимальних показників на 21-у добу $8,593 \pm 0,442$ %. Рівень клітин у інфікованих курчат був у 2 рази вищими за контрольний.

Така ж тенденція спостерігалася і при вивченні динаміки утворення клітин з маркером IgA. Рівень цих клітин у інфікованих курчат був вищим за контрольний протягом усього періоду спостережень. Відсоток кількості починав вірогідно збільшуватись на 10-у добу ($6,423 \pm 0,297$ % при $3,826 \pm 0,6155$ % – у контролі). Кількість цих клітин зростала до кінця строку спостережень і досягала максимальних показників на 21-у добу – $9,876 \pm 0,283$ %.

У трахеї при вивченні Т-лімфоцитів з маркером CD4 встановлено зростання їх у групі інфікованих курчат, по відношенню до контрольних. Так, відсоткова кількість їх починала зростати вже з першої доби досліджень і досягала максимальних показників на 10-у добу ($4,14 \pm 0,208$ % при $1,876 \pm 0,812$ % – у контролі). З 14-ї доби спостерігали етап повільного зниження клітин, що тривав до кінця строку спостережень на 21-у добу, але рівень у інфікованих курчат був значно вищим, ніж у контрольної птиці.

Кількість макрофагів реєстрували на високому рівні впродовж усього періоду досліджень, проте, на відміну від інших органів, кількість їх у трахеї інфікованих курчат була у 2 рази вище, ніж у контролі. Рівень їх підвищувався з 3-ї по 7-у добу з максимальним показником $5,18 \pm 0,183$ % при $2,241 \pm 0,339$ %. Далі встановлено зниження кількості цих клітин до кінця строку спостережень.

Характер кривої кількісних змін клітин, що продукують IgG та IgA був однаковим. Після періоду коливань кількості клітин на 1–7-у добу спостерігали різкий процес збільшення відсотку клітин даної субпопуляції на 10-у добу ($1,363 \pm 0,194$ % при $1,343 \pm 0,117$ % – у контролі – IgG; та $1,526 \pm 0,160$ % при $1,076 \pm 1,218$ % – у контролі – IgA). Процес збільшення відсотку IgG та IgA тривав до кінця строку спостережень.

Висновки. 1. При проведенні імуногістохімічних досліджень у курчат 1-ї і 2-ї дослідних груп встановлено, що у перші доби спостережень у селезінці та легенях відмічалось пригнічення імунної відповіді на рівні всіх субпопуляцій імунокомпетентних клітин.

2. Зростання субпопуляції мононуклеарів (макрофагів) відзначалось в більш ранні строки, ніж інших субпопуляцій (CD8, IgM, IgG, IgA М-клітини), тобто вже на 3-ю добу спостережень і зберігалось до 7-ї доби, що пояснюється їхньою найбільш ранньою взаємодією з антигеном як ланки, що забезпечує подання переробленої антигенної субстанції виконавчим клітинам.

3. У сліпій кишці та трахеї характер кривої змін накопичення клітинних субпопуляцій має інший характер. Так, відсоткова кількість усіх досліджених субпопуляцій у групі інфікованих курчат була набагато вище, ніж у інтактної, здорової птиці. Причому, хоча в перші доби спостережень відмічалось супресії імунної відповіді, все ж таки рівень клітин у інфікованих курчат був вищим вже з першої доби дослідів. Це можна пояснити, можливо, більш активним залучанням імунних елементів кишечника та трахеї в імунний процес при зараженні низькопатогенним грипом птиці.

4. У сліпій кишці та трахеї встановлено активний стан клітинного імунітету в першу половину досліджень з 1-ї по 10-у добу, а у період з 10-ї до 14-ї доби спостерігався процес різкого підвищення показників гуморального імунітету, тобто клітин, що продукують імуноглобуліни. Таким чином, на початкових стадіях захворювання залучаються елементи клітинної ланки імунітету.

Список літератури

1. Participation of the intestinal epithelium and mast cells in local mucosal immune responses in commercial poultry [Text] / D.J. Caldwell [et al.] // Poultry Sci. – 2004. – Vol. 83. – P. 591–599.
2. Pantin-Jackwood, M.J. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds [Text] / M.J. Pantin-Jackwood, D.E. Swayne // Rev. Sci. Tch. – 2009. – Vol. 28(1). – P. 113–136.
3. Immunostimulatory effects of oriental plum (*Prunus salicina* Lindl.) [Text] / Lee Sung-Hyen [et al.] // Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 32. – P. 407–417.
4. Immune enhancing properties of Safflower leaf (*Carthamus tonctorius*) on chicken lymphocytes and macrophages [Text] / Lee Sung-Hyen [et al.] // J. Poult. Sci. – 2008. – Vol. 45. – P. 147–151.

STUDYING OF CHICKEN MUCOSAL IMMUNITY STATE AFTER EXPERIMENTAL INFECTION WITH LOW-PATHOLOGICAL AVIAN INFLUENZA 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 (amount) and character 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 spleen and lungs registered inhibition of immune reaction on the level of all subpopulations of immunocompetent cells.