

СТАНОВЛЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ПОРΟΣЯТ ВІКОМ ДО ДВОХ ТИЖНІВ

***І.І. Панікар, кандидат ветеринарних наук,⁸
Полтавська державна аграрна академія,
В.Л. Коваленко, доктор ветеринарних наук,
Інститут ветеринарної медицини НААН України,
Н.І. Носик, завідувач імунологічним відділом
Обласна клінічна лікарня ім. М.В. Скліфосовського***

Імуногістохімічними дослідженнями імунокомпетентного стану організму поросят та динаміки його становлення до 2-тижневого віку, встановлено специфіку процесів формування деяких показників гуморальної ланки імунної системи та органів імунної системи залежно від віку тварин. Імунологічні дослідження крові свідчили про виражене зменшення кількості Т- і В-лімфоцитів без загальних змін у формуванні органів імунної системи поросят на тлі загального збільшення кількості лімфоцитів, а також встановлено, що залежно від органа імунної системи заселення клітин із маркерами CD3 та CD79 має свої особливості. Дослідженнями зареєстровано міграцію у кров'яне русло В-лімфоцитів та їх скупчення навколо кровоносних судин слизової оболонки.

Імуногістохімія, імунітет, показники, свині, лімфоцити.

У кровоносне русло плазматичними клітинами викидаються антитіла або специфічні імуноглобуліни, які зв'язують і знешкоджують антиген внаслідок утворення комплексу антиген-антитіло. Потім різними неспецифічними діями комплекс антиген-антитіло руйнується і виводиться з організму. Клітинну ланку імунітету характеризують CD3⁺ Т-лімфоцитів (інтегральний показник клітинної ланки), CD3⁺CD4⁺ Т-лімфоцитів (так званих Т-хелперів), CD3⁺CD8⁺ Т-лімфоцитів (так званих Т-кілерів, або цитотоксичних Т-лімфоцитів), CD4⁺CD25⁺ Т-лімфоцитів (регуляторних Т-клітин), CD3⁺-CD16⁺-CD56⁺-клітин (так званих природних кілерів), CD3⁺CD16⁺CD56⁺-клітин (природних кілерних Т-лімфоцитів). Гуморальну ланку імунітету характеризують рівні CD3⁺-CD19⁺, CD3⁺-CD20⁺, CD3⁺-CD21⁺ і CD3⁺-CD22⁺-клітин (В-лімфоцитів у різні фази дозрівання), а також рівні імуноглобулінів різних класів (IgM, IgG, IgE, сироваткового і секреторного IgA).

Оскільки синтез антитіл є Т-залежним процесом, для належної оцінки гуморальної ланки імунітету слід враховувати рівень Т-хелперів (CD3⁺ CD4⁺ Т-лімфоцитів).

Стисла характеристика основних субпопуляцій лімфоцитів по CD-маркерах. CD3 – тимоцити, Т-клітини (лімфоцити). Практично усі зрілі Т-лімфоцити експресують на своїй поверхні CD3 маркерні молекули, тому

рівень CD3-клітин є інтегральним (узагальнюючим) показником Т-клітинної ланки імунітету і слугує компонентом антигенпізнавального комплексу Т-лімфоцитів.

CD4 – це субпопуляція тимоцитів та Т-клітин, що розпізнають антигени, асоційовані з молекулами головного комплексу гістосумісності II класу. А також моноцити, тканинні макрофаги, гранулоцити. Виконують регуляцію внутрішньотимічного диференціювання, Т- В-клітинної адгезії та як корецептор у Т-клітинній активації. Використовується для моніторингу імунологічного статусу [1].

Молекули CD4 експресують на своїй поверхні Т-лімфоцити, які отримали назву хелперів. CD4 – це корецептор, що стабілізує рецептори антигенпрезентуючої клітини і Т-хелпера під час антигенної презентації.

Т-лімфоцити CD4 забезпечують проєктивну імунну відповідь за інфекційних захворюваннях та пухлинних хворобах, беруть участь у розвитку алергічних реакцій та забезпечують регуляцію імунної відповіді. Виконання різноманітних функцій забезпечується різними субпопуляціями лімфоцитів CD-4: Th1, Th2, Th3, Th17. При інфекційних захворюваннях основне значення у протективній імунній відповіді мають лімфоцити Th1, що продукують IFN-γ та активують макрофаги. Th1 утворюються в лімфатичних вузлах у ході антиген залежного диференціювання з наявних Т-лімфоцитів. Т-лімфоцит набуває властивість до продукції ефекторних цитокінів лише через декількох циклів поділу. Костимуляційні сигнали отримують, насамперед через рецептори CD 8 [4, 5, 7, 9, 10].

CD8 – більшість тимоцитів, 30 % Т-клітин у периферійній крові та субпопуляції NK- клітин. Регуляція внутрішньотимічного диференціювання, Т-В-клітинної адгезії, корецептор у Т-клітинній активації [1].

Молекули CD8 містять на своїй поверхні цитотоксичні Т-лімфоцити. Вважається, що саме за гострих інфекцій основними клітинами, що відповідають, є лімфоцити CD8, у той час, як відповідь лімфоцитів CD4 переважає за хронічних інфекцій в умовах, коли патоген (антиген) персистує тривалий час [8, 11, 12].

CD34 – гемопоетичні клітини-попередники, ендотеліальні клітини, ембріональні фібробласти, субпопуляції клітин у нервовій тканині. Виконують адгезію клітин та інгібування гемопоетичного диференціювання.

CD79 – В-клітини на всіх стадіях диференціювання від пре-В-клітин до плазмобластів. Є сигнальним компонентом BCR [1].

З самого початку наявні Т-лімфоцити у ході поділу набувають властивостей до продукції певного спектра цитокінів та змінюють фенотип цих клітин на фенотип антигенпрезентованих «ефекторних» лімфоцитів. Останні виходять з лімфатичних вузлів у кровоток і далі надходять до периферійних тканин [6, 13].

Мета дослідження – дослідити імунокомпетентний стан організму порослят та динаміку його становлення до 2-тижневого віку для розуміння

основ функції вродженого та набутого імунітету, стану органів імунної системи, вікові аспекти імунології.

Матеріал та методика дослідження. Дослідження проводили в одному з господарств Полтавської області на поросятах великої білої породи весняного опоросу віком 1 доба та 14 діб.

Матеріалом для дослідження слугувала кров, яку одержували з краніальної порожнистої вени. У крові визначали відсоток Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, ЦІК, фагоцитарний індекс та проводили постановку НСТ-тесту.

Функціональну активність нейтрофілів оцінювали за допомогою НСТ-тесту у спонтанному та стимульованому зимозаном варіантах; фагоцитарну активність – за допомогою фагоцитарного показника та фагоцитарного числа.

Для імуногістохімічних досліджень зрізи завтовшки 4–6 мкм наносили на спеціально оброблені адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus, депарафінізували відповідно до стандартів. Як первинні антитіла використовували CD3 (моноклон sp7, фірма Thermo), CD34 Ab-1 (моноклон QBEnd/10, фірма Thermo), CD79 α Ab-1 (моноклон HM47/A9, фірма Thermo) з контрольними дослідженнями для виключення помилково позитивних або помилково негативних результатів.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Stat Soft in animals 6.0. із визначенням критерію Studenta в T-test для незалежних груп.

Результати дослідження. Дослідженням крові поросят встановлено статистично значуще зростання в 1,4 раза відсотка лімфоцитів у поросят до 2 тижневого віку, при цьому відбулося зниження в 1,2 раза кількості Т-лімфоцитів. Зменшення загальної кількості клітин – завдяки Т-супресорам (у 1,3 раза), ймовірно і є фактором запобігання розвитку гіперімунних реакцій.

У той час як кількість супресорів статистично значущо, і зменшилася, відсоток Т-хелперів зріс в 1,1 раза порівняно із тваринами віком одна доба.

Результати наших досліджень свідчать про статистично значуще зростання (в 1,4 раза) співвідношення абсолютної кількості Т-хелперів до Т-супресорів до показника 2,38 %, що за даними В.Ю. Чумаченко (2008), становить фізіологічну межу для цього виду тварин (2–3 %) [2].

Відсоток В-лімфоцитів до 14 денного віку мав тенденцію до зниження в 1,3 раза з $16,8 \pm 0,92$ до $12,7 \pm 1,49$, що вірогідно позначається на активності гуморального імунітету у тварин перших тижнів життя.

У поросят віком 1 доба показник ЦІК становив 86,1 % і у подальшому у тварин старшої вікової групи спостерігалось його статистично значуще зростання до 90,6 %, що свідчить про наявність і ступінь антитілоутворення в організмі тварин, спрямованої на елімінацію патогенних чинників.

Зменшення фагоцитозу майже в 1,4 раза (з 52,2 до 37,8 %) свідчить про недостатність неспецифічного імунітету. Про недостатньо розвинену

ланку фагоцитозу поросят дослідних груп цієї вікової груп свідчить незначне зростання показника НСТ-тесту у 1,15 раза (з 1,27 до 1,47). Результати досліджень наведено у таблиці.

Імунітет, імунобіологічна активність поросят віком до 14 діб, $M \pm m$, n = 10

Показники	1 доба	14 діб
Лімфоцити %	24,6±3,95	34,5±3,14*
Т-лімфоцити (CD2, CD3)%	30,4±2,37	25,7±1,57* 19,5
Т-хелпери (CD4)%	14,8±1,03	16,3±0,94* 14,8
Т-супресори/кілери (CD8)%	9,1±1,52	7,1±0,88*
ІРІ (Т-хелп./Т-супр.), %	1,66±0,22	2,38±0,35*
В-лімфоцити (CD22)%	16,8±0,92	12,7±1,49*
НСТ-тест	1,27±0,03	1,47±0,072*
ЦІК, %	86,1±4,51	90,6±6,85*
Відсоток фагоцитозу, %	52,2±8,55	37,8±2,66*
Природні кілери	9,5±0,85	7,9±1,85

* порівняно із групою 1 доби ($p < 0,001$)

Проведеними імуногістохімічними дослідженнями деяких показників гуморальної ланки імунної системи (CD3, CD79) встановлено специфіку процесів формування органів імунної системи залежно від віку поросят.

Так, у тварин другого тижня життя у селезінці характерним є розташування Т-клітин з маркерами CD3 у крайовій зоні лімфатичних вузликів у невеликій кількості. У періартеріальній зоні спостерігається велика концентрація клітин з маркерами CD3, вони тісно прилягають до адвентиція судин (рис. 1 – Б). У червоній пульпі такі клітини мають розріджене розташування. У новонароджених тварин кількість таких клітин значно менша (рис. 1 – А).

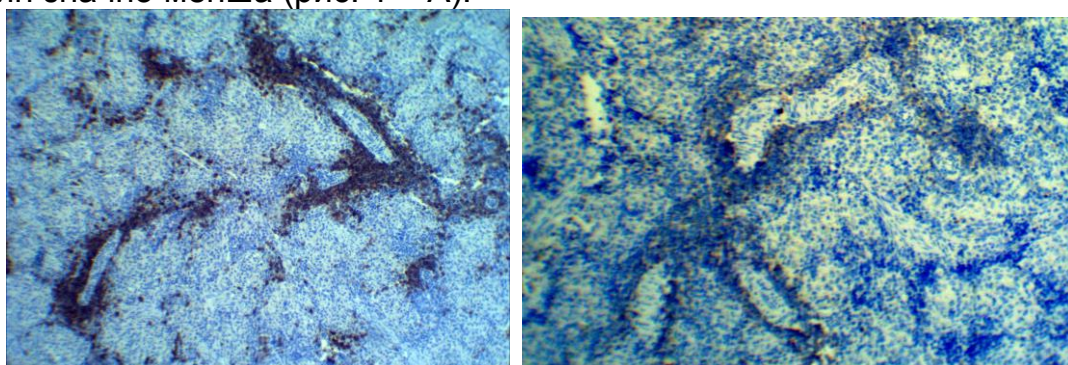


Рис. 1. Гістопрепарат селезінки поросят перших годин життя (А), віком 14 діб (Б): локалізація клітин з маркерами CD3 (Т-лімфоцитів) у періартеріальній зоні лімфатичних вузликів. Дофарбовування гематоксиліном Майєра. Збільшення x 100

У лімфатичних вузликах селезінки клітини з маркерами CD79 реєструються у невеликій кількості (2–3 клітини) і розташовуються у центральній зоні вузлика.

Залежно від виду лімфатичного вузла заселення клітин із маркерами CD3 має свої особливості. Так, у мигдаликах, спостерігається дифузне концентроване розташування цих клітин у кірковій зоні між лімфатичними вузликами, останні сформовані, добре виражені, мають світлі центри. Невелику кількість цих клітин зареєстровано і у лімфатичних вузликах. У мозковій зоні для клітини із маркерами CD3 характерним є дифузне розріджене розташування. У поросят перших годин життя клітини з маркерами CD3 мають розріджене розташування по периферії лімфатичних вузликів (рис. 2 – А).

Дослідженнями підщелепових та кишкових лімфатичних вузлів встановлено, що на великих ділянках кіркової зони характерною є дифузна інфільтрація міжлімфатичних вузликів клітинами з маркерами CD3, у той же час великі ділянки органа не містять CD3 (рис. 2 – Б).

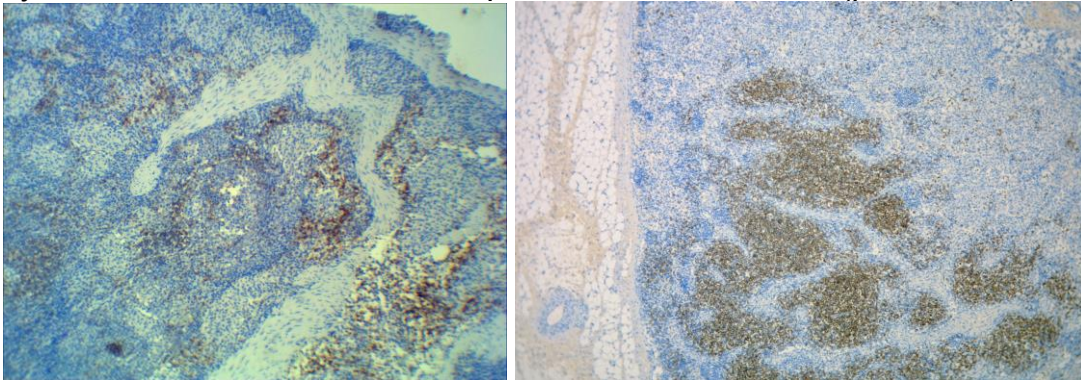


Рис. 2. Гістопрепарат лімфатичного вузла поросяти перших годин життя (А), віком 14 діб (Б): вогнищева локалізація клітин із маркерами CD3 (Т-лімфоцитів) міжлімфатичних вузликів. Дофарбовування гематоксиліном Майєра. Збільшення x200

Імунні фактори материнського молока та його деякі нутрієнти блокують заселення кишечника умовно-патогенною флорою та сприяють росту біфідофлори. Остання стимулює синтез секреторного IgA та неспецифічних факторів імунного захисту (лізоциму, інтерферону, цитокінів, комплементу), що позитивно впливають на формування слизової оболонки травного каналу (природного бар'єра на шляху інфекційних та неінфекційних антигенів) [3, 14].

Проведеними дослідженнями деяких показників гуморальної ланки імунної системи (CD3, CD79) нами встановлено, що у тварин віком 9 діб найбільшу кількість В-лімфоцитів (CD79) виявлено на поверхні слизової оболонки, у просвіті крипти слизової оболонки тонкого відділу кишечника що, на нашу думку, пов'язано з абсорбцією цих клітин саме з материнського молока (рис. 1–А). Крім того, такі скупчення зареєстровано навколо кровоносних судин слизової оболонки. Цей процес пояснюється міграцією В-лімфоцитів у кров'яне русло.

У лімфоїдних вузликах стінки кишечника, селезінки та лімфатичних вузлах ці клітини реєструються у невеликій кількості (2–3 клітини) і розташовуються у центральній зоні вузлика утворюючи світлі (герментативні) центри.

Відомо, що Т-лімфоцити (клітини з маркерами CD3) забезпечують клітинно-опосередковані форми захисту слизових оболонок. Характер розташування Т-лімфоцитів також має свої особливості. У слизовій оболонці кількість Т-лімфоцитів значно менша ніж В-лімфоцитів, що, на нашу думку, пояснюється тим, що у лімфоїдних органах відбувається перша зустріч з антигеном та відбувається поділ імунокомпетентних В-лімфоцитів. Відповідно частина дочірніх клітин перетворюється на клітини імунологічної пам'яті та розносяться по організму. А ті клітини, що залишилися у лімфоїдних органах, перетворюються на плазматичні клітини, які виробляють і виділяють у плазму крові власне антитіла. У лімфоїдній тканині клітини з маркерами CD3 охоплюють 2/3 площі лімфатичного вузлика і мають досить щільну концентрацію розташування вище наведених клітин. Однак слід зауважити, що у багатьох вузликах реєструються лише поодинокі клітини з маркерами CD3.

Висновки

1. Проведеними імуногістохімічними дослідженнями імунокомпетентного стану організму поросят та динаміки його становлення до 2-тижневого віку, встановлено специфіку процесів формування деяких показників гуморальної ланки імунної системи та органів імунної системи залежно від віку тварин.

2. Імунологічні дослідження крові та імуногістохімічне дослідження органів імунітету свідчить, що відбувається виражене зменшення кількості Т- і В-лімфоцитів без загальних змін у формуванні органів імунної системи поросят на тлі загального збільшення кількості лімфоцитів.

3. Імуногістохімічними дослідженнями встановлено, що залежно від органа імунної системи заселення клітин із маркерами CD3 та CD79 має свої особливості.

4. Дослідженнями зареєстровано міграцію у кров'яне русло В-лімфоцитів та їх скупчення навколо кровоносних судин слизової оболонки.

Список літератури

1. Сидоренко С. П. Поверхностные антигены клеток человека, систематизированные международными рабочими совещаниями по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека / С. П. Сидоренко / Имунология та алергологія. – 1998. – № 3. – С. 16–38.

2. Чумаченко В. Ю. Хвороби імунної системи у тварин. Імунітет, механізми та фактори, що зумовлюють його стан / В. Ю. Чумаченко, В. В. Чумаченко // Ветеринарна медицина. – 2008. – № 9. – С. 16–19.

3. Abbott B.A. Infant feeding and maternal concerns about stool hardness / Abbott B. A., A. Lucas / Child: care, health and development. – 1997. – № 23. – P. 475–478.

4. von Andrian U.H. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. / U.H. von Andrian, C.R. Mackay // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol.343. – P.1020–1034.

5. Bird J.J. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle / J.J. Bird, D.R. Brown, A.C. Mullen [et al.] // Immunity.– 1998. – Vol. 9. – P. 229–237
6. Cauley L.S. Cutting edge: virus-specific CD4 memory T cells in nonlymphoid tissues express a highly activated phenotype / L.S. Cauley, T. Cookenham, T.B. Miller [et al.] // J. Immunol. – 1995. – Vol. 169. – P. 6655–6658.
7. Celli S. CD 4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo / S. Celli, Z. Garcia, P. Bousso // J. Exp. Med. – 2005. – Vol. 202.– P.117–122.
8. Fulton S.A. Pulmonary immune responses during primary mycobacterium bovis – Calmette – Guérin bacillus infection in C57B1/6 mice / S.A. Fulton, T.D. Martin, R.W. Redline, W. Boob // Am. J. Respir. Cell.Mol. Biol. – 2000.– Vol. 22. – P. 33.
9. Gudmundsdottir H. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity / H. Gudmundsdottir, A. D. Wels, L. A. Turka // J. Immunol. – 1999. – Vol. 162. – P.5212–5223.
10. Oostewijk M.F. CD 27-CD 70 interactions sensitise naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development / M.F. Oostewijk, H. Uwana, R. Arens [et al.] // Intern. Immunol. – 2007.– Vol. 19. – P. 713–718.
11. Liadova I.V. Intranasal BCG vaccination protects BALB/c mice against virulent Mycobacterium bovis and accelerates production of IFN-gamma in their lungs / I.V. Liadova, H.M. Vordermeier, E.B. Eryslanov [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2001.– Vol. 126. – P. 274–279.
12. Srinivasan A. Massive number of antigen-specific CD4 T cells during vaccination with live attenuated Salmonella causes interclonal competition / A. Srinivasan, J. Foley, S.I. McSorey // J.Immunol. – 2004. – Vol. 172. – P. 6884–6893.
13. Swain S.L. T cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4+ T cells in protective immunity to influenza. / S.L. Swain, J.N. Agrewala, D.M. Brown // Immunol. Rev.– 2006. – Vol. 2011. – P. 8.–22.
14. Role of Nutrients and Bacterial Colonisation in the Development of Intestinal Host Defence. / Walker W.A. // J. Paediatr Gastroenterol Nutr. – 2000. – № 30. – P. 287.

Иммуногистохимическими исследованиями иммунокомпетентного состояния организма поросят и динамики его становления до 2-недельного возраста, установлены особенности процессов формирования отдельных показателей гуморального звена иммунной системы и органов иммунной системы в зависимости от возраста животных. Иммунологические исследования крови показали выраженное уменьшение количества Т- и В-лимфоцитов без общих изменений в формировании органов иммунной системы поросят на фоне общего увеличения количества лимфоцитов, а также установлено, что в зависимости от органа иммунной системы заселения клеток с маркерами CD3 и CD79 имеет свои особенности. Исследованиями зарегистрирована миграция в кровяное русло В-лимфоцитов и их скопление вокруг кровеносных сосудов слизистой оболочки.

Иммуногистохимия, иммунитет, показатели, лимфоциты.

Immunohistochemical studies of immune state of the pigs and the dynamics of its formation up to 2 weeks of age, the peculiarities of the formation of individual indicators humoral immune system and the immune system, depending on the age of the animals. Immunological studies of blood showed marked reduction in the number of T-and B-lymphocytes without general changes in the formation of the immune system of piglets to the overall increase in the number of lymphocytes and found that, depending on the body immune system cell population with markers CD3 and CD79 has its own characteristics. Research has registered migration into the bloodstream of B-lymphocytes and their accumulation around blood vessels in the mucous membrane.

Immunohistochemistry, immunity, performance, lymphocytes.