УДК 619:616-097.3:636.5
© 2012

П.О. Шутченко,
кандидат ветеринарних наук
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ЗА САЛЬМОНЕЛЬОЗУ КУРЕЙ

У дослідженнях з використанням удосконалених сучасних методів імуногістохімії отримані нові дані про стан органів імунітету на курях у нормі та після зараження сальмонельозом. Визначено динаміку змін найпоказовіших кластерів імунітету у курчат після щеплення проти сальмонельозу.

Нині значних успіхів досягнуто в галузі досліджень клітинного імунітету, де були отримані знання про тимус- і бурсазалежні системи лімфоцитів [3]. Вони доповнилися вагомими повідомленнями про систему кластерів імунних клітин, що відрізняються за структурою поверхневих маркерів (кластери диференціації, CD) і виконують чітко визначені функції у складній системі формування та підтримання імунітету [4]. Завдяки одержаним фундаментальним даним імунологія здобула нові унікальні можливості для свого розвитку. Дуже важливим було те, що на підставі даних про кластери диференціації клітин імунітету створено й активно розвивається нова галузь імунології клітин і тканин — імуногістохімія. Вона стає важливим, а часто і невід'ємним елементом сучасних імунологічних досліджень, оскільки створює унікальні можливості для вивчення різноманітних субпопуляцій клітин (кількість відомих кластерів перевищує 160) безпосередньо *in situ*, тобто в гістологічних зрізах тканин [2]. Отже, застосування імуногістохімічних методів диференціації та обліку кількості спеціалізованих клітин відкриває принципово нову сторінку в галузі вивчення активності досліджених ланок клітинного імунітету тварин, бо при цьому вважається, що збільшення кількості клітин з певним маркером зумовлює посилення функціонального стану їхньої цілої субпопуляції.

Сучасні методи імуногістохімії дедалі ширше використовують у ветеринарії та медицині під час вивчення інфекційних хвороб і в онкології [1, 5]. Опубліковано дані застосування методів імуногістохімії у ветеринарній медицині, зокрема під час вивчення дії вакцин проти сальмонельозу на імунний стан організму птиці [3]. Зміст публікацій свідчить про доцільність і перспективність подальших досліджень у цьому напрямі, оскільки вони дали змогу отримати дані про певні зміни кількості субпопуляцій імунних клітин на різних стадіях розвитку імунного процесу. Проте залишаються невивченими питання визначення етапів супресивної дії патогенних збудників і впливу протисальмонельозної вакцини на кластери клітинного імунітету в динаміці формування імунітету. Також немає даних про динаміку змін кількості імунокомпетентних клітин певних субпопуляцій в органах імунітету здорових курчат різного віку, зокрема селезінки і фабрицієвої бурси.

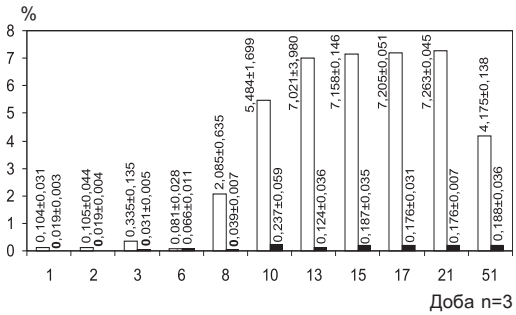
Мета досліджень — вивчити зміни вмісту найпоказовіших кластерів клітин імунітету CD3, CD4, CD8, IgG, IgM, IgA та CVI у бурсі Фабриціуса й селезінці курчат у нормі в період між 1-й 51-ю добами життя; провести порівняльні імуногістохімічні дослідження вмісту клітин показових кластерів під час формування імунітету в курчат різного віку після зараження епізоотичним штамом *Salmonella enteritidis*; визначити динаміку вмісту показових кластерів імунітету в курчат різного віку після імунізації атенуйованою вакциною проти сальмонельозу *Salmovac SE*.

Матеріали і методи. Для проведення імуногістохімічних досліджень було використано 99 гол. курчат добового віку породи Білий Леггорн, з яких було сформовано 3 групи: інфіковані диким штамом *S. enteritidis SE* 147 (33 гол.), імунізовані вакциною *Salmovac SE* (33 гол.) та контрольні, необроблені курчата (33 гол.). Забій курчат здійснювали на 1-шу, 2-, 3-, 6-, 8-, 10-, 13-, 15-, 17-, 21- та 51-шу доби після вакцинації або інфікування. Від забитих курчат брали зразки фабрицієвої бурси та селезінки, які фіксували в рідкому азоті.

У дослідженнях використовували такі моноклональні антитіла: до CD3 — загальних Т-клітин; CD4 — Т-хелперних лімфоцитів; CD8 — Т-цитотоксичних клітин і нормальних Т-кілерів; IgM, IgG, IgA, CVI — тканинних макрофагів.

Імуногістохімічний облік клітинних субпопуляцій Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів і макрофагів в органах (селезінка і бурса Фабриціуса) здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «AnalySIS». У цих органах підраховували відсоткове співвідношення зон позитивно забарвлених клітин до всіх клітин зрізу (незабарвлених). Отримані дані оброблено статистично.

Результати досліджень. Дані, отримані під час вивчення кластерів селезінки й бурси Фаб-



Динаміка змін субпопуляції лімфоцитів з поверхневим маркером IgA у бурсі Фабриціуса після імунізації: ▭ — імунізовані курчата; ■ — контроль

риціуса здорових курчат, які не зазнавали впливу сальмонел, свідчили про те, що кількісні показники всіх кластерів імунітету були більшими в селезінці. Це підтверджувало її вищу імунну активність порівняно з бурсою Фабриціуса у ВСП птиці. Особливо високим був уміст тканинних лімфоцитів CD3 (28%) і макрофагів CVI (70,8%). Нагромадження великої кількості лімфоцитів і макрофагів у селезінці за невеликої кількості кластерів клітин, що продукують імуноглобуліни, свідчило про перевагу клітинного імунітету в інтактної птиці й відрізняло його від гуморального імунітету, що розвивається під впливом антигенів і здійснюється за участі глобулінпродукувальних клітин [3].

Під час вивчення селезінки курчат, щеплених вакциною *Salmovac SE*, був короткочасний період супресії клітин кластерів CD3, CD4, CD8, IgG, IgM і CVI, що змінювався підвищенням їхньої активності на 2-гу, 3-, 6-ту доби, причому в кластері CD4 виявлено повторне зниження активності на 21-шу добу.

Максимальних показників кількість кластерів у цьому органі досягала на 8-му добу після щеплень і лише кількість клітин з маркерами IgG й IgA була найвищою на 51-шу добу спостережень. Дуже високим був рівень максимального вмісту кластерів CD3 — 41,95%, CD8 — 36,92 й CVI — 67,34% за невеликої кількості клітин кластерів IgG — 0,49 й IgA — 0,606%.

Кількість кластерів імунітету в бурсі Фабриціуса мала інший характер. Так, вивчення субпопуляцій клітин бурси Фабриціуса з маркером CD3 і CD4 дало змогу встановити супресивну дію вакцини на ці клітини в перші 3 доби після імунізації, але з 6-ї доби їхня кількість збільшилася й досягала максимуму на 8-му добу (0,968%).

Своєрідною була реакція макрофагів з маркером CVI бурси Фабриціуса. Кількість цих клітин у піддослідній і контрольній групах була протягом усього досліду практично на одному рівні, що можна пояснити високим резервом їхньої стійкості. Кількість клітин з маркером IgG у бурсі Фабриціуса досягала максимуму на 13-ту добу й стабільно утримувалася на одному рівні до кінця спостережень, що свідчило про формування стабільного імунітету в щепленої птиці на 13–15-ту доби після вакцинації.

Уміст клітин з маркером IgA, починаючи з 1-ї доби проведення досліджень, постійно зростав у бурсі Фабриціуса імунізованих курчат. Цей процес тривав з 8-ї до 21-ї доби, після чого рівень кластера досягав максимальних значень — 7,263%, на контролі — 0,176%. Лише на 51-шу добу почалося зниження вмісту клітин цього кластера (рисунок). Заслуговувало на увагу те, що на 51-шу добу після імунізації на фоні зниження вмісту лімфоцитів з маркером IgA у бурсі Фабриціуса відбувалося збільшення кількості таких лімфоцитів у селезінці.

Уміст субпопуляцій клітин, досліджених у курчат, заражених патогенним штамом сальмонел, істотно відрізнявся.

Кількість клітин кластера CD4 починала збільшуватися з перших діб і утримувалася на високих рівнях у період між 10- й 21-ю добами (до 3,76%) і різко знижувалася на 51-у добу.

Кількість лімфоцитів з маркером IgG у селезінці на 1-шу добу мала тенденцію до зниження. На 3-тю добу відбувалася стабілізація їхньої кількості з подальшою активацією кластера, що тривала до кінця спостережень, однак вона становила лише 0,49%. Збільшення кількості клітин кластера IgG починалося з 13-ї доби і тривало до кінця спостережень, тобто до 51-ї доби.

У бурсі Фабриціуса після зараження курчат сальмонельозом виявлено певні зрушення у вмісті клітин різних кластерів. Уміст клітин з маркером CD4 постійно був вищим, ніж у групі контролю, а з 10-ї доби досягав високих значень на 13-ту, 15-, 17- й 21-шу доби в межах 3,01–3,76% зі зниженням на 51-шу добу.

Під час вивчення клітин з маркером IgM збільшення їхнього вмісту виявлено на 6-ту добу після інфікування. Потім відбувалося подальше збільшення кількості цих клітин на 10-ту добу (32,05 %) і різке зниження на 13-ту добу (до 6,75%).

Це положення підтверджується даними обліку лімфоцитів з поверхневим маркером IgG у бурсі Фабриціуса, кількість яких зростала на 13-ту добу майже втричі порівняно із 6-ю добою.

Під час вивчення лімфоцитів з поверхневим маркером IgA у бурсі Фабриціуса встановлено високий їх уміст на 8-му добу, подальше збільшення кількості цих клітин до 7,1 % — на 10-ту добу, до 8,9% — на 13-ту й до 8,5% — на 15–21-шу доби. Отже, рівень кластера IgA у цей період досягав максимального значення.

Висновки

Отримані дані свідчать про активну участь спеціалізованих кластерів бурси Фабриціуса в утворенні імуноглобулінів. За даними визначення вмісту різних імунокомпетентних клітин у селезінці та бурсі Фабриціуса після імунізації курчат проти сальмонельозу, на відміну від зараженої птиці, швидше розвивався процес формування глобулінпродукувальних клітин, до того ж переважне значення мала бурса Фабриціуса. Важливими у створенні захисту проти сальмонельозу є також секреторні імуноглобуліни, найбільший відсоток яких продукувався в бурсі (7,263±0,045% на 21-шу добу) і менша частина — у селезінці (0,606±0,013% на 51-шу добу). Отже, імуногістохімічне визначення кількості клітин кластеру IgG у бурсі Фабриціуса в щепленої птиці в інтервалі між 8-ю й 51-ю добами після вакцинації може бути одним з критеріїв оцінки активності протисальмонельозних вакцин. У бурсі Фабриціуса птиці, зараженої диким штамом S. enteritidis SE 147, превалювали клітини з маркером IgA, що можна враховувати під час диференціації поствакцинального й постінфекційного імунітету за сальмонельозу курей. Імунітет у щепленої птиці відрізняється від такого в зараженої більшою кількістю клітин з маркерами CD8 та IgG у бурсі Фабриціуса, а в селезінці — клітин з маркерами CD8, CVI, CD3.

Бібліографія

1. *Карселадзе А.И.* Иммуногистохимическое исследование специфического антигена в раке предстательной железы/А.И. Карселадзе, И.Э. Рытин, И.Э. Будунова//Архив патологии. — 2004. — 66, № 2. — С. 3–7.

2. *Шутченко П., Красніков Г.* Імуногістохімічне вивчення клітинного імунітету при сальмонельозі курчат//Вет. медицина України. — 2006. — № 7. — С. 26–27.

3. *Berndt A.* Gamma/delta T-cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium strains*/A. Berndt, U. Methner//Vet. Immunol. Immunopathol. — 2001. — V. 78. — P. 143–161.

4. *Lillehoj H.S.* Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens/H.S. Lillehoj, K.S. Chung//Vet. Immunol. Immunopathol. — 1992. — V. 31. — P. 347–360.

5. *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. — 2008. — 45. — P. 147–151.