

УДК 619:616.98:578.832:
612.017.11:636.52/.58

© 2018

ДИНАМІКА МАРКЕРІВ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У ТРАХЕЇ КУРЧАТ ЗА ОРТОМІКСОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Л.В. Коваленко¹, Б.Т. Стегній²

¹ кандидат біологічних наук

² доктор ветеринарних наук, академік НААН

^{1,2} ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023, Україна

e-mail: ¹larbuko@gmail.com, ²admin@vet.kharkov.ua

Надійшла 20.06.2018

Мета. Установити динаміку чинників неспецифічної імунореактивності у слизовій оболонці трахеї курчат, експериментально заражених низькопатогенним штамом вірусу грипу, як моделі патогенезу ортоміксовірусних інфекцій, зумовлених вірусом типу А. **Методи.** Біохімічні для дослідження гомогенатів слизової оболонки трахеї курчат, статистичні. Дослідження проведено на 2-х групах (n=35) 45-денних курчат. Птиця I групи була інфікована низькопатогенним вірусом пташиного грипу, штам А/крижень/Україна/2007 (H5N2), II група — контрольна. Зразки трахеї від 5-ти курчат із кожної групи було відібрано на 1-й, 3-, 5-, 7-, 10-, 14- та 21-й дні після зараження. Маркери неспецифічної резистентності в гомогенатах слизової трахеї визначали за методами, адаптованими нами для роботи з гомогенатами слизової оболонки. **Результати.** Вивчено динаміку показників, які характеризують рівень природженого мукозального імунітету у трахеї птиці за експериментального перебігу грипу впродовж 21-ї доби. Установлено, що інфікування курчат низькопатогенним штамом вірусу грипу максимально підвищує рівень Ig M — до 48,3% на 3-тю добу. На 3-тю добу також відбувається зниження продукування Ig G (на 31,8%), у період від 7- до 10-ти днів концентрація Ig G збільшується на 35,5%, а активне накопичення Ig A починається з 10-ї доби після зараження. У динаміці експерименту встановлено підвищення інтенсивності процесів ліпопероксидації (максимально на 1- та 21-шу доби експерименту), коливання активності каталази (на 5-ту добу експерименту збільшення становить 88%, на 21-шу добу зниження — 38,2%, $P \leq 0,05$) та зниження загальної антиоксидантної активності ліпідів (на 21-шу добу на 70,2%). **Висновки.** Установлені зміни в системі неспецифічного імунітету трахеї слизової оболонки за експериментального низькопатогенного грипу птиці впродовж 21-ї доби розвитку інфекції можуть бути використані як підґрунтя для розробки стратегії боротьби з ортоміксовірусними інфекціями та пташиним грипом зокрема, з використанням спеціальних профілактичних засобів та імуномодуляторів спрямованої дії.

Ключові слова: ортоміксовіруси, неспецифічна резистентність, трахея, низькопатогенний грип птиці, курчата.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201807-05>

Останнім часом епізоотична ситуація видів тварин істотно погіршилась [1, 2].
щодо ортоміксовірусних захворювань різних Назва родини *Orthomyxoviridae* включає,

зокрема, грецьке слово *тухо* (слизові), що відображає тропізм вірусів цієї родини до слизових оболонок. Ортоміксовіруси призводять до респіраторних або генералізованих інфекцій спорадичного чи епідемічного характеру у людей, птахів і багатьох макроорганізмів. Найбільш епідемічно, епізоотично та економічно значущим є ортоміксовірус типу А, який є етіологічним чинником грипу [3].

Як відомо, протягом інкубаційного періоду вірус грипу розмножується та накопичується в епітелії дихальних шляхів і кишечнику (воротах збудника інфекції). Водночас, як свідчать літературні дані, вироблені на поверхні слизової оболонки антитіла можуть відігравати важливу роль не тільки в захисті, а й у обмеженні первинної реплікації на порталі входу та елімінації вірусу [4], що підвищує значення мукозального імунітету при грипі [5, 6].

У патогенезі пташиного грипу важливим є те, що ураження відбувається на клітинному, субклітинному та генетичному рівнях [7, 8]. Однією з патогенетичних ланок розвитку грипу також є утворення активних форм кисню, що призводить до ініціації та розвитку процесів перекисного окиснення ліпідів у біологічних мембранах макроорганізму. Крім того, в клітинах епітелію відбувається продукування імуноактивних речовин — імуноглобулінів, цитокінів різних класів [4, 9]. Водночас патологічні зміни та функціональний стан системи неспецифічної резистентності в мукозальних оболонках

організму хворої на грип птиці вивчено недостатньо.

Мета досліджень — визначити динаміку маркерів неспецифічної імунорезистентності мукозальних оболонок трахеї у курчат за експериментального низькопатогенного грипу (НПГ) птиці як моделі патогенезу ортоміксовірусних інфекцій, зумовлених вірусом типу А.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведено на 45-добових курчатах кросу Хаббард (n=35). Курчат I групи було інфіковано низькопатогенним вірусом грипу птиці, штаму А/крижень/Україна/2007 (H5N2), виділеним співробітниками відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ», птиця II групи — контрольна.

Зразки трахеї від 5-ти курчат із кожної групи відбирали на 1-шу, 3-тю, 5-ту, 7-му, 10-ту, 14-ту та 21-шу доби після зараження. Еутаназію птиці проводили під її хлороформним наркозом з дотриманням вимог біоетики.

У гомогенатах слизової оболонки трахеї рівень імуноглобулінів А, М і G визначали за методом Манчіні (1965) [10]. З метою встановлення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) вимірювали концентрацію дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) з використанням модифікованої нами методики В.Б. Гаврилова і М.І. Мішкорудної (1985), стан системи антиоксидантного захисту (АОЗ) оцінювали за активністю ферменту

Рівень імуноглобулінів у слизовій оболонці трахеї птиці за низькопатогенного грипу (M±m, n=5), мг/мл

Доба досліджу	Ig M		Ig G		Ig A	
	Група					
	Дослідна	Контрольна	Дослідна	Контрольна	Дослідна	Контрольна
1-ша	0,06±0,001	0,052±0,001	0,026±0,001	0,027±0,001	0,018±0,0005	0,020±0,001
3-тя	0,089±0,001*	0,060±0,001	0,02±0,0007*	0,029±0,0006	0,024±0,001	0,020±0,0005
5-та	0,086±0,001*	0,062±0,001	0,025±0,001*	0,030±0,001	0,036±0,002	0,030±0,001
7-ма	0,1±0,0005*	0,080±0,002	0,03±0,006*	0,033±0,0005	0,034±0,001*	0,032±0,002
10-та	0,14±0,001*	0,10±0,001	0,042±0,001*	0,031±0,002	0,068±0,003*	0,036±0,001
14-та	0,12±0,003*	0,11±0,003	0,039±0,004*	0,033±0,0005	0,072±0,002*	0,047±0,002
21-ша	0,13±0,002*	0,11±0,002	0,044±0,001*	0,034±0,001	0,084±0,003*	0,04±0,003

* Різниця статистично вірогідна щодо показників контролю (P≤0,05).

каталази та рівнем загальної антиокиснювальної активності (АОА) ліпідів [11]. Зазначені вище загальноприйняті методики були адаптовані нами до роботи з гомогенатами слизової трахеї.

Статистичну обробку одержаних даних виконано загальноприйнятими методами із використанням комп'ютерної програми MS Excel.

Результати досліджень. За результатами проведених досліджень встановлено динаміку рівня імуноглобулінів (таблиця). Її дані свідчать, що внаслідок інфікування низькопатогенним штамом вірусу грипу відбувається посилення індукція імуноглобулінів класу М. Через добу після інфікування рівень Ig M у дослідних курчат перевищує контрольний на 15,4% ($P \leq 0,05$). Найінтенсивніше Ig M накопичувався на 3-, 5- та 10-ту доби досліді, статистично вірогідна різниця між дослідними та контрольними показниками становила 48,3%, 38,7 та 40% відповідно.

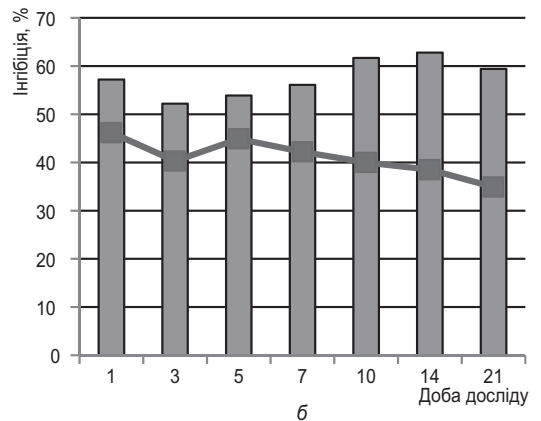
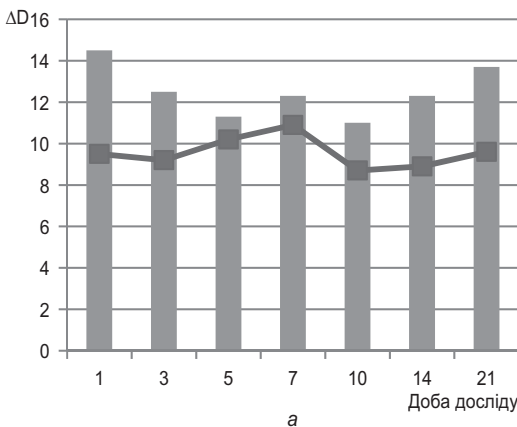
Також за НПГ у птиці на початкових стадіях інфекційного процесу відбувається пригнічення продукування Ig G, найбільш виражене на 3-тю добу, коли концентрація імуноглобуліну цього класу у дослідних курчат була зниженою на 31,8%. Однак у період з 7- до 10-ї доби спостерігали різке накопичення Ig G, коли зростання становило 35,5% щодо контролю, а до кінця досліді рівень Ig G перевищував контрольні показники в середньому на 20%. Активне

накопичення Ig A починається з 10-ї доби після інфікування і до завершення досліді його концентрація перевищує контрольні показники в середньому на 50% ($P \leq 0,05$).

У результаті вивчення стану системи оксидантно-антиоксидантного гомеостазу встановлено, що інфекційний процес НПГ супроводжується посиленням інтенсивності процесів ПОЛ у слизовій оболонці трахеї. Зокрема, рівень кінцевого продукту ліпопероксидації МДА (рисунок, а) максимально перевищував показники контрольної групи через добу після інфікування (на 57,8%), з 3- до 10-ї доби експерименту накопичення МДА дещо уповільнювалось. У період з 14- до 21-ї доби спостерігали ознаки активізації ПОЛ — на 21-шу добу досліді рівень МДА був вищим на 42,7% ($P \leq 0,05$). Аналогічну динаміку виявлено щодо продукування ДК.

У трахеї дослідних курчат, починаючи з 3-ї доби експерименту, також відбувається пригнічення загальної АОА, про що свідчить підвищення відсотка інгібіції (рисунок, б). АОА динамічно знижувалась упродовж усього досліді: на 21-шу добу вірогідна різниця між показниками дослідної та контрольної груп становила 70,2%.

Протягом досліді в інфікованих курчат також спостерігали зміни активності каталази, які мали коливальний характер. Так, на 5-ту добу досліді її значення набували максимального рівня (компенсаторне зростання активності становило 88% щодо



Динаміка маркерів стану системи оксидантно-антиоксидантного гомеостазу мукозальної оболонки трахеї за низькопатогенного грипу птиці: а — малоносовий діальдегід; б — антиокиснювальна активність ліпідів: ■ — НПГ; ■ — контроль

її значень у контрольній птиці), на 10-ту добу знижувалися до контрольних показників, а на 21-шу добу активність ферменту була нижчою на 38,2% порівняно

з контролем ($P \leq 0,05$). Одержані дані свідчать, що за низькопатогенного грипу птиці знижується загальний пул антиоксидантів у мукозальній оболонці трахеї.

Висновки

У системі неспецифічного мукозального імунітету трахеї за експериментального низькопатогенного грипу птиці впродовж перших 21 діб розвитку інфекції відбувається комплекс патогенетичних і компенсаторних змін, які характеризуються посиленням індукції імуноглобулінів класу М і А та пригніченням продукування Іg G на початковій стадії розвитку інфекції.

Спостерігається також динамічна активізація перекисного окиснення ліпідів, зниження активності каталази та загального пулу антиоксидантів. Отримані нами дані мають загальнобіологічне та практичне значення, можуть бути базисом для розробки стратегії контролю грипу птиці з використанням засобів специфічної профілактики та імунотуляторів спрямованої дії.

Коваленко Л.В.¹, Стегній Б.Т.²

^{1,2} ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», ул. Пушкінська, 83, г. Харків, 61023, Україна; e-mail: ¹larbuko@gmail.com, ²admin@vet.kharkov.ua

Динаміка маркерів неспецифічної резистентності в трахеї цыплят при ортоміксовірусній інфекції

Цель. Установить динамику факторов неспецифической иммунореактивности в слизистой оболочке трахеи цыплят, экспериментально зараженных низкопатогенным штаммом вируса гриппа, как модели патогенеза ортомиксовирусных инфекций, вызванных вирусом типа А. **Методы.** Биохимические для исследования гомогенатов слизистой оболочки трахеи цыплят, статистические. Исследования проведены на 2-х группах (n=35) 45-дневных цыплят. Птица I группы была инфицирована низкопатогенным вирусом птичьего гриппа, штамм А/кряква/Украина/2007(H5N2), II группа — контрольная. Образцы трахеи от 5-ти цыплят из каждой группы были отобраны на 1-й, 3-, 5-, 7-, 10-, 14- и 21-й дни после заражения. Маркеры неспецифической резистентности в гомогенатах слизистой трахеи определяли по методам, адаптированным нами для работы с гомогенатами слизистой оболочки. **Результаты.** Изучена динамика показателей, характеризующих уровень врожденного мукозального иммунитета в трахее птицы при экспериментальном течении гриппа в течение 21 суток. Установлено, что инфицирование цыплят низкопатогенным штаммом вируса гриппа максимально повышает уровень Іg М — 48,3% на 3-тї сутки. На 3-тї сутки также наблюдали снижение продукции Іg G (на 31,8%), в период от 7- до 10-ти суток концентрация Іg G

увеличилась на 35,5%, а активное накопление Іg А начиналось с 10-х суток после заражения. В динамике эксперимента установлено повышение интенсивности процессов липопероксидации (максимально на 1- и 21-е сутки эксперимента), колебания активности каталазы (на 5-е сутки эксперимента увеличение составило 88%, на 21-е сутки снижение — 38,2%, $P \leq 0,05$) и снижение общей антиоксидантной активности липидов (на 21-е сутки на 70,2%). **Выводы.** Установленные изменения в системе неспецифического иммунитета трахеи слизистой оболочки при экспериментальном низкопатогенном гриппе птицы в течение 21-х суток развития инфекции могут быть использованы в качестве основы для разработки стратегии борьбы с ортомиксовирусными инфекциями и птичьим гриппом в частности, с использованием специальных профилактических средств и иммуномодуляторов направленного действия.

Ключевые слова: ортомиксовирусы, неспецифическая резистентность, трахея, низкопатогенный грипп птицы, цыплята.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201807-05>

Kovalenko L.¹, Stegnii B.²

^{1,2} NSC «Institute of experimental and clinical veterinary medicine», Pushkin Str., 83, Kharkiv, 61023, Ukraine; e-mail: ¹larbuko@gmail.com, ²admin@vet.kharkov.ua

Dynamics of markers of non-specific resistance in trachea of chickens at orthomyxovirus infection

The purpose. To fix dynamics of factors of non-specific immunoreactivity in mucous membrane of trachea of chickens experimentally infected with low-pathogenic strain of virus of grippе, as a model of pathogenesis of orthomyxovirus infection caused by

virus of type A. **Methods.** Biochemical for research of homogenates of mucous membrane of trachea of chickens; statistical. Researches were carried out in 2 groups (n=35) of 45-day's chickens. Birds of the first group were infected with low-pathogenic virus of bird's gripe (strain A/mallard/Ukraine/2007 (H5N2), the second group was a control one. Samples of trachea from 5 chickens from each group were taken on the 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21 day after infection. Markers of non-specific resistance in homogenates of mucous membrane of trachea were determined using methods adapted by us for operation with homogenates of mucous membrane. **Results.** Dynamics is studied of indexes describing the level of inborn mucosal immunity in trachea of a bird at experimental gripe within 21 day. It is determined that infect of chickens with low-pathogenic strain of virus of gripe raises to maximum the level of IgM — up to 48,3% on the third day. On the third day they also observed lowering of production of IgG (on 31,8%), in the period from 7th

to 10th day density of IgG increased on 35,5%, and active accumulation of IgA began on the 10th day after infection. In dynamics of experiment they fixed heightening intensity of processes of lipoperoxidation (maximally on the first and the 21st day of experiment), oscillations of activity of catalase (on the 5th day of experiment the increase has made 88%, on the 21st day it lowed on 38,2%, $P \leq 0,05$) and lowering of general anti-oxidant activity of lipids (for 21 day on 70,2%). **Conclusions.** The fixed changes in system of non-specific immunity of mucous membrane of trachea at experimental low-pathogenic gripe of birds within 21 day of evolution of infection can be used as a basis for development of strategy of struggle with orthomyxovirus infections and bird's gripe in particular, using special prophylactic means and immunomodulators of direct action.

Key words: *orthomyxovirus, non-specific resistance, trachea, low-pathogenic gripe of birds, chickens.*

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201807-05>

Бібліографія

1. Музика Д.В., Неволько О.М., Герілович А.П. та ін. Високопатогенний грип птиці у світі та Україні. *Ветеринарна медицина*. 2017. Вип. 103. С. 198–201.
2. Nelson M.I., Culhane M.R., Trovao N S. at al. The emergence and evolution of influenza A (H1 α) viruses in swine in Canada and the United States. *J. Gen Virol*. 2017. V. 98 (11). P. 2663–2675.
3. Стегній Б.Т., Герілович А.П., Коваленко Л.В. та ін. Високопатогенний грип птиці. Харків: ТОВ «Повноколір», 2006. 144 с.
4. Ferreira H.L., Pirlot J.F., Kaspers B. at al. Development of specific enzyme-linked immunosorbent assays to evaluate the duck immune response after experimental infection with H5N1 and H7N1 low pathogenic avian influenza viruses. *Avian Dis*. 2010. V. 54. P. 660–667.
5. Kang H., Wang H., Yu Q., Yang Q. A novel combined adjuvant strongly enhances mucosal and systemic immunity to low pathogenic avian influenza after oral immunization in ducks. *Poult Sci*. 2013. 92(6). P. 1543–1551.
6. Cao W., Kim J.H., Reber A.J. at al. Nasal delivery of Protollin-adjuvanted H5N1 vaccine induces enhanced systemic as well as mucosal immunity in mice. *Vaccine*. 2017. V. 35 (25). P. 3318–3325.
7. Лурия Дж., Дарнелл Б., Балтимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология. Москва: Мир, 1981. 680 с.
8. Карпунин Г.И. Грипп. Руководство для врачей. Санкт-Петербург: Гиппократ, 2001. 360 с.
9. Böttcher-Friebertshäuser E., Klenk H.D., Garten W. Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathog Dis*. 2013. 69(2). P. 87–100.
10. Manchini G., Carbonara A.O., Hermans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by singl radial immunodifusion. *Immunochemistry*. 1965. № 2. P. 235.
11. Стегній Б.Т., Коваленко Л.В., Романько М.С. та ін. Методи дослідження перекисного окиснення ліпідів та його регуляції в біологічних об'єктах: метод. рекомендації. Харків, 2009. 64 с.