

УДК 619:615.371:578.832.1:616.98:578.838.1

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУННОГО СТАНУ КУРЧАТ, ЩЕПЛЕНИХ ВАКЦИНОЮ ПРОТИ ВИСОКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ ТА НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ

Шутченко П.О., Красніков Г.А., Стегній Б.Т., Стегній А.Б., Музика Д.В., Медвідь К.О., Гур'єва В.Б.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків,

Високопатогенний грип птиці та хвороба Ньюкасла набули в останні роки особливої актуальності. Економічні збитки від цих хвороб у світі вимірюються мільярдами доларів США [1, 2]. Проте, розробка лікувально-профілактичних заходів, що сприяють запобіганню виникнення цих захворювань, ускладнюється відсутністю інформації щодо імуногістохімічних змін, які мають місце у імунокомпетентних органах сільськогосподарської птиці після щеплення проти цих хвороб [3, 4]. Тому вивчення стану імунної системи птиці після щеплення новими вакцинами значно доповнить теоретичну наукову базу.

Матеріали і методи. У досліді використовували 3 групи птиці: 1 – курчата, щеплені вакциною проти високопатогенного грипу птиці (H_5N_1) і ньюкаслської хвороби (штам Ла Сота) у співвідношенні 1:1:1; 2 – курчата, щеплені вакциною проти високопатогенного грипу птиці (H_5N_1) і ньюкаслської хвороби (штам Ла Сота) у співвідношенні 2:1:1; 3 – контрольні, інтактні курчата. Вивчено вплив комбінованої інактивованої емульсин-вакцини проти високопатогенного грипу птиці (H_5N_1) і ньюкаслської хвороби (штам Ла Сота) на імунний стан курчат. Було досліджено зразки внутрішніх органів курчат (селезінка і бурса Фабриціуса), які були відібрані на 1-шу, 7-му, 14-ту та 28-шу добу після ревакцинації. Досліджували відсоткову кількість субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів: CD4–Т-хелперні лімфоцити; CD8–Т-цитотоксичні клітини і нормальні Т-кілери; IgM–маркер клітин-продуцентів імуноглобуліна класу М; IgG–маркер клітин-продуцентів імуноглобуліна класу G; IgA–маркер клітин-продуцентів імуноглобуліна класу А. Імуногістохімічний облік клітинних субпопуляцій у селезінці та бурсі Фабриціуса здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «ВідеоТест Морфологія – 5,0». У цих органах підраховували відсоткове співвідношення зон позитивно фарбованих клітин до всіх клітин зрізу (незабарвлених). Отримані дані оброблялись статистично.

Результати досліджень. Так, у селезінці курчат 1-ї групи при дослідженні клітин CD4 спостерігали збільшення їх кількості вже на 1-у добу експерименту ($18,193 \pm 4,602$ %) проти $15,753 \pm 3,843$ % – у контролі. Процес збільшення тривав до 7-ї доби, коли кількість клітин набувала максимальних значень ($22,153 \pm 0,378$ % проти $18,213 \pm 0,431$ % – у контрольній птиці). У курчат 2-ї дослідної групи максимальна кількість клітин CD4 досягала на 14-у добу ($18,99 \pm 0,426$ % при $14,076 \pm 0,751$ % – у контролі). Причому рівень клітин-хелперів у курчат 2-ї групи на 14-у – 21-у добу спостережень був вищим, ніж у курчат 1-ї й контрольної груп. Звертав на себе увагу той факт, що у інтактної птиці відсоткова кількість клітин-хелперів зменшувалася починаючи з 7-ї доби ($20,943 \pm 2,047$ %) й до кінця строку спостережень (21-ша доба) ($13,056 \pm 0,246$ %). Факт зростання субпопуляції клітин CD4 у курчат 1-ї та 2-ї групи на фоні зниження кількості у контрольної птиці свідчить про імуностимулюючий вплив вакцини.

При вивченні субпопуляції лімфоцитів з поверхневим маркером CD8 встановлено значне збільшення відсотку цих клітин у дослідної та контрольної птиці. Як і у випадку з CD4, кількість клітин-кілерів починала збільшуватися з 1-ї доби у курчат 2-ї групи, причому кількість їх у дослідної птиці була (набагато) вищею, ніж у контролі. Так, на 1-у добу у курчат 2-ї групи кількість CD8 складала ($22,456 \pm 3,610$ %) проти ($15,286 \pm 7,3949$ %) – у контрольній птиці. Починаючи вже з 5-ї доби відсоткова кількість клітин-кілерів починала зменшуватись. Проте у дослідної птиці 2-ї групи протягом 2-тижнів після введення вакцини спостерігали тенденцію до збільшення їх кількості з максимальним показником на 7-у добу – ($28,896 \pm 4,541$ %) проти ($20,943 \pm 0,575$ %) – у інтактної птиці. Рівень CD8 у курчат 2-ї групи протягом періоду досліджень був вищим, ніж у курчат 1-ї і контрольної дослідних груп.

При дослідженні клітин з маркером IgM зареєстровано значна їх кількість у курчат 2-ї групи порівняно до групи контролю протягом семи діб. Так, на 1-у добу вміст IgM у курчат 2-ї групи становив ($1,026 \pm 0,579$ %) при ($0,173 \pm 0,063$ %) у контрольній групі. Максимальних значень у 2-й і контрольній групах цей показник досягав на 7-у добу ($3,583 \pm 0,516$ %) при $2,316 \pm 0,103$ % у контрольній групі). У подальшому спостерігали значне зменшення кількості цих клітин до кінця строку дослідів. Кількість клітин з маркером IgM у курчат 1-ї групи була меншою, ніж у курчат 2-ї груп протягом усього періоду спостережень. Але на 7-у добу кількість їх зросла до ($1,346 \pm 0,321$ %). У подальшому спостерігався процес зниження кількості клітин з цим маркером, проте кількість все ж була більшою, ніж у контролі.

При дослідженні клітин з маркером IgG у курчат 1-ї групи встановлено незначну їх кількість у перші сім діб спостережень ($0,396 \pm 0,044$ %). Саме на 14-у добу відзначалося різке вірогідне збільшення відсотку цих клітин на фоні різкого зменшення клітин з маркером IgM ($2,168 \pm 0,183$ % при $2,043 \pm 0,233$ % – у інтактних курчат). Збільшення тривало до кінця строку спостережень на 21-у добу, коли цей показник набував максимальних значень – $2,542 \pm 0,162$ % при $0,984 \pm 0,416$ % – у контрольній групі курчат. У курчат 2-ї групи також встановлено незначну його кількість у перші сім діб спостережень ($0,573 \pm 0,078$ %). Проте на 14-у добу кількість клітин значно зросла і перевищувала рівні у курчат 1-ї і контрольної груп з максимальним показником на 21-у добу $3,72 \pm 0,190$ %.

Колівання відсоткової кількості клітин у бік збільшення або зменшення спостерігали при вивченні субпопуляції клітин з поверхневим маркером IgA. Чітка тенденція до збільшення відсотку клітин у курчат 2-ї групи відзначалася з 14-ї доби досліджень ($2,896 \pm 0,160$ % та $1,910 \pm 0,268$ % відповідно у курчат 2-ї і 1-ї груп при $1,140 \pm 0,446$ % у контрольній птиці) й до кінця строку спостережень з максимальним рівнем на 21-у добу – $2,876 \pm 0,518$ % та $2,312 \pm 0,185$ % відповідно у курчат 2-ї і 1-ї груп при $1,554 \pm 0,156$ % у групі інтактних курчат. Причому як і у попередньому випадку кількість клітин у курчат 2-ї групи була набагато вище, ніж у курчат 1-ї та контрольної груп.

У бурсі Фабриціуса при дослідженні субпопуляції Т-лімфоцитів з поверхневим маркером CD4 спостерігали незначну тенденцію до збільшення відсотків цих клітин у курчат 1-ї групи протягом перших семи діб. Так, на 7-у добу вміст CD4 становив $2,213 \pm 0,093$ % проти $1,773 \pm 0,103$ % у контрольній групі курчат. Починаючи з 7-ї доби відбувалося підвищення кількості клітин цієї субпопуляції, що досягала максимальних показників на 14-у добу ($2,246 \pm 0,063$ % - у курчат 1-ї групи при $1,240 \pm 0,385$ % у інтактної птиці). У подальшому відбувався процес швидкого спаду активності цих клітин, що тривав до кінця строку спостережень ($1,856 \pm 0,121$ % - у курчат 1-ї групи при $0,964 \pm 0,136$ % у контролі). Що стосується курчат 2-ї групи, то динаміка накопичення характеризувалася зростанням кількості клітин по відношенню до курчат 1-ї і контрольної груп протягом усього періоду спостережень (майже у 3 рази перевищувала цей показник). Так на 1-у добу кількість клітин становила $3,41 \pm 0,617$ % при $1,033 \pm 0,224$ % та $0,526 \pm 0,255$ % – у курчат 1-ї і контрольної груп відповідно. Максимального показнику клітини з маркером CD4 досягали на 14-у добу ($4,580 \pm 0,282$ %). На 14-у – 21-у добу спостережень у курчат 2-ї групи відбувався процес повільного зменшення кількості клітин.

При вивченні клітин з маркером CD8 зареєстровано накопичення значної їх кількості у курчат 2-ї групи порівняно до 1-ї групи та групи контролю, більш ніж у 3 рази протягом усього періоду досліджень. Протягом усього часу спостерігалася чітка тенденція до збільшення відсоткової кількості цих клітин. Максимальних показників CD8 досягали на 7-у добу досліджень, коли рівень їх становив у курчат 2-ї групи – (4,236±0,461) %, у 1-ї групі курчат (2,203±0,176) % при (1,173±0,156) у групі контрольної птиці. У подальший період досліджень і до кінця строку дослідів спостерігали незначне зменшення кількості цих клітин.

Кількість В-лімфоцитів з поверхневим маркером IgM у перші три доби спостережень була значно більшою у курчат 2-ї групи, ніж у 1-ї та контрольних. Так, на 1-у добу їх відсоткова кількість становила 3,566±0,405 % проти 2,45±0,900 % у контрольній групі. Крім того було зафіксовано процес вірогідного збільшення кількості цих клітин у селезінці з максимальним показником на 7-у добу, який у курчат 2-ї групи становив 3,816±1,888 % при 2,810±1,168 % у групі інтактних курчат. Після цього відсоток цих клітин починав зменшуватись, але у курчат 2-ї групи залишався на більш високому рівні.

При імуногістохімічному вивченні вмісту IgG у бурсі не було встановлено тенденцію до поступового збільшення або зменшення відсоткової кількості цих клітин, лише коливання в той чи інший бік. Але починаючи з 7-ї доби спостережень встановлено зростання кількості клітин цієї субпопуляції у курчат 2-ї групи до 6,373±2,124 % при 3,796±0,186 % – у контрольній групі, яке тривало до кінця строку спостережень, коли кількість цих клітин набула найвищого значення (9,07±0,552 % при 5,951±0,521 % – у групі інтактних курчат). Але з 10-ї доби кількість клітин у курчат 2-ї групи починала значно зростати й була вищою, ніж у 1-ї і 3-ї групах до кінця строку спостережень, досягаючи максимального показнику 9,07±0,191 %. Процес збільшення відсотку клітин IgG мав місце разом із зменшенням відсотку клітин з маркером IgM. Очевидно, що це пов'язано із переходом захисної функції з IgM до IgG.

При дослідженні клітин з поверхневим маркером IgA до 14-ї доби експерименту спостерігали коливання відсоткової кількості цих клітин у бік збільшення або зменшення. І тільки на 14-ту добу зафіксовано вірогідне підвищення кількості клітин з поверхневим маркером IgA у 2-й групі курчат з (4,093±0,233) % та у 1-й групі курчат з (3,686±0,092) % при (1,846±0,589) % у контролі. Процес вірогідного збільшення спостерігався до кінця строку експерименту, коли він досяг максимального рівня (7,476±0,393) % у курчат 2-ї групи та (6,345±0,856) % у курчат 1-ї групи при (4,645±0,127) % у контрольній групі.

Висновки. 1. Вакцина проти високопатогенного грипу птиці та ньюкаслської хвороби комбінована емульсована має високу імуногенну активність.

2. У формуванні імунної відповіді курчат після щеплення їх новими вакцинами проти високопатогенного грипу птиці та ньюкаслської хвороби, приймають участь імунні клітини з маркерами CD4, CD8, макрофаги, IgM, IgG, IgA.

3. Місцем найбільшого накопичення лімфоцитів із маркерами IgG, IgA є Bursa Fabricii.

4. Вакцина, у склад якої входять штами H₅, H₇ та La Sota у співвідношенні 2:1:1, має високу імуногенну активність.

Список літератури

1. 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. 2. 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. 3. Spackman, E, Swayne, DE, Suarez, DL, Senne, DA, Pedersen, JC, Killian, ML, Pasick J, Handel K, Pillai SP, Lee CW, Stallknecht D, Slemons R, Ip HS, Deliberto T. Characterization of low-pathogenicity H5N1 avian influenza viruses from North America. *J Virol.* 2007 Nov; 81(21):11612-9. Epub 2007 Aug 29. 4. Qureshi, M.A., 2003. Avian macrophage and immune response: an overview. *Poultry Science* 82, 691-698.

IMMUNOHISTOCHEMICAL DEFINITION OF IMMUNE STATE AT CHICKENS INOCULATED WITH VACCINE AGAINST HIGHLY-PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA AND NEWCASTLE DISEASE

Stegniy B.T., Shutchenko P.O., Krasnikov G.A., Stegnyy A.B., Muzyka D.V., Medvid' K.O., Gur'yeva V.B.

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

The results of immunohistochemical researches of immunocompetent organ samples of chickens immunized with the different variants of new vaccines against highly-pathogenic avian influenza and Newcastle disease are shown in the article. It is established that after inoculation of vaccine against highly-pathogenic avian influenza and Newcastle disease combined emulsion that includes H5 and H7 and La Sota strains in correlation of 1:1:1 (group 1) and 2:1:1 (group 2) in the immune defence organs the high indexes of amount of immunocompetent cell subpopulations are established, that testified to the increase of morphofunctional activity and forming of immune response. In addition, vaccines at chickens of 2nd group appeared to be more immunogenic.