

но-суженную форму, у животных-СТ – расширенно-укороченную. Животные с нормотоническим типом автономной регуляции сердечного ритма имеют промежуточные показатели между животными-СТ и животными-ПСТ, в связи с чем форма сердца у них умеренно удлинённая и умеренно расширенная.

Литература. 1. Подковыров, Я. Т. Закономерности роста сердца крупного рогатого скота в онтогенезе / Я. Т. Подковыров // *Возрастная и экологическая морфология животных в условиях интенсивного животноводства*. – Ульяновск, 1987. – С. 66 – 67. 2. Волошин, О. С. Особливості автономної нервової регуляції та серцевої діяльності в осіб різного віку / О. С. Волошин, І. Б. Чень // *Тернопіль – 2011*. – № 4. – С. 24–28. 3. Тибінка, А. М. Особливості будови серця та дрібних артеріальних судин у свиней різних типів автономної регуляції серцевого ритму / А. М. Тибінка // *Науковий вісник Львівської державної академії вет. медицини імені С. З. Гжицького*. – Том. 5 (№2). – Ч. 3. – Львів. – 2003. – С. 176–180. 4. Pérez, W. Gross anatomy of the heart of the alpaca (*Vicugna pacos*, Linnaeus 1758) / W. Pérez, V. Méndez, N. Vazquez, M. Navarrete, H. E. König // *Anat Histol Embryol*. 2017. – Vol. 46. – pp 498–505. doi: 10.1111/ah.12327. 5. Cope, L. A. A typical Chordae Tendineae of the Canine (*Canis familiaris*) Right Atrioventricular Valve / L. A. Cope // *Anat Histol Embryol*. – 2016. – vol. 45(6). – P. 485–489 doi: 10.1111/ah.12231. 6. Лепяко, А. А. Порівняльна характеристика автономної регуляції серця, пошкодженого адреналіном, у різностатевих щурів при старінні / А. А. Лепяко // *Здобутки клін. і експерим. мед.* – 2008. – № 1. – С. 44–47. 7. Yusupov, T. T. Stavskaya, O. N. Timkina, M. I. The heterogeneous response of skeletal muscle arterioles to sympathetic stimulation // *Microcirculation. Clinical and Experimental*. – 1984. – Vol. 3, № 3/4. – P. 375 – 379. 8. Xanthos, T. Anatomic variations of the cardiac valves and papillary muscles of the right heart / T. Xanthos, I. Dalivigkas, K. A. Ekmektzoglou // *Ital J Anat Embryol*. – 2011. – vol. 116(2). – P. 111–26. 9. Баевский, Р. М. Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе / Р. М. Баевский, О. И. Кирилов, С. З. Клецкин // *М : Наука*, 1984. – 222 с. 10. Карповський, В. І. Методика визначення типів вищої нервової діяльності свиней у виробничих умовах / В. І. Карповський, В. О. Трокоз, Д. І. Криворучко // *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок*. – Вип. 13. №1/2. – Львів. – 2012. – С. 105–108. 11. Роцевский, М. П. Электрокардиология копытных животных / М. П. Роцевский. – Л : Наука, 1978. – 166 с. 12. Горальський, Л. П. Основи гістологічної техніки і морфологічної методи дослідження у нормі та при патології: навч. посібник / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир : Полісся, 2015. – 288 с.

Статья передана в печать 11.04.2018 г.

УДК 591.4:636.52/.58:619

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, CD20⁺- ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА КУР ПРИ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА

Гуральская С.В.

Житомирский национальный агроэкологический университет, г. Житомир, Украина

На основе наших результатов получены данные о структуре, закономерности роста и развития тимуса кур, которые свидетельствуют о незавершенности его морфогенеза в раннем периоде постнатального онтогенеза, что необходимо учитывать при составлении программ вакцинопрофилактики. Установлено, что у вакцинированных против инфекционного бронхита кур происходит усиление активности гуморального иммунитета, о чем свидетельствует рост В-лимфоцитов с маркерами CD20⁺ в тимусе. Вместе с тем происходила активизация звена клеточного иммунитета, на что указывает активный рост Т-цитотоксических клеток с маркерами CD8⁺. **Ключевые слова:** инфекционный бронхит, вакцинация, куры, тимус, морфология, иммуногистохимия, морфометрические исследования.

DYNAMICS OF CHANGES OF SUBPOPULATIONS CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, CD20⁺- LYMPHOCYTES OF CHICKEN THYMUS FOR VACCINATION AGAINST INFECTIOUS BRONCHITIS

Huralska S.V.

Zhytomyr National Agroecological University, Zhytomyr, Ukraine

On the basis of the obtained results the data about the structure, laws of growth and development of the thymus chickens, which indicate the incompleteness of their morphogenesis in the early period of postnatal ontogenesis, that must be considered when drawing up programmers of vaccination obtained. It was found increasing of activity of humoral immunity in chickens vaccinated against infectious bronchitis, as evidenced by the increase B-lymphocytes with markers CD20⁺ in thymus. However, there was activation of cellular immunity, as indicated by the active growth of T-cytotoxic cells and normal T-killer cells with the marker CD8⁺. **Keywords:** infectious bronchitis, vaccination, chickens, thymus, morphology, immunohistochemistry, morphometric studies.

Введение. Инфекционный бронхит птиц регистрируется во всех странах мира и наносит значительные экономические убытки промышленным и фермерским птицефабрикам. Одной из актуальных проблем в птицеводстве остается выбор оптимальных программ иммунизации птицы против инфекционного бронхита кур [1-3]. Для понимания патогенеза заболевания птицы в последние годы большое внимание уделяется изучению особенностей развития, строения и функционирования органов иммунной системы [3, 4].

Средства диагностики вирусных болезней птицы, используемые на сегодняшний день, трудоемкие, недостаточно чувствительные и специфические.

Иммуногистохимические методы исследования в настоящее время являются неотъемлемой частью научных исследований. Применение иммуногистохимии значительно расширяет возможности морфологии как в изучении этиологии, патогенеза патологических процессов, так и в диагностической практике.

Иммуногистохимические исследования в ветеринарии применяются для диагностики инфекционных болезней, в том числе инфекционного бронхита кур [5-10]. Ряд авторов использовали иммуногистохимические методы при исследовании лимфоидных образований у кур [7-13]. Так, Fredericksen T. и Gilmour D. [14] показали, что количество иммунокомпетентных Т-клеток в селезенке повышалось в первую неделю после вылупления и продолжало расти до 42-го дня после вылупления. Berndt A. и Methner U. [15] изучали распространение и количество субпопуляций Т-клеток в слепой кишке, бурсе Фабрициуса, селезенке после заражения цыплят *S. typhimurium*. В селезенке CD8⁺ локализовались в оболочке периартериальных лимфатических сосудов и в маргинальных зонах. По данным Шутченко П.А. [8], количество Т-лимфоцитов с кластерами CD4⁺ в селезенке значительно возрастает у иммунизированных цыплят.

Перспективность развития иммуногистохимических исследований заключается в том, что они сочетают в себе возможности современной гистологии и иммуногистохимического анализа на клеточном и тканевом уровнях и дают возможность проводить диагностику в фиксированном материале даже после длительного его хранения [16].

Материалы и методы исследований. Для опыта отобрали кур возрастом 1 сутки, выращенных в условиях СООО «Старосолотвинская птицефабрика» Бердичевского района Житомирской области, разделенных по принципу аналогов на две группы по 70 голов в каждой. Первая группа - контрольная, интактные; вторая - опытная, кур которой вакцинировали живой лиофилизированной вакциной штамма Н-120 два раза (в 1 и 13-е сутки), живой лиофилизированной вакциной штамма 4-91 – два раза (на 13 и 80-е сутки) и инактивированной вакциной ИБ/БН/ССЯ (фирмы «Интервет», Нидерланды) – один раз (на 100-е сутки).

Иммуногистохимическое исследование проводили в патоморфологической лаборатории «СSD», г. Киев. На гистологических срезах исследовали субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и CD20⁺.

Цифровые данные морфометрических исследований обрабатывали с помощью вариационно-статистических методов на персональном компьютере с использованием программы Statistica 5.0 для Windows XP. При этом определяли среднюю арифметическую (М), статистическую ошибку средней арифметической (m), среднее квадратическое отклонение (δ), показатель существенной разницы между средним арифметическим двух вариационных рядов по критерию достоверности (td) и таблицами Стьюдента [17]. Разницу между двумя величинами считали достоверной при $p < 0,05; 0,01; 0,001$.

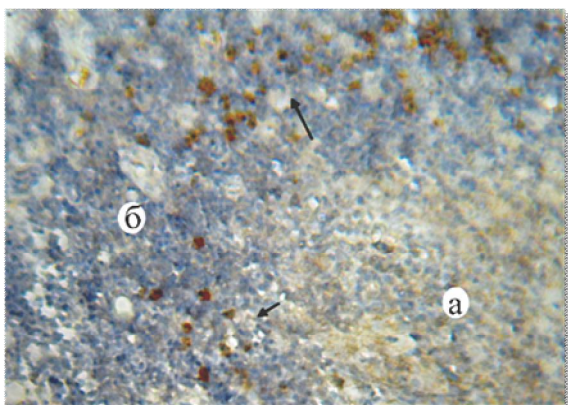
Результаты исследований. Иммуногистохимический анализ показал, что CD4⁺ лимфоциты у вакцинированных кур 8-суточного возраста размещены в корковом (КВ) и мозговом веществе (МВ) одиночно. У кур 20 и 40-суточного возраста при вакцинации против инфекционного бронхита хелперные клетки формировали скопления в виде «полумесяца», причем, у кур 20-суточного возраста такое скопление формировалось у КВ, вокруг МВ дольки тимуса (ДТ) (рисунок 1), а у кур 40-суточного возраста - на периферии КВ ДТ. CD4⁺-лимфоциты у вакцинированных кур 90- и 110-суточного возраста размещались в виде одиночных клеток по всей плоскости ДТ. Цитоморфометрическими исследованиями установлено, что количество лимфоцитов с маркерами CD4⁺ в тимусе вакцинированных кур всех возрастов по сравнению с невакцинированными было практически без изменений, наблюдали только тенденцию роста этого показателя (таблица).

Таблица - Количество субпопуляции лимфоцитов в тимусе кур при вакцинации против инфекционного бронхита (М ± m, n = 6)

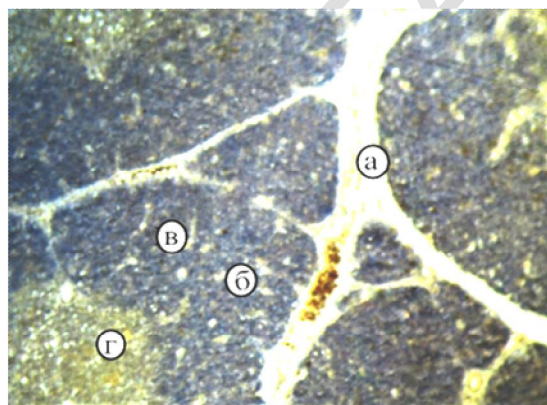
Группы кур	Показатели			
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD45RA ⁺	CD20 ⁺
	на усл. ед. площади (ок.10, об. 40), шт.			
	8 діб			
Контрольная	15,28±1,18	13,61±1,21	34,33±2,09	-
Вакцинированная	17,33±1,56	33,72±0,93	43,39±1,69	-
	20 діб			
Контрольная	37,94±0,69	20,44±1,03	52,39±1,95	-
Вакцинированная	38,22±1,77	37,88±1,74	63,17±2,21	45,22±2,05
	40 діб			
Контрольная	39,44±1,59	31,28±1,51	41,11±1,66	40,33±1,37
Вакцинированная	41,56±0,92	42,11±1,06	74,27±2,24	192,72±6,68
	90 діб			
Контрольная	44,39±2,02	29,11±1,07	61,89±3,97	36,16±1,69
Вакцинированная	46,67±3,18	51,06±3,38	82,89±1,44	171,33±12,99
	110 діб			
Контрольная	45,56±1,42	29,28±1,41	38,33±2,17	27,83±2,59
Вакцинированная	45,83±2,53	50,11±2,63	56,22±3,42	121,11±3,27

Примечания: ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ по отношению к контролю.

Иммуногистохимическими исследованиями с использованием маркера $CD8^+$ установлено, что в тимусе вакцинированных кур 8-суточного возраста субпопуляции лимфоцитов имели подобную локализацию, как и у интактной птицы, и находились в МВ и КВ ДТ. У кур 20-суточного возраста лимфоциты с маркерами $CD8^+$ в МВ были размещены одиночно по всей его поверхности, а вокруг тимусных телец они формировали скопления, иногда в виде «кольца». У вакцинированных кур 40-суточного возраста такие клетки были расположены диффузно в МВ, одиночную локализацию их обнаруживали в КВ, а также они образовывали скопления в междольковой соединительной ткани (рисунок 2). Лимфоциты с маркерами $CD8^+$ почти у всех опытных кур 90 и 110-суточного возраста были расположены одиночно вокруг ДТ, а в МВ ДТ формировали участки округлой формы. При этом количество лимфоцитов с маркерами $CD8^+$ в тимусе вакцинированных кур 8, 20, 40, 90 и 110-суточного возраста достоверно ($p < 0,01$) росло, соответственно, в 2,47, 1,85, 1,34, 1,75 и 1,71 раза по сравнению с невакцинированными (таблица). При этом индекс дифференциации лимфоцитов в вакцинированной группе, в сравнении с контрольной, уменьшался, что указывает на усиленную работу иммунной системы организма для уничтожения чужеродного антигена.



а - мозговое вещество; б - корковое вещество; х 400
Рисунок 1 - $CD4^+$ -лимфоциты в тимусе вакцинированной курицы 20-суточного возраста



а - соединительная ткань; б - долька тимуса;
в - корковое вещество; г - мозговое вещество; х 100
Рисунок 2 - $CD8^+$ -лимфоциты в тимусе вакцинированной курицы 40-суточного возраста

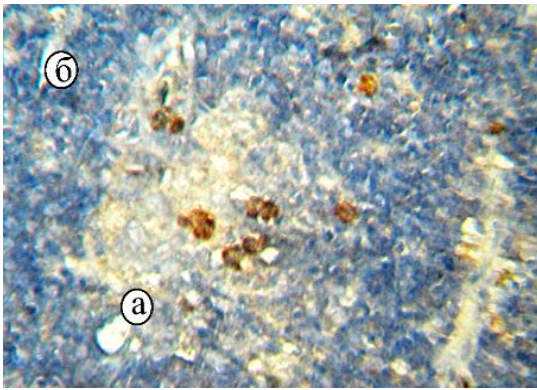
Иммуногистохимическими исследованиями тимуса вакцинированных кур 8-суточного возраста установлено, что лимфоциты с маркерами $CD45RA^+$ в МВ ДТ расположены диффузно и одиночно по всей его поверхности. У вакцинированных кур 20-суточного возраста $CD45RA^+$ -лимфоциты локализуются в виде скоплений вокруг тимусных телец. В полости телец лимфоцитов с маркерами $CD45RA^+$ не обнаружено (рисунок 3).

Окраска гистопрепаратов тимуса антителами маркера $CD45RA^+$ позволила обнаружить наивные Т-хелперы, В-лимфоциты и моноциты в КВ и МВ ДТ, а также в соединительной ткани. Причем, лимфоциты с маркерами $CD45RA^+$ в КВ ДТ локализованы одиночно, а в МВ - диффузно, значительное количество этих лимфоцитов расположено в тимусных тельцах.

Лимфоциты с маркерами $CD45RA^+$ у кур 90-суточного возраста при вакцинации против инфекционного бронхита размещены в междольковой соединительной ткани одиночно, а в ДТ могут формировать очаговые скопления в виде «круга» или «полумесяца». У птиц 110-суточного возраста лимфоциты с маркерами $CD45RA^+$ имели подобное расположение, как и у кур предыдущей возрастной группы. Согласно данным цитоморфометрического исследования, количество клеток, экспрессирующих маркер $CD45RA^+$ в вакцинированной группе относительно невакцинированных также достоверно возрастало (таблица).

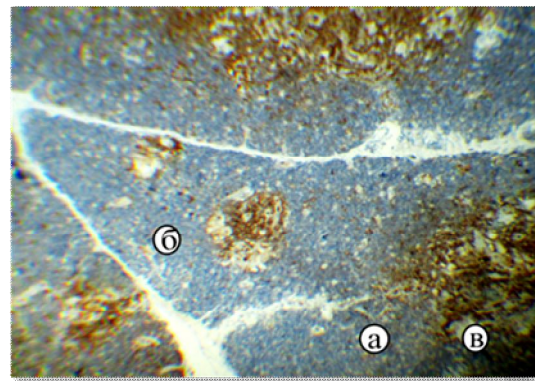
У кур 20-суточного возраста при вакцинации против инфекционного бронхита лимфоциты с маркерами $CD20^+$ в КВ ДТ находились в виде очаговых скоплений различной величины или отдельных клеток по всей ее площади. При этом в количественном отношении зрелых В-лимфоцитов в КВ ДТ было гораздо меньше, чем таких в МВ. У вакцинированных кур 40-суточного возраста происходили количественные изменения в отношениях тканевых компонентов тимуса. При этом отмечали значительный рост количества лимфоцитов с поверхностными маркерами $CD20^+$ в МВ.

У птицы 90-суточного возраста вышеуказанные клетки имели подобное расположение, как и у кур 40-суточного возраста (рисунок 4), однако зрелых В-лимфоцитов с маркерами $CD20^+$ было значительно больше, чем у невакцинированных (см. таблицу). У вакцинированных кур 110-суточного возраста, вследствие разрежения МВ, наблюдали снижение количества В-лимфоцитов в ДТ. При этом цитоморфометрический анализ показал, что количество лимфоцитов с маркером $CD20^+$ характеризовалось достоверным ($p < 0,001$) увеличением этих клеток в тимусе опытных кур 40-, 90- и 110-суточного возраста, соответственно, в 4,77, 4,73 и в 4,35 раза по сравнению с интактными курами (таблица).



а - тимусное тельце, б - мозговое вещество;
х 400

Рисунок 3 - Скопление CD45RA⁺-лимфоцитов вокруг тимусных телес вакцинированной курицы 20-суточного возраста



а - долька; б - корковое вещество;
в - мозговое вещество; х 100

Рисунок 4 - Скопление CD20⁺-лимфоцитов в тимусе курицы 90-суточного возраста при вакцинации против инфекционного бронхита

Заключение. У вакцинированных против инфекционного бронхита кур происходит усиление активности гуморального иммунитета, которое характеризуется ростом В-лимфоцитов с маркерами CD20⁺ в тимусе. Цитоморфометрический анализ показал, что количество CD20⁺-лимфоцитов характеризовалась достоверным ($p < 0,001$) увеличением этих клеток в тимусе опытных кур 40, 90 и 110-суточного возраста, соответственно, в 4,77, 4,73 и в 4,35 раза по сравнению с интактными курами. При этом индекс дифференциации лимфоцитов в вакцинированной группе, по сравнению с контрольной, уменьшался, что указывает на усиленную работу иммунной системы организма для уничтожения чужеродного антигена.

Литература. 1. A survey of the prevalence of infectious bronchitis virus type 4/91 in Iran / M. R. Seyfi [et al.] // *Acta Veterinaria Hungarica*. – 2003. – Vol. 52. – P. 163–166. 2. Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy / M. S. Beato [et al.] // *The Veterinary Record*, 2005. – P. 156–172. 3. Гуральська, С. В. Морфологічні зміни органів кровотворення та імуногенезу курей, вакцинованих проти інфекційного бронхіту / С. В. Гуральська // *Науковий вісник національного університету біоресурсів і природокористування України*. – Вип. 217. – Ч. 1. – К., 2015. – С. 47–52. 4. Дунаєвська, О. Ф. Імуногістохімічна характеристика субпопуляцій лімфоцитів селезінки кролів / О. Ф. Дунаєвська // *Вісник Проблем біології і медицини*. Полтава, 2017. – Вип. 3. – Т. 2 (138). – С. 60–63. 5. Гаврилін, П. М. Методичні особливості застосування імуногістохімічного аналізу для діагностики вірусних хвороб птиці [Електронний ресурс] / П. М. Гаврилін, О. Г. Прокушенкова, В. С. Недзвецький. Режим доступу: <https://www.pdaa.edu.ua/sites/default/files/nppdaa-vet/2011/2/8.pdf>. – Дата доступу : 02.02.2016. 6. Красников, Г. А. Применение иммуногистохимических методов исследования при изучении иммунитета животных / Г. А. Красников, П. А. Шутченко, А. Берндт // III конференція Всеукраїнського товариства ветеринарних патологів, 21–23 квітня 2004 р., м. Харків. – Х., 2004. – Вип. 4 (1). – С. 35–38. 7. Медвідь, К. О. Вивчення динаміки накопичення субпопуляцій імунокомпетентних клітин у селезінці курчат за експериментального зараження вірусом низькопатогенного грипу птиці / К. О. Медвідь // *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини* : зб. наук. праць Харківської державної зооветеринарної академії. – Х., 2011. – Т. 1, вип. 23, ч. 2. – С. 61–64. 8. Шутченко, П. О. Імуногістохімічна діагностика та оцінка клітинного імунітету при сальмонельозі курей : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія та вірусологія» / П. О. Шутченко. – Харків, 2007. – 21 с. 9. Гуральська, С. В. Динаміка змін субпопуляції лімфоцитів з поверхневим маркером CD4⁺ та CD8⁺ у тимусі курей при інфекційному бронхіті / С. В. Гуральська // *Науковий журнал «Біологія тварин»*. 2016. – Т. 18, № 3. – С. 133. 10. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry / E. W. Collisson [et al.] // *Dev. Comp. Immunol.* – 2000. – Vol. 24. – P. 187–200. 11. Seo, S.H. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus / S. H. Seo, E. W. Collisson // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71 – P. 5173–5177. 12. Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: Altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen / G. F. Erf [et al.] // *Poultry Science*. – 1998. – Vol. 77. – P. 529–537. 13. Nagy, N. Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken / N. Nagy, I. Olah // *Journal of Anatomy*. – 2007. – Vol. 211 (3). – P. 407–411. 14. Fredericksen, T. L. Ontogeny of conA and PHA responses of chicken blood cells in MHC-compatible lines 6(3) and 7(2) / T. L. Fredericksen, D. G. Gilmour // *J. Immunol.* – 1983. – Vol. 130. – P. 2528–2533. 15. 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. – Vol. 78. – P. 143–161. 16. Kiernan, J. A. *Histological and histochemical methods: theory and practice* / J. A. Kiernan. – N. Y.: Pergamon Press, 1981. – 81 p. 17. Горальський, Л. П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології: [навч. посібник] / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир: Полісся, 2011. – 288 с.

Статья передана в печать 28.03.2018 г.