

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ имени Я.Р.КОВАЛЕНКО

На правах рукописи

ЖУРАВЛЕВА МАРИЯ СПАРТАКОВНА

**Количественная характеристика показателей иммунного
ответа у кур на различные типы антигенов**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
И.Ю. Ездакова

Москва – 2014

Содержание

1.	ВВЕДЕНИЕ.....	4
1.1.	Список сокращенных названий.....	4
1.2.	ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	5
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1.	Особенности иммунной системы птиц.....	12
2.2.	Иммунокомпетентные клетки и антитела.....	27
2.3.	Основные принципы функционирования иммунной системы птиц.....	42
2.4.	Антигены и вакцины.....	49
	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
3.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	55
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	67
4.1.	Оптимизация методов получения препаратов для количественного определения иммуноглобулина Y кур.....	67
4.1.1.	Выделение IgY из сыворотки крови и желтка яиц кур.....	67
4.1.2.	Получение и контроль антисывороток к белкам сыворотки крови, γ -глобулинам и иммуноглобулину Y кур	73
4.1.3.	Иммунохимические свойства IgY кур.....	75
4.2.	Использование иммунологических методов для изучения и оценки поствакцинального иммунитета у кур	76
4.2.1.	Определение IgY в реакции простой радиальной иммунодиффузии..	76
4.2.2.	Применение различных вариантов реакции розеткообразования для количественной характеристики иммунокомпетентных клеток.....	78
4.2.3.	Разработка нагрузочных тестов для изучения функциональных свойств компонентов иммунной системы у кур	80
4.3.	Динамика поствакцинального иммунного ответа у кур на различные типы антигенов.....	80
4.3.1.	Количественная характеристика иммунологических показателей в процессе T-зависимого иммунного ответа у кур.....	81

4.3.2.	Динамика количественных показателей Т-независимого иммунного ответа у кур.....	95
4.3.3.	Основные иммунологические показатели в процессе Т-зависимого и Т-независимого иммунного ответа у кур под влиянием сезонных факторов.	109
4.3.4.	Количественная характеристика иммунокомпетентных клеток и уровня IgY в процессе иммунного ответа на живую вакцину против ИБК....	112
4.3.5.	Функциональная активность компонентов иммунной системы под влиянием метаболитов микроорганизмов в процессе иммуногенеза	124
4.3.6.	Сравнительная характеристика показателей иммунного ответа на различные типы антигенов	128
5.	ОБСУЖДЕНИЕ.....	132
6.	ВЫВОДЫ.....	146
7.	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	148
8.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	151

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Список сокращенных названий

АПК – антигенпрезентирующая клетка

ВКР – В-клеточный рецептор (BCR)

ДК – дендритная клетка

ИБК – инфекционный бронхит кур

ИКК – иммунокомпетентные клетки

ИС – индекс стимуляции

кДа – килодальтон

МНК – моноклеарные клетки

ПВП – поливинилпирролидон

РО – реакция розеткообразования

ТКР – Т-клеточный рецептор (TCR)

Т_{φр}-РОК – теофиллинрезистентные розеткообразующие клетки

Т_{φч}-РОК – теофиллинчувствительные розеткообразующие клетки

ЭБ – эритроциты барана

Ag – антиген

BALT – лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой дыхательной системы

CD – кластер дифференцировки

Е-РОК – розеткообразующая клетка с эритроцитами барана

Fab–фрагмент – участок молекулы иммуноглобулина, который связывает антиген

Fc-фрагмент – концевая часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc-рецепторами на поверхности клеток

GALT – лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой пищеварительного тракта

Ig – иммуноглобулин

НК – натуральный (естественный) киллер

1.2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Иммунная система животных в процессе эволюции изменялась от примитивных защитных форм у беспозвоночных до сложнейших регуляторных механизмов у млекопитающих, где основные компоненты иммунитета, играющие важную роль в защите от инфекции, по своей структуре и функциям обладают значительной степенью гомологии. Поэтому экспериментальные исследования, проводимые на таких животных, как куры, помогают понять закономерности иммуногенеза, начиная с ранних этапов формирования иммунной системы.

Количественная и функциональная характеристика различных компонентов иммунной системы показывает различия в ее способности давать сильный или слабый иммунный ответ на различные типы антигенов, что важно учитывать при проведении иммунопрофилактики [214].

Иммуногенными свойствами обладает широкий круг природных высокомолекулярных соединений и, в первую очередь белки, полисахариды и их комплексы. Существует несколько критериев, по которым классифицируются антигены: происхождение, химическая природа, чужеродность, характер иммунного ответа. По механизму формирования иммунного ответа выделяют Т-зависимые и Т-независимые антигены [159]. Т-зависимые антигены обладают способностью индуцировать иммунный ответ с участием всех компонентов иммунной системы: макрофаги осуществляют фагоцитарную защиту организма на ранней стадии иммунного ответа, также функция макрофагов предполагает процессинг и презентацию антигена Т-лимфоцитам, которые активируют В-клетки в медуллярной зоне вторичных лимфоидных органов [115, 149].

Т-независимые антигены (митогены) первого и второго типов (полисахариды, липополисахариды, высокополимерные белки, синтетический поливинилпирролидон) характеризуются многократным повторением структурно идентичных В-эпитопов, что приводит к поликлональной стимуляции В-лимфоцитов с преимущественным синтезом IgM и отсутствием формирования клеток памяти [102, 110, 119, 138].

Несмотря на то, что опубликован ряд работ [22, 53] посвященных Т-зависимому и Т-независимому иммуногенезу у лабораторных животных, неосвященными остаются аспекты формирования иммунного ответа у кур на данные типы антигенов. В настоящее время это является особенно актуальным, так как в России используется большое количество иммунопрофилактических препаратов для птицеводства, а именно вакцин против основных инфекционных болезней кур, к которым необходимо применять научно обоснованные методы биологического контроля, основанные на изучении механизмов формирования поствакцинального иммунного ответа. Поэтому в наших исследованиях мы дали сравнительную характеристику показателям иммунного ответа на три модели антигенов (Т-зависимый (эритроциты барана (диаметр 5 мкм) и вирус-вакцина (диаметр 0,12 мкм) - белковые антигены, Т-независимый (поливинилпирролидон – 750 кДа) - небелковый антиген).

Вакцинный процесс, обусловленный введением специфических профилактических препаратов, отражает сложные механизмы взаимодействия макроорганизма и антигена со стороны иммунной системы. Известно, что для полноценного развития специфического иммунного ответа на антиген необходима кооперация макрофагов, Т- и В-клеток [80, 132, 149, 158, 169, 177]. При этом практически все органы и ткани участвуют в иммунологической перестройке, характер которой обусловлен особенностями иммунной системы животного, свойствами и дозой вводимого антигена [43, 110].

Важное значение данных о состоянии поствакцинального иммунитета для практической и фундаментальной ветеринарии подтверждено многочисленными исследованиями [47, 66, 171, 177, 198, 203].

Целью любой вакцинации является защита организма от инфекции, однако в большинстве случаев полностью достичь этого эффекта не удастся, так как иммунорегуляторные механизмы поствакцинального иммунного ответа изучены не в полной мере. В связи с этим актуальными являются исследования по изучению механизмов формирования иммунного ответа на различные типы антигенов, получению препаратов для оценки эффективности вакцинных и

лекарственных средств для кур, оптимизации и использованию методов для определения состояния иммунной системы в процессе онто - и иммуногенеза. Результаты подобных исследований будут иметь не только научный интерес в изучении механизмов формирования иммунного ответа у птиц, но и практическую значимость для ветеринарии, способствуя производству эффективных вакцинных препаратов.

Цель исследований – дать сравнительную характеристику показателям иммунного ответа у кур на различные типы антигенов с помощью полученных препаратов и оптимизированных методов исследования иммунитета.

Для решения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- выделить иммуноглобулин Y из биологических жидкостей кур;
- получить моноспецифическую сыворотку к IgY, антисыворотки к белкам крови и γ -глобулинам кур;
- изучить показатели иммунного ответа у кур на T-зависимый антиген;
- дать характеристику показателям T-независимого иммунного ответа у кур;
- определить показатели иммунного ответа на введение живой вакцины против инфекционного бронхита кур (ИБК);
- дать сравнительную характеристику основным критериям оценки иммунного ответа у кур на различные типы антигенов;
- определить функциональную активность иммунокомпетентных клеток и иммуноглобулина Y на разных этапах иммунного ответа.

Научная новизна. Впервые проведены сравнительные исследования на антигены различной структуры в процессе иммунного ответа у кур. На основании полученных экспериментальных данных подтверждены некоторые закономерности регуляции иммунной системы животных. Установлена отрицательная корреляция между количеством псевдоэозинофилов и лимфоцитов в крови кур в процессе T-зависимого и T-независимого иммунного ответа.

Отработаны способы выделения иммуноглобулина Y из биологических жидкостей кур. Установлено, что электрофоретические свойства IgY,

полученного из сыворотки крови и желтка яиц идентичны. Получена моноспецифическая сыворотка к IgY кур для его количественного определения в реакции иммунодиффузии по методу Манчини.

Впервые дана сравнительная характеристика показателей иммунного ответа у кур и использованы нагрузочные тесты на основе методов иммунодиффузии, спонтанного розеткообразования, определения фагоцитарной активности лейкоцитов крови для оценки функциональных свойств различных компонентов иммунной системы у кур в процессе иммунного ответа на различные типы антигенов.

Установлено, что *in vitro* метаболиты дрожжеподобных грибов рода *Candida* значительней метаболитов дерматофитных грибов *Trichophyton* и *Microsporum*, а также метаболитов бактерий рода *Salmonella*, снижают преципитирующие свойства иммуноглобулина Y и фагоцитарную активность лейкоцитов крови кур.

Получены новые данные о одновременной функциональной активности отдельных компонентов иммунитета в процессе первичного иммунного ответа. Определено, что на 7-е сутки первичного иммунного ответа на T-зависимый и T-независимый антигены активность фагоцитов крови находится в обратной зависимости от адгезивной способности T-спленоцитов.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные дают объективное представление о динамике иммунного ответа у кур и позволяют прогнозировать его развитие на различные типы антигенов.

В результате исследований определены параметры иммуноглобулина класса Y, а также проведена оценка клеточных показателей иммунного ответа с учетом возрастных и сезонных факторов.

Разработаны методические положения по получению моноспецифической антисыворотки к IgY кур (утверждены директором ФГБНУ ВИЭВ, протокол №7 от 19 ноября 2014 г.).

Для дальнейших исследований механизмов иммунного ответа предлагается методический подход к оценке иммунного ответа у кур, который

заключается в определении взаимосвязи псевдоэозинофилов и лимфоцитов и дифференцированном анализе показателей иммунного ответа на различных этапах его развития. Показана возможность использования данного подхода на примере живой вирус-вакцины для оценки поствакцинального иммунного ответа у кур.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены, обсуждены и получили положительную оценку на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел» (Москва, 2011 г.); на 3-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» (Владимир, 2012 г.); на Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития ветеринарной науки России» (Москва, 2013 г.); на Международной научно-практической конференции «Ветеринарная наука в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2014 г.); на Ученом Совете и методической комиссии ФГБНУ ВИЭВ в 2012-2014 гг.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 6 работ в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

Личный вклад соискателя. Работа выполнена соискателем самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно изданных научных статьях. Автор приносит глубокую благодарность научному руководителю доктору биологических наук Ездаковой Ирине Юрьевне за оказание научно-методической помощи в анализе полученных результатов. Автор также благодарна доктору ветеринарных наук В.Н. Скворцову, доктору ветеринарных наук А.М. Литвинову и кандидату ветеринарных наук М.Н. Лощину за научно-методическую помощь в проведении исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 174 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы,

материалов и методов, результатов исследований, обсуждения, выводов, практических предложений и списка литературы.

Материалы диссертации иллюстрированы 24 таблицами и 36 рисунками. Список литературы включает 228 источников, из них 67 зарубежных авторов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- получение препаратов для изучения и характеристики иммунного ответа на различные типы антигенов;
- основные показатели Т-зависимого и Т-независимого иммунного ответа у кур;
- динамика поствакцинального иммуногенеза на живую вакцину против ИБК;
- сравнительная характеристика параметров иммунного ответа у кур на различные типы антигенов;
- функциональная активность структурных компонентов иммунной системы кур на разных этапах иммуногенеза.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время промышленное птицеводство развивается наиболее интенсивно, обеспечивая население высококачественной продукцией во все более короткие сроки [24, 146]. В условиях повышенной концентрации птицепоголовья на ограниченной территории предприятий, унификации кормов и воздействия различных стресс-факторов адаптация птицы происходит с выраженным напряжением физиологических систем. Это ведет к снижению оборотов продукции, ее качества и повышению отхода птицы [46].

Дефицит племенных ресурсов птицепоголовья в нашей стране привел к необходимости ввоза импортных инкубационных яиц и гибридных суточных цыплят. Поступающий из-за рубежа молодняк птицы - источник завоза возбудителей инфекционных заболеваний, таких как инфекционная бурсальная болезнь (ИББ), инфекционная анемия цыплят (ИАЦ), пневмовирусная инфекция и другие. Значителен падеж птицы от колибактериоза, гидроперикардита, болезни Марека и Гамборо, а также от микоплазмоза, сальмонеллеза, инфекционного бронхита кур (ИБК) [145].

Успех в борьбе с данными болезнями не возможен без широкого применения качественных профилактических и диагностических лекарственных средств [130]. Для увеличения протективных свойств вакцин и сохранения их безопасности необходимо учитывать особенности формирования иммунной системы птиц в онтогенезе и характер иммунного ответа на антигены. Несмотря на разнообразие применяемых вакцинных препаратов, иммунологическая эффективность их не всегда достигает желаемого уровня [50].

Одни из первых работ по изучению поствакцинального иммунитета у животных принадлежат академику ВАСХНИЛ Я.Р. Коваленко, который в 1967 г. создал лабораторию иммунитета на базе Всесоюзного института экспериментальной ветеринарии.

Поствакцинальный процесс, обусловленный введением специфических профилактических препаратов, отражает сложное взаимодействие

макроорганизма и антигена со стороны иммунной системы. При этом практически все органы и ткани организма участвуют в иммунологической перестройке, характер которой обусловлен строением иммунной системы животного и природой вводимого антигена [43, 49, 55].

Опыт современного птицеводства показывает, что ветеринарно-санитарное и экологическое благополучие предприятий определяется в первую очередь системным взаимодействием всех производственных подразделений: передовые технологии выращивания, содержания и кормления, профилактические ветеринарные мероприятия и внедрение в практику новых кроссов птицы [11, 145].

Оценка этиологии, природы возбудителей и характера физиологических реакций требует более тщательного научного анализа и обобщения, что обеспечивается своевременной и грамотной работой специалистов ветеринарной медицины.

2.1. Особенности иммунной системы птиц

Иммунная система сформировалась в процессе эволюции позвоночных, обеспечивая защиту от инфекций, поддерживая гомеостаз организма и элиминируя чужеродные агенты как экзогенной, так и эндогенной природы. Кроме того иммунная защита «запоминает» контакт с конкретными антигенами, определяя их ускоренное удаление при повторном поступлении в организм [32, 37, 158].

Защита от инфекций у позвоночных основана на естественном (врожденном) иммунитете, который тесно связан с адаптивными иммунными реакциями Т-, В-клеток и макрофагов. Межклеточное взаимодействие этих иммунокомпетентных клеток служит основой специфического распознавания чужеродных структур [110, 159].

Птицы являются высокоразвитым классом позвоночных и имеют ряд общих черт с млекопитающими [182]. Некоторые из этих характеристик наследуются от общего предка, в то время как другие являются последствием конвергентной эволюции. Птицы имеют ряд специальных приспособлений, одно

из которых - развитие Фабрициевой сумки в качестве первичного лимфоидного органа. Хотя функциональное разграничение Т-, В-клеточных линий и специализированных микросред для их дифференциации происходит и у других классов позвоночных, только у птиц есть орган для первичной дифференцировки клон В-клеток в виде отдельной анатомической структуры [41, 84, 98]. Это четкое разделение Т- и В-клеточных линий обеспечивает удобную модель для иммунологических исследований.

Изучение этой области показывает, что организация и функции иммунной системы птиц схожи с таковыми у млекопитающих, хотя филогенетически она является более ранней [35, 36, 39, 177]. Это подтверждено работами И.А. Болотникова (1983), А.П. Стрельникова (1976), С.Б. Селезнева (2000), Б.Я. Бирмана, И.Н. Громова (2001), F. Davison (2008) и многих других авторов.

В формировании и реализации иммунитета наиболее важными являются лимфоидные органы, лимфоидная ткань и пул циркулирующих лимфатических клеток [19,134]. У птиц лимфоидные органы по степени функциональной активности и значимости в формировании иммунного ответа, так же как и у млекопитающих, принято подразделять на первичные (центральные) и вторичные (периферические) [32, 59, 106, 116, 212].

К первичным органам относят костный мозг, тимус, клоакальную (Фабрициеву) сумку [19, 86, 104, 118, 139, 187], кроме того ряд авторов выделяет эмбриональный желточный мешок и эмбриональную печень как ранние органы кроветворения [19, 35, 84].

Ко вторичным органам иммунной системы относят селезенку, Гардерову и слезную железы, а также скопления лимфоидной ткани, расположенные в стенках полых органов пищеварительной системы (эзофагальная миндалина, дивертикул Меккеля, миндалины слепых кишок, пейеровы бляшки, одиночные лимфоидные узелки), системы органов дыхания и мочевыделительной системы.

Периферические лимфоидные органы расположены на границе с внешней средой и на путях циркуляции крови и лимфы. Центральные же органы

иммунной системы находятся в хорошо защищенных от внешних воздействий участках тела животного [7, 10, 67, 85, 177, 187, 203, 209].

Первые очаги эмбрионального кроветворения появляются в желточном мешке через 30-36 ч. инкубации в виде кровяных островков, которые, объединяясь, формируют тонкостенные эндотелиальные трубочки с плазмой и первичными округлыми эритроцитами. В этот же период среди эритробластов появляются клетки, дающие начало серии тромбоцитов и гранулоцитов. С 7-го по 12-ый день инкубации [35, 65, 133] активную кроветворную функцию выполняют печень и селезенка.

Закладка лимфоидной ткани происходит позднее. Лимфоциты начинают появляться в селезенке на 15-ый день инкубации, далее они обнаруживаются в печени и костном мозге, который начинает функционировать с 14-го дня развития куриного эмбриона [15]. В нем формируются все виды клеток [149]. Гемопозитические стволовые клетки костного мозга птиц (ГСК) – родоначальные клетки крови, которые могут дифференцироваться в зависимости от состояния организма и влияния микросреды в предшественников лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов, эритроцитов и тромбоцитов. Предшественники Т- и В-лимфоцитов птиц уже детерминированы в своем дальнейшем развитии в костном мозге [15].

Закладка и формирование костного мозга во всех костях конечностей эмбриона происходит одновременно, исключение составляют проксимальные участки предплечья и голени, где его развитие наиболее интенсивно и в постнатальном периоде [96]. К моменту вылупления цыпленка гемопозитические функции костного мозга находятся в зачаточном состоянии, а основную кроветворную роль продолжают играть печень и селезенка.

По данным литературы [9, 15, 35, 106] у птиц могут возникать очаги гетеротропного кроветворения практически в любом органе или ткани, так как ГСК мигрируют из одного кроветворного органа в другой (селезенку, тимус, Фабрициеву сумку, лимфатические узлы и др.).

Тимус птиц (зобная или вилочковая железа) – паренхиматозный многодольчатый лимфоэпителиальный орган. Формируется на 10-14-й день эмбрионального развития, активно растет и функционирует в течение первых 3-х месяцев жизни. [87, 136, 221]. Располагается в области шеи, идет параллельно блуждающему нерву и внутренней яремной вене, проходя вдоль трахеи, краниально достигает 3-го шейного позвонка.

Состоит из 6-7 пар долей, расположенных в два ряда [47, 126]. Данные в работах F. Davison (2008) и О.В. Вавиной (2008) указывают на 7-8 пар. Быстрая инволюция железы начинается незадолго до периода половой активности и начала яйцекладки (4,5-5 месяцев). В последующем, тимус все больше редуцируется, хотя и не исчезает полностью [35, 89, 193].

Каждая доля его покрыта капсулой, состоящей из волокнистой соединительной ткани. Внутри от капсулы отходят тяжи – трабекулы, которые делят железу на доли бобовидной формы или в форме «кнопки», достигающих максимального размера 6-12 мм в диаметре к 3-4 месяцам, то есть до периода физиологической инволюции [221].

Трабекулы не доходят до центральных участков доли и не полностью отделяют дольки друг от друга [35, 158, 160, 177]. Паренхима долек тимуса состоит из корковой (кортикальной) зоны и мозговой (медуллярной), субкортикальная зона между ними выражена нечетко, в отличие от строения долек тимуса млекопитающих [65].

Корковая зона густо заполнена лимфоцитами. Большие и средние лимфоциты плотно занимают пространство под капсулой, в то время как малые – основную площадь кортикальной зоны. Здесь же встречаются створчатые, эпителиальные клетки («nurse cells» - клетки-няньки), дендритные, секреторные клетки и макрофаги.

Дендритные клетки имеют отростки и содержат на своей поверхности молекулы комплементарные молекулам адгезии лимфоцитов, удерживая тимоциты. Кроме того дендритные клетки служат источником сигналов, генерируемых при клеточных контактах [148].

Другая разновидность клеток тимуса – секреторные. Они вырабатывают некоторые гуморальные субстанции – тимулин (847 кДа), тимозин (3108 кДа), тимопоэтин (5562 кДа), а также интерлейкины, стимулирующие дифференцировку Т-лимфоцитов [47, 149, 160]. Важным компонентом микроокружения тимуса являются «клетки-няньки», которые располагаются в корковой зоне и участвуют в образовании многоклеточных агрегатов, поглощая тимоциты, что способствует созреванию и дифференцировке тимусных клеток [158].

В мозговой зоне лимфоциты лежат не так плотно. Здесь встречаются тельца тимуса (тельца Гассалья), которые представлены узелками эпителиоидных и ретикулярных клеток, часть которых подвергается дегенерации. У кур тельца Гассалья отличаются гомогенностью и полиморфизмом, встречаются редко и незначительно выделяются из общей массы клеток медуллярного слоя [47]. У млекопитающих клетки тимусных телец секреторируют цитокин, активирующий дендритные клетки. Вероятно, подобную функцию они выполняют и у птиц [37, 38, 158, 160].

Процесс созревания лимфоцитов представляет собой ряд последовательных изменений в направлении от кортикальной зоны к медуллярной. Малодифференцированные лимфобласты (предшественники Т-лимфоцитов) поступают из костного мозга в тимус через вены кортикотимомедуллярного слоя, откуда они мигрируют в наружные слои коры. Затем начинается их обратное движение в сторону кортикотимомедуллярной зоны. В ходе этих перемещений происходит созревание Т-клеток [149, 158, 160, 177].

Предшественники Т-лимфоцитов лишены основных поверхностных маркеров дифференцировки - CD-рецепторов («CD» - clusters of differentiation): CD4+ и CD8+, типичных для Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток соответственно [57, 176]. Кроме того у них отсутствует CD3-TCR («T-cell receptor») - Т-клеточный антигенраспознающий рецептор. В результате взаимодействия тимоцитов с эпителиальными (дендритными) клетками субкортикальной зоны на их поверхности экспрессируется CD2 рецептор,

обладающий адгезивными свойствами. Далее, в результате генной перестройки, запускается механизм синтеза Т-клеточного рецептора (ТКР). Продвигаясь в более глубокие слои коркового вещества тимуса, на поверхности Т-клетки появляются CD4 и CD8 рецепторы, а также CD3-TCR. Контактируя с эпителиальными клетками, на поверхности которых находятся молекулы МНС (Major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости) классов I и II, эти клетки подвергаются положительной селекции по принципу сохранения тех Т-лимфоцитов, ТКР которых имеет сродство к молекулам классов комплекса гистосовместимости. Развитие клеток, которые не вступили во взаимодействие с МНС I или II классов завершается. В результате положительной селекции погибает значительная часть лимфоцитов [47, 127, 149, 158, 160, 177].

Т-лимфоциты, на поверхности которых экспрессированы CD4- и CD8-рецепторы, продвигаются дальше к кортикострукулярному слою. Там они проходят отрицательную селекцию при участии дендритных клеток и макрофагов, где элиминации подвергаются Т-лимфоциты, которые обладают значительным сродством к собственным молекулам, находящимся во взаимосвязи с МНС. Утрата одного из рецепторов дифференцировки дважды положительных Т-лимфоцитов (CD4+CD8+) зависит от того, к какому классу МНС клетка проявила сродство. Если МНС класса I - сохраняется кластер CD8, и клетка становится предшественником цитотоксической Т-клетки (Т-киллера), если МНС класса II - сохраняется кластер CD4, предшественника Т-хелпера. Таким образом, в тимусе формируются наивные Т-лимфоциты [158].

Вскоре после открытия роли тимуса в развитии Т-лимфоцитов, у птиц был обнаружен орган, удаление которого нарушало развитие тимуснезависимой части популяции лимфоцитов.

Бурса Фабрициуса (Фабрициева, клоакальная сумка) – лимфоэпителиальный полостной орган, представляющий собой округлый или овальный дивертикул на дорсальной стенке клоаки. Свое название Фабрициева сумка получила по фамилии первооткрывателя - Джероламо Фабриция

(Girolamo Fabrizi d' Acquapendente) в начале XVII века. В то время предполагалось, что данное образование может служить для хранения семени. Спустя более 350 лет ученые Б. Глик и Т. Чанг (Poultry Science Department at Ohio State University, USA) опубликовали работу, в которой были приведены данные об отсутствии агглютинирующих свойств крови при взаимодействии с антигеном у бурсэктромированных кур. В результате дальнейших исследований в этом направлении было установлено, что Фабрициева сумка является источником В-лимфоцитов [47, 88, 124, 142, 158, 177, 183].

Бурса закладывается на 8-е сутки эмбрионального развития, затем в течение 6-и суток заселяется клетками-предшественниками из костного мозга. Для Фабрициевой сумки характерно интенсивное развитие в период раннего онтогенеза и полная инволюция у взрослых [35,157]. Стадии зрелости клоакальная сумка достигает к 8-10 неделям [177]. По данным В.Ф. Вракина и М.В. Сидоровой (1984) признаки ранней инволюции наблюдаются к 15 неделям, F. Davison (2008) указывает на 12 недель.

К 7 месяцам процессы инволюции переходят в позднюю стадию вплоть до 12 месяцев, когда Фабрициева сумка у кур уже не обнаруживается. Это подтверждается в работах О.В. Вавиной (2008), В.М. Кравченко (2000), Т.В. Бариновой (2010), Е.Г. Турицыной (2012), Л.Л. Якименко (2012). Согласно работам этих авторов функцию Фабрициевой сумки после ее инволюции выполняют селезенка и костный мозг.

Стенка клоакальной сумки состоит из трех слоев – слизистого, мышечного и серозного. Функциональному значению мышечного слоя, как правило, уделяется недостаточно внимания, но по данным F. Davison (2008), его сокращение может способствовать продвижению лимфоцитов в медуллярный слой.

Слизистая оболочка бursы кур образует 12-14 складок, состоит из покровного эпителия и собственной пластинки, в массе которой залегают по 2 ряда лимфатических фолликулов. К первому месяцу жизни цыпленка общее число фолликулов достигает 8-12 тысяч [52, 204]. Каждый фолликул состоит из

корковой и мозговой зон. В корковой периферической зоне располагаются малые и средние лимфоциты, а мозговая зона представлена преимущественно большими лимфоцитами, дендритными клетками и макрофагами. Разграничены зоны капиллярной сетью и базальной мембраной [10, 35, 98, 126]. Корковый слой фолликула полностью сформирован к 2-ух недельному возрасту.

К моменту вылупления бурса имеет около 10 000 фолликулов, в каждом из которых содержится 100 000-150 000 лимфоцитов [177, 206]. Во время фолликулогенеза (постнатальный период) новых лимфоцитов в бурсу не поступает.

Первичные поверхностные рецепторы IgM обнаруживаются с 12-го дня эмбрионального развития, и, к моменту вылупления, более чем 90% бурсальных клеток являются зрелыми В-лимфоцитами. В период развития эмбриона Фабрицева сумка продуктивно заселена ограниченным количеством В-клеточных предшественников (экспрессируют рецептор CD19), которые уже подверглись перестройке Ig генов в парааортальных очагах (участки мезенхимной ткани) аорты эмбриона и в костном мозге.

У птиц (и жвачных животных) основой перестройки V-генов является генная конверсия, суть которой состоит в обмене фрагментами ДНК между функциональными V-генами и псевдогенами. Для запуска этого процесса, вероятно, требуются сигналы, генерируемые эпителиальными клетками кишечника (бурсы, пейеровых бляшек) или их продуктами [158, 191].

В-клеточные предшественники, прошедшие первичную перестройку Ig генов, в последующем проникают в фолликулы бурсы. Основным событием при дифференцировке В-клеток в Фабрицевой сумке (медуллярный слой) является экспрессия иммуноглобулинового рецептора для распознавания антигенов – BCR-sIgM (мембранный иммуноглобулин М - мономер). При контакте BCR с собственными антигенами на завершающей стадии дифференцировки в бурсе происходит корректировка перестройки генов. В случае высокой степени сродства к собственным белкам, клетки подвергаются апоптозу (отрицательная селекция) [25, 37, 85, 148].

Клеточный цикл В-клеток в Фабрициевой сумке птиц составляет 8-10 часов. Эта сравнительно быстрая пролиферация клеток приводит к синтезу нескольких тысяч лимфоидных фолликулов, каждый из которых содержит лимфоциты на различных этапах дифференцировки [73, 97, 106, 210].

Созревшие наивные В-лимфоциты (не имевшие контакта с антигеном и не способные к продукции антител) покидают бурсу и заселяют периферические лимфоидные органы [135].

Есть данные, что В-клетки мигрируют из бурсы в тимус, вероятно, для завершения развития. Таким образом, бурсу нельзя считать органом, аналогичным тимусу, так как она имеет определенные черты сходства со вторичными лимфоидными органами (наличие лимфоидных фолликулов) [154].

Основным периферическим лимфоидным органом птиц является **селезенка** – паренхиматозный орган округлой формы, который занимает центральное место в переработке антигенов и продукции антител в организме взрослых птиц [187]. Кроме того, селезенка служит иммунным барьером на путях гематогенного распространения чужеродных агентов [123, 158]. Диффузные скопления лимфоидной ткани в ней обнаруживаются в первый день постэмбрионального развития, а герминативные центры - к 4-му дню.

В отличие от млекопитающих, селезенка птиц не выполняет функцию депо крови. Начиная с момента вылупления цыпленка, в ней происходит разрушение эритроцитов и образование лимфоцитов [4, 64, 84].

В 40 % случаев у птиц обнаруживают добавочные селезенки меньшего размера, расположенные либо в непосредственной близости от органа, либо удаленно - вдоль брюшной аорты [35, 177]. Селезенку относят к инкапсулированным вторичным органам (истинным) наряду с одиночными лимфоидными узелками, Гардеровой и слезной железами, пищеводной миндалиной, дивертикулом Меккеля, слепоклещечными миндалинами и пейеровыми бляшками [158].

Соединительнотканная строма селезенки развита незначительно, трабекул в отличие от млекопитающих нет, волокнистая ткань в небольших количествах располагается по ходу крупных сосудов селезенки [35, 40, 172].

В зависимости от преобладания тех или иных клеток в селезенке птиц присутствует белая и красная пульпы. Белая пульпа заселена лимфоцитами и является местом их скопления, в красной пульпе преобладают эритроциты, встречаются так же эозинофилы, плазматические клетки, макрофаги и лимфоциты.

Белая пульпа окружена маргинальным синусом, для которого характерно наличие макрофагов и скопление плазматических клеток, продуцирующих антитела. Именно здесь происходит обмен клеток между пульпами селезенки [158]. Артериолы, заходящие в белую пульпу, окружены лимфоидными скоплениями (периартериальными лимфоидными муфтами - ПАЛМ), которые образованы в основном Т-лимфоцитами и являются Т-зависимыми зонами [47, 158]. Муфту окружает пространство, содержащее лимфоциты обоих классов (Т-, В-клетки). Ближе к периферии от этого пространства располагаются лимфоидные узелки (фолликулы). В них накапливаются в основном В-лимфоциты, и они являются В-зависимой зоной. В этой зоне хорошо видны зародышевые центры (герминативные центры - ГЦ), которые образуются при антигенной стимуляции [37, 38, 110]. До антигенной стимуляции фолликулы являются первичными, они не имеют центров размножения и состоят из наивных В-клеток.

Фолликулярные дендритные клетки, являющиеся микроокружением для В-лимфоцитов, фиксируют на своей поверхности антигены, передавая, таким образом, информацию о них В-клеткам [172].

Гардерова железа (железа третьего века) – основная экзокринная парная железа, расположенная в интраорбитальном синусе глаза на медиальной поверхности глазного яблока. Является не только железой внешней секреции, но и органом иммунной системы [29, 47, 151, 184, 208]. Железа представляет собой удлиненное и уплощенное неправильной формы тело, отсутствует у наземных

хищников, у человека и летучих мышей, в рудиментарном состоянии находится у обезьян. У взрослой птицы железа Гардера имеет больший размер, чем слезная [203].

В ходе исследований А.Л. Харлана (2012) было установлено, что каждая доля железа третьего века имеет полость, которая сообщается тонким протоком с полостью конъюнктивального мешка глаза для выведения образующегося секрета. Он продуцируется железистым эпителием Гардеровой железы, выстланным glanduloцитами. От капсулы вглубь отходят перегородки, разделяющие паренхиму на секреторирующие ячейки и лимфоидную ткань, В-лимфоциты которой обладают выраженной способностью к секреции IgA [66, 126].

Слезная железа – парный орган, находящийся в медиальном углу периорбиты глаза [26]. Морфологическое и гистологическое строение его схоже с Гардеровой железой. По данным Б.Я. Бирмана и др. (2008) в органе синтезируется незначительное количество иммуноглобулина А.

Как упоминалось ранее, периферический отдел иммунной системы птиц включает систему лимфатических органов и диффузную лимфоидную ткань, связанную с основными типами слизистых оболочек.

Лимфоидная ткань пищеварительного тракта (GALT - gut-associated lymphoid tissue) у птиц расположена вдоль всей его слизистой оболочки, образуя скопления в виде лимфоидных узелков, пищеводной и слепкишечных миндалин, дивертикула Меккеля [171, 226]. Эти лимфоидные ткани имеют Т-клеточные зоны, лимфоидные фолликулы с герминативными центрами (В-клеточные зоны) и особый лимфоэпителиальный слой в микроскладках слизистой оболочки. Спустя несколько дней после вылупления цыпленка Т- и В-лимфоциты заселяют лимфоидную ткань кишечника для продуцирования IgA и формирования клеточного иммунитета [211, 217].

Одной из характерных черт специализированного эпителия пищеварительного тракта птиц является наличие микроскладчатых клеток (М-клеток), обладающих высокой поглотительной способностью. М-клетки - это

эпителиальные клетки, расположенные в скоплениях лимфоидных узелков, они селективно захватывают патогены, перерабатывают их и передают лимфоцитам, макрофагам и ДК. Данные клетки у птиц были обнаружены в дивертикуле Меккеля и слепок кишечных миндалинах [197].

Эзофагальная миндалина является важным элементом лимфоидной ткани пищеварительного тракта. Ее постоянное местоположение в области перехода пищевода в железистый желудок и гистологическая организация, представленная лимфоидными узелками (6-8 узелков) на собственной оболочке слизистой пищевода, позволяют выделить это образование как «миндалина» [10, 205, 209].

Число складок слизистой оболочки эзофагальной миндалины соответствует их количеству в пищеводе. Каждый элемент миндалины представляет собой крипту, находящуюся на пластине из лимфоэпителиальных клеток, окруженной плотным лимфоидным веществом (корковое вещество). В коре миндалины выделяют Т- и В-зависимые зоны, такие же как и в других периферических лимфоидных органах. Выводной проток железы часто связан с лимфоэпителиальной пластиной.

Расположение миндалины до входа в желудок и ее постоянный контакт с непереваренной пищей, аллергенами и инфекционными агентами, позволило развить и в дальнейшем совершенствовать оральную вакцинацию, акцентируя внимание на функциональном значении миндалины.

Дивертикул Меккеля является рудиментом желточного мешка, расположенным на стыке двенадцатиперстной и тощей кишок [170, 177], хотя по данным В.Ф. Вракина (1991), В.П. Шишкова (1978) и Б.Я. Бирмана (2008) его расположение относят к середине тощей кишки.

После вылупления цыпленка значительная часть желтка поступает в кишечник как источник питательных веществ. Оставшийся участок в виде желточного протока формирует связь между желточным мешком и тонкой кишкой эмбриона. Она сохраняется до 5-ти недель после вылупления [44]. Стенка дивертикула состоит из 4-ех слоев. Серозная оболочка покрывает

толстый слой соединительной ткани, глубже расположены пучки гладкомышечных волокон и нервные узлы, далее находится эпителиальный слой, выстланный бокаловидными клетками, продуцирующими слизистый секрет. Сразу после вылупления цыпленка лимфоидная ткань в дивертикуле не обнаруживается, она появляется спустя 2 недели, когда по периферии дивертикула начинает формироваться миелопоэтическая ткань как источник формирования клеток, а в центральной части (в субэпителиальном пространстве) - лимфоидная.

В миелопоэтической ткани четко прослеживаются 3 зоны в зависимости от клеточного состава: моноцитарные клетки, заполняющие просвет желточного мешка, недифференцированные бластные клетки (при созревании превращаются в функциональные клетки крови) и скопление гранулоцитов, формирующие самую большую зону. Далее в продольных складках субэпителиального пространства появляются небольшие скопления лимфатических клеток с CD45 рецептором – общим лейкоцитарным рецептором [162]. Число бокаловидных клеток в дивертикуле постепенно уменьшается, эпителий пронизывает лимфоциты, которые формируются вокруг дендритных клеток. Спустя 2-3 месяца после вылупления цыпленка появляются герминативные центры, и большая их часть находится вблизи скоплений гладкомышечных волокон. Плазматические клетки, продуцирующие IgA и IgY, рассеяны по органу. После 3-х месяцев в органе можно увидеть зоны Т- и В-клеток. Т-зоны расположены ближе к герминативным центрам, тогда как В-зоны, как правило, располагаются под эпителиальным слоем [177].

Слепокишечные (цекальные) миндалины – парные лимфоэпителиальные образования, выступающие в виде валиков у основания каждой слепой кишки [10, 126, 128]. Зачатки слепых кишок закладываются к 10-у дню эмбрионального развития, а лимфоциты там обнаруживают к 18-у дню. В течение первой недели после вылупления цыпленка число лимфоцитов увеличивается, а герминативные центры появляются на второй неделе жизни. Отмечено, что у цыплят, выращенных в стерильных условиях, герминативные

центры не обнаруживаются, а количество лимфоидной ткани заметно снижено. Предполагается, что кишечная флора - неотъемлемый компонент для развития миндалин.

Структура цекальных миндалин схожа со структурой дивертикула Меккеля и включает в себя лимфоэпителиальный слой, субэпителиальную и интерфолликулярную зоны, а также герминативные центры. В субэпителиальном слое встречаются В-клетки (IgM+, IgY+), плазматические клетки, CD4- и CD8-лимфоциты. Макрофаги обнаруживаются на всем протяжении миндалины, но более распространены в субэпителиальном слое [177].

Немалую роль в иммунной защите организма птиц играет лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой респираторного тракта (BALT - bronchus-associated lymphoid tissue). Она развивается с возрастом птицы в зависимости от окружающей антигенной стимуляции.

Легкие птиц имеют в своем составе лимфоидные структуры, а также диффузно расположенные лимфоидные и миелоидные клетки. Впервые это было описано в работах Bienenstock et al. (1984), который сравнил легочную иммунную систему птиц и млекопитающих и обнаружил лимфатические узелки [165].

Зрелая лимфоидная ткань легких покрыта слоем эпителиальных клеток. У суточных цыплят в лимфоидной ткани присутствуют только Т-клетки, а с 14-и суток появляются В-клетки. На протяжении последующих недель накапливается количество CD45, и формируются герминативные центры. У взрослых птиц В-клетки расположены в центре лимфоидного узелка, а CD4-клетки по периферии, что является обратным расположением по сравнению с молодняком птиц. У 2-ух месячных цыплят большее число В-клеток продуцирует IgM, и в меньших количествах - IgY и IgA. Эпителий трахеи и бронхов не имеет М-клеток [178].

В заключении следует отметить две важнейшие, с точки зрения иммунологии, филогенетические особенности птиц.

Во-первых, это появление интрамурального лимфатического узла – важнейшего шага к генерализации местного иммунного ответа – и, во-вторых, – появление герминативных центров во вторичных лимфоидных органах, в которых пролиферируют антигенспецифические В-клетки, происходит переключение изотипов иммуноглобулинов и формируются В-клетки памяти.

Два этих эволюционных шага делают лимфоидную (иммунную) систему млекопитающих и птиц весьма сопоставимой как структурно, так и функционально.

Первое подробное описание интрамурального лимфатического узла птиц в литературе относится к 1957 г. Р.М. Biggs предположил, что интрамуральные лимфатические узлы являются нормальной структурой, а не эктопическим лимфоидным скоплением [166]. Как правило, они связаны с глубокими лимфатическими сосудами, которые идут вместе с бедренными, подколенными и большеберцовыми венами, кроме того, незначительное число лимфоидных скоплений находится по ходу вен крыльев. Появление интрамуральных узлов происходит после 6 недель, и они сохраняются у птиц во взрослом состоянии.

Существует несколько анатомических и гистологических отличий между действительными лимфатическими узлами млекопитающих и интрамуральными узлами птиц. Лимфатические узлы млекопитающих анатомически прерывают ток лимфы, в то время как интрамуральные узлы связаны с боковой стенкой лимфатического сосуда, то есть лимфа течет свободно. Гистологическое отличие от лимфатических узлов млекопитающих заключается в отсутствие ретикулярных волокон и макрофагов в узле птиц. В действительном лимфатическом узле ретикулярные волокна и макрофаги осуществляют механическую и биологическую фильтрацию лимфы. Отсутствие фильтрационной системы в интрамуральных узлах предполагает эволюционную платформу в развитии иммунной системы [156, 211].

Еще одна особенность лимфатической системы птиц – наличие эктопической лимфоидной ткани. Она начинает развиваться после трех недель в нелимфоидных органах, таких как печень, почки, эндокринные железы

(щитовидная железа, надпочечники), гонады и даже центральная нервная система. Остается открытым вопрос - является ли эктопическая лимфоидная ткань разрушительной для нелимфоидных органов, или это нормальная реакция на внешние антигены. Biggs P. M. (1957) рассматривал появление эктопической лимфоидной ткани как нормальную реакцию в иммунной системе птиц. Это явление кратковременно (до 3-4 месяцев), после чего нелимфоидные органы возвращаются в свое первоначальное состояние как гистологически, так и функционально. В последние годы, было доказано, что стволовые клетки встречаются почти во всех зрелых тканях птиц, и их появление во многих нелимфоидных органах не является неожиданностью. Лимфоидную ткань обнаруживают даже в гипофизе, в органе, который обычно выходит за рамки исследований в области иммунологии птиц [177, 211].

2.2. Иммунокомпетентные клетки и антитела

Кровь и лимфа составляют циркуляторное звено иммунной системы и отражают физиологическое состояние организма. Кровь содержит много типов клеток, которые выполняют совершенно различные функции – от транспорта кислорода до выработки антител. По кровотоку происходит рециркуляция лимфоцитов и миграция клеток из кроветворных органов в периферические лимфоидные органы. Некоторые из этих клеток функционируют исключительно в пределах кровеносной системы, а другие используют ее только для транспорта и свои функции выполняют в других органах и тканях [13,14, 61,63, 149].

В зависимости от диагностических целей проводят оценку морфологического, биохимического состава крови, ее физико-химических показателей и иммунологических свойств [16, 43, 126].

По данным А.А. Заварзина (1953) постэмбриональное кроветворение у птиц характеризуется отсутствием четкого деления на миелоидные и лимфоидные системы. Это подтверждается в работах С. Corbel (2007), который указывал на то, что в костном мозге птиц гистологически выделяют два отдельных отсека.

Интравакулярная часть отвечает за эритро- и тромбопоэз, в то время как экставакулярная – за миело, моно-и лимфопоэз [133, 175].

В иммунологическом отношении особую роль играют гранулоцитарные (зернистые) и агранулоцитарные (незернистые) формы лейкоцитов [31].

К гранулоцитам относятся – базофилы, эозинофилы и псевдоэозинофилы, формирующиеся в красном костном мозге. Агранулоциты представлены моноцитами и лимфоцитами. Окончательная дифференцировка последних проходит в лимфоидной ткани [12, 75].

Первоначальная классификация зернистых лейкоцитов птиц включала только базофильные и эозинофильные формы клеток. При этом В. Букраба (1928) и другие авторы отмечали необходимость выделять клетки с круглой и палочковидной зернистостью среди эозинофилов. Позднее, клетки с палочковидной зернистостью получили название «псевдоэозинофилы», а круглозернистые – эозинофилы. В зарубежных литературных источниках чаще встречается термин «гетерофилы», обозначающий псевдоэозинофильные клетки [164].

Базофилы – клетки диаметром 7-13 мкм. Главной морфологической особенностью их является наличие базофильных гранул. Они содержат гистамин, гепарин, ферменты (протеазы, дегидрогеназы, пероксидазы и другие). Являются основными эффекторными клетками при гиперчувствительности немедленного типа. Ядро клетки двулопастное или овальное, расположено эксцентрично, просматривается плохо, так как скрыто гранулами различной величины, заполняющими цитоплазму.

Эозинофилы – округлые клетки с диаметром 8-12 мкм. В зрелых клетках ядро расположено эксцентрично, состоит чаще из двух сегментов, соединенных тонкой перемычкой. Специфической особенностью является наличие округлых гранул в цитоплазме, которые содержат ряд ферментов (пероксидазы, РНКазы, коллагеназы, эластазы и другие), щелочной и катионный эозинофильный белок, молекулы которого способны встраиваться в мембрану клеток гельминтов и нарушать ее целостность. Эозинофилы секретируют широкий спектр цитокинов

и хемокинов. Чаще встречаются в сосудах и тканях желудочно-кишечного тракта. Способны к самостоятельному движению и фагоцитозу, но обладают слабой фагоцитарной активностью [44, 47].

Псевдоэозинофилы – имеют неправильную округлую форму и средний размер 8-13 мкм. Это специфическая форма клеток у птиц и наиболее часто встречающаяся среди зернистых лейкоцитов. Ядро состоит из 3-5 сегментов, лежит эксцентрично, или в клетке наблюдаются два ядра, расположенные у полюсов [108, 141]. Цитоплазма заполнена гранулами ярко-красного цвета веретеновидной формы. Псевдоэозинофилы – активные бактериальные фагоциты как в кровяном русле, так и в тканях. Кроме того, они способны нейтрализовать чужеродные белки и фагоцитировать мертвые клетки. У самцов фагоцитарная активность выше, чем у самок [15, 19, 35]. Активированные псевдоэозинофилы индуцируют экспрессию различных провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-8 [179].

Тромбоциты – особые клетки крови птиц, которые по функциям аналогичны кровяным пластинкам млекопитающих, участвуют в свертывании крови. Тромбоциты образуются из тромбобластов в костном мозге, что резко отличает их происхождение и структуру от млекопитающих. Тромбоциты имеют форму мелких овальных клеток, диаметром 5-12 мкм. В мазках крови кур они чаще лежат группами по 3-10 клеток. При кровопотере они в больших количествах скапливаются у края раны, набухают, склеиваются друг с другом и разрушаются. Кроме участия в свертывании крови, тромбоциты птиц осуществляют фагоцитарную функцию в кровеносном русле, что подтверждено результатами исследований многих авторов [17, 24, 126].

Моноциты – самые крупные клетки крови птиц диаметром 10-17 мкм, с крупным ядром овальной, почковидной или подковообразной формы. Моноциты формируются в костном мозге и селезенке, в крови остаются не продолжительное время. Основные функции осуществляют в тканях, где и накапливаются, превращаясь в истинные макрофаги, способные к амебиодному движению.

Моноциты крови и тканевые макрофаги образуют моноклеарную фагоцитирующую систему. Наиболее важными в функциональном отношении являются рецепторы, предназначенные для узнавания антигенов и рецепторных молекул собственных клеток организма. В первую очередь к ним относятся Toll-подобные рецепторы (TLR – Toll-like receptor), которые позволяют моноцитам/макрофагам распознавать основные группы патогенов. Среди Toll-рецепторов выделяют разновидности, например – TLR-4, с которым связан маркер – CD14, обеспечивающий взаимодействие клетки с липополисахаридами бактерий. Кроме того, некоторые Toll-рецепторы способны распознавать чужеродные нуклеиновые кислоты. На поверхности моноцитов и макрофагов экспрессированы молекулы CD13, обладающие сродством к капсидной оболочке ряда вирусов. Для моноцитов свойственна экспрессия лектиновых рецепторов, распознающих свободные углеводные остатки (глюкозы, маннозы, галактозы). Наиболее важным среди лектиновых рецепторов является маннозосвязывающий рецептор – CD206.

Другая группа рецепторов – Fc-рецептор (Fc-R), распознающий Fc-участок молекулы иммуноглобулина, что облегчает фагоцитоз опсонизированных антителами клеток. Так же на поверхности моноцитов и макрофагов присутствуют рецепторы к компонентам комплимента (C-R).

Функционально важную роль играют молекулы МНС (Major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости), которые обуславливают презентацию антигенных пептидов для антигенраспознающего рецептора Т-клетки. МНС класса I (молекула главного комплекса гистосовместимости I класса), присутствует на всех ядродержащих клетках, в то время как МНС класса II (молекула главного комплекса гистосовместимости II класса) – только у антигенпрезентирующих клеток (АПК) [74]. В ходе презентации молекула МНС распознается TCR, CD8- и CD4-рецепторами, обладающими сродством к МНС класса I и МНС класса II соответственно [34, 57, 148]. Следует отметить, что репертуар мембранных молекул псевдоэозинофилов, эозинофилов и моноцитов/макрофагов во многом схож,

хотя молекулы на поверхности моноцитов и макрофагов обладают большим разнообразием. В отличие от других клеток зрелые моноциты способны делиться, находясь в очаге воспаления [4, 39].

Лимфоциты – самая распространенная форма лейкоцитов в крови птиц. И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев (1980-1983) выделяли три формы лимфоцитов: большие, средние и малые – в зависимости от степени созревания клетки.

Электронная и световая микроскопия показали наличие непостоянных псевдоподий, благодаря которым лимфоциты обладают значительной подвижностью. Они способны проникать через сосудистую стенку и между клетками тканей, где осуществляют свои функции, проникая не только в соединительную ткань, но и между клетками эпителия [27].

Лимфоциты в кровяном русле находятся очень короткое время – от 2 до 6 часов. Образуются лимфоциты в костном мозге, селезенке, лимфоидных образованиях желудочно-кишечного тракта (пищеводная миндалина, миндалина слепой кишки), тимусе и Фабрициевой сумке. Они участвуют в реакциях специфического иммунитета, в местных аллергических реакциях и реакциях отторжения, являются предшественниками антителообразующих клеток, носителями иммунологической памяти [32, 184].

Такое многообразие выполняемых функций обусловлено тем, что зрелые лимфоциты являются неоднородной, хотя и морфологически схожей группой. Различия между ними определяются иммунологическими и радиоизотопными методами. На этом основании среди них выделяют тимусзависимые (Т-лимфоциты) и бурсозависимые (В-лимфоциты).

Т-клетки имеют на поверхности своей мембраны характерный маркер, которым служит молекула TCR (T-cell receptor) – антигенраспознающий рецептор. Среди Т-клеток различают 2 типа рецепторов в зависимости от их полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями. Встречаются TCR-1 ($\alpha\beta$ -цепи) и TCR-2 ($\gamma\delta$ -цепи). Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности рецептор TCR-1, подавляющее большинство – порядка 95%. Оба рецептора ассоциированы с CD3 полипептидами, формируя TCR-CD3-рецептор.

Наличие $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов обнаружено и у птиц, на что указывают работы N.J. Davidson и R.L. Boyd (1992). Особенность этих Т-клеток состоит в том, что они способны распознавать непептидные антигены (например, липиды) независимо от класса МНС. Данная субпопуляция усиливает иммунный ответ, вырабатывая хемокины, а также обладает высокой и продолжительной пролиферативной способностью [190].

TCR-1 формирует две субпопуляции: CD4- (хелперы) и CD8-клетки (цитотоксические), распознающие пептиды антигена в ассоциации с молекулами МНС. CD4-клетки, в зависимости от вырабатываемых цитокинов, дифференцируются в Th-1 и Th-2 хелперы. Субпопуляция Th-1 секретирует ИЛ-2, в то время как Th-2 – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10. Клетки Th-1 активируют цитотоксические Т-клетки и участвуют в местных воспалительных реакциях. То есть, данная стимуляция важна при внутриклеточной инфекции (вирусной, бактериальной или паразитарной). Th-2-клетки эффективны при стимуляции В-клеток для пролиферации и образования антител. В случае необходимости супрессии иммунного ответа, Т-лимфоциты могут оказывать прямое цитотоксическое действие на АПК и выделять супрессивные цитотоксины [115, 119].

Кроме того, среди Т-лимфоцитов существует субпопуляция Т-клеток памяти – долгоживущих лимфоцитов, премированных антигеном, но не достигших окончательной стадии дифференцировки. Формируются Т-клетки памяти в Т-зависимых зонах лимфоидных органов из CD4- и CD8-клеток.

Среди лимфоцитов выделяют еще одну популяцию клеток, получившую название натуральных (естественных) киллеров или НК-клеток (Natural Killer). Главное отличие НК-клеток от других лимфоцитов — отсутствие антигенспецифического рецептора.

В организме НК-клетки выполняют две основные функции. Первая – это лизис опухолей и инфицированных вирусами клеток, что осуществляется благодаря наличию цитоплазматических азурофильных гранул (разновидность лизосом). Гранулолизины, гранзимы и перфорин — основные компоненты

гранул НК-клеток, связанные с их цитолитической функцией. Вторая функция — регуляция врожденного и адаптивного иммунного ответа за счет секреции хемокинов и цитокинов [185].

Известны две основные субпопуляции В-клеток: В2-клетки («обычные» В-клетки), которые локализуются в селезенке, лимфатических узлах, Фабрициевой сумке и составляют большинство циркулирующих В-лимфоцитов, играя основную роль в гуморальном иммунном ответе, и В1-лимфоциты, сосредоточенные в брюшной и плевральной серозных полостях. Экспрессия на поверхности этих клеток костимулирующих молекул CD80 и CD86 обеспечивает способность В1-лимфоцитов выполнять функции АПК. В1-клетки могут дифференцироваться в антителообразующие клетки без стимуляции антигеном. При этом они преимущественно секретируют IgM. В-1-лимфоциты ориентированы на распознавание соединений клеточных стенок бактерий и способны синтезировать антитела к чужеродным полисахаридам без участия Т-клеток. Таким образом, В-1-лимфоциты являются противобактериальным фактором первой линии защиты организма [158].

В-лимфоциты продуцируют антитела, обеспечивая специфический гуморальный иммунный ответ. Антитела взаимодействуют с чужеродными агентами, активируют систему комплемента и стимулируют фагоцитарную активность фагоцитов посредством взаимодействия с их мембранными рецепторами [137].

В-клетки экспрессируют на своей поверхности мембранный иммуноглобулин (IgM-мономер) и мембранные маркеры, которые необходимы для формирования В-клеточного рецептора (BCR – B-cell reseptor). В состав BCR входит две пары молекул — гетеродимеры, содержащие полипептидные цепи $Ig\alpha$ (CD79a) и $Ig\beta$ (CD79b), которые встроены в мембрану В-лимфоцита. Они участвуют в передаче сигнала в процессе распознавания антигена. На мембране В-клеток находятся молекулы, которые формируют корецепторный комплекс, принимающий участие в регуляции развития В-лимфоцитов, их активации и дифференцировки.

При воздействии Т-хелперных факторов В-клетки трансформируются в плазмоциты, секретирующие иммуноглобулины (IgY, IgM, IgA), формируя гуморальный иммунный ответ и В-клетки памяти. Идентификация В-клеток памяти осуществляется по маркеру CD27. Взаимодействие CD27 с его лигандом CD70 на Т-клетках является одним из условий дифференцировки В-клеток в плазматические клетки [47, 215, 219].

Последующая дифференцировка В-клетки заключается в формировании плазмочита, далее - плазматической клетки, способной секретировать основной продукт гуморального ответа – иммуноглобулины [37, 38].

Плазматические клетки имеют большой объем цитоплазмы и значительное развитие цитоплазматического аппарата, обеспечивающего синтез белка. На пролиферацию плазматических клеток влияет ИЛ-6. Он продуцируется эндотелиальными клетками, моноцитами, макрофагами, фибробластами, Т-лимфоцитами, гепатоцитами, кератиноцитами и другими клетками. Продолжительность жизни плазматических клеток составляет несколько суток, далее они подвергаются апоптозу.

Зрелые плазматические клетки утрачивают способность реагировать на внешние стимулы, что обусловлено потерей характерных мембранных иммуноглобулинов и других компонентов BCR, MHC и костимулирующих молекул. Основным итогом дифференцировки В-клеток при формировании плазмочита состоит в переключении генов синтеза белков с мембранных молекул на растворимые формы иммуноглобулинов – антитела [69].

Синтез иммуноглобулинов происходит в полисомах, далее молекулы переходят в ЭПС, содержащую комплекс Гольджи, где подвергаются гликолизированию, а затем – выводятся из клетки [1, 148].

Иммуноглобулины представляют собой гликопротеины, которые находятся в крови, лимфе и кровоснабжаемых тканях всех позвоночных. Они состоят из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых (H) и двух легких (L), которые формируют мономерное звено (H₂L₂). Каждый класс

иммуноглобулинов может быть представлен в виде мембраносвязанного рецептора для антигена или растворимой секретируемой формы [57].

С помощью иммуноцитохимических и генетических методов были определены три класса птичьих иммуноглобулинов как гомологи IgM, IgA и IgG млекопитающих [103].

Ig G выделяют из сыворотки крови птицы и яичного желтка, Ig M – из сыворотки и яичного белка, а Ig A – из желчи, секретов слизистых оболочек и яичного белка [19,18, 32, 42, 181, 199]. Н и L цепи образуются из повторяющихся сегментов, каждый из которых состоит из 115 аминокислот. Они содержат цистеиновые и триптофановые аминокислотные остатки и дисульфидный мостик внутри домена, который придает функционально важную третичную структуру молекуле.

Домены в концевой части сильно варьируют (V-домены), а формирование пар домена VH и VL создает антигенсвязывающий участок, который определяет специфику антитела. Ag-связывающая область вмещает эпитоп или, так называемый, Fab-фрагмент (fragment antigen binding), состоящий из 6-9 аминокислот и углеводов. Поскольку пары Н и L цепей, соединенные дисульфидными связями, образуют основной мономерный блок, формируются два Ag-участка связывания.

Незначительная генетическая изменчивость наблюдается в противоположной области молекулы, и эти участки называют константными доменами (СН или CL) – Fc-фрагменты. Цепи Н обычно имеют 2-4 домена константной области и один домен L цепи. Биологические свойства зависят от С доменов. Они обеспечивают мембранный транспорт, связывание комплемента и опсонизацию [120, 198].

Птичий IgM структурно и функционально гомологичен иммуноглобулину млекопитающих. Это преобладающий В-клеточный антигенный рецептор, который в процессе эмбрионального развития является первым изотипом экспрессии. Молекулярная масса данного иммуноглобулина была определена в диапазоне 823-954 кДа со средним показателем 890 кДа [82]. Однако Н цепи

имеют молекулярный вес около 70 кДа, а L цепи – 22 кДа [180], это указывает на то, что IgM птиц, скорее всего, имеет тетраидную структуру $(H_2L_2)_4$, а не пентамерную $(H_2L_2)_5$, или, возможно, это смесь из двух конфигураций. В небольших количествах мономерная форма IgM содержится в нормальной сыворотке крови кур.

Молекулярный вес IgM уток – 800 кДа, H цепь – 86 кДа и L цепь – 22 кДа, это также свидетельствует о тетрамерной структуре молекулы.

IgM является преобладающим изотипом, продуцируемым после первичного контакта с новым антигеном. Содержание IgM в сыворотке крови птиц составляет 0,7-2,0 мг/мл [6, 32, 211].

В 1893 году Klemperer F. Впервые описал эксперимент, в котором он показал, что иммунизация кур вызывает передачу специфических антител в яичный желток. Он отметил, что концентрация антител была одинаковой в желтке и крови кур, хотя ранее сообщалось, что в желтке концентрация иммуноглобулинов выше. Тогда молекула еще не получила своего названия «IgY». Спустя более, чем 70 лет этот термин был введен G. A. Leslie и L. W. Clem (1969). Ими было доказано, что птичий иммуноглобулин имеет достаточно отличий от аналога млекопитающих – IgG. В настоящее время известно, что IgY является основным иммуноглобулином сыворотки крови птиц, рептилий, амфибий и двоякодышащих.

Филогенетические исследования показали, что IgY имеет сходство как с IgG, так и с IgE млекопитающих и, вероятно, в равной степени [225]. Этот изотип является доминирующей формой в сыворотке крови, продуцируется после IgM при первичном контакте с антигеном и является главным изотипом во вторичном иммунном ответе.

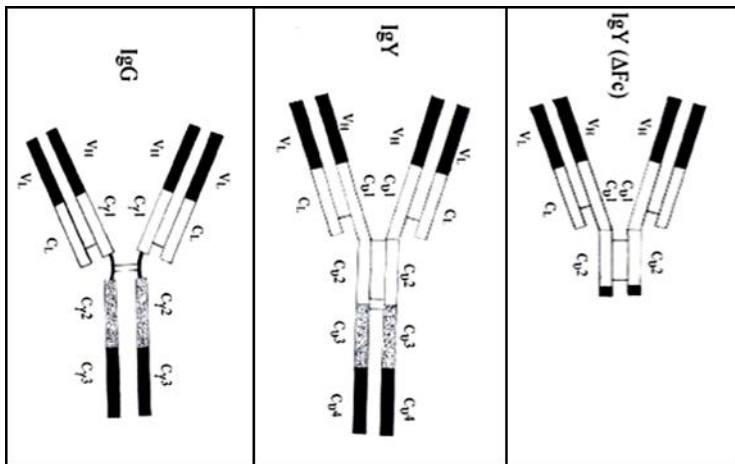


Рис. 1.

Строение молекул IgG млекопитающих, IgY кур и IgY(ΔFc) водоплавающей птицы (Источник: <http://gallusimmunotec.h.com/about-igy/structure-function-and-physicochemical-properties-of-igy>).

Основное различие между IgY птиц и IgG млекопитающих заключается в длине цепи H молекулы иммуноглобулина (рис. 1). Молекула IgY состоит из пяти доменов (V, C1-C4) и не обладает шарнирной областью, которая у млекопитающих имеет значительное число остатков пролина и цистеина, и определяет ее гибкость, необходимую для взаимодействия с антигеном [91].

Молекула иммуноглобулина птиц вместо шарнирной области имеет участок “переключения” с ограниченной гибкостью в области C1-C2 и C3-C4 доменов. «Ограниченная гибкость» молекулы IgY объясняет некоторые уникальные биохимические свойства, такие как, невозможность ее осаждения в физиологических концентрациях соли [207].

IgY в сыворотке крови присутствует в виде мономера и имеет молекулярный вес – 165-206 кДа, хотя были обнаружены и полимерные формы в сыворотке суточных цыплят [222]. При изучении структуры молекулы IgY многих видов птиц выделяют особенности в характере разрушения молекулы при действии протеолитических ферментов. Под воздействием протеазы папаина молекула распадается на Fab-фрагменты и диализированные пептиды, вместо двух Fab-фрагментов и Fc-фрагмента, получаемых при влиянии папаина на IgG млекопитающих. По данным литературы гомология иммуноглобулина Y с IgG млекопитающих составляет 30-35% [211].

Согласно данным литературы [197] водоплавающие птицы (утки, гуси) имеют две “изоформы” IgY. Большая – структурно аналогична куриному иммуноглобулину, и меньшая изоформа – иногда ее обозначают как ΔF – имеет

только три домена в Н цепи (V, C1 и C2) и напоминает по структуре и в антигенном отношении Fab-фрагмент IgY (рис. 1). Эволюционное происхождение усеченной формы IgY неизвестно. Не установлено также, встречается ли она у всех водоплавающих птиц или только у уток и гусей. Тем не менее, считается, что усеченная форма иммуноглобулина присуща всем гусеобразным. Усеченную форму IgY обнаруживают у некоторых видов черепах. Другие виды (двоякодышащие рыбы, акулы-няньки и скаты) также имеют усеченную форму иммуноглобулина, но это не гомолог IgY [197].

Количественное содержание IgY в сыворотке крови кур, согласно данным литературы, отличается, например, L. W. Clem (1973) приводит данные в 5,0 мг/мл, И.А. Болотников (1982, 1983) – 2,2-2,6 мг/мл, М.П. Бабина (1996) – 5,1-6,0 мг/мл, в работах О.А. Верховского и др. (2007) 4-5 мг/мл, F. Davison (2008) – 1-5 мг/мл. Вероятно, различия в показателях содержания IgY сыворотки крови обусловлены разнообразием методов исследования, возрастом птицы, кроссом и сезонами года.

Преобладающей формой секретируемых антител является IgA. У млекопитающих IgA является димером, соединенным J цепью, которая вступает во взаимодействие с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток. Этот рецептор интегрируется в IgA молекуле как секреторный компонент, и IgA-комплекс становится способным транспортироваться через эпителиальные клетки и выделяться в просвет органа [194]. Секреторный компонент повышает адгезию IgA к поверхности эпителиальных клеток и защищает их от действия протеолитических ферментов в пределах клетки.

Проведенные исследования подтвердили наличие общих структурных и функциональных особенностей молекул IgA млекопитающих и птиц. Особенно их схожесть характерна для IgA желчи. Кроме того, расшифровка аминокислотной последовательности м-ДНК IgA млекопитающих и птиц подтверждает общую гомологию [213]. Содержание IgA в сыворотке крови кур мало и составляет в среднем 0,5-1,0 мг/мл, по некоторым данным до 3,0 мг/мл [211].

Общепринято мнение об отсутствии гомолога IgD на В-клетках птиц, так как достоверных данных по этому вопросу нет. Также нет описания гомолога изоформа IgE птиц. Из литературных источников следует, что IgY может sensibilizировать ткани, хотя параметры его чувствительности и активации отличаются от сывороточных антител млекопитающих. Вероятно, что функции IgE выполняются частично IgY [19].

Иммунная система только что вылупившегося цыпленка лишь частично является зрелой и, следовательно, не способна обеспечить защиту от патогенов. Врожденные иммунные механизмы не полностью функциональны у новорожденных цыплят, а адаптивные иммунные реакции развиваются только в течение первых нескольких недель после вылупления [192]. Эмбрионы птиц и новорожденные цыплята защищены от бактерий, бактериальных токсинов, паразитов и вирусов материнскими антителами, передаваемыми через желток яйца. Известно, что материнские антитела подвергаются элиминации в организме цыплят. Согласно литературным источникам, период полураспада материнских антител составляет 5 дней, но эти данные могут варьировать в зависимости от иммунного статуса родительского стада [6,19]. Если его уровень достаточно высок, то разрушение материнских антител может продолжаться вплоть до месяца [8,188].

Передача материнских антител помогает защитить потомство, пока адаптивные иммунные реакции не приобретут полную силу. Это явление впервые было описано Феликсом Клемперером (1893), который заметил, что у птиц, иммунитет против бактерий столбняка передается через яичный желток. Позже выступили J. Brierley и W.A. Hemmings (1956), которые продемонстрировали и подтвердили перенос антител из желточного мешка в кровотока эмбриона и вылупившегося птенца. Эти и другие исследования заложили основу для концепции накопления материнских антител в яйце, которые затем поглощаются развивающимся эмбрионом. Эта особенность была использована при вакцинации родительского стада в птицеводстве.

Несушка передает материнские антитела в яйцо путем их перемещения в желток и белок. IgY секретируется яичником в процессе развития яичных фолликулов. Передача IgY в фолликулы регулируется фолликулярным эпителием, который проходит ряд морфологических изменений в процессе своего развития. При увеличении фолликула в размере эпителий становится более тонким и рыхлым, вследствие чего, иммуноглобулины свободно переходят в фолликул.

Перемещение IgY через фолликулярный эпителий достигает максимума за 3–4 дня до начала периода овуляции [196].

Количество IgY, переданного через фолликулярный эпителий в желток, является пропорциональным концентрации IgY в сыворотке, что поддерживается активным транспортным механизмом. Концентрация специфических IgY антител, обнаруженных в снесенном яйце иммунизированной курицы, имеет отличие по сравнению с концентрацией сывороточных специфических антител несушки с задержкой в 5-6 дней. Это объясняется временем, необходимым для развития фолликулов и снесением яиц. Концентрация IgY желтка по данным разных авторов находится в диапазоне от 10 до 25 мг/мл [167, 173, 188].

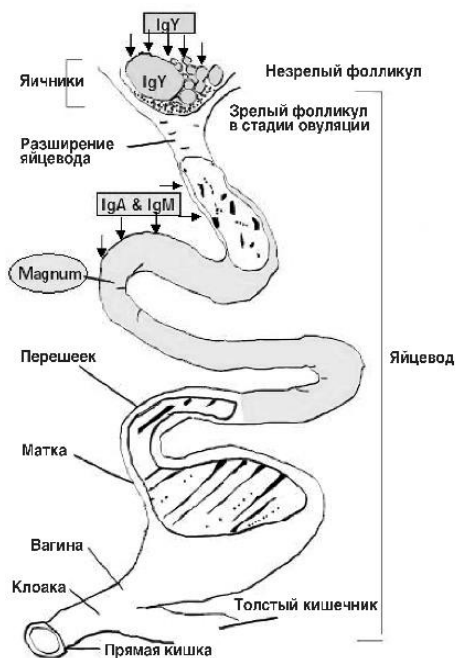


Рис.2. Передача IgY, IgM и IgA на разных этапах формирования яйца в яйцеводе несушки [Источник: Соарес Р. Пассивный иммунитет: часть 1./ Соарес Р. // АВ ОВО-. Минск.-2010 г.-С.1-5.].

Для передачи материнских антител требуется поглощение IgY через мембрану желточного мешка и поступление его в кровоток эмбриона (рис. 2).

Этот процесс переноса начинается довольно медленно – с 7 дня эмбрионального развития и резко увеличивается за 3 дня до вылупления. Существует предположение, что это опосредованно через Fc-рецептор IgY кур, кроме того, связывание IgY желточного мешка с мембраной зависит от pH среды.

Десятилетие назад этот рецептор был клонирован и назван FcRY. FcRY – функциональный гомолог FcRn млекопитающих (главного комплекса гистосовместимости), он передает IgY в желток, представляет собой отдельный класс Fc-рецепторов, близкий маннозным рецепторам млекопитающих и ответственный за кишечное и плацентарное поглощение IgG у млекопитающих [168, 227].

Общее количество IgY, поглощенное эмбрионом, составляет только 10% (20-30% - по данным Р. Соареса, 2010), от количества, поступившего в желток. Судьба оставшейся части иммуноглобулинов не известна, но есть мнение, что IgY переваривается протеолитическими ферментами вместе с остаточным содержанием желтка. В то время как IgY обнаруживается только в желтке яйца, а IgM и IgA находятся в белке, незначительное количество (следы) этих двух изоформ могут быть обнаружены и в желтке, достигая концентраций 0,15 и 0,7 мг/мл для IgM и IgA соответственно [196].

Некоторые виды птиц имеют дополнительные возможности, для того чтобы защитить свое потомство. Например, голуби, пингвины и большие фламинго производят специальный секрет в зобе, которым питают птенцов. Это «молоко» богато жирами и белками, хотя в отличие от молока млекопитающих оно не содержит лактозу, богато IgA (около 1,5 мг/мл) и содержит немного IgY. Поглощение IgA «молока» приводит к накоплению иммуноглобулина в кишечном тракте, что обеспечивает защиту против патогенных микроорганизмов кишечника [186]. IgA и IgM передаются вследствие абсорбции белка через пищеварительный тракт эмбриона. Их основная функция у суточных цыплят — защита желудочно-кишечного тракта и дополнительный источник протеина. Количество IgA и IgM, которое передается эмбриону, составляет менее 1% от их концентрации в плазме крови несушки [131].

2.3. Основные принципы функционирования иммунной системы птиц

Свои собственные защитные механизмы у птенца начинают формироваться в процессе эмбриональной жизни, но иммунокомпетенция появляется только через несколько недель после вылупления. С иммунологической точки зрения период после вылупления имеет решающее значение, так как цыпленок подвергается резкому воздействию антигенов окружающей среды, и у него нет возможности получить дополнительно антитела с молозивом матери, как у млекопитающих [5, 125]. Иммунизация в первый день жизни не активирует выработку антител, возможно, вследствие неполной структурной организации вторичных лимфоидных органов. Однако существуют данные, что спустя неделю, после иммунизации бычьим сывороточным альбумином, развивается гуморальный ответ с продукцией специфических антител [201].

Система иммунитета птиц, также как и у млекопитающих, имеет две основные ветви: врожденный иммунитет (естественный, неспецифический) и адаптивный иммунитет (приобретенный, специфический). Основой врожденного иммунитета служит активация гуморальных и клеточных факторов «первой линии иммунной защиты». При этом происходит вовлечение в развитие ответной реакции на антиген не только клеток иммунной системы, но и других типов клеток, например эндотелиальных, эпителиальных клеток слизистых оболочек дыхательных путей и пищеварительного тракта, кожи, печени [121, 143].

Повреждение кожных барьеров и слизистых оболочек часто может служить «воротами инфекции». Этому способствует расклев (каннибализм) птиц, эктопаразиты (клещи, гельминты), травмы. При этом не стоит оставлять без внимания естественные способы защиты на пути внедрения антигена: нормальную микрофлору и жирные кислоты кожных покровов, кислую и щелочную среду желудочно-кишечного тракта, мерцательный эпителий дыхательных путей и другое [74, 126, 181].

Само проникновение чужеродного вещества в макроорганизм способствует проявлению местной сосудистой реакции. Изменяется микроциркуляция крови, повышается проницаемость сосудистых стенок и возникает миграция лейкоцитов к очагу воспаления. Патогены и выделяемые ими продукты (продукты обмена веществ, экзотоксины) сталкиваются с псевдоэозинофилами, эозинофилами крови, моноцитами, тромбоцитами и NK-клетками, активируя их. Следует отметить, что на поверхности фагоцитирующих клеток экспрессированы Toll-подобные рецепторы, позволяющие им распознавать основные группы патогенов. Фагоцитарные клетки крови поглощают чужеродный агент (микроорганизм, белок, углевод), формируя фагосому, она сливается с лизосомой (вакуоль с набором активных ферментов), в результате чего формируется фаголизосома, и микроорганизм может погибнуть под воздействием ферментов. NK-клетки выполняют цитотоксические функции преимущественно в отношении опухолевых клеток и клеток, зараженных вирусами, а также они осуществляют цитокинпродуцирующие функции [37, 38, 162, 169].

Одним из основных гуморальных факторов врожденного иммунитета являются цитокины, высвобождаемые поврежденными или инфицированными клетками. К наиболее распространенным цитокинам относятся следующие интерлейкины: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-18. Они отвечают за взаимодействие между лейкоцитами в процессе иммунного ответа. Хемокины, стимулирующие хемотаксис (движение фагоцита к мишени), и интерфероны, обладающие противовирусными свойствами, обладают способностью угнетать синтез чужеродного белка в клетках макроорганизма [200].

Еще одним важным звеном гуморального врожденного и приобретенного иммунитета является система комплемента - комплекс белков, присутствующих в сыворотке крови. Комплемент включает в себя более 20 белков и несколько факторов. Его компоненты имеют обозначение «С» с порядковым номером 1-9 (основные белки). После активации, система комплемента представляет собой

каскад последовательных реакций. Их запуск может идти по классическому пути (для этого необходимо взаимодействие антигена и антитела), альтернативному и лектиновому путям. В результате формируется финальное звено активации комплемента - мембраноатакующий комплекс (МАК). Это индуцирует появление пор в мембране патогенной клетки, вследствие чего межклеточная жидкость свободно проникает внутрь, вызывая осмотический лизис клетки [81, 90, 138]. Альтернативный путь активации системы комплемента срабатывает в ответ на появление полисахаридов бактерий, внедрение вирусов, паразитов и на наличие опухолевых клеток [51].

Компоненты комплемента наряду с антителами могут выступать и в качестве опсопинов, прикрепляясь к наружным стенкам корпускулярных антигенов, что делает патогены более восприимчивыми к действию фагоцитов. Это связано с тем, что фагоцитарные клетки имеют рецепторы к белкам комплемента. Антитела, прикрепленные к антигену своим Fab-фрагментом, вступают во взаимодействие с фагоцитами посредством Fc-участка [33, 140].

Следует также отметить такой гуморальный фактор иммунной защиты как лизоцим – фермент класса гидролаз, способный разрушать пептидогликан клеточной стенки бактерий. Лизоцим присутствует в организме млекопитающих, птиц, насекомых и микроорганизмов. В 1909 году П.Л. Лашенко впервые обнаружил его в яичном белке. Лизоцим присутствует как в сыворотке крови, слюне, слезном секрете, так и в составе гранул фагоцитов крови, и является неспецифическим фактором иммунного ответа [224].

В тех случаях, когда реакции врожденного иммунитета не приводят к полной элиминации инфекции, запускается адаптивный иммунный ответ, ключевым событием которого является активация антигеном специфических клонов лимфоцитов. Дендритные клетки и макрофаги поглощают патогены (их фрагменты) и транспортируют их в периферические органы иммунной системы – эти события иллюстрируют связь между врожденным и адаптивным иммунитетом. Главным преимуществом адаптивного иммунитета является

формирование иммунологической памяти, резко повышающей эффективность иммунной защиты при повторной встрече с антигеном [158].

После введения растворимого антигенного белка у кур были описаны реакции гиперчувствительности немедленного типа (обусловлены гуморальными иммунными механизмами) и гиперчувствительности замедленного типа (обусловлены клеточным иммунитетом). Установлено, что эти реакции зависят от возраста птицы. Так, в 6-12 недель реакции более выражены, чем в 3 недели. В соответствии с этим, проявление реакций гиперчувствительности может быть летальными для взрослых птиц и менее серьезным для молодых, что возможно объясняется блокированием проявления функций антигистаминных веществ, продуцируемых тучными клетками [228].

Клеточные и гуморальные реакции организма формируют адаптивный иммунный ответ. Клеточный приобретенный иммунный ответ развивается при проникновении в организм внутриклеточных антигенов (вирусов, паразитов), когда те находятся вне досягаемости для гуморальных факторов (антител).

В клеточном иммунном ответе условно можно выделить цитотоксические и воспалительные реакции [81, 160]. Цитотоксический адаптивный иммунный ответ развивается при презентации CD8-клеткам пептидов антигена в ассоциации с молекулой МНС класса I АПК. Переключение классов молекул МНС с класса II на класс I возможно благодаря «перекрестной» презентации в АПК. Активированные Т-хелперы, в свою очередь, продуцируют ИЛ-2, стимулирующий созревание цитотоксических клеток. При этом CD8-клетки приобретают способность взаимодействовать непосредственно с мембраной инфицированной клетки-мишени, вызывая ее гибель под действием перфорина (белка, образующего «поры» в мембране), гранзимов и интерферона [95, 148, 160].

Воспалительные реакции клеточного иммунного ответа защищают от внутриклеточных форм инфекции. Он индуцируется Т-хелперами (CD4), которые воспринимают сигнал от АПК своим TCR-CD3 рецептором. Это вызывает активацию интегринов, увеличивая прочность связи между клетками.

CD28 Т-хелпера вступает во взаимосвязь с CD80 и CD86 (В-7) АПК, что стимулирует Т-хелперы продуцировать интерлейкины и дифференцироваться в Th-1 и Th-2. Th-1, выходя в кровеносное русло, специфически взаимодействует с макрофагами, содержащими на своей поверхности пептидные фрагменты антигена в ассоциации с молекулой МНС класса I. Это приводит к активации макрофагов, которые начинают секретировать весь спектр своих провоспалительных и бактерицидных продуктов [158].

Активированные специфические Th-2 вступают во взаимодействие с В-клетками, на поверхности которых в ассоциации с молекулой МНС класса II представлены пептиды антигена. Т-клеточный рецептор Т-хелпера распознает этот комплекс, и через CD28 Th-2 и В-7 В-клетки происходит активация Th-2. Т-хелпер экспрессирует CD154, а В-клетка - CD40, что приводит к появлению рецепторов на поверхности В-лимфоцита для цитокинов. ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-5 активируют В-клетку для пролиферации.

В паракортикальных зонах (Т-зонах) периферических лимфоидных органов (селезенки, эзофагальной и слепкишечных миндалин, дивертикула Меккеля) информация об антигенах передается Т-клеткам. В-лимфоциты, связавшие антиген и получившие дополнительный сигнал от Th-2, мигрируют в зародышевый (герминативный) центр, где превращаются в плазматические клетки [132, 158, 161].

Согласно исследованиям Н. Arakawa et al. (1996) у цыплят были описаны два типа герминативных центров (ГЦ): полностью и частично заключенные в капсулу. Предположительно, это различные стадии развития ГЦ. Зрелый герминативный центр окружен капсулой из соединительной ткани и почти лишен кровеносных сосудов. Они расположены близко к зонам Т-клеток, смежным с артериями. Зрелый ГЦ состоит из пролиферирующих В-клеток и небольшого количества Т-клеток (CD4-, CD8-лимфоцитов) [59, 163].

Как и у млекопитающих, после антигенной стимуляции и инициации синтеза специфического IgM, следует возрастание количества синтезированного иммуноглобулина IgY. Переключение изотипов в ходе иммунного ответа

происходит в зародышевых центрах, где также развиваются В-клетки памяти. Зародышевые центры являются участками для гипермутаций — процесса, необходимого для усиления аффинности (прочности взаимосвязи с антигеном) антител, участвующих во вторичном иммунном ответе.

Исследования разнообразия антител у кур выявили некоторые особенности в соматической генной конверсии, благодаря которой достигается значительный репертуар иммуноглобулинов. В последовательности V-гена цыпленка встречаются соматические мутации с 25-ю псевдогенами. Показано, что почти все соматические мутации могут возникать в результате генной конверсии на основе формирования несовершенных гетеродуплексов из нитей ДНК гена и псевдогена с последующей коррекцией несовпадающих оснований. Длины участков конверсии варьируют от нескольких нуклеотидов до нескольких десятков нуклеотидов [163].

IgM является преобладающим изотипом первичного гуморального ответа птиц, в то время как IgY — основной иммуноглобулин вторичного иммунного ответа. Защитный иммунитет, генерируемый в ответ на патогены или вакцины, у цыплят обладает выраженной способностью продуцировать антитела. Однако существуют значительные отличия в способности разных инбредных линий в производстве иммуноглобулинов и их реакции на антиген. Исследования синтеза антител и их функций у других видов птиц менее фундаментальны, поэтому вероятны различия в продукции антител, как в первичном, так и во вторичном иммунном ответе [198].

Детальное изучение иммунных реакций на комплекс антигенов, таких как вакцины, дают мало информации о тонкостях гуморального ответа, так как создается сложность в оценке вклада каждого изотипа иммуноглобулинов в ходе первичного или вторичного ответов иммунной системы. При этом гуморальный ответ на определенные антигены, такие как очищенные протеины или эритроциты, может быть изучен более полно.

У млекопитающих при первичном иммунном ответе значительная доля синтезированных антител приходится на IgM (процесс происходит на 2-е сутки,

максимума достигают - на 4-е), позже появляются IgG-антителообразующие клетки, число которых достигает максимума на 7-е сутки. Сывороточные антитела IgM появляются на 5-6 сутки, IgG - 10-12-е сутки. Вторичный иммунный ответ развивается при повторном контакте с антигеном и опосредован клетками памяти. Характеризуется интенсивной пролиферацией В-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов. IgG, появляется быстрее и в более высоком титре, чем при первичном иммунном ответе [119, 132, 160].

Секреторный IgA обеспечивает первую линию гуморальной защиты от многих болезнетворных микроорганизмов [72]. У кур лимфоидная ткань кишечника и бронхов, обеспечивающая важную энтеральную и мукозальную защиту в отсутствие материнских антител, функционально зрелая уже к 4-у дню после вылупления, но способность к секреции IgA против патогенов развивается только к концу второй недели [3].

Антиген, попадая в структурные лимфоидные образования слизистых оболочек, распознается В-лимфоцитом (экспрессирующим преимущественно IgA). В результате взаимодействия с Th-2 (которые здесь формируются), при участии цитокинов, В-лимфоциты поступают в циркуляцию и переносятся в региональный лимфоидный периферический орган, где испытывают дополнительное стимулирующее действие со стороны Th-2 и снова оказываются в рециркуляции (через кровотоки). В собственной пластинке слизистой оболочки В-клетки дозревают до стадии плазмоцитов, секретируют IgA в виде мономеров и димеров. Димеры взаимодействуют с рецепторами эпителиальных клеток и проникают в них. Здесь рецептор подвергается частичному разрушению, в результате которого остается секреторный компонент. В таком виде секреторный IgA выходит в просвет органа, где взаимодействует с антигенами.

Механизм иммунной защиты от инфекции зависит главным образом от локализации патогена в организме. Внеклеточные формы стимулируют такие эффекторные механизмы, как фагоцитоз, антитела и комплемент, при этом в защиту включаются преимущественно Th-2 хелперы. При локализации патогена на слизистых оболочках пищеварительного тракта, дыхательной и половой

систем в защите участвуют В-клетки, ДК и Th-2 хелперы, обеспечивая выработку IgA, интерлейкинов, активацию эозинофилов и макрофагов. В случае внутриклеточной инфекции (в ядре, цитоплазме) развивается преимущественно клеточный иммунный ответ с вовлечением Th-1 хелперов и NK-клеток [38, 148, 158].

2.4. Антигены и вакцины

Иммуногенными свойствами обладает широкий круг природных высокомолекулярных соединений и, в первую очередь белки, полисахариды и их комплексы. Существует несколько критериев, по которым классифицируются антигены: происхождение, химическая природа, чужеродность, характер иммунного ответа. По типу иммуногенеза и в зависимости от молекулярной структуры эпитопов выделяют тимусзависимые (Т-зависимые) и тимуснезависимые (Т-независимые) антигены [110]. Значительная часть природных антигенов - Т-зависимые, то есть для полноценного развития специфического иммунного ответа необходимо поступление дополнительного сигнала от Т-клеток (CD4+). К тимусзависимым антигенам относятся сывороточные белки, бактериальные токсины, антигены чужеродных эритроцитов, вирусы.

Подобные представления сложились на основании опытов *in vivo* и *in vitro*, где было отмечено, что тимэктомированные мыши либо вообще не отвечают на антиген продукцией IgG, либо такой ответ крайне слабый. Трансплантация мышам тимуса восстанавливает специфический ответ. В опытах *in vitro* было показано, что чистая популяция В-клеток отвечает на антиген только пролиферацией, и при этом она не способна пройти весь путь развития до зрелых, продуцирующих антитела плазмочитов [57, 158].

Антигены, способные инициировать иммунный ответ при отсутствии Т-клеток получили название - Т-независимые. В основном это полисахариды и липополисахариды (обладают митогенной активностью), которые характеризуются многократным повторением структурно идентичных

В-эпитопов. Многоточечное взаимодействие с В-клеткой обеспечивает полноценное развитие активированного В-лимфоцита до зрелого плазмоцита, продуцирующего антитела [110].

В зависимости от способа активации В-клеток тимуснезависимые антигены встречаются двух типов: ТН-1 антигены и ТН-2 антигены. ТН-1 антигены (липополисахариды), имеющие на своей поверхности крупные молекулы с повторяющимися детерминантами, при высокой концентрации способны к поликлональной активации значительной части В-лимфоцитов без помощи Т-клеток. В данном случае антигенная специфичность рецепторов роли не играет. При низкой концентрации подобных антигенов, В-лимфоциты, у которых Ig-рецепторы специфичны к нему, фокусируют их на своей поверхности.

ТН-1 за счет митогенной активности своих детерминант стимулируют пролиферацию В-клеток, взаимодействуя с другими поверхностными структурами лимфоцита [58,153].

ТН-2 антигены (например, поливинилпирролидон – 750 кДа) связываются со специфическими В-лимфоцитами посредством перекрестного взаимодействия антигенных детерминант с Ig-рецепторами клеток. Они характеризуются меньшим количеством повторяющихся эпитопов на своей поверхности. Для развития иммунного ответа на них необходима опосредованная Т-клеточная помощь. Тимуснезависимые антигены вызывают синтез преимущественно IgM, а иммунный ответ на них практически не сопровождается формированием клеток памяти [38, 120].

Т-клеточные рецепторы способны распознавать антиген только после того, как АПК подвергнет его расщеплению на короткие пептидные фрагменты. В зависимости от характера структуры антигена его презентация проходит эндогенным или экзогенным путем. Экзогенный путь характерен для вирусного белка, когда под действием протеасом происходит его расщепление до пептидов, связывание их в эндоплазматической цепи с молекулами МНС класса I и презентация данного комплекса на клеточной поверхности для распознавания

его Т-клетками CD8⁺ (цитотоксические клетки), которые разрушают инфицированную клетку-мишень. Примером экзогенного антигена может служить бактериальная клетка, чужеродный эритроцит, токсины. После поглощения антигена путем пино- или эндоцитоза вакуоль сливается с фагосомой, где происходит расщепление чужеродного вещества на пептиды. Фагосома сливается с лизосомой, содержащей молекулы МНС класса II, после чего комплекс антигена с молекулой гистосовместимости II класса презентруется на поверхности клеточной мембраны. Распознается антиген Т-клетками CD4⁺ или В-лимфоцитами, что в последующем приводит к активации В-клеток, созреванию их до стадии плазмочита и синтезу специфических антител [110].

Создание средств профилактики и лечения заболеваний животных невозможно без знаний о влиянии на организм антигенов, входящих в их состав.

Таким образом, для создания эффективных вакцин, приводящих к образованию протективных иммуноглобулинов, необходимо чтобы они в своем составе имели компоненты активирующие Т-клетки. Только в этом случае иммунный ответ приведет к появлению специфических антител, Т- и В-клеток памяти, т.е. к созданию длительного протективного иммунитета.

Наиболее опасными являются инфекционные заболевания птицы из-за их высокой контагиозности [71]. При этом, некоторые инфекции представляют опасность и для человека, например, болезнь Ньюкасла, орнитоз, сальмонеллез, пастереллез. Современные научные изыскания постоянно обновляют перечень средств профилактики инфекционных болезней, в том числе и основных средств защиты – вакцин [45, 68, 105, 107].

По данным ВНИВИП (Санкт-Петербург) специфическая профилактика на крупных специализированных птицефабриках может осуществляться против 6-8 вирусных, 2-3 бактериальных и 2 паразитарных болезней. Следует отметить, что она проводится от 2 до 5 раз в максимально сжатые ранние сроки жизни птицы (от 1 до 110 суток), когда иммунная система ещё функционирует недостаточно [Цитируется из журнала АГРОРУСЬ:

http://istina.msu.ru/media/conferences/conferencepresentation/29e/cf1/6763389/AGRORUS-2014._SPb.pdf].

Как известно, вакцинация является одним из наиболее эффективных путей защиты птицы от инфекционных заболеваний. В промышленном птицеводстве специфическая профилактика осуществляется в виде комплексного применения живых и инактивированных вакцин [16, 111, 122, 223]. Живые вакцины (аттенуированные) могут содержать вакцинный цельный агент, отдельные его фракции (субъединичные) или полученные на основе методов молекулярной биотехнологии (рекомбинантные, ДНК-вакцины и др.). Основным их преимуществом является активация всех звеньев иммунной системы. Это особенно важно для тех инфекций, которые поражают слизистые оболочки, и необходимо развитие клеточного и гуморального иммунного ответа.

Живые вакцины формируют раннюю специфическую защиту (1-2 дня) после введения. В промышленном птицеводстве аттенуированные вакцины применяют массовым и индивидуальным методами, что обусловлено эпизоотической ситуацией, размером стада, продолжительностью трансовариального иммунитета и другими факторами. Недостатки применения живых вакцин связаны с их реактогенностью (побочные эффекты на введение вакцины), возможностью нейтрализации вакцинного эффекта материнскими антителами и лекарственными препаратами.

Инактивированные вакцины имеют более широкое применение в птицеводстве, так как они относительно безопасны и безвредны. Материнские антитела не оказывают значительного влияния на инактивированные вакцины, что делает их пригодными для введения суточным цыплятам. Создание напряженного и длительного иммунитета при применении инактивированных вакцин обеспечивается за счет адъювантов, которые депонируют антиген, стимулируя клеточные и плазмоцитарные реакции [21, 48, 50, 70, 150].

Правильный выбор вакцин и схемы их применения обеспечивает надежность иммунного статуса и гарантирует сохранность здоровья птицепоголовья. Программу вакцинации необходимо составлять с учетом

географических, климатических и эпизоотических особенностей региона, а также учитывать индивидуальность каждой птицефабрики [21, 30, 152].

Разнообразие и высокое качество применяемых вакцинных препаратов не всегда обеспечивает желаемый уровень иммунологической эффективности. Изучение особенностей формирования иммунной системы птиц в онтогенезе и характер иммунного ответа на антигены может способствовать увеличению протективных свойств вакцины и ее безопасности.

Особое внимание среди заболеваний на птицеводческих предприятиях занимают инфекционные болезни слизистых оболочек респираторных путей, которые негативно сказываются на всей мукозальной иммунной системе. Одним из наиболее распространенных является инфекционный бронхит кур [2, 59, 154].

Инфекционный бронхит – острое, высококонтагиозное заболевание кур разного возраста, которое характеризуется поражением дыхательных путей у цыплят и снижением яйценоскости у взрослых кур [47, 76, 77, 79, 135]. После переболевания ИБК развивается системный и местный иммунитет. У птиц обнаруживается выраженный гуморальный ответ на вирус ИБК, который можно определить в ИФА и в реакции торможения гемагглютинации на 3-5 дни после заражения или в реакции нейтрализации [109]. Переболевшая птица устойчива к заражению гомологичным вирусом в течение 6 месяцев. Для специфической профилактики применяют живые и инактивированные вакцины [30].

Создание длительного и напряженного иммунитета против ИБК у кур-несушек обеспечивается за счет комплексной вакцинации живой вакциной в возрасте до 14 недель, далее инактивированной - с 14 недель [21]. При этом среди инактивированных вакцин особенно эффективны эмульгированные вакцины.

Уровень материнских антител против инфекционного бронхита может отличаться на различных стадах. Это зависит от вакцинного штамма, схем вакцинации, качества вакцин, схемы производства и линии (красса) птицы.

Передача IgY против ИБК суточным цыплятам происходит на уровне 30-40% [131]. Материнские антитела против ИБК демонстрируют полную

защиту, но уровень антител снижается очень стремительно. Уже на 7-й день защита против ИБК составляет около 30%. Это подтверждается в исследованиях K.R. Namal et al (2006), где материнские антитела против ИБК снизились существенно к 7-му дню, а к 14-му дню их уже невозможно было определить. Высокая степень защиты материнского иммунитета против ИБК дополняется высоким уровнем местного иммунитета при вакцинации цыплят живыми вакцинами в инкубатории. Именно поэтому проводится вакцинация суточных цыплят против ИБК, несмотря на наличие у них материнских антител [131].

Проведенный анализ данных литературы показывает недостаточность изученности формирования иммунитета у птиц в ранний постнатальный период. Таким образом, исследования в этой области актуальны и имеют практическую значимость.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-экспериментальная работа была выполнена в лаборатории иммунологии и Белгородском филиале Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко в период 2011-2014 гг.

Реактивы и компоненты реакций

В качестве объектов исследования использовали цыплят яичного кросса «Хайсекс Браун» в возрасте от 6-и суток до 1,5 месяцев и количестве 400 голов.

Материалом для исследований служили: стабилизированная гепарином кровь, сыворотка крови, лимфоидные органы (тимус, бурса, селезенка) и перитонеальные макрофаги кур.

Гамма-глобулины из сыворотки крови и желтка осаждали кристаллическим (химически чистым) сульфатом аммония $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ («РеаХим»), осадок ресуспендировали физиологическим раствором (ФР). Диализ осадка проводили в диализных трубках («Sigma», диаметр трубки – 10 мм, размер пор 12-14 кДа).

Для получения иммунохимически чистых иммуноглобулинов кур использовали хроматографические сорбенты: Sephacryl S-500, DEAE-Sepharose CL-6B (GE «Healthcare»). Элюцию проводили в буферных растворах Tris-HCl различной молярности и pH («ХимМед»).

Реактивы для иммуноэлектрофореза и электрофореза: 1,0 % агароза, веронал, мединал, антисыворотка к белкам сыворотки крови кур (титр 1:32), акриламид, NN-метиленбис-акриламид, TEMED (тетраметилэтилендиамин), персульфат аммония, бромфеноловый синий, 2-Меркаптоэтанол, трис (гидроксиметил) аминметан; SDS (натрия додецилсульфат); глицерол (87%); красители: амидо-черный 10Б, Page Blue (Protein Staining Solution); маркер

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 кДа); 7% уксусная кислота.

При определении белка по методу Лоури использовали реактив Фолина («Sigma»), реактивы «А», «В».

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) проводили с применением питательной среды «RPMI-1640 с глутамином» («ПанЭко»). Клетки разделяли в градиенте плотности раствора фиколла ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) («ПанЭко»). Жизнеспособность клеток определяли с помощью 4,0 % раствора трипанового синего.

В реакции розеткообразования (РО) применяли 0,5% суспензию эритроцитов барана, комплекс зимозана («Sigma») со свежей сывороткой крови морской свинки, 0,6% раствор глутарового альдегида («Sigma»), теофиллин (порошок).

Фагоцитарную активность лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов исследовали с помощью взвеси частиц латекса ($0,5-1 \times 10^6$ частиц/мл, размер частиц - 1,5 мкм).

В экспериментах использовали 0,5% суспензию эритроцитов барана (ЭБ) в качестве Т-зависимого антигена, 2,0 % раствор поливинилпирролидона (ПВП) как Т-независимый антиген и отечественную производственную живую сухую вакцину против инфекционного бронхита кур из штамма «Н-120» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (серия № 69, объем 4 см³, 4000 иммунизирующих доз).

В нагрузочных тестах на основе реакции иммунодиффузии, определения фагоцитарной активности лейкоцитов крови и рецепторной активности Т-спленоцитов цыплят использовали метаболиты культур микроорганизмов: *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Salmonella choleraesuis* (штамм 14К), *Salmonella enteritidis* (штамм «Липецк»), *Trychophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis*, живую вакцину против ИБК.

Для получения антисывороток к белкам сыворотки крови кур и гамма-глобулинам иммунизировали овец Романовской породы в возрасте 2-3 лет. Для получения моноспецифической антисыворотки к IgY кур

иммунизировали кроликов-самцов породы «Советская шиншилла» массой тела 2,5-3,0 кг. Для пролонгированного действия антигена и усиления иммунного ответа применяли полный адъювант Фрейнда (ПАФ) производства «DIFCO, USA».

Методы

Для решения поставленных задач использовали солевое осаждение сыворотки крови, хроматографические методы, иммуноэлектрофорез, электрофорез в ПААГ-ДСН, определение концентрации белка по методу Лоури, реакцию розеткообразования, определение фагоцитарной активности, нагрузочные тесты.

При получении иммунохимически чистых препаратов иммуноглобулинов применяли различные варианты реакции преципитации (простая радиальная иммунодиффузия, двойная иммунодиффузия по Оухтерлони). Всего было проведено более 1500 исследований.

Выделение и очистка иммуноглобулинов из сыворотки крови и желтка яиц кур

Исходным материалом для выделения иммуноглобулина Y служили сыворотка крови и желтки яиц.

Метод получения IgY из сыворотки крови состоял из следующих этапов:

- осаждение сыворотки сульфатом аммония (50%, 37,5% насыщения);
- отделение осадка центрифугированием при 4500 об/мин., t 10°C в течение 45 мин.;
- ресуспендирование осадка в ФР и диализ против 0,01 М Tris-HCl, pH 8,0;
- гель-фильтрация препарата на колонке с Sephacryl S-500;
- ионообменная хроматография на колонке с DEAE Sepharose CL-6B;
- иммуноэлектрофорез, концентрация элюатов;
- определение белка по методу Лоури;
- электрофорез в ПААГ-ДСН.

Концентрация белка в препарате, наносимом на колонку размером 16м x 600 мм, для разделения гамма-глобулинов с помощью гель-фильтрации в 0,1 М Tris-HCl буфере, рН 8,0 составила 10,0-15,0 мг/мл.

Дальнейшим этапом выделения IgY была ионообменная хроматография, которую проводили для очистки иммуноглобулина от примесей других белков на DEAE Sepharose CL-6B. Элюцию проводили 0,02 М Tris-HCl буфером, рН 7,2, далее в градиенте NaCl (0,05 М, 0,15 М, 0,25 М, 0,5 М, 1,0 М). Использовали колонку размером 11 x 250 мм.

Метод получения IgY из желтка яиц состоял из следующих этапов [113, 147, 174, 189, 195]:

- перемешивание желточной массы, разведённой в 10 раз дистиллированной водой, на магнитной мешалке для образования гомогенной смеси;
- выдерживание при t 4⁰С в течение 1,5-2 ч.;
- добавление к супернатанту 1М раствора кальция хлорида (CaCl₂) и 0,2 мл 10% раствора декстрана для удаления липидов;
- центрифугирование при 10 000 об/мин. в течение 10 мин. при t 10⁰С;
- ресуспендирование осадка в ФР и диализ против дистиллированной воды;
- добавление равного объёма насыщенного раствора (NH₄)₂SO₄ (50% насыщения) к полученному раствору;
- центрифугирование при 4500 об/мин., t 10⁰С в течение 45 мин.;
- диализ осадка против 0,01 М Tris-HCl, рН 7,2;
- ионообменная хроматография на колонке с Sepharose DEAE CL-6B;
- иммуноэлектрофорез, концентрация фракции;
- определение белка по методу Лоури;
- электрофорез в ПААГ-ДСН.

Иммуноэлектрофоретический анализ [101, 147] проводили на стеклянных пластинах 8 x 10 см с 1,0% агарозой, приготовленной на 0,05 М веронал-мединаловом буфере рН 8,6. В лунки вносили отдельные фракции элюата и проводили электрофорез в течение 1,5 ч. при 25 mA, затем в канавки вносили антисыворотку к белкам сыворотки крови кур (титр 1:32).

Иммунодиффузия продолжалась во влажной камере не менее 24 ч. Затем гель на стеклянной пластине отмывали ФР 24 ч, высушивали, окрашивали амидо-черным 10Б 20 мин., избыток краски удаляли 7,0 % уксусной кислотой.

Учет реакции проводили по количеству, положению и форме полос преципитации, что позволяло оценить иммунохимическую чистоту элюата.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ-ДСН) определяли степень очистки выделенных иммуноглобулинов и их молекулярную массу. Использовали прибор «Midget Electrophoresis Unit» («ЛКВ»). Электрофорез проводили в буферной системе Laemmli U.K [117] с крупнопористым концентрирующим и мелкопористым разделяющим гелем. Компоненты для электрофореза готовили согласно инструкции производителя: 29,1% раствор акриламида, 0,9% раствор NN-метиленбис-акриламида, 1,875M трис аминотетан, рН 8,8, 1,25M трис аминотетан, рН 6,8, 10% раствор SDS, 10% раствор аммония персульфата.

Электродный буфер (рН 8,3) содержал 1,4 г глицина, 3 г триса аминотетана, 0,1 г SDS в 100 мл дистиллированной воды.

Образцы белков готовили в (+) и (-) вариантах. В (+) варианте исследуемые образцы смешивали в равных объемах с лизирующим буфером, состоящим из 2,5 мл 2-Меркаптоэтанола; 1 г SDS; 2,5 мл 1,25 М триса аминотетана; 5,8 мл глицерола (87%); 5 мл бромфенолового синего и 50 мл дистиллированной воды. Затем кипятили 5 мин. на водяной бане и центрифугировали при режиме 1100 об/мин 5 мин. В (-) варианте исследуемые образцы инкубировали в течение того же времени при комнатной температуре в буфере без 2-Меркаптоэтанола. Электрофорез проводили при постоянной силе тока 25-30 мА в течение 1,5-2 ч. Гель окрашивали Page Blue, избыток краски удаляли дистиллированной водой. Учет реакции проводили по количеству и месторасположению окрашенных полос в геле.

Реакцию двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони (РДИ) [147] использовали для определения рабочего разведения антисывороток. Для этого в чашку Петри вносили 1,0% агарозу на 0,05 М веронал-медиаловом

буфере рН 8,6, в центральную лунку - сыворотку крови кур или γ -глобулины кур, в лунки по периферии - двойные разведения антисыворотки. Учет проводили через 24 ч. инкубации во влажной камере по наличию или отсутствию линий преципитации. Для контроля специфичности антисыворотки использовали метод иммуноэлектрофореза.

Для количественного определения иммуноглобулинов в сыворотке крови кур использовали *реакцию простой радиальной иммунодиффузии по методу Манчини* [147]. 5,0 мл 2,0 % агарозы на 0,05 М веронал-мединаловом буфере рН 8,6 смешивали при t 56⁰С с полученной моноспецифической антисывороткой к IgY (рабочее разведение 1:10) в равном объеме и наносили на стеклянные пластины размером 9x12 см. В остывшем слое агарозы вырезали 48 лунок, рассчитанных на 1мкл раствора.

В первые 6 лунок вносили двукратные разведения стандартной сыворотки крови, полученной от 100 кур с известным содержанием иммуноглобулина, в остальные лунки - исследуемые образцы сыворотки крови кур. Учет реакции проводили через 24 ч. инкубации во влажной камере, выстраивали график зависимости диаметра колец преципитации от логарифма концентрации антигена (содержание IgY-3,2 мг/мл). По калибровочной кривой диаметр колец (мм) переводили в значения, соответствующие содержанию иммуноглобулина Y в мг/мл.

Приготовление стандартной сыворотки. Стандартную сыворотку готовили из смеси 100 проб сывороток крови клинически здоровых кур (источник Белгородский филиал). Объединённый пул сыворотки центрифугировали в течение 15 мин. при 1500 об/мин. В приготовленной сыворотке определяли содержание IgY с помощью реакции простой радиальной иммунодиффузии, используя при этом иммунохимически чистый иммуноглобулин Y.

Имунокомпетентные мононуклеарные клетки выделяли [144] из крови, перитонеального экссудата, первичных (тимус, бурса) и вторичных (селезенка) лимфоидных органов.

Для выделения МНК свежевзятую кровь кур стабилизировали раствором гепарина (5 000 МЕ/мл). В пробирку вносили раствор фикола, затем по стенке пробирки наслаивали кровь в соотношении 1:1 и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 45 мин. На границе раздела фаз отбирали взвесь МНК, разбавляли клеточную суспензию питательной средой для культивирования клеток «RPMI-1640 с глутамином», двукратно центрифугировали при 1100 об/мин по 10 мин.

На следующем этапе взвесь МНК смешивали с равным объемом 0,4% раствора трипанового синего, подсчитывали в камере Горяева количество неокрашенных клеток и определяли жизнеспособность. В реакциях использовали суспензию клеток с жизнеспособностью не менее 90%.

Из лимфоидных органов птиц получали суспензию иммунокомпетентных клеток путем гомогенизации. Полученную массу, разбавленную питательной средой, фильтровали через стерильную нейлоновую сетку и наслаивали на раствор фикола в соотношении 1:1. Центрифугирование в градиенте плотности, как описано выше, обеспечивало выделение значительного количества жизнеспособных мононуклеарных клеток, используемых в различных иммунологических реакциях.

Применяли *метод розеткообразования* [83] основанный на том, что на поверхности Т-клеток расположены CD2-рецепторы, а на мембране В-клеток - рецепторы к C₃-компоненту комплемента. При взаимодействии индикаторных частиц с гомологичными молекулами образуются фигуры, имеющие форму розеток. В качестве индикаторных частиц использовали 0,5% взвесь эритроцитов барана и эритроцитов мыши в физиологическом растворе и комплекс зимозана с C₃-компонентом комплемента. Свежие отмытые ФР эритроциты барана и эритроциты мыши смешивали с раствором Олсвера в соотношении 1:1, к 10 мл полученной взвеси добавляли 0,1 мл формалина, что позволяло сохранить эритроциты без потери их способности к розеткообразованию.

Комплекс зимозана с комплементом готовили по следующей методике: 5 мл 0,1% взвеси зимозана в дистиллированной воде прогревали на водяной бане при 80°C в течение 30 мин., центрифугировали при 3000 об/мин. 10 мин., отмывали и ресуспендировали в 5 мл ФР. Затем смешивали с равным объемом свежей сыворотки крови кролика и инкубировали при 37°C 30 мин, отмывали, ресуспендировали в 3 мл ФР. Получали 0,17% взвесь зимозана, обработанного комплементом.

Для определения розеткообразующих рецепторов применяли:

- суспензию МНК ($0,3-0,5 \times 10^6$ кл/мл) в 1 мл среды «RPMI-1640»;
- 0,5% суспензию эритроцитов барана (ЭБ), эритроцитов мыши (ЭМ) в ФР;
- 0,17% взвесь зимозана, обработанного комплементом (ЗС₃-комплекс).

Равные объемы суспензии МНК, ЭБ, ЭМ или ЗС₃-комплекса смешивали и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали при 1000 об/мин. в течение 5 мин., далее инкубировали 18 ч. при t 4-6°C. Фиксировали клетки добавлением 0,6% раствора глутарового альдегида (20 мин.), трехкратно отмывали дистиллированной водой, центрифугировали при 1500 об/мин. 5 мин. Суспензию клеток наносили на предметное стекло, после полного высыхания мазок фиксировали этиловым спиртом 20 мин., окрашивали по Романовскому-Гимза в течение 20 мин. Под микроскопом (увеличение $\times 1000$) подсчитывали не менее 200 лимфоцитов, на поверхности которых обнаруживали от 3 и более эритроцитов барана или частиц зимозана, определяли процент Т- и В-лимфоцитов.

Антигенное розеткообразование [94]. Опытной группе цыплят окулярно (в конъюнктивальный мешок) вводили живую вакцину против ИБК, контрольной - физиологический раствор тем же способом. МНК, выделенные из селезенки кур опытной и контрольной групп ($0,3-0,5 \times 10^6$ кл/мл), инкубировали с вакциной в течение 30 мин. при t 40°C, в соотношении 1:1. После инкубации клетки трехкратно отмывали PBS (фосфатно-солевой буфер, рН 7,2) при 1000 об/мин по 5 мин. Далее добавляли 0,5% взвесь ЭБ, выдерживали 20 мин

при t 20⁰-22⁰С. Полученную смесь центрифугировали при 1000 об/мин. в течение 5 мин. Последующий ход реакции аналогичен методу розеткообразования.

Теофиллиновый тест [80]. 1,8 мг теофиллина растворяли в 1 мл теплой питательной среды (37⁰С) для культивирования клеток, при изменении рН добавляли 0,1 N раствор NaOH для достижения рН 7,2. В суспензию клеток вносили 0,2 мл раствора теофиллина в среде «RPMI-1640 с глутамином» (готовили *ex tempore*) и инкубировали 1 ч. при t 40⁰С. Последующий ход реакции аналогичен методу розеткообразования.

T-цитотоксические клетки в присутствии теофиллина теряют способность к розеткообразованию (теофиллин-чувствительные), T-хелперы – резистентны к нему. Количество теофиллин-чувствительных розеткообразующих клеток (%) определяли по формуле:

$$\frac{\text{Tф}_\text{ч-РОК (аналог CD8-клеток)} - \text{Tф}_\text{р-РОК (аналог CD4-клеток)}}{\text{E-РОК}}$$

где E-РОК – количество розеткообразующих клеток в пробе без теофиллина, Tф_р-РОК - количество розеткообразующих клеток в пробе с теофиллином.

Определяли иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8).

Фагоцитарную активность [53] исследовали у лейкоцитов крови кур. Равные объемы стабилизированной гепарином (5 000 ME/мл) крови, ФР и раствора латекса ($0,5 \times 10^6$ ч/мл) в питательной среде «RPMI-1640 с глутамином», смешивали и инкубировали при t 40⁰С в течение 30 мин.

Затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, из взвеси клеток осадка готовили мазки, высушивали до исчезновения влажного блеска, фиксировали этиловым спиртом 20 мин., окрашивали по Романовскому-Гимза в течение 20 мин. и подсчитывали количество фагоцитирующих клеток (100 фагоцитов).

Фагоцитарную активность определяли по проценту фагоцитов, захвативших частицы (фагоцитарная активность) и количеству частиц, поглощенных одним фагоцитом (фагоцитарное число).

Методом адгезии на пластик [53] получали перитонеальные макрофаги (ПМ) кур. Для этого в брюшную полость цыпленка вводили 5 мл PBS, извлекали

перитонеальный экссудат на чашки Петри с питательной средой. Далее центрифугировали полученный экссудат при 1500 об/мин 10 мин., отмывали осадок и его ресуспендировали в среде «RPMI-1640 с глутамином». Взвесь клеток (1-2 мл) наносили на чашки Петри. Клетки инкубировали 1 ч. при t 40°C, затем отмывали монослой клеток питательной средой.

Фагоцитарную активность ПМ определяли с помощью частиц латекса. К монослою ПМ добавляли 100 мкл суспензии латекса, инкубировали при t 40°C в течение 30 мин. Чашки с ПМ отмывали PBS, высушивали, фиксировали этиловым спиртом 20 мин. и окрашивали раствором по Романовскому-Гимза в течение 20 мин. Подсчитывали 100 ПМ, определяли фагоцитарное число и фагоцитарную активность.

Нагрузочный тест с метаболитами микроорганизмов на основе реакции розеткообразования, определения фагоцитарной активности лейкоцитов крови и иммунодиффузии [80].

Метаболиты патогенных дрожжеподобных грибов рода *Candida*, *Trichophyton* и *Microsporum* были предоставлены д.в.н. А.М. Литвиновым (лаборатория микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова (ВИЭВ)). Получены на 5-10-е сутки роста в жидкой питательной среде (сусло-агар).

Метаболиты бактерий рода *Salmonella* были предоставлены к.в.н. М.Н. Лощининым (лаборатория микробиологии ВИЭВ с музеем типовых культур (суточная культура)).

МНК кур в концентрации $0,3-0,5 \times 10^6$ кл/мл разводили в среде «RPMI-1640 с глутамином». МНК опытной и контрольной групп инкубировали с метаболитами в течение 30 мин. при t 40°C. После инкубирования клетки трехкратно отмывали от метаболитов ФР при 1000 об/мин по 5 мин. Затем смешивали равные объемы суспензии МНК селезенки и ЭБ. Последующий ход реакции аналогичен методу розеткообразования.

Для оценки преципитирующей активности иммуноглобулина γ под действием метаболитов использовали РИД с исследуемыми сыворотками крови кур. Готовили стеклянную пластину по методике описанной выше. Сыворотки

крови кур с метаболитами инкубировали при t 40°C в течение 30 мин. В первые 6 лунок пластины вносили двукратные разведения стандартной сыворотки крови, в остальные лунки - исследуемые образцы сыворотки после инкубации с метаболитами. Учет реакции проводили через 24 ч.

Нагрузочный тест с метаболитами микроорганизмов проводили также на основе метода по определению фагоцитарной активности лейкоцитов крови. С этой целью смешивали равные объемы стабилизированной гепарином (5 000 МЕ/мл) крови, ФР и метаболиты микроорганизмов. Инкубировали при t 40°C в течение 30 мин. Затем центрифугировали при 1500 об/мин., 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, добавляли равный объем раствора латекса. Дальнейший ход реакции аналогичен методике определения фагоцитарной активности лейкоцитов крови.

Для оценки результатов определяли *индекс сдвига* [80] - по формуле:

$$\text{ИС} = \frac{\text{П}_m}{\text{П}_k}, \text{ где}$$

ИС – индекс сдвига;

П_м – параметры реакции с метаболитами;

П_к – параметры реакции без метаболитов.

Величина индекса больше 1 означала стимулирующий эффект, а меньше 1 – супрессивное влияние.

Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку результатов проводили согласно стандартным методам [93] с использованием программы Microsoft Excel 2010.

При этом были приняты следующие обозначения:

M – средняя арифметическая;

m – ошибка средней арифметической;

n – число животных в опыте;

r – коэффициент корреляции;

p – критерий достоверности.

Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала.

Вероятность различий считалась существенной при $p < 0,05$.

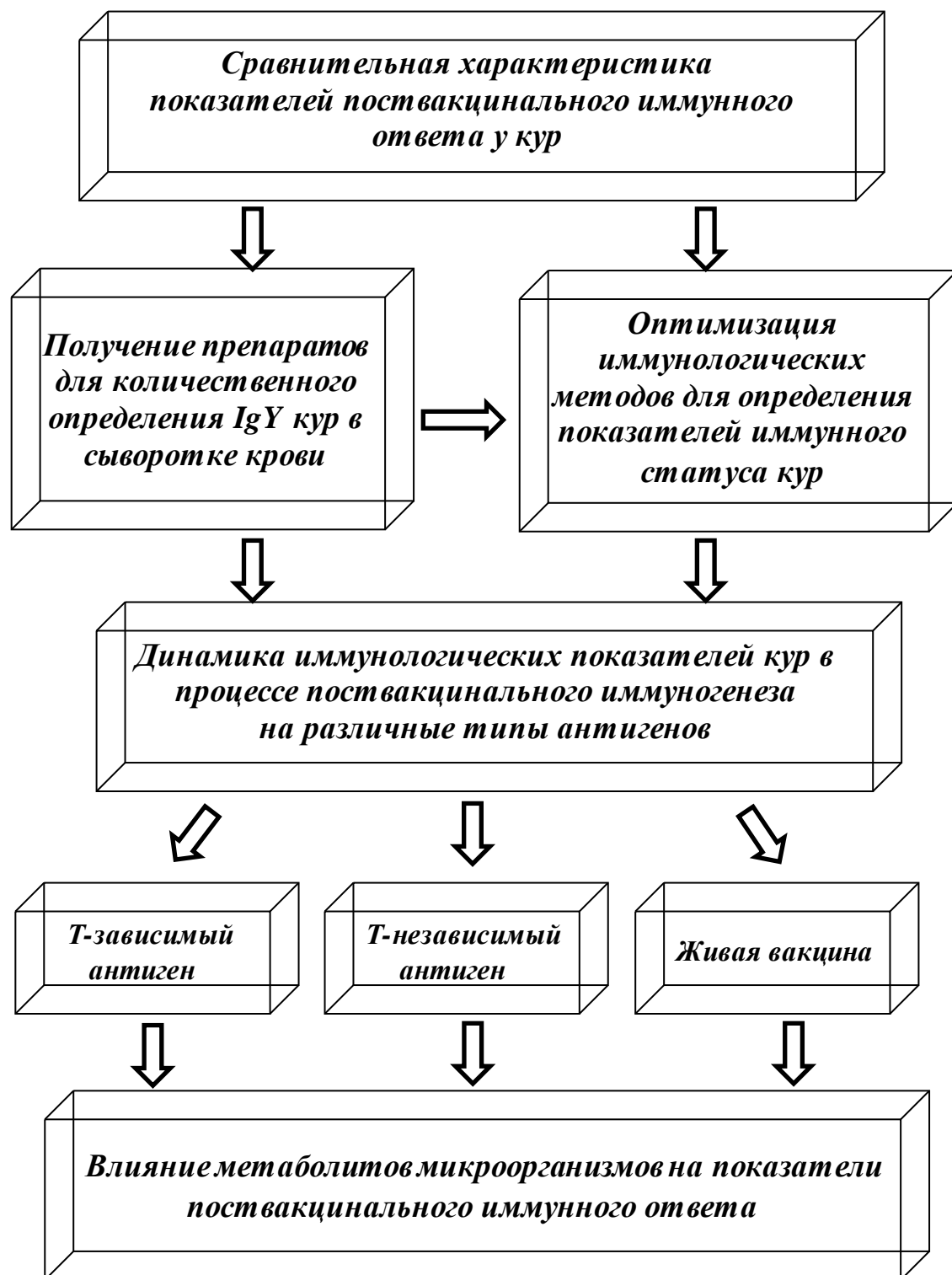


Рис. 3. Общая схема исследований.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Оптимизация методов получения препаратов для количественного определения иммуноглобулина Y кур

В лаборатории иммунологии ВИЭВ был разработан комплекс методических приемов, позволяющих изготавливать иммунохимически чистые препараты иммуноглобулинов животных и моноспецифические антисыворотки. Были подобраны наиболее оптимальные в лабораторных условиях методы получения иммуноглобулинов М, G и А различных видов животных (крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, собаки, кошки, мыши).

В ходе работы был оптимизирован процесс выделения IgY из сыворотки крови кур. Так же была получена моноспецифическая антисыворотка к данному изотипу.

4.1.1. Выделение IgY из сыворотки крови и желтка яиц кур

Для выделения IgY из сыворотки крови использовали сыворотку крови клинически здоровой птицы в возрасте 2-5 месяцев, предоставленную Белгородским филиалом ВИЭВ.

Взятие крови (без антикоагулянта) для получения сыворотки проводили до кормления или через 2 часа после. Выдерживали кровь при t 20-22°C в течение 30 минут для образования сгустка, далее обводили его металлической спицей, пробирки помещали в термостат на 1-2 часа при t 40°C. Сыворотку сливали в пробирки и центрифугировали 10 минут при 1500-2000 об/мин. Для работы использовали прозрачную сыворотку, желтоватого цвета.

Для осаждения фракции γ -глобулинов к сыворотке крови кур добавляли химически чистый кристаллический $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ [99]. Осаждение проводили в три этапа. На первом этапе к сыворотке крови кур добавляли кристаллический сульфат аммония из расчета 38 г на 100 мл сыворотки крови (50% насыщения). Выдерживали 16-18 ч. при t 4-6°C, центрифугировали в течение 45 мин при

4500 об/мин. (t 10°C). Осадок ресуспендировали в ФР, далее проводили диализ против 0,01 М Tris-HCl буфера, рН 8,0 в течение 16-18 ч. при t 4-6°C.

Полученную фракцию повторно осаждали согласно вышеописанной методике. На третьем этапе к фракции γ -глобулинов добавляли сульфат аммония из расчета 28,5 г на 100 мл сыворотки (37,5% насыщения) и повторяли методику.

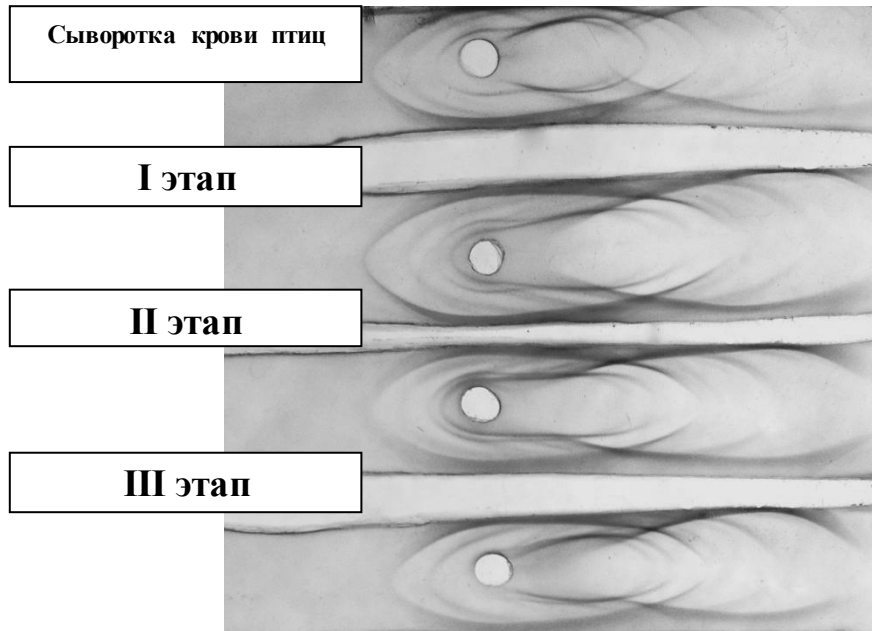


Рис. 4. Иммуноэлектрофореграмма γ -глобулинов сыворотки крови кур при поэтапном осаждении сульфатом аммония (в лунках сыворотка крови и γ -глобулины кур, в траншеях - антисыворотка к белкам сыворотки крови кур).

На рисунке 4 видно, что после III этапа осаждения гамма-глобулиновая фракция содержала меньше белковых примесей.

В результате получили фракцию γ -глобулинов сыворотки крови кур с содержанием белка 33,5-45,2 мг/мл. Полученную фракцию белков с концентрацией 10,0-15,0 мг/мл и в объеме 3-4 мл наносили на поверхность колонки с Sephacryl S-500 в 0,1 М Tris-HCl буфере, рН 8,0 для разделения их по молекулярной массе со скоростью 0,5 мл/мин.

После гель-фильтрации элюаты пика вносили в лунки для проведения иммуноэлектрофореза (ИЭФ), чтобы оценить их белковый состав. Было установлено, что IgY с меньшим количеством примесей других белков элюировался в нисходящей части первого пика в процессе хроматографии (рис. 5, 6).

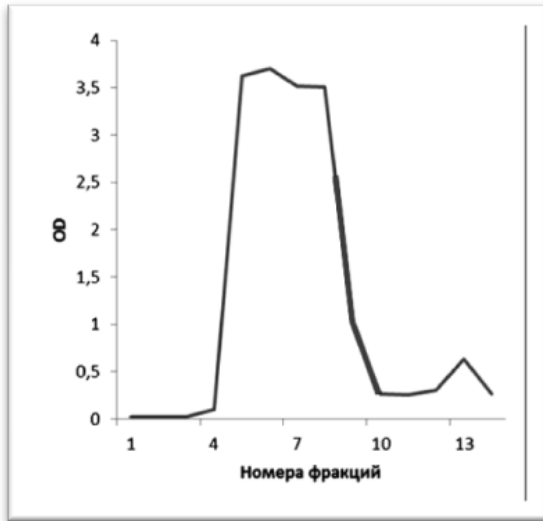


Рис. 5. Профиль элюции γ -глобулинов кур после гель-фльтрации на Sephacryl S-500.

Известно, что IgM и IgA млекопитающих элюируются в первых двух пиках в процессе гель-фльтрации, но содержание этих иммуноглобулинов в сыворотке крови кур составляет меньше 1,0 мг/мл, что является недостаточным для их выделения на данном носителе.

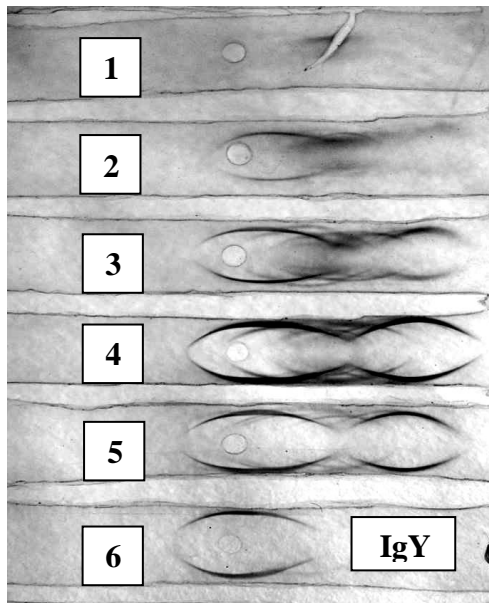


Рис. 6. Иммуноэлектрофореграмма фракций, полученных после гель-фльтрации γ -глобулинов кур (элюаты содержали иммуноглобулин Y с примесью других белков). В лунках (1-6) фракции пика элюции, в траншеях – антисыворотка к белкам сыворотки крови кур.

В полученных фракциях иммуноглобулина определяли количество белка на спектрофотометре (OD_{280}).

После проведения одной серии гель-фльтрации элюат с IgY, имевший по результатам ИЭФ 2-3 полосы преципитации, содержал 0,7-1,0 мг/мл белка.

Фракции с молекулами IgY в растворе 0,1 М Tris-HCl буфера концентрировали (режим вакуума при t 30°C) в 5 раз и хранили при t -20°C.

Для накопления материала провели 10 серий гель фильтрации по вышеописанной методике.



Рис. 7. Иммуноэлектрофореграмма концентрированных фракций IgY после гелефильтрации на Sephacryl S-500 (в лунке-концентрированные фракции IgY, в траншеях- антисыворотка к белкам сыворотки кур).

Так как метод гелефильтрации не позволил получить элюат IgY без примесей других белков (рис. 7), следующим этапом выделения была ионообменная хроматография для получения иммунохимически чистого иммуноглобулина.

Ионообменную хроматографию проводили на колонке с DEAE-Sepharose CL-6B. Колонку уравнивали 0,02 М Tris-HCl буфером, pH 7,2. Элюцию проводили в градиенте NaCl (0,05 М, 0,15 М, 0,25 М, 0,5 М, 1,0 М) со скоростью 0,5 мл/мин.

На колонку наносили 1 мл элюата с IgY, где содержание белка составляло 2-3 мг/мл. После первичного проведения ионообменной хроматографии иммуноглобулин Y элюировался во втором пике при 0,15 М NaCl на 0,02 М Tris-HCl, pH 7,2 (рис. 8).

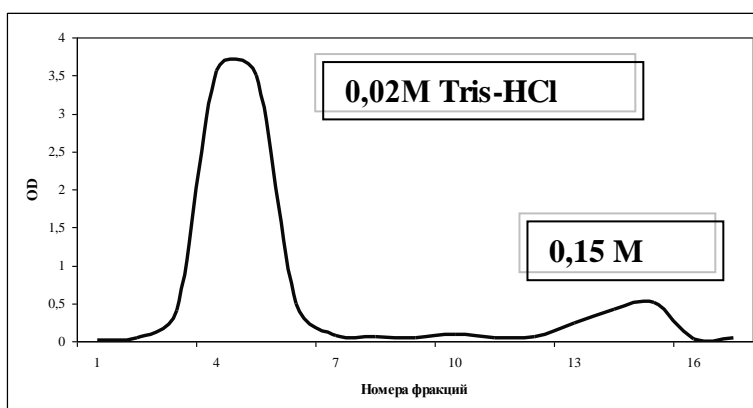


Рис. 8. Профиль элюции концентрированных фракций IgY сыворотки крови кур после проведения ионообменной хроматографии на Sepharose-DEAE CL-6B.

Однократное проведение ионообменной хроматографии оказалось недостаточным для получения иммунохимически чистого иммуноглобулина, что

проявлялось на иммуноэлектрофореграмме после концентрации фракций с IgY в виде второй полосы преципитации.

Повторная ионообменная хроматография данных фракций позволила получить иммунохимически чистый IgY сыворотки крови кур, который элюировался в 0,02 М Tris-HCl буфере, pH 7,2 без градиента NaCl [62].

Методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ-ДСН) определяли степень чистоты выделенного иммуноглобулина и его молекулярную массу.

Электрофоретический спектр элюатов состоял из 2 компонентов в области 70 кДа и 20 кДа в (+) варианте, что соответствует молекулярной массе тяжелой и легкой цепей IgY. В (-) варианте на электрофореграмме в области 180 кДа присутствовала одна полоса, соответствующая молекулярной массе цельной молекулы IgY. Содержание белка во фракциях с IgY составило 1,0-1,2 мг/мл.

Схема выделения иммуноглобулина Y при повторной ионообменной хроматографии аналогична выделению IgG КРС [55].

Для накопления IgY, выделенного из сыворотки крови, было проведено 5 серий ионообменной хроматографии по вышеописанной методике. В результате был получен иммунохимически чистый IgY кур с содержанием белка 5,3 мг/мл.

Для выделения IgY из желтка яиц использовали яйца не иммунизированных кур. Отделяли желтки от белков, желточную массу, разведенную в 10 раз дистиллированной водой, перемешивали на магнитной мешалке BioSan MSH-300, при 500 об/мин., 10 мин. для получения гомогенной смеси. Затем выдерживали при t 4 °C в течение 1,5-2 ч. для разделения фракций. В дальнейшей работе использовали супернатант [216].

К 10 мл супернатанта добавляли 1,0 мл 1М раствора кальция хлорида (CaCl_2) и 0,2 мл 10% раствора декстрана для удаления липидов, которые препятствуют получению фракции гамма-глобулинов [147].

Данный раствор центрифугировали при 10 000 об/мин., в течение 10 мин., проводили диализ против дистиллированной воды, добавляли раствор сульфата

аммония (38 г на 100 мл дистиллированной воды - 50% насыщения), выдерживали 16-18 ч. при t 4°C, центрифугировали при 4500 об/мин., в течение 45 мин., проводили диализ против 0,02 М Tris-HCl, pH 7,2.

Получали фракцию γ -глобулинов с содержанием белка 10,0-12,0 мг/мл. На колонку с Sepharose-DEAE CL-6B наносили 1 мл фракции белков с концентрацией 2,0-2,5 мг/мл. Ионообменная хроматография позволила получить иммунохимически чистый IgY желтка яиц кур, который элюировался в нисходящей части первого пика на 0,02 М Tris-HCl буфере, pH 7,2 без NaCl (рис. 9). При наличии белковых примесей в элюате после концентрации повторно проводили ионообменную хроматографию с получением иммунохимически чистого иммуноглобулина.

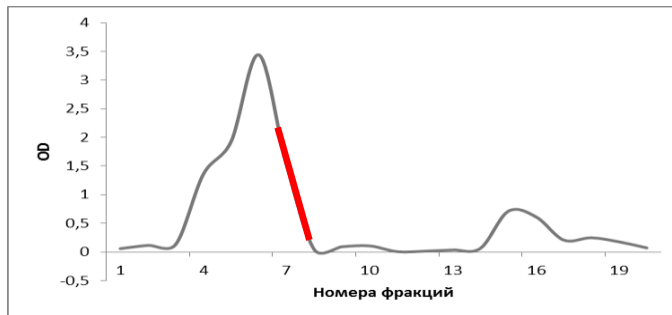


Рис. 9. Профиль элюции γ -глобулинов желтка после ионообменной хроматографии на Sepharose-DEAE CL-6B.

Иммунохимическая чистота была подтверждена методом электрофореза в ПААГ-ДСН. По данным электрофоретического анализа установлено, что сывороточный и желточный IgY имели молекулярную массу 180 кДа. Содержание белка во фракциях с IgY желтка составило 0,3-0,5 мг/мл.

Для накопления IgY желтка было проведено 5 серий ионообменной хроматографии по вышеописанной методике. В результате был получен иммунохимически чистый IgY желтка кур с содержанием белка 1,8 мг/мл (рис. 10).

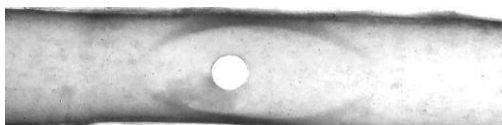


Рис. 10. Иммуноэлектрофореграмма, полученная после ионообменной хроматографии концентрированных фракций IgY желтка (в лунке - иммунохимически чистый IgY, в траншеях - антисыворотка к белкам сыворотки).

В результате проведенных исследований был сделан вывод о том, что для получения иммунохимически чистого IgY сыворотки крови кур необходимо последовательное сочетание метода гель-фильтрации, концентрации фракций, которые по результатам иммуноэлектрофореграммы содержали IgY с наименьшим количеством примесей других белков, и проведение ионообменной хроматографии.

Для выделения иммуноглобулина Y из желтка яиц одним из оптимальных являлось сочетание ионообменной хроматографии предварительно очищенных от липидов гамма-глобулинов желтка, концентрация фракций, которые по результатам иммуноэлектрофореграммы содержали IgY и, при наличии других белковых примесей в элюате после концентрации, проведение повторной ионообменной хроматографии с получением иммунохимически чистого иммуноглобулина [62].

Таким образом, в результате проведенных исследований было получено 1,8 мг/мл и 5,3 мг/мл иммунохимически чистого IgY из желтка яиц и сыворотки крови кур соответственно.

В ходе исследований было определено, что расположение, форма и характер полос преципитации IgY, выделенного из сыворотки крови и из желтка яиц, аналогичны, что свидетельствует об идентичных электрофоретических свойствах иммуноглобулина, выделенного из разных биологических жидкостей.

Для дальнейшей работы по получению моноспецифической антисыворотки использовали сывороточный иммунохимически чистый иммуноглобулин Y, так как это соответствовало задачам нашего исследования.

4.1.2. Получение и контроль антисывороток к белкам сыворотки крови, γ -глобулинам и иммуноглобулину Y кур

Иммунизацию лабораторных животных проводили по методу, разработанному А.Ю. Самострельским и М.А. Мисниковой [114], в нашей модификации.

Для оценки белкового состава полученных элюатов в процессе разделения гамма-глобулинов с помощью гель-фильтрации и очистки их ионообменной

хроматографией использовали антисыворотку к белкам сыворотки крови и гамма-глобулинам.

Для этого иммунизировали овец Романовской породы в возрасте 2-3 лет. В область лопатки и подколенных лимфатических узлов подкожно вводили по 1,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) смешанного с равным объемом иммуноглобулина (2,5 мг). Через 21 сутки иммунизировали повторно.

Если титр антител в РДП на 7-е сутки после повторной иммунизации был меньше 1:8, то иммуноглобулин в дозе 5,0 мг вводили внутривенно в объеме 1,5 мл и повторно через сутки в двукратной дозе. На 7-е сутки после последней инъекции антигена проводили взятие крови для получения сыворотки.

Получение антисыворотки к гамма-глобулинам сыворотки крови кур осуществляли по той же методике.

Для получения моноспецифической антисыворотки к IgY кур иммунизировали кроликов-самцов породы «Советская шиншилла» массой 2,5-3,0 кг.

С этой целью в область подколенных лимфатических узлов подкожно вводили по 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) смешанного с равным объемом иммуноглобулина (1,0 мг). Через 21 сутки ПАФ и иммуноглобулин вводили повторно. Титр антисыворотки на 7-е сутки определяли в реакции двойной радиальной иммунодиффузии по методу Оухтерлони (РДП). Если титр был меньше 1:8, то иммуноглобулин в дозе 1,0 мг вводили внутривенно в объеме 0,5 мл и повторно через сутки в двукратной дозе.

После последней инъекции антигена на 7-е сутки брали кровь для получения сыворотки к IgY кур.

Реакцию простой радиальной (РИД) и двойной иммунодиффузии (РДП) использовали для определения рабочего разведения антисывороток.

В ходе работы были получены антисыворотки к белкам сыворотки крови и гамма-глобулинам кур, титр антител которых в РДП составил 1:32 и 1:16 соответственно, а также моноспецифическая антисыворотка к IgY кур с титром

антител 1:16. Для определения специфичности антисывороток использовали ИЭФ и РДП.

4.1.3. Иммунохимические свойства IgY кур

IgY является доминирующим классом антител в сыворотке крови кур, продуцируется после IgM в первичном гуморальном ответе и является главным изотипом во вторичном иммунном ответе, что определяет его функциональное сходство с IgG млекопитающих.

Основное структурное различие этих молекул состоит в длине тяжелой цепи H иммуноглобулина птиц. Она имеет пять доменов (V, C1-C4), в то время как у IgG млекопитающих их четыре. Иммуноглобулин Y не обладает четко выраженной шарнирной областью, вместо этого присутствует участок с ограниченной гибкостью в области Cu1-Cu2 и Cu3-Cu4 доменов.

Для выделения иммунохимически чистого IgY кур на начальном этапе применяли метод последовательного осаждения фракции γ -глобулинов из сыворотки крови сульфатом аммония, что увеличивало выход IgY.

При проведении гель-фильтрации γ -глобулиновой фракции было установлено, что IgY с меньшим количеством примесей другого белка элюируется в нисходящей части первого пика в процессе хроматографии. Полученные элюаты концентрировали. При ионообменной хроматографии IgY элюировался при 0,15M NaCl на 0,02 M Tris-HCl, pH 7,2. Повторное проведение ионообменной хроматографии позволило получить элюат иммунохимически чистого IgY сыворотки крови кур, вышедшего в первом пике в 0,02 M Tris-HCl буфере, pH 7,2.

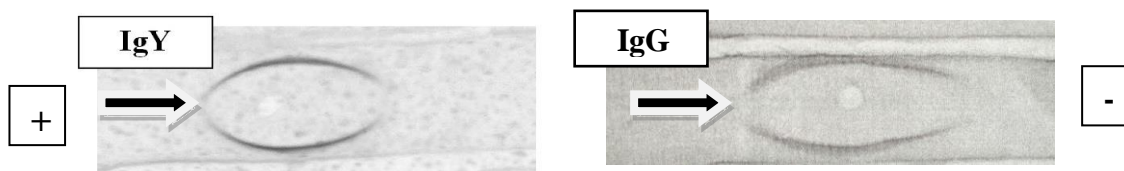


Рис. 11. Иммуноэлектрофореграммы иммунохимически чистого IgY сыворотки крови кур и IgG сыворотки крови КРС (в лунках – иммунохимически чистые иммуноглобулины, в траншеях – антисыворотки к гамма-глобулинам сыворотки крови кур и КРС).

На рисунке 11 видно, что Ig Y и Ig G обладают разной электрофоретической подвижностью. Форма полос преципитации иммуноглобулинов также различается, что, по-видимому, обусловлено меньшей концентрацией белка в препарате IgY кур.

4.2. Использование иммунологических методов для изучения и оценки поствакцинального иммунитета у кур

Комплексное изучение иммунного ответа организма на введение антигена с одной стороны помогает формировать понимание сложных механизмов антителообразования, а с другой - дать оценку эффективности вакцинации животных.

4.2.1. Определение IgY в реакции простой радиальной иммунодиффузии

Проведя исследования по подбору рабочего разведения (в РИД) моноспецифической антисыворотки (1:5; 1:10; 1:20) для количественного определения IgY, было установлено, что ее рабочее разведение составило 1:10.

Приготовление стандартной сыворотки. Стандартную сыворотку готовили из смеси 100 образцов сывороток крови, взятых от клинически здоровых кур (Белгородский филиал ВИЭВ) объемом по 2-3 мл. Объединённый пул сывороток центрифугировали 15 мин. при 1500 об/мин. В работе использовали осветлённую сыворотку, желтоватого цвета.

Готовили двойные разведения иммунохимически чистого иммуноглобулина Y, которые вносили в первый ряд лунок пластины геля при проведении РИД, а во второй ряд – образцы объединенной сыворотки крови кур (рис.12). По диаметру колец преципитации в двойных разведениях IgY выстраивали калибровочную кривую, на основании которой определили содержание иммуноглобулина в образцах сыворотки. Было установлено, что содержание IgY в стандартной сыворотке - 3,2 мг/мл.

Для определения количественного содержания IgY в исследуемых образцах сыворотки крови кур проводили реакцию иммунодиффузии (рис. 12).

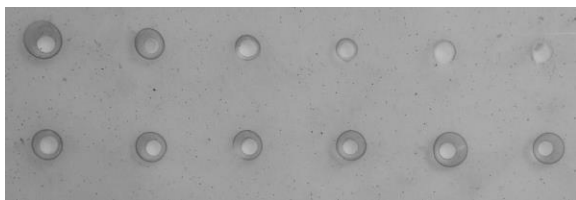


Рис. 12. РИД по определению содержания IgY в исследуемых образцах сыворотки крови.

В первом ряду - двукратные разведения иммунохимически чистого IgY кур.

Во втором ряду - образцы исследуемых сывороток крови кур.

Нами были получены количественные показатели содержания иммуноглобулина Y в сыворотке крови цыплят по сезонам года. Возраст цыплят составил от 7 до 21 суток (рис. 13).

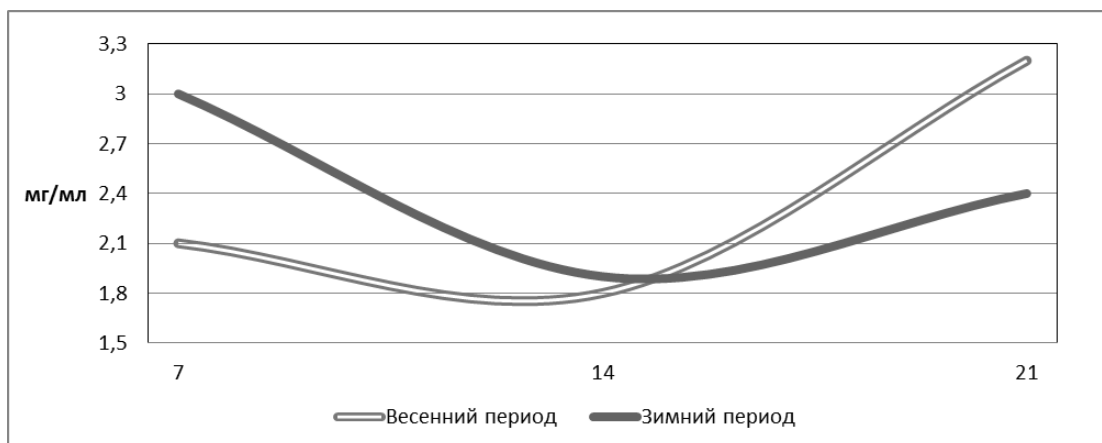


Рис. 13. Количественные показатели содержания IgY в сыворотке крови цыплят по сезонам года.

Установлено, что содержание IgY имеет тенденцию к увеличению в онтогенезе. Спад количества иммуноглобулина наблюдался к 14 суткам цыплят, что, вероятно, связано с распадом материнских антител. По некоторым литературным данным период полураспада материнских антител составляет 5 дней [6, 19], но эти показатели могут изменяться, в зависимости от иммунного статуса родительского стада - если его уровень достаточно высок, то материнские антитела сохраняются до 1 месяца [8,188]. Следует отметить, что в весенний период концентрация IgY в сыворотке крови цыплят была ниже, чем в зимний, что, по-видимому, обусловлено активацией клеточных факторов (параметры лейкоцитарной формулы) [32, 177].

4.2.2. Применение различных вариантов реакции розеткообразования для количественной характеристики иммунокомпетентных клеток

Для определения количества Т-, В-клеток в органах иммунной системы кур (тимус, бурса, селезенка) были применены методы розеткообразования, в которых в качестве индикаторных частиц использовали эритроциты барана (ЭБ), эритроциты мыши (ЭМ) и комплекс зимозана с С₃-компонентом комплемента (ЗС₃-комплекс). Для расчета иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) крови цыплят проводили теофиллиновый тест.

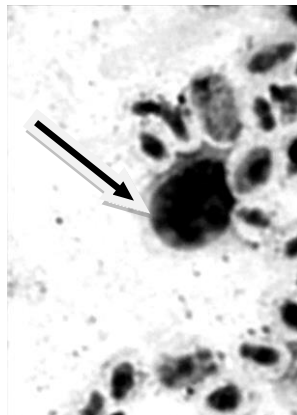
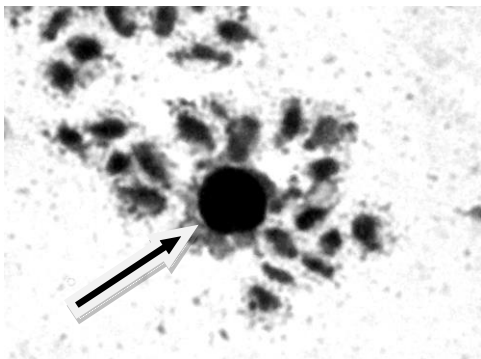
Индикацию В-клеток в иммунных органах кур проводили по выявлению рецепторов к комплексу зимозана с С₃-компонентом комплемента и эритроцитам мыши в возрасте 1 месяц (табл. 1).

Таблица 1

Количественное содержание В-лимфоцитов в крови кур при использовании различных индикаторных частиц

Количество В-клеток крови кур, %	
ЗС ₃ -комплекс	ЭМ
20,0±2,3	14,8±1,7

Таким образом, было установлено, что реакция с ЗС₃-комплексом выявляет большее число В-клеток, чем в реакции с эритроцитами мыши. Поэтому дальнейшие исследования по количественному определению В-лимфоцитов кур проводили с комплексом зимозана с С₃-компонентом комплемента (рис. 14)



*Рис. 14.
В-лимфоциты крови цыплят (21 сутки), выявленные комплексом зимозана с С₃-компонентом комплемента.*

С помощью теofilлинового теста выявляли теofilлинрезистентные розеткообразующие клетки (Тф_p-РОК) – аналог CD4. Цитотоксические клетки (CD8) составляли теofilлинчувствительную популяцию лимфоцитов.

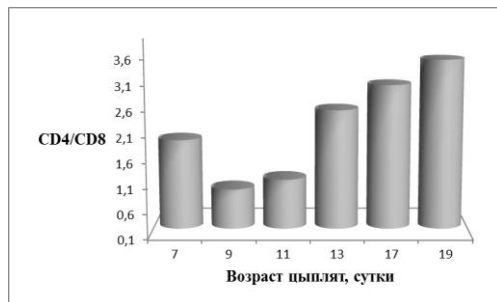


Рис. 15. Динамика уровня иммунорегуляторного индекса крови цыплят в онтогенезе.

Соотношение CD4/CD8 является важным диагностическим показателем для оценки состояния иммунной системы. В норме этот показатель находится в пределах 1,5-2,5 [78]. На рисунке 15 видно, что значение иммунорегуляторного индекса увеличивается с 11-и суточного возраста цыплят, что вызвано повышением количества Т-хелперов (CD4) в крови. По-видимому, это связано с физиологическими особенностями данного периода у птиц, или увеличением бактериальной нагрузки на организм цыплят.

Методом антигенного розеткообразования определяли реакцию премированных вакциной Т-лимфоцитов крови на ее добавление к взвеси МНК, выделенных из селезенки кур.

На рисунке 16 видно, что количество выявленных Т-лимфоцитов селезенки на 3-и, 5-е, 7-е сутки первичного иммунного ответа и на 1-е, 3-и сутки вторичного больше контрольных значений. Это свидетельствует об увеличении активности розеткообразующих рецепторов Т-клеток после двойного (*in vivo*, *in vitro*) антигенного сигнала. На 5- и 7-е сутки вторичного иммунного ответа контрольные значения выше, что показывает анергию Т-клеток – неспособность к активации.

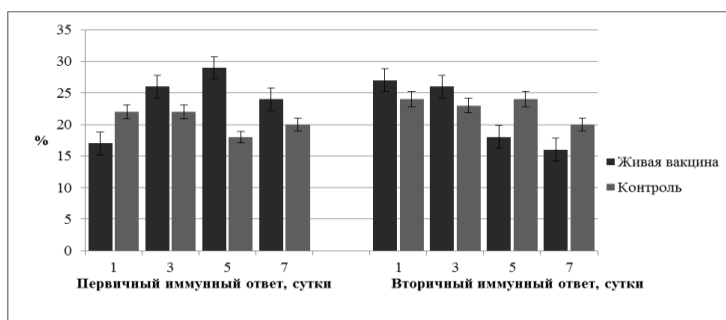


Рис. 16. Динамика относительного содержания Т-лимфоцитов селезенки, выявленных в реакции антигенного розеткообразования.

4.2.3. Разработка нагрузочных тестов для изучения функциональных свойств компонентов иммунной системы у кур

Метаболиты патогенных грибов и микроорганизмов для нагрузочных тестов были предоставлены д.в.н. А.М. Литвиновым (лаборатория микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова) и к.в.н. М.Н. Лощининым (лаборатория микробиологии с музеем типовых культур), ВИЭВ.

После инкубации дрожжеподобных грибов рода *Candida* в течение 5-и суток при t 37°C в жидкой питательной среде (сусло-агар) культуральную жидкость стерильно отбирали и пропускали через фильтр (Millex-GS 0,22 μ m).

Метаболиты дерматофитных грибов рода *Trichophyton* и *Microsporum*, полученные на 10-е сутки роста в жидкой питательной среде (сусло-агар) при 37°C, также подвергали фильтрации.

Метаболиты бактерий рода *Salmonella* получали от суточной культуры. Содержание белка в метаболитах определяли по методу Лоури.

Метаболиты исследовали в 3-х концентрациях: 0,5; 1,5 и 3,0 мг/мл в реакциях иммунодиффузии, определения фагоцитарной активности и розеткообразования. Исследуемые образцы крови, взвеси МНК селезенки и сывороток крови инкубировали с метаболитами в течение 30 мин. при t 40°C.

В ходе работы было подобрано оптимальное содержание белка в препаратах метаболитов, которое составило 1,5 мг/мл.

4.3. Динамика поствакцинального иммунного ответа у кур на различные типы антигенов

В разделе приведены экспериментальные данные по комплексному изучению иммунного ответа на Т-зависимый (0,5% взвесь эритроцитов барана) и Т-независимый (2,0% раствор поливинилпирролидона) антигены, а также на введение живой вакцины против ИБК.

Для оценки первичного и вторичного иммунного ответа на 1-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки проводили определение показателей лейкоцитарной формулы, уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови и перитонеальных

макрофагов, оценивали гуморальный иммунный ответ по содержанию IgY в сыворотке крови кур. Также исследовали относительное содержание Т- и В-лимфоцитов в органах иммунной системы и крови.

4.3.1. Количественная характеристика иммунологических показателей в процессе Т-зависимого иммунного ответа у кур

В качестве модели Т-зависимого антигена в нашем исследовании была использована 0,5% суспензия эритроцитов барана.

Эритроциты барана, являясь корпускулярным тимусзависимым антигеном, способствуют развитию иммунного ответа с участием макрофагов, которые поглощают антиген и презентуют его детерминанты на своей цитоплазматической мембране в комплексе с молекулами МНС класса II. Далее информация об антигене передается Т-лимфоцитам, в результате чего формируется клон специфических Т-хелперов (CD4+), которые в свою очередь стимулируют В-клетки для синтеза антител. То есть, в Т-зависимом иммунном ответе участвуют все иммунокомпетентные клетки.

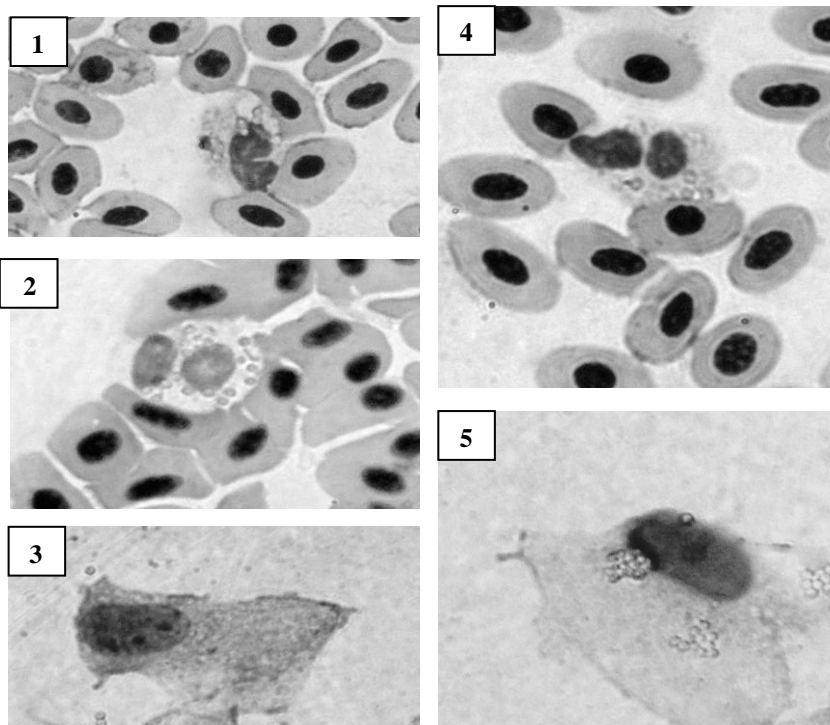


Рис. 17. Фагоцитоз. Эозинофил (1), псевдоэозинофилы (2,4) цыпленка с частицами латекса. Перитонеальные макрофаги (3,5), x1000.

Показатели лейкоцитарной формулы крови цыплят при введении Т-зависимого антигена в процессе первичного иммунного ответа ($M \pm m$)

Показатели	Контроль (n=20)				Опыт (n=20)			
	Сутки иммунного ответа							
	1	3	5	7	1	3	5	7
Базофилы, %	0,0	0,2±0,04	0,0	0,0	0,0	0,2±0,04	0,0	0,0
Эозинофилы,%	6,4±0,7	3,0±0,6	6,6±0,7	6,0±0,8	5,2±0,9	4,0±0,7	7,6±1,0	4,6±0,8
Псевдоэозинофилы,%	19,0±2,4	14,8±1,7	21,6±1,9	13,2±2,0	26,6±2,1	19,6±2,2	19,2±1,5	16,6±3,3
Моноциты,%	3,0±0,3	2,4±0,6	4,4±0,8	6,6±1,0	4,8±0,9	5,2±1,0	3,8±0,8	4,4±1,2
Лимфоциты,%	71,6±2,1	79,6±0,4	67,4±2,3	74,2±2,5	63,4±1,7	71,0±1,4	69,4±1,0	74,4±2,3
Коэффициент корреляции, r (Л/ПЭ)	-0,81				-0,97			
Л/ПЭ	3,7	5,4	3,1	5,6	2,4	3,6	3,6	4,5

Примечание: Л-лимфоциты, ПЭ – псевдоэозинофилы, r-коэффициент корреляции,

Из таблицы 2 видно, что введение 0,5% взвеси ЭБ не вызвало достоверных увеличений в показателях клеток крови, но наблюдалась тенденция к увеличению числа эозинофилов, псевдоэозинофилов и моноцитов.

Индекс соотношения относительного содержания лимфоцитов и псевдоэозинофилов в опытной группе имел тенденцию к снижению в 1-е, 3-и, 7-е сутки иммунного ответа по сравнению со значениями контрольной группы, что обусловлено перераспределением Т- и В-лимфоцитов из системной циркуляции во вторичные лимфоидные органы.

Был вычислен коэффициент корреляции, отражающий взаимосвязь между относительным содержанием лимфоцитов, как компонентов адаптивного иммунитета, и псевдоэозинофилов – показателей врожденной иммунной системы. В первичном иммуногенезе коэффициент корреляции в контрольной группе составил -0,81, в опытной группе -0,97. Отрицательный коэффициент корреляции между количеством лимфоцитов и псевдоэозинофилов является показателем адаптивных возможностей иммунной системы.

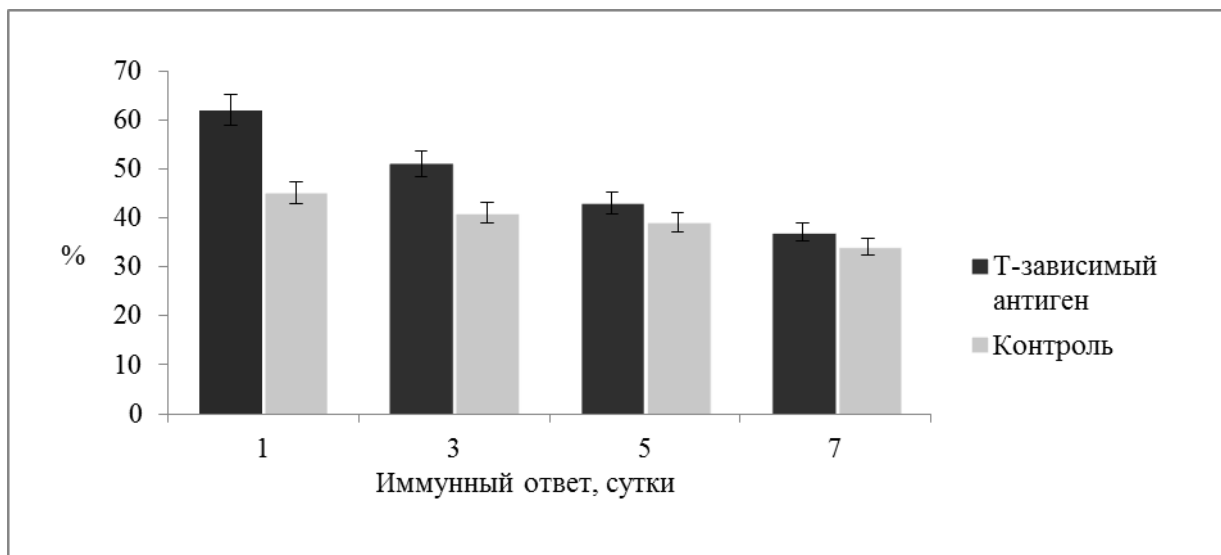


Рис. 18. Динамика уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови кур при первичном иммуногенезе на введение тимусзависимого антигена.

Согласно представленным данным (рис. 18) фагоцитарная активность клеток была выше по сравнению с контрольными значениями на всех этапах исследования.

Установлено, что развитие Т-зависимого иммунного ответа у кур имеет циклический характер, связанный с компенсаторными реакциями иммунной системы, то есть тенденция к снижению фагоцитарной активности на 3-и сутки иммунного ответа влечет за собой повышение количества В-клеток и, как следствие, уровня IgY в сыворотке крови кур (рис. 18, 19).

Динамика фагоцитарного числа в процессе первичного ответа на введение Т-зависимого антигена составила: $10,7 \pm 2,0$; $8,3 \pm 0,3$; $7,6 \pm 0,7$ и $10,8 \pm 1,7$. В контрольной группе - $10,5 \pm 0,5$; $7,7 \pm 1,0$; $7,3 \pm 0,9$ и $6,9 \pm 1,5$. Достоверных отличий в показателях поглотительной способности лейкоцитов опытной и контрольной групп не наблюдали.

Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов, $M \pm m$
(первичный иммунный ответ на введение Т-зависимого антигена)

Сутки иммунного ответа	Контроль (n=20)		Опыт (n=20)	
	ФА, %	ФЧ, ч.л.	ФА, %	ФЧ, ч.л.
1	44,0±3,6	6,2±1,2	38,5±2,3	15,0±0,4*
3	40,0±2,2	5,8±0,9	36,0±1,6	6,8±1,0
5	49,2±1,0	3,9±0,8	45,4±2,2	6,0±1,3
7	37,0±0,9	4,2±0,7	24,0±1,3	7,2±0,7

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Из данных таблицы 3 видно, что внутрибрюшинное введение Т-зависимого антигена не вызвало повышения уровня фагоцитоза перитонеальных макрофагов, но показатель поглотительной способности на 1-е сутки иммуногенеза был достоверно выше и составил $15,0 \pm 0,4\%$ (контроль — $6,2 \pm 1,2\%$).

Вычисление коэффициента корреляции не показало значимой взаимосвязи между параметрами фагоцитарной активности лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов в процессе первичного иммуногенеза.

Для оценки гуморального иммунного ответа на введение тимусзависимого антигена исследовали содержание IgY в сыворотке крови кур в РИД с помощью полученной моноспецифической антисыворотки.

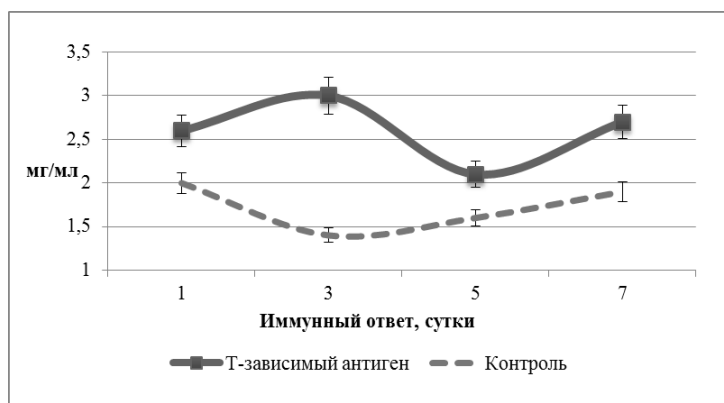


Рис. 19. Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови кур после введения Т-зависимого антигена.

Достоверное увеличение IgY на 3-и сутки первичного Т-зависимого иммуногенеза составило 3,1 мг/мл (контроль - 1,4 мг/мл). В остальные сутки

исследования опытной группы сохранялась динамика увеличения показателей по сравнению с контрольными значениями. Взаимосвязь показателей фагоцитарной активности лейкоцитов крови и содержания IgY в сыворотке крови кур отражает регуляторные аспекты функционирования иммунной системы.

На 1-е сутки иммунного ответа наблюдали повышение общего числа Т-лимфоцитов, CD4- и CD8-клеток в тимусе и крови опытной группы (табл. 4). На 3-и сутки сохранялась та же тенденция с достоверным увеличением количества CD4-клеток в крови ($34,0 \pm 1,7\%$, контроль - $20,0 \pm 0,4\%$). Кроме того, содержание

Т-хелперов селезенки также увеличилось на 3-и сутки ($28,4 \pm 1,3\%$, контроль - $14,2 \pm 0,9\%$). На 5-е сутки иммунного ответа в тимусе наблюдали увеличение числа CD4-клеток ($16,5 \pm 1,3\%$, контроль - $7,0 \pm 0,2\%$), а на 7-е сутки в тимусе регистрировали повышение содержания общего числа Т-лимфоцитов и CD8-клеток ($43,0 \pm 1,3\%$ и $40,0 \pm 1,2\%$ соответственно, контроль — $24,6 \pm 0,9\%$ и $22,6 \pm 1,8\%$ соответственно).

В результате проведенных исследований (табл. 4) установлено, что введение Т-зависимого антигена привело к увеличению числа цитотоксических Т-лимфоцитов в тимусе в процессе первичного иммунного ответа.

Количественные показатели относительного содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций в лимфоидных органах и крови кур в первичном Т-зависимом иммунном ответе ($M \pm m$)

Источник клеток	1-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=5)			Опыт (n=5)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	57,2±3,6	25,1±0,7	32,1±2,8	69,0±1,4	27,1±0,7	41,9±0,8
Бурса	21,3±1,0	11,2±1,5	10,1±0,1	22,6±2,0	7,0±0,4	15,6±1,3
Селезёнка	29,2±2,3	12,0±0,4	17,2±1,0	30,0±1,2	7,5±0,2	22,5±2,0
Кровь	32,0±0,9	21,4±1,2	10,6±1,2	41,0±2,7	26,0±1,3	15,0±2,2
Источник клеток	3-и сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=5)			Опыт (n=5)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	61,4±1,3	16,2±0,7	45,2±2,2	65,0±2,9	22,5±1,6	42,5±1,0
Бурса	22,0±1,8	8,4±0,5	13,6±2,4	20,5±0,7	10,5±1,0	10,0±0,2
Селезёнка	26,0±0,6	14,2±0,9	11,8±1,4	34,6±1,5	28,4±1,3*	6,2±1,0
Кровь	22,0±1,5	20,0±0,4	2,0±0,1	36,9±1,9	34,0±1,7*	2,9±1,0

Источник клеток	5-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=5)			Опыт (n=5)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	64,0±2,7	7,0±0,2	57,0±1,6	58,0±1,8	16,5±1,3*	41,5±1,6
Бурса	12,0±1,6	29,0±1,7	0,0	14,6±0,4	40,0±2,8	0,0
Селезёнка	43,4±2,2	18,6±0,7	24,8±1,2	30,8±1,5	8,4±1,8	20,4±0,7
Кровь	47,0±1,4	20,2±1,6	26,8±1,9	26,2±1,9	8,2±1,4	18,0±0,3
Источник клеток	7-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=5)			Опыт (n=5)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	24,6±0,9	2,0±0,1	22,6±1,8	43,0±1,3*	3,0±0,2	40,0±1,2*
Бурса	14,0±1,5	18,0±2,4	0,0	6,0±0,4	10,0±1,6	0,0
Селезёнка	12,4±0,7	7,0±1,0	5,4±0,8	14,2±1,2	10,0±1,4	4,2±1,0
Кровь	12,2±1,3	4,0±1,7	8,2±0,4	18,4±1,6	10,2±2,5	8,2±1,6

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

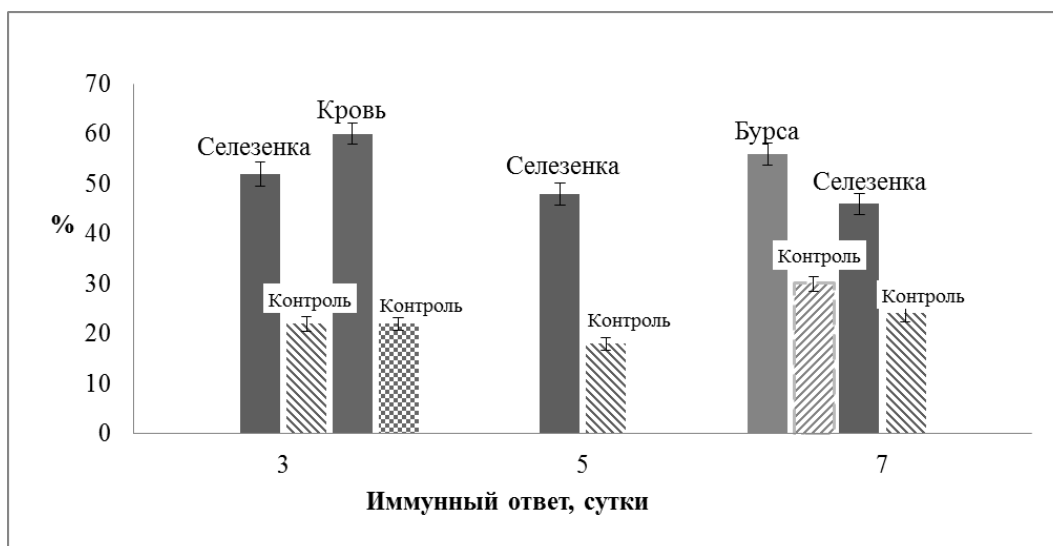


Рис. 20. Динамика количества В-лимфоцитов в органах иммунной системы и крови в процессе первичного Т-зависимого иммунного ответа.

На диаграмме (рис. 20) видно, что на 3-и сутки иммуногенеза содержание В-клеток в крови увеличилось более чем в 2,5 раза ($55,0 \pm 1,4\%$, контроль – $22,1 \pm 0,9\%$). В селезенке число В-лимфоцитов на 3-и, 5-е и 7-е сутки также повысилось и составило $52,0 \pm 2,4\%$, $48,1 \pm 1,9\%$ и $46,0 \pm 1,3\%$ (контроль – $22,0 \pm 0,9\%$, $18,0 \pm 1,4\%$, $24,4 \pm 2,3\%$ соответственно). На 7-е сутки достоверно увеличилось содержание В-лимфоцитов в бурсе ($56,2 \pm 1,7\%$, контроль – $30,0 \pm 1,4\%$).

Таким образом, внутрибрюшинное введение Т-зависимого антигена вызывало активную пролиферацию В-лимфоцитов в селезенке, крови и бурсе, что коррелировало с уровнем IgY в крови в процессе первичного иммунного ответа (рис. 19).

Проведя анализ экспериментальных данных первичного иммунного ответа у кур на введение Т-зависимого антигена, можно сделать вывод о сохранении отрицательной корреляции между количеством лимфоцитов и псевдоэозинофилов, что является показателем адаптивных возможностей иммунной системы. Показана компенсаторная связь между уровнем фагоцитарной активности лейкоцитов крови, относительным содержанием В-клеток в крови, селезенке и увеличением содержания IgY в сыворотке крови.

Показатели лейкоцитарной формулы крови цыплят при введении Т-зависимого антигена в процессе вторичного иммунного ответа (M±m)

Показатели	Контроль (n=20)				Опыт (n=20)			
	Сутки иммунного ответа							
	1	3	5	7	1	3	5	7
Базофилы, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4±0,04	0,0	0,0	0,0
Эозинофилы, %	4,6±0,6	5,6±0,7	7,6±0,8	3,4±0,6	9,8±1,5	7,0±1,7	5,4±1,4	6,6±1,0
Псевдоэозинофилы, %	20,0±2,2	16,6±1,9	24,4±1,0	20,4±1,6	15,0±2,2	22,6±1,5	24,2±0,7	30,2±1,6
Моноциты, %	2,6±0,8	7,8±1,0	4,8±0,4	3,8±0,3	4,8±1,0	10,4±2,4	7,2±0,7	5,8±1,3
Лимфоциты, %	72,8±2,4	70,0±2,3	63,2±1,9	72,4±2,6	70,0±3,3	60,0±2,1	63,2±2,7	57,4±1,6
Коэффициент корреляции, r (Л/ПЭ)	-0,67				-0,93			
Л/ПЭ	3,6	4,2	2,5	3,5	4,7	2,7	2,5	1,9

Примечание: Л-лимфоциты, ПЭ – псевдоэозинофилы, r- коэффициент корреляции.

Из данных таблицы 5 видно, что введение антигена не вызвало достоверных увеличений в лейкограмме, но наблюдалась тенденция к увеличению числа эозинофилов, псевдоэозинофилов, моноцитов на протяжении всего периода исследования.

Индекс соотношения лимфоцитов и псевдоэозинофилов в опытной группе имел аналогичную тенденцию снижения на 3-и, 5-е и 7-е сутки иммунного ответа по сравнению со значениями контрольной группы, что обусловлено увеличением количества клеток врожденного иммунитета.

Коэффициент корреляции между относительным содержанием лимфоцитов и псевдоэозинофилов в контрольной группе был несколько ниже, чем в опытных группах. Повышение отрицательной взаимосвязи показателей обусловлено введением антигена.

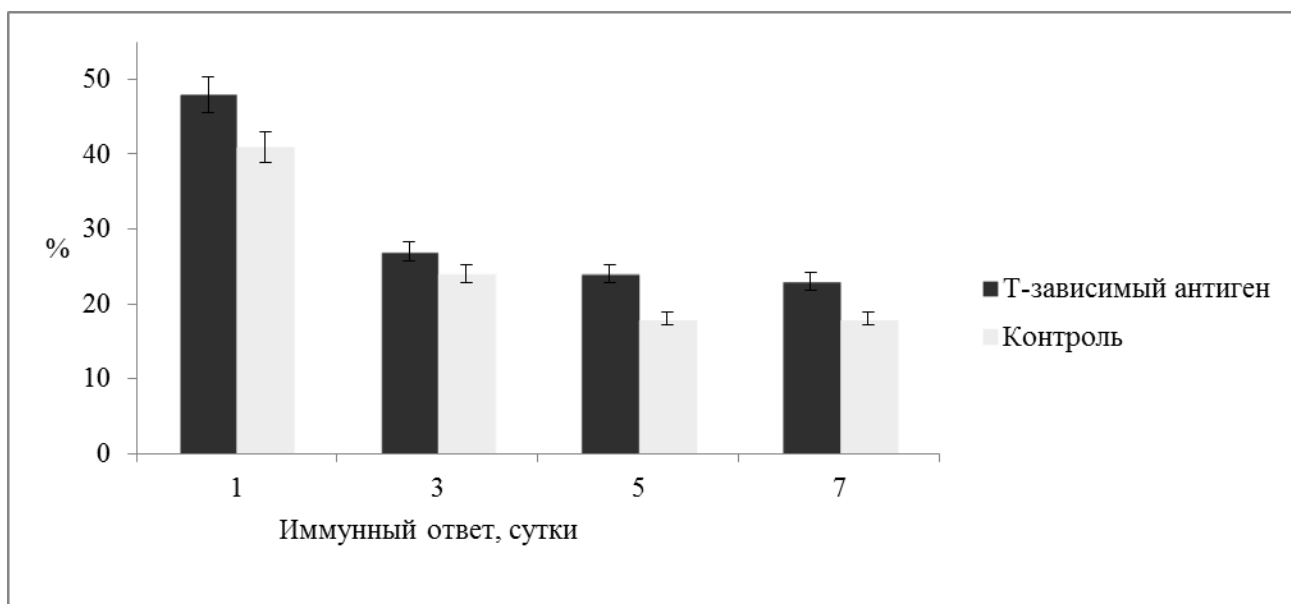


Рис. 21. Фагоцитарная активность лейкоцитов крови в процессе вторичного иммунного ответа.

На диаграмме (рис. 21) видно, что повторное введение 0,5% взвеси эритроцитов барана вызвало повышение уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови на 1-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки вторичного иммуногенеза.

Среди данных по поглотительной способности фагоцитов крови достоверных отличий от контрольной группы не наблюдалось (5,4±0,4; 7,1±1,0; 7,2±1,1; 4,1±0,9; контроль - 6,2±1,2; 5,8±0,9; 3,9±0,8; 4,2±0,7).

Таблица 6

Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов, $M \pm m$
(вторичный иммунный ответ на введение Т-зависимого антигена)

Сутки иммунного ответа	Контроль (n=20)		Опыт (n=20)	
	ФА, %	ФЧ, ч.л.	ФА, %	ФЧ, ч.л.
1	36,0±0,9	7,5±0,4	38,0±1,6	4,0±0,2
3	20,1 ±1,7	5,0±1,3	30,0±0,9*	7,2±1,6
5	21,0±1,1	9,0±1,6	20,6±1,4	5,1±0,2
7	16,3±2,6	1,9±0,3	19,0±0,7	3,0±0,1

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

В таблице 6 приведены значения фагоцитарной активности макрофагов перитонеального экссудата кур в процессе вторичного иммуногенеза. Согласно данным повторное введение антигена вызвало достоверное повышение

фагоцитарной активности макрофагов на 3-и сутки иммуногенеза. В остальные сутки иммунного ответа достоверных отличий от контрольной группы не наблюдалось.

В опытной группе при расчете коэффициента корреляции между уровнями фагоцитоза лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов во вторичном иммуногенезе была установлена сильная положительная взаимосвязь ($r = 0,9$), что свидетельствует об адекватном состоянии фагоцитарной системы организма.

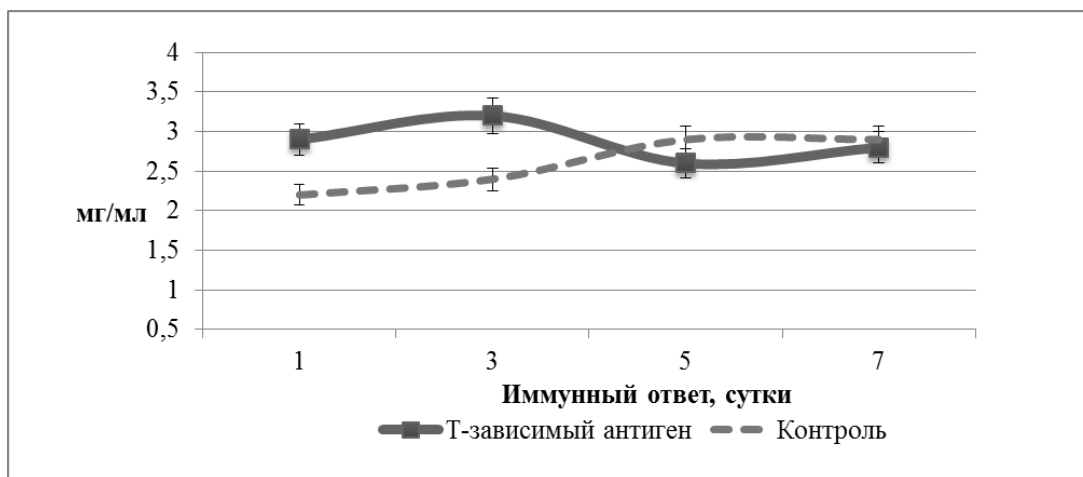


Рис. 22. Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови кур в процессе вторичного иммуногенеза.

На графике (рис. 22) видно, что достоверных отличий от контрольной группы не наблюдали, но в 1-е и 3-и сутки иммунного ответа содержание иммуноглобулина Y повышалось по сравнению с контрольными значениями (1-е сутки – $2,9 \pm 0,08$ мг/мл, 3-и сутки – $3,1 \pm 0,07$ мг/мл, контроль – $2,2 \pm 0,06$ мг/мл, $2,5 \pm 0,05$ мг/мл соответственно).

**Количественные показатели Т-лимфоцитов и их субпопуляций в лимфоидных органах и крови кур
во вторичном Т-зависимом иммунном ответе, М±m**

Источник клеток	1-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	50,0±2,7	24,2±1,3	25,8±1,1	44,4±0,7	26,0±3,0	18,4±1,2
Бурса	24,7±1,4	34,0±3,6	0,0	16,0±1,0	24,0±2,8	0,0
Селезёнка	34,6±1,8	26,2±2,5	8,4±0,3	22,0±0,4	24,5±3,2	0,0
Кровь	16,0±0,9	14,0±0,7	2,0±0,3	16,0±1,2	12,5±1,0	3,5±01
Источник клеток	3-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	61,4±1,3	16,2±0,7	45,2±2,2	52,0±4,2	22,0±1,6	30,0±0,9
Бурса	22,0±1,8	18,4±0,5	3,6±0,4	20,6±1,4	28,0±4,0	0,0
Селезёнка	26,0±0,6	14,2±0,9	11,8±1,4	31,5±2,0	26,3±1,4*	5,2±0,7
Кровь	22,0±1,5	20,0±0,4	2,0±0,1	24,0±1,3	41,0±2,3*	0,0

Источник клеток	5-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	48,2±0,5	8,4±1,6	39,8±2,3	49,5±2,3	5,4±1,2	44,1±0,7
Бурса	22,6±0,4	12,5±1,2	10,1±0,7	18,0±2,2	14,0±1,0	4,0±0,2
Селезёнка	32,0±0,8	7,0±0,4	25,0±1,6	23,0±0,9	8,0±0,4	15,0±0,4
Кровь	30,0±2,7	9,0±1,4	21,0±2,8	35,8±1,3	20,6±0,9*	15,2±1,2
Источник клеток	7-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	48,2±0,5	8,4±1,6	39,8±2,3	32,8±1,0	7,0±0,9	25,8±1,4
Бурса	22,6±0,4	10,5±1,2	12,1±0,7	24,5±0,4	10,0±1,1	14,5±1,2
Селезёнка	32,0±0,8	7,0±0,4	25,0±1,6	40,6±1,7	11,0±2,0	29,6±1,4
Кровь	40,0±2,7	9,0±1,4	31,0±2,8	38,8±2,6	9,0±1,2	29,8±2,9

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Согласно данным таблицы 7 на 3-и сутки иммунного ответа достоверно повышалось содержание Т-хелперов в селезенке и крови ($26,3\pm 1,4\%$ и $41,0\pm 2,3\%$ соответственно, контроль – $14,2\pm 0,9\%$ и $20,0\pm 0,4\%$). На 5-е сутки достоверно повышалось содержание CD4-клеток в крови ($20,6\pm 0,9\%$, контроль - $9,0\pm 1,4\%$). В остальные сутки исследования достоверных отличий от контрольной группы не наблюдали.

Установлено, что введение Т-зависимого антигена в первичном и вторичном иммуногенезе привело к увеличению цитотоксических Т-лимфоцитов в тимусе (табл.7). Характер соотношения CD4- и CD8-клеток в 1-е и 3-и сутки иммунного ответа в крови и селезенке соответствовал уровню IgY в сыворотке крови кур (рис. 22).

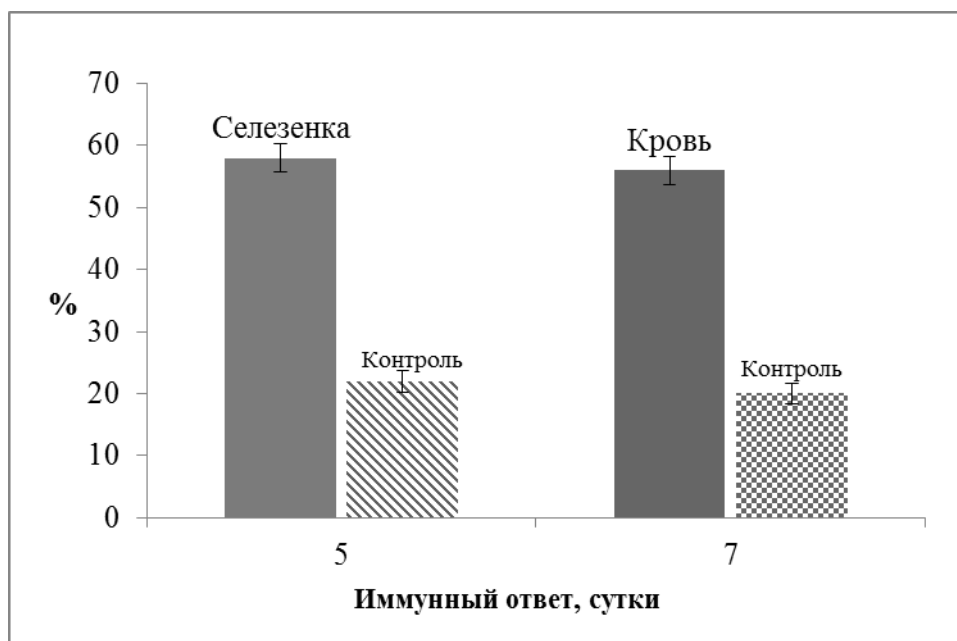


Рис. 23. Динамика числа В-лимфоцитов в селезенке и крови кур в процессе вторичного иммунного ответа.

На диаграмме (рис. 23) показано, что на 5-е сутки исследования количество В-спленоцитов увеличилось более чем в 2,5 раза ($58,0\pm 1,6\%$ контроль – $22,0\pm 1,6\%$), кроме того содержание В-лимфоцитов в крови на 7-е сутки также достоверно повышалось ($56,0\pm 2,8\%$, контроль – $20,0\pm 1,5\%$).

В процессе вторичного иммунного ответа у кур на введение Т-зависимого антигена сохранялась отрицательная корреляция между количеством лимфоцитов и псевдоэозинофилов ($r = -0,93$).

При расчете коэффициента корреляции между уровнями фагоцитоза лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов была установлена положительная взаимосвязь ($r = 0,9$), что обусловлено общим снижением фагоцитарной активности клеток.

4.3.2. Динамика количественных показателей Т-независимого иммунного ответа у кур

В качестве модели Т-независимого антигена 2 типа (ТН-2) был использован 2,0 % раствор поливинилпирролидона (750 кДа), характеризующийся содержанием большого количества повторяющихся детерминант на поверхности крупных полимерных молекул. Т-независимые антигены 1 типа вызывают поликлональную В-клеточную активацию, а во вторичном иммунном ответе продуцируется IgM, а не IgG, как при введении Т-зависимых антигенов [110, 119]. Для развития иммунного ответа на тимуснезависимые антигены 2 типа необходима опосредованная Т-клеточная помощь [22, 57].

Показатели лейкоцитарной формулы крови цыплят при введении Т-независимого антигена в процессе первичного иммунного ответа (M±m)

Показатели	Контроль (n=20)				Опыт (n=20)			
	Сутки иммунного ответа							
	1	3	5	7	1	3	5	7
Базофилы, %	0,0	0,2±0,04	0,0	0,0	0,0	0,2±0,04	0,0	0,0
Эозинофилы, %	6,4±0,7	3,0±0,6	6,6±0,7	6,0±0,8	3,8±0,9	5,6±1,5	5,4±1,2	6,6±0,8
Псевдоэозинофилы, %	19,0±2,4	14,8±1,7	21,6±1,9	13,2±2,0	22,8±4,9	16,6±3,7	16,8±2,5	18,8±2,9
Моноциты, %	3,0±0,3	2,4±0,6	4,4±0,8	6,6±1,0	5,2±0,6	2,0±0,6	7,4±1,9	3,6±0,2
Лимфоциты, %	71,6±2,1	79,6±0,4	67,4±2,3	74,2±2,5	68,2±5,7	73,6±3,3	70,4±3,2	71,0±3,7
Коэффициент корреляции, r (Л/ПЭ)	-0,81				-0,82			
Л/ПЭ	3,7	5,4	3,1	5,6	3,0	3,2	4,2	3,8

Примечание: Л-лимфоциты, ПЭ – псевдоэозинофилы, r- коэффициент корреляции.

Из данных таблицы 8 видно, что введение 2,0% раствора ПВП не вызвало достоверных увеличений показателей крови, но наблюдалась тенденция к увеличению числа эозинофилов, псевдоэозинофилов и моноцитов.

Индекс соотношения лимфоцитов и псевдоэозинофилов в опытной группе снижался в 1-е, 3-и, 7-е сутки иммунного ответа по сравнению со значениями контрольной группы, что, по-видимому, обусловлено перераспределением Т- и В-лимфоцитов во вторичные лимфоидные органы в процессе иммунного ответа.

Был вычислен коэффициент корреляции, отражающий взаимосвязь между лимфоцитами и псевдоэозинофилами. В процессе иммунного ответа коэффициент корреляции в контрольной группе составил -0,81, а в опытной группе -0,97. Отрицательные показатели коэффициента корреляции отражали обратную зависимость врожденных и адаптивных компонентов иммунной системы в ответ на Т-независимый антиген.

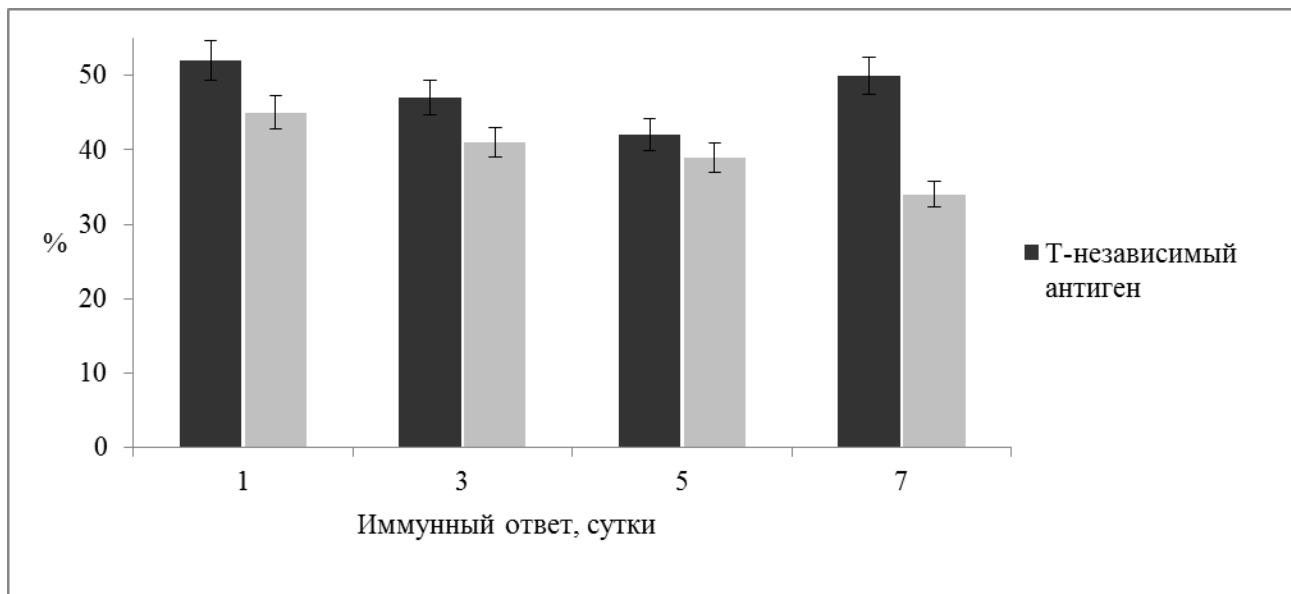


Рис. 24. Динамика уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови кур в процессе первичного иммунного ответа.

Согласно представленным данным (рис. 24) фагоцитарная активность лейкоцитов крови при введении Т-независимого антигена была выше по сравнению с контрольными значениями на всех этапах исследования. На 7-е сутки фагоцитарная активность клеток достоверно увеличивалась по сравнению с контролем, и составила $50,0 \pm 5,4\%$ (контроль – $34,0 \pm 2,2\%$).

Результаты исследования показывают, что уровень фагоцитарной активности при введении Т-независимого антигена не снижался в течение 7-и суток исследования, что коррелировало с концентрацией IgY в сыворотке крови ($r = 0,89$) в процессе первичного иммунного ответа (рис. 25).

Динамика показателей фагоцитируемых частиц в процессе первичного ответа опытной группы Т-независимого антигена составила: $8,8 \pm 1,2$; $8,6 \pm 1,5$; $8,1 \pm 1,7$; $8,1 \pm 1,7$ (контроль - $10,5 \pm 0,5$; $7,7 \pm 1,0$; $7,3 \pm 0,9$ и $6,9 \pm 1,5$). Достоверных отличий в показателях опытной группы от контрольной не было.

Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов, $M \pm m$
(первичный иммунный ответ на введение Т-независимого антигена)

Сутки иммунного ответа	Контроль (n=20)		Опыт (n=20)	
	ФА, %	ФЧ, ч.л.	ФА, %	ФЧ, ч.л.
1	44,0±3,6	6,2±1,2	50,0±0,8	4,2±0,5
3	40,0±2,2	5,8±0,9	49,2±0,7	2,6±0,9
5	49,2±1,0	3,9±0,8	46,0±0,5	7,3±1,8
7	37,0±0,9	4,2±0,7	40,4±2,1	4,0±0,3

Из данных таблицы 9 видно, что внутрибрюшинное введение Т-независимого антигена способствовало активации макрофагов в течение 7-и суток первичного иммунного ответа. Вычисление коэффициента корреляции не показало взаимосвязи между уровнями фагоцитарной активности лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов кур в отличие от данного показателя в процессе Т-зависимого иммунного ответа.

Для оценки гуморального иммунного ответа на введение тимуснезависимого антигена определяли содержание IgY в сыворотке крови кур.

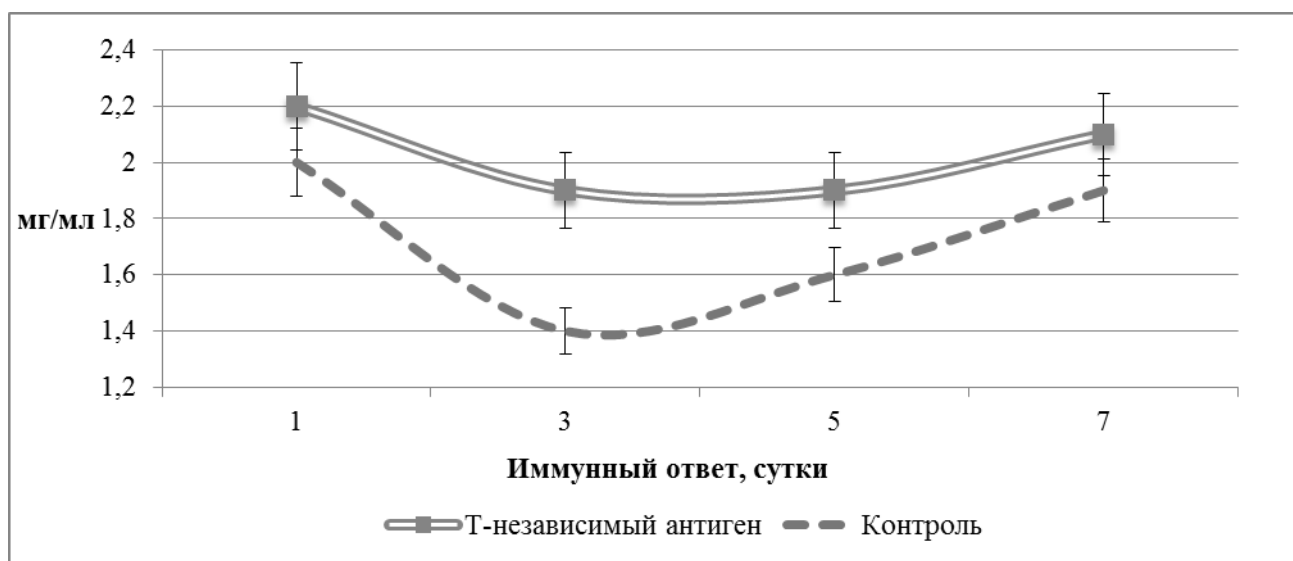


Рис. 25. Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови кур в процессе Т-независимого иммунного ответа.

Согласно рисунку 25, введение Т-независимого антигена не вызвало достоверного увеличения количества иммуноглобулина Y, но его содержание на 3-и, 5-е и 7-е сутки исследования было выше, чем контрольные показатели.

Вычисление коэффициента корреляции не показало взаимосвязи между уровнями фагоцитарной активности лейкоцитов крови и содержанием IgY в сыворотке крови в процессе первичного иммунного ответа на данный антиген.

Согласно представленным данным в таблице 10 относительное содержание Т-клеток и их субпопуляций на 1-е сутки исследования повысилось в селезенке и крови. На 3-и сутки иммунного ответа эта тенденция сохранялась при достоверном увеличении числа Т-лимфоцитов и CD8-клеток в крови (Т-лимфоциты - $52,6 \pm 2,9\%$; CD8-клетки - $36,4 \pm 2,2\%$, контроль - $22,0 \pm 1,5\%$ и $2,0 \pm 0,1\%$ соответственно). На 5-е сутки достоверно увеличивалось количество CD4-клеток в тимусе до $19,7 \pm 2,2\%$ (контроль - $7,0 \pm 0,2\%$). На 7-е сутки достоверно повышалось общее число Т-лимфоцитов и CD8-клеток в тимусе (Т-лимфоциты - $48,5 \pm 1,3\%$; CD8-клетки - $43,0 \pm 1,4\%$; контроль - $24,6 \pm 0,9\%$ и $22,6 \pm 1,8\%$ соответственно) и в крови (Т-лимфоциты - $22,4 \pm 1,5\%$; CD8-клетки - $16,4 \pm 2,2\%$; контроль - $12,2 \pm 1,3\%$ и $8,2 \pm 0,4\%$ соответственно).

В результате проведенных исследований (табл. 10) установлено, что введение поливинилпирролидона привело к увеличению цитотоксических Т-лимфоцитов в процессе первичного иммунного ответа в тимусе. В селезенке и крови иммунорегуляторный индекс имел циклический характер, что связано с перераспределением иммунокомпетентных клеток из циркуляции во вторичные лимфоидные органы.

Количественные показатели относительного содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций в лимфоидных органах и крови кур в процессе первичного Т-независимого иммунного ответа ($M \pm m$)

Источник клеток	1-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=5)			Опыт (n=5)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	57,2±3,6	25,1±0,7	32,1±2,8	54,0±1,6	17,2±0,4	36,8±2,8
Бурса	21,3±1,0	11,2±1,5	10,1±0,1	16,8±2,0	18,2±1,4	0,0
Селезёнка	29,2±2,3	12,0±0,4	17,2±1,0	45,0±2,1	22,0±0,5	23,0±2,4
Кровь	32,0±0,9	21,4±1,2	10,6±1,2	49,5±2,7	28,2±3,0	21,3±0,9
Источник клеток	3-и сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=5)			Опыт (n=5)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	61,4±1,3	16,2±0,7	45,2±2,2	52,6±1,4	18,2±0,6	34,4±1,7
Бурса	22,0±1,8	8,4±0,5	13,6±2,4	12,3±0,9	14,5±1,0	0,0
Селезёнка	26,0±0,6	14,2±0,9	11,8±1,4	32,7±0,8	17,4±1,2	15,3±2,0
Кровь	22,0±1,5	20,0±0,4	2,0±0,1	52,6±2,9*	16,2±1,5	36,4±2,2*

Источник клеток	5-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=5)			Опыт (n=5)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	64,0±2,7	7,0±0,2	57,0±1,6	63,9±2,6	19,7±2,2*	44,2±2,3
Бурса	12,0±1,6	29,0±1,7	0,0	10,7±1,4	20,0±3,0	0,0
Селезёнка	43,4±2,2	18,6±0,7	24,8±1,2	38,5±1,4	14,0±0,9	24,5±1,2
Кровь	47,0±1,4	20,2±1,6	26,8±1,9	31,6±2,6	26,4±2,0	5,2±0,5
Источник клеток	7-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=5)			Опыт (n=5)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	24,6±0,9	2,0±0,1	22,6±1,8	48,5±1,3*	5,5±0,2	43,0±1,4*
Бурса	14,0±1,5	18,0±2,4	0,0	10,6±0,7	9,0±1,2	1,6±0,9
Селезёнка	12,4±0,7	7,0±1,0	5,4±0,8	11,0±1,1	5,0±1,4	6,0±0,5
Кровь	12,2±1,3	4,0±1,7	8,2±0,4	22,4±1,5*	6,0±1,0	16,4±2,2*

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

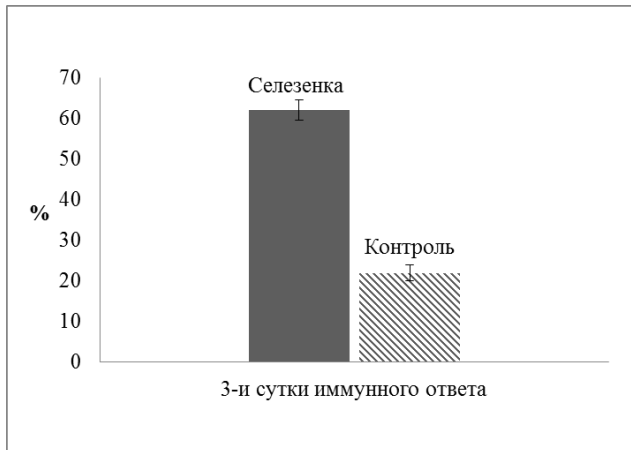


Рис. 26. Относительное содержание В-спленоцитов в процессе первичного Т-независимого иммунного ответа.

Согласно диаграмме (рис. 26) на 3-и сутки достоверно увеличилось содержание В-лимфоцитов в селезенке цыплят ($62,0 \pm 2,4\%$, контроль – $22,0 \pm 1,0\%$), при этом тенденция к увеличению сохранялась до 7-х суток иммунного ответа. На 5-е сутки первичного иммуногенеза наблюдалось повышение содержания В-клеток в бурсе. В остальные сутки исследования достоверных различий в показателях опытной группы от контрольной не было.

Таким образом, введение Т-независимого антигена в процессе первичного иммунного ответа не вызвало достоверных изменений показателей лейкограммы, но способствовало увеличению числа лейкоцитов крови и макрофагов в течение 7-и суток первичного иммунного ответа.

Показатели лейкоцитарной формулы крови цыплят Т-независимого в процессе вторичного Т-независимого иммунного ответа ($M \pm m$)

Показатели	Контроль (n=20)				Опыт (n=20)			
	Сутки иммунного ответа							
	1	3	5	7	1	3	5	7
Базофилы, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2±0,04	0,0	0,0	0,0
Эозинофилы, %	4,6±0,6	5,6±0,7	7,6±0,8	3,4±0,6	4,4±1,0	3,6±0,8	3,6±0,7	4,8±0,7
Псевдоэозинофилы, %	20,0±2,2	16,6±1,9	24,4±1,0	20,4±1,6	18,8±1,5	18,6±2,2	28,0±1,7	28,8±0,9
Моноциты, %	2,6±0,8	7,8±1,0	4,8±0,4	3,8±0,3	4,6±0,8	6,4±1,3	4,4±0,5	6,0±0,7
Лимфоциты, %	72,8±2,4	70,0±2,3	63,2±1,9	72,4±2,6	72,0±2,1	71,4±2,2	64,0±0,5	60,4±1,1
Коэффициент корреляции, r (Л/ПЭ)	-0,67				-0,98			
Л/ПЭ	3,6	4,2	2,5	3,5	3,8	3,8	2,3	2,1

Примечание: Л-лимфоциты, ПЭ – псевдоэозинофилы, r - коэффициент корреляции.

Из данных таблицы 11 видно, что введение антигена не вызвало достоверных увеличений в лейкограмме, но наблюдалась тенденция к увеличению числа эозинофилов, псевдоэозинофилов, моноцитов на протяжении всего периода исследований. Индекс соотношения лимфоцитов и псевдоэозинофилов был ниже в 3-и, 5-е и 7-е сутки иммунного ответа по сравнению со значениями контрольной группы, что обусловлено увеличением количества клеточных факторов врожденного звена иммунитета. Повышение корреляции показателей лимфоцитов и псевдоэозинофилов (опыт – $r = -0,67$, контроль – $r = -0,98$) обусловлено воздействием антигена.

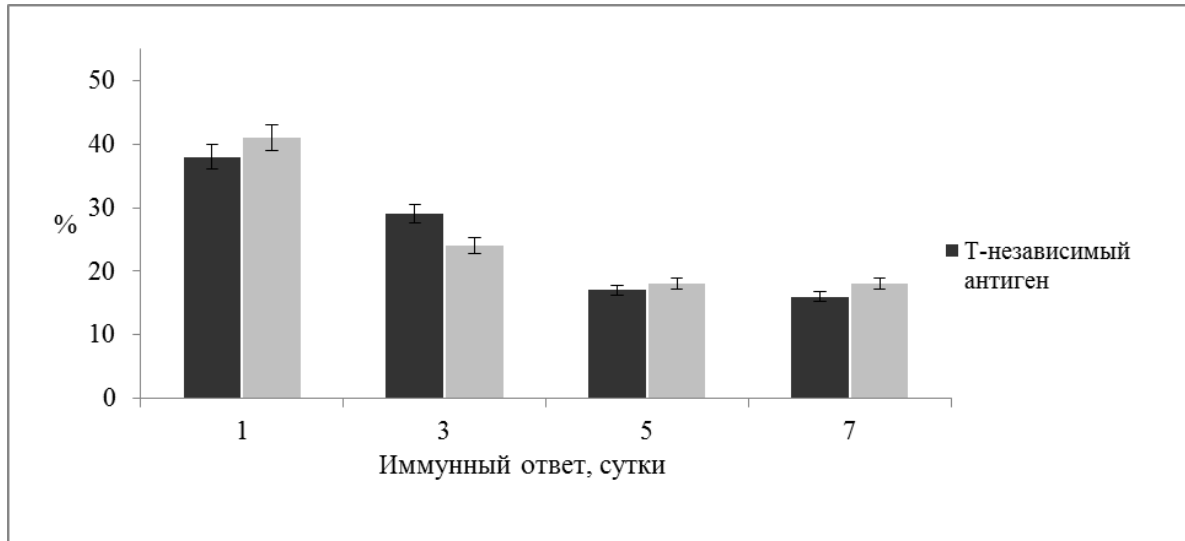


Рис. 27. Показатели уровня фагоцитарной активности в процессе вторичного иммунного ответа.

На диаграмме (рис. 27) видно, что введение антигена способствовало повышению уровня фагоцитарной активности лишь на 3-и сутки иммунного ответа, в остальной период исследования его значения не превышали контрольных. Среди данных по поглотительной способности фагоцитов крови достоверных отличий от контрольной группы не наблюдалось. Была установлена взаимосвязь между уровнем фагоцитарной активности лейкоцитов крови и содержанием IgY в сыворотке крови ($r = -0,57$), которая показывает, что снижение активности лейкоцитов соответствует повышению концентрации IgY.

Таблица 12

Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов, $M \pm m$
(вторичный иммунный ответ на введение Т-независимого антигена)

Сутки иммунного ответа	Контроль (n=20)		Опыт (n=20)	
	ФА, %	ФЧ, ч.л.	ФА, %	ФЧ, ч.л.
1	36,0±0,9	7,5±0,4	25,4±0,9	5,0±1,1
3	20,1 ±1,7	5,0±1,3	32,4±0,7*	6,3±2,0
5	21,0±1,1	9,0±1,6	30,3±1,4*	3,7±0,6
7	16,3±2,6	1,9±0,3	20,0±1,2	5,0±0,4

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Согласно данным (табл. 12) повторное введение антигена вызвало активацию макрофагов на 3-и и 5-е сутки ($32,4 \pm 0,7\%$ - на 3-и сутки, $30,3 \pm 1,4$ – на 5-е сутки; контроль $-20,1 \pm 1,7\%$ и $21,0 \pm 1,1\%$ соответственно). В остальной период исследования достоверных отличий от контрольной группы не было.

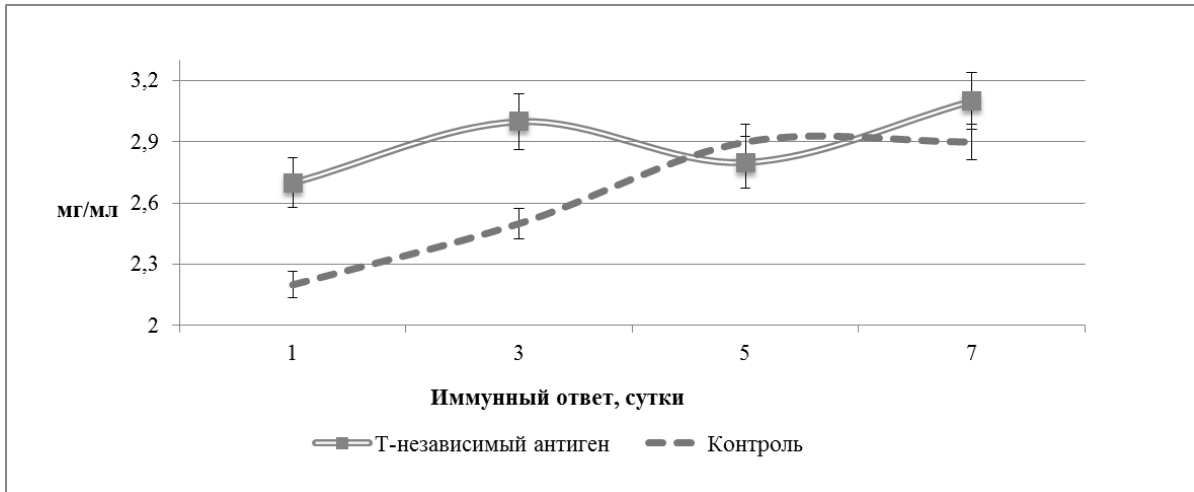


Рис. 28. Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови в процессе вторичного иммуногенеза.

На графике (рис. 28) отражены изменения концентрации IgY при повторном введении Т-независимого антигена. Достоверных отличий от контрольной группы не наблюдалось, но в 1-е и 3-и и 7-е сутки иммунного ответа отмечалось незначительное повышение содержания иммуноглобулина Y по сравнению с контрольными значениями. Это свидетельствует об участии Т-клеточных факторов в развитии иммунного ответа на Т-независимый антиген 2 типа.

Количественные показатели Т-лимфоцитов и их субпопуляций в лимфоидных органах и крови кур в процессе вторичного Т-независимого иммунного ответа, $M \pm m$

Источник клеток	1-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	50,0±2,7	24,2±1,3	25,8±1,1	34,0±1,3	16,0±1,6	18,0±0,9
Бурса	24,7±1,4	34,0±3,6	0,0	18,0±0,4	22,5±1,4	0,0
Селезёнка	34,6±1,8	26,2±2,5	8,4±0,3	28,5±0,9	16,2±0,2	12,3±1,8
Кровь	16,0±0,9	14,0±0,7	2,0±0,3	50,8±2,6*	32,5±0,9*	18,3±1,7*
Источник клеток	3-и сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	61,4±1,3	16,2±0,7	45,2±2,2	49,5±3,0	28,4±2,2	21,1±0,9
Бурса	22,0±1,8	18,4±0,5	3,6±0,4	20,0±0,7	22,0±1,3	0,0
Селезёнка	26,0±0,6	14,2±0,9	11,8±1,4	32,6±1,8	32,0±2,3*	0,0
Кровь	22,0±1,5	20,0±0,4	2,0±0,1	20,0±1,3	47,5±2,8*	0,0

Источник клеток	5-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	48,2±0,5	8,4±1,6	39,8±2,3	42,9±2,4	10,0±0,5	36,9±2,5
Бурса	22,6±0,4	12,5±1,2	10,1±0,7	14,0±1,0	15,4±2,5	40±0,5
Селезёнка	32,0±0,8	7,0±0,4	25,0±1,6	42,8±3,2	24,4±2,8	27,4±1,6
Кровь	30,0±2,7	9,0±1,4	21,0±2,8	29,8±2,2	10,0±1,4	19,8±1,3
Источник клеток	7-е сутки иммунного ответа					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%	Т-клетки, %	CD4,%	CD8,%
Тимус	48,2±0,5	8,4±1,6	39,8±2,3	37,8±3,5	10,0±1,4	28,7±2,7
Бурса	22,6±0,4	10,5±1,2	12,1±0,7	17,6±3,0	16,0±2,5	1,6±0,7
Селезёнка	32,0±0,8	7,0±0,4	25,0±1,6	32,0±1,4	24,0±2,6	8,0±0,7
Кровь	40,0±2,7	9,0±1,4	31,0±2,8	22,7±3,8	9,0±2,0	13,7±1,4

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Согласно представленным данным (табл. 13) на 1-е сутки иммунного ответа наблюдалось достоверное повышение общего количества Т-лимфоцитов, CD4- и CD8-клеток в крови опытной группы ($50,8 \pm 2,6\%$; $32,5 \pm 0,9\%$; $18,3 \pm 1,7\%$ соответственно, контроль — $16,0 \pm 1,2\%$, $12,5 \pm 1,0\%$ и $3,5 \pm 0,1\%$).

На 3-и сутки иммунного ответа достоверно повышалось содержание Т-хелперов в селезенке, которое увеличилось более чем в 2 раза ($32,0 \pm 2,3\%$, контроль — $14,2 \pm 0,9\%$) и в крови ($47,5 \pm 2,8\%$; контроль — $20,0 \pm 0,4\%$).

В остальные сутки исследования достоверных отличий от контрольной группы не наблюдалось.

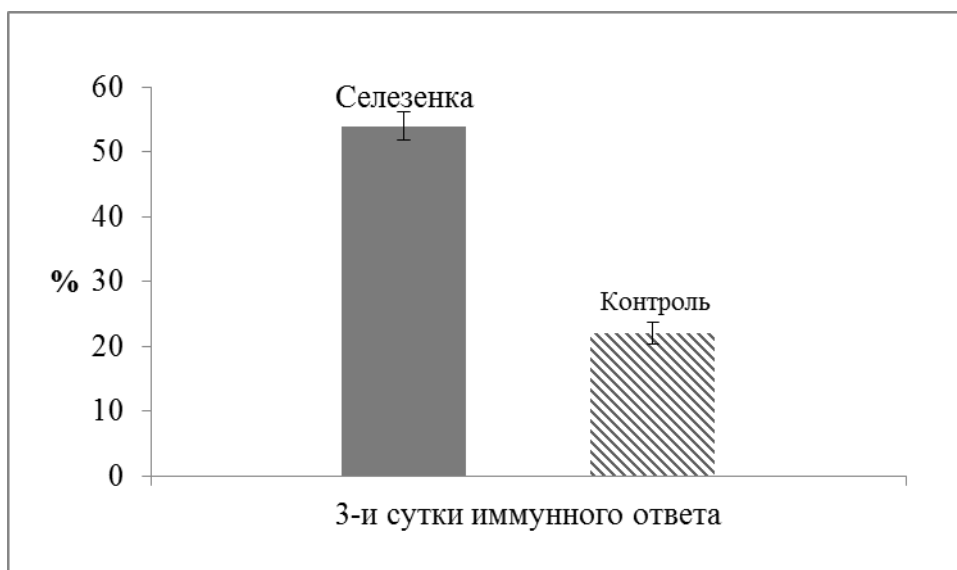


Рис. 29. Относительное содержание В-спленоцитов в процессе вторичного Т-независимого иммунного ответа.

Согласно приведенным значениям диаграммы (рис. 29) достоверное увеличение количества В-спленоцитов наблюдалось на 3-и сутки и составило $52,0 \pm 1,6\%$ (контроль — $22,3 \pm 0,9\%$) на 5-е и 7-е сутки тенденция увеличения сохранялась (рис. 28).

4.3.3. Основные иммунологические показатели в процессе Т-зависимого и Т-независимого иммунного ответа у кур под влиянием сезонных факторов

Таблица 14

Основные иммунологические показатели Т-зависимого иммунного ответа у кур в зимний и весенний периоды года при первичном введении антигена. Возраст цыплят 7 суток ($M \pm m$)

Лейкоцитарная формула						Фагоцитарная активность крови		Количество В-клеток крови, %	Количество IgY (мг/мл)
Группа (n=5)	Б,%	Э,%	ПЭ,%	М,%	Л,%	ФА,%	ФЧ, ч.л.		
Зимний период	0,4±0,04	4,0±0,6	18,0±1,2	8,6±1,5	63,0±0,8	46,0±2,2	3,5±0,4	17,0±1,6	2,2±0,05
Контроль	1,8±0,3	4,8±0,7	18,6±0,9	5,4±0,6	69,4±1,3	44,0±2,2	2,4±0,5	18,0±1,9	2,1±0,3
Весенний период	0,0	5,2±0,9	26,6±2,1	4,8±0,9	63,4±1,7	62,0±4,0	10,7±2,0	40,0±1,5	2,6±0,03
Контроль	0,0	6,4±0,7	19,0±2,4	3,0±0,3	71,6±2,1	45,0±1,4	10,5±0,5	52,0±1,4	2,0±0,09

Примечание. Б-базофил, Э-эозинофил, ПЭ-псевдоэозинофил, М-моноцит, Л-лимфоцит, ФА – фагоцитарная активность, ФЧ - фагоцитарное число, $p < 0,05$.

Таблица 15

Основные иммунологические показатели Т-зависимого иммунного ответа у кур в зимний и весенний периоды года при вторичном введении антигена. Возраст цыплят 1 месяц ($M \pm m$)

Лейкоцитарная формула						Фагоцитарная активность крови		Количество В-клеток крови, %	Количество IgY (мг/мл)
Группа (n=5)	Б,%	Э,%	ПЭ,%	М,%	Л,%	ФА,%	ФЧ, ч.л.		
Зимний период	1,0±0,01	7,0±0,5	35,4±0,5	6,2±0,8	49,8±1,1	50,0±2,0	7,0±1,9	15,0±0,9	2,2±0,04
Контроль	1,0±0,2	5,0±0,7	28,2±1,9	8,2±1,1	57,6±2,2	40,0±3,2	8,0±1,4	14,0±1,1	1,9±0,05
Весенний период	0,4±0,04	9,8±1,5	15,0±2,2	4,8±1,0	70,0±3,3	48,0±1,2	5,4±0,4	38,0±1,4	2,9±0,03
Контроль	0,0	4,6±0,6	20,0±2,2	2,6±0,8	72,8±2,4	41,0±2,2	6,2±1,2	40,0±1,8	2,2±0,07

Примечание. Б-базофил, Э-эозинофил, ПЭ-псевдоэозинофил, М-моноцит, Л-лимфоцит, ФА – фагоцитарная активность, ФЧ - фагоцитарное число, $p < 0,05$.

Основные иммунологические показатели Т-независимого иммунного ответа у кур в зимний и весенний периоды года при первичном введении антигена. Возраст цыплят 7 суток (M±m)

Лейкоцитарная формула						Фагоцитарная активность крови		Количество В-клеток крови, %	Количество IgY (мг/мл)
Группа (n=5)	Б,%	Э,%	ПЭ,%	М,%	Л,%	ФА,%	ФЧ, ч.л.		
Зимний период	1,6±0,4	6,0±0,8	20,8±2,6	8,4±1,7	62,8±2,9	56,7±2,1	4,0±0,4	25,0±0,9	2,0±0,08
Контроль	1,8±0,3	3,8±0,7	18,6±0,9	7,4±0,6	68,4±1,3	44,0±2,2	2,4±0,5	18,0±1,9	2,1±0,3
Весенний период	0,0	3,8±0,9	22,8±4,9	5,2±0,6	68,2±5,7	52,0±4,0	8,8±1,2	42,0±1,1	2,2±0,02
Контроль	0,0	6,4±0,7	19,0±2,4	3,0±0,3	71,6±2,1	45,0±1,4	10,5±0,5	52,0±1,4	2,0±0,09

Примечание. Б-базофил, Э-эозинофил, ПЭ-псевдозэозинофил, М-моноцит, Л-лимфоцит, ФА – фагоцитарная активность, ФЧ - фагоцитарное число, p<0,05.

Основные иммунологические показатели Т-независимого иммунного ответа у кур в зимний и весенний периоды года при вторичном введении антигена. Возраст цыплят 1 месяц (M±m)

Лейкоцитарная формула						Фагоцитарная активность крови		Количество В-клеток крови, %	Количество IgY (мг/мл)
Группа (n=5)	Б,%	Э,%	ПЭ,%	М,%	Л,%	ФА,%	ФЧ, ч.л.		
Зимний период	1,4±0,2	5,0±0,9	28,0±1,7	16,8±1,6	49,0±3,4	54,0±2,5	10,2±1,3	18,0±0,6	2,5±0,08
Контроль	1,0±0,2	5,0±0,7	28,2±1,9	8,2±1,1	57,4±2,2	40,0±3,2	8,0±1,4	14,0±1,1	1,9±0,05
Весенний период	0,2±0,04	4,4±1,0	18,8±1,5	4,6±0,8	72,0±2,1	38,0±1,4	6,9±1,3	30,0±1,2	2,7±0,05
Контроль	0,0	4,6±0,6	20,0±2,2	2,6±0,8	72,8±2,4	41,0±2,2	6,2±1,2	40,0±1,8	2,2±0,07

Примечание. Б-базофил, Э-эозинофил, ПЭ-псевдозэозинофил, М-моноцит, Л-лимфоцит, ФА – фагоцитарная активность, ФЧ - фагоцитарное число, p<0,05.

При оценке данных иммунологических показателей крови у цыплят 7-и суток в зимний и весенний периоды года (табл.14,15) было установлено, что параметры лейкограммы и уровень фагоцитарной активности не зависели от сезона года. Фагоцитарное число лейкоцитов крови было выше в весенний сезон и составило $10,5 \pm 0,5$, ч.л. (зимний период - $2,4 \pm 0,5$, ч.л.), количество В-клеток крови также повышалось весной и составило 52,0% (зимний сезон – 18,0%), уровень IgY у 7-и суточных цыплят весной был ниже, чем в зимний период года.

Анализ показателей лейкоцитарной формулы цыплят в возрасте 1 месяца показал, что относительное содержание псевдоэозинофилов и моноцитов выше зимой, а количество В-клеток крови и содержание IgY снижается по сравнению с весенним периодом года, где наблюдалась обратная закономерность клеточных и гуморальных показателей.

При первичном введении Т-зависимого антигена цыплятам 7-и суток в зимний период года выраженных изменений обнаружено не было, но значения опытной группы всех изучаемых показателей были несколько выше контрольных. Весенний период характеризовался усилением иммунного ответа на антиген, что выражалось в повышении количества псевдоэозинофилов, уровня фагоцитарной активности и содержания IgY в сыворотке крови.

Повторное введение Т-зависимого антигена в зимний период года сопровождалось повышением числа псевдоэозинофилов и уровня фагоцитарной активности, при этом количественное содержание IgY в сыворотке крови повышалось незначительно. Весенний период характеризовался усилением факторов гуморального иммунного ответа.

Оценка Т-независимого иммунного ответа при первичном введении антигена показала, что степень его выраженности идентична как в зимний, так и в весенний периоды года и сопровождается повышением клеточных факторов иммунной системы, в то время как гуморальные - остаются неизменными.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что повторное введение Т-независимого антигена привело к функциональной

активации всех изучаемых показателей и повышению уровня IgY в сыворотке крови кур.

При повторном введении антигенов в весенний период года наблюдалось повышение концентрации IgY, в то время как зимний период характеризовался увеличением числа клеток врожденного иммунитета.

4.3.4. Количественная характеристика иммунокомпетентных клеток и уровня IgY в процессе иммунного ответа на живую вакцину против ИБК

Для проведения исследований использовали живую сухую вакцину против ИБК из штамма «Н-120». Согласно инструкции производителя (ФГБУ «ВНИИЗЖ») вакцину применяют методом выпаивания, крупнокапельного распыления (спрей-метод) и интраназально/окулярно. Нами был выбран способ окулярного введения вакцины, который проводили по предложенной методике.

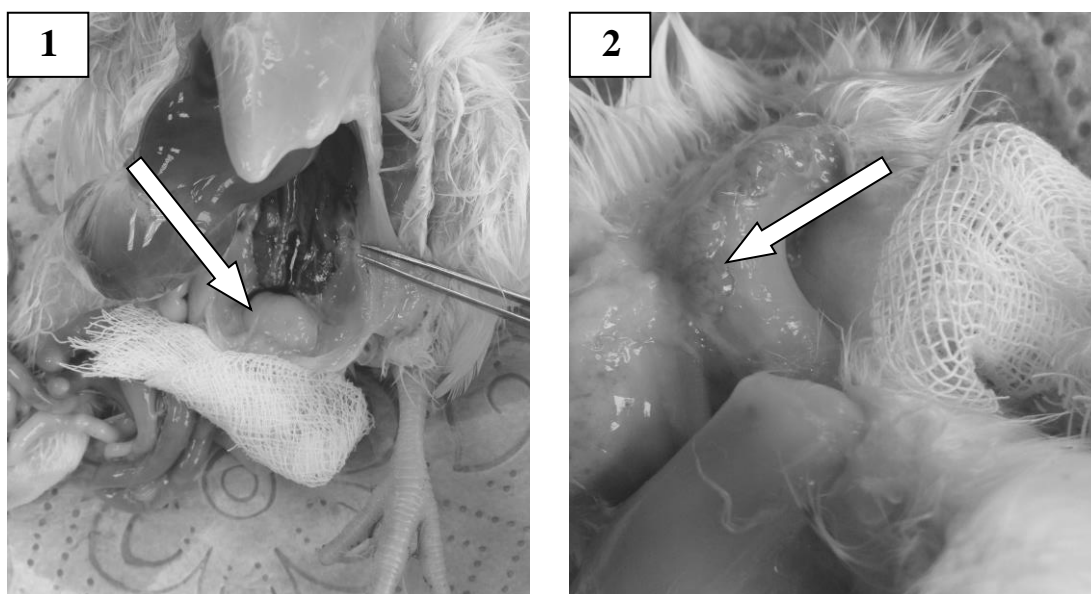
Вакцину разводили физиологическим раствором из расчета 200 см³ на 4000 прививных доз, таким образом, одна прививная доза составляла 0,05 см³ (50 мкл). Данный объем закапывали в конъюнктивальный мешок обоих глаз цыпленка (по 25 мкл). Ревакцинацию проводили через 10 суток тем же способом. Контрольной группе окулярно вводили ФР в том же объеме.

Для оценки иммунного ответа на живую вакцину изучали следующие показатели: лейкограмму, фагоцитарную активность лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов, содержание IgY в сыворотке крови, относительное число Т-лимфоцитов, их субпопуляций (CD4-, CD8-клетки), а также число В-клеток в тимусе, бурсе, селезенке и крови.

**Фоновые показатели лейкограммы и фагоцитарной активности крови
цыплят 6-и суток (M±m), n=4**

Лейкоцитарная формула					Фагоцитарная активность крови	
Базофилы, %	Эозинофилы, %	Псевдоэозинофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %	ФА, %	ФЧ, ч.л.
0,0	7,4 ±0,2	11,3±2,0	2,5±2,0	78,7±1,3	55,5±3,0	5,4±0,3

Примечание: ФА – фагоцитарная активность, ФЧ – фагоцитарное число.



*Рис. 30. Первичные органы иммунной системы кур. Бурса (1), тимус (2).
Возраст цыплят – 7 суток.*

Показатели лейкоцитарной формулы крови цыплят при окулярном методе введения живой вакцины, $M \pm m$
(первичный и вторичный иммунный ответ)

Показатели	Первичный иммунный ответ							
	Контроль (n=20)				Опыт (n=20)			
	Сутки иммунного ответа							
	1	3	5	7	1	3	5	7
Базофилы, %	0,0	0,2±0,04	0,0	0,0	0,4±0,04	0,0	0,2±0,04	0,0
Эозинофилы, %	6,4±0,7	3,0±0,6	6,6±0,7	6,0±0,8	8,5±0,3	1,3±0,3	6,4±0,6	8,3±0,9
Псевдоэозинофилы, %	19,0±2,4	14,8±1,7	21,6±1,9	13,2±2,0	16,0±1,8	12,0±1,9	14,0±2,5	16,0±1,7
Моноциты, %	3,0±0,3	2,4±0,6	4,4±0,8	6,6±1,0	14,7±1,6*	10,0±0,8*	7,3±2,1	7,6±0,8
Лимфоциты, %	71,6±2,1	79,6±0,4	67,4±2,3	74,2±2,5	60,4±0,2	76,7±1,2	73,4±2,1	66,1±2,9
Коэффициент корреляции, r (ЛПЭ)	-0,81				-0,79			
Л/ПЭ	3,8	5,4	3,1	5,6	3,8	6,4	5,2	3,7
Показатели	Вторичный иммунный ответ							
	Контроль (n=20)				Опыт (n=20)			
	Сутки иммунного ответа							
	1	3	5	7	1	3	5	7
Базофилы, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4±0,04	0,0	0,0	0,0
Эозинофилы, %	4,6±0,6	5,6±0,7	7,6±0,8	3,4±0,6	4,8±0,8	8,0±0,9	6,4±0,8	3,4±0,6
Псевдоэозинофилы, %	20,0±2,2	16,6±1,9	24,4±1,0	20,4±1,6	16,2±2,1	22,0±2,6	24,6±1,3	26,8±2,0
Моноциты, %	2,6±0,8	7,8±1,0	4,8±0,4	3,8±0,3	4,2±0,8	9,0±0,9	9,4±0,7	7,6±0,8
Лимфоциты, %	72,8±2,9	70,0±2,7	63,2±1,1	72,4±1,5	74,4±1,8	63,0±1,0	59,6±2,7	62,2±1,1
Коэффициент корреляции, r (ЛПЭ)	-0,67				-0,90			
Л/ПЭ	3,6	4,2	2,6	3,5	4,6	2,9	2,4	2,3

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Из данных таблицы 19 видно, что количество моноцитов достоверно увеличивалось на 1-е и 3-и сутки первичного иммунного ответа (1-е сутки - $14,7 \pm 1,6\%$; 3-и сутки - $10,0 \pm 0,8\%$; контроль - $3,0 \pm 0,3\%$ и $2,4 \pm 0,6\%$ соответственно). В последующие сутки первичного и вторичного иммуногенеза среди показателей лейкограммы достоверных отличий от контроля обнаружено не было.

По данным таблицы вычисляли индекс соотношения лимфоцитов и псевдоэозинофилов. Было отмечено, что на 3-и и 5-е сутки после первичного введения антигена по сравнению с контролем индекс увеличивался, а на 7-е сутки - снижался. Это обусловлено перераспределением клеток организма животного в онтогенезе в зависимости от активации того или иного звена защитной системы.

Во вторичном иммунном ответе на 1-е сутки индекс соотношения клеток повысился, что обусловлено снижением числа псевдоэозинофилов и увеличением количества лимфоцитов. На 3-и сутки индекс уменьшался за счет обратного перераспределения клеток (повышение псевдоэозинофилов и соответствующее этому снижение количества лимфоцитов). Такая же тенденция сохранялась на 5-е и 7-е сутки вторичного иммуногенеза.

Данные закономерности объясняются тем, что на первой линии защиты организма вступают факторы врожденного иммунитета, они передают информацию об антигене Т- и В-клеткам, которые в свою очередь начинают пролиферировать, для последующей выработки антител. Этот циклический процесс для поддержания иммунного равновесия в организме был отражен в индексных показателях.

Также был вычислен коэффициент корреляции, отражающий взаимосвязь между числом псевдоэозинофилов, как клеток врожденной иммунной системы, и лимфоцитов – показателей адаптивного иммунитета. В первичном иммуногенезе коэффициент корреляции в контрольной группе составил - 0,81, в опытной - 0,79, во вторичном иммунном ответе значения были -0,67 и -0,90 соответственно.

Отрицательные показатели коэффициента корреляций между количеством псевдозозинофилов и лимфоцитов являются константами иммунорегуляции, и необходимым условием для нормального функционирования иммунной системы.

Была изучена фагоцитарная активность лейкоцитов крови кур в ответ на окулярный метод введения живой вакцины (рис. 31).

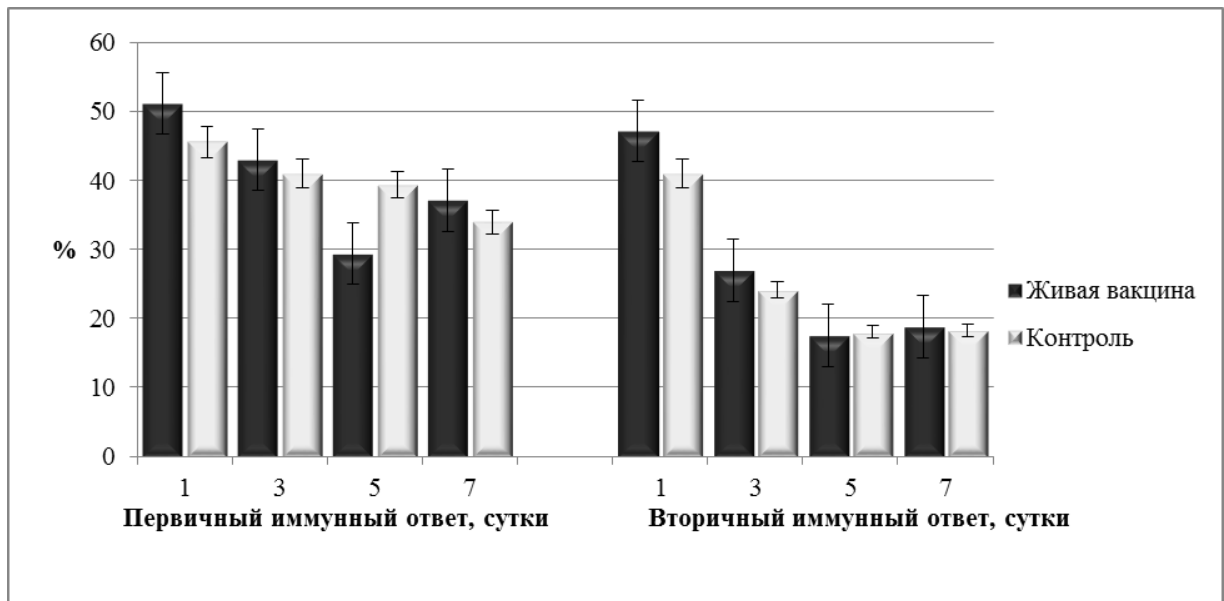


Рис. 31. Динамика изменения фагоцитарной активности лейкоцитов крови кур в ответ на введение живой вакцины в процессе первичного и вторичного иммуногенеза.

На диаграмме (рис. 31) отражено повышение фагоцитарной активности крови, которое наблюдалось на 1-е сутки первичного и вторичного иммунного ответа, что свидетельствует об активации функциональных свойств фагоцитов крови под воздействием компонентов живой вакцины против ИБК. На 1-е сутки первичного иммуногенеза значения составили $54,0 \pm 1,3\%$, контроль – $45,0 \pm 0,9\%$, 1-е сутки вторичного иммуногенеза – $48,7 \pm 0,7\%$, контроль – $41,0 \pm 0,4\%$. Такая динамика подтверждает, что клетки врожденной иммунной системы, а именно псевдозозинофилы, активируются только в течение первых суток первичного и вторичного иммунного ответа.

Динамика фагоцитарного числа в процессе первичного ответа опытной группы составила: $6,6 \pm 2,1$; $11,1 \pm 1,7$; $5,3 \pm 1,0$; $8,1 \pm 1,9$, контроль - $10,5 \pm 0,5$; $7,7 \pm 1,0$; $7,3 \pm 0,9$; $6,9 \pm 1,5$. В процессе вторичного иммуногенеза динамика фагоцитарного числа у опытной группы была следующей: $6,7 \pm 1,2$; $4,3 \pm 0,1$;

4,7±1,1; 5,2±1,0, контроль - 6,2±1,2; 5,8±0,9; 3,9±0,8; 4,2±0,7. Достоверных отличий в опытной группе по сравнению с контрольной не наблюдали.

Из таблицы 20 видно, что уровень фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов был достоверно выше на 5-е сутки первичного иммунного ответа и составил 65,0±2,0% (контроль – 50,2±1,0%). По-видимому, в данный период произошла активация макрофагов, не только как фагоцитирующих клеток, но и как антигенпрезентирующих. В остальные сутки иммуногенеза достоверных различий выявлено не было, но в результате повторного введения живой вакцины фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов увеличивалась в течение 7-и суток исследования.

Таблица 20

Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов, М±m
(первичный и вторичный иммунный ответ на живую вакцину)

Первичный иммунный ответ				
Сутки иммунного ответа	Контроль (n=20)		Опыт (n=20)	
	ФА, %	ФЧ, ч.л.	ФА, %	ФЧ, ч.л.
1	44,0±3,6	6,2±1,2	37,5±2,8	5,4±0,4
3	40,0±2,2	5,8±0,9	38,0±3,1	7,1±1,0
5	50,2±1,0	3,9±0,8	65,0±2,0*	7,2±1,1
7	37,0±0,9	4,2±0,7	22,0±1,8	4,1±0,9
Вторичный иммунный ответ				
1	36,0±0,9	7,5±0,4	44,2±1,6	6,5±0,2
3	20,1 ±1,7	5,0±1,3	26,0±2,3	5,5±0,1
5	21,0±1,1	9,0±1,6	31,0±1,9	2,3±1,1
7	16,3±2,6	1,9±0,3	19,6±0,4	5,0±1,5

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Был вычислен коэффициент корреляции, показывающий взаимосвязь между уровнями фагоцитарной активности лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов. В процессе первичного иммунного ответа коэффициент был отрицательным ($r = -0,5$), когда показатели фагоцитарной активности лейкоцитов крови были статистически выше параметров фагоцитоза

перитонеальных макрофагов. Это свидетельствует о том, что фагоциты крови и перитонеального экссудата выполняют разные функции в процессе иммунного ответа.

При вторичном иммуногенезе наблюдалась положительная взаимосвязь между показателями ($r = 0,84$), характеризующая общее снижение уровня фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и фагоцитов крови.

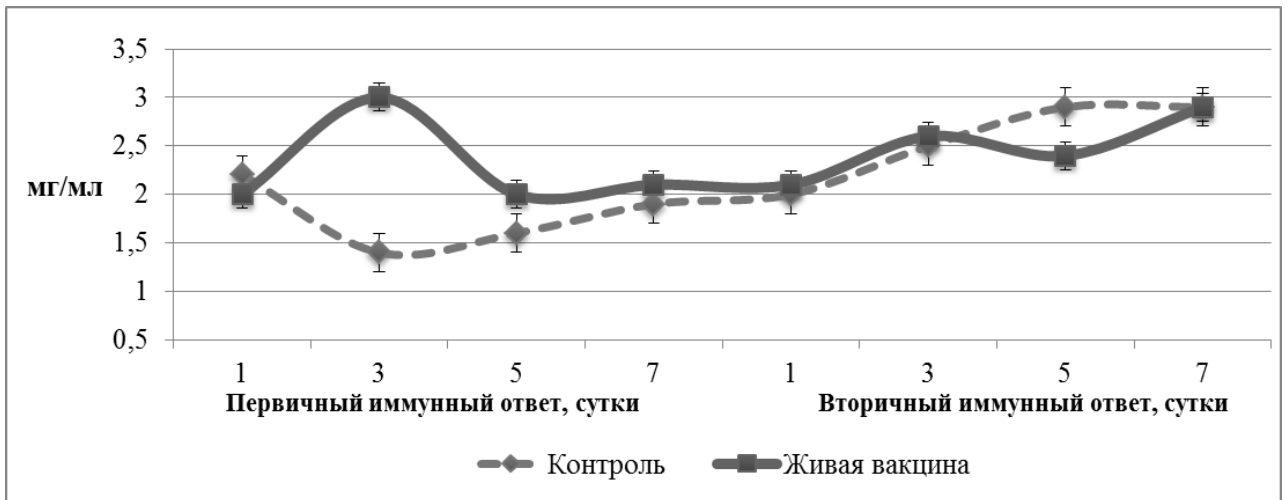


Рис. 32. Динамика IgY сыворотки крови в процессе первичного и вторичного иммуногенеза после введения живой вакцины.

На графике (рис. 32) видно, что достоверное увеличение количества иммуноглобулина Y в сыворотке крови цыплят на введение живой вакцины наблюдалось на 3-и сутки первичного иммунного ответа. Значение составило 3,0 мг/мл (контроль – 1,4 мг/мл). В остальные сутки исследования первичного и вторичного иммуногенеза достоверных различий в показателях опытной группы по сравнению с контрольной не наблюдали.

Количественные показатели относительного содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций в лимфоидных органах и крови кур в процессе первичного иммуногенеза на введение живой вакцины (M±m)

Источник клеток	Сутки иммунного ответа											
	1-е						3-и					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)			Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%
Тимус	57,2±3,6	25,1±0,7	32,1±2,8	64,0±2,7	29,1±1,3	34,9±1,8	48,4±1,6	12,0±1,4	36,4±2,2	61,2±1,0*	10,1±1,2	51,1±1,6*
Бурса	21,3±1,0	18,2±1,5	3,1±1,1	21,1±1,7	13,0±0,9	8,1±1,4	10,0±1,7	5,2±0,4	4,8±0,7	12,4±0,7	8,0±0,2	4,4±0,2
Селезёнка	29,2±1,3	12,0±0,4	17,2±1,0	41,0±1,2*	20,6±0,8*	20,4±0,5	46,4±3,0	8,0±1,2	38,4±1,2	40,2±1,4	6,3±1,0	33,9±0,7
Кровь	32,0±0,9	21,4±1,2	10,6±1,2	32,2±1,4	24,0±1,7	8,2±0,3	20,0±1,4	5,4±1,6	14,6±2,3	22,0±1,7	14,2±0,9*	7,8±1,3
Источник клеток	5-е						7-е					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)			Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%
	Тимус	64,0±2,7	7,0±0,2	57,0±1,6	56,2±3,4	12,0±1,3	44,2±2,7	24,6±0,9	2,0±0,1	22,6±1,8	51,0±2,7*	6,0±2,2
Бурса	12,0±1,6	19,0±1,7	0,0	20,0±1,4	13,0±0,7	7,0±1,2	14,0±1,5	18,0±2,4	0,0	7,4±0,9	14,0±0,1	0,0
Селезёнка	43,4±2,2	18,6±0,7	24,8±1,2	38,3±2,0	12,0±1,4	26,3±0,5	12,4±0,7	7,0±1,0	5,4±0,8	12,0±0,3	8,2±0,4	3,8±0,4
Кровь	47,0±1,4	20,2±1,6	26,8±1,9	39,0±0,6	18,2±0,9	19,8±0,3	12,2±1,3	9,0±1,7	3,2±0,4	17,0±1,2	9,0±0,9	8,0±1,1

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при p<0,05.

Количественные показатели относительного содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций в лимфоидных органах и крови кур в процессе вторичного иммуногенеза на введение живой вакцины (M±m)

Источник клеток	Сутки иммунного ответа											
	1-е						3-е					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)			Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%
Тимус	50,0±2,7	24,2±1,3	25,8±1,1	56,0±2,6	18,4±1,0	37,6±2,2	61,4±1,3	16,2±0,7	45,2±2,2	58,0±2,6	24,4±1,0	33,6±2,2
Бурса	24,7±1,4	24,9±3,6	0,0	20,0±1,2	16,2±0,9	3,8±0,7	22,0±1,8	10,4±0,5	11,6±2,4	22,0±1,1	24,3±0,9	0,0
Селезёнка	36,6±1,0	26,2±2,5	10,4±0,3	28,0±1,4	20,2±2,6	8,2±1,2	26,0±0,6	14,2±0,9	11,8±1,4	22,2±0,7	13,0±1,4	9,2±0,9
Кровь	16,0±0,9	14,0±0,7	2,0±0,3	34,6±1,3*	30,0±2,5*	4,6±0,7	22,0±1,5	20,0±0,4	2,0±0,1	31,6±1,4	28,0±1,9	3,6±0,5
Источник клеток	5-е						7-е					
	Контроль (n=20)			Опыт (n=20)			Контроль (n=20)			Опыт (n=20)		
	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%	Т-кл., %	CD4,%	CD8,%
	Тимус	48,2±0,5	8,4±1,6	39,8±2,3	38,0±2,6	4,0±0,9	34,0±2,7	48,2±0,5	8,4±1,6	39,8±2,3	49,6±1,8	9,4±1,3
Бурса	19,6±0,4	10,5±1,2	9,1±0,7	14,0±0,7	19,0±2,1	0,0	22,6±0,4	10,5±1,2	12,1±0,7	22,0±0,4	20,0±2,6	2,0±0,1
Селезёнка	32,0±0,8	7,0±0,4	25,0±2,6	32,9±2,5	18,7±0,4*	14,2±1,8	32,0±0,8	7,0±0,2	25,0±1,6	36,4±1,5	16,8±1,8*	19,6±1,2
Кровь	24,0±2,7	9,0±1,4	15,0±2,8	20,6±1,4	12,0±0,3	8,6±0,1	30,0±2,7	12,0±1,4	18,0±2,8	18,8±0,3	12,6±1,2	6,2±0,4

Примечание: * - значение достоверно по сравнению с контролем при p<0,05.

Согласно представленным данным (табл. 21) вакцинация оказала стимулирующее действие на тимоциты в 1-е сутки иммунного ответа, что проявилось в увеличении общего пула Т-клеток, а также CD4- (Т-хелперов) и CD8-клеток (цитотоксических клеток). Общее число Т-лимфоцитов достоверно увеличилось в тимусе на 3-и сутки ($61,2 \pm 1,0\%$, контроль - $48,4 \pm 1,6\%$) и повышалось содержание CD8-лимфоцитов ($51,1 \pm 1,6\%$, контроль - $36,4 \pm 2,2\%$). На 7-е сутки первичного иммунного ответа в тимусе наблюдали повышение числа Т-клеток - $51,0 \pm 2,7\%$ и CD8-клеток - $45,0 \pm 2,6$ (контроль - $24,6 \pm 0,9\%$ и $22,6 \pm 1,8\%$ соответственно).

На 1-е сутки иммунного ответа в селезенке увеличилось общее число Т-лимфоцитов и CD4-клеток (Т-лимфоциты - $41,0 \pm 1,2$; CD4-клетки - $20,6 \pm 0,8\%$; контроль - $29,2 \pm 1,3\%$ и $12,0 \pm 0,4\%$ соответственно).

Достоверное увеличение числа Т-хелперов крови наблюдали на 3-и сутки иммунного ответа ($14,2 \pm 0,9\%$; контроль - $5,4 \pm 1,6\%$).

Таким образом, первичное введение живой вакцины цыплятам в возрасте 7-и суток вызвало усиление пролиферации и дифференцировки Т-клеток в первичных и вторичных лимфоидных органах.

Из данных таблицы 22 видно, что в 1-е сутки вторичного иммунного ответа увеличилось общее число Т-клеток и CD8-тимоцитов. На 1-е сутки иммунного ответа достоверно увеличилось число Т-лимфоцитов и Т-хелперов в крови и составило $24,6 \pm 1,3\%$ и $30,0 \pm 2,5\%$ (контроль - $16,0 \pm 0,9\%$ и $14,0 \pm 0,7\%$ соответственно). В селезенке на 5-е и 7-е сутки вторичного иммуногенеза увеличилось содержание CD4-клеток (на 5-е сутки - $18,7 \pm 0,4\%$, на 7-е сутки - $16,8 \pm 1,8\%$, контроль - $7,0 \pm 0,4\%$ и $7,0 \pm 0,2\%$ соответственно). Повторное введение живой вакцины вызвало активацию процессов пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе, крови и селезенке.

В результате проведенных исследований (табл. 21, 22) установлено, что в тимусе увеличивалось число цитотоксических Т-лимфоцитов в процессе первичного и вторичного иммунного ответа, что связано с презентацией вирусного антигена. В селезенке в процессе первичного иммунного ответа

установлены циклические изменения числа CD8- и CD4-клеток, что обусловлено функциональными особенностями вторичных лимфоидных органов. А во вторичном иммуногенезе в селезенке преобладали CD4-клетки, что связано с процессом антителообразования. Динамика Т-хелперов в крови коррелировала с уровнем IgY в сыворотке крови кур.

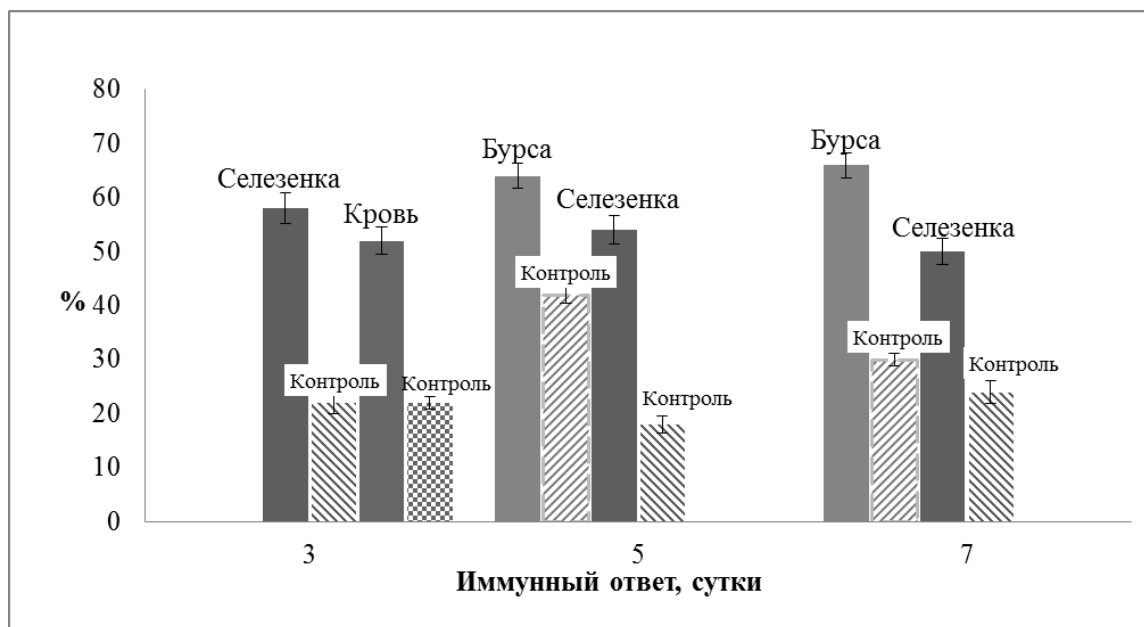


Рис. 33. Относительное содержание В-лимфоцитов в органах иммунной системы и крови в процессе первичного иммуногенеза.

На диаграмме (рис. 33) видно, что на 3-и, 5-е и 7-е сутки первичного иммунного ответа достоверно увеличивалось содержание В-лимфоцитов в селезенке цыплят (3-и сутки – $58,2 \pm 1,7\%$, 5-е сутки – $54,0 \pm 1,2\%$, 7-е сутки – $50,0 \pm 2,3\%$, контроль – $22,0 \pm 1,0\%$, $18,1 \pm 0,7\%$ и $24,2 \pm 1,8\%$ соответственно). На 5-е и 7-е сутки первичного иммуногенеза наблюдалось достоверное повышение содержания В-клеток в бурсе (5-е сутки – $64,0 \pm 2,2\%$, 7-е сутки – $66,5 \pm 2,4\%$, контроль – $42,0 \pm 1,1\%$ и $30,0 \pm 1,8\%$ соответственно). Увеличение количества В-клеток более чем в 2 раза зарегистрировано в крови на 3-и сутки первичного иммуногенеза и составило $52,0 \pm 1,6\%$ (контроль – $21,0 \pm 0,9\%$). В остальные сутки исследования достоверных различий показателей опытных групп от контрольной не было.

Было установлено, что в процессе первичного и вторичного иммунного ответа увеличение числа В-спленоцитов и В-клеток крови, коррелировало с уровнем IgY.

Повторное введение антигена не привело к значительному повышению содержания В-клеток, также как и к увеличению концентрации IgY в крови.

В результате комплексного изучения иммунного ответа на введение живой вакцины цыплятам, можно сделать вывод о том, что данный антиген способствовал повышению функциональной активности факторов врожденного и адаптивного иммунитета, что выражалось в увеличении количества моноцитов в крови, повышением уровня фагоцитарной активности лейкоцитов и перитонеальных макрофагов, достоверным увеличением содержания IgY в сыворотке крови на 3-и сутки первичного иммуногенеза. Показатели относительного содержания Т-лимфоцитов, их субпопуляций и В-клеток свидетельствуют о стимуляции процессов пролиферации и дифференцировки в органах иммунной системы и крови под действием живой вакцины.

4.3.5. Функциональная активность компонентов иммунной системы под влиянием метаболитов микроорганизмов в процессе иммуногенеза

Для оценки состояния иммунной системы определяют количественные и функциональные показатели ее структурных компонентов. В предыдущих главах были определены количественные показатели, в данной главе будут рассмотрены параметры функциональной активности иммунокомпетентных клеток и иммуноглобулинов в процессе иммунного ответа под влиянием метаболитов микроорганизмов.

Анализ результатов проведенных ранее экспериментов позволил сформулировать методические принципы оценки состояния иммунной системы. Одним из них является принцип дифференцированного подхода к оценке иммунологических показателей в зависимости от определенного этапа развития иммуногенеза, а также принцип «основных ориентиров», подтверждающий отрицательную корреляцию между показателями макрофагов и Т-клеток лимфатических узлов [56]. Ранее была установлена отрицательная корреляция между количеством псевдоэозинофилов и числом лимфоцитов в иммуногенезе на различные типы антигенов у кур, что подтверждает принцип основных ориентиров оценки состояния иммунной системы.

Нагрузочный тест в наших исследованиях был использован с целью изучения функциональной активности ИКК и Ig на различных этапах поствакцинального иммунного ответа.

Нагрузочный тест с метаболитами различных микроорганизмов (*Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella enteritidis*, *Trychophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis*) проводили на основе реакции иммунодиффузии (РИД), метода определения фагоцитарной активности (ФА) и рецепторной способности Т-спленоцитов [80].

Культуральную жидкость микроорганизмов в фазе логарифмического роста центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин) и фильтровали (Millex-GS 0,22µm), затем определяли белок по методу Лоури. Образцы культуральной жидкости доводили физиологическим раствором до концентрации белка

1,5 мг/мл и использовали в объеме 100 мкл. В контрольном опыте установлено, что культуральная среда микроорганизмов (сусло-агар и мясо-пептонный бульон) не оказала значимого влияния на параметры РИД, ФА и РО.

Перед проведением реакции по определению фагоцитарной активности с частицами латекса ($0,5-1 \times 10^6$ ч/мл), радиальной иммунодиффузии и метода спонтанного розеткообразования образцы крови, сыворотки и МНК инкубировали с метаболитами в течение 30 мин. при 40°C . В дальнейшем, реакции проводили по стандартным методикам.

Учет результатов проводили по формуле: $\text{Ис} = \text{Пм}/\text{Пк}$, где **Ис** – индекс сдвига; **Пм** – параметры реакции с метаболитами; **Пк** – параметры реакции без метаболитов. Величина индекса больше 1 означала стимулирующий эффект, а меньше 1 – супрессивное влияние [80].

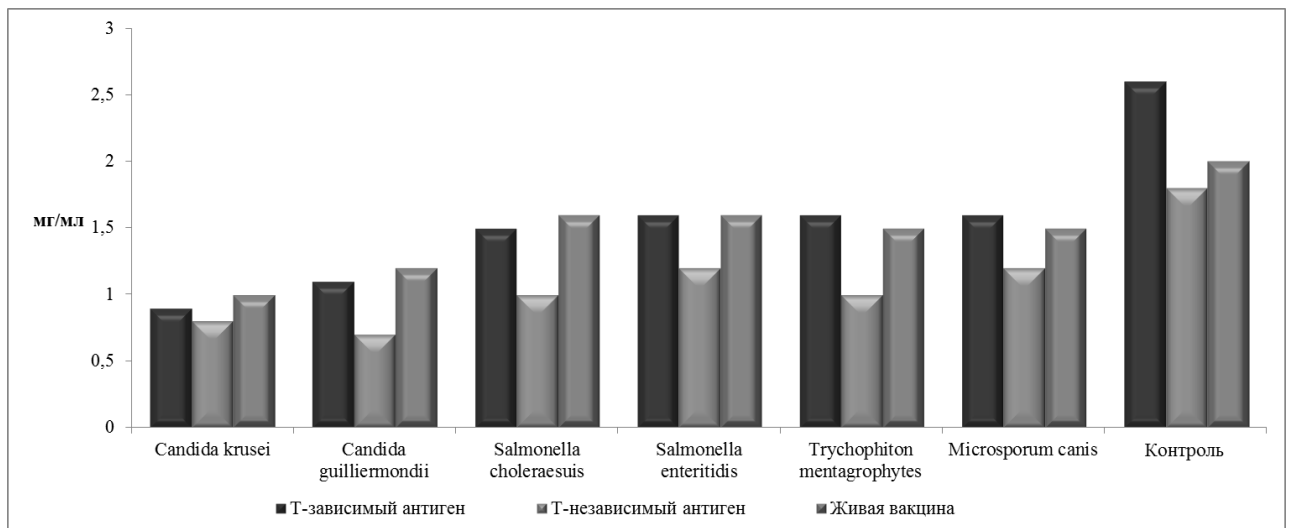


Рис. 34. Преципитирующая активность IgY сыворотки крови кур под влиянием метаболитов в процессе первичного иммунного ответа на различные типы антигенов.

Как видно на диаграмме (рис. 34), метаболиты всех патогенных микроорганизмов угнетают преципитирующую активность иммуноглобулина Y, но метаболиты патогенных грибов рода *Candida* значительней других.

Было установлено, что среднее значение индекса сдвига в группе введения живой вакцины составило 0,68, что выше показателей T-зависимого и T-независимого антигенов (0,58 и 0,53 соответственно). По-видимому,

сыворотка кур, вакцинированных живой вирус-вакциной, содержит больше компонентов, блокирующих метаболическую активность микроорганизмов.

Первичный иммуногенез на Т-зависимый, Т-независимый антигены и вирус-вакцину характеризуется различной фагоцитарной активностью лейкоцитов крови и рецепторной способностью Т-спленоцитов.

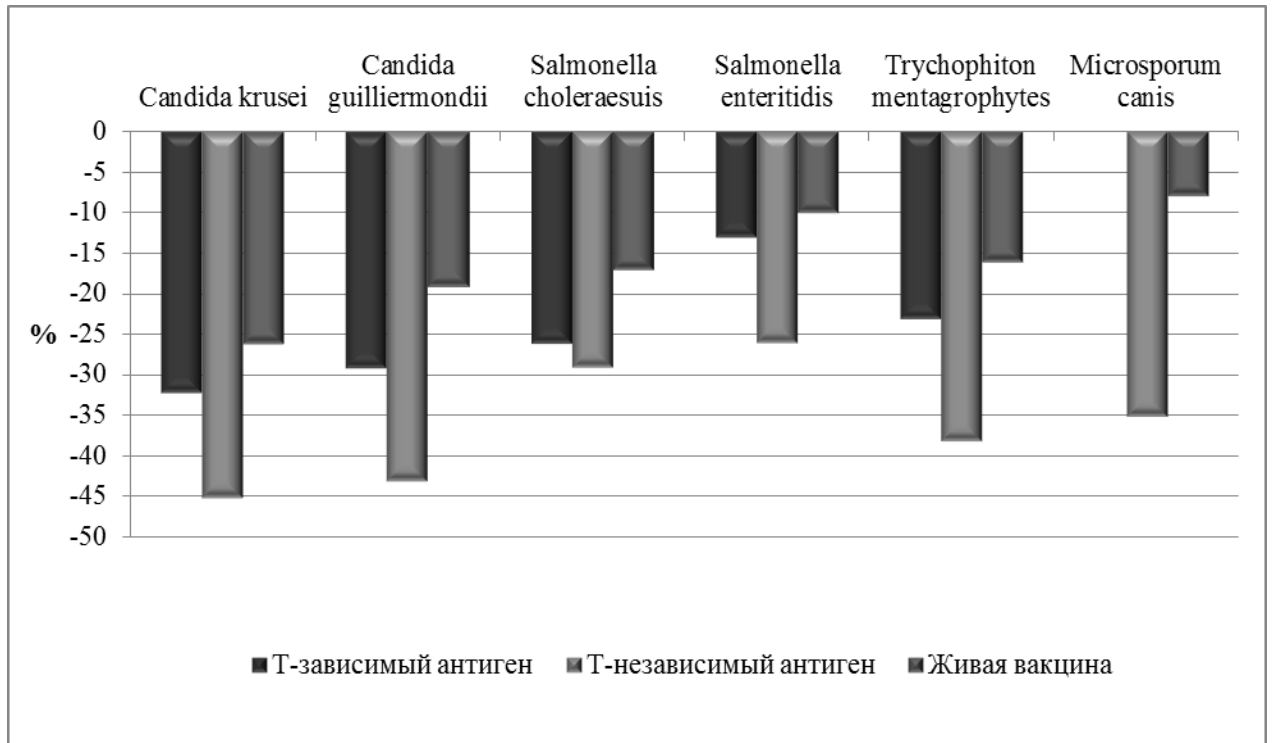


Рис. 35. Фагоцитарная активность лейкоцитов крови под влиянием метаболитов на 7-е сутки первичного иммунного ответа.

На 1-е, 5-е и 7-е сутки (рис. 35) первичного иммунного ответа метаболиты микроорганизмов, в большей степени кандид и сальмонелл, угнетали фагоцитарную активность лейкоцитов крови. При вторичном иммунном ответе супрессивное влияние различной степени наблюдалось только после инкубации с метаболитами патогенных грибов рода *Candida*.

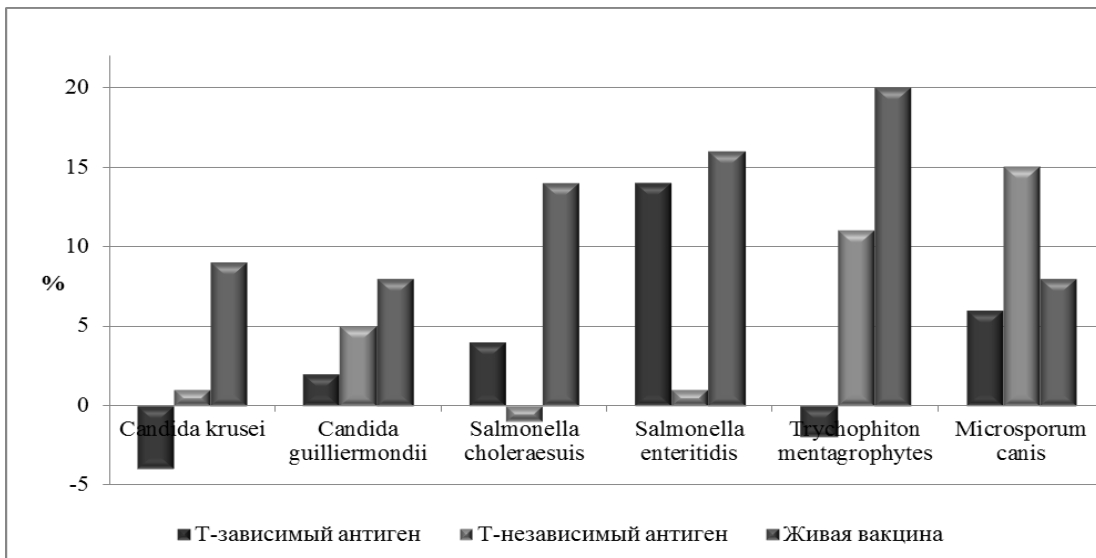


Рис. 36. Рецепторная способность Т-лимфоцитов селезенки на 7-е сутки первичного иммунного ответа.

На 1-е сутки первичного иммунного ответа рецепторная способность Т-спленоцитов была более подвержена супрессивному влиянию возбудителей трихофитии и микроспории, а на 7-е сутки (рис. 36) наблюдалась стимуляция адгезивной активности Т-клеток селезенки под влиянием всех изучаемых метаболитов микроорганизмов.

В результате проведенных исследований установлена обратная взаимосвязь между фагоцитарной активностью лейкоцитов крови и адгезивной способностью Т-спленоцитов на 7-е сутки первичного иммуногенеза при инкубации с метаболитами всех изучаемых микроорганизмов. Это связано с тем, что структурные компоненты иммунной системы при воздействии антигенов распределяют функциональную нагрузку неодинаково в зависимости от особенностей антигена. По данным А.А. Михайленко и Т.А. Федотовой [102] в организме существует система стойких прямых и обратных взаимосвязей ее наиболее важных компонентов (корреляционные константы), которые выполняют роль своеобразных переключателей иммунного ответа.

Эзотоксины сальмонелл (энтеротоксин, активирующий цАМФ и термостабильный экзотоксин, который опосредует своё действие через гуанилатциклазу цГМФ, цитотоксин) проявляют *in vivo* свойства

антиметаболитов, блокируя функциональную активность естественных аналогов [148].

Известно, что специфические рецепторы распознавания антигенов присутствуют как на фагоцитах, так и на лимфоцитах и это объединяет систему врожденного и приобретенного иммунитета. Различие заключается в генетических механизмах программирования Toll-подобных (TLR и др.) и антигенраспознающих Ig-подобных рецепторов клеток (TCR, BCR).

От функционального состояния фагоцитов зависит их способность связывать чужеродные структуры на своей поверхности, а затем поглощать и уничтожать или представлять их на своей мембране в комплексе с МНС. Фагоцитоз также зависит от системы лектиноподобных рецепторов. В результате связывания мембранных рецепторов клетки, генерируется сигнал активации сократительной системы фагоцита и антиген поглощается, образуется фагосома и патоген подвергается деградации с помощью бактерицидных механизмов. По-видимому, в опыте *in vitro*, произошла частичная блокировка метаболитами сальмонелл поверхностных рецепторов клетки, в результате чего был нарушен процесс активации фагоцитов.

По нашему мнению, вопрос о влиянии метаболитов на процесс фагоцитоза требует дальнейших исследований, так как он представляет глубокий научный интерес не только в познании механизмов иммунной защиты организма от инфекционных агентов, но и в создании новых методов иммунодиагностики.

4.3.6. Сравнительная характеристика показателей иммунного ответа на различные типы антигенов

Проведены исследования по сравнительной характеристике показателей иммунного ответа на различные антигены (табл. 23, 24).

Показатели иммунного ответа на введение антигенов в процессе первичного иммуногенеза

Антигены Показатели иммунного ответа	Т-зависимый антиген	Т-независимый антиген	Живая вакцина
Лейкоцитарная формула	Увеличение числа псевдоэозинофилов и моноцитов	Увеличение числа псевдоэозинофилов и моноцитов	Достоверное увеличение моноцитов на 1-е и 3-и сутки (1-е сутки - 14,7±1,6%; 3-и сутки - 10,0±0,8%; в контроль - 3,0±0,3% и 2,4±0,6% соответственно)
Фагоцитарная активность лейкоцитов крови	Увеличение активности на 1-е сутки, далее снижение показателей	Увеличение активности во все сутки исследования	Увеличение активности только на 1-е сутки
Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов	Не повышалась по сравнению с контрольными значениями, но фагоцитарное число было достоверно выше в 1-е сутки (15,0±0,4%, контроль - 6,2±1,2%) и сохраняло тенденцию к увеличению в остальные сутки исследования	Тенденция к увеличению во все сутки исследования	Достоверное увеличение на 5-е сутки (65,0±2,0%, контроль - 50,2±1,0%), остальные сутки исследования показатели не превышали контрольных значений
Содержание IgY в сыворотке крови	Достоверно выше на 3-и сутки исследования (3,1 мг/мл, контроль – 1,4 мг/мл)	Достоверного повышения показателей нет	Достоверно выше на 3-и сутки исследования (3,0 мг/мл, контроль – 1,4 мг/мл)
Т-лимфоциты в органах иммунной системы и крови	Повышение общего числа тимоцитов, преобладание CD8-клеток в тимусе во все сутки исследования и увеличение CD4-клеток в крови и селезенке на 3-и сутки исследования	Преобладание CD8-клеток в тимусе. Соотношение CD4- и CD8-клеток в селезенке и крови аналогично на 1-е и 3-и сутки исследования	Повышение общего числа тимоцитов. Наблюдалось выраженное преобладание CD8-клеток в тимусе. На 3-и сутки в крови достоверно увеличивалось число CD4-клеток, на 1-е сутки - в селезенке
В-лимфоциты в органах иммунной системы и крови	Достоверное увеличение В-лимфоцитов в селезенке на 3-и, 5-е и 7-е сутки, в крови – на 3-и сутки и в бурсе – на 7-е сутки исследования	Достоверное увеличение В-лимфоцитов в селезенке на 3-и сутки исследования	Достоверное увеличение В-спленоцитов в селезенке на 3-и, 5-е и 7-е сутки, в крови достоверное увеличение на 3-и, в бурсе - на 5-е и 7-е сутки иммунного ответа

Показатели иммунного ответа на введение антигенов в процессе вторичного иммуногенеза

Антигены Показатели иммунного ответа	Т-зависимый антиген	Т-независимый антиген	Живая вакцина
Лейкоцитарная формула	Увеличение числа псевдоэозинофилов и моноцитов	Увеличение числа псевдоэозинофилов и моноцитов	Увеличение числа псевдоэозинофилов и моноцитов
Фагоцитарная активность лейкоцитов крови	Увеличение активности во все сутки исследования	Увеличение активности только на 3-и сутки, в остальные сутки исследования значения не превышали контрольных	Увеличение на 1-е сутки, в остальные сутки исследования значения не превышали контрольных
Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов	Достоверное увеличение на 3-и сутки ($30,0 \pm 0,9\%$, контроль - $20,1 \pm 1,7\%$), в остальные сутки исследования значения были выше контрольных	Достоверное увеличение на 3-и и 5е сутки исследования ($32,4 \pm 0,7\%$ - на 3-и сутки, $30,3 \pm 1,4$ – на 5-е сутки; контроль - $20,1 \pm 1,7\%$ и $21,0 \pm 1,1\%$ соответственно)	Тенденция к увеличению во все сутки исследования
Содержание IgY в сыворотке крови	Тенденция к повышению на 1-е и 3-и сутки исследования	Тенденция к повышению на 1-е и 3-и сутки исследования	Достоверного повышения концентрации IgY нет
Т-лимфоциты в органах иммунной системы и крови	Преобладание CD8-клеток в тимусе, увеличение CD4-клеток в селезенке на 3-и сутки, в крови - на 3-и и 5-е сутки исследования	Менее выраженное преобладание CD8-клеток в тимусе. Количество CD4-клеток в селезенке и крови преобладали на 1-е и 3-и сутки исследования	Выраженное преобладание CD8-клеток в тимусе. В крови и в селезенке преобладали CD4-клетки
В-лимфоциты в органах иммунной системы и крови	Достоверное увеличение В-лимфоцитов в селезенке и крови на 5-е сутки исследования	Достоверное увеличение В-спленоцитов в селезенке на 3-и сутки	Достоверного повышения концентрации IgY нет

По результатам проведенных исследований было установлено, что иммунологические показатели при введении живой вакцины коррелируют с параметрами иммунного ответа на Т-зависимый антиген.

Это выразилось в повышении числа клеточных факторов иммунной системы (моноцитов и псевдоэозинофилов), уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови, содержании IgY в сыворотке крови, а также характеризовалось повышением общего числа тимоцитов с преобладанием CD8-клеток в тимусе. Количественное содержание В-лимфоцитов коррелировало с уровнем иммуноглобулина Y при введении Т-зависимых антигенов (эритроциты барана и вирус-вакцина).

Хотя способы введения Т-зависимого антигена (ЭБ) и живой вакцины были различны (внутрибрюшинный и окулярный) показано, что при этих методах развивается системный иммунный ответ.

Следует отметить, что динамика антителообразования при введении Т-зависимого антигена и живой вакцины имеет некоторые различия. По-видимому, это связано с тем, что презентация вирусного антигена проходит по эндогенному пути с участием МНС класса I и CD8-клеток, а пептиды эритроцитов барана в комплексе с МНС класса II взаимодействуют с Т-хелперами и В-лимфоцитами, что вызывает активацию В-клеток с последующим синтезом специфических антител.

5. ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунная система птиц представляет собой отдельный этап филогенетического развития, главной особенностью которого является наличие четко дифференцированной морфологической структуры для созревания В-лимфоцитов. При этом органы и ткани иммунной системы птиц тесно связаны между собой постоянно циркулирующими лимфоидными клетками, которые осуществляют иммунологический контроль за поддержанием биологической целостности организма, непосредственно уничтожая генетически чужеродные элементы или вырабатывая специфические антитела [1, 14, 19, 28].

Актуальными проблемами птицеводства остаются мероприятия, направленные на повышение жизнеспособности и устойчивости птицепоголовья к заболеваниям различного генеза [9, 11, 64]. В связи с этим изучение функциональной активности лимфоидных органов, тканей и клеток, имеющих непосредственное отношение к иммунореактивности организма, приобретает большое значение [64].

Интенсивное развитие промышленного птицеводства происходит с выраженным напряжением физиологических систем, что ведет к повышению отхода птицы, снижению оборотов продукции и ее качества [46].

Птицеводческие предприятия терпят большие убытки при вспышках колибактериоза, гидроперикардита, болезни Марека и Гамборо, а также от микоплазмоза, сальмонеллеза, инфекционного бронхита кур [145]. Борьба с данными болезнями обуславливает широкое применение профилактических, диагностических и лекарственных средств [130]. Исследования в области формирования иммунной системы птиц в онтогенезе и характера иммунного ответа на антигены помогают усилить протективные свойства вакцин и сохранить их безопасность, так как, несмотря на разнообразие применяемых вакцинных препаратов, иммунологическая эффективность их не всегда достигает желаемого уровня [50].

Значительное число научных работ посвящено исследованиям в области иммунологических процессов под влиянием лекарственных, профилактических средств, новых комбинированных препаратов и стресс-факторов [6, 8, 25, 41, 44, 129].

Иммунный ответ, обусловленный введением антигена, отражает сложные механизмы взаимодействия практически всех органов и тканей защитной системы макроорганизма, участвующих в иммунологической перестройке, характер которой определен природой вводимого агента и его дозой [43, 110].

Наша работа была направлена на комплексное изучение основных иммунологических показателей иммунного ответа у кур на модельные Т-зависимый и Т-независимый антигены и живую вирус-вакцину против ИБК.

Выбор модельных антигенов был обусловлен заведомо известным характером иммунного ответа на них у млекопитающих [58].

Следует отметить, что презентация пептидов чужеродного белка имеет ряд отличий [110, 120, 160], что зависит от природы, химической структуры и размера антигена. Эндогенный путь (характерен для внутриклеточных антигенов (вирусов)) способствует активации протеолитических ферментов в цитоплазме (протеасомы), где осуществляется процессинг эндогенных антигенов. Попадая в эндоплазматическую сеть (ЭПС), пептиды антигена связываются с молекулами МНС класса I и транспортируются (аппаратом Гольджи) на клеточную поверхность АПК, где презентуются CD8+ Т-лимфоцитам.

Экзогенный путь презентации антигена характерен для внеклеточных микроорганизмов и их токсинов. Попав посредством фагоцитоза или пиноцитоза внутрь АПК, антиген подвергается воздействию ферментов фаголизосомы, расщепляясь до приблизительно 10 аминокислотных остатков. В фаголизосоме пептид соединяется с молекулами МНС класса II и, аналогично эндогенному пути, после транспортировки презентуются на клеточной поверхности для распознавания уже CD4-клетками. Т-хелперы передают информацию об

антигене В-лимфоцитам, стимулируя тем самым их к пролиферации и антителообразованию [34, 37, 38, 39, 110].

Таким образом, можно предположить, что после воздействия вирусного антигена Т-хелперы включаются в иммунный ответ позже.

В литературе [149] встречаются данные о том, что полисахариды, липополисахариды, а также полимерные белки не могут быть процессированы до комплексов с молекулами МНС класса I и II из-за своих химических свойств и, следовательно, не могут быть представлены для распознавания Т-лимфоцитам.

Т-зависимый антиген (эритроциты барана), являясь антигеном преимущественно белковой природы, индуцирует полноценный иммунный ответ, который сопровождается синтезом специфических антител после получения В-клеткой сигнала от Т-хелпера, активированного АПК.

Синтетический поливинилпирролидон (Т-независимый антиген 2 типа - 750 кДа) способен активировать В-лимфоциты без непосредственного участия Т-клеток, так как содержит многократно повторяющиеся детерминанты на своей поверхности, что приводит к поликлональной стимуляции В-лимфоцитов, преимущественному синтезу IgM и отсутствию формирования клеток памяти [110].

Живая вакцина против ИБК представляет собой цельный аттенуированный РНК вирус, прошедший 120 пассажей на куриных эмбрионах, белковая оболочка которого состоит преимущественно из гликопротеинов [76].

В качестве основных показателей иммунного ответа были выбраны параметры относительного содержания показателей лейкоцитарной формулы, уровень фагоцитарной активности лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов, количественное содержание IgY в сыворотке крови, относительное число Т-лимфоцитов, CD4- и CD8-клеток, В-лимфоцитов в органах иммунной системы и крови. То есть, наше исследование подразумевало комплексный анализ факторов специфической и неспецифической защиты организма в ответ на введение различных типов антигенов.

С целью изучения индукции гуморального иммунного ответа под воздействием антигенов, а также в онтогенезе и в зависимости от сезонных факторов нами был получен препарат иммунохимически чистого IgY сыворотки крови кур (5,3 мг/мл).

Методика его выделения имела ряд отличий по сравнению с разработанными в лабораторных условиях (лаборатория иммунологии ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко) методами получения иммуноглобулинов классов М, G и А различных видов животных (крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, собаки, кошки, мыши) [54].

Эти методы были оптимизированы на основе исследований, проведенных учеными по получению аналогичных препаратов [113, 112, 117, 147].

В нашей работе оптимизация процесса заключалась в применении поэтапного солевого осаждения сыворотки крови кристаллическим сульфатом аммония и последовательным сочетанием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови кур.

Несмотря на то, что метод высаливания для фракционирования белков млекопитающих давно используется в лабораторных условиях [147], применение разных концентраций данной соли (50% и 37,5% насыщения), позволило получить фракцию гамма-глобулинов кур с меньшим количеством примесей других белков, что подтверждалось на иммуноэлектрофореграмме.

Разделение фракции по молекулярной массе с помощью гель-фильтрации на Sephacryl S-500, способствовало получению IgY, который с меньшим количеством примесей других белков регистрировался в нисходящей части первого пика, что схоже с характером элюции IgG у млекопитающих [99].

Выделение IgM и IgA сыворотки крови кур на данном сорбенте не проводили из-за их низкого количественного содержания в данной биологической жидкости (1,0-1,5 мг/мл).

Последующим этапом получения иммунохимически чистого IgY являлась ионообменная хроматография. В первую серию выделения иммуноглобулин элюировался на 0,15M NaCl в 0,02 M Tris-HCl, pH 7,2.

Повторная ионообменная хроматография позволила получить IgY без примесей других белков в первом пике на 0,02 М Tris-HCl, pH 7,2 без градиента соли. Иммунохимическая чистота IgY была подтверждена методом электрофореза в ПААГ-ДСН.

Было установлено, что схема выделения иммуноглобулина Y при повторной ионообменной хроматографии была аналогична выделению IgG КРС из сыворотки крови, что подтверждено исследованиями других авторов [51, 54, 147].

Оценив иммунохимические свойства IgY сыворотки крови кур и IgG сыворотки КРС, нами было установлено, что данные иммуноглобулины обладают разной электрофоретической подвижностью. Форма полос преципитации иммуноглобулинов также различалась, что, по-видимому, обусловлено меньшей концентрацией белка в препарате IgY кур [54].

Для сравнения электрофоретических свойств иммуноглобулина Y, выделенного из сыворотки крови и желтка яиц кур, получили иммунохимически чистый препарат IgY желтка (1,8 мг/мл).

Методика его выделения имела ряд модификаций по сравнению с выделением IgY из сыворотки крови и способами получения данного изотипа, описанными у других авторов [113, 112].

Во-первых, для получения фракции супернатанта желтки яиц смешивали до достижения гомогенной смеси с физиологическим раствором и выдерживали при t 4-6⁰С. Этот этап выделения иммуноглобулина из желтка описан у гусеобразных [113]. Во-вторых, для удаления липидов, которые препятствуют выделению IgY, добавляли растворы кальция хлорида и декстрана, что показано для применения при выделении IgA из сыворотки крови свиней [147], и только после этого осаждали фракцию гамма-глобулинов кристаллическим сульфатом аммония (50% насыщения однократно). То есть процесс получения гамма-глобулинов желтка имел больше этапов подготовки, чем сыворотки крови кур.

С целью снижения количественных потерь белка, мы выделяли IgY из желтка яиц только методом ионообменной хроматографией, так как конечная

концентрация белка полученных гамма-глобулинов была в 3-4 раза меньше сывороточной фракции (сывороточная фракция - 33,5-45,2 мг/мл, желтковая фракция – 10,0-12,0 мг/мл).

Проведя иммуно- и электрофорез было установлено, что электрофоретическая подвижность в геле IgY, выделенного из сыворотки крови и желтка яиц кур идентична, что подтверждается в работах И.А. Болотникова и др. (1976), Л.П. Колабской (1987), Larsson A. (1993), Чиоу й-нэна (2003), Davison F. (2008), Chalghoumi R. (2009).

Для дальнейшей работы по получению моноспецифической антисыворотки использовали сывороточный иммунохимически чистый иммуноглобулин Y, так как это соответствовало задачам нашего исследования.

Имунохимически чистым препаратом IgY иммунизировали лабораторных животных [144] по методу, разработанному А.Ю. Самострельским и М.А. Мисниковой [114], в нашей модификации.

Была получена моноспецифическая антисыворотка к данному изотипу иммуноглобулинов, которую применяли в научно-экспериментальной работе для оценки гуморального иммунного ответа цыплят на различные типы антигенов.

Кроме того, с помощью моноспецифической антисыворотки к IgY кур можно оценить эффективность профилактических и лечебных препаратов, также получить данные о возрастной динамике становления гуморального звена иммунитета у птицы в онтогенезе [18, 54, 82].

Для определения количественного содержания иммуноглобулина Y в сыворотке крови в РИД были проведены исследования по подбору оптимального рабочего разведения моноспецифической антисыворотки (1:10), что позволило определить концентрацию IgY в стандартной сыворотке крови, которая составила – 3,2 мг/мл.

Согласно литературным данным количественное содержание IgY в сыворотке крови кур отличается и составляет 1,0-8,6 мг/мл [6, 32, 177,180]. Вероятно, различия в показателях содержания IgY в сыворотке крови

обусловлено разнообразием методов исследования, возрастом птицы, кроссом и сезонами года.

При изучении динамики количественного содержания IgY в сыворотке крови цыплят в РИД, была установлена его тенденция к увеличению в онтогенезе. Полученные нами сведения аналогичны таковым в исследованиях других авторов [6, 177].

При этом подтверждалось снижение количества иммуноглобулина в крови к 14-и суточному возрасту цыплят, что, вероятно, связано с распадом материнских антител [6, 19]. По литературным данным разрушение материнских антител может продолжаться до 1 месяца, если иммунный статус родительского стада достаточно высок [32, 177].

Изучение динамики IgY под влиянием сезонных факторов показало, что в зимний период количественное содержание иммуноглобулина выше, чем в весенний, что вероятно связано с особенностями биологических ритмов организма в разные периоды года.

Исследования в этом направлении не многочисленны, но представляют интерес и требуют дальнейшего изучения и учета при организации равномерного, круглогодичного выращивания птицы [20, 23, 155].

Различные варианты реакции розеткообразования для оценки функциональной активности компонентов иммунной системы проводили по стандартным методам [80], но было установлено, что использование комплекса зимозана с C₃-компонентом комплемента выявляло большее число В-клеток в крови, по сравнению с использованием эритроцитов мыши, поэтому на протяжении всего периода исследования мы применяли индикаторный комплекс с зимозаном.

Изучение иммунного ответа на введение 0,5% взвеси эритроцитов барана и 2,0% раствора поливинилпирролидона проводили по ранее описанной схеме на 1-е, 3-е и 5-е и 7-е сутки иммуногенеза.

Внутрибрюшинное введение Т-зависимого и Т-независимого антигенов не привело к достоверным изменениям показателей лейкоцитарной формулы, но

наблюдалась аналогичная тенденция к увеличению числа эозинофилов, псевдоэозинофилов и моноцитов в обеих опытных группах.

Фагоцитарная активность лейкоцитов крови была выше в первичном иммунном ответе во все сутки исследования, при этом в группе Т-зависимого антигена после 3-х суток иммунного ответа отмечали снижение уровня фагоцитоза. Т-независимый антиген способствовал повышению фагоцитарной активности лейкоцитов крови в 1-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки иммуногенеза.

Во вторичном иммунном ответе эта тенденция сохранилась для Т-зависимого иммунного ответа, а показатель фагоцитарной активности клеток при Т-независимом иммунном ответе был выше контрольного только на 3-и сутки исследования.

Было показано, что Т-зависимый первичный иммунный ответ имеет циклический характер, связанный с неодновременным включением отдельных компонентов иммунной системы, то есть тенденция к снижению фагоцитарной активности на 3-и сутки, влекла за собой повышение количества В-клеток и, как следствие, уровня IgY в сыворотке крови.

Результаты исследования первичного Т-независимого иммуногенеза свидетельствовали о том, что уровень фагоцитарной активности лейкоцитов крови не снижался в течение 7-и суток иммунного ответа, что коррелировало с концентрацией IgY в сыворотке крови ($r = 0,89$).

При оценке Т-независимого вторичного иммуногенеза была установлена обратная взаимосвязь ($r = - 0,57$) между уровнем фагоцитарной активности лейкоцитов крови и количественным содержанием IgY в сыворотке кур, которая показывала, что снижение активности лейкоцитов соответствует повышению количества IgY в сыворотке крови кур.

Эти закономерности отражают систему прямых и обратных взаимосвязей наиболее важных компонентов иммунной системы, которые выполняют роль своеобразных переключателей иммунного ответа, что отражено в работах А.А. Михайленко и Т.А. Федотовой [102].

Многочисленные исследования на млекопитающих в этой области подтверждают предположение об участии Т-клеток (прямо или опосредованно) в регуляции иммунного ответа на Т-независимые антигены 2 типа (ТН-2), что выражается в повышении уровня иммуноглобулина G млекопитающих, вызванного переключением изотипов иммуноглобулинов, нам же было интересно изучить данный вопрос у кур [22,53].

При изучении функциональной активности перитонеальных макрофагов было установлено, что Т-зависимый антиген в первичном иммунном ответе не стимулировал макрофаги, но поглотительная способность клеток возрастала, что подтверждалось в увеличении фагоцитарного числа.

Т-независимый антиген вызывал повышение активности клеток в течение первичного иммунного ответа. В процессе вторичного иммуногенеза характер влияния антигенов на макрофаги был аналогичен, оба вызывали повышение фагоцитарного показателя на 3-и сутки исследования.

Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови в процессе первичного иммуногенеза показала, что на 3-и сутки введения Т-зависимого антигена достоверно повышалась концентрация иммуноглобулина Y до 3,1 мг/мл (контроль – 1,4 мг/мл).

Введение Т-независимого антигена не вызвало достоверных отличий в содержании IgY от контрольной группы, но концентрация иммуноглобулина была выше на протяжении всех суток исследования в процессе первичного иммунного ответа.

Во вторичном иммуногенезе наблюдали аналогичную тенденцию к увеличению IgY в 1-е и 3-и сутки обеих опытных групп, что свидетельствовало об участии Т-клеточных факторов в процессе вторичного Т-независимого иммунного ответа, ответственных за переключение изотипов антител в активированных В-клетках.

Эти данные подтверждаются исследованиями, проведенными на лабораторных мышах [57, 58].

Изменения в относительном содержании Т-лимфоцитов и их субпопуляций при введении Т-зависимого антигена в первичном иммунном ответе наблюдались преимущественно в тимусе и крови, при этом в тимусе увеличивалось общее содержание Т-клеток, CD4- и CD8-клеток.

Т-независимый антиген стимулировал Т-лимфоциты преимущественно в селезенке и крови, что выражалось в повышении числа CD4-клеток, а на 5-е и 7-е сутки исследования изменения регистрировались в тимусе.

В процессе первичного иммунного ответа в тимусе увеличилось число CD8-клеток, а в селезенке и крови соотношение Т-хелперов и цитотоксических клеток имело циклический характер, что, по-видимому, связано с перераспределением иммунокомпетентных клеток из циркуляции во вторичные лимфоидные органы, та же тенденция наблюдалась во вторичном иммунном ответе с преобладанием Т-хелперов [13, 41, 53, 137].

Введение Т-зависимого антигена стимулировало значительное повышение количества В-лимфоцитов в селезенке и крови, что отражалось на уровне IgY в сыворотке кур. В результате воздействия Т-независимого антигена повышалось содержание В-спленоцитов на 3-и сутки первичного иммуногенеза, что так же выражалось в тенденции к повышению иммуноглобулина Y сыворотки крови кур.

В процессе вторичного иммунного ответа введение Т-зависимого антигена повышало содержание В-лимфоцитов в селезенке только на 5-е сутки. Т-независимый антиген способствовал достоверному увеличению количества В-клеток в селезенке на 3-и сутки, а на 5-е и 7-е сутки тенденция к их увеличению сохранялась.

Таким образом, была установлена различная динамика показателей в процессе Т-зависимого и Т-независимого иммунного ответа у кур при сохранении основных иммунологических критериев функционирования иммунной системы [53, 57, 102].

Оценку поствакцинального иммунного ответа на введение живой вирус-вакцины против ИБК проводили по ранее описанной схеме для модельных

T-зависимого и T-независимого антигенов с целью определения к какому типу антигенов относится живая вирус-вакцина против ИБК.

Было показано достоверное увеличение количества моноцитов в крови на 1-е и 3-и сутки при окулярном методе введения вакцины, в остальные сутки первичного и вторичного иммуногенеза в эксперименте отличий от контрольных значений не наблюдалось.

Известно, что проникший в организм антиген сорбируют на своей поверхности и поглощают эндоцитозом дендритные клетки, а макрофаги подвергают патогены фагоцитозу. И те и другие клетки являются антигенпрезентирующими, которые формируют первую линию защиты организма [34, 37, 57, 110, 149].

Дендритные клетки, циркулирующие моноциты, а также тканевые макрофаги облают способностью экспрессировать на своей мембране комплексы пептидов антигена с МНС класса I и МНС класса II, с помощью которых они вступают во взаимодействие с T-лимфоцитами в T-зависимых зонах периферических лимфоидных органов [149,160]. Эти процессы способствовали повышению фагоцитарной активности лейкоцитов крови под влиянием живой вирус-вакцины, что увеличивало фагоцитарный показатель на 1-е сутки первичного и вторичного иммуногенеза. На 3-и сутки после первичного введения вакцины активировались перитонеальные макрофаги, что свидетельствует о формировании системного иммунного ответа, а во вторичном иммуногенезе их фагоцитарный показатель был выше на протяжении всего периода исследования.

Индукция гуморального иммунного ответа была выражена в виде достоверного увеличения количественного содержания IgY на 3-и сутки первичного иммуногенеза (3,0 мг/мл, контроль – 1,4 мг/мл), что также наблюдалось в опытной группе по введению T-зависимого антигена.

Было установлено, что динамика антителообразования у кур в данном эксперименте отличалась от млекопитающих [119].

В результате проведенных исследований по иммунизации живой вакциной было установлено, что инкубация клеток с теофиллином привела к выявлению большого числа цитотоксических Т-лимфоцитов в процессе первичного и вторичного иммунного ответа в тимусе.

Известно, что вирус инфекционного бронхита кур обладает тропностью к эпителию слизистых оболочек, преимущественно дыхательных путей [76]. После репликации вируса в клетках слизистой оболочки запускается каскад гуморальных и клеточных реакций иммунной системы. В Т-зависимых зонах периферических лимфоидных органов происходит передача информации об антигене, где АПК с комплексом пептидов антигена и молекулами МНС на поверхности своей клеточной мембраны взаимодействует с Т-лимфоцитами, активируя их. После Т-В-клеточной кооперации В-лимфоциты мигрируют в зону фолликулов вторичных лимфоидных органов, формируя герминативные центры, где пролиферируют и дифференцируются в плазматические клетки, способные синтезировать специфические антитела [2, 11, 14, 202].

В селезенке в процессе первичного иммунного ответа установлены цикличные изменения числа CD8- и CD4-клеток, что обусловлено функциональными особенностями вторичных лимфоидных органов, где происходит узнавание антигена и дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки, способные секретировать специфические антитела.

А во вторичном иммуногенезе в селезенке преобладали CD4-клетки, что связано с активацией В-клеток памяти и процессами антителообразования [158].

Изменение числа Т-лимфоцитов в бурсе, по-видимому, отражает циркуляцию их в крови. Число CD4-клеток в крови и В-клеток в селезенке и крови коррелировало с уровнем IgY в сыворотке кур.

По результатам проведенных исследований было установлено, что иммунологические показатели при введении живой вирус-вакцины коррелировали с параметрами иммунного ответа на Т-зависимый антиген. Это выражалось в повышении числа иммунокомпетентных клеток (моноцитов и псевдоэозинофилов), уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови,

содержания IgY в сыворотке крови, а также характеризовалось увеличением общего числа тимоцитов с преобладание CD8-клеток в тимусе. Количественное содержание В-лимфоцитов коррелировало с уровнем иммуноглобулина Y в крови кур под влиянием T-зависимого антигена и живой вакцины.

Следует отметить, что, несмотря на различные способы введения T-зависимого антигена и живой вакцины (внутрибрюшинный и окулярный соответственно), наши результаты показали развитие системного иммунного ответа в обоих случаях.

Было установлено, что динамика антителообразования при введении T-зависимого антигена и живой вакцины имела некоторые различия. Так, под воздействием тимусзависимого антигена во вторичном иммунном ответе наблюдалось повышение количественного содержания иммуноглобулина Y в 1-е и 3-и сутки иммуногенеза. Окулярное повторное введение живой вакцины не вызвало повышение концентрации IgY в сыворотке крови кур.

По-видимому, это связано с тем, что презентация вирусного антигена проходит по эндогенному пути с участием МНС класса I и CD8-клеток, а пептиды эритроцитов барана в комплексе с МНС класса II взаимодействуют с T-хелперами и В-лимфоцитами, что вызывает активацию В-клеток с последующим синтезом специфических антител. В случае вирусного антигена T-хелперы включаются в иммунный ответ позже [110].

Исходя из данных литературы и результатов собственного научно-экспериментального исследования, можно заключить, что индукция иммунного ответа на T-зависимый и T-независимый антигены имеет ряд существенных отличий в количественной динамике моноклеарных клеток и количественном содержании IgY в сыворотке крови. Дополнительное изучение поствакцинального иммунного ответа на живую вакцину также выявило некоторые особенности иммуногенеза у кур.

В ходе нашей работы также были изучены параметры функциональной активности иммунокомпетентных клеток и иммуноглобулина Y в процессе иммунного ответа под влиянием метаболитов микроорганизмов.

Общие принципы нагрузочного метода исследования компонентов иммунной системы описаны А.В. Карауловым (2002), оценка которого проводится по вычислению индекса сдвига [80].

Известно, что нагрузочные тесты, как один из уровней иммунологического исследования, используются в медицинской практике для прогностической оценки влияния факторов на различные субпопуляции лимфоцитов (например, для определения эффективности иммуномодуляторов) [92, 94, 95].

Впервые нагрузочный тест с метаболитами различных микроорганизмов (*Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella enteritidis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*) проводили на основе реакции иммунодиффузии, метода определения фагоцитарной активности лейкоцитов крови и рецепторной способности Т-спленоцитов кур.

Было определено, что метаболиты патогенных грибов рода *Candida* наиболее супрессивно влияют на преципитирующие свойства IgY, фагоцитарную активность лейкоцитов крови и рецепторную способность Т-спленоцитов кур по сравнению с метаболитами дерматофитных грибов *Trichophyton* и *Microsporum*, а также метаболитов бактерий рода *Salmonella*.

Было установлено, что среднее значение индекса сдвига в группе введения живой вакцины выше показателей Т-зависимого и Т-независимого антигенов. По-видимому, это объясняется тем, что сыворотка кур вакцинированных живой вирус-вакциной содержит больше компонентов, блокирующих метаболиты микроорганизмов.

В нагрузочном тесте с метаболитами установлено снижение фагоцитарной активности лейкоцитов крови и повышение адгезивной способности Т-спленоцитов на 7-е сутки первичного иммунного ответа при инкубации со всеми типами изучаемых метаболитов, что связано с конституционными закономерностями распределения функциональной нагрузки иммунной системой [102].

Всестороннее изучение иммунного ответа у кур формирует комплексную картину, отражающую динамические изменения в организме под воздействием антигена [218, 220]. Поэтому накопление знаний о нем и его влиянии на клеточное и гуморальное звенья иммунной системы позволят прогнозировать ответ организма кур при введении функциональных аналогов данных антигенов.

6. ВЫВОДЫ

1. Определены иммунохимические свойства иммуноглобулина класса Y, выделенного из сыворотки крови и желтка кур. По данным электрофоретического анализа установлено, что сывороточный и желточный IgY имеют молекулярную массу 180 кДа.
2. Получена моноспецифическая антисыворотка к IgY, выделенному из сыворотки крови кур для количественного определения данного иммуноглобулина в реакции иммунодиффузии (титр 1:16).
3. Дана количественная характеристика и установлена различная динамика иммунологических показателей в процессе T-зависимого, T-независимого иммунного ответа у кур при сохранении основных иммунологических критериев функционирования иммунной системы животных (отрицательная корреляция между показателями лимфоцитов и псевдоэозинофилов при введении T-зависимого антигена $r = -0,97$ и $-0,93$ в процессе первичного и вторичного иммуногенеза, при введении T-независимого антигена $r = -0,82$ и $-0,98$ соответственно).
4. Определены показатели иммунного ответа на введение живой вакцины и установлено, что они коррелируют с параметрами иммунного ответа на T-зависимый антиген, несмотря на различие путей их презентации антигенпредставляющими клетками (экзогенный и эндогенный пути).
5. Установлено, что максимальный уровень IgY в сыворотке крови на T-зависимые антигены (эритроциты барана и аттенуированный вирус) регистрируется на 3-и сутки иммунного ответа (3,1 мг/мл и 3,0 мг/мл).

соответственно, контроль - 1,4 мг/мл), что отличается от динамики антителообразования при Т-независимом иммунном ответе.

6. Показано, что в процессе вторичного Т-независимого иммунного ответа у кур повышается содержание IgY в сыворотке крови, что косвенно свидетельствует об участии Т-клеточных факторов (3-и сутки $-3,0 \pm 0,09$ мг/мл, контроль $-2,5 \pm 0,04$ мг/мл соответственно) в иммуногенезе.

7. Определено, что метаболиты патогенных грибов рода *Candida* наиболее супрессивно влияют на преципитирующие свойства IgY, фагоцитарную активность лейкоцитов крови и рецепторную способность Т-спленоцитов кур по сравнению с метаболитами дерматофитных грибов *Trichophyton* и *Microsporum*, и бактерий рода *Salmonella*.

8. На 7-е сутки первичного иммунного ответа на все типы изучаемых метаболитов установлена обратная взаимосвязь между фагоцитарной активностью лейкоцитов крови и адгезивной способностью Т-спленоцитов, что связано с конституционными закономерностями распределения функциональной нагрузки иммунной системой.

7. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Разработаны методические рекомендации по получению моноспецифической антисыворотки к IgY из сыворотки крови кур.

РИД с использованием моноспецифических антисывороток может быть рекомендована в качестве метода оценки эффективности профилактических препаратов, а также возрастной динамики становления гуморального звена иммунитета у птицы в онтогенезе.

Для клинических исследований предлагается методический подход к оценке поствакцинального иммунного ответа у кур. Этот методический подход заключается в определении соотношения псевдозозинофилов и лимфоцитов ($r < -0,5$) и в дифференцированном анализе показателей иммунного ответа на различных этапах его развития. Показана возможность использования данного подхода на примере живой вирус-вакцины для оценки поствакцинального иммунного ответа у кур.

ФАНО РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ
Я.Р. КОВАЛЕНКО»



«УТВЕРЖДАЮ»

Академик РАН

М.И. Гулюкин

2014 г.

**Методические положения
по получению моноспецифической
антисыворотки к IgY кур**

Москва - 2014

Методические положения разработаны заведующей лабораторией иммунологии, доктором биологических наук И.Ю. Ездаковой и научным сотрудником лаборатории иммунологии М.С. Журавлевой

Методические положения предназначены для сотрудников научно-исследовательских и образовательных учреждений

Методические положения рассмотрены и одобрены на заседании методической комиссии ВИЭВ « 19 » ноября 2014 г., протокол № 7.

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор В.Ф. Поляков,
кандидат биологических наук Г.А. Надточей

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адельман Д. Введение в иммунологию Практика: учеб./ Д. Адельман, Х. Кесарвала, Т. Фишер.- М.:Практика.-2000.- 806 с.
2. Акулов А.В. Патологоанатомическая диагностика болезней птиц/А.В. Акулов, В. М. Апатенко, Б.Ф. Бессарабов.-М.: Колос.- 1978.- 440 с.
3. Алексеева С. А. Возрастные изменения местной защиты дыхательных путей у кур/С.А. Алексеева//Ветеринария.-1985.-№ 2.-С.30.
4. Анатомия домашних животных: учеб. 3-е изд., испр./ И.В. Хрусталева, Н.В. Михайлов, Я.И. Шнейберг. – М.: Колос, 2000.-704 с.
5. Андреева Н.Л. Иммунобиохимические изменения в организме бройлеров при стимуляции продуктивности / Н.Л. Андреева, В.Д. Соколов// Ветеринария.-1987.- № 7.-С. 61-62.
6. Бабина М.П. Иммунология цыплят-бройлеров в онтогенезе и профилактика иммунной недостаточности, желудочно-кишечных болезней бактериальными препаратами. – Витебск, 2001.- 114 с.
7. Баринова Т.В. Анатомио-гистологические особенности строения птиц/ Т.В. Баринова.– Вологда, Молочное: ИЦ ВГМХА, 2010.- 31 с.
8. Беляева С.Н. Адаптационно-иммунологические процессы в организме цыплят-бройлеров после применения иммуномодулятора тимогена/ С.Н. Беляева, Н.В. Безбородов// Птица и птицепродукты.-2009.- № 3. - С. 23-27.
9. Бессарабов Б.Ф. Защитные механизмы птиц в постэмбриональном периоде/ Б.Ф. Бессарабов// Птицеводство.-2009.-№10.-С. 46-47.
10. Бирман Б.Я. Иммунодефицит у птиц/ Б.Я. Бирман, И.Н. Громов.- Минск.- Бизнес офсет, 2001.-140 с.
11. Бобылева Г.А. Состояние и перспективы развития отрасли птицеводства/ Г.А. Бобылева//VI-й Международный ветеринарный конгресс по птицеводству, Москва, 2011.-С. 7-13.

12. Бодрова Л.Ф. Клинико-гематологические показатели и морфологическая характеристика внутренних органов кур разных кроссов, получавших низкоэнергетические кормосмеси в промышленных условиях: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 06.02.01 /Барнаул, 2011.-29 с.
13. Болотников И.А. Биохимические и морфологические основы иммунологии птиц. Идентификация Т- и В- лимфоцитов периферической крови птиц с использованием прижизненного маркирования на кислую и щелочную фосфатазу/ И.А. Болотников, И.А. Степанов, С.А. Такшеев.- Карельский филиал АН СССР,1982.- С. 24-27.
14. Болотников И.А. Биохимические и морфологические основы иммунологии птиц. Физиолого-биохимические механизмы стресса птиц и его влияние на иммунологический статус/И.А. Болотников.- Карельский филиал АН СССР, 1982.- С.5-23.
15. Болотников И.А. Гематология птиц/ И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев.- Наука,1980.- 115 с.
16. Болотников И.А. Иммунопрофилактика инфекционных болезней птиц/ И.А. Болотников. - М.: Россельхозиздат, 1982.-183 с.
17. Болотников И.А. К методике определения форменных элементов в крови у птиц / И.А. Болотников//Лабораторное дело.-1965.№4.-С.212-213.
18. Болотников И.А. Количественное определение иммуноглобулинов в сыворотке крови птиц по методу Манчини/ И.А. Болотников, О.И. Король, Е.К. Олейник.-Методы иммунологии птиц. Карельский филиал АН СССР, 1976.-С. 38-44.
19. Болотников И.А. Стресс и иммунитет у птиц/ И.А. Болотников, В.С. Михкиева, Е.К. Олейник.- Ленинград: Наука, 1983.-118 с.

20. Бондаренко Г.М. Воспроизводительные качества родительских стад кросса «УК Кубань - 456» в зависимости от лунного цикла, биоэлектрических показателей яиц в разные сезоны года / Циклы природы и общества / Г.М. Бондаренко, В.П. Орлов, О.Н. Бурда, И.А. Сидорова // Материалы XV Международной конференции. - Ставрополь.- 2007. - Т 1. - С. 49 - 54.
21. Борисов В.В. Особенности применения инактивированных вакцин в промышленном птицеводстве/В.В. Борисов, А.В. Борисов//VII-й Международный конгресс по птицеводству.-Москва, 2011.-С.55-66.
22. Борисова Т.К. Роль цитокинов в иммунном ответе на Т-независимые антигены 2 типа/Т.К. Борисова// Микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.-2006.-№1.-С.44-47.
23. Бурда О.Н. Влияние биоэлектрических показателей, качества яиц родителей на стресс-устойчивость, резистентность цыплят яичного кросса "УК Кубань - 456": автореф. дис. ...канд. диолог. наук: 06.02.01 / Ставрополь, 2009. -23 с.
24. Бурев И.А. Усовершенствованный генератор аэрозолей для дезинфекции производственных помещений птицеводческих предприятий/И.А. Бурев, А.Т. Кушнир, И.А. Сливко//VII-й Международный ветеринарный конгресс по птицеводству.-Москва, 2011.-С. 39-40.
25. Вавилова О.В. Развитие иммунокомпетентных органов кур в антенатальном онтогенезе под влиянием "Ксидифона" и "Иммунала": автореф. дис. канд. вет. наук: 06.02.01/ Великие луки, 2010.-17 с.
26. Вавина О.В. Анатомия домашней птицы: 2-е изд., перераб. и доп./О.В. Вавина.- Нижний Новгород: НГСХА, 2008. - 41 с.
27. Васильев А.В. Гематология сельскохозяйственных животных/Васильев А.В.- Москва, 1948.- 439 с.

28. Васильев А.Г. Руководство по иммунологии и иммунопатологии/ А.Г. Васильев, Л.П. Чурилов.-2002.-507 с.
29. Васильева В.И. Возрастная морфофункциональная характеристика иммунологической активности слезной и гардеровой желез у домашних кур / В.И. Васильева. - Сб. науч. трудов.- Омск, 1983.- С 71-75.
30. Верджил Д. Вакцинация цыплят США – практические аспекты/ Д. Верджил.//III Международный конгресс по птицеводств.-Москва, 2007.-С.34-43.
31. Верещак Н. А. Оценка показателей иммунной системы и методы коррекции иммунной недостаточности у продуктивных животных и птицы в Уральском регионе: автореф. дис. ... д-ра. вет. наук: 16.00.03, 16.00.01 /Екатеринбург, 2007.-36 с.
32. Верховский О.А. Структурные и функциональные особенности иммуноглобулинов птиц/Ю.Н. Федоров, М.М. Гараева, Т.И. Алипер// Ветеринария.- 2007.-№11.-С.18-22.
33. Воробьев А.А. Иммунология и аллергология Практическая медицина/ А.А. Воробьев, А. С. Быкова, А.В. Караулова.-2006.- 288 с.
34. Воробьев А.А. Микробиология и иммунология / А.А. Воробьев.- М.: КолосС.-1999.-464 с.
35. Вракин В.Ф. Анатомия и гистология домашней птицы/ В.Ф. Вракин, М.В. Сидорова. - М.:КолосС,1984.-439 с.
36. Вракин В.Ф. Морфология сельскохозяйственных животных: (анатомия с основами цитологии, эмбриологии и гистологии) учебник для студ. высш. учебн. завед. по спец. "Зоотехния"/В. Ф. Вракин, М. В. Сидорова, 1991. - 528 с.
37. Галактионов В.Г. Иммунология/ В.Г. Галактионов.- М.: Московский университет, 1998.- 480 с.
38. Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология/ В.Г. Галактионов.- ИКЦ «Академкнига», 2005.- 413 с.

39. Герберт У. Дж. Ветеринарная иммунология: учеб./ У. Дж. Герберт.- М.: Колос.-1974.-311 с.
40. Гладков Б.А. Функциональная морфология и возрастные изменения лимфоидных фолликулов селезенки кур/Научн. труд., Воронеж, 1974.- С. 171-179.
41. Глебов Д.П. Цитологические показатели местной защиты трахеи и иммунный статус у кур при применении препаратов "Лигногумат КД-А" на фоне пониженной иммунологической реактивности: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.02/Екатеринбург, 2007.-21 с.
42. Голубничий В.П. Показатели клеточного и гуморального иммунитета у птиц при различных антигенных нагрузках организма/ В.П. Голубничий, Б.Я. Бирман//Тезисы докладов научно-производственной конференции, 1985.-С 66-67.
43. Громов И.Н. Использование морфологических исследований для оценки иммуногенных и реактогенных свойств противовирусных вакцин / И.Н. Громов, В.С. Прудников//VII-й Международный ветеринарный конгресс по птицеводству.- Москва, 2011.-С.83-85.
44. Деблик А.Г. Функциональная морфология периферических органов иммунитета цыплят при применении пробиотиков: автореф. дис. ...канд. вет. наук: 16.00.02/ Уфа,2007.-19 с.
45. Джавадов Э. Д. Инновационные достижения ветеринарной медицины в птицеводстве/ Э. Д. Джавадов// Ветеринария и кормление. – 2010. – № 5. - С. 21-22.
46. Джавадов Э. Д. Особенности вакцинопрофилактики в промышленном птицеводстве/ Э.Д. Джавадов// Птица и птицепродукты. – 2011.-№6.- С.76-77.
47. Диагностика, лечение и профилактика иммунодефицитов птиц/ Б.Я. Бирман, И. Н. Громов, В.С. Прудников, И.В. Брило, С.Л. Борознов.- Минск.-Бизнес офсет, 2008.-147 с.

48. Диагностика, профилактика и лечение инфекционных заболеваний птиц/ А.В. Борисов, В.В. Борисов, Н.С. Мудрак, Т.Б. Манин, В.Н. Ирза, Ш. К. Куляшбекова, С.В. Фролов, А.В. Фролов.-ВНИИЗЖ.-Владимир, 2008.-46 с.
49. Диагностические критерии оценки состояния иммунной системы быков-производителей/ Ездакова И.Ю., Еремина М.А., Ефремова М.С., Фёдорова Е.В.// Ветеринария и кормление. -2014.-№2.- С.10-12.
50. Дмитриева М.Е. Особенности вакцинопрофилактики иммунодепрессивных болезней птиц в промышленном птицеводстве/ М.Е. Дмитриева, Э.Д. Джавадов// Farm animals.- 2013.-№3-4.-С.81-83.
51. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология/Одесса: «АстроПринт», 1999.- 603 с.
52. Дроздова Л.И. Сравнительная морфология иммунных органов цыплят-бройлеров при воздействии в ранний постэмбриональный период разными препаратами селена и йода/ Л.И Дроздова, Е.В. Шацких// Птицеводство.-2009.- № 7 (61).-С. 73-75.
53. Ездакова И.Ю. Динамика иммунокомпетентных клеток в процессе иммунного ответа на Т-независимые и Т-зависимые антигены / И.Ю. Ездакова // Ветеринарная медицина.- 2007.-№ 1.-С. 11-12.
54. Ездакова И.Ю. Идентификация и характеристика биологических свойств белков суперсемейства иммуноглобулинов животных: дис. ...д-ра биол. наук: 03.01.06/Москва, 2012 г.-388 с.
55. Ездакова И.Ю. Корреляции параметров иммунного ответа у мышей при подкожном и пероральном методах иммунизации/И.Ю. Ездакова, М.Н. Лощинин, М.С. Ефремова//Аллергология и иммунология. -2014. - Том 15, №3.-С. 225-226.
56. Ездакова И.Ю. Методические принципы оценки поствакцинального иммунного ответа /И.Ю. Ездакова//Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.-2013.-№1.-С.49-51

57. Ездакова И.Ю. Рецепторы иммунного узнавания у животных/ И.Ю. Ездакова—М.: Спутник, 2008.-88 с.
58. Ездакова И.Ю. Сравнительная характеристика показателей иммунного ответа на Т-зависимый и Т-независимый антигены у кур/И.Ю. Ездакова, М.С. Ефремова// Ветеринария и кормление. -2014.-№ 5.- С. 74-75.
59. Ездакова И.Ю., Гончарова И.С., Ефремова М.С. Эволюционные аспекты развития иммунной системы животных //Мат. конф. «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел»: Сб. науч. тр. - М: ВИЭВ. -2011.-С.249-251.
60. Ездакова И.Ю. Динамика уровня IgY в сыворотке крови кур в процессе иммуногенеза/ И.Ю. Ездакова, М.С. Ефремова// Мат. конф. «Ветеринарная наука в промышленном птицеводстве», посвященной 50-летию со дня основания ГНУ ВНИВИП, 30-31 октября 2014 года.- ВНИВИП, 2014. - С. 60-62.
61. Ездакова И.Ю. Количественная характеристика иммунокомпетентных клеток кур в процессе поствакцинального иммунного ответа/И.Ю. Ездакова, М.С. Ефремова // Ветеринария и кормление. - 2013.-№1.-С.28-29.
62. Ефремова М.С. Выделение иммуноглобулина Y из сыворотки крови кур и желтка яиц /М.С. Ефремова/ Мат. конф. «Состояние и перспективы развития ветеринарной науки России» //Ветеринария и кормление. - 2013.-№4.-С.34-35.
63. Ефремова М.С. Иммуногематологические показатели крови кур в процессе поствакцинального иммунного ответа / М. С. Ефремова / Мат. конф. «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» // Ветеринария и кормление. - 2012. - № 5. - С. 12-13.

64. Женихова Н.И. Морфология и морфометрия органов иммунной системы суточных цыплят, полученных от разновозрастной птицы: автореф. канд. вет. наук: 16.00.02/Екатеринбург, 2006.-28 с.
65. Задарновская Г.Ф. Гистостроение тимуса у кур русской белой породы/ Задарновская Г.Ф. - Научн. труд. Ставрополь, 1979.-С. 64-66.
66. Зайцева Е.В. Морфология иммунной системы птиц/Е.В. Зайцева.- Ладомир-Брянск, 2011.- 109 с.
67. Змушко Е.И. Клиническая иммунология/ Е.И. Змушко, Е.С. Белозеров, Ю.А. Минин.- Питер, 2001.-576 с.
68. Иммунитет у кур привитых инактивированной ассоциативной вакциной/В.Н. Ирза, В.В. Борисов, С.К. Старов, В.В. Дрыгин, А.В. Борисов//Ветеринария.- 2002.- №4.-С 21-23.
69. Иммунология: в 3 т. Т. 1/У. Пол.-М.:Мир.-1988.- 476 с.
70. Инструкция по применению вакцины против инфекционного бронхита кур полиштамтной инактивированной эмульсионной/Владимир, ВНИИЗЖ.- 2009 .- 4 с.
71. Инфекционные болезни животных /А. А. Сидорчук, Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин.- М.: КолосС.-2007.-671 с.
72. Ирза А.В. Разработка тест-систем для оценки мукозального и клеточного иммунитета птиц: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.02.02 / Владимир, 2012.- 26 с.
73. Казабан К. Фабрициева сумка - визуальный индикатор/ К. Казабан, Я. Гарден, С.А. Сева//БИО.-2012.-№3.-С.26-29.
74. Казаков А.В. Иммунологическая реактивность и возможности ее использования в селекции кур на устойчивость к заболеваниям: дис. ...канд. биол. наук: 06.02.01/ Санкт-Петербург, 2006.-114 с.

75. Карпенко Е.А. Иммуноморфологические показатели у цыплят с низкой живой массой, вакцинированных против вирусных инфекций, на фоне применения иммуномодулятора Нуклевита/ Е.А. Карпенко, В.С. Прудников//VI-й Международный конгресс по птицеводству.- Москва, 2010.-С. 172-177.
76. Каспарьянц С.А. Инфекционный бронхит кур – ситуация в России и в Европе. Опыт применения вакцины Пулвак ИБ Праймер/ С.А. Каспарьянц, А.Д. Чекмарев//VII-й Международный конгресс по птицеводству. - Москва, 2011.-С. 78-83.
77. Каспарьянц С.А. Применение вакцины Пулвак ИВ Праймер для профилактики инфекционного бронхита кур в промышленном птицеводстве: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02/Москва, 2012.- 155 с.
78. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики /А.А.Кишкун. М.:ГЭОТАР Медиа.-2009.-800 с.
79. Клинико-патоморфологические изменения у цыплят при экспериментальном инфекционном бронхите: труды 3-й Всесоюзной конференции по патологической анатомии животных/ В.А. Шубин, К.П. Юров, А.Я. Фомина.- Л.-1967.-3 с.
80. Клиническая иммунология и аллергология/под ред. А.В. Караулова. - М: МИА, 2002.- 651 с.
81. Ковальчук Л.В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии/ Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская, Р.Я. Мешкова// М.: ГЭОТАР-Медиа.-2011.-640 с.
82. Колабская Л. П. Иммуноглобулины птицы/ Л. П. Колабская// Птицеводство.-1987.- № 9.- С-35-36.
83. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики/ И.П. Кондрахин. - М.:КолосС, 2004.-520 с.

84. Конопатов Ю.В. Основы иммунитета и кормление сельскохозяйственной птицы/ Ю.В. Конопатов, Е.Е. Макеева.- Санкт-Петербург, 2000.-120 с.
85. Копылова С.В. Морфология селезенки бройлеров кросса «Смена – 7» при применении гамавита/ С.В. Копылова, Л.П. Тельцова, Е.В. Зайцев// Материалы международной научно-практической конференции.- Ульяновск, 2011.-С.14-19.
86. Кочиш И.И. Биология сельскохозяйственной птицы/ И.И. Кочиш, И.Л. Сидоренко, В.И. Щербатов. - М.: КолосС, 2005.-203с.
87. Кравченко В.М. Морфогенез центральных органов иммунитета у петухов бройлеров и при дерматитах (наминах) стоп: автореф. дис. ...канд. вет. наук.:16.00.02/Екатеринбург, 2004.-19 с.
88. Красников Г.А. Фабрициева бурса как индикаторный орган при гистологическом изучении состояния иммунитета у кур/Г.А. Красников, Е.В. Медведь, Е.А. Маценко//Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: мат-лы. междунар. науч.-произв. конф.-Воронеж, 2006.-141 с.
89. Красноперова М. А. Морфофункциональная характеристика различных долей тимуса кур в постнатальном онтогенезе: автореф. дис. ...канд. вет. наук.: 16.00.02/Екатеринбург, 2004.-17 с.
90. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология/А.Я. Кульберг.-М.: Высшая школа.- 1985.-288 с.
91. Кяйвярайнен Е.Н. Строение и физиологические свойства иммуноглобулинов М и G кур/ Е.Н. Кяйвярайнен// Карельский филиал АН СССР, 1982.- С. 28-42.
92. Лабораторная диагностика синдрома эндогенной интоксикации: Метод. рекомендации. / Под ред. И.П. Корюкиной. – Пермь, 2005.-39 с.
93. Лакин Г.Ф. Биометрия./ Г.Ф. Лакин - М.: Высшая школа, 2000.-288 с.

94. Лебедев К.А. Изменение спонтанного розеткообразования под влиянием короткой инкубации лимфоцитов с антигеном/ К.А. Лебедев, Д.Р.Каулен, Н.А.Ноева // Иммунология.-1981.- №2.- С.5-8.
95. Лебедев К.А. Иммунология в клинической практике. Том 1 издания медицинской электронной библиотеки/К.А. Лебедев.-1996.-387 с.
96. Липунова Е.А. Система красной крови: Сравнительная физиология/ Е.А. Липунова, М.Ю Скоркина.-Белгород: Изд во БелГУ.-2004.- 216 с.
97. Мельников И.А. Возможные аналоги сумки Фабрициуса у млекопитающих/ И.А. Мельников// Функциональная морфология органов и систем в норме и при патологии.- Минск, 1981.- С. 99-100.
98. Мельников И.А. Количественные параметры морфогенеза бурсы Фабрициуса/ И.А. Мельников// Морфология.-т.129.- 2006.-№4.- С.81-82.
99. Методические основы получения иммуноглобулинов животных/И.Ю. Ездакова, Т.А. Чеботарева, М.С. Ефремова, И.С. Гончарова, В.Г. Окунева, Е.В. Попова // Ветеринария и кормление. - 2013. -№4.-С.32-33.
100. Методы исследования в иммунологии: в 3 т. Т. 1/ И. Лефковитс, Б. Пернис, М. Трукко, Б. Такач - М.: Мир, 1981.- 485 с.
101. Методы исследования в иммунологии: в 3 т. Т. 2/ И. Лефковитс, Б.Пернис – М.: Мир, 1983.- 350 с.
102. Михайленко А.А. Роль корреляционных взаимосвязей в оценке функциональных возможностей иммунной системы / А.А. Михайленко, Т.А. Федотова // Иммунология. 2000. - № 6. - С. 59 - 61.
103. Михкмева В.С. Возрастная динамика иммуноглобулинов сыворотки крови цыплят Методы иммунологии птиц/В.С. Михкмева// Карельский филиал АН СССР.-1976.- С.44-49.

104. Морфология центральных органов иммунной системы цыплят-бройлеров при введении в их рацион пробиотика и ферментного препарата на основе *Bac. Subtilis*/ Г.И. Корнеев, О.Ю. Сипайлова, С.С. Мартыненко, Ю. Б. Иванов, Е.П. Мирошникова// Вестник ОГУ.- 2006.- № 2.-С.75-77.
105. Мудрак Н.С. Создание и внедрение в промышленное птицеводство системы комплексного серологического мониторинга инфекционных болезней на основе иммуноферментного анализа: автореф. дис. ...д-ра биолог. наук: 03.02.02/Владимир, 2010.- 40 с.
106. Научные основы применения пробиотиков в птицеводстве/ Г.А. Ноздрин, А.Б. Иванова, А.И. Шевченко, А.Г. Ноздрин.- Монография. Новосибирск, 2005.-86 с.
107. О применении иммуномодуляторов в птицеводстве/А.В.Санин, А.А. Виденина, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин// Птица и птицеводство.- №1.-2012.-С. 34-37.
108. Общие и специальные методы исследования крови птиц промышленных кроссов/Н.В. Садовников, Н.Д. Придыбайло, Н.А. Верещак, А.С. Заслонов//Екатеринбург-Санкт-Петербург: Уральская ГСХА, НПП «АВИВАК».-2009.-с.85.
109. Овчинникова Е.В. Диагностика инфекционного бронхита кур. Ситуация в России (2007-2009 гг.)/ Е.В. Овчинникова, Л.О. Щербакова, Н.С. Мудрак, А.В. Борисов, В.В. Дрыгин//V Международный ветеринарный конгресс по птицеводству.- Москва, 2009.- 66-70 с.
110. Основы иммунологии: учебник/ Р. Цинкернагель.- М. Мир,2008.- 135 с.
111. [Основы иммунопрофилактики в птицеводстве \[Электронный ресурс\].- Режим доступа: http://www.vnivip.com/pub_imunoprofilactic.](http://www.vnivip.com/pub_imunoprofilactic)

112. Пат. 1695931 Российская Федерация/Способ выделения иммуноглобулина G из сыворотки крови кур/ Э.Д. Джавадов, Е.Н.Горбачев, И.М.Джавадова; ВНИ ветеринарный институт птицеводства.-№4705742/13; заявл. 18.04.89; опубл. 07.12.91,.-6с.
113. Пат. 2304587 Российская Федерация/Способ селективного выделения антител IgY их яичного желтка птиц отряда гусеобразных (варианты)/ Чиоу й-нэн № 2002115256/13, заявл. 10.06.2002, опубл. 27.12.2003.-17 с.
114. Пат. 510237 СССР/Способ введения антигена в лимфатические узлы животного/ А.Ю. Самострельский, М.А. Мисникова, опубл. 15.06.1976.-20с.
115. Плейфэр Дж. Наглядная иммунология/ Плейфэр Дж.- СНМ, 1999.-96 с.
116. Полушкина Н. Диагностический справочник иммунолога/ Н. Полушкина.- Астрель, Полиграфиздат, 2010.- 480 с.
117. Практикум по иммунологии/ И.А. Кондратьева и соав. – М.: АСАДЕМА, 2004. – 271 с.
118. Профилактика инфекционного бронхита кур/ Б.Я. Бирман, И.Н. Громов, В.С. Прудников, И.В. Брило, С.Л..-Минкс.-Бизнес офсет, 2008.-88 с.
119. Ройт А. Иммунология/ А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл.- М.:Мир.- 2000.- 593 с.
120. Ройт А. Основы иммунологии/ А. Ройт.- М.:Мир.-1991.-328 с.
121. Романцев М.Г. Иммунный ответ при вирусных инфекциях/ М.Г. Романцев, Ф. И. Ершов.- Санкт-Петербург,1998.- 67 с.
122. Руководство по процедуре вакцинации «Кобб-Вантресс» [Электронный ресурс].- 2008.- Режим доступа: <http://cobb-vantress.com/docs/default-source/guides/cobb-broiler-management-guide---russian.pdf?sfvrsn=0>

123. Садовников В.Н. Морфофункциональные изменения в иммунных органах у цыплят разной степени физиологической зрелости до и после воздействия регуляторными пептидами : автореферат дис. ... д-ра вет. наук :16.00.02/С.-Петербург. гос. акад. вет. мед. - Санкт-Петербург, 1995. - 47 с.
124. Селезнев С.Б. Возрастная морфология лимфоидных органов у кур клеточного содержания в зависимости от различной степени двигательной активности: автореф. дис...канд. вет. наук: 16.00.02 / С.Б. Селезнев.- Москва,1986.- 14 с.
125. Селезнев С.Б. Общие закономерности строения и развития органов иммунной системы птиц/ С.Б. Селезнев// Животноводство.-1996.- № 2.- С. 30-33.
126. Селезнев С.Б. Постнатальный органогенез иммунной системы птиц и млекопитающих (эволюционно-морфологическое исследование): автореф. дис...д-ра вет. наук.:16.00.02/ С.Б. Селезнев.- Иваново, 2000.- 27 с.
127. Селезнев С.Б. Структурная организация иммунной системы птиц и млекопитающих: лекц. курс/С.Б. Селезнев//М.: Рос. РУДН.-1999.-31 С.
128. Селезнев С.Б. Структурная характеристика иммунной системы птиц/ С.Б. Селезнев//Актуальные вопросы морфологии и хирургии XXI века. - Оренбург, 2001 .- С.-250-253.
129. Серeda Т.И. Возрастная характеристика морфологических показателей крови, белкового обмена и качества яиц кур кросса "Ломанн - белый" в условиях интенсивной технологии: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.13/Т.И. Серeda.-Троицк, 2007.-22 с.
130. Смоленский В.И. Обеспечение качества производства и применения лекарственных средств в промышленном птицеводстве/ В.И. Смоленский//III Международный конгресс по птицеводству.- Москва, 2007.-С.28-34.

131. Соарес Р. Пассивный иммунитет: часть 1./ Соарес Р. // АВ ОВО-. Минск.-2010 г.-С.1-5.
132. Соколов Е.И. Клиническая иммунология/ Е.И. Соколов. - М.: Медицина, 1998.-45 с.
133. Старун А.С. Костномозговое кроветворение и иммунореактивность цыплят в норме и при вакцинации против инфекционного ларинготрахеита на фоне применения витамина С: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.13/А.С. Старун.- Омск, 2005.-36 с.
134. Сухинина Т.Л. Регулирующие свойства пептидов тимуса и бурсы Фабрициуса при иммунодепрессии у птиц: сб. науч. тр. Т. 59/ Т.Л. Сухинина, Н.Д. Придыбайло, В.Г. Морозов.-№ 2.-1990.- С.169-172.
135. Терюханов А. Б. Инфекционный бронхит кур/ А. Б. Терюханов.- Ленинград.-Колос.-1976.-64 с.
136. Тимус и его значение для организма птиц/ сб. науч. трудов.// А.П. Стрельников.- 1975.-С. 48-51.
137. Топурия Л. Ю. Содержание Т- и В-лимфоцитов в крови цыплят-бройлеров в постнатальном онтогенезе под действием препарата рибавирина /Л.Ю. Топурия // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: матер. II региональной научной конф. – Челябинск, 2002. – С. 162–166.
138. Тотолян А. А. Клетки иммунной системы / А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин.- Наука.- 2000.-231 с.
139. Травникова Н.А. Сравнительная морфология фабрициевой бурсы цыплят-бройлеров в возрастном аспекте при разных способах содержания: автореф. дис. ...канд. вет. наук: 16.00.02 / Травникова Н.А. - Екатеринбург, 2004.-21 с.
140. Турицына Е. Г. Иммунодефициты птиц: этиология, патогенез, морфологическая диагностика, способы коррекции/Е.Г. Турицына – Красноярск.- 2012.- 283 с.

141. Тухфатова Р. Ф. Гематологические показатели кур при использовании препарата на основе серебра/ Р.Ф. Тухфатова, Е. В. Бессарабова// Птица и птицепродукты. - №1.- 2013.- С. 39-40.
142. Фабрициева сумка и ее значение для организма птиц: сб. науч. трудов/ А. П. Стрельников.- 1976.-С. 79-81.
143. Федоров Ю. Н. Иммунодефициты домашних животных/ Ю. Н. Федоров, О. А. Верховский.- Москва.-1996.- 95 с.
144. Федоров Ю.Н. Методические рекомендации по количественному определению и оценке функциональной активности иммунокомпетентных клеток животных/Ю.Н. Федоров, И.Ю. Ездакова//Сборник «Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины».-2008.-4.- С.144-158.
145. Фисинин В.И. О состоянии и перспективах развития птицеводства/ В.И. Фисинин//Российское отделение ВНАП «Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве.-2012. [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://abercade.ru/research/analysis/8088.html>.
146. Фисинин В.И. Общие проблемы птицеводства/ В.И. Фисинин //VII-й Международный ветеринарный конгресс по птицеводству.- Москва.- 2011.- С.5-19.
147. Фримель Г. /Г. Фримель. - М.: Медицина, 1987.- 472 с.
148. Хаитов Р.М. Аллергология и иммунология: учебник/Р.М. Хаитов, Н.И. Ильина.- М: ГЭОТАР-Медиа, 2009.- 656 с.
149. Хаитов Р.М. Иммунология: учебник./Р. М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. — М.: Медицина, 2000.-432 с.
150. Характеристика биологических свойств живых и инактивированных вакцин Авивак.-2012 г. 72 с. [Электронный ресурс].-Режим доступа: <http://www.avivac.com/downloads/catalog.pdf>.

151. Харлан А.Л. Морфология железы третьего века бройлеров кросса "Смена-7" в норме и при применении "Гамавита" и "Фоспренила": автореф. дис. ...канд. биол. наук: 06.02.01/Саранск, 2012.-21 с.
152. Хохолачев О. Ф. Ассоциативное течение инфекционного бронхита и синдрома снижения яйценоскости кур/ О.Ф. Хохолачев, А.Б. Терюханов // Ветеринария.-2005.- № 11. –С. 12-16.
153. Чернышова И. Н. Феноменология иммунного ответа на Т-независимые антигены 2-го типа: автореф. дис. ...канд. мед. наук: 14.03.09/Москва, 2012.-27 с.
154. Чупина О.А. Использование эксплантатов трахеи куриных эмбрионов и цыплят для изучения возбудителей инфекционных респираторных болезней птиц: автореф. дис....канд. биол. наук: 03.00.06/ О.А. Чупина. - Владимир, 2009.-27 с.
155. Шкарупа В.Ф. Влияние линии, возраста птицы, типа клеточных батарей и сезона года на потребительские достоинства яиц: автореф. дис....канд. тех. наук:05.18.15/Киев, 1984.-32 с.
156. Юдичев Ю.Ф. Анатомия животных: учебное пособие. В 2-х т. Т. 2/ Ю.Ф. Юдичев, В.В. Дегтярев, А.Г. Гончаров// Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2013. – 406 с.
157. Якименко Л. Л. Современные представления о фабрициевой бурсе птиц/ Л.Л. Якименко, В.П. Якименко// Ученые записки УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины". - 2011. - Том 47, вып.1. - С. 321-323.
158. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010.-752 с.
159. Ярилин А.А. Межклеточная кооперация в иммунном ответе. Выбор клеткой формы ответа/А.А. Ярилин//Иммунология.-2000.-№ 1.-С.17-24.
160. Ярилин А.А. Основы иммунологии/ А.А. Ярилин.-М.: Медицина.- 1999.- 608 с.

161. Adelman D. C. Manual of Allergy and Immunology/ Adelman D. C.// Lippincott Williams & Wilkins.-2002.-529 p.
162. Alexander D. R. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function/ Alexander D. R.// Seminars in Immunology.-2000.-P.349–359.
163. Arakawa H. Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers/ Arakawa H., Furusawa S., Ekino S., Yamagishi H.// 1996.-P. 2540-2546.
164. Benmmne O. Antibacterial Activity of Heterophils: A Protective Shield Against Infections in Broilers/ O. Benmmne, M. Melizi, K. Khazal, R. Bourouba// Am-Euras.J.Agris. and Environ. Sci.-2009.-P. 561-563.
165. Bienenstock J. Gut- and bronchus-associated lymphoid tissue/Bienenstock J., Befus D.// Am. J. Anat.-1984.-P. 437-445.
166. Biggs P.M. The association of lymphoid tissue with the lymph vessels in the domesticated chicken/ Biggs P.M.//Acta Anat.-1957.-P. 36-47.
167. Brambell F.W.R. The Transmission of Immunity in Birds/Brambell F.W.R.// Elsevier, New York.-1970.-P.53-59.
168. Brierley J. The selective transport of antibodies from yolk to the circulation of the chicken/ Brierley J., Hemmings W.A., J. Embryol// Exp. Morphol.-1956.-P. 34-41.
169. Burmester G. Color Atlas of Immunology/Burmester G.,A. Pezzutto// Grammllich.-2003.-336 p.
170. Burns R.B. Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*)/ Burns R.B.// Res. Vet. Sci.-1982.-P.359-367.
171. Casteleyn C. Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review/ Casteleyn C.// 2010.-P. 120-125.
172. Cesta M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen/ Cesta M.F.//Toxicol Pathol.-2006.-P.455-465.

173. Chalghoumi R. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review/ Chalghoumi R., Beckers Y., Portetelle D., Théwis A.// *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*- 2009.-№ 13(2).- P. 295-308.
174. Chicken IgY.-Thermo Scientific INSTRUCTIONS Pierce®. Purification Kit Thermo Fisher Scientific Inc.- 2013.- P. 1-5.
175. Corbel C. Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois/Corbel C., Salaun J., Belo-Diabangouaya P., Dieterlen-Lievre F.//*Dev. Biol.*-2007.-P. 478-488.
176. Davidson N.J. Delineation of chicken thymocytes by CD3-TCR complex, CD4 and CD8 antigen expression reveals phylogenically conserved and novel thymocyte subsets/ Davidson N.J.,Boyd R.L.// *Int. Immunol.*-1992.- P. 1175-1182.
177. Davison F. Avian Immunology/ Davison F.,B. K. Karel, A. Schat//Elsevier.- 2008.-451 p.
178. Fagerland J.A. Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens/ Fagerland J.A., Arp L.H.// *Avian Dis.*- 1993.P.10-18.
179. Farnell M.B. Oxidative burst mediated by toll like receptors (TLR) and CD14 on avian heterophils stimulated with bacterial toll agonists/Farnell M.B., Crippen T.L., H. H. Swaggerty// *Dev. Comp. Immunol.*-2003.-P. 423-429.
180. Gerrie A. Clem Phylogeny of Immunoglobulin structure and function. Immunoglobulin of chicken/ Gerrie A., Leslie L. W.//1969.-P.1337-1352.
181. Glavits R. Studies on the immune system of poultry/ Glavits R.,Fehviviari T., Ratz F.//*Magy. allatorv., Lapja.*-1981.-P.407-417.
182. Glick B. The avian immune system/ Glick B.//*Avian Dis.*-1979.-№ 2.-P.282-289.
183. Glick B. The bursa of Fabricius: the evolution of a discovery/ Glick B.// *Poult. Sci.*-1994.-Vol.73.-№ 7.-P. 979-983.

184. Glick B. The immune response in chicken: lymphoid development of the bursa of Fabricius and thymus response role for the gland of Harder/ Glick B.// *Poult. Sci.*-1978.-№ 5.-P. 1441-1444.
185. Gobel T.W. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken/ Gobel T.W., Kaspers B., Stangassinger M.// *Academic Press, Inc., New York. Int. Immunol.*-2001.-P. 757-762.
186. Goudswaard J. Peculiar IgA transfer in the pigeon from mother to squab/ Goudswaard J., Vanderdonk J.A., Vandergaag I., Noordzij A.// *Dev. Comp. Immunol.*-1979.-P.307-319.
187. Grogan K. B. Avian immune system/Grogan K. B.//*USAP.*-2005.-P.16-23.
188. Hamal K.R. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens/ Hamal K.R., Burgess S.C., Pevzner I.Y. Erf G.F.// *Poult. Sci.*-2006. P.-1364-1372.
189. Hatta H. A Novel Isolation Method for Hen Egg Yolk Antibody, "IgY"/ Hatta H., M. Kim, T. Yamamoto// *Agric. Biol Chem.*-1990. P.-2531-2535.
190. Holtmeier W. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses/ Holtmeier W., Kabelitz D.// *Chem Immunol Allergy.*-2005.-P. 151-183.
191. Honjo T. Immunoglobulin Genes/Honjo T., Alt F.W.//*Academic Press Limited.*-1995.- 463 p.
192. Jain A.K. First 10 days of chicken's life: today's care, tomorrow's performance/ Jain AK //*Poultry Line.*-2013.-10 p.
193. Khalil M. A prospective study of prenatal and postnatal development of thymus of Deshi chicken/ Khalil M.// *Mymensingh Medical Journal.*-2003.-Vol.12. -P.20-24.
194. Kiyono H. Mucosal Vaccines/ Kiyono H., Pearay L., O. Jerry R. McGhee// *Academic Press.*-1996.-P. 142-156.

195. Ko K. Y. Preparation of Immunoglobulin Y from Egg Yolk Using Ammonium Sulfate Precipitation and Ion Exchange Chromatography/ Ko K.Y., Ahn D. U.// Poultry Science.-2007.- P. 400–407.
196. Kowalczyk K. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken/ Kowalczyk K., Daiss J., Halpern J. and Roth T.F.// Immunology.-1985.- P. 755-762.
197. Kraehenbuhl J-P. Epithelial M cells: differentiation and function/ Kraehenbuhl J-P., Neutra M.R.// Annu. Res.Cell .-2000.-V.16.-P.301-332.
198. Larsson A. Chicken antibodies: taking advantage of evolution - a review/ Larsson A., Balow R.M., Lindahl T.L. ,Forsberg P.O.// Poult. Sci.-1993.- P.1807-1812.
199. Leslie G. A. Ontogeny on the chicken humoral immune mechanism/ Leslie G. A.// Amer. J. Vet. Res.-1975.-Vol.36.-№4.-P.149-151.
200. Magor K.E. Structural relationship between the two IgY of the duck (*Anas platyrhynchos*): molecular genetic evidence / Magor K.E., Warr G.W., Middleton D., Wilson M.R. and Higgins D.A.// J. Immunol.-1992.- P. 2627-2633.
201. Mast J. Development of immunocompetence of broiler chickens/ Mast J., Goddeeris B.M. Vet. Immunol. Immunopathol.-1999.-P. 245-256.
202. Mestecky J. Mucosal immunology (third edition)/ Mestecky J., Michael E., W. Strober, J. Bienenstock, J. R. McGhee, L. Mayer// Elsevier Academic Press, USA P.-2005.-P.199-200.
203. Mobini B. Histological and histochemical studies on the Harderian gland in native chickens/ Mobini B.// Veterinarni Medicina.-2012.-P. 404–409.
204. Mustonen L. Bursa of Fabricius/Mustonen L., J. Alinikula, O.Lassila, K.P. Nera// 2010.-P.120-125.
205. Nagy N. Oesophagal tonsil of the chicken/ Nagy N.// Acta. Vet. Hungarica.- 2005.-Vol.53.- P. 173-188.

206. Naukkerien A. Morphological and histological characterization of the medullary cells in the bursal follicles of the chicken/Naukkerien A., Sorvari T.//Acta. Pathol. Microbiol. Scand.-1982.-№4.- P. 193-199.
207. Nilsson E. Characterization of IgY of oral immunotherapy and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections in Cystic Fibrosis Patients/Nilsson E.//Astra universitatis upsaliensis Uppsala.-2009.- 66 p.
208. Ohshima K. Immunohistochemical localization of three different immunoglobulin classes in the Harderian gland of young chicken// Ohshima K., Hiramatsu K.//Acta. Pathol. Microbiol. Scand.-2002.-Vol.34.- P. 129-133.
209. Oláh I. Esophageal tonsil of the chicken/ Oláh I., Nagy N., Magyar A., Palya V.// Poult Sci.-2003.-P.767-770.
210. Paramithiotis E. Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood/ Paramithiotis E., Ratcliffe M. J.// European Journal of Immunology.-1993. - Vol. 23.-P. 96-102.
211. Pastoret P.-P. Handbook of Vertebrate Immunology/ Pastoret P.-P., P. Griebel, H. Bazin, A. Govaerts.- Hardcover, 1998.- 635 p.
212. Patil-Kulkarni V. G. Immunity of poultry/ Patil-Kulkarni V. G.// Poult. Guide.-1980.- № 12.-P. 35-37.
213. Paul F. Cotter Avian immunoglobulin A: glycoform differences and nutritional influence/ Paul F. Cotter// Courtesy of Alltech Inc.Published.- 2007.-P. 213-220.
214. Phenotypic and genetic parameters of antibody and delayed-type hypersensitivity responses of lactating Holstein cows/ Heriazon A., Quinton M., Miglior F., Leslie KE., Sears W., Mallard BA.//Vet Immunol Immunopathol.-2013.-Aug 15;154(3-4). P.-83-92.
215. Pike K.A. The avian B-cell receptor complex: distinct roles of Igalpha and Igbeta in B-cell development/ Pike K.A., Baig E., Ratcliffe MJ.// Immunol Rev.- 2004.-P.10-25.

216. Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure/ Polson A.//Immunol Invest.-1990.- P. 253-258.
217. Porter P. Further characterization of Ig A in chicken serum and secretions with evidence of possible analogy of mammalian secretory component/ Porter P., Parry S. H.-Immunology.-№5.-1976. - P. 407-415.
218. Pulendran B. Systems vaccinology: Probing humanity's diverse immune systems with vaccines/Pulendran B.//PNAS.-2014.-Vol.111.-№34.- P.12300-12306.
219. Sayegh C.E. The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development/ Sayegh C.E., Demaries S.L., Pike K.A., Friedman J.E., Ratcliffe M.J.// Immunol Rev.- 2000.-№ 175.-P.187-200.
220. Shuzhao Li Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines/Shuzhao Li Nadine Rouphael, Sai Duraisingham, Sandra Romero-Steiner, Scott Presnell, Carl Davis, Daniel S Schmidt, Scott E Johnson, Andrea Milton, Gowrisankar Rajam Sudhir Kasturi, George M Carlone, Charlie Quinn, Damien Chaussabel, A Karolina Palucka, Mark J Mulligan, Rafi Ahmed, David S Stephens, Helder I Nakaya, Bali Pulendran//Nature Immunology, 2014.-№15.-P. 195-204.
221. Tarek K. Morpho-Histological Study of the Thymus of Broiler Chickens During Post-Hashing Age/ Tarek K., Mohamed M., Omar B., Hassina B.//International Journal of Poultry Science.-2012.- P. 78-80.
222. Tenenhouse H.S. Some physical-chemical properties of chicken gamma globulins and their pepsin and papain digestion products/ Tenenhouse H.S., Deutsch, H.F.-Immunochemistry.-1966.-№3.-P. 11-20.
223. Vadivukkarasi N. Vaccination failure in poultry/ Vadivukkarasi N., Edwin S.C., Amutha R.// Poultry Line.-2013.-P. 250-255.

224. Vanderkelen L. Role of Lysozyme Inhibitors in the Virulence of Avian Pathogenic *Escherichia coli*/ Vanderkelen L., E. Ons, Joris M.V. Herreweghe, L. Callewaert, B. M. Goddeeris, C. W. Michiels//Aix-Marseille Université, France.- 2012.-P. 136-139.
225. Warr G. IgY: clues to the origins of modern antibodies/ Warr G., Magor K., Higgins D.// Immunol Today.-1995.-P.3-5.
226. Yasuda M. A comparative study of gut-associated lymphoid tissue in calf and chicken *The Anatomical*/ Yasuda M. //Record.-2002.-Vol.266.-№4.-P. 207-217.
227. Yongning H. Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY/ Yongning H., Pamela J. Bjorkmana// The Rockefeller University, New York.-2011.-P.12431-12436.
228. Zhu X.Y. Delayed-type hypersensitivity reaction induced in broilers by killed *Staphylococcus aureus*/ Zhu X.Y., Porter R.E., Hester P.Y.-Poult. Sci. 78.-1999.-P. 1703-1710.