

**ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК ОРГАНОВ ИММУНОГЕНЕЗА ЦЫПЛЯТ
РАННЕГО ВОЗРАСТА**

Изучена динамика параметров люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции клеток фабрициевой бursы, селезенки и костного мозга цыплят раннего постнатального возраста. Установлена высокая активность кислородного метаболизма клеток костного мозга суточных цыплят. Фагоциты селезенки новорожденной птицы не способны реагировать на антигенную стимуляцию in vitro продукцией свободных радикалов кислорода. В течение первых трех недель жизни способность клеток костного мозга и селезенки генерировать разные формы АФК сокращается, а фабрициевой бursы незначительно увеличивается.

Ключевые слова: люминол- и люцигенинзависимая хемилюминесценция, фабрициева бурса, селезенка, костный мозг, цыплята.

*E.G. Turitsyna, G.V. Makarskaya,
S.V. Tarsikh, P.Yu. Tsarev*

**THE PARAMETER DYNAMICS OF THE CELL CHEMILUMINESCENCE OF EARLY AGE CHICKEN IMMUNE
GENESIS ORGANS**

The parameter dynamics of luminol-dependent and lucigenin-dependent cell chemiluminescence of chicken Fabricius bursa, spleen and bone marrow in the early postnatal age is studied. The high activity of the bone marrow cell oxygen metabolism of the chickens in the age of 24 hours is established. Spleen phagocytes of the newborn poultry are not able to respond to antigenic stimulation in vitro by free oxygen radical production. During the first three life weeks the cell ability of the bone marrow and spleen to generate different forms of ROS decreases and of Fabricius bursa slightly increases.

Key words: luminol-dependent and lucigenin-dependent chemiluminescence, Fabricius bursa, spleen, bone marrow, chickens.

Введение. Организм кур раннего постнатального возраста в условиях промышленных птицефабрик подвергается экстремальным воздействиям, таким, как значительные перепады температуры между инкубаторием и цехами выращивания, стресс при транспортировке, многократные вакцинации против вирусных инфекций и другие факторы, способные негативно влиять на физиологически незрелый организм цыплят и снижать его неспецифическую резистентность, в том числе способность клеток к фагоцитозу. Фагоцитирующие клетки при контакте с патогенным агентом генерируют активные формы кислорода (АФК), то есть индуцируют «респираторный взрыв» [1, 7]. Известно, что недостаточность и избыточность продукции АФК (суперпероксиданиона, гипохлоританиона, гидроперекиси, гидроксила) являются факторами риска для развития различных патологий [3].

В последние годы появляются работы, посвященные изучению генерации активных форм кислорода клетками крови кур [4, 5, 6]. Однако данные о продукции свободных кислородных радикалов клетками внутренних органов птиц, особенно органов иммуногенеза, в доступной научной литературе отсутствуют.

Цель исследований. Изучение параметров хемилюминесцентной кинетики генерации АФК клетками органов иммуногенеза (фабрициевой бursы, селезенки, костного мозга) цыплят раннего постнатального возраста.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены в феврале-марте 2012 года на базе Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Красноярского научного центра СО РАН и на кафедре анатомии, патологической анатомии и хирургии Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины Красноярского государственного аграрного университета.

Объектом исследования являлись петушки суточного и трехнедельного возраста породы Хайсекс уайт в количестве восьми голов, полученные из ООО «Птицефабрика Заря» Емельяновского района Красноярского края. Материалом для исследований служила суспензия клеток фабрициевой бursы, селезенки и костного мозга, выделенного из большеберцовой кости. Для получения суспензии органы измельчали в гомогенизаторе с неокрашенным раствором Хенкса, фильтровали через капроновые фильтры и центрифугировали по 10 мин со скоростью 3000 об/мин трижды, каждый раз удаляя надосадочную жидкость, затем концентрацию клеток доводили раствором Хенкса до 6 млн/мл.

Функциональную активность клеток оценивали микрометодом люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции при антигенной активации *in vitro* (активированная) и без нее (спонтанная) с использованием аппаратно-программного 36-канального комплекса «Хемилюминометр CL-3604» – ПЭВМ (СКТБ «Наука», Красноярск) по методу Топо-Оке в модификации В.М. Земскова [2] и модификации Г.В. Макарской [5]. Активацию клеток органов осуществляли *in vitro* частицами монодисперсного латекса. Уровень продукции АФК регистрировали в течение 90 мин при температуре +42°C, соответствующей температуре тела клинически здоровых кур.

В состав реакционной смеси входила суспензия клеток в объеме 100 мкл; 200 мкл раствора люминола ("Sigma", USA) в концентрации $2,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ или люцигенина ("Sigma-Aldrich", Switzerland) 10^{-4}M на растворе Хенкса при pH=7,4, 50 мкл взвеси частиц латекса размером 2,3 мкм в концентрации $5 \cdot 10^8$ частиц/мл (ВНИИСК, С.-Петербург), опсонизированных белками пулловой сыворотки крови кур. В анализе хемилюминесцентной кинетики учитывались амплитуда максимальной активности хемилюминесцентной реакции (I_{max} , имп/с); время достижения максимума активности хемилюминесценции (T_{max} , мин); площадь под кривой хемилюминесценции (S , имп. за 90 мин), определяющая суммарный объем АФК, генерируемых клетками за время записи хемилюминесцентной кривой; индекс активации ($IA = S_{\text{акт.}}/S_{\text{спонт.}}$, усл. ед.), как отношение светосумм активированной и спонтанной хемилюминесценции.

Результаты исследований и их обсуждение. Максимально высокий уровень интенсивности спонтанной и активированной продукции всех видов АФК демонстрировали костномозговые клетки суточных цыплят. Показатели их хемилюминесцентной кинетики превысили параметры клеток селезенки в 1,3–2 раза, а клеток фабрициевой бursы – в 8–13 раз (рис. 1), что свидетельствовало о высоком функциональном напряжении костномозговых клеток и отсутствии зрелых фагоцитов в фабрициевой бурсе новорожденной птицы. Несмотря на высокие значения показателей интенсивности ХЛ-реакции клеток селезенки, антигенная активация *in vitro* не стимулировала, а подавляла продукцию ими любых форм АФК на 9–16 % относительно спонтанной генерации (рис. 1). Активность продукции первичных люцигенинзависимых АФК (супероксида-ниона) клетками органов иммуногенеза как при спонтанной, так и антигениндуцированной хемилюминесценции, в 4–5 раз превышала показатели продукции люминолзависимых радикалов. Эти данные совпадают с результатами проведенных ранее исследований хемилюминесценции клеток цельной крови кур и подтверждают видовые особенности течения свободнорадикальных процессов у птиц [5].

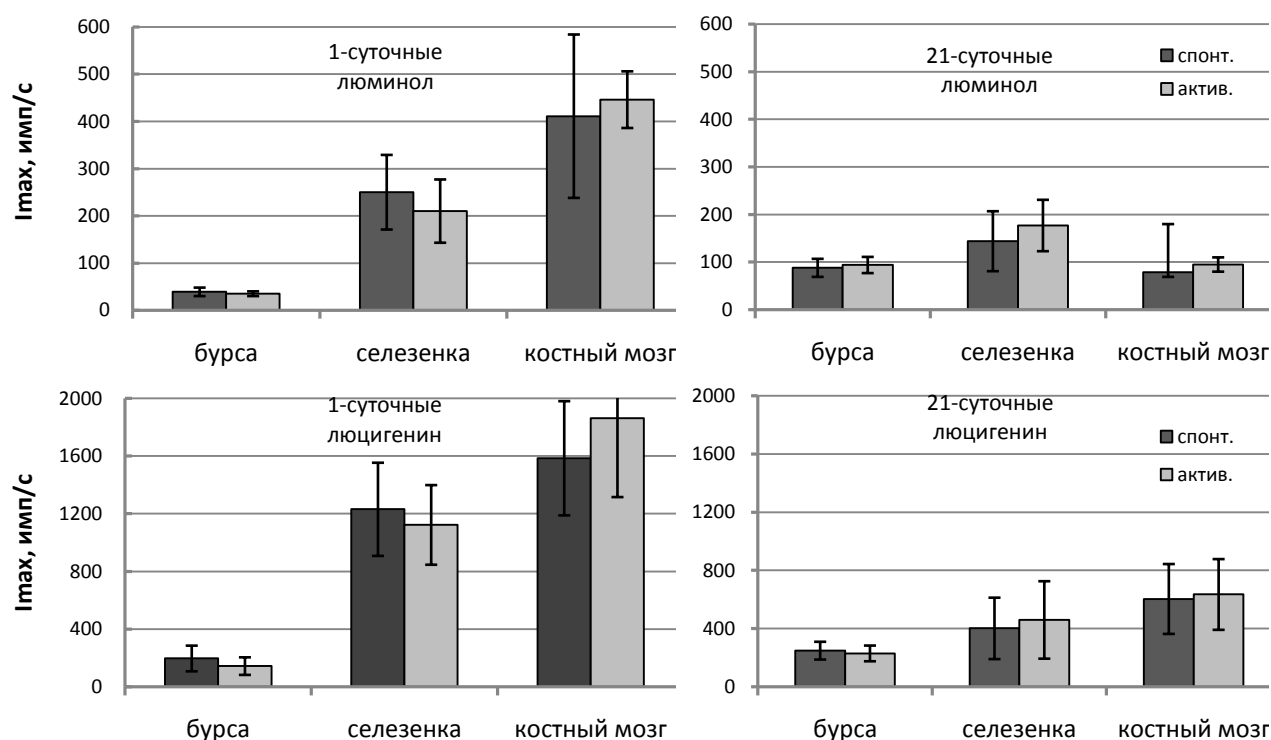


Рис. 1. Максимальная интенсивность (I_{max} , имп/с) люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции клеток органов иммуногенеза цыплят раннего возраста

У трехнедельных цыплят значение максимальной интенсивности спонтанной и активированной генерации люминол- и люцигенинзависимых АФК костномозговыми клетками сократилось на 80 %, а фагоцитами селезенки – на 16–40 % относительно показателей суточной птицы. Способность клеток фабрициевой бursы генерировать активные формы кислорода за первые три недели жизни выросла в 2,2–2,6 раза, что, на наш взгляд, свидетельствовало о появлении в органе функционально активных фагоцитов. Тем не менее величина показателя продукции люминол- и люцигенинзависимых АФК клетками фабрициевой бursы трехнедельной птицы была ниже показателей костномозговых клеток в 2,4–2,8 раза, а клеток селезенки – в 1,6–2 раза, судя по кинетике как спонтанной, так и антигенактивированной ХЛ-реакции.

Наибольший суммарный объем продукции (S) всех видов АФК демонстрировали клетки костного мозга суточных цыплят (рис. 2). Значение параметра S люминолзависимой спонтанной и активированной хемилюминесцентной кинетики составляло $(0,37 \pm 0,14) \times 10^6$ и $(0,57 \pm 0,07) \times 10^6$ имп. за 90 мин, люцигенинзависимой – $(1,25 \pm 0,29) \times 10^6$ и $(1,85 \pm 0,49) \times 10^6$ имп. за 90 мин соответственно. Эти значения превышают показатели клеток фабрициевой бursы при использовании в качестве ХЛ-зонда люминола в 4–5 раз, а люцигенина – в 1,6–3,5 раза.

Антигенная стимуляция клеток бursы частицами латекса *in vitro* подавляла продукцию люцигенинзависимых радикалов почти на 30 % относительно показателей спонтанной ХЛ-реакции. Но возрастающая при этом величина объема продукции люминолзависимых АФК антигенактивированных клеток свидетельствует об активизации антиоксидантных агентов, утилизирующих супероксид анионы. Разница между суммарной продукцией клетками костного мозга и селезенки люминолзависимых АФК составила 1,6–2,4 раза, люцигенинзависимых радикалов – 1,4–1,8 раза. Следует отметить, что костномозговые клетки суточной птицы отличались крайней неоднородностью параметров ХЛ, о чем свидетельствовала высокая вариабельность значений светосуммы и максимальной интенсивности ХЛ-реакции (рис. 2).

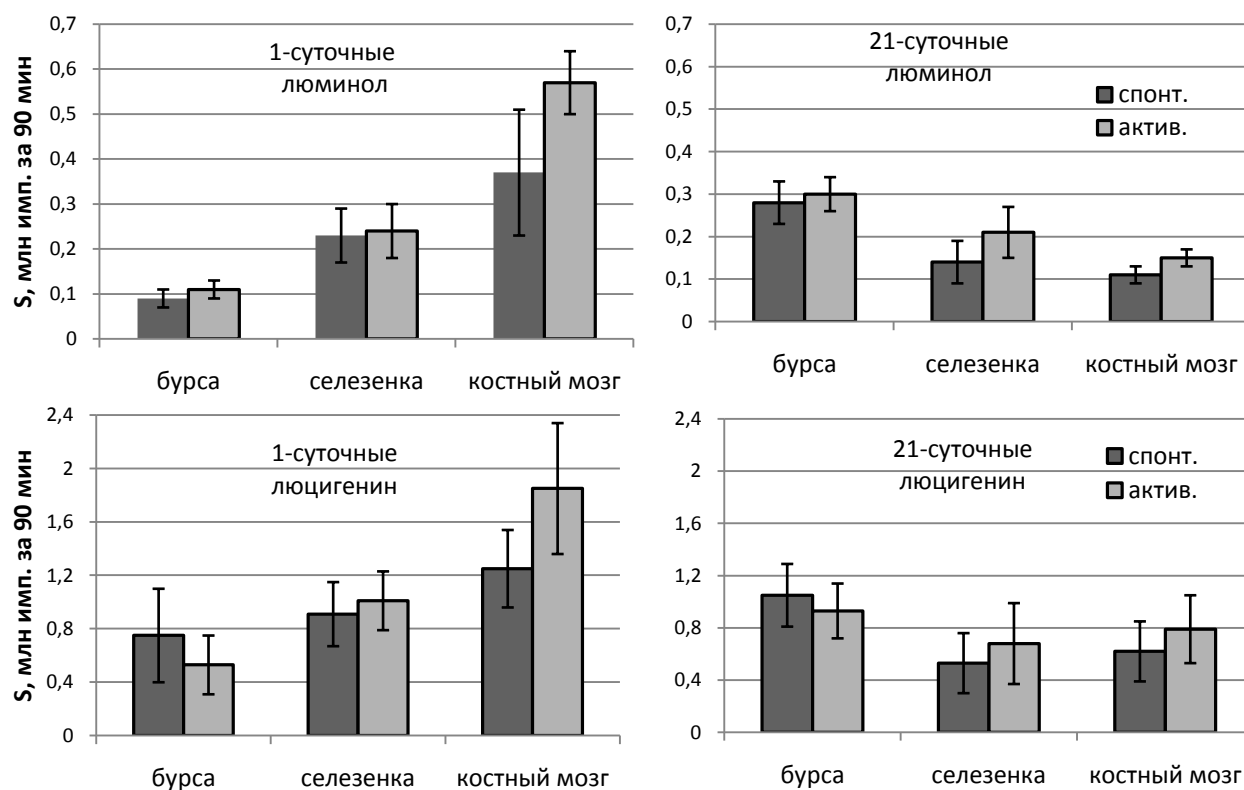


Рис. 2. Показатели суммарного объема (S) спонтанной и антигенактивированной продукции люминол- и люцигенинзависимых АФК клетками органов иммуногенеза цыплят раннего возраста по результатам хемилюминесцентного анализа

У трехнедельного молодняка кур объем продукции всех видов АФК, судя по спонтанной и активированной хемилюминесценции, клетками костного мозга сократился в 2–4 раза, селезенки – на 20–45 % относительно исходных показателей. Клетки фабрициевой бursы увеличили генерацию первичных люцигенинза-

висимых кислородных радикалов в 1,4–1,8 раза, а вторичных люминолзависимых – почти в 3 раза по сравнению с суточными цыплятами.

Значения параметра времени достижения максимума хемилюминесцентной кинетики заметно отличались у клеточных суспензий обследованных органов иммуногенеза, но незначительно изменялись при выборе ХЛ-зонда, антигенной активации клеток и увеличении возраста птицы (табл.).

Время достижения максимума (T_{\max} , мин) люминол- и люцигенинзависимой спонтанной и активированной *in vitro* хемилюминесценции клеток органов иммуногенеза цыплят раннего возраста

ХЛ-зонд	1-суточные цыплята		21-суточные цыплята	
	Спонтанная	Активированная	Спонтанная	Активированная
<i>Фабрициева бурса</i>				
Люминол	15±5*	16±4*	14±5	12±4
Люцигенин	17±3**	20±3**	30±7**	24±8
<i>Селезенка</i>				
Люминол	7±1	10±1	5±1	7±1
Люцигенин	7±1	9±1	8±1	10±1
<i>Костный мозг</i>				
Люминол	6 ± 1	10 ± 2	6 ± 1	11 ± 1
Люцигенин	7 ± 1	10 ± 0,3	11 ± 1	13 ± 0,5

* $P \leq 0,5$; ** $P \leq 0,1$ по сравнению с соответствующей реакцией клеток селезенки и костного мозга.

Хемилюминесцентные кривые клеток селезенки и костного мозга в 2–2,5 раза быстрее достигали максимума, чем показатели клеток фабрициевой бursы, как в первые сутки жизни, так и у птицы трехнедельного возраста (табл.). У суточных цыплят антигенная стимуляция клеток всех органов *in vitro* частицами латекса тормозила люминол- и люцигенинзависимую ХЛ-реакцию и увеличивала показатели T_{\max} от 7–17 % (фабрициева бурса) до 43–67 % (селезенка и костный мозг). С возрастом только клетки фабрициевой бursы отвечали на антигенное раздражение незначительным сокращением времени достижения максимума ХЛ-реакции.

Важным параметром функциональной активности клеток является индекс активации, показывающий потенциальные возможности фагоцитов к генерации свободных радикалов кислорода в ответ на антигенную стимуляцию. Исследования показали положительное влияние возраста птицы на функциональную активность фагоцитов селезенки, о чем свидетельствовал рост индекса активации клеток при генерации люминолзависимых АФК с 1,04 до 1,5 усл. ед., то есть на 44 %, а люцигенинзависимых радикалов – на 15 % (рис. 3).

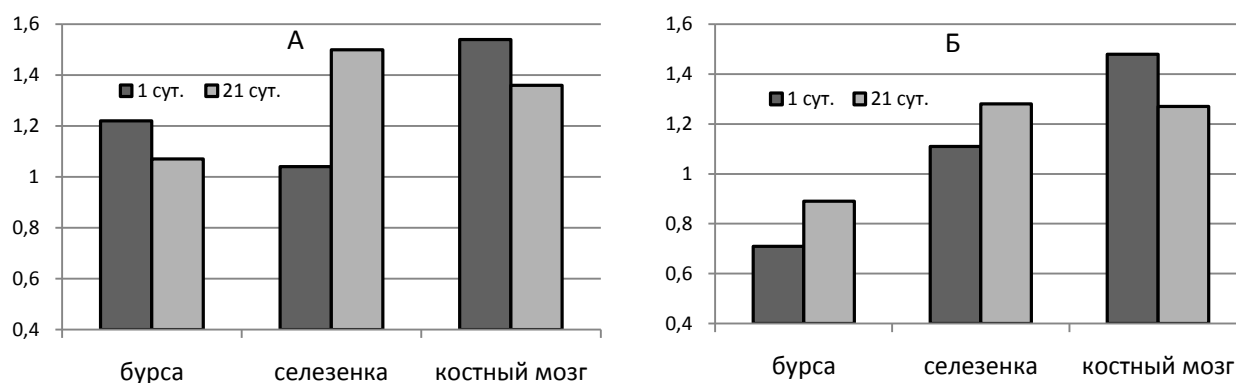


Рис. 3. Возрастная динамика индекса активации (ИА, усл. ед.) продукции люминол- (А) и люцигенинзависимых (Б) АФК клетками органов иммуногенеза кур раннего возраста

Индекс активации костномозговых клеток снижался при продукции всех видов АФК: на 12 % люминолзависимых и почти на 14% люцигенинзависимых. Антигенная стимуляция клеток фабрициевой бursы подавляла продукцию первичных люцигенинзависимых АФК птицы раннего постнатального возраста, на что указывало

падение индекса активации ниже 1,0 возможно из-за активации клеточных антиоксидантных ферментов, выполняющих функцию перехватчиков свободных радикалов. Индекс активации при образовании вторичных люминолзависимых АФК отличался низкими показателями (1,22) и с возрастом сокращался (рис. 3).

Выводы

1. Костномозговые клетки кур раннего постнатального возраста характеризуются высокой активностью кислородного метаболизма и снижением способности реагировать на антигенное раздражение продукцией всех видов АФК в первые недели жизни птицы.

2. Клетки фабрициевой бursы отличаются крайне низким уровнем течения свободнорадикальных процессов и подавлением кислородного метаболизма при антигенном ответе *in vitro*.

3. Потенциальные возможности клеток селезенки суточных цыплят в качестве фагоцитов минимальны, но с возрастом увеличиваются, что свидетельствует о функциональной незрелости механизмов неспецифической реактивности новорожденной птицы и незавершенном морфогенезе органов иммунной системы.

Литература

1. Бахов Н.И., Майчук Ю.Ф., Корнев А.В. Механизмы защиты организма от вирусных инфекций: нейтрофильные лейкоциты // Успехи современной биологии. – 2000. – Т. 130. – № 1. – С. 23–35.
2. Земсков В.М., Барсуков А.А. Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток): метод. рекомендации. – М.: Ин-т иммунологии МЗ СССР, 1988. – 20 с.
3. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
4. Садовников Н.В. Использование метода биохемилюминесценции и ферментативной антиокислительной системы крови для оценки функционального состояния цыплят в норме и при гипотрофии // БИО. – 2002. – № 4. – С. 16.
5. Makarskaya G.V., Tarskikh S.V., Turitsyna E.G. Luminol- and Lucigenin-Dependent Chemiluminescence of Chicken Whole-Blood Cells during Postnatal Ontogen // Russian Agricultural Sciences. – 2011. – Vol. 37. – № 3. – P. 254–257.
6. Papp Z., Smits J.E.G. Validation and novel applications of the whole-blood chemiluminescence assay of innate immune function in wild vertebrates and domestic chickens // Journal of Wildlife Diseases. – 2007. – Vol. 43. – № 4. – P. 623–634.
7. Farnell M.B., He H., Kogut M.H. Differential activation of signal transduction pathways mediating oxidative burst by chicken heterophils in response to stimulation with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid // Inflammation. – 2003. – Vol. 27. – № 4. – P. 225–231.

