

**Пономаренко А.П.,
Тимченко Л.Д.**

К ВОПРОСУ О ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ ФОРМИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У КУРИНОГО ЗАРОДЫША В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ

Аннотация. в эмбриогенезе куриного зародыша установлены закономерности, связанные с увеличением общего числа нейтрофилов, сопровождающимся повышением их ферментативной активности (увеличение количества катионных белков, кислой и щелочной фосфатазы), а также снижением общего количества лимфоцитов, при сохранении высокой ферментативной активности, связанной с увеличением количества сукцинатдегидрогеназы.

Ключевые слова: куриный эмбрион, клеточный иммунитет, ферменты, нейтрофилы, лимфоциты.

Куриный зародыш является одной из наиболее удобных моделей биологии развития и эмбриологии, что позволило накопить достаточное количество информации, описывающей закономерности его развития как в стандартных условиях, так и под действием факторов различного происхождения. Однако остается слабо изученным вопрос о закономерностях формирования иммунной системы куриного эмбриона. Имеются отдельные сведения, свидетельствующие о том, что у зародыша птиц своеобразно протекает воспаление, что связано с физиологическим недоразвитием рефлекторных механизмов, осуществляющих реакцию сосудов. Данный факт обуславливает редуцированный характер воспалительного процесса, который заключается в полном или частичном выпадении некоторых стадий воспаления в связи с недостаточным развитием тканевых комплексов в эмбриогенезе. При таком течении воспалительного процесса основной его характеристикой является фагоцитарная активность [3; 7].

По мере эмбриогенеза реактивные возможности зародыша изменяются, с чем связано развитие продуктивного компонента реакции со стороны мезенхимальных элементов [3]. В этот момент центральные и периферические органы иммунной системы заканчивают свое формирование и начинают обеспечивать функционирование клеточного иммунитета. В связи с этим, по нашему мнению, могут возникать специфические реакции на внедрение антигена, о механизме развития которых имеются лишь единичные данные и касаются, в основном, оценки количественных показателей клеточного звена иммунитета. Эти факты относятся к отдельным периодам онтогенеза, не отражая динамичности становления активности иммунных реакций.

Детальное и полное представление о закономерностях формирования механизмов иммунной защиты у куриного эмбриона можно получить при изучении активности отдельных клеток, что заключается не только в подсчете их количества, но и в определении их ферментативной активности.

Общее количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу изучали по классическим методикам.

При оценке интенсивности клеточного иммунитета определяли ферментативную активность нейтрофилов, появляющихся уже на ранних стадиях эмбриогенеза и обеспечивающих защитные реакции на любой его стадии. Нейтрофильные гранулоциты включают в свой состав различные ферменты, которые обеспечивают формирование ответной реакции организма на внедрение антигенов. В этих клетках определяли количество

катионных белков по Пигаревскому В.Е., миелопероксидазы (МПО (К.Ф.1.11.1.7)) – по Грэхему-Кноллю, кислой фосфатазы (КФ (К.Ф.3.1.3.2)) - по методике Goldberg A., Varca T., щелочной фосфатазы (ЩФ (К.Ф.3.1.3.1)) – с помощью методики Кэплой Л. [4].

Определение в нейтрофилах именно указанных ферментов связано с их высокой активностью в обеспечении различных иммунных реакций. Так, катионные белки локализуются в лизосомах нейтрофилов, обладают высокой микробной активностью, низкой токсичностью, антигенностью, а также свойствами медиатора воспаления, фактора проницаемости, стимулятора фагоцитоза, модификатора дыхательных и ферментативных процессов, вызывают дегрануляцию тучных клеток [6].

Миелопероксидаза концентрируется в специфической зернистости цитоплазмы нейтрофилов. Как и катионные белки, МПО совместно с перекисью водорода и ионами галогенов образует мощную антибактериальную систему организма, способную к деградации антител [2]. Фермент принимает участие в расщеплении перекиси водорода в клетках и разрушает токсическую перекись водорода, катализирует реакцию хлорирования чужеродных белков, сконцентрированных в фагосомах.

Кислая фосфатаза локализуется в азурофильных гранулах нейтрофилов и является основным маркером лизосом. Концентрация фермента прямо зависит от возраста клетки. Кислая фосфатаза принимает участие в фагоцитозе, пиноцитозе, лизисе тканевых компонентов. По данным Агеева А.К. [1969] в клетках при воспалительной реакции отмечается увеличение активности КФ [1].

Щелочная фосфатаза обнаруживается в специфических гранулах нейтрофилов. Наиболее высокая активность фермента в крови регистрируется у новорожденных. С развитием процессов воспаления, при интоксикации, повреждениях тканей и шоке наблюдается увеличение количества ЩФ в лейкоцитах, что, по мнению исследователей, связано с реакцией стресса [5].

В лимфоцитах, количество которых является преобладающим в крови у птиц, определяли активность сукцинатдегидрогеназы – кислородзависимого фермента, принимающего участие в обеспечении перекисного окисления. Фермент осуществляет перенос электронов по средствам митохондрий клеток, что позволяет отнести его к маркерам митохондрий. Определение количества СДГ в лимфоцитах проводили по методике Нарцисова Р.П. [4].

Оценку среднего цитохимического показателя (СЦП), свидетельствующего о количестве фермента в клетке и ее ферментативной активности, осуществляли по формуле Karlow L. [4].

Исследования проводили на 11, 13, 15, 17 и 19-е сутки развития зародышей (по 50 эмбрионов – на каждые сутки). Выбор указанных периодов эмбриогенеза обусловлен высокой степенью их критичности. Так, например, с 10 по 11-е сутки инкубации начинается интенсивный процесс развития иммунных и кроветворных органов. К 13, 15-м суткам их можно считать полностью сформированными, а с 17-х суток они начинают функционировать и обеспечивать клеточный и гуморальный иммунитет. К 19-м суткам развития можно считать практически завершенным процесс органогенеза и всего организма куриного зародыша.

Установлено, что с 11 по 15-е сутки инкубации происходит постепенное увеличение количества белых клеток соответственно с $3,8621 \pm 0,875 \times 10^9/\text{л}$ до $5,5823 \pm 0,862 \times 10^9/\text{л}$. С 17-х по 19-е сутки отмечена тенденция к снижению общего количества лейкоцитов в крови зародышей по сравнению с 15-ми сутками развития. Количество лимфоцитов на 17-е и 19-е сутки в среднем составляло, соответственно $5,487 \pm 0,932 \times 10^9/\text{л}$ и $4,527 \pm 0,851 \times 10^9/\text{л}$. Снижение количества лейкоцитов в крови эмбрионов на данные периоды развития, вероятно, связано с особенностями интенсивности кроветворения или с перераспределением

белых клеток крови внутри сосудистого русла эмбриона.

При подсчете лейкоцитарной формулы установлено, что на 11-е сутки в крови зародышей присутствуют лимфоциты ($89,61 \pm 1,50\%$), эозинофилы ($2,77 \pm 0,27\%$), моноциты - $0,69 \pm 0,11\%$, юные, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы в количестве соответственно $2,53 \pm 0,32$, $3,07 \pm 0,21$, $1,36 \pm 0,29\%$. Базофилы не обнаружены. Единичные базофилы были обнаружены в крови эмбрионов лишь на 17-е сутки развития ($0,41 \pm 0,09\%$). К 19-м суткам их количество увеличилось в среднем до $1,18 \pm 0,32\%$.

В целом из результатов гематологических исследований следует, что у птиц в эмбриональном периоде развития происходит волнообразное изменение количества лейкоцитов. Период его подъема отмечен на 11-15-е сутки развития, а спад количества клеток - с 15 по 19-е сутки инкубации. При этом в динамике лимфоцитов отмечено постепенное их снижение с 11 по 19 - е сутки. Параллельно с этим происходит увеличение общего количества базофилов, эозинофилов, моноцитов и нейтрофилов (рис. 1.).

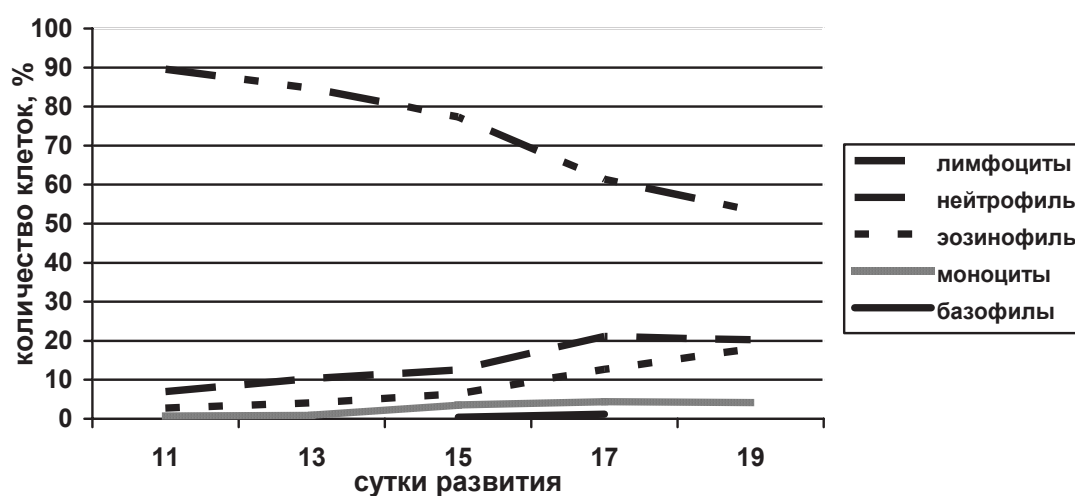


Рис. 1. Динамика изменения лейкоцитарной формулы у куриных эмбрионов в процессе их развития.

Результаты проведения оценки ферментативной активности нейтрофилов и лимфоцитов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Изменение количества ферментов в крови куриных эмбрионов в процессе их эмбрионального развития, $n=50$

Период эмбрионального развития (сутки)	Средний цитохимический показатель			
	КБ	ЩФ	КФ	СДГ
11	$0,041 \pm 0,011$	$0,77 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,03$
13	$0,062 \pm 0,018$	$0,82 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,04^*$
15	$0,921 \pm 0,036^*$	$1,26 \pm 0,09^*$	$0,54 \pm 0,06$	$0,58 \pm 0,06^*$
17	$0,984 \pm 0,054$	$1,32 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,07$
19	$1,153 \pm 0,064^*$	$1,45 \pm 0,08$	$0,72 \pm 0,09$	$1,08 \pm 0,09^*$

* $P \leq 0,05$, по сравнению с предыдущими сутками

При проведении экспериментальной работы на всех стадиях развития в нейтрофилах куриных эмбрионов не обнаружено миелопероксидазы. Поскольку фермент является

кислородзависимым, его отсутствие, по-видимому, можно связать с ограниченным поступлением кислорода через скорлуповую оболочку.

Катионные белки в нейтрофилах были обнаружены на всех стадиях развития. Их количество постепенно возрастает с $0,041 \pm 0,011$ на 11-е до $1,15 \pm 0,024$ на 19-е сутки. Максимальный достоверный прирост количества данного белка отмечен на 15-е сутки инкубации по сравнению с предыдущим периодом. Количество КБ на 15 и 17-е сутки слабо изменяется и остается практически на одном уровне.

Средний цитохимический показатель, отражающий количество щелочной фосфатазы в нейтрофилах, постепенно увеличивается в ходе развития. Необходимо отметить, что на всех стадиях эмбриогенеза количество ЩФ превышает количество остальных ферментов. Максимальное достоверное увеличение количества фермента в нейтрофилах происходит на 15-е сутки инкубации по сравнению с 13-ми.

Количество кислой фосфатазы в нейтрофилах эмбрионов птиц также увеличивается в процессе развития с $0,43 \pm 0,02$ на 11-е сутки до $0,72 \pm 0,36$ – на 19-е, но изменения по сравнению с предыдущими стадиями инкубации не достоверны. Наибольший прирост количества КФ отмечен на 17-е сутки.

Ферментативная активность лимфоцитов, заключающаяся в изменении количества сукцинатдегидрогеназы, постепенно возрастает с $0,24 \pm 0,014$ на 11-е сутки развития до $0,57 \pm 0,63$ на 19-е сутки. Достоверное наибольшее увеличение количества этого фермента приходится на 19-е сутки.

Таким образом, на основании полученных результатов установлены следующие закономерности:

- в процессе развития куриного эмбриона параллельно с увеличением общего числа нейтрофилов происходит повышение их ферментативной активности, заключающейся в увеличении количества катионных белков, кислой и щелочной фосфатазы;

- несмотря на снижение в эмбриогенезе количества лимфоцитов в крови куриного зародыша, количество в них сукцинатдегидрогеназы возрастает, что обеспечивает их достаточно высокую ферментативную активность.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Агеев, А.К. Гистохимия щелочной и кислой фосфатаз человека в норме и патологии / А.К. Агеев. – Л.: Медицина, 1969. – 143 с.
2. Бакуев, М.М. Особенности секреции миелопероксидазы и хеммлюминесцентного ответа нейтрофилов человека при контакте со стимуляторами различного происхождения / М.М. Бакуев, М.З. Саидов, А.А. Бутаков // Иммунология. - 1991. - № 1. – С. 15-18
3. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.
4. Клиническая цитохимия / Под ред. А.В. Ягоды, Н.А. Локтева. – Ставрополь: СтГМА, 2005. – 485 с.
5. Комисарова И.А. Особенности некоторых цитохимических показателей нейтрофилов крови в детском и подростковом возрасте / И.А. Комисарова, А.И. Зивенко, Р.Э. Петросян // Лабораторное дело. - 1971. - № 8. – С. 479-481.
6. Нагоев Б.С. Очерки о нейтрофильном гранулоците / Б.С. Нагоев. – Нальчик: Эльбрус, 1986. – 144 с.
7. Отрыганьев Г.К. Болезни эмбрионов птиц / Г.К. Отрыганьев, Б.Ф. Бессарабов, Ю.В. Исаев. – М.: Россельхозиздат, 1981. – 136 с.

A. Ponomarenko, L. Timchenko

TO A QUESTION ON LAWS OF FORMATION OF CELLULAR IMMUNITY AT A CHICKEN GERM IN DEVELOPMENT

Abstract. In embryogenesis a chicken germ the laws connected to increase of the general number neutrophils, by accompanying their increase activity of enzymes cations protains, sour and alkaline phosphatase, and also decrease in total lymphocytes are established, at preservation high activity of enzymes the activity connected to increase of quantity sukcinatdegidrogenasis.

Key words: chicken embryo, cellular immunity, enzymes, neutrophils, lymphocyte.