

УДК: 636.5.034:615.371

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.30

ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУНИТЕТА ПТИЦ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ GALLID ALPHAHERPESVIRUS 2 И MELEAGRID ALPHAHERPESVIRUS 1

Тарлавин Н.В. * – канд. ветеринар. наук, асс. кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана; **Веретенников В.В.** – канд. ветеринар. наук, асс. кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана; **Джавадов Э.Д.** – д-р ветеринар. наук, проф. кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана; **Красков Д.А.** – асп. кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана; **Сидоренко К.В.** – канд. ветеринар. наук, асс. кафедры биологии, экологии и гистологии; **Махнин И.А.** – асс. кафедры биохимии физиологии.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

Ключевые слова: птицеводство, эпизоотология, экспрессия генов, заражение, болезнь Марека.

Key words: poultry farming, epizootology, gene expression, infection, Marek's disease.

*tarlav1995@bk.ru

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-20084, <https://rscf.ru/project/22-26-20084/>

Поступила: 05.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ:

Болезнь Марека (MDV) – опасная иммунодепрессивная вирусная болезнь сельскохозяйственной птицы. Большинство яичных птицефабрик Российской Федерации вакцинирует своих цыплят в первые сутки жизни от этой вирусной болезни. Благодаря данной тактике вакцинопрофилактики, птицеводческие хозяйства оберегают себя от вспышки данной болезни и экономических ущербов. Традиционно среди вирусов, относящихся к данной болезни, выделяют 1-й серотип вируса болезни Марека (Gallid alphaherpesvirus 2) и 3-й серотип вируса болезни Марека, не являющийся таковым в строгом таксономическом смысле (Meleagrid alphaherpesvirus 1, также называемый герпесвирусом индеек). При инфицировании птицы данный вирус вызывает существенное изменение экспрессии основных генов иммунитета (*IL6*, *PTGS2*, *IRF7*). Исходя из полученных результатов, был сделан вывод, что экспрессия генов *IL6* и *PTGS2* незначительно превышали уровень экспрессии данных генов в группе контроля. Возможно, имело место подавление местного иммунитета иммунодепрессивными свойствами вируса болезни Марека. При исследовании экспрессии гена *IRF7* было обнаружено значительное воздействие вирусов обоих серотипов на данный ген, причем Gallid alphaherpesvirus 2 превышал уровень данного воздействия по сравнению с эффектом от Meleagrid al-

phaherpesvirus 1 в 4 раза. Данные результаты могут свидетельствовать о том, что резко возрастающая экспрессия гена *IRF7* может быть признаком репликации вируса болезни Марека (так как Gallid alphaherpesvirus 2 и Meleagrid alphaherpesvirus 1 взаимодействуют с одним и тем же клеточным рецептором, на этом основан вакцинный эффект Meleagrid alphaherpesvirus 1). С другой стороны, можно сделать вывод, что введение данных вирусов не вызывает воспалительных и иммунных реакций в илеоцекальных миндалинах птицы.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

На сегодняшний день большинство птицефабрик яичного направления в Российской Федерации проводит вакцинацию против болезни Марека. Это связано, в первую очередь, с иммуносупрессивными явлениями, возникающими при субклиническом и клиническом проявлениях болезни Марека. Несмотря на это, некоторые бройлерные птицефабрики отказываются от проведения специфической профилактики против болезни Марека, считая, что длительный срок инкубации вируса делает невозможным его патогенное проявление. При проведении данного исследования мы получили подтверждение тому, что при попадании вируса в организм птицы, в кратчайшие сроки происходит его репликация и начинается поражение иммунокомпетентных клеток.

Возбудителем болезни является двухцепочечный ДНК-содержащий вирус из семейства Orthoherpesviridae рода *Mardivirus*. Традиционно вирусы болезни Марека подразделяются на 3 серотипа: 1-й серотип (Gallid alphaherpesvirus 2), вызывающий непосредственно болезнь Марека; 2-й серотип (Gallid alphaherpesvirus 3), являющийся неонкогенным вакцинным вирусом и антигенно- и рецепторно-близкий первым двум серотипам 3-й “серотип” – герпесвирус индеек (HVT, Meleagrid alphaherpesvirus 1) [8].

Экспрессия генов иммунитета – важный показатель активности иммунных реакций, протекающих в организме. Экспрессия генов определяется путем определения в ПЦР мРНК. При данной методике исследования, уровень экспрессии конкретного гена определяется путем сравнения с экспрессией данного гена в группе контроля.

Целью данной работы являлось изуче-

ние экспрессии основных генов неспецифического иммунного ответа *IL6*, *PTGS2*, и *IRF7*, возникающей в ответ на введение в организм кур-несушек вируса болезни Марека 1-го (Gallid alphaherpesvirus 2) и 3-го (Meleagrid alphaherpesvirus 1) серотипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Все исследования (выделение нуклеиновых кислот, амплификация) были осуществлены на базе Научно-консультационного диагностического центра по птицеводству кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Объектом для исследования служил цыплята породы Доминант 14-дневного возраста, материалом для исследования - образцы тканей илеоцекальных миндалин кишечника цыплят. Содержание и вакцинация птиц проводились на базе вивариев ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Содержание птицы клеточное. Для проведения исследования цыплятам была осуществлена инъеция вирусом Gallid alphaherpesvirus 2 и Meleagrid alphaherpesvirus 1 в первые сутки жизни. В качестве образца 1-го серотипа вируса болезни Марека был взят вирус штамма “3004”, полученный от ФГБУ «ВНИИЗЖ», а в качестве образца 3-его серотипа вируса болезни Марека был взят вирус штамма “FC-126” в вакцине “МАРЕК-3”, также производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Контрольной группой выступали интактные цыплята. Образцы тканей илеоцекальных миндалин кишечника были получены на 14 сутки жизни цыплят. Цыплята были забиты с соблюдением требований международных соглашений «Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза» о защите животных, ис-

пользуемых в научных целях.

Методика проведения исследований (выделение мРНК, порядок амплификации и температурный режим, нуклеотидная последовательность амплифицируемых праймеров), изложена нами в ранее опубликованных работах по данной тематике [9, 10]. Реакцию амплификации с генными праймерами проводили с использованием набора Готовая смесь для ПЦР 5X qPCRmix-HS (Евроген) в соответствии с протоколом производителя. Расчет относительной экспрессии был произведен при помощи метода $-\Delta\Delta C_t$. В качестве референсного гена был выбран ген белка b-Actin.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Результаты, полученные в данном исследовании, позволили отметить ряд особенностей экспрессии генов неспецифического иммунитета, возникающих при инфицировании организма вирусом болезни Марека (рисунки №1, №2).

Из рисунка №1 видно, что экспрессия гена IL6, в группе цыплят, инфицированных 1-м серотипом вируса болезни Марека (Gallid alphaherpesvirus 2), в 6,5 раз превышает уровень контроля. Напротив, в группе, инфицированной вакцинным 3-м серотипом вируса (Meleagrid alphaherpesvirus 1), увеличение экспрессии данного гена практически не наблюдалось. Данное явление связано с тем, что штамм “3004” более антигенно родственен полевым штаммам вируса болезни Марека, по сравнению с 3-м серотип. Так, Heidari с соавторами отмечает, что илеоцекальные миндалины кишечника птиц считаются крупнейшими агрегатами лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником птицы, и, соответственно, становятся мишенями для вируса болезни Марека 1-го серотипа [2]. Стоит иметь в виду, что ген IL6 включается в работу при воспалительных процессах в организме птицы, что может свидетельствовать об отсутствии данных процессов в илеоцекальных железах кишечника цыплят породы Доминант, несмотря на введение в организм вируса болезни Марека 3-его серотипа.

Увеличение экспрессии гена PTGS2 считают явным следствием воспалительных процессов в тканях кишечника цыплят. Несмотря на введение вирусных инфекционных агентов в организм птицы, отсутствие существенного повышения уровня экспрессии данного гена в кишечнике птицы говорит о том, что это не привело к воспалению. В данном исследовании оба вируса не оказали существенного влияния на лимфоидные клетки кишечника цыплят, в сравнении с данным показателем в контрольной группе. Так, в группе, инфицированной 1-м серотипом вируса болезни Марека, уровень экспрессии не превысил уровень контроля, а в группе, инфицированной 3-м серотипом вируса, было отмечено 2-кратное повышение по сравнению с уровнем экспрессии в контрольной группе.

В целом, обычно введение как вакцинных, так и полевых штаммов вызывает возрастание уровня экспрессии гена PTGS2, как это показано в предыдущих наших исследованиях [4]. Здесь же отсутствие данного эффекта может быть связано как с местной иммуносупрессией, так и с влиянием на кишечную микробиоту, на что явно указывают Perumbakkam с соавторами [6].

При анализе амплификации РНК гена IRF7 (рисунок №2) видно существенное превышение уровня экспрессии в обеих группах над уровнем контроля. Также, экспрессия в лимфоидных клетках илеоцекальных миндалин птиц, инфицированных 1-м серотипом вируса, в 4 раза превышает данный показатель в группе, птицам которой вводился 3-й серотип вируса болезни Марека. Ген IRF7 кодирует регуляторный фактор интерферона 7, играющего важную роль в активации транскрипции вирус-индуцированных клеточных генов [9].

Исследователи также отмечают, что вирус болезни Марека нацеливается на противодействие функционированию данного гена. Об этом сообщают Du с соавторами [1]. Ими сообщается, что уникальная короткая киназа 3 (Us3), обнаруживаемая в геноме всех трех серотипов

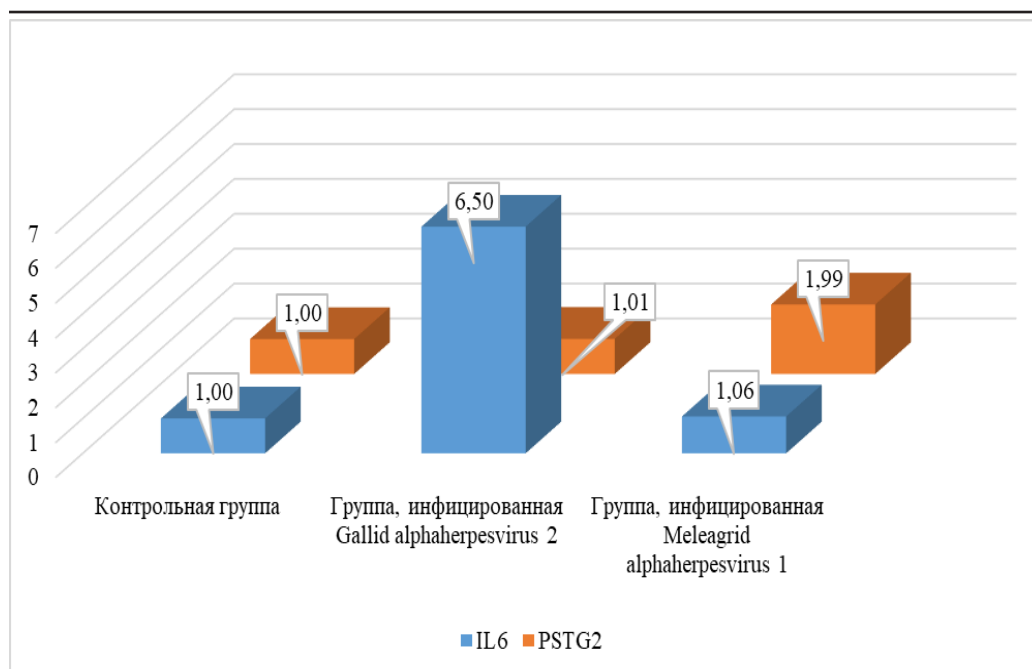


Рисунок 1 – Экспрессия генов IL6 и PTGS2 в тканях илеоцекальных миндалин цыплят породы Доминант на 14 сутки после инфицирования, Δ циклов.

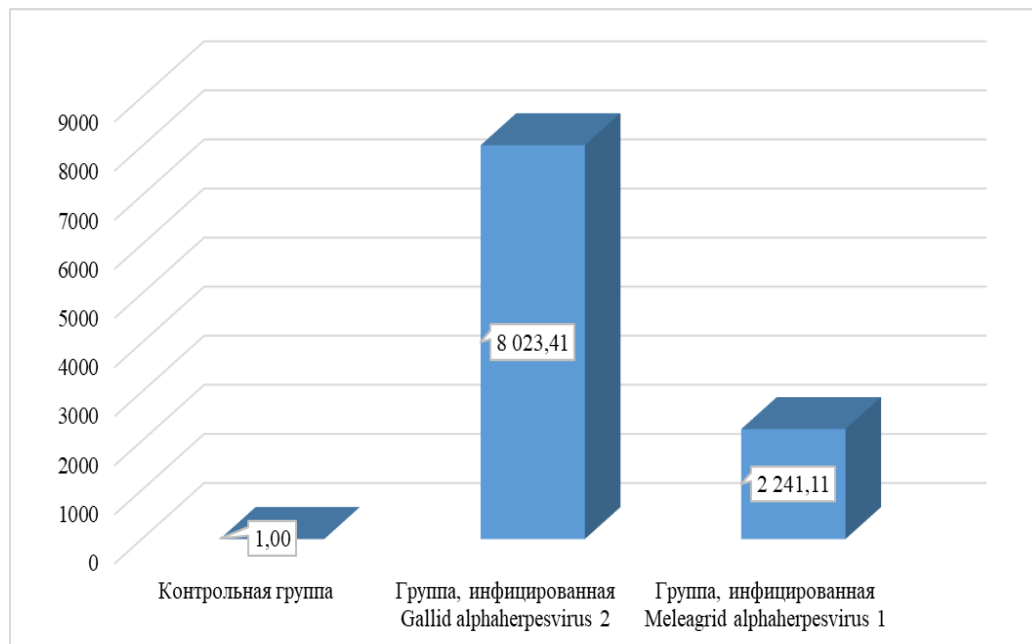


Рисунок 2 – Экспрессия гена IRF7 в тканях илеоцекальных миндалин цыплят породы Доминант на 14 сутки после инфицирования, Δ циклов.

вируса БМ, важна для репликации MDV. Данная киназа способна активно взаимодействовать с геном IRF7 клеток, что приводит к блокировке синтеза IFN- β , и лучшей репликации вируса болезни Марека.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Из полученных результатов следует, что экспрессия генов, кодирующих синтез цитокинов (IL6) и медиаторов воспаления (PTGS2), либо находилась в идентичном (либо незначительно превышающем) состоянии по сравнению с уровнем экспрессии данных генов в группе контроля, либо были существенно подавлены иммунодепрессивными свойствами вируса болезни Марека.

Также, при исследовании экспрессии гена IRF7 было обнаружено значительное воздействие вирусов обоих серотипов на данный ген. Был сделан вывод, что воздействие 1-го серотипа вируса болезни Марека на активацию данного гена существенно сильнее (в 4 раза) по сравнению с эффектом на организм герпесвируса индеек (3-его серотипа вируса болезни Марека).

Данные результаты могут свидетельствовать о том, что резко возрастающая экспрессия гена IRF7 может быть признаком репликации вируса болезни Марека (так как Gallid alphaherpesvirus 2 и Meleagrid alphaherpesvirus 1 взаимодействуют с одним и тем же клеточным рецептором, на этом основан вакцинный эффект Meleagrid alphaherpesvirus 1). С другой стороны, можно сделать вывод, что введение данных вирусов не вызывает воспалительных и иммунных реакций в илеоцекальных миндалинах птицы.

NATURE OF EXPRESSION OF BIRD IMMUNITY GENES DURING INFECTION BY GALLID ALPHAHERPESVIRUS 2 AND MELEAGRID ALPHAHERPESVIRUS 1

Tarlavin N.V. * – Ph.D., assistant at the Department of Epizootology named after. V.P. Urbana; **Veretennikov V.V.** – Ph.D., assistant at the Department of Epizootology named after. V.P. Urbana; **Javadov E.J.** – Doctor of V.S., Professor of the Department

of Epizootology named after. V.P. Urbana; **Kraskov D.A.** – postgraduate student of the Department of Epizootology named after. V.P. Urbana; **Sidorenko K.V.** – Ph.D., assistant at the Department of Biology, Ecology and Histology; **Makhnin I.A.** – Assistant at the Department of Biochemistry and Physiology.

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

*tarlav1995@bk.ru

The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-26-20084, <https://rscf.ru/project/22-26-20084/>

ABSTRACT

Marek's disease is a dangerous immunosuppressive viral disease of poultry. Most egg poultry farm in the Russian Federation vaccinate their chickens on the first day of life against this viral disease. Thanks to this vaccine prevention tactic, poultry farms protect themselves from the outbreak of this disease and economic damage. Traditionally, among the viruses related to this disease, there are the 1st serotype of the Marek's disease virus (Gallid alphaherpesvirus 2) and the 3rd serotype of the Marek's disease virus, which is not such in a strict taxonomic sense (Meleagrid alphaherpesvirus 1, also called turkey herpesvirus). When poultry is infected, this virus causes a significant change in the expression of the main immunity genes (IL6, PTGS2, IRF7). Based on the results obtained, it was concluded that the expression of the IL6 and PTGS2 genes was slightly higher than the level of expression of these genes in the control group. It is possible that local immunity was suppressed by the immunosuppressive properties of the Marek's disease virus. When studying the expression of the IRF7 gene, a strong effect of viruses of both serotypes on this gene was found, and Gallid alphaherpesvirus 2 exceeded the level of this effect compared to the effect of Meleagrid alphaherpesvirus 1 by 4 times. These results may indicate that sharply increasing expression of the IRF7 gene may be a sign of Marek's disease virus

replication (since Gallid alphaherpesvirus 2 and Meleagrid alphaherpesvirus 1 interact with the same cellular receptor, the vaccine effect of Meleagrid alphaherpesvirus 1 is based on this). On the other hand, we can conclude that the introduction of these viruses does not cause inflammatory and immune reactions in the ileocecal tonsils of birds.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Du X., Zhou D., Zhou J., Xue J., Wang G., Cheng Z. Marek's disease virus serine/threonine kinase Us3 facilitates viral replication by targeting IRF7 to block IFN- β production. *Vet Microbiol.* 2022, 266:109364. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109364.
2. Heidari M., Heidari F., Huanmin S. Huanmin Z. Immune Responses in Cecal Tonsils of Marek's Disease Virus-Infected Chickens. *Avian Diseases.* 2015, 59. doi: 10.1637/10950-093014-Reg.1.
3. Kaiser P., Underwood G., Davison F. Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *J Virol.* 2003, 77(1):762-8. doi: 10.1128/jvi.77.1.762-768.2003.
4. Kamble N., Gurung A., Kaufer B.B., Pathan A.A., Behboudi S. Marek's Disease Virus Modulates T Cell Proliferation via Activation of Cyclooxygenase 2-Dependent Prostaglandin E2. *Front Immunol.* 2021, 22, 12:801781. doi: 10.3389/fimmu.2021.801781.
5. Ma W., Huang G., Wang Z., Wang L., Gao Q. IRF7: role and regulation in immunity and autoimmunity. *Front Immunol.* 2023, 10:14:1236923. doi: 10.3389/fimmu.2023.1236923.
6. Perumbakkam S., Hunt H.D., Cheng H.H. Marek's disease virus influences the core gut microbiome of the chicken during the early and late phases of viral replication. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014, 90(1):300-312. doi: 10.1111/1574-6941.12392.
7. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2014, № 10(6): a016295.
8. Джавадов Э.Д., Веретенников В.В., Тарлавин Н.В., Красков Д.А. Болезнь

Марека - современное представление о болезни и её профилактике. *Эффективное животноводство.* 2023. № 3(185). С. 35-37. doi: 10.24412/cl-33489-2023-3-35-37.

9. Тарлавин Н.В., Веретенников В.В., Джавадов Э.Д., Красков Д.А. Изучение экспрессии ключевых генов неспецифического иммунного ответа в организме *galus gallus domesticus* под влиянием инфицирования иммунодепрессивными вакцинами вирусами. *Международный вестник ветеринарии.* 2022, № 4, С. 34-41. doi: 10.52419/ISSN2072-2419.2022.4.34.
10. Тарлавин Н.В. Иммуногенные свойства иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни: специальность 06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология": диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Тарлавин Николай Владимирович. – Санкт-Петербург, 2022. – 142 с.

REFERENCES

1. Du X., Zhou D., Zhou J., Xue J., Wang G., Cheng Z. Marek's disease virus serine/threonine kinase Us3 facilitates viral replication by targeting IRF7 to block IFN- β production. *Vet Microbiol.* 2022, 266:109364. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109364.
2. Heidari M., Heidari F., Huanmin S. Huanmin Z.. Immune Responses in Cecal Tonsils of Marek's Disease Virus-Infected Chickens. *Avian diseases.* 2015, 59. doi: 10.1637/10950-093014-Reg.1.
3. Kaiser P., Underwood G., Davison F. Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *J Virol.* 2003, 77(1):762-8. doi: 10.1128/jvi.77.1.762-768.2003.
4. Kamble N., Gurung A., Kaufer B.B., Pathan A.A., Behboudi S. Marek's Disease Virus Modulates T Cell Proliferation via Activation of Cyclooxygenase 2-Dependent Prostaglandin E2. *Front Immunol.* 2021, 22, 12:801781. doi: 10.3389/fimmu.2021.801781.
5. Ma W., Huang G., Wang Z., Wang L., Gao Q. IRF7: role and regulation in immuni-

- ty and autoimmunity. *Front Immunol.* 2023, 10;14:1236923. doi: 10.3389/fimmu.2023.1236923.
6. Perumbakkam S., Hunt H.D., Cheng H.H. Marek's disease virus influences the core gut microbiome of the chicken during the early and late phases of viral replication. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014, 90(1):300-312. doi:10.1111/1574-6941.12392.
7. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2014, no. 10(6): a016295.
8. Javadov E.D., Veretennikov V.V., Tarlavin N.V., Kraskov D.A. Marek's disease is a modern understanding of the disease and its prevention. *Efficient livestock farming.* 2023. No. 3(185). pp. 35-37. doi: 10.24412/cl-33489-2023-3-35-37.
9. Tarlavin N.V., Veretennikov V.V., Javadov E.D., Kraskov D.A. Study of the expression of key genes of nonspecific immune response in the body of gallus gallus domesticus under the influence of infection with immunosuppressive vaccine viruses. *International Bulletin of Veterinary Medicine.* 2022, No. 4, pp. 34-41. doi: 10.52419/ISSN2072-2419.2022.4.34.
10. Tarlavin N.V. Immunogenic properties of an immunocomplex vaccine against infectious bursal disease: specialty 06.02.02 "Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology": dissertation for the degree of candidate of veterinary sciences / Nikolay Vladimirovich Tarlavin. – St. Petersburg, 2022. – 142 p.