УДК 619:616.98:578:615.37:636.5.053

Е.А. Карпенко
ассистент
С.П. Герман
к. вет. н.
Витебская ордена "Знак Почета"
Государственная академия ветеринарной медицины

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ РНК В ЛИМФОЦИТАХ БУРСЫ ФАБРИЦИУСА И СЕЛЕЗЕНКИ У ЦЫПЛЯТ СО СНИЖЕННОЙ ЖИВОЙ МАССОЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СОВМЕСТНО С НУКЛЕВИТОМ

Применение нуклевита при комбинированной вакцинации цыплят со сниженной живой массой против БМ, НБ и ИБК стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки в лимфоцитах бурсы Фабрициуса и селезенки.

Постановка проблемы

Вакцинация птицепоголовья против вирусных болезней занимает основное место в комплексе мероприятий по их ликвидации и профилактике. В результате у бройлеров формируется иммунный ответ достаточной напряженности. Однако одновременное введение нескольких вакцинных антигенов может вызвать у молодняка патоморфологические изменения в органах иммунной системы, что выражается в снижении эффективности вакцинации, возникновении поствакцинальных осложнений и т. д.

Анализ последних исследований

Особенно актуально изучение иммуноморфогенеза у цыплят со сниженной живой массой. По литературным данным [1] морфометрические показатели органов иммунной системы суточных цыплят, полученных от кур-молодок, ниже, чем у молодняка, полученного от несушек во второй фазе продуктивного периода. Однако И.В. Котович и др., изучив активность ряда ферментов в органах суточных цыплят с различной живой массой, предположили, что у цыплят с меньшей живой массой существуют компенсаторные механизмы для повышения адаптации к условиям окружающей среды [2].

В настоящее время проведено множество исследований, посвященных

© Е.А. Карпенко, С.П. Герман

применению иммуномодулирующих препаратов для снижения поствакцинальных последствий у молодняка птицы. Исследованиям влияния нуклевита на иммуноморфогенез у цыплят-бройлеров со стандартной живой массой посвящен ряд работ [4, 5], но данные о воздействии препарата на морфологическое проявление иммунных процессов у молодняка кур со сниженной живой массой, вакцинированных против болезни Марека (БМ), ньюкаслской болезни (НБ) и инфекционного бронхита кур (ИБК), отсутствуют. Поэтому, проведение исследований в этой области является актуальным и представляет большое научное и практическое значение.

Целью исследования явилось определение активности иммуноморфологических реакций у цыплят-бройлеров со сниженной живой массой, одновременно вакцинированных против БМ, НБ и ИБК без и с применением иммуномодулятора нуклевита.

Исходя из этого, были определены следующие задачи:

1. Изучить в сравнительном аспекте иммуноморфогенез у цыплят-бройлеров с низкой живой массой при одновременной вакцинации их против БМ, НБ и ИБК.
2. Определить активность иммуноморфологических реакций у цыплят с низкой живой массой при одновременной вакцинации их против БМ, НБ и ИБК совместно с нуклевитом.

Объекты и методика исследований

Исследования проводились на 75 цыплятах суточного возраста кросса «Кобб-500», полученных из яиц с различной массой. Цыплята 1-й группы, полученные из стандартных яиц, имели живую массу более 40 г и были вакцинированы против БМ, НБ и ИБК. Молодняк 2-й группы с живой массой менее 40 г, полученный из маловесных яиц, иммунизировали теми же вакцинами. Вакцинацию цыплят 3-й группы с массой менее 40 г, вылупившихся из некондиционных яиц, проводили совместно с выпаиванием им иммуномодулятора нуклевита. Бройлеры 4-й группы с живой массой более 40 г, полученные из стандартных яиц, и птица 5-й группы весом менее 40 г, полученная из маловесных яиц, были интактными и служили контролем.

На 9-й день после 1-й вакцинации, на 3-й и 7-й день после 2-й вакцинации по 5 цыплят из каждой группы убивали для проведения гистохимических исследований органов иммунной системы. Органы цыплят фиксировали и уплотняли по общепринятым методикам. Гистосрезы изготавливали на санном микротоме, окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для выявления содержания РНК в цитоплазме лимфоцитов бурсы Фабрициуса, а также по методу Гомори для исследования активности ферментов щелочной и кислой фосфатаз в клетках бурсы и селезенки бройлеров [3].

При гистохимическом (качественном) изучении активности неспецифических гидролаз применялся метод, основывающийся на визуальном определении интенсивности окраски гистосрезов органов. Нами предложен способ подсчета ферментативной активности и концентрации РНК

в лимфоцитах при помощи программы «Image Scope M» на базе микроскопа «Olympus BX – 41» (измерительный окуляр – 10, объектив – 40) в 50 точках микрообъекта, взятых произвольно. В программе «Image Scope M» заложена опция «Яркость средняя (B_{avg})», обозначающая среднюю яркость пикселов объекта. Максимальное значение этого признака (255) мы принимали за 100%. Коэффициент пропускания также выражали в процентах. Так как между активностью ферментов (количеством РНК) в клетках и интенсивностью окраски гистосрезов существует прямая зависимость, а между интенсивностью окраски и коэффициентом пропускания – обратная, то для количественного определения этих показателей использовали формулу:

$$X=100\%-\frac{K\times 100}{255}$$

где: X – искомый показатель,
K – коэффициент пропускания.

Результаты исследований

В результате исследований на 9-й день после 1-й иммунизации выявлено, что активность нуклеиновых кислот в лимфоцитах коркового вещества бурсы цыплят всех групп была выше, чем в клетках мозговой зоны (табл. 1). Эти показатели среди бройлеров различных групп отличались недостоверно.

На 3-й день после 2-й иммунизации при гистохимическом исследовании количественного содержания нуклеиновых кислот в лимфоцитах бурсы установлено, что с возрастом происходит недостоверное увеличение содержания РНК в лимфоцитах у всех птиц (табл. 1). Также сохранялась тенденция к усилению активности РНК в лимфоцитах коркового вещества, по сравнению с аналогичным показателем в клетках мозговой зоны узелков бурсы у цыплят. Эти показатели среди бройлеров различных групп незначительно отличались.

На 7-й день после 2-й иммунизации активность РНК в лимфоцитах узелков бурсы по сравнению с предыдущим сроком исследования увеличивалась незначительно (табл. 1). Сохранилась закономерность преобладания этого показателя в клетках коркового вещества по сравнению с мозговой зоной узелков бурсы у птицы всех групп. Достоверно высоким было численное значение активности РНК в лимфоцитах мозгового вещества узелков цыплят, иммунизированных совместно с нуклевитом (48,04±2,219%; $p_{1-3}<0,05$; $p_{3-5}<0,01$), по сравнению с остальными бройлерами.

Таблица 1. **Содержание РНК (%) в лимфоцитах бурсы Фабрициуса у цыплят, M±m, p**

Зоны лимфоидных узелков бурсы	Группы цыплят				
	вакцинированные со стандартной живой массой	вакцинированные со сниженной живой массой	вакцинированные со сниженной живой массой + нуклевит	интактные со стандартной живой массой	интактные со сниженной живой массой
	1	2	3	4	5
На 9-й день после 1-й вакцинации					
Корковая	49,66±4,836 p_{1-2}>0,05 p_{1-3}>0,05 p_{1-4}>0,05	50,44±3,952 p_{2-3}>0,05 p_{2-5}>0,05	49,20±2,238 p_{3-5}>0,05	51,11±2,304	51,23±2,051
Мозговая	39,56±7,718 p_{1-2}>0,05 p_{1-3}>0,05 p_{1-4}>0,05	39,69±3,411 p_{2-3}>0,05 p_{2-5}>0,05	39,22±1,863 p_{3-5}>0,05	41,39±2,146	41,55±4,473
На 3-й день после 2-й вакцинации					
Корковая	52,14±3,150 p_{1-2}>0,05 p_{1-3}>0,05 p_{1-4}>0,05 p*>0,05	51,79±5,367 p_{2-3}>0,05 p_{2-5}>0,05 p*>0,05	52,17±7,287 p_{3-5}>0,05 p*>0,05	51,72±3,202 p*>0,05	51,48±5,459 p*>0,05
Мозговая	42,60±2,474 p_{1-2}>0,05 p_{1-3}>0,05 p_{1-4}>0,05 p*>0,05	42,42±2,360 p_{2-3}>0,05 p_{2-5}>0,05 p*>0,05	43,03±6,010 p_{3-5}>0,05 p*>0,05	42,37±3,397 p*>0,05	42,05±2,030 p*>0,05
На 7-й день после 2-й вакцинации					
Корковая	54,21±3,811 p_{1-2}>0,05 p_{1-3}>0,05 p_{1-4}>0,05 p*>0,05	52,72±5,730 p_{2-3}>0,05 p_{2-5}>0,05 p*>0,05	54,31±4,761 p_{3-5}>0,05 p*>0,05	54,13±3,157 p*>0,05	52,70±2,846 p*>0,05
Мозговая	44,62±2,254 p_{1-2}>0,05 p_{1-3}<0,05 p_{1-4}>0,05 p*>0,05	45,26±2,916 p_{2-3}>0,05 p_{2-5}>0,05 p*>0,05	48,04±2,219 p_{3-5}<0,01 p*>0,05	46,75±5,337 p*>0,05	43,49±1,174 p*>0,05

Примечания:
p_{1-2} – 1-я группа по сравнению со 2-й;
p_{1-3} – 1–3-я группы;
p_{1-4} – 1–4-я группы;
p_{2-3} – 2–3-я группы;
p_{2-5} – 2–5-я группы;
p_{3-5} – 3–5-я группы;
p* – с предыдущим сроком исследования.

При гистохимическом исследовании определяли активность ЩФ в цитоплазме лимфоцитов бурсы. Установлена определенная закономерность

изменения количества активных форм фермента в В-клетках узелков бурсы у птиц: в корковой зоне этот показатель был выше, чем в мозговой (рис. 1). У иммунизированных бройлеров отмечалось усиление ферментной активности лимфоцитов как в корковом, так и в мозговом веществе узелков по отношению к интактной птице. Аналогичная закономерность наблюдалась при сравнении этого показателя у маловесных цыплят и молодняка со стандартной живой массой. Наибольшее значение ферментной активности было у маловесных бройлеров, вакцинированных одновременно с нуклевитом, в корковой зоне – 70,44±4,904% ($p<0,005$), а в мозговой – 63,39±6,276% ($p_{1-3}<0,005$; $p_{2-3}<0,05$; $p_{3-5}<0,05$).

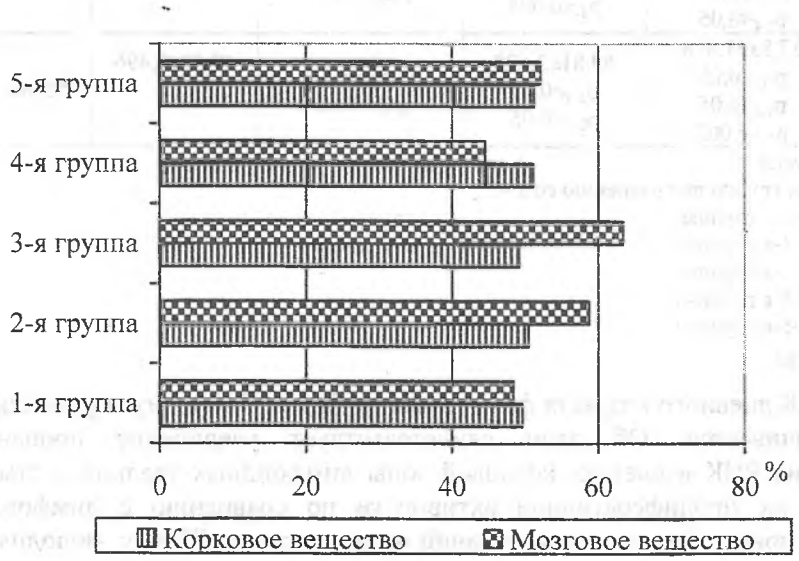

Рис.1. **Активность ЩФ в В-лимфоцитах коркового и мозгового вещества узелков бурсы Фабрициуса у цыплят на 7-й день после 2-й вакцинации**

При исследовании активности ЩФ в лимфоцитах селезенки было установлено, что у вакцинированных цыплят этот показатель увеличивался в 1,12–1,20 раза по сравнению с контролем (табл. 2). Аналогичная закономерность выявлялась между бройлерами, полученными из маловесных и стандартных яиц. Применение нуклевита одновременно с вакцинацией молодняка 3-й группы стимулировало ферментативную активность клеток, и ее значение на 6,53% ($p_{2-3}<0,05$) превышало аналогичные показатели у цыплят 2-й группы и на 20,01% ($p_{3-5}<0,005$) – у интактной птицы.

Вакцинация молодняка кур против вирусных болезней способствовала повышению активности КФ в Т-лимфоцитах селезенки в 1,13–1,21 раза по сравнению с контрольными показателями. Достоверных различий в значениях этого показателя у опытных цыплят не выявлено (табл. 2).

Таблица 2. **Активность ЩФ и КФ в лимфоцитах селезенки у цыплят на 7-й день после 2-й иммунизации, M±m, p**

Ферменты	Группы цыплят				
	вакцинированные со стандартной живой массой	вакцинированные со сниженной живой массой	вакцинированные со сниженной живой массой + нуклевит	интактные со стандартной живой массой	интактные со сниженной живой массой
ЩФ	147,32±8,460 p_{1-2}<0,05 p_{1-}<0,005 p_{1-4}<0,05	162,50±6,331 p_{2-3}<0,05 p_{2-}<0,005	173,12±5,459 p_{3-5}<0,005	131,74±9,049	144,27±5,963
КФ	57,53±1,828 p_{1-2}>0,05 p_{1-3}>0,05 p_{1-}<0,005	59,81±3,628 p_{2-3}>0,05 p_{2-5}<0,05	60,57±2,321 p_{3-5}<0,01	47,42±2,496	52,90±3,569

Примечания:

p_{1-2} – 1-я группа по сравнению со 2-й;
p_{1-3} – 1–3-я группы;
p_{1-4} – 1–4-я группы;
p_{2-3} – 2–3-я группы;
p_{2-5} – 2–5-я группы;
p_{3-5} – 3–5-я группы;

Выводы

1. До 28-дневного возраста формирование бурсы Фабрициуса у цыплят еще не заканчивается. Об этом свидетельствует увеличение процентного содержания РНК в клетках корковой зоны лимфоидных узелков, а значит и усиление их пролиферативной активности по сравнению с лимфоцитами мозговой зоны. Достоверных отличий в содержании РНК у молодняка со сниженной и стандартной живой массой не обнаружено.

2. Иммунизация молодняка кур против вирусных болезней, вне зависимости от их массы стимулирует обменные процессы и дифференцировку лимфоцитов, что проявляется в усилении активности фосфатаз в клетках органов по сравнению с интактной птицей.

3. У иммунизированных цыплят, полученных из некондиционных яиц, активность ЩФ в В-лимфоцитах мозгового вещества узелков бурсы и в селезенке превышает аналогичные показатели у цыплят-нормотрофиков, что свидетельствует об усилении интенсивности иммунных процессов, протекающих в этих органах.

4. Применение иммуномодулятора нуклевита при вакцинации бройлеров с некондиционной живой массой приводит к увеличению содержания РНК в лимфоцитах мозговой зоны узелков бурсы у бройлеров, а следовательно и их пролиферативной активности.

Перспективы дальнейших исследований

У полученных из маловесных яиц цыплят дальнейшие исследования иммуноморфологических реакций, возникающих в ответ на введение

вакцинных антигенов, и применения иммуномодулирующих средств для снижения их иммунодепрессивного действия может стать фактором повышения рентабельности промышленного птицеводства.

Литература

1. *Женихова Н.И.* Морфометрические изменения в иммунокомпетентных органах суточных цыплят в зависимости от возраста матерей-несушек // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: материалы Сибир. междунар. вет. конгресса, Новосибирск, 3–4 марта 2005 г., НГАУ. – Новосибирск, 2005. – С. 302–304.
2. *Котович И.В.* Ферментные адаптации суточных цыплят-бройлеров // Птицеводство Беларуси. – 2002. – № 3. – С. 14–16.
3. *Меркулов Г.А.* Курс патогистологической техники. – Л., 1969. – 432 с.
4. *Паланский А.М., Рягин С.Т., Герман В.В.* Повышение эффективности вакцинации цыплят-бройлеров против ньюкаслской болезни с помощью левамизола и нуклеоната натрия // Ветеринария. – 1990. – Вып. 65. – С. 9–12.
5. *Прудников А.В., Мацинович А.А.* Влияние иммуностимулятора нуклевита на иммуногенез у цыплят, одновременно вакцинированных против болезни Марека, инфекционного бронхита и болезни Ньюкасла // Ученые записки: сб. науч. тр.: материалы научной конференции «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы» / УО «Гродненский государственный аграрный университет». – Гродно, 2004. – Т. 3. – Ч. 3. – С. 74 – 76.
6. *Hearn P.J.* Reading chicks from small eggs // Poultry World. – 1986. – Vol. 140. – № 20. – P. 28.