

УДК 636.5.015.017.1:619:616.98:578.834.11:615.371

И.Н. Громов

к. вет. н.

С.П. Герман

к. вет. н.

Витебская ордена “Знак Почета”

Государственная академия ветеринарной медицины

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПТИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА

Установлено, что иммунизация птиц против инфекционного бронхита приводит к усилению сначала миграционной, а затем пролиферативной способности лимфоцитов в тимусе, фабрициевой бурсе и селезенке. Морфологические изменения коррелируют с динамикой концентрации нуклеиновых кислот и активности фосфатаз в органах иммунной системы.

Постановка проблемы

Инфекционный бронхит кур (ИБК) – высококонтагиозная вирусная болезнь, поражающая цыплят и кур всех возрастов [2]. У цыплят до 30-дневного возраста отмечают катарально-фибринозное воспаление конъюнктивы, воздухоносных путей, легких (респираторная форма); у цыплят 3–9-недельного возраста – нефрозо-нефрит, висцеральный мочекислый диатез (нефрозо-нефритная форма); у кур-несушек – атрофию и кистоз яичника (репродуктивная форма). В комплексе мероприятий по профилактике и ликвидации ИБК основное место уделяется проведению вакцинации. Сведения об иммуноморфологических изменениях в организме птиц, вакцинированных против данной болезни, изучены недостаточно. Вместе с тем использование морфологических методов исследования позволяет оценивать не только иммуноморфологические реакции, но и иммунопатологические состояния, сопровождающие иммунный процесс.

Формирование поствакцинального иммунитета у животных сопряжено с интенсификацией обмена нуклеиновых кислот в органах иммунной системы [1, 4, 5]. Поэтому определение уровня нуклеиновых кислот в органах иммунитета дает объективную оценку иммунного статуса птиц, изменяющегося при введении вакцин. Известно также, что органы иммунной системы млекопитающих и птиц также содержат значительное количество фосфатаз. В-лимфоциты (заселяющие бурсу Фабрициуса птиц и В-зависимые зоны периферических органов иммунитета) обладают высокой активностью щелочной фосфатазы, а Т-лимфоциты (заселяющие тимус и Т-зависимые зоны периферических органов иммунной системы) и макрофаги – высокой активностью кислой фосфатазы.

Целью наших исследований явилось изучение морфологических и биохимических изменений в тимусе, бурсе Фабрициуса и селезенке молодняка кур при парентеральной иммунизации против инфекционного бронхита.

Объекты и методика исследований

Исследования проведены на 40 головах ремонтного молодняка кур 130–158-дневного возраста, подобранных по принципу аналогов и разделенных на 2 группы, по 20 птиц в каждой. Птиц 1-й (опытной) группы в 130-дневном возрасте иммунизировали жидкой инактивированной эмульгированной вакциной против ИБК, разработанной во Всероссийском НИИ защиты животных (г. Владимир, Россия). Вакцину вводили согласно наставлению по ее применению: однократно внутримышечно в область бедра в дозе 0,5 мл. Молодняк кур 2-й группы служил контролем. На 3-й, 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни после вакцинации по 4 птицы из каждой группы убивали. Проводили контрольное взвешивание птицы, определяли абсолютную массу, индекс и линейные размеры (длина, ширина) тимуса, фабрициевой бursы и селезенки. Кусочки органов иммунитета фиксировали в 10%-м растворе формалина и жидкости Карнуа, а затем подвергали уплотнению путем заливки в парафин [6]. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Браше. Определяли абсолютные размеры коркового и мозгового вещества долек тимуса и лимфоидных узелков бursы Фабрициуса, подсчитывали количество лимфоцитов, приходящееся на условную единицу площади сетки Г.Г. Автандилова, а также устанавливали площадь элементов стромы и паренхимы. На гистологических срезах селезенки определяли число и размеры лимфоидных узелков. Кроме того, в красной пульпе селезенки подсчитывали количество зрелых форм митозов, лимфо- и плазмобластов, незрелых и зрелых плазмоцитов, определяли общее количество клеточных элементов.

Для изучения содержания нуклеиновых кислот из органов иммунной системы готовили гомогенаты на 0,25 М растворе сахарозы. В полученных гомогенатах определяли содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК) по Шмидту и Тангаузеру [9] с последующим выведением соотношения ДНК/РНК. Из органов иммунной системы готовили гомогенаты на трис-сахарозном буфере (РН-7,3). Активность кислой и щелочной фосфатаз в гомогенатах органов иммунной системы птиц, приготовленных на трис-сахарозном буфере (РН-7,3), определяли способом Бодански [3]. Цифровые данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты исследований

Абсолютная масса тимуса птиц опытной группы на 3-й день после вакцинации снижалась до $1,42 \pm 0,25$ г (в контроле – $2,70 \pm 0,28$; $P < 0,05$). Уменьшение абсолютной массы тимуса иммунных птиц приводило к снижению его индекса в 1,7 раза ($P < 0,01$). Аналогичная тенденция была

установлена нами при изучении линейных размеров органа. Это свидетельствует о возможном усилении миграции лимфоцитов в периферические органы иммунной системы для осуществления иммунных реакций. Наши результаты согласуются с данными А.Б. Терюханова и А.П. Стрельникова, указывающих на возможность снижения абсолютной массы и индекса тимуса у птиц после применения других вакцин против ИБК [7, 8]. Микроскопическим исследованием тимуса птиц 1-й группы отмечено незначительное увеличение размеров коркового вещества долек по сравнению с контролем. Плотность тимоцитов на условную единицу площади в корковой и мозговой зоне долек тимуса у птиц опытной группы была в 1,1–1,2 раза ниже, чем в контроле ($P > 0,05$). Удельные объемы стромы и паренхимы долек тимуса и их соотношение у молодняка кур 1-й и 2-й групп были примерно одинаковыми. При биохимическом исследовании установлено, что концентрация ДНК и РНК в тимусе птиц 1-ой группы была в 1,3–1,4 раза ниже ($P > 0,05$), чем в контроле. Снижение уровня нуклеиновых кислот, по-видимому, было связано с возможной делимфатизацией паренхимы, поскольку оно коррелировало с уменьшением плотности расположения тимусных лимфоцитов в дольках. При биохимическом изучении активности КФ и ЩФ в тимусе нами отмечено незначительное уменьшение данных показателей в группе иммунного молодняка кур по сравнению с контрольными данными.

На 7-й день после вакцинации абсолютная масса тимуса птиц 1-й группы составила $2,78 \pm 0,14$ г (в контроле – $4,08 \pm 0,19$ г; $P < 0,01$). При этом индекс и линейные размеры тимуса подопытных птиц уменьшались в 1,3 раза ($P > 0,05$) по сравнению с контролем. При гистологическом исследовании тимуса молодняка кур 1-й и 2-й групп установлена тенденция к резкому уменьшению размеров коркового вещества долек по сравнению с исходными данными. Размеры же мозгового вещества, наоборот, увеличивались. Удельный объем элементов паренхимы и стромы в тимусе птиц 1-й группы составил соответственно $88,25 \pm 0,28\%$ и $11,75 \pm 0,28\%$ (в контроле $85,75 \pm 1,12\%$ и $14,25 \pm 1,12\%$). Плотность расположения тимоцитов в корковом и мозговом веществе долек тимуса у иммунного молодняка кур не имела значимых различий по сравнению с контролем. Биохимическим исследованием в этот срок исследований установлено достоверное уменьшение концентрации ДНК и РНК соответственно в 1,6 и 1,4 раза по сравнению с контрольными показателями, что, вероятно, свидетельствует о продолжающейся делимфатизации паренхимы. Снижение уровня нуклеиновых кислот может быть также признаком ослабления процессов пролиферации и низкого уровня биосинтеза белка как пластического материала в Т-лимфообластах – предшественниках зрелых Т-лимфоцитов. Активность КФ и ЩФ в тимусе подопытных птиц находилась на уровне $0,65 \pm 0,06$ и $0,32 \pm 0,08$ МЕ/г ткани, что было на 20–28% ниже ($P > 0,05$), чем в контроле.

На 14-й день после вакцинации абсолютная масса тимуса птиц опытной группы возрастала до $3,39 \pm 0,17$ г (против $3,13 \pm 0,69$ г в контроле; $P < 0,05$). Одновременно наблюдалось увеличение других органомерических

показателей. Размеры коркового и мозгового вещества тимуса птиц 1-й группы были соответственно на 14% и 7% ($P > 0,05$) меньше, чем в контроле. Плотность тимоцитов как в корковом, так и мозговом веществе долек тимуса у птиц подопытной и контрольной групп была примерно одинаковой. Удельные объемы стромы и паренхимы тимуса иммунной птицы характеризовались незначительным увеличением удельного объема паренхимы и уменьшением удельного объема стромы по сравнению с контролем. При этом у вакцинированных птиц наблюдалось увеличение числа и размеров телец Гассалья по сравнению с контролем. Это свидетельствует о возможной роли тимических телец в развитии иммунных реакций у вакцинированных птиц. Концентрация ДНК и РНК в тимусе молодняка кур 1-й группы возрастала по сравнению с предыдущим сроком исследований, достигая уровня контрольных значений, что указывает на возможное нарастание лимфопролиферативных и белоксинтетических процессов. Результаты наших исследований согласуются с данными ряда исследователей. Так, увеличение концентрации ДНК и РНК в тимусе птиц, вакцинированных против других инфекционных болезней (пастереллез, ньюкаслская болезнь), наблюдали Ю.В. Конопатов и др. [4], С.А. Барышников [1] и А.Л. Лях [5]. Параллельно в тимусе иммунных птиц определялось значительное ($P < 0,05$) возрастание активности КФ по сравнению с исходными данными. Активность ЩФ изменялась недостоверно.

На 21-й день после иммунизации абсолютная масса и индекс тимуса интактного молодняка кур 2-й группы достоверно снижались по сравнению с предыдущим сроком исследований и составляли соответственно $1,52 \pm 0,18$ и $1,25 \pm 0,17$ г. Одновременно регистрировалось уменьшение линейных размеров органа. У подопытного молодняка кур обнаружены сходные изменения. При этом абсолютная масса и индекс тимуса у иммунных птиц достоверно превышали контрольные значения в 1,8 раза. Микроскопическим исследованием тимуса птиц обеих групп отмечена тенденция к уменьшению размеров долек, удельного объема лимфоидной ткани при одновременном увеличении удельного объема соединительной ткани. Плотность расположения тимоцитов в корковом и мозговом веществе долек у птиц обеих групп снижалась по сравнению с исходными данными. Концентрация ДНК и РНК в тимусе птиц 1-й группы составляла соответственно $12,95 \pm 0,97$ и $10,15 \pm 0,69$ мг/г ткани (в контроле – $9,38 \pm 1,14$ и $7,84 \pm 0,93$ мг/г ткани; $P > 0,05$). При биохимическом и гистохимическом определении активности фосфатаз значимых и достоверных различий в данном показателе между группами птиц нами не выявлено.

На 28-й день после вакцинации органомерические показатели тимуса иммунного молодняка кур нормализовались по отношению к контролю. Размеры коркового и мозгового вещества долек тимуса молодняка кур обеих групп продолжали уменьшаться, что обусловлено, вероятно, продолжающейся инволюцией органа. Другие микроморфометрические и биохимические показатели тимуса молодняка кур 1-й и 2-й групп не имели существенных отличий по сравнению с предыдущим сроком исследований.

Абсолютная масса бурсы Фабрициуса птиц 1-й группы на 3-й день после вакцинации составила $1,09 \pm 0,08$ г и была ниже контрольного показателя в 1,7 раза ($P < 0,05$). Одновременно отмечалось уменьшение бурсального индекса в опытной группе по сравнению с контролем в 1,5 раза ($P < 0,05$). При гистологическом исследовании бурсы Фабрициуса птиц 1-ой группы отмечено незначительное сужение как корковой, так мозговой зон лимфоидных узелков по сравнению с контролем. Плотность лимфоцитов на условную единицу площади в мозговой зоне лимфоидных узелков у подопытных птиц достоверно снижалась с $4,50 \pm 0,56$ (контроль) до $1,75 \pm 0,28$ ($P < 0,05$). При этом удельные объемы элементов стромы и паренхимы изменялись недостоверно. Концентрация ДНК и РНК в бурсе Фабрициуса интактных птиц составила соответственно $9,04 \pm 0,81$ и $7,84 \pm 0,69$ мг/г ткани. У иммунного молодняка кур отмечено снижение данных показателей на 17–26% ($P > 0,05$). Это указывает на возможное усиление миграции В-лимфоцитов в кровь для участия в иммунных реакциях, либо свидетельствует о подавлении процессов размножения и первичной антигеннезависимой дифференцировки предшественников зрелых форм В-лимфоцитов. Одновременно регистрировалось снижение активности КФ и ЩФ.

На 7-й день после вакцинации абсолютная масса бурсы Фабрициуса у птиц опытной группы составляла $1,43 \pm 0,33$ г и была в 1,3 раза ниже, чем в контроле ($P > 0,05$). Одновременно отмечалось уменьшение бурсального индекса и линейных размеров органа. Размеры корковой зоны лимфоидных узелков бурсы птиц 1-й группы на 15% меньше ($P > 0,05$), чем в контрольной группе. При этом размеры мозговой зоны лимфоидных узелков бурсы подопытных птиц возрастали по сравнению с контролем на 17% ($P > 0,05$). Плотность лимфоцитов в корковой зоне лимфоидных узелков бурсы у вакцинированных птиц 1-й группы была ниже, чем у молодняка кур группы ($P > 0,05$), а в мозговой зоне существенно не изменялась. Концентрация ДНК и РНК в бурсе иммунных птиц была в 1,4 раза меньше, чем в контроле ($P < 0,05$).

На 14-й день после вакцинации абсолютная масса и индекс бурсы Фабрициуса иммунных птиц 1-й группы нормализовались по отношению к контролю. При гистологическом исследовании установлено, что у птиц опытной группы размеры коркового и мозгового вещества лимфоидных узелков бурсы увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследований и были больше, чем в контроле ($P > 0,05$). Плотность лимфоцитов в корковой зоне лимфоидных узелков бурсы Фабрициуса у иммунных птиц значительно возрастала по сравнению с исходными данными ($P < 0,05$) и контрольными значениями ($P > 0,05$), а в мозговой зоне существенно не изменялась. Кроме того, в фабрициевой бурсе молодняка кур 1-й группы отмечено значительное повышение уровня нуклеиновых кислот по сравнению с исходными данными. Сходные данные получены Ю.В. Конопатовым и др., С.А. Барышниковым и А.Л. Ляхом, наблюдавшими увеличение содержания РНК в бурсе Фабрициуса птиц, иммунизированных против пастереллеза и ньюкаслской болезни [1, 4, 5]. При биохимическом и гистохимическом изучении активности КФ и ЩФ отмечена нормализация данных показателей

по отношению к контролю.

На 21-й день после иммунизации абсолютная масса и индекс тимуса иммунного молодняка кур достоверно возрастали по сравнению контрольными показателями и составляли соответственно $1,43 \pm 0,03$ и $1,18 \pm 0,06$ г. Одновременно регистрировалось увеличение линейных размеров органа ($P < 0,05$). Размеры корковой и мозговой зон лимфоидных узелков бурсы птиц превышали контрольные значения на 10% и 20% ($P > 0,05$). Как и в предыдущий срок исследований, плотность лимфоцитов в корковой зоне лимфоидных узелков бурсы птиц 1-й группы была недостоверно больше, чем в контроле. Кроме того, у иммунного молодняка кур отмечено некоторое увеличение удельного объема элементов паренхимы.

На 28-й день после иммунизации органометрические показатели бурсы Фабрициуса подопытных птиц значительно снижались по сравнению с исходными данными, однако по отношению к контрольным показателям изменялись недостоверно. Микроморфометрические показатели бурсы иммунных птиц постепенно нормализовывались по сравнению с контрольными данными. Биохимические показатели птиц обеих групп были примерно одинаковыми.

Абсолютная масса селезенки птиц 1-й группы на 3-й день после вакцинации была на 15% ($P > 0,05$) меньше, чем в контроле. Одновременно отмечалось уменьшение линейных размеров органа. При гистологическом исследовании установлено, число и размеры лимфоидных узелков у птиц обеих групп были примерно одинаковыми. При изучении плазмочитарной реакции у кур 1-й группы отметили достоверное увеличение числа лимфобластов в – 1,7 раза, плазмобластов – в 1,4 раза, а также проплазмочитов в 1,5 ($P < 0,05$) раза по сравнению с контролем. Количество митозов и плазмочитов не изменялось. Сходные изменения в селезенке у птиц, вакцинированных против ИБК, наблюдали А.Б. Терюханов [8] и А.П. Стрельников [7].

На 7-й день после вакцинации у иммунного молодняка кур было отмечено снижение абсолютной массы селезенки в 1,5 раза по сравнению с контролем ($P < 0,01$). При этом индекс и линейные размеры органа также уменьшались. При гистологическом исследовании установлено, что размеры лимфоидных узелков у птиц опытной группы были на 48% ($P < 0,05$) меньше по сравнению с контрольными данными. Иммуноморфологические изменения в ответ на введение вакцины против ИБК проявлялись также увеличением числа плазмочитов в 1,8 раза ($P < 0,05$) в опытной группе по отношению к контролю. На 14-й день после вакцинации абсолютная масса и индекс селезенки у птиц опытной группы увеличивались по сравнению с исходными данными и достигали уровня контрольных значений. На 21-й день эксперимента макроморфометрические показатели селезенки иммунного молодняка кур продолжали нарастать, достоверно превышая контрольные показатели в 1,3–1,4 раза. На 28-й день после иммунизации абсолютная масса, индекс и линейные размеры селезенки птиц 1-й группы нормализовывались по отношению к контролю.

При учете плазмоцитарной реакции в селезенке на 14-й, 21-й и 28-й дни после иммунизации значимых различий в содержании иммунокомпетентных клеток между группами птиц нами не выявлено. Число и размеры лимфоидных узелков в селезенке птиц 1-й и 2-й группы в эти сроки исследований были примерно одинаковыми. При биохимическом исследовании установлено, что во все сроки исследований концентрация нуклеиновых кислот в селезенке иммунных и интактных птиц была примерно одинаковой. Аналогичные данные были получены нами при изучении активности ЩФ. Активность КФ у молодняка кур 1-й группы на 3-й и 7-й дни эксперимента превышала контрольные значения соответственно на 21% ($P < 0,05$) и 24% ($P > 0,05$). Повышение активности данного фермента может косвенно указывать на увеличение числа Т-лимфоцитов, обеспечивающих реакции клеточного иммунитета. В более поздние сроки отмечалась нормализация данного фермента по сравнению с контрольными значениями.

Выводы

1. Иммунизация молодняка кур против ИБК вызывает в тимусе морфологические и биохимические изменения: уменьшение массы и индекса органа, концентрации ДНК и РНК, что является признаком активизации миграционной способности лимфоцитов в периферические органы иммунной системы. Последующее увеличение органомерических и биохимических показателей свидетельствует об активной пролиферации лимфоцитов и нормализации обменных процессов.

2. Инактивированная эмульсин-вакцина против ИБК вызывает соответствующие иммуноморфологические и биохимические изменения в бурсе Фабрициуса. Вначале они проявляются усилением миграционной активности лимфоцитов (уменьшение абсолютной массы и линейных размеров бursы, сужение коркового и мозгового слоя узелков, снижение плотности лимфоцитов в мозговом слое, концентрации ДНК и РНК). Затем происходит усиление процессов пролиферации лимфоцитов (увеличение индекса массы и линейных размеров бursы, расширение коркового и мозгового слоя лимфоидных узелков, увеличение содержания нуклеиновых кислот).

3. Иммунизация молодняка кур против ИБК вызывает достоверное увеличение количества плазмобластов, незрелых и зрелых плазмоцитов, а также повышение активности КФ в селезенке по сравнению с интактной птицей. Иммуноморфологическая перестройка в организме птиц в ответ на введение указанной вакцины сопровождается также изменением органомерических показателей селезенки. При этом вначале (на 3-й и 7-ой дни после вакцинации) наблюдается уменьшение, а затем (на 21-й день) увеличение абсолютной массы и индекса органа.

Перспективы дальнейших исследований

Изучение биохимических изменений в комплексе с морфологическими исследованиями позволяет дать объективную оценку влияния вакцинации на состояние иммунной системы птиц.

Литература

1. Барышников С.А. Иммунологические и биохимические изменения у кур, вакцинированных против ньюкаслской болезни, и влияние на иммуногенез инфекционной бурсальной болезни: Автореф. дис. ...к. вет. наук: 16.00.03. – Л., 1981. – 22 с.
2. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / Б.У. Кэллек и др. / Под ред. Б.У. Кэллека, Х. Джона Барнса, Чарльза У. Биерда и др.: Пер. с англ. И. Григорьева, С. Дорош, Н. Хрущева, И. Суворцев. – М.: АКВАРИУМ БУК, 2003. – С. 590–607.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 1. – С. 409–412.
4. Конопатов Ю.В., Болотников И.А., Лебедева А.И. Влияние сульфадимезина и левомицетина на содержание общего белка в крови и нуклеиновых кислот в некоторых органах цыплят при вакцинации против пастереллеза // Методы иммунологии птиц. Карельский филиал АН СССР; науч. ред. И.А. Болотников. – Петрозаводск, 1976. – С. 59–67.
5. Лях А.Л. Влияние иммуностимулятора натрия тиосульфата на иммуноморфогенез при парентеральной вакцинации гусят против пастереллеза: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.02. – В., 2003. – 21 с.
6. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. – Ленинград: Медицина, 1969. – 432 с.
7. Стрельников А.П. Патоморфология и иммуноморфологические реакции у кур при инфекционном бронхите, оспе, колибактериозе и пастереллезе: Автореф. дис... д-ра вет. наук: 16.00.02. – Москва, 1987. – 32 с.
8. Терюханов А.Б. Инфекционный бронхит кур. – Ленинград: “Колос”, 1976. – 64 с.
9. Шевченко Н.А., Шевченко В.Г. Выделение, количественное определение и анализ нуклеиновых кислот у сельскохозяйственных животных (Методические указания) ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных. – Боровск, 1984. – С. 6–8.