

УДК 619:616.476:577.311:615.37:636.5-053.3

Громов И.Н. , кандидат ветеринарных наук, доцент \*

Господарик О.В. , старший преподаватель \*

Бирман Б.Я. , доктор ветеринарных наук, профессор \*\*

\* УО "Витебская орденна "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", г. Витебск

\*\* РНИУП "Институт Экспериментальной Ветеринарии им. С.Н. Вышелесского Национальной Академии Наук Беларуси", г. Минск

## ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ И ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗ У МОЛОДНЯКА КУР ПРИ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО БУРСИТА

*Целью работы было изучение активности щелочной и кислой фосфатаз в органах иммунной системы и плазме крови молодняка кур, иммунизированных против инфекционного бурсита инактивированной эмульсин-вакциной. Показано, что иммунизация птиц вызывает достоверное повышение активности фосфатаз в центральных и периферических органах иммунитета. Наибольшие изменения активности ферментов в органах иммунной системы и плазме крови вакцинированных птиц наблюдались на 7-й и 14-й дни эксперимента. К 21-му и 28-му дням отмечалась тенденция к стабилизации показателей, что свидетельствует о нормализации метаболических процессов и завершении иммунных реакций.*

*The dynamic of the activity of the acid and alkaline phosphatase in organs of immune system of hen youngsters parenteral immunized by liquid inactivated oil-emulsion vaccine against infectious bursitis have been investigated. It is shown that the immunization of birds against infectious bursitis induces a reliable increases activity of acid phosphatase, alkaline phosphatase in organs of immunity and plasma of blood.*

*The greatest changes of enzyme activity organs of immune system, and plasma of blood of vaccinated birds were observed on the 7-th and 14-th days of experiment. By the 21-th and 28-th days the tendency of parameters stabilization was noted, that is the evidence of normalization of metabolic processes and completion of immune reactions.*

### ВВЕДЕНИЕ

Фосфатазы - ферменты, отщепляющие остаток фосфорной кислоты от ее эфирных органических соединений. Фосфатазы распространены в различных органах (печень, почки, костная ткань). Известно также, что органы иммунной системы млекопитающих и птиц также содержат значительное количество фермента. 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 [1, 3].

В РНИУП "ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси" разработана жидкая инактивированная эмульсин-вакцина против инфекционного бурсита. Она характеризуется высокой степенью антигенной гомологии вакцинного и полевых штаммов вируса, а также более низкой рыночной стоимостью по сравнению с зарубежными аналогами. Возможные биохимические изменения в организме птиц, сопровождающие формирование иммунного ответа против ИБ, остаются неизученными.

Учитывая взаимосвязь активности фосфатаз с процессами иммуногенеза, была поставлена цель - изучить динамику активности щелочной и кислой фосфатазы в органах иммунной системы (тимусе, бурсе Фабрициуса, селезенке) у ремонтного молодняка кур, иммунизированных жидкой инактивированной эмульсин-вакциной против инфекционного бурсита (БД-1), разработанной в ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были 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-ой (опытной) группы иммунизировали жидкой инактивированной эмульсин-вакциной против ИБ согласно Временному Наставлению по ее применению, однократно, внутримышечно, в область бедра, в дозе 0,5 мл.

Интактная птица 2-ой группы служила контролем.

За всей птицей было установлено клиническое наблюдение.

На 3-й, 7-ой, 14-й, 21-й и 28-ой дни после вакцинации по 4 птицы из каждой группы убивали. Для дальнейших анализов отбирали тимус, бурсу Фабрициуса, селезенку, а также плазму крови. Из органов иммунной системы готовили гомогенаты на трис-сахарозном буфере (РН-7,3).

Активность кислой и щелочной фосфатаз в органах иммунной системы и плазме крови птиц определяли способом Бодански [2]. Метод основан на ферментативном гидролизе бета-глицерофосфата. Освобожденный фосфат, реагируя с фосфомолибденовой кислотой, дает желтый комплекс, который при действии восстановителей (аскорбиновой кислоты, эйконогена) трансформируется в фосфомолибденовую синь. Учет реакции производили путем фотометрии раствора при длине волны 620-640 нм.

Цифровые данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Excel 2003.

### РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 3-й день после вакцинации активность КФ в тимусе птиц контрольной группы находилась на уровне  $0,65 \pm 0,081$  МЕ/г ткани, а у молодняка кур опытной группы -  $0,49 \pm 0,069$  МЕ/г ткани (табл. 1;  $P > 0,05$ ).

Таблица 1

#### Активность КФ в органах иммунной системы и плазме крови птиц ( $M \pm m$ , P)

Группы птиц	Тимус, МЕ/г ткани	Бурса, МЕ/г ткани	Селезенка, МЕ/г ткани	Плазма крови, МЕ/л
на 3-й день после вакцинации				
1 группа	$0,49 \pm 0,069$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,44 \pm 0,092$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,87 \pm 0,071$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,45 \pm 0,092$ $P_{1-2} > 0,05$
2 группа	$0,65 \pm 0,081$	$0,34 \pm 0,038$	$0,85 \pm 0,083$	$0,65 \pm 0,086$
на 7-ой день после вакцинации				
1 группа	$0,66 \pm 0,095$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,37 \pm 0,081$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,92 \pm 0,037$ $P_{1-2} < 0,05$	$0,58 \pm 0,056$ $P_{1-2} < 0,05$
2 группа	$0,70 \pm 0,092$	$0,53 \pm 0,066$	$0,65 \pm 0,091$	$0,37 \pm 0,039$
на 14-й день после вакцинации				
1 группа	$0,68 \pm 0,081$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,31 \pm 0,079$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,60 \pm 0,090$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,44 \pm 0,080$ $P_{1-2} > 0,05$
2 группа	$0,49 \pm 0,056$	$0,56 \pm 0,072$	$0,64 \pm 0,106$	$0,29 \pm 0,022$
на 21-й день после вакцинации				
1 группа	$0,57 \pm 0,082$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,35 \pm 0,079$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,43 \pm 0,034$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,34 \pm 0,090$ $P_{1-2} > 0,05$
2 группа	$0,40 \pm 0,099$	$0,45 \pm 0,082$	$0,47 \pm 0,082$	$0,44 \pm 0,069$
на 28-ой день после вакцинации				
1 группа	$0,32 \pm 0,067$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,49 \pm 0,056$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,49 \pm 0,056$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,59 \pm 0,092$ $P_{1-2} > 0,05$
2 группа	$0,36 \pm 0,079$	$0,47 \pm 0,058$	$0,44 \pm 0,079$	$0,51 \pm 0,091$

У иммунных и интактных птиц 137-дневного возраста (в сроки на 7-й день после вакцинации) активность КФ была примерно одинаковой и находилась в пределах  $0,66 \pm 0,095$  -  $0,70 \pm 0,092$  МЕ/г ткани.

На 14-й день после иммунизации в тимусе птиц 1-ой группы наблюдалось возрастание активности КФ в 1,4 раза ( $P > 0,05$ ) по сравнению с контролем. Это вероятно связано с увеличением выработки Т-лимфоцитов, маркером которых является КФ.

На 21-й и 28-й дни после вакцинации активность КФ в тимусе подопытных и неиммунных птиц постепенно снижалась по сравнению с исходными данными.

## ИММУНОБИОЛОГИЯ

Активность КФ в бурсе Фабрициуса птиц 1-ой и 2-ой групп во все сроки исследований варьировала в пределах  $0,31 \pm 0,079$  -  $0,56 \pm 0,072$  МЕ/г ткани. При этом статистически достоверных различий между группами не обнаружено.

Активность кислой фосфатазы в селезенке привитого и интактного молодняка кур на 3-й день после иммунизации была примерно одинаковой, составляя  $0,85 \pm 0,083$  -  $0,87 \pm 0,071$  МЕ/г ткани.

На 7-ой день после иммунизации в селезенке птиц 1-ой группы наблюдалось возрастание активности КФ до  $0,92 \pm 0,037$  МЕ/г ткани (в контроле -  $0,65 \pm 0,091$  МЕ/г ткани;  $P < 0,05$ ). Это свидетельствует о возможном увеличении числа Т-лимфоцитов, обеспечивающих реакции клеточного иммунитета.

На 14-й день после вакцинации в селезенке подопытного молодняка кур происходило снижение активности КФ до уровня контрольных значений, что указывает на возможное затухание иммунных реакций.

В более поздние сроки исследований (На 21-й и 28-й дни после вакцинации) активность КФ в селезенке птиц 1-ой и 2-ой групп постепенно снижалась. При этом существенных различий между группами установлено не было.

На 3-й день после вакцинации активность КФ в плазме крови интактного молодняка кур находилась в пределах  $0,65 \pm 0,086$  МЕ/л, а у птиц опытной группы -  $0,45 \pm 0,092$  МЕ/л ( $P > 0,05$ ).

На 7-ой день после иммунизации в плазме крови подопытных птиц отмечено повышение активности кислой фосфатазы по сравнению с контрольными значениями ( $P < 0,05$ ), которое коррелировало с увеличением данного показателя в селезенке. Сходные изменения выявлены нами на 14-й день после иммунизации. Так, активность КФ в плазме крови птиц 1-ой группы достигала  $0,44 \pm 0,080$  МЕ/л, а у интактного молодняка кур – лишь  $0,29 \pm 0,022$  МЕ/л ( $P > 0,05$ ).

В последующие сроки исследований мы наблюдали значительную вариабельность данного показателя у птиц как опытной, так и контрольной групп. Так, активность КФ в плазме крови или возрастала до  $0,51 \pm 0,091$  -  $0,59 \pm 0,092$  МЕ/л (на 28-ой день после вакцинации), или наоборот, снижалась до  $0,34 \pm 0,090$  -  $0,44 \pm 0,069$  МЕ/л (на 21-й день после иммунизации).

Активность щелочной фосфатазы в тимусе интактного молодняка кур на 3-й день после иммунизации составляла  $0,35 \pm 0,081$  МЕ/г ткани, а у подопытных птиц -  $0,22 \pm 0,090$  МЕ/г ткани (табл. 2).

Таблица 2

### Активность ЩФ в органах иммунной системы и плазме крови птиц ( $M \pm m$ , P)

Группы птиц	Тимус, МЕ/г ткани	Бурса, МЕ/г ткани	Селезенка, МЕ/г ткани	Плазма крови, МЕ/л
<b>на 3-й день после вакцинации</b>				
1 группа	$0,22 \pm 0,090$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,28 \pm 0,035$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,34 \pm 0,022$ $P_{1-2} > 0,05$	$2,57 \pm 0,670$ $P_{1-2} > 0,05$
2 группа	$0,35 \pm 0,081$	$0,25 \pm 0,056$	$0,35 \pm 0,073$	$1,70 \pm 0,180$
<b>на 7-ой день после вакцинации</b>				
1 группа	$0,51 \pm 0,025$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,52 \pm 0,049$ $P_{1-2} < 0,05$	$0,58 \pm 0,022$ $P_{1-2} < 0,05$	$2,25 \pm 0,119$ $P_{1-2} < 0,05$
2 группа	$0,56 \pm 0,034$	$0,35 \pm 0,019$	$0,38 \pm 0,049$	$1,70 \pm 0,191$
<b>на 14-й день после вакцинации</b>				
1 группа	$0,43 \pm 0,018$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,56 \pm 0,045$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,45 \pm 0,017$ $P_{1-2} > 0,05$	$2,60 \pm 0,281$ $P_{1-2} > 0,05$
2 группа	$0,45 \pm 0,034$	$0,44 \pm 0,056$	$0,47 \pm 0,011$	$2,67 \pm 0,416$
<b>на 21-й день после вакцинации</b>				
1 группа	$0,40 \pm 0,018$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,41 \pm 0,022$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,54 \pm 0,058$ $P_{1-2} > 0,05$	$2,85 \pm 0,236$ $P_{1-2} > 0,05$
2 группа	$0,44 \pm 0,057$	$0,49 \pm 0,056$	$0,56 \pm 0,034$	$2,55 \pm 0,225$
<b>на 28-ой день после вакцинации</b>				
1 группа	$0,33 \pm 0,034$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,33 \pm 0,034$ $P_{1-2} > 0,05$	$0,57 \pm 0,056$ $P_{1-2} > 0,05$	$3,16 \pm 0,483$ $P_{1-2} > 0,05$
2 группа	$0,33 \pm 0,011$	$0,39 \pm 0,011$	$0,58 \pm 0,019$	$2,01 \pm 0,225$

На 7-ой день эксперимента у птиц обеих групп зарегистрировано увеличение данного показателя в 1,6 – 2,3 раза по сравнению с исходными данными. В последующем активность ЩФ в тимусе интактных птиц постепенно снижалась до уровня  $0,44 \pm 0,057$  МЕ/г ткани (на 21-й день после иммунизации) -  $0,33 \pm 0,011$  МЕ/г ткани (на 28-й день после иммунизации). При изучении активности ЩФ в тимусе вакцинированных птиц выявлена аналогичная тенденция.

При изучении активности щелочной фосфатазы в бурсе Фабрициуса на 3-й день после вакцинации существенных различий между группами птиц установлено не было.

На 7-й день после вакцинации активность ЩФ в бурсе у птиц опытной группы возрастала по сравнению с контролем в 1,5 раза ( $P < 0,05$ ), что указывает, по-видимому, на усиление выработки В-лимфоцитов, необходимых для формирования гуморального иммунитета. Сходные изменения были отмечены нами и на 14-й день эксперимента.

В отдаленные сроки исследований (на 21-й и 28-й дни после вакцинации) активность ЩФ в фабрициевой подопытных птиц постепенно нормализовывалась по сравнению с контрольными данными.

В селезенке птиц опытной и контрольной групп на 3-й день после вакцинации активность ЩФ была примерно одинаковой.

На 7-й день эксперимента активность ЩФ в селезенке контрольных птиц составила  $0,38 \pm 0,049$  МЕ/г. У иммунного молодняка кур 1-ой группы отмечалось увеличение данного показателя в 1,5 раза ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Это свидетельствует о возможном увеличении числа В-лимфоцитов, обеспечивающих выработку антител. На 14-й день после вакцинации активность ЩФ в селезенке иммунизированных птиц снижалась до  $0,45 \pm 0,017$  МЕ/г (в контроле -  $0,47 \pm 0,011$  МЕ/г). При изучении данного показателя на 21-й и 28-ой дни после вакцинации существенных различий между группами птиц выявлено не было.

Изменение активности ЩФ в фабрициевой бурсе и селезенке иммунизированных птиц коррелировало с динамикой данного показателя в плазме крови.

Так, на 3-й день после вакцинации активность ЩФ в плазме крови птиц 1-ой группы превышала контрольные значения в 1,5 раза ( $P > 0,05$ ), а на 7-ой день эксперимента – в 1,3 раза ( $P < 0,05$ ). На 14-й, 21-й и 28-й дни после вакцинации активность ЩФ в плазме крови подопытных птиц постепенно выравнивалась по сравнению с контрольными показателями.

### ВЫВОДЫ

1. Иммунизация молодняка кур жидкой инактивированной эмульсин-вакциной против инфекционного бурсита вызывает увеличение активности кислой и щелочной фосфатаз в бурсе Фабрициуса, селезенке и плазме крови. Поскольку ЩФ является маркером В-лимфоцитов, а КФ – Т-лимфоцитов, повышение активности данных ферментов может косвенно указывать на увеличение числа Т- и В-лимфоцитов, обеспечивающих реакции клеточного и гуморального иммунитета. Кроме того, усиление процессов дефосфорилирования может свидетельствовать о напряженности метаболических процессов в центральных и периферических органах иммунной системы вакцинированных птиц.
2. Наибольшие изменения активности ферментов в органах иммунной системы и плазме крови вакцинированных птиц наблюдались на 7-й и 14-й дни эксперимента. К 21-му и 28-му дням отмечалась тенденция к стабилизации показателей, что свидетельствует о нормализации метаболических процессов и завершении иммунных реакций.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Берстон, М. Гистохимия ферментов / Пер. с англ. М.В. Баниковского, А.Ф. Бочкова, М.А. Грачева; Под ред. В.В. Португалова. – М.: Мир, 1965. – С. 137-144, 160-175.
2. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Мн.: Беларусь, 2000. – Т.1. – С. 409-412.
3. Федоров, А.Ф. Некоторые особенности гистохимии щелочной фосфатазы в миндалинах при воспалении // Некоторые вопросы биохимии и медицины: Сб. науч. тр. / Второй Моск. госуд. мед. ин-т им. Пирогова. – М., 1971. – Вып. 3. – С. 18-20.