

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
на 3-й день после вакцинации				
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	$0,35 \pm 0,081$	$0,25 \pm 0,056$	$0,35 \pm 0,073$	$1,70 \pm 0,180$
на 7-ой день после вакцинации				
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	$0,56 \pm 0,034$	$0,35 \pm 0,019$	$0,38 \pm 0,049$	$1,70 \pm 0,191$
на 14-й день после вакцинации				
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	$0,45 \pm 0,034$	$0,44 \pm 0,056$	$0,47 \pm 0,011$	$2,67 \pm 0,416$
на 21-й день после вакцинации				
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	$0,44 \pm 0,057$	$0,49 \pm 0,056$	$0,56 \pm 0,034$	$2,55 \pm 0,225$
на 28-ой день после вакцинации				
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.