

ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПТИЦ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ И ПРИ ВИРУСНЫХ АНТИГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Е.Г. ТУРИЦЫНА,

*кандидат ветеринарных наук, доцент,
Красноярский ГАУ, г. Красноярск*

Ключевые слова: метаболическая активность, лейкоциты птиц, миелопероксидаза, лизосомально-катионные белки, гликоген, иммунизация.

Основной функцией лейкоцитов, в том числе и у птиц, является защита организма от генетически чужеродных тел, появляющихся в крови и тканях. Функции гранулоцитов, особенно нейтрофильных, связаны с наличием большого количества ферментов и основных белков, содержащихся в азурофильных и специфических гранулах [1]. Кроме того, гранулоциты отлича-

ются высоким уровнем энергетического обмена, в основе которого лежит утилизация гликогена, который используется ими как энергетический субстрат [2].

Изменения метаболической активности лейкоцитов могут быть связаны с возрастом, физиологическим состоянием и воздействиями различных факторов на организм птиц, в том



числе инфекционных. Известно об ингибирующем влиянии многих вирусных инфекций на хемотаксис и бактерицидные способности гранулоцитов. Имеется возможность не только прямого влияния вирусов на клетки, но и последующее вторичное действие их продуктов на нейтрофилы. Некоторые вирусные инфекции сопровождаются

Metabolic activity, poultry leukocytes, myeloperoxidase, lysosomal cation proteins, glycogen, immunization.

транзиторной гранулоцитопенией, что убедительно показано в экспериментах на животных [1].

Недостаточность метаболической активности различных форм лейкоцитов может рассматриваться как фактор риска для развития патологических состояний, сопровождающихся формированием вторичного иммунодефицита, поскольку именно на уровне клеток происходит формирование ответной реакции на воздействия различных факторов эндогенного и экзогенного происхождения [3].

Цель и методика исследований

В связи с тем, что в условиях промышленных птицефабрик птица раннего постнатального возраста подвергается интенсивным воздействиям живых вакцинных вирусов, была поставлена цель – провести оценку метаболической активности лейкоцитов периферической крови цыплят первых 2-х месяцев жизни при иммунизациях. В задачи исследований входило изучение кислород-зависимой биоцидности лейкоцитов по содержанию миелопероксидазы, кислороднезависимой бактерицидности по уровню лизосомально-катионных белков и энергетических возможностей лейкоцитов по количеству гликогена.

Материалом для исследований являлись мазки крови цыплят первых месяцев жизни породы «Хайсекс коричневый», приготовленные в разные сроки после плановых иммунизаций живыми вирусвакцинами, проводимых в условиях промышленного птицеводческого предприятия в соответствии с утвержденной схемой вакцинопрофилактики. Контролем служили мазки крови неиммунизированной птицы того же возраста.

Морфологический состав крови изучали на мазках, окрашенных комбинированным методом по Паппенгейму [4], миелопероксидазу исследовали по методу Грэхем-Кнолля с отолитидином или бензидином, гликоген изучали в ШИК-реакции с реактивом Шиффа по МакМанусу [5]. Лизосомаль-

но-катионные белки определяли 0,1-процентным забуференным спиртовым раствором прочного зеленого марки С.1.42053 (производство «Диаэм») по В.Е. Пигаревскому. [6]. Для определения миелопероксидазы и гликогена использовали стандартные наборы («Диахим-ЦитоСтейн», Санкт-Петербург). Контролем при определении гликогена служили мазки крови, обработанные слюной, которые инкубировали при температуре 37°С в течение 30 минут. При последующем окрашивании они давали отрицательную реакцию, так как гликоген расщеплялся амилазой слюны.

Полуколичественную оценку интенсивности цитохимических реакций проводили, используя принцип Астальди-Верга, основанный на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски. В зависимости от нее исследуемые элементы делили на четыре группы: с отрицательной реакцией (-), слабоположительной (+), положительной (++) и резко положительной (+++).

Определяли средний цитохимический коэффициент (СЦК) по L. Karlow (1955) в модификации В.Е. Пигаревского, Ю.А. Мазинга [6]. С этой целью дифференцировали 100 исследуемых клеток по указанной выше системе. Полученный процент клеток в каждой группе умножали на соответствующее данной группе число плюсов. Сумма этих величин, деленная на 100, представляла собой СЦК для одной клетки.

В тех случаях, когда изучаемые вещества локализовались в клетках в виде единичных гранул (например, гликоген в лимфоцитах), результат цитохимической реакции выражали в процентах клеток, дающих положительную реакцию. При проведении исследований были соблюдены стандартные условия обработки препаратов и единые критерии визуальной оценки для выведения количественных показателей учета, что в целом могло отражаться на результатах исследования.

Исследование мазков крови и микрофотографирование проведено на микроскопе МС 100 (Micros, Austria) фотокамерой САМ V200, совмещенной с компьютером при увеличениях объектива $\times 40$ и $\times 100$. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований

Лизосомально-катионные белки.

Биологическое значение лизосомально-катионных белков (ЛКБ), по современным представлениям, довольно широко. Они обладают высокой антибактериальной активностью и участвуют в формировании противoinфекционной неспецифической резистентности организма. Дефицит катионных белков или их недостаточный синтез приводят к снижению функциональной активности лейкоцитов [7].

В процессе исследований установлена положительная реакция на катионные белки гранул гранулоцитов. В моноцитах и лимфоцитах лизосомально-катионный тест был отрицательным.

Лизосомально-катионный тест лейкоцитов у клинически здорового молодняка птиц первой недели жизни отличался крайне низкими показателями. Содержание ЛКБ в псевдоэозинофилах цыплят суточного возраста колебалось от 0,75 до 1,28 и в среднем составляло $1,02 \pm 0,09$ ед. Преобладали клетки со слабоположительной (48%) и умеренной (33%) реакцией. От 2 до 6% клеток давали отрицательную реакцию. Ряд авторов расценивают показатели лизосомально-катионного теста до 1,5 ед. как характеризующие низкий уровень естественной резистентности [8, 9]. В 7-суточном возрасте у всех экспериментальных цыплят отмечали снижение уровня ЛКБ. У интактных цыплят разница с исходными показателями составила 12,7%, у привитых – 4,9%. Содержание ЛКБ у вакцинированных цыплят на 11,3% превышало результаты интактной птицы (рис. 1).

Антигенное воздействие живыми вирусвакцинами вызывало слабое понижение ЛКБ у молодняка 14-суточного возраста. У 21-суточных вакцинированных цыплят количество ЛКБ было на 16,3% ниже, чем в контроле ($P < 0,05$). По мере дальнейшего роста птицы содержание ЛКБ равномерно возрастало, достигая 1,6-2 ед. к 45-60-суточному возрасту, что соответствует показателям среднего уровня естественной резистентности. Достоверные отличия в этом показателе у привитой и интактной птицы в этот период отсутствовали. В псевдоэозинофилах наблюдались два типа катионных гранул: мелкие, дающие неравномерное светло-зеленое окрашивание цитоплазмы, и более крупные удлиненные светло- или темно-зеленые (рис. 2). Катионные гра-

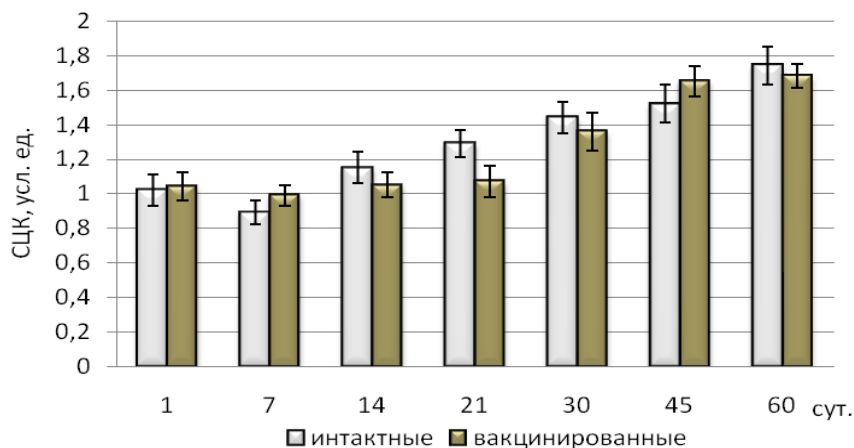


Рисунок 1. Показатели СЦК катионных белков в псевдоэозинофилах интактной и вакцинированной птицы

нулы в эозинофилах и базофилах имели ярко-зеленую окраску.

Миелопероксидаза. Одним из основных компонентов бактерицидной системы организма является миелопероксидаза, которую помимо пероксидазы образуют перекись водорода и ионы галоидов (хлора, брома и йода). Эта система является токсичной для бактерий, грибов, вирусов, микоплазм и хламидий.

Псевдоэозинофильные гранулоциты экспериментальных цыплят в первые три недели исследований показали отрицательную реакцию на пероксидазу. В возрасте 45-60 дней клетки демонстрировали слабое диффузное окрашивание цитоплазмы. В то же время гранулы эозинофилов и базофилов проявляли интенсивную положительную реакцию. Гранулы имели округлую форму и желто-коричневую окраску (рис. 3). О низком содержании либо о полном отсутствии миелопероксидазы в лейкоцитах у цыплят сообщает ряд авторов [2, 9]. В отличие от млекопитающих установлена положительная реакция на пероксидазу цитоплазмы эритроцитов птиц, что в настоящее время вызывает затруднение в объяснении этого эффекта.

Гликоген. Содержание гликогена как основного энергетического субстрата является важным показателем, определяющим способности клетки в осуществлении его функций. Молекула гликогена не имеет фиксированной структуры и находится в состоянии постоянного обмена глюкозных остатков. Ее размер варьирует в зависимости от потребности клетки в глюкозе в данный момент.

Исследование гликогена в клетках крови птиц показало, что количество ШИК-положительно реагирующих гранул и степень интенсивности их окраски зависит от возраста и функционального состояния птицы. У суточных цыплят наблюдали мелкие, пылевидные, едва заметные в световой микроскоп красноватые зернышки в цитоплазме гранулоцитов и тромбоцитов. СЦК составлял всего $0,26 \pm 0,03$ ед. (рис. 4). Около 12-14% гетерофилов крови, идентифицируемых по морфологической характеристике как палочковидные и юные гранулоциты, давали отрицательную реакцию, что является показателем функциональной незрелости этих клеток.

В процессе постнатального онтогенеза количество гликогена в лейкоцитах возрастало и к 60 суткам более чем в 2 раза превышало исходные показатели. Цитоплазма псевдоэозинофилов содержала ШИК-положительные гранулы двух видов: четко очерченные редко расположенные темно-вишневые гранулы удлинённой формы и мелкие округлые зерна красновато-розового цвета (рис. 5).

У вакцинированного молодняка на

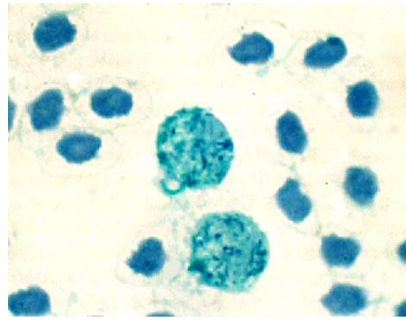


Рисунок 2. Положительная реакция на катионные белки двух псевдоэозинофилов. Прочный зеленый по Пигаревскому. $\times 10, \times 100$

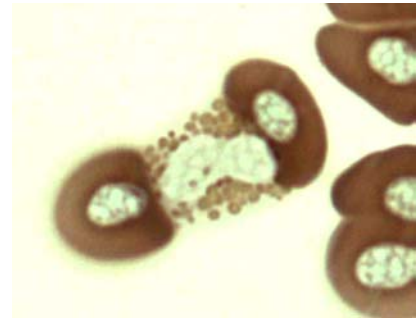


Рисунок 3. Положительная реакция гранул эозинофила на пероксидазу. $\times 10, \times 100$

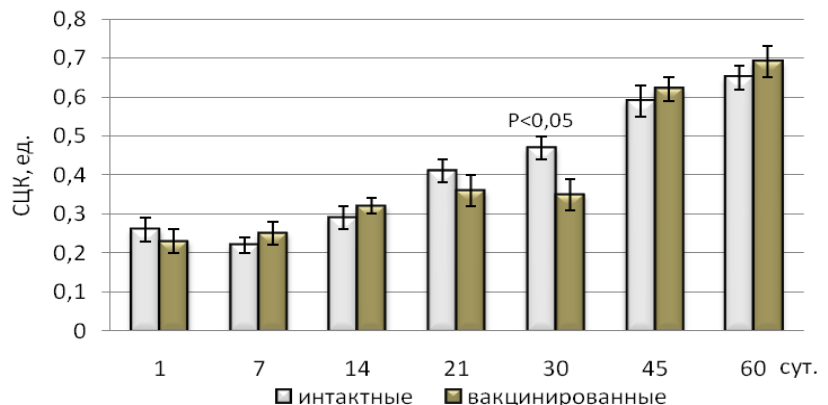


Рисунок 4. СЦК гликогена в псевдоэозинофилах периферической крови интактных и вакцинированных цыплят

21-е и особенно на 30-е сутки содержание гликогена было ниже, чем в контроле ($P < 0,05$). Именно к этому периоду жизни количество антигенных стимуляций живыми вирусвакцинами возрастает до 5-6 обработок. К 45-60-суточному возрасту разница в содержании гликогена у привитой и интактной птицы не превышала 5-6%.

Лимфоциты крови цыплят первой недели жизни не содержали гликогена. На 14-21-е сутки после начала вакцинации 16-20% лимфоцитов содержали в цитоплазме гранулы гликогена. Считается, что наличие гликогена в цитоплазме лимфоцитов характерно для В-клеток [5]. Увеличение в крови этих клеток свидетельствует об иммунной перестройке, происходящей в организме привитой птицы. В эозинофилах наблюдали диффузное окрашивание цитоплазмы в красноватый цвет. При этом гранулы клеток давали ШИК-отрицательную реакцию. Интенсивность окраски цитоплазмы эозинофилов с возрастом и при антигенных раздражениях достоверных изменений не претерпевала. Гранулы базофилов всегда были ШИК-негативными.

Незначительные запасы гликогена в лейкоцитах крови птиц раннего постнатального возраста свидетельствуют о слабых потенциальных способностях к фагоцитозу, зависящих от имеющегося в клетке энергетичес-

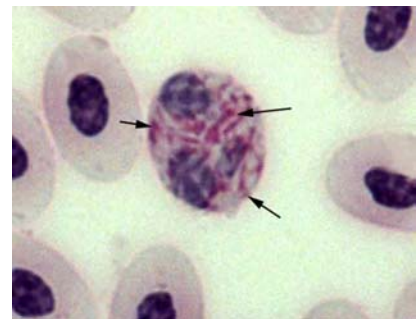


Рисунок 5. Гранулы гликогена в цитоплазме псевдоэозинофила. ШИК-реакция. $\times 10, \times 100$

кого субстрата. Количество гликогена в псевдоэозинофильных гранулоцитах птиц на порядок меньше, чем у млекопитающих, что подтверждается работами ряда авторов [2, 9].

Выводы

1. Низкий уровень лизосомально-катионных белков и гликогена, отсутствие миелопероксидазы в клетках, отвечающих за фагоцитарные реакции, свидетельствуют о низкой естественной резистентности организма птиц раннего постнатального возраста.

Изменения метаболической активности лейкоцитов птиц при действии вирусвакцин несут разнонаправленный характер. Небольшие антигенные стимуляции активируют синтез и накопление катионных бел-

Ветеринария

ков и энергетического субстрата в гетерофилах периферической крови, тогда как многократные антигенные

воздействия ведут к снижению уровня гликогена и ЛКБ в этих клетках в определенные моменты жизни птицы,

что является потенциально опасным с точки зрения развития иммунопатологических состояний.

Литература

1. Бережная Н. М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз. Киев : Наук. думка, 1988. 192 с.
2. Болотников И. А., Конопатов Ю. В. Практическая иммунология сельскохозяйственной птицы. СПб. : Наука, 1993. 208 с.
3. Кадричева С. Г., Савченко А. А. Метаболическая реакция лимфоцитов на воздействие биологически активных веществ *in vitro* // Гомеостаз и экстремальные состояния организма : тез. докл. XI Междунар. симп. Красноярск, 2003. С. 62-63.
4. Карпуть И. М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. Минск : Ураджай, 1986. С. 20.
5. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М. : Медицина, 1983. 320 с.
6. Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А. Лизосомально-катионный тест : методич. письмо. Ленинград, 1987. 13 с.
7. Кокряков В. Н. Катионные белки лизосом нейтрофильных гранулоцитов при фагоцитозе и воспалении // Вопросы медицинской химии. 1990. № 6. С. 13-16.
8. Коровин Р. Н., Зеленский В. П., Грошева И. А. Лабораторная диагностика болезней птиц : справочник. М. : Агропромиздат, 1989. С. 244-245.
9. Egami M., Sasso W. S. Topochemistry of blood cells of the Gallus domesticus (Aves, Galliforme) // Rev. Bras. Biol. 1991. Feb. 51 (1).