

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет»

На правах рукописи

Царев  
Павел Юрьевич

ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТКАНЕЙ  
И ОРГАНОВ У КУР И ПЕРЕПЕЛОВ МЕТОДОМ  
ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и  
морфология животных

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:  
доктор ветеринарных наук, профессор  
Донкова Наталья Владимировна

Красноярск 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	9
1.1 Структурная и функциональная характеристика клеток крови сельскохозяйственных птиц.....	9
1.2 Методы оценки функционального состояния клеток крови.....	20
1.3 Хемилюминесцентный анализ в ветеринарной медицине .....	26
1.4 Влияние экстремальных факторов на морфологию и функцию клеток крови животных.....	29
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	34
2.1 Материалы и методы исследования .....	34
2.2 Результаты собственных исследований .....	42
2.2.1 Оценка морфофункционального состояния клеток крови кур разного возраста.....	42
2.2.1.1 Возрастные особенности морфологических показателей крови кур....	42
2.2.1.2 Оценка функционального состояния клеток крови кур хемилюминесцентным методом .....	47
2.2.2 Оценка морфофункционального состояния клеток крови перепелов разного возраста.....	59
2.2.2.1 Возрастные особенности морфологических показателей крови перепелов.....	59
2.2.2.2 Оценка функционального состояния клеток крови перепелов хемилюминесцентным методом .....	63
2.2.3 Хемилюминесцентный анализ клеток органов иммуногенеза цыплят раннего возраста.....	74
2.2.4 Особенности морфологических показателей и хемилюминесценции крови кур при иммунизациях.....	82

2.2.4.1 Оценка морфофункционального состояния клеток крови при вакцинации кур против инфекционного ларинготрахеита .....	82
2.2.4.2 Оценка морфофункционального состояния клеток крови при вакцинации кур против болезни Гамборо и гемофилёза .....	88
2.2.4.3 Оценка морфофункционального состояния клеток крови при вакцинации кур против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита и синдрома снижения яйценоскости .....	98
2.2.5 Влияние низких и высоких температур на морфологические показатели и хемилюминесценцию крови кур.....	103
2.2.5.1 Морфологические показатели крови цыплят при воздействии низких и высоких температур .....	104
2.2.5.2 Оценка функционального состояния клеток крови при воздействии низких и высоких температур.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	152

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследований.** Идентификация структуры и функции клеток тканей и органов является жизненно важным инструментом, позволяющим судить об их морфофункциональном состоянии, оценивать влияние негативных внешних факторов на организм, своевременно реагировать на возникающие угрозы здоровью и поддерживать ветеринарное благополучие поголовья животных и птиц [Донник И.М. с соавт., 2015; Фисинин В.И., Кавтарашвили А.Ш., 2015].

Высокой активностью и способностью к отражению изменений гомеостаза отличаются лейкоциты крови, играющие центральную роль в неспецифической защите организма благодаря своей фагоцитарной активности и способности генерировать активные формы кислорода [Маянский Д.Н., 2008]. Молекулярный уровень мониторинга функциональной активности клеток по уровню генерации свободных радикалов, регистрируемый хемилюминесцентным методом, в последние годы нашел применение в медико-биологических исследованиях и практической медицине [Фархутдинов, Р.Р., 2006; Хабибуллин Р.Р., Федосов А.В., 2006; Земсков В.М. с соавт., 2013]. Однако хемилюминесцентный анализ мало известен практикующим ветеринарным специалистам.

Несмотря на появление отдельных работ, посвященных хемилюминесценции изолированных лейкоцитов или клеток цельной крови домашних и диких птиц [Chadfield M., Olsen J., 2001; Papp Z., Smits J.E.G., 2007], возникают определенные трудности в интерпретации полученных результатов, что связано с отсутствием системных данных о возрастной динамике течения свободнорадикальных процессов у сельскохозяйственных птиц и об изменениях кислородного метаболизма клеток тканей и органов, в том числе иммуногенеза, при экстремальных воздействиях различной этиологии. Данные факты обуславливают актуальность настоящих исследований.

**Степень разработанности.** Основы применения хемилюминесцентного анализа биологических субстратов для оценки функционального состояния клеток изложены в работах Топо-Ока et al. (1983); В.М. Земскова с соавт. (1988); М.У.

Magrisso et al. (2000); Ю.А. Владимирова, Е.В. Проскурниной (2007). Параметры генерации свободных кислородных радикалов клетками крови домашних и диких птиц представлены в работах отечественных [Садовников Н.В., 2002; Макарская Г.В. с соавт., 2011; Турицына Е.Г. с соавт., 2013] и зарубежных [Desmidt M. et al., 1996; Van Neron A. et al., 1997; Chadfield M., Olsen J., 2001] авторов. Однако в публикациях отсутствуют данные о возрастных особенностях хемилюминесценции клеток тканей и органов кур и перепелов, а также продукции свободных радикалов клетками крови кур при экстремальных воздействиях различного происхождения.

***Цель и задачи исследований.*** Целью настоящего исследования являлась оценка морфофункционального состояния тканей и органов у кур и перепелов методом хемилюминесцентного анализа. Для реализации намеченной цели поставлены следующие задачи:

- исследовать морфофункциональное состояние клеток крови кур яичных кроссов и японских перепелов разного возраста хемилюминесцентным методом;
- дать оценку особенностям свободнорадикальных процессов в суспензии органов иммуногенеза цыплят при хемилюминесцентном анализе;
- изучить морфологические показатели и хемилюминесценцию крови кур при иммунизациях;
- оценить влияние низких и высоких температур на морфологические показатели и хемилюминесценцию крови цыплят раннего возраста.

***Научная новизна.*** Впервые применен хемилюминесцентный анализ в оценке морфофункциональных показателей клеток крови кур яичного кросса «Декалб» и японских перепелов разного возраста. Определены особенности хемилюминесценции клеток органов иммуногенеза (селезёнка, клоакальная сумка, костный мозг) цыплят яичного кросса «Хайсекс уайт» раннего возраста. Впервые применен хемилюминесцентный анализ в оценке влияния иммунизаций, низко- и высокотемпературных воздействий на морфологические показатели и продукцию свободных радикалов кислорода клетками крови кур. Впервые выявлены особенности активности фагоцитов крови сельскохозяйственных птиц в

возрастном аспекте, при вакцинациях и воздействии низких и высоких температур.

***Теоретическая и практическая значимость.*** Сведения об особенностях продукции свободных кислородных радикалов клетками крови и органов иммуногенеза сельскохозяйственных птиц, полученные методом хемилюминесцентного анализа, позволяют выявить изменения морфофункционального состояния организма на молекулярном уровне до их проявления на субклеточном и клеточном уровне. Полученные параметры хемилюминесценции клеток могут быть использованы в качестве референтных показателей при проведении научных исследований и в практической работе при оценке раннего повреждающего воздействия факторов внешней среды на организм сельскохозяйственных птиц, а также при решении вопроса о целесообразности применения в птицеводстве препаратов, обладающих антиоксидантными или прооксидантными свойствами.

Результаты исследований применения хемилюминесцентного анализа при оценке морфофункционального состояния клеток тканей и органов сельскохозяйственных птиц включены в научно-практические рекомендации «Факторы технологических процессов и характеристик сырья, влияющие на показатели безопасности мяса птицы и продуктов его переработки», рекомендованные научно-техническим советом ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет» (протокол № 3 от 6 декабря 2017 г.) и используются в работе ветеринарных специалистов на ОАО «Птицефабрика Заря» Красноярского края (акт внедрения от 18 июня 2018 г.).

***Методология и методы исследования.*** Методологической основой диссертационной работы являлись научные положения об использовании хемилюминесценции биологических объектов для оценки состояния живых организмов в норме и при патологических процессах различной этиологии, изложенные в трудах отечественных и зарубежных авторов. В процессе работы проведено комплексное исследование, включающее научный поиск и анализ публикаций отечественных и иностранных авторов по данной тематике;

хемилюминесцентный анализ клеток нефракционированной крови и суспензии органов иммуногенеза кур и перепелов, морфологические, иммунологические и статистические методы исследования, направленные на выяснение возрастных особенностей функционального состояния клеток крови и органов сельскохозяйственных птиц, а также влияние вакцинаций и температурных стрессов на морфологические показатели клеток крови кур и параметры их хемилюминесценции.

***Положения, выносимые на защиту.***

- закономерности возрастных изменений морфологических показателей и параметров хемилюминесценции крови кур и японских перепелов;
- особенности течения свободнорадикальных процессов в суспензии органов иммуногенеза кур раннего возраста по данным хемилюминесцентного анализа;
- характеристика морфологических показателей и хемилюминесценции крови кур при иммунизациях;
- особенности морфологических показателей и параметров хемилюминесценции крови кур при моделируемых температурных воздействиях.

***Публикации результатов исследований.*** По результатам исследований опубликовано 14 научных работ, в том числе пять из них в рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК.

***Степень достоверности и апробация результатов.*** Достоверность представленных результатов подтверждается соответствием теоретического обоснования, достаточным количеством экспериментального материала, корректными методиками исследований и статистической обработкой полученных цифровых данных.

Основные положения диссертационной работы доложены и одобрены на конференциях различного уровня: III Всероссийской ветеринарной конференции «Животные как часть экосистемы» (г. Красноярск, 19 октября 2012 г.); Международной научно-практической конференции «Проблемы развития АПК Саяно-Алтая» (г. Абакан, 14 декабря 2012 г.); Международной научно-

практической конференции молодых ученых «Вклад молодых ученых в инновационное развитие АПК России» (г. Пенза, 22-23 октября 2015 г.); Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (г. Троицк, 16-17 декабря 2015 г.); IX, X и XI Международных научно-практических конференциях молодых ученых «Инновационные тенденции развития Российской науки» (г. Красноярск, 2016-2018 гг.); Международной заочной научной конференции «Проблемы современной аграрной науки» (г. Красноярск, 15 октября 2016 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных «Развитие научной, творческой и инновационной деятельности молодежи» (г. Курган, 9 ноября 2016 г.); X Международной научно-практической конференции молодых ученых «Инновационные тенденции развития Российской науки» (г. Красноярск, 22-23 марта 2017 г.); научном семинаре «Вопросы прикладной морфологии и патологии животных» (г. Красноярск, 16 апреля 2017 г.); II и III этапы Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений МСХ РФ по Сибирскому федеральному округу (г. Новосибирск, г. Ставрополь, 2018).

***Личный вклад соискателя.*** Представленные в диссертационной работе экспериментальные исследования, теоретическое обоснование и анализ полученных результатов проведены автором самостоятельно. В проведении хемилюминесцентного анализа техническую помощь оказали сотрудники Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Красноярского научного центра СО РАН кандидат биологических наук Г.В. Макарская и инженер С.В. Тарских.



## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

#### **1.1 Структурная и функциональная характеристика клеток крови сельскохозяйственных птиц**

Одним из наиболее распространенных, доступных и информативных методов оценки морфофункционального статуса организма являются исследования крови. Кровь – жидкая ткань организма, относится к опорно-трофическим тканям, выполняет множество функций, в том числе транспортную функцию, доставляя питательные вещества и кислород к органам и тканям и удаляя от них продукты обмена веществ [Бажибина Е.Б. с соавт., 2005; Васильев Ю.Г. с соавт., 2015]. Кровь участвует в терморегуляции, равномерно распределяя тепло по организму и поддерживая относительно постоянную температуру.

Кроме того, кровь участвует в гуморальной регуляции обменных процессов, так как с током крови переносятся биологически активные вещества – гормоны. Кровь содержит специфические белковые молекулы, называемые антитела, которые обладают способностью обезвреживать микроорганизмы, вирусы и токсины, попавшие в организм. Помимо этого, некоторые клетки крови, в частности нейтрофильные гранулоциты и моноциты, обладают ярко выраженной способностью к фагоцитозу [Ройт А. с соавт., 2000; Ярилин А.А., 2010].

Идентификация клеток крови и оценка клеточного ответа являются жизненно важными инструментами, которые помогают ветеринарным специалистам оценить состояние здоровья птиц, судить о функциональном состоянии отдельных органов и всего организма, диагностировать наличие того или иного заболевания, контролировать его течение, а также прогнозировать исход патологического процесса [Азаубаева Г.С., 2012; Суханова С.Ф., 2017; Bickford D., 2007; Mitchell E.B., Johns J., 2008; Jones M.P., 2015].

Общий объём крови у птиц зависит от их возраста, пола и видовой принадлежности и колеблется от 7% до 13% от массы тела. У кур массой 2-3,5 кг содержится 180-315 мл крови; у уток массой до 4 кг – 360 мл; у гусей массой 7 кг

– 595 мл; у индеек массой 8 кг – 688 мл [Селянский В.М, 1980]. Считается что у молодых птиц относительное содержание крови больше чем у взрослых.

Общеизвестно, что кровь состоит из плазмы и форменных элементов. Плазма крови представляет собой межклеточное вещество жидкой консистенции. Помимо воды она содержит белки (альбумины, глобулины, фибриноген и др.), органические и минеральные соединения. Плазма крови без фибриногена называется сывороткой. Форменные элементы, или клетки крови, составляют 30-40% от объёма крови и отличаются большим разнообразием строения и выполняемых функций. Клетки крови образуются в красном костном мозге, откуда попадают в кровяное русло и переносятся плазмой. Форменными элементами крови являются эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Эритроциты и тромбоциты осуществляют свои функции непосредственно в крови. Лейкоциты выполняют разнообразные задачи в основном не в крови, а в соединительной ткани [Ройт А.А. с соавт., 2000; Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010].

*Эритроциты птиц* – ядерные клетки эллипсоидной формы, их длина составляет 11-13 мкм, а ширина – 7-8 мкм. Цитоплазма зрелых эритроцитов характеризуется ярко выраженной оксифильностью и отсутствием органелл. Ядро овальной формы, занимает центральное положение и отличается гиперхромной окраской [Mitchell E.V., Johns J., 2008]. Продолжительность жизни эритроцита в периферической крови у птиц составляет 25-30 суток [Болотников И.А., Соловьев Ю.В., 1980; Карпуть И.М., 1986]. У птицы раннего постнатального возраста наряду со зрелыми эритроцитами содержится до 10-14% ретикулоцитов, представляющих незрелую форму клеток, содержащих в цитоплазме мелкую зернистость и сетчатость [Васильев Ю.Г. с соавт., 2015].

Эритроцит имеет эластичную плазмолемму, что позволяет ему выходить за пределы сосуда. Цитоплазма клетки заполнена гемоглобином, состоящим из белка глобина и железосодержащего пигмента – гема. Гемоглобин способен присоединять кислород и углекислых газ и осуществлять дыхательную функцию. Помимо этого, эритроциты могут адсорбировать на своей поверхности белки (глобулины) и бактерии и транспортировать их [Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010].

Эритроциты являются самым многочисленным типом клеток крови, так как их в 500-1000 раз больше, чем лейкоцитов. По данным ряда авторов, у сельскохозяйственных птиц, таких как куры, утки, гуси, индейки, цесарки, содержание эритроцитов в крови колеблется от  $1,8 \times 10^{12}/л$  до  $4,5 \times 10^{12}/л$  [Карпуть И.М., 1986; Донкова Н.В., 2004; Бессарабов Б.Ф., 2009; Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2013; Бурков В.П., 2013; Суханова С.Ф., 2017].

*Лейкоциты*, также как эритроциты, циркулируют в крови. Они способны формировать псевдоподии, с помощью которых проникают через стенки сосудов в соединительную ткань и перемещаются к месту реализации своих функций [Ярилин А.А., 2010; Liu G. et al, 2013]. Одни лейкоциты отличаются малой продолжительностью жизни, другие – циркулируют в крови сравнительно долго.

В многочисленных учебниках и учебных пособиях по физиологии и морфологии приводится морфологическая классификация лейкоцитов, которая базируется на их внешнем виде при световой микроскопии на окрашенных мазках крови. Идентифицируется два типа лейкоцитов – зернистые и незернистые. Эта терминология сохранилась до сих пор, хотя известно, что даже незернистые лейкоциты содержат небольшое количество гранул [Тэмл Х., 2010].

Существуют три типа зернистых лейкоцитов, различаемые по окрашиванию их цитоплазматических гранул. Если специфические гранулы клеток окрашиваются кислыми красителями – это эозинофильные лейкоциты. Лейкоциты, гранулы которых интенсивно окрашиваются основными красителями, названы базофильными лейкоцитами. Лейкоциты, гранулы которых при нейтральном значении рН не могут быть отнесены ни к ацидофильным, ни к базофильным, названы нейтрофильными зернистыми лейкоцитами [Карпуть И.М., 1986; Maxwell M.H., Robertson G.M., 1998].

Незернистые лейкоциты бывают двух типов: многочисленные и мелкие лимфоциты, более крупные и относительно малочисленные – моноциты. Процентное соотношение разных типов лейкоцитов называется лейкоцитарной формулой, имеет диагностическое значение, так как при развитии различных патологических состояний происходят сдвиги в их популяции.

Общее количество лейкоцитов в крови у клинически здоровой взрослой птицы колеблется в большом диапазоне от  $20 \times 10^9/\text{л}$  до  $40 \times 10^9/\text{л}$  [Болотников И.А., Соловьев Ю.В., 1980; Бурков В.П., 2013; Донник И.М. с соавт., 2015], а по некоторым данным достигает  $60 \times 10^9/\text{л}$  [Селянский В.М., 1980]. Вракин В.Ф. и Сидорова М.В. (1984) приводят следующие данные по содержанию лейкоцитов у различных видов птицы: куры –  $20-45 \times 10^9/\text{л}$ , индейки –  $34 \times 10^9/\text{л}$ , утки –  $18-30 \times 10^9/\text{л}$ , гуси –  $20-38 \times 10^9/\text{л}$ . Колебания показателей в этих пределах зависят от возраста и породы птицы, времени суток, кормления и других факторов.

Известно, что у молодняка раннего возраста число лейкоцитов меньше, чем у взрослой птицы [Бессарабов Б.Ф., 2009]. Количество лейкоцитов изменяется после приема корма, усиленной мышечной работы, при различных заболеваниях и под влиянием различных кормовых добавок [Strydom N., Rankin S.M., 2013]. Даже в пределах одной породы у птиц разных кроссов наблюдаются отличия в количестве лейкоцитов, что может отражать разный уровень иммунологической адаптации [Азаубаева Г.С., 2012; Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2013; Жуков В.М., Семенихина Н.М., 2016; Bílková V. et al., 2017].

*Псевдоэозинофильные гранулоциты (псевдоэозинофилы)* – специфическая форма нейтрофильных лейкоцитов у птиц. Они развиваются в костном мозге из миелобласта. По мере созревания клетка преобразуется сначала в промиелоцит, а затем в миелоцит [Карпуть И.М., 1986; Болотников И.А., Конопатов, Ю.В., 1993]. При нормальном кроветворении миелоцит становится метамиелоцитом или юным нейтрофилом, его ядро имеет овальную или бобовидную форму. В дальнейшем клетка превращается в палочковидный нейтрофил, ядро становится уплотненным, принимает форму подковы. Конечной стадией развития является сегментоядерный гранулоцит. Таким образом зрелость нейтрофила определяют, главным образом, по форме ядра и в меньшей степени по интенсивности его окраски [Тэмл Х., 2010; Clark Ph. et al., 2009; Jones M.P., 2015].

Псевдоэозинофилы – округлые клетки диаметром 10-12 мкм. Ядро зрелой клетки состоит из трёх-пяти сегментов, расположено эксцентрично, неравномерно

окрашивается в красно-фиолетовый цвет [Bickford D., 2007]. Считается, что сегментированность ядра у птиц выражена незначительно [Карпуть И.М., 1986].

В плазмолемму псевдоэозинофилов встроены рецепторы молекул адгезии, цитокинов, колониестимулирующих факторов, опсонинов и медиаторов воспаления [Ройт А с соавт., 2000; Ярилин А.А., 2010]. Цитоплазма псевдоэозинофилов заполнена веретенновидными заостренными и мелкими округлыми гранулами [Карпуть И.М., 1986; Mitchell E.B., Johns J., 2008; Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010]. У молодых клеток гранулы лежат рыхло, в зрелых клетках они густо заполняют цитоплазму. Известно, что гранулы у гусей короче и шире, чем куриные [Селянский В.М., 1980]. Главный фермент азурофильных гранул – миелопероксидаза. Этот белок катализирует образование хлорноватистой кислоты и других соединений, усиливающих бактерицидную активность нейтрофила [Ярилин А.А., 2010]. Однако в некоторых исследованиях установлено, что гранулы псевдоэозинофилов птиц не содержат пероксидазу, что указывает на особенности их кислородного метаболизма [Болотников И.А., Соловьев Ю.В., 1980; Турицына Е.Г., 2009; Egami M.I., Sasso W.S., 1991]. Кроме того, гранулы содержат катепсины, дефензины, лизоцим и катионные белки, обладающие бактериостатическими свойствами. Содержание катионных белков в псевдоэозинофилах птиц с возрастом увеличивается, что положительно влияет на неспецифическую защиту организма [Колабская Л.С., 1982; Бессарабов Б.Ф., 2009; Турицына Е.Г., 2009]. Цитоплазма псевдоэозинофилов содержит гликоген, обеспечивающий клетки энергией. Однако молодые клетки либо не имеют запасов гликогена, либо его количество минимально, что является признаком их функциональной незрелости [Болотников И.А., Конопатов, Ю.В., 1993; Турицына Е.Г., 2009].

Псевдоэозинофилы обладают выраженной фагоцитарной активностью и участвуют в острой воспалительной реакции [Ройт А. с соавт., 2000; Liu G. et al., 2013; Strydom N., Rankin S.M., 2013]. Фагоцитоз и уничтожение тканевых обломков и опсонизированных микроорганизмов сопровождается образованием

метаболизм арахидоновой кислоты и респираторным взрывом, в результате чего образуются свободные кислородные радикалы [Ярилин А.А., 2010].

Относительное содержание псевдоэозинофилов в крови разных видов сельскохозяйственных птиц колеблется и у кур составляет 28-40%; индеек – 40-45%; гусей – 35-43%; уток – 37-40% [Селянский В.М., 1980]; у перепелов – 28-30% [Турицына Е.Г., Климова Е.А., 2014]. Известно, что на их количество влияет кросс птицы и её возраст. По данным Н.В. Донковой (2004) их содержание у бройлеров кроссов «Сибиряк» и «ISA» колеблется от 48-55% у суточных цыплят до 20-35% – у птицы 42-48-суточного возраста. Аналогичные результаты получены Е.А. Колесник и М.А. Дерхо (2013).

*Эозинофильные гранулоциты* (эозинофилы) в своем развитии проходят те же этапы созревания, что и псевдоэозинофильные гранулоциты. Они образуются в костном мозге, где содержание всей популяции не превышает 4%. Общий жизненный цикл клеток составляет 8-12 дней. Они депонируются в рыхлой соединительной ткани дыхательного и пищеварительного тракта. Эозинофильные гранулоциты являются крупными клетками диаметром 10-14 мкм [Карпуть И.М., 1986; Clark Ph. et al., 2009]. В зависимости от степени зрелости клетки ядро может быть округлым, палочковидным или сегментированным, окрашенным в красно-фиолетовый цвет. У зрелых клеток ядра состоят из двух долек, соединенных тонкой перемычкой. Грубые глыбки хроматина в ядрах эозинофилов не столь плотно упакованы, как в нейтрофилах [Васильев Ю.Г. с соавт., 2015; Mitchell E.B., Johns J., 2008; Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010]. Цитоплазма клеток голубоватая, плотно заполнена гранулами двух типов: первичными азурофильными и вторичными – эозинофильными, которые принято считать модифицированными лизосомами [Bickford D., 2007]. В гранулах находится кристаллоид, богатый аргинином, а также катионные белки, лизосомные гидролитические ферменты, пероксидаза, гистаминаза и др. [Clark Ph. et al., 2009; Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010].

Функциональные возможности эозинофилов обширны. Они способны фагоцитировать бактерии, обладают хемотаксисом к гистамину, лимфокинам и

иммунным комплексам, обезвреживают токсины, являются основными эффекторными клетками в противопаразитарном иммунитете. В аллергических реакциях принимают участие Fc-рецептор плазмолеммы для IgE, а также C3- и C4 – рецепторы [Ярилин А.А., 2010; Васильев Ю.Г. с соавт., 2015; Prin L.et al. 1990].

Подвижность эозинофилов значительно ниже, чем у нейтрофилов. Особенностью зрелых клеток является большое число митохондрий, развитый пластинчатый комплекс и шероховатая эндоплазматическая сеть, небольшое содержание свободных рибосом. В зрелом эозинофиле сохраняется белоксинтезирующий аппарат, как правило, не свойственный конечной стадии дифференцировки. В отличие от нейтрофилов эозинофилы не имеют активности щелочной фосфатазы и лизоцима [Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010].

Относительное содержание эозинофилов в крови птиц в среднем составляет 4-5% [Селянский В.М., 1980; Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2013; Васильев Ю.Г., 2015]. У разных видов сельскохозяйственной птицы уровень эозинофилов составляет: у кур 1,2-6%, индеек – 1,2-3%, гусей – 4,0-4,5%, уток – 4,5-7% [Вракин В.Ф., Сидорова М.Ф., 1984]; перепелов – 1,7-3,5% [Турицына Е.Г., Климова Е.А., 2014]; бройлерных кроссов кур – 2-5% [Донкова Н.В., 2004].

*Базофильные гранулоциты* (базофилы) образуются в гранулоцитарном ростке костного мозга, так же как нейтрофилы и эозинофилы. Из костного мозга они на несколько часов попадают в периферический кровоток, после чего мигрируют в ткани, где функционируют в течение 10-12 дней.

Базофилы – крупные клетки размером 12-14 мкм с двудольчатым или сегментированным ядром, которое окрашивается менее интенсивно, чем ядра нейтрофила или эозинофила [Васильев Ю.Г. с соавт., 2015; Vickford D., 2007]. В мазках крови ядра, как правило, не видны из-за многочисленных темно-фиолетовых гранул в цитоплазме. Гранулы содержат простагландины, серотонин, лейкотриены и гистамин, сходны с гранулами тучных клеток и, подобно им, метакроматичны, так как содержат гепарин [Mitchell E.B., Johns J., 2008].

Базофилы участвуют в аллергических реакциях немедленного и замедленного типов, при этом происходит выход клеток в ткани и уменьшение их

концентрации в крови [Ярилин А.А., 2010]. Они обеспечивают кровоток в мелких кровеносных сосудах, рост новых капилляров, участвуют в регуляции свертываемости крови благодаря наличию в гранулах гепарина [Васильев Ю.Г. с соавт., 2015]. Считается, что клетки не играют существенной роли в защитных реакциях, хотя и обладают способностью к фагоцитозу [Ройт А. с соавт., 2000]. При действии гидрокортизона базофилы покидают кровяное русло и скапливаются в местах воспаления, происходит их дегрануляция, выделяются биологически активные соединения, вызывающие зуд, жжение, покраснение и отек тканей.

Содержание базофилов в крови птиц в среднем составляет 2-4,5% [Селянский В.М., 1980; Карпуть И.М., 1986; Васильев Ю.Г., 2015]. У кур их относительное количество не превышает 1,7-4,6%, индеек – 2,8-4,8%, гусей – 1,2-2,3%, уток – 1,5-3% [Вракин В.Ф., Сидорова М.Ф., 1984]; у перепелов – 0,15-3% [Турицына Е.Г., Климова Е.А., 2014]; цыплят-бройлеров – 2-4% [Донкова Н.В., 2004; Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2013]. На содержание базофилов практически не влияет возраст, характер кормления и содержания птицы.

*Лимфоциты* – один из пяти типов лейкоцитов. Морфологические особенности строения и размеры позволяют выделить три типа лимфоцитов – малые, средние и большие. Размер малых лимфоцитов составляет 4,5-6 мкм, средних – 7-10 мкм, больших – 10-18 мкм [Селянский В.М., 1980; Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010]. В зависимости от происхождения и выполняемых функций различают В-лимфоциты, Т-лимфоциты и НК-клетки [Ройт А. с соавт., 2000].

Малые лимфоциты имеют оптически плотное округлое или бобовидное ядро красно-фиолетового цвета, с грубыми глыбками хроматина. Цитоплазма голубоватая, образует узкий ободок вокруг ядра [Васильев Ю.Г. с соавт., 2015; Bickford D., 2007; Clark Ph. et al., 2009]. Большинство циркулирующих малых лимфоцитов функционально относятся к Т- и В-лимфоцитам. По данным И.М. Карпутя (1986), у птиц 60-65% составляют Т-лимфоциты и 30-35% – В-лимфоциты. Морфологически эти клетки невозможно идентифицировать; различить их можно лишь соответствующими иммунологическими методами.



Главная функция Т-лимфоцитов – участие в иммунных реакциях. Они уничтожают аномальные клетки организма, участвуют в аллергических реакциях, отторжении чужеродного трансплантата. Среди Т-лимфоцитов различают CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоциты. CD4<sup>+</sup> клетки (Т-хелперы) поддерживают пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, стимулируют образование цитотоксических Т-лимфоцитов, способствуют пролиферации и дифференцировке супрессорных Т-лимфоцитов [Ройт А.А. с соавт., 2000; Ярилин А.А., 2010]. При встрече лимфоцита с антигеном, к которому у него имеется рецептор, он превращается в лимфобласт, затем пролиферирует, образуя клон лимфоцитов с одинаковыми рецепторами.

Ядро средних лимфоцитов плотно заполнено глыбками хроматина. Их цитоплазма более объёмная, нередко образует перинуклеарные участки просветления, содержит свободные рибосомы, митохондрии, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. Функционально средние, а также большие лимфоциты, как правило, являются В-лимфоцитами. Под действием антигенов они дифференцируются в плазматические клетки, вырабатывающие специфические антитела [Васильев Ю.Г. с соавт., 2015].

Большие лимфоциты имеют крупное и относительно рыхлое ядро. Цитоплазма объёмная светло-голубого цвета, в ней немного лизосом и митохондрий, рудиментарный комплекс Гольджи, минимум эндоплазматической сети и сравнительно большое количество свободных рибосом. Клетка образует микроворсинки, более многочисленные у В-лимфоцитов [Карпуть И.М., 1986]

К большим лимфоцитам относят НК-клетки. Они содержат красновато-фиолетовые гранулы, содержащие перфорин, обладающий цитолитическими свойствами. НК-клетки функционально являются киллерами, они обеспечивают защиту организма от чужеродных клеток или измененных генетически клеток собственного организма, способны уничтожать трансформированные опухолевые и клетки, инфицированные вирусами [Ройт А. с соавт., 2000; Cotter P.F., 2015].

По продолжительности жизни лимфоциты подразделяются на: короткоживущие (недели, месяцы), к ним относятся преимущественно В-

лимфоциты, и долгоживущие (месяцы, годы), преимущественно Т-лимфоциты и клетки иммунной памяти [Ярилин А.А., 2010].

У птиц раннего возраста лимфоциты составляют 40-44% [Селянский В.М., 1980; Болотников И.А., Соловьев Ю.В., 1980]. Однако у взрослой птицы относительное содержание лимфоцитов увеличивается до 60-68% [Донкова Н.В., 2004; Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2013; Турицына Е.Г., Климова Е.А., 2014; Jones M.P., 2015; Суханова С.Ф., 2017]. Имеются данные о содержании лимфоцитов в крови разных видов домашней птицы: у кур – 56-60%, индеек – 45-47%, гусей – 45-50%, уток – 45-47% [Вракин В.Ф., Сидорова М.В., 1984].

*Моноциты* являются самыми крупными лейкоцитами и достигают 14-17 мкм в диаметре. Клетки неправильной округлой формы, их ядра слабо сегментированные, синевато-фиолетового цвета, овальные, бобовидные или лопастные. Хроматин ядра менее конденсирован, чем в лимфоцитах. При ультраструктурном исследовании в ядре обнаруживаются один-два ядрышка [Mitchell E.V., Johns J., 2008]. Цитоплазма голубовато-серого цвета занимает большую часть клетки, часто вакуолизирована и содержит мелкие азурофильные гранулы, являющиеся лизосомами. Она способна формировать псевдоподии, благодаря чему клетки мигрируют через эндотелий капилляров или мелких венул в рыхлую соединительную ткань. В цитоплазме имеется хорошо развитый аппарат Гольджи, небольшое количество свободных рибосом и полирибосом, гранулярный эндоплазматический ретикулум и отдельные митохондрии.

Моноциты являются основными клетками, участвующими в неспецифической защите организма [Ройт А.А. с соавт., 2000; Sun S.F. et al., 2008]. Они находятся в крови около трёх дней, затем мигрируют в соединительные ткани и становятся макрофагами, обладающими ярко выраженной способностью к фагоцитозу [Guimarães M.C.C. et al., 2011]. Известно, что моноциты у разных видов и кроссов птиц обладают разным уровнем функциональной активности, что влияет на уровень специфических антител в крови птиц [Sun S.F. et al., 2008; Ma H. et al., 2010]. В норме на долю моноцитов приходится у кур 2-7%, индеек 1-2%, а у гусей 5-8% от общего

содержания лейкоцитов [Вракин В.Ф., Сидорова М.В., 1984; Донкова Н.В., 2004; Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2013; Васильев Ю.Г. с соавт., 2015].

*Тромбоциты* птиц участвуют в свертывании крови [Вракин В.Ф., Сидорова М.Ф., 1984; Huang H.S. et al., 2016]. Они образуются из тромбобластов в красном костном мозге. Это овальные ядерные клетки напоминают незрелые эритроциты, что затрудняет их дифференцировку [Mitchell E.V., Johns J., 2008]. Ядро округлое или овальное, с крупными глыбками хроматина, красно-фиолетового цвета. Цитоплазма полупрозрачная, голубоватая с небольшим содержанием мелкой красно-фиолетовой зернистости и вакуолей, наличие которых помогает отличить тромбоциты от молодых форм эритроцитов [Clark Ph. et al., 2009; Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010].

В мазках крови тромбоциты лежат группами из 3-10 клеток. При кровотечении они скапливаются по краям раны, увеличиваются в объеме, склеиваются друг с другом, а затем разрушаются. При этом освобождается тромбокиназа, которая вместе с тромбопластином и ионами кальция образуют в плазме крови тромбин, который переводит фибриноген плазмы в фибрин. Тромбоциты вместе с фибрином образуют густую сеть, в которой осаждаются другие клетки крови и белки плазмы. Образуется тромб, закрывающий разрыв стенки сосуда. Тромбоциты разных видов птиц, помимо участия в свертывании крови, осуществляют фагоцитарную функцию в кровеносном русле. Они обезвреживают бактерии, вирусы, чужеродные белки [Ferdous F., Scott T.R., 2015].

Существуют видовые отличия в содержании тромбоцитов у разных видов птицы: у кур –  $32-100 \times 10^9/\text{л}$ , гусей –  $50-200 \times 10^9/\text{л}$ , уток –  $70-120 \times 10^9/\text{л}$  [Селянский В.М., 1980]. У кур они имеют веретенообразную форму, размер составляет 5,5-8,5 мкм, у гусей – 4,4-6,7 мкм, у индеек тромбоциты удлиненные.

Таким образом, в научной литературе имеются сведения о морфологических и физиологических особенностях клеток крови сельскохозяйственных птиц при различных функциональных состояниях, при применении разнообразных кормовых добавок и лекарственных препаратов, широко распространенных в птицеводстве. Однако отсутствуют данные по морфофизиологии крови

современных высокопродуктивных кроссов кур и перепелов, которые могли бы использоваться в качестве референтных значений в практической ветеринарии и при проведении разного рода научных исследований.

## **1.2 Методы оценки функционального состояния клеток крови**

Количество и морфология клеток крови, а также их функциональная характеристика отражают общее состояние организма животных. Существуют количественные, морфологические, цитохимические, биофизические, иммунологические и другие методы исследования клеток крови, позволяющие в полной мере оценить их структурно-функциональные особенности [Тэмл Х., 2010; Новикова И.А., Ходулева С.А., 2013].

*Количественные методы исследования.* Количество клеток крови определяется с помощью различных методов, в том числе с помощью счетных камер Горяева, в мазках крови, с помощью автоматических устройств. Во всех случаях результаты представляются в виде количества клеток в единице объема крови. По международной системе единиц (СИ) число форменных элементов в крови выражают в расчете на один литр.

Наиболее распространенным методом является подсчет клеток с помощью счетных камер [Садовников Н.В. с соавт., 2009; Новикова И.А., Ходулева С.А., 2013]. Форменные элементы крови считаются по одному и тому же принципу, различие заключается в применении различных по составу разбавителей и степени разведения крови. Для подсчета лейкоцитов птиц непригодны методы, которые используют для определения содержания лейкоцитов у млекопитающих, так как ядерные эритроциты и тромбоциты птиц не подвергаются гемолизу при добавлении 3% уксусной кислоты. В качестве разбавителей используют растворы красителей разного состава [Карпуть И.М., 1986]. Метод определения количества форменных элементов крови в счетных камерах достаточно трудоёмок, однако он не требует дефицитных реактивов и сложного оборудования и может применяться в любых условиях.

Работа автоматических счетчиков и гематологических анализаторов основана на использовании фотометрических или кондуктометрических принципов. Клетки крови либо изменяют сопротивление между электродами капилляра, по которому протекает разбавленная кровь, либо перекрывают световой луч сканирующего микроскопа, при этом возникает импульс, который регистрируется счетным устройством [Васильев Ю.Г. с соавт., 2015].

В настоящее время гематологические анализаторы различных модификаций широко используются в практической ветеринарии и научных исследованиях у лабораторных, мелких домашних и продуктивных животных [Веснина Ж.В. с соавт., 2009; Ермолина С.А. с соавт., 2009; Науменко П.А. с соавт., 2013; Миколенко О.Н., Ватников Ю.А., 2015; Bílková V. et al., 2017].

*Исследование морфологии клеток крови.* Идентифицировать основные структуры клеток и выявить их морфологические отличия можно на окрашенных мазках крови. Гематологические красители делятся на кислые, основные и нейтральные. Щелочные структуры клеток окрашиваются кислыми красителями, кислые компоненты – щелочными красителями. Нейтральные элементы взаимодействуют как с кислыми, так и со щелочными красителями. Цитоплазма одних клеток, будучи щелочной, взаимодействует с кислыми красителями, выявляя оксифильные элементы. Цитоплазма других клеток, содержащих базофильные и нейтрофильные субстанции, поглощает и кислые, и основные красители. Ядра, содержащие нуклеиновую кислоту, связывают основные красители.

Главными гематологическими красителями является метиленовый синий и его производные, такие как азур I (метилен-азур) и азур II (смесь азур I и метиленового синего), к кислым – водорастворимый эозин. Наиболее распространенным методом окраски мазков крови является окраска азур-эозиновой смесью по Романовскому-Гимза, либо его модификацией по Нохту. Эти способы окраски требуют предварительную фиксацию мазков метанолом. Более удобна окраска мазков растворами Май-Грюнвальда или Лейшмана, в состав которых уже входит метанол [Карпуть И.М., 1986].

Хороших результатов даёт окраска мазков комбинированными методами, сочетающими использование фиксирующих растворов и азур-эозиновой окраски (окраска по Паппенгейму). Она позволяет дифференцировать все основные структуры клеток – ядра, цитоплазму и зернистость [Садовников Н.В. с соавт., 2009; Новикова И.А., Ходулева С.А., 2013].

Наибольшее диагностическое значение имеет определение процентного соотношения разных видов лейкоцитов, называемое лейкоцитарная формула или лейкограмма и определяемое в окрашенном мазке крови под микроскопом.

*Исследование функционального состояния лейкоцитов крови.* Среди широкого спектра проявлений функциональной активности лейкоцитов различают кислородзависимые и кислороднезависимые процессы.

Кислородзависимый метаболизм представляет уникальную систему немитохондриального клеточного дыхания, которое резко возрастает в процессе активации клетки и называется «респираторным взрывом». Индукция респираторного взрыва сопровождается повышенным потреблением кислорода и глюкозы, а также ростом генерации свободных радикалов кислорода, таких как супероксид анион, пероксид водорода, гидроксил радикал и синглетный кислород [Маянский Д.Н., 2008; Merrill G.A. et al., 2001]. Активные формы кислорода являются основой антимикробного потенциала нейтрофилов и активно регулируют тканевой метаболизм [Долгушин И.И., Бухарин О.В., 2001]. Исследования кислородзависимого метаболизма нейтрофилов при бактериальных и вирусных инфекциях, сердечно-сосудистых заболеваниях, коллагенозах, панкреатите и других патологиях имеют большое диагностическое значение [Бахов Н.И. с соавт., 2000; Cadroy Y. et al., 2000; Kim C., Dinauer M.C., 2001].

Для оценки кислородзависимого метаболизма лейкоцитов используют тест с нитросиним тетразолием и хемилюминесцентный анализ. Состояние кислороднезависимых процессов в лейкоцитах определяют по содержанию лизосомально-катионных белков и миелопероксидазы.

*Тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест)* – является одним из наиболее объективных методов исследования кислородзависимого метаболизма

нейтрофилов. Он основан на способности зернистых лейкоцитов фагоцитировать бесцветный нитросиний тетразолий и затем восстанавливать его с помощью НАДН- и НАДФН-оксидаз в нерастворимые темно-синие гранулы формазана [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983; Вагнер В.К. с соавт., 1989].

Существует два способа проведения данного теста. Первый способ основан на спектрофотометрическом определении количества формазана, экстрагированного органическим растворителем диоксаном из крови, инкубированной с нитросиним тетразолием [Зинкин В.Ю., 2004]. Второй метод – цитохимическая оценка, основанная на определении тёмно-фиолетовых гранул формазана в цитоплазме нейтрофилов [Pack В.Н. et al., 1968]. Модификацию в проведение НСТ-теста у животных внесли Ю.И. Пацула и В.С. Власенко (2009). Результаты теста оценивают по спонтанному и стимулированному различным препаратами восстановлению. Повышение показателей НСТ-теста свидетельствует об активации функциональной активности нейтрофилов.

В ветеринарии НСТ-тест применяется для оценки метаболической активности лейкоцитов крови здоровых и больных животных [Сычева М.В. с соавт., 2005; Власенко В.С. с соавт., 2012; Власенко В.С. с соавт., 2014]. Нередко НСТ-тест используется для оценки влияния различных лекарственных препаратов на функциональное состояние нейтрофилов крови [Узбекова С.Е. с соавт., 2013].

*Лизосомально-катионный тест* характеризует степень активности кислороднезависимых антимикробных систем фагоцита и основан на избирательном окрашивании лизосомально-катионных белков красителем зеленым прочным. Количество окрашенных зёрен и интенсивность их окраски соответствует содержанию катионных белков в клетке [Мазинг Ю.А., Старосельская И.Я., 1981; Пигаревский В.Е., Мазинг Ю.А., 1987; De Guise S. et al., 1995]. Катионные белки – модификаторы дыхательных и ферментативных процессов в лизосомах нейтрофилов и эозинофилов [Нагоев Б.С., 1982; Кокряков Н.В., 1990]. Лизосомально-катионный тест относится к цитохимическим реакциям и оценивается полуколичественно по методу Астальди-Верга, либо с помощью проточной цитометрии.

Имеются работы, посвященные изучению лизосомально-катионных белков у крыс [Хидирова Л.Д., Маянская Н.Н., 2012; Зарубина И.В. и др., 2016], морских млекопитающих [Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н., 2013], рыб [Вихман А.А., Таразевич Е.В., 1992; Пронина Г.И., 2008; Docan A., et al. 2010]; птиц [Коровин Р.Н. с соавт., 1989; Болотников И.А., Конопатов, 1993; Бессарабов Б.Ф., 2009; Турицына Е.Г., 2009]. Значительное содержание катионных белков оценивается положительно при воспалениях и свидетельствует о высокой бактерицидной активности фагоцитирующих клеток [Колабская Л.С., 1982; Кокряков В.Н., 1990; Бессарабов Б.Ф., 2009; Egami M.I, Sasso W.S., 1991].

*Определение миелопероксидазы.* Миелопероксидаза – фермент, содержащийся в лизосомах лейкоцитов, особенно нейтрофилов и участвующий в реакциях разрушения перекиси водорода, образующейся в процессе кислородного метаболизма. С участием миелопероксидазы и в присутствии ионов хлора образуется гипохлорит-анион, обладающий мощным бактерицидным действием [Бахов Н.И. с соавт., 2000; Муравьев Р.А. соавт., 2002; Маянский Д.Н., 2008]. Активность миелопероксидазы определяют в цитохимических реакциях при окислении хромогенов (бензидина, о-дианизидина, орто-толуола) по методу Грэхема–Кнолля или его модификаций [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983]. В цитоплазме клеток образуются гранулы золотисто-коричневого цвета. Реакция оценивается полуколичественно по среднему цитохимическому коэффициенту.

Метод определения миелопероксидазы используют для оценки функциональной активности лейкоцитов крови разных видов животных, в том числе морских млекопитающих [De Guise S. et al., 1995; Frouin H. et al., 2010; Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н., 2013] и крыс [Алёхин Е.К. и др., 2012]. В ряде работ показано отсутствие или низкое содержание миелопероксидазы в лейкоцитах крови птиц [Dri P. et al. 1978; Merrill G.A. et al., 2001]. Положительную реакцию на миелопероксидазу у птиц дают гранулы эозинофилов [Турицына Е.Г., 2009]. Однако, по данным Egami M.I., Sasso W.S. (1991), пероксидаза, выделенная из этих клеток, отличается от миелопероксидазы нейтрофилов по своим хроматографическим, спектральным и иммунологическим свойствам.



При воспалительных процессах уровень миелопероксидазы повышается, что ведёт к выбросу значительных объёмов гипохлорита и повреждению тканей. По мнению М.Н. Берлова и др. (2009) показатели уровня фермента являются одними из наиболее точных диагностических параметров риска развития патологий.

*Фагоцитарная активность лейкоцитов* – это способность фагоцитов захватывать и переваривать чужеродные микроорганизмы, попавшие в организм, и поврежденные клетки. При определении фагоцитарной активности к крови добавляют взвесь микроорганизмов, инкубируют полученный состав в термостате, затем раствор центрифугируют и из слоя лейкоцитов готовят мазки, которые исследуют после окраски по Романовскому-Гимза.

Фагоцитарная активность лейкоцитов выражается процентом активных лейкоцитов (фагоцитов) в общем числе подсчитанных лейкоцитов (фагоцитарный индекс), средним числом фагоцитированных микробов, приходящихся на один активный лейкоцит (фагоцитарное число) и показателями завершенности фагоцитоза, то есть число убитых бактерий в фагоцитах на общее число поглощенных бактерий. Исследование фагоцитарной активности лейкоцитов крови не только позволяет определить функциональное состояние клеток, но и оценить уровень неспецифического иммунитета организма [Ширшев С.В. с соавт., 2014; Коленчукова О.А., Сарматова Н.И., 2017].

В зависимости от задач и целей исследований используют любой из видов живых или убитых микроорганизмов, таких как культура микобактерий [Трубкин А.И. с соавт., 2011; Ерохин В.В. с соавт., 2012], золотистого стафилококка [Майорова О.В., Молянова Г.В., 2013], кишечной палочки [Ширшев С.В. с соавт., 2014] и др. Кроме того, стимуляцию фагоцитарной активности можно проводить с помощью частиц латекса [Макарская Г.В. с соавт., 2003; Чернявских С.Д. с соавт., 2011; Турицына Е.Г. с соавт., 2011]; зимозана [Сычева М.В. и др., 2005; Дюсенова Г.М., 2006]; кристаллов кварца [Садовников Н.В., 2002].

Анализируя вышеописанные методы изучения клеток крови, следует отметить, что многие из них являются достаточно трудоёмкими, требуют высокой квалификации специалистов и отличаются определённой субъективностью в

интерпретации полученных результатов. Поэтому поиск высокотехнологичных и объективных методов оценки морфофункционального состояния клеток крови, в частности у сельскохозяйственной птицы, является актуальным.

### **1.3 Хемилюминесцентный анализ в ветеринарной медицине**

Хемилюминесцентный анализ относится к биофизическим методам исследования, он позволяет определить функциональное состояние клеток на молекулярном уровне по интенсивности течения свободнорадикальных процессов [Хабибуллин Р.Р., Федосов А.В., 2006; Маянский А.Н., 2007]. Способностью генерировать активные формы кислорода обладают многие клетки, однако наиболее интенсивно они образуются в клетках, способных к фагоцитозу – зернистых лейкоцитах (гранулоцитах) и моноцитах крови, эндотелиальных клетках, тканевых макрофагах [Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2007]. Фагоциты индуцируют «респираторный взрыв» при контакте с чужеродными частицами или микроорганизмами. Этот процесс направлен на уничтожение микроба и его дальнейшее внутриклеточное переваривание.

Хемилюминесценция – это свечение, возникающее в процессе химической реакции, в ходе которой образуются вещества в электронно-возбуждённом виде. В них электрон поднимается на верхний энергетический уровень. Когда электрон возвращается в основное положение происходит эмиссия (свечение) фотонов. В качестве усилителей собственного свечения используют хемилюминесцентные зонды – соединения, вступающие в реакцию с активными формами кислорода [Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009]. В настоящее время в этом качестве используют родамин G, люминол, люцигенин и другие вещества, позволяющие в тысячи раз увеличивать интенсивность свечения.

Люминол (3-аминофталевый гидразид) обладает слабой избирательной способностью и вступает в реакции с большинством активных форм кислорода, преимущественно вторичных, таких как гипохлорит, гидроксильный радикал, липидные и третичные радикалы. Люцигенин (бис-N-метилакридиний)

характеризуется высокой избирательностью и реагирует с первичными радикалами, прежде всего с супероксиданионом [Faulker K., Fiodorovich I. 1993].

Существуют видовые особенности кислородного метаболизма у разных видов животных. От этого зависит выбор хемилюминесцентного зонда [Papp Z., Smits J.E.G., 2007]. У лошадей, крупного рогатого скота, лабораторных животных в спектре образования активных форм кислорода преобладают вторичные радикалы, которые выявляются посредством люминола [Дюсенова Г.М., 2006; Ерёмина И.Ю. и др., 2010; Богатов М.А., 2011]. В то же время у птиц продукция первичных люцигенинзависимых радикалов в несколько раз превышает образование вторичных люминолзависимых кислородных радикалов [Макарская Г.В. и др., 2011; Dri P. et al., 1978; Van Neron A. et al., 1997; Chadfield M., Olsen J., 2001; Papp Z., Smits J.E.G., 2007].

Ю.А. Владимиров и Е.В. Проскурнина (2007) считают, что «...изучение хемилюминесценции клеток в состоянии покоя не позволяет в полной мере оценить функциональные возможности фагоцитов». В связи с этим клетки стимулируют различными веществами. Активаторами хемилюминесценции могут быть частицы, вызывающие фагоцитоз (латекс, зимозан, кристаллы кварца), химические вещества (двухвалентное железо), микроорганизмы, а также физические факторы, такие как облучение, высокие и низкие температуры [Садовников Н.В., 2002; Дюсенова Г.М., 2006; Кривохижина Л.В. и др., 2013; Макарская Г.В. и др., 2011; Богатов М.А., 2011; Погорелова Н.А. и др., 2013; Турицына Е.Г. и др., 2013; Desmidt M. et al., 1996; Van Neron A. et al., 1997; Chadfield M., Olsen J., 2001].

Основы хемилюминесцентного анализа клеток крови отражены в работах ряда авторов [Земсков В.М., Барсуков А.А., 1988; Tono-Oka et al, 1983; Conlon P. et al., 1991]. Объектами исследования в ветеринарии могут быть птицы, рыбы, сельскохозяйственные и лабораторные животные. Так, И.Ю. Ерёмина с соавт. (2010) исследовала возрастную хемилюминесценцию клеток крови быков-спермодоноров; Г.М. Дюсенова (2006) использовала хемилюминесцентный анализ для прижизненной диагностики туберкулеза у коров и телят; М.А. Богатов (2011) изучал параметры хемилюминесценции клеток у лабораторных крыс; в работе Г.В.

Макарской с соавторами (2011) описана кинетика хемилюминесценции клеток крови кур в постнатальном онтогенезе; особенности респираторного взрыва в нейтрофилах лошадей представлены в исследовании P.C. Braga et al. (2015).

Изучение свободнорадикальных процессов в хемилюминесцентной реакции невозможно без специальных приборов – фотоэлектронных умножителей, позволяющих регистрировать излучение фотонов. В настоящее время в биологии и медицине используют разнообразные фотоэлектронные умножители – одно-, двух-, шести-, 12- и 36-ти канальные, совмещенные с компьютером. Продолжительность хемилюминесцентной реакции колеблется от нескольких минут до двух-трёх часов. Например, Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина (2007, 2009) рекомендуют фиксировать результаты реакции в течение 30 минут, но большинство авторов регистрируют суммарное количество импульсов на протяжении 90 минут [Дюсенова Г.М., 2006; Макарская Г.В. и др., 2011; Турицына Е.Г. и др., 2013]. В исследованиях И.Ю. Ерёмовой с соавт. (2010) кинетика хемилюминесценции клеток крови быков отмечалась 180 минут.

При хемилюминесцентном анализе температура в регистрационной камере зависит от биологического объекта и температуры его тела. Хемилюминесцентный анализ биологического материала от лошадей, крупного рогатого скота и лабораторных животных проводится при температуре 37°C [Ерёмина И.Ю. и др., 2010; Погорелова Н.А. и др., 2013], а при изучении крови кур применяется температура 42°C, соответствующая температуре тела клинически здоровой птицы [Макарская Г.В. и др., 2011; Турицына Е.Г. и др., 2013].

М.У. Magrisso et al. (2000) установили, что процессы, происходящие при хемилюминесценции можно распределить на три компоненты – это процессы, происходящие вблизи плазмолеммы и связанные с внеклеточной продукцией радикалов при фагоцитозе; внутриклеточные процессы, обусловленные фагоцитозом; внутриклеточная продукция радикалов не связанная с фагоцитозом.

Таким образом, использование в ветеринарии хемилюминесцентного анализа, позволяющего на молекулярном уровне определить состояние метаболических процессов в клетках, способно помочь специалистам оценить

эффективность проведения лечебных и профилактических мероприятий, особенно при решении вопроса о целесообразности назначения тех или иных лекарственных препаратов, пробиотиков и витаминов, обладающих прооксидантными или антиоксидантными свойствами.

#### **1.4 Влияние экстремальных факторов на морфологию и функцию клеток крови животных**

Под влиянием экстремальных факторов различного генеза в организме животных и птиц развиваются процессы, при которых изменяются количественные показатели, морфология и функция клеток крови. Такие изменения носят разнонаправленный характер и зависят от этиологического фактора, длительности и интенсивного его воздействия. Изменения показателей крови наблюдают при вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваниях, нарушениях обмена веществ, стрессах, воспалительных и дистрофических процессах. Увеличение абсолютного количества тех или иных клеток крови называется эритроцитоз, лейкоцитоз или тромбоцитоз, а их снижение – эритропения, лейкопения или тромбопения.

*Вирусные инфекции.* При вирусных заболеваниях наиболее часто регистрируют изменения количества лейкоцитов крови – сокращение (лейкопению) или рост абсолютного содержания (лейкоцитоз) [Алексеев Н.А., 2002]. Тотальное сокращение общего содержания лейкоцитов и лимфоцитов характерны для приобретенных иммунодефицитов животных, как правило, обусловленных различными вирусами [Бирман Б.Я., Громов И.Н., 2004; Рожина О.И., 2015]. Например, при развитии экспериментальной гриппозной инфекции у диких уток, вызванной вирусом гриппа подтипа H<sub>5</sub>, наблюдается лимфопения, которая ведёт к подавлению защитных механизмов и способствует репликации вируса в клетках организма [Абдуллазянова Э.Р. с соавт., 2013].

Метапневмовирусная инфекция птиц, по данным М.А. Волкова с соавт. (2015), влияет не только на количество активированных лейкоцитов в крови, но и на их популяцию. В течение первой недели после заражения в крови опытной

птицы в два-три раза сокращается количество Т-хелперов, что также рассматривается авторами, как показатель кратковременной иммуносупрессии.

Резкое повышение уровня лейкоцитов в крови животных наблюдается при гемобластозах. Так, Р.Ф. Галеев (2007), М.А. Староселов и Н.Ю. Басова (2008) наблюдали значительный рост количества лейкоцитов и лимфоцитов у коров, больных лейкозом, и снижение уровня нейтрофильных гранулоцитов. Данные результаты расценивались авторами как проявление иммунодефицитного состояния. Помимо этого, установлено негативное влияние вируса лейкоза крупного рогатого скота на морфологию клеток крови [Лютю А.А. с соавт., 2012].

Лейкопения и лимфоцитопения наблюдается при многих вирусных заболеваниях, в том числе парвовирусном энтерите у собак [Колесников П.В., 2014] и панлейкопении кошек [Рожина О.И., 2015]. В то же время при инфекционном гепатите и чуме мелких домашних животных отмечают анемию и лейкоцитоз. На морфологический состав крови влияют не только вирусные инфекции, но и иммунизации живыми вакцинами. Например, поствакцинальные лейкоцитозы и сдвиги в их популяции наблюдаются при вакцинации птиц против инфекционного ларинготрахеита, болезни Марека, ньюкаслской болезни и др. [Громов И.Н. с соавт., 2004; Валеева Л.А. с соавт., 2007; Турицына Е.Г., 2011].

*Бактериальные инфекции.* Развитие бактериальных болезней сопровождается значительными сдвигами в содержании и соотношении клеток крови. Так, при генерализованной форме стафилококковых инфекций развивается лейкоцитоз со сдвигом лейкограммы [Костылева О.А., 2005]. Гематологические показатели крови коров, больных субклиническим маститом и гнойным эндометритом, характеризуются высоким содержанием лейкоцитов, уменьшением количества палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, повышением уровня эозинофилов и моноцитов [Павленко О.Б., Сулейманов С.М., 2014].

Лейкоцитоз и нейтрофилия наблюдаются у цыплят и у поросят при желудочно-кишечных расстройствах, обусловленных грамтрицательными бактериями семейства *Enterobacteriaceae* [Мансурова Е.А., Ленченко Е.М., 2011].

При заболевании туберкулезом, по данным В.М. Селянского (1980), число лейкоцитов у кур достигает  $300 \times 10^9/\text{л}$ .

Инфекционные заболевания влияют на продукцию активных форм кислорода и изменяют течение свободнорадикальных процессов, что рассматривается рядом авторов, как ключевой момент в патогенезе инфекционного процесса [Шахов А.Г., 2004].

*Неинфекционные болезни.* Изменениями морфофункциональной характеристики клеток крови сопровождаются многие неинфекционные заболевания, в том числе травмы, что нередко используется в диагностических целях [Алексеев Н.А., 2002; Анников В.В., Якимчук Е.А., 2011]. При гепатозах у лактирующих коров снижается содержание эритроцитов и растёт уровень нейтрофилов и эозинофилов, что по мнению Мерзленко Р.А. с соавт. (2012), является следствием интоксикации организма. Снижение общего содержания лейкоцитов до  $13-20 \times 10^9/\text{л}$  установлено Е.И. Ермашкевич с соавт. (2016) у взрослых кур-несушек, больных субклиническим гепатозом, при этом уровень лимфоцитов увеличивается до 80-90%.

Воспалительные процессы сопровождаются лейкоцитозом, анемией, изменениями относительного содержания разных видов лейкоцитов, в том числе при поражении желудочно-кишечного тракта [Курятова Е.В., 2005; Концевова А.А., 2008], синдроме мастит-метрит-агалактия (ММА) у свиней [Горшков Г.И. с соавт., 2014], экспериментальной интоксикации у лабораторных животных [Ткаченко Е.А., Дерхо М.А., 2014], бронхопневмонии у телят [Жуков А.П. с соавт., 2016]. Кроме того, воспалительные процессы увеличивают продукцию кислородных радикалов клетками крови. При этом сокращение продукции радикалов свидетельствует о благоприятном исходе воспалительного процесса [Винник Ю.С. с соавт., 2004].

*Паразитарные заболевания.* Интенсивность и динамика изменений клеточного состава крови, особенно при хронически протекающих моноинвазиях и ассоциациях гельминтозов обусловлено как длительностью болезни, так и структурными изменениями клеток [Мазихова А.М. с соавт, 2009; Мкртчян М.Э., Мовсесян С.О., 2015]. При инвазиях (нематодозах, гетерокидозе, диктиокаулезе и

др.) наблюдают интоксикацию и аллергизацию организма – лейкоцитоз, повышение уровня палочкоядерных и снижение сегментоядерных клеток, рост содержания эозинофилов и базофилов [Дерхо М.А., Самойлова Е.С., 2011; Домосканов И.С., Акбаев М.Ш., 2011; Крайнов В.В., Лутфуллин М.Х., 2013; Дегтяревская Т.Ю., 2016; Prin L. et al., 1990; Baikench M.G., Magnaval G.I., 1993].

*Стрессовые состояния.* Стрессовые факторы различного происхождения оказывают значительное влияние на морфологию и функцию клеток крови [Мифтахутдинов А.В., 2014; Донник И.М. с соавт., 2015; Фисинин В.И., Кавтарашвили А.Ш., 2015]. Установлено, что у разных пород и кроссов птиц устойчивость к стрессам различного генеза заметно отличается [Campo J.L. et al., 2008; Bílková V. et al., 2017]. Исследования влияния ионизирующего гамма-излучения на клетки крови цыплят-бройлеров показало резкий рост уровня лейкоцитов в крови облученной птицы с последующей лейкопенией. Кроме того, облучение приводит к увеличению численности юных нейтрофилов и снижению числа зрелых сегментоядерных клеток [Вишняков А.И., Уварова Е.А., 2013].

В работах А.Ю. Ковтуненко (2015) и Е.Ю. Беляевой с соавторами (2013) показано, что чередование различных режимов освещения, широко используемое в практике промышленного птицеводства, приводит к развитию хронического стресса и негативно отражается на таких параметрах клеток крови, как площадь поверхности клеток, их объём и упругость поверхностной мембраны.

Значительные сдвиги показателей крови наблюдаются при температурном и транспортном стрессах. По данным С.В. Надеждина с соавт. (2008), интенсивное тепловое воздействие сопровождается уменьшением числа циркулирующих лейкоцитов, лимфоцитозом и нейтропенией. Кроме того, тепловой стресс у птиц характеризуется развитием оксидативного стресса, который ведёт к дисбалансу между продукцией свободных радикалов и количеством антиоксидантов [Фисинин В.И., Кавтарашвили А.Ш., 2015]. Низкотемпературный стресс резко изменяет соотношение гетерофилов и лимфоцитов в крови птицы [Campo J.L. et al., 2008]. Этот показатель является инструментом оценки долгосрочного стресса у кур-несушек и цыплят-бройлеров [Терман А.А., 2012; Cotter P.F., 2015; Lentfer T.L. et al., 2015]. При стрессах



наблюдается выброс незрелых гетерофилов в кровь и миграция циркулирующих лимфоцитов из крови в ткани, что ведёт к росту отношения гетерофилов и лимфоцитов, сокращению уровня эозинофилов и моноцитов [Мифтахутдинов А.В., 2014; Maxwell M.H., Robertson G.M., 1998; Altan O. et al., 2000].

С.Ю. Харлап с соавт. (2015) установили, что стресс-реакция при моделированном транспортном стрессе у цыплят в раннем периоде характеризуется лейкоцитозом, сокращением уровня лимфоцитов и эозинофилов и ростом числа базофилов, моноцитов и сегментоядерных нейтрофилов. Однако через четыре часа после шуттелирования снижается содержание лейкоцитов, за счёт базофилов, сегментоядерных псевдоэозинофилов и моноцитов на фоне роста доли эозинофилов и лимфоцитов. Аналогичные результаты при вибрационном и транспортном стрессе у кур представлены в работах Л.К. Бусловской с соавт. (2009), А.В. Мифтахутдинова и А.И. Кузнецова (2012), А.А. Термана (2012).

Сокращение уровня лимфоцитов и появление атипичных клеток в крови при стрессовых состояниях, по мнению ряда авторов, обусловлено значительным выбросом кортикостероидов [Мифтахутдинов А.В., 2011; Фисинин В.И., Сурай П., 2012; Cotter P.F., 2015; Scanes C.G., 2016].

Таким образом, сведения об изменениях морфологических и функциональных показателей клеток крови современных кроссов сельскохозяйственной птицы, возникающих под влиянием возраста, физиологической нагрузки, а также различных по интенсивности, кратности и продолжительности воздействия экстремальных факторов, включая стрессы различного генеза и многократные вакцинации против вирусных и бактериальных заболеваний, носят не только общебиологический характер, но имеют большое значение при оценке морфофункционального состояния тканей и органов сельскохозяйственных птиц в условиях промышленного птицеводства.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы и методы исследования**

Исследования структурных и функциональных особенностей клеток крови и органов сельскохозяйственных птиц в возрастном аспекте и при экстремальных раздражениях различной этиологии проведены в течение 2012-2018 годов на кафедре анатомии, патологической анатомии и хирургии института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины Красноярского государственного аграрного университета и на базе международного научного центра исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Красноярского научного центра СО РАН. Работа выполнена в рамках госбюджетной научно-исследовательской тематики «Морфофункциональный статус животных и птиц на различных этапах онтогенеза и при воздействии лекарственных ксенобиотиков».

Исследования структурных и функциональных особенностей клеток крови и органов иммунной системы здоровых птиц проведены с учётом возраста и при влиянии экстремальных факторов (вакцинаций и температурных стрессов). Схема исследований представлена на рисунке 1.

Объектами исследований являлись клинически здоровые куры яичного кросса «Декалб» суточного, 30-, 60-, 100-, 240- и 560-суточного возраста, полученные из ОАО «Птицефабрика Заря» Красноярского края, а также японские перепела разного пола суточного, 14-, 30-, 60-, 90-, 120-, 180- и 240-суточного возраста, поступившие из парка флоры и фауны «Роев ручей», г. Красноярск. Материалом для исследований служила нефракционированная венозная кровь.

Исследование функционального состояния клеток органов иммуногенеза проведено на петушках суточного и трёхнедельного возраста породы «Хайсекс уайт». Материалом для исследований служила суспензия клеток костного мозга, клоакальной сумки и селезёнки.

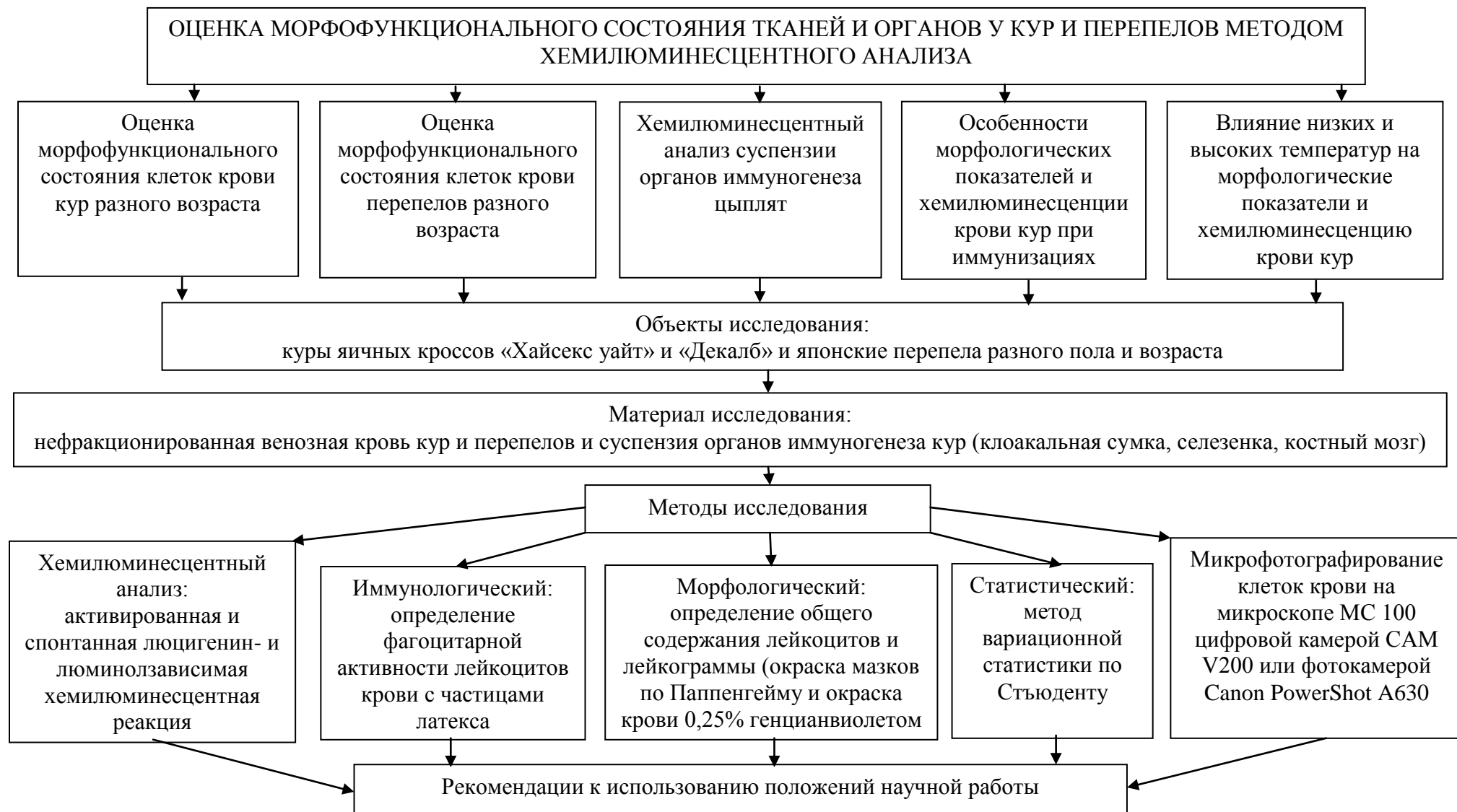


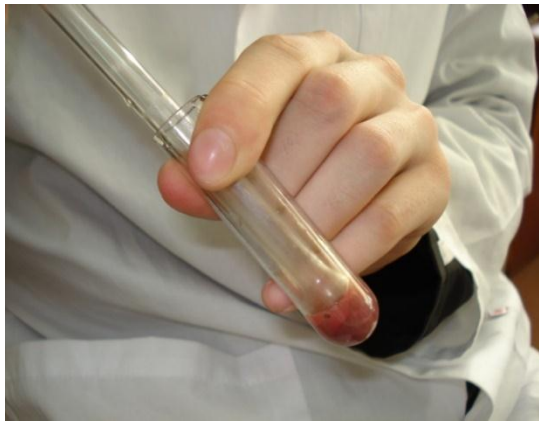
Рисунок 1 – Структура научных исследований

Для получения суспензии селезёнку и клоакальную сумку измельчали в гомогенизаторе с раствором Хенкса, фильтровали через капроновые фильтры и центрифугировали по 10 мин. со скоростью 3000 об./мин. трижды, каждый раз удаляя надосадочную жидкость. Костный мозг получали из большой берцовой кости, после удаления проксимального и дистального эпифизов, путем вымывания неокрашенным раствором Хенкса с помощью шприца.

После получения суспензий концентрацию клеток клоакальной сумки, селезёнки и костного мозга довели неокрашенным раствором Хенкса до шести млн./мл. Концентрацию клеток, требуемую для хемилюминесцентного анализа, контролировали в камере Горяева при объективе  $\times 40$ . Этапы приготовления суспензии органов иммуногенеза представлены на рисунке 2. Всего исследовано 24 образца органов, в том числе восемь образцов селезёнки, восемь – клоакальной сумки и восемь – костного мозга.

Влияние экстремальных воздействий на структуру и функции клеток крови птиц изучали при иммунизациях против вирусных и бактериальных инфекций и температурных стрессах (тепловых и холодových). Объектами исследований влияния вакцинаций на структурные и функциональные показатели клеток крови являлся молодняк кур яичных кроссов «Хайсекс уайт» и «Декалб», полученный из ОАО «Птицефабрика Заря» Красноярского края, привитый в разные сроки жизни в производственных условиях против инфекционной бурсальной болезни, или болезни Гамборо (БГ), инфекционного ринита (гемофилёза) птиц, инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ), против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и синдрома снижения яйценоскости (НБ+ИБК+ССЯ).

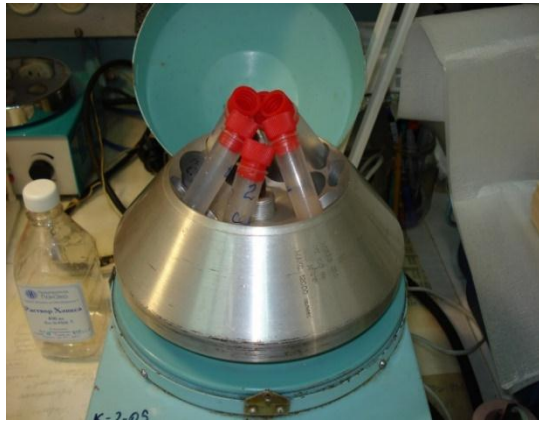
Вакцинация птицы против инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ), осуществлялась вакциной АВИВАК ИЛТ (Россия) путём выпаивания цыплятам породы «Хайсекс уайт» 28-суточного возраста. Кровь исследована через 48 и 96 часов после вакцинации.



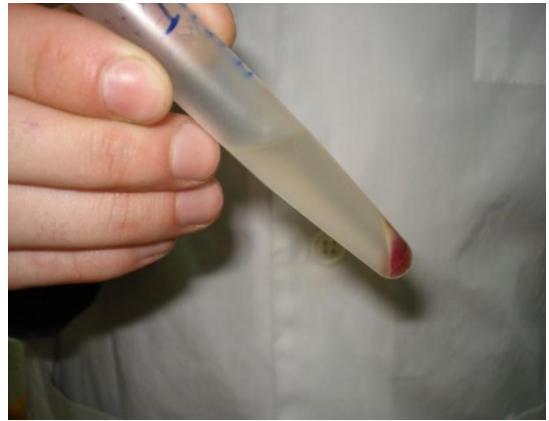
А



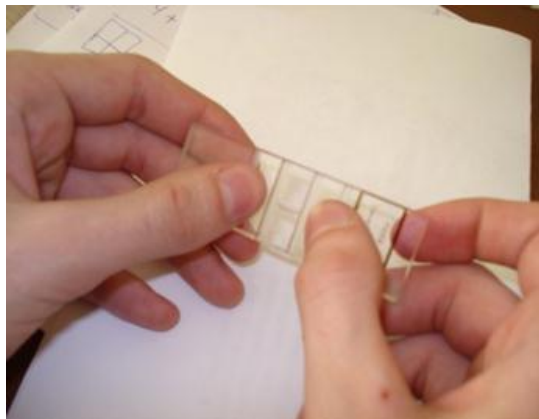
Б



В



Г



Д



Е

Рисунок 2 – Этапы подготовки суспензии селезёнки, клоакальной сумки и костного мозга для хемилюминесцентного анализа: А – гомогенизация органов с раствором Хенкса; Б – фильтрование гомогената через капроновый фильтр; В – центрифугирование 3000 об./ 10 мин. трижды; Г – удаление надосадочной жидкости; Д – определение концентрации суспензии клеток в камере Горяева; Е – окраска образцов клеток 0,25% раствором генцианвиолета для определения активности фагоцитов

Иммунизация 21-суточных цыплят кросса «Декалб» против болезни Гамборо проводилась методом выпаивания живой вакциной ТАБИК МВ (Tabic M.V., Израиль). Этот же молодняк в 55-суточном возрасте привит против инфекционного ринита (гемофилеза) птиц внутримышечно в грудные мышцы в дозе 0,5 мл инактивированной вакциной КОРИПРАВАК (CORIPRAVAC, Испания).

Куры кросса «Декалб» 100-суточного возраста привиты комбинированной инактивированной эмульгированной вирусвакциной AviPro 303 ND-IB-EDS (Россия) против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и синдрома снижения яйценоскости в область грудных мышц, внутримышечно в дозе 0,5 мл на голову. Кровь исследована до вакцинации, через один и 72 часа после прививки.

Исследование влияния низких и высоких температур на клетки крови проведено в двух группах клинически здоровых цыплят суточного возраста. В первой группе птица находилась в течение суток при температуре  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ , затем в течение суток при температуре  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Молодняк кур второй группы содержался сутки при температуре  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , а следующие 24 час. под инфракрасной лампой с постепенным нагревом до  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Контролем служили исходные показатели суточных цыплят. Исследование крови проведено до воздействия высоких и низких температур и через 24 час. и 48 час.

Материалом для всех морфофункциональных исследований служила цельная гепаринизированная кровь, полученная у цыплят раннего возраста из наружной яремной вены и из подкожной вены предплечья у птицы старшего возраста. Для предотвращения свертывания крови в качестве антикоагулянта использовали 1%-ный раствор гепарина (5000 ед. в 1 мл) в дозе 25-50 МЕ гепарина на 1 мл крови. Клеточный состав лейкоцитов изучен в мазках крови, окрашенных по Паппенгейму, с предварительной фиксацией мазков раствором Май-Грюнвальда в течение 3-5 мин. и докрашиванием краской Романовского-Гимза 20-30 мин. [Карпуть И.М., 1986]. Общее содержание лейкоцитов определено в камере Горяева в образцах крови, подкрашенных 0,25% раствором генцианового фиолетового на 3%-ном растворе уксусной кислоты для дифференциации ядерных клеток [Макарская Г.В. с соавт., 2011].

Оценка функционального состояния клеток крови осуществлялась по их фагоцитарной активности с частицами латекса и способности генерировать активные формы кислорода. Течение свободнорадикальных процессов в клетках крови изучено с помощью хемилюминесцентного анализа по методу Топо-Оке в модификации Макарской Г.В. с соавт. (2011) с использованием 36-канального фотоэлектронного умножителя «Хемилюминометр CL-3604» (Россия). Исследована хемилюминесценция клеток крови в состоянии покоя (спонтанная) и при стимуляции клеток *in vitro* частицами латекса (активированная).

Время записи хемилюминесцентной кривой составило 90 мин., температура в регистрационной камере находилась в пределах +42°C, что соответствовало температуре тела клинически здоровой птицы. В качестве хемилюминесцентных зондов, усиливающих хемилюминесценцию, использованы люцигенин и люминол, обладающие выраженной селективностью в отношении первичных (супероксиданион) и вторичных (гидроксил, гипохлорид, перекись водорода, пероксидный радикал) активных форм кислорода (таблица 1).

Таблица 1 – Выбор хемилюминесцентного зонда для выявления разных видов свободных кислородных радикалов

ХЛ-зонд	Кислородные радикалы	Вид кислородного радикала
люцигенин	Первичные	супероксиданион ( $\cdot\text{O}_2^-$ )
люминол	Вторичные	перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), гипохлорид анион ( $\text{HOCl}^-$ ), гидроксильный анион ( $\text{OH}^-$ ); пероксидный радикал ( $\text{HOO}^\cdot$ )

Антигенная стимуляция фагоцитов крови при хемилюминесцентной реакции осуществлена *in vitro* частицами монодисперсного латекса размером 2,3 мкм, полученными из научно-исследовательского института синтетического каучука (ФГУП «НИИСК», Санкт-Петербург). Латекс опсонизировали белками пуловой сыворотки крови взрослых кур. Сыворотку крови для опсонизации

латекса получали от 10-12 голов взрослой птицы из убойного цеха ОАО «Птицефабрика Заря» при плановом убое.

Из каждого образца крови готовили четыре пробирки с реакционной смесью (рисунок 3), в состав которой входила гепаринизированная кровь в объёме 100 мкл, разведённая неокрашенным раствором Хенкса в соотношении 1:1; 200 мкл раствора люцигенина ("Sigma-Aldrich", Switzerland)  $10^{-4}$  М на растворе Хенкса или люминола ("Sigma", USA) в концентрации  $2,2 \times 10^{-4}$  М при pH=7,4; 50 мкл взвеси частиц опсонизированного латекса в концентрации  $5 \times 10^8$  частиц/мл. По окончании реакции определяли фагоцитарную активность лейкоцитов в камере Горяева по проценту лейкоцитарных клеток с частицами латекса в цитоплазме.

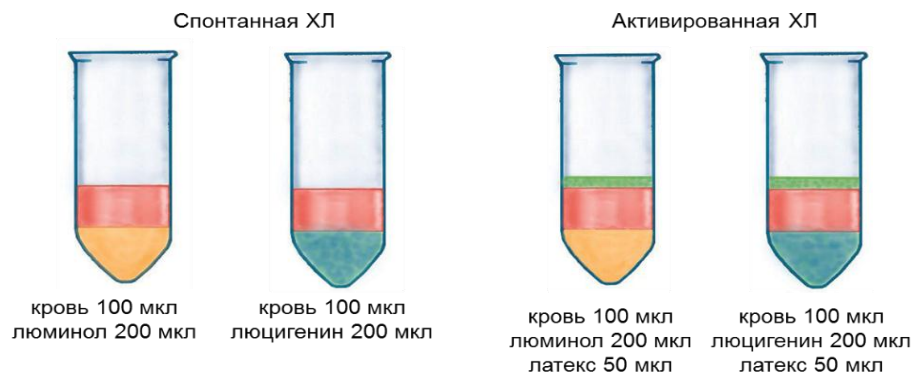


Рисунок 3 – Схема состава реакционной смеси для спонтанной и активированной хемилюминесцентной реакции

Определяли следующие показатели хемилюминесцентной реакции: амплитуду максимальной активности ( $I_{max}$ , имп./с); время достижения максимума хемилюминесценции ( $T_{max}$ , мин.); суммарное количество импульсов, зарегистрированное в течении ХЛ-реакции ( $S$ , имп. за 90 мин.); индекс активации, как соотношение суммарной продукции свободных радикалов при активированной и спонтанной хемилюминесценции ( $ИА = S_{акт.}/S_{спонт.}$ , усл. ед.). Используя данные по общему содержанию лейкоцитов, их фагоцитарной активности и степени разведения крови, рассчитывали удельную антигениндуцированную продукцию радикалов лейкоцитами и фагоцитами крови (имп./кл.).



Статистическая обработка полученного цифрового материала проведена методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента с помощью прикладных программ Microsoft Office Excel 2013. Различия параметров клеток крови считали достоверными при  $P \leq 0,05$ . Микроскопия и микрофотографирование проведены на микроскопе MC 100 (Micros, Austria) цифровой камерой CAM V200 (Vision, Austria) при увеличениях объектива 40 и 100. Сводные данные по количеству объектов исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сводные данные по количеству проведённых исследований

Метод исследования	Вид сельскохозяйственной птицы					Всего
	куры яичных кроссов «Декалб» и «Хайсекс уайт»				японский перепел	
	клетки крови в онтогенезе	после иммунизации	температурный фактор	органы иммуногенеза	клетки крови в онтогенезе	
Хемилюминесцентный анализ	96	100	48	24	46	314
Морфологический (общее содержание лейкоцитов, лейкограмма)	96	56	48	–	46	246
Иммунологический (фагоцитарная активность лейкоцитов)	96	100	48	–	46	290
Статистический	288	256	144	24	138	850

## 2.2 Результаты собственных исследований

### 2.2.1 Оценка морфофункционального состояния клеток крови кур разного возраста

Морфофункциональное состояние клеток крови кур разного возраста оценивали по особенностям морфологических показателей, таких как общее содержание лейкоцитов и их клеточный состав (лейкограмма), а функциональное состояние – методом хемилюминесцентного анализа по характеру течения свободнорадикальных процессов в клетках крови и их поглотительной фагоцитарной активности в отношении частиц латекса.

#### 2.2.1.1 Возрастные особенности морфологических показателей крови кур

*Общее содержание лейкоцитов.* Исследования крови клинически здоровой птицы показали незначительные возрастные изменения общего содержания лейкоцитов у кур кросса «Декалб». У суточных цыплят количество белых клеток крови колебалось от  $17,36 \times 10^9/\text{л}$  до  $24,92 \times 10^9/\text{л}$  и в среднем составило  $21,25 \pm 1,01 \times 10^9/\text{л}$ , что свидетельствовало об однородности поголовья, поступившего на выращивание из инкубационного цеха.

Спустя 30 суток жизни уровень лейкоцитов у молодняка кур снизился на 8% и составил  $19,58 \pm 0,97 \times 10^9/\text{л}$ . К концу второго месяца жизни количество клеток незначительно сократилось относительно предыдущего возрастного периода и на 19% отставало от показателей суточных цыплят ( $P \leq 0,05$ ). У птицы 100-суточного возраста зарегистрирован рост содержания лейкоцитов на 16% по сравнению с исходными данными. В разгар яйцекладки у кур 240-суточного возраста количество белых клеток крови снизилось до  $15,19 \pm 1,02 \times 10^9/\text{л}$  и сохранялось на этом уровне до конца наблюдений. У старой птицы перед убоем общее содержание лейкоцитов крови в среднем составило  $15,54 \pm 1,26 \times 10^9/\text{л}$ , что на 27% меньше исходных величин ( $P \leq 0,01$ ).

*Клеточный состав лейкоцитов.* Клеточный состав лейкоцитов кур имел возрастные отличия. Преобладающими клетками у суточных цыплят являлись псевдоэозинофильные гранулоциты, относительное содержание которых в среднем составило  $46,5 \pm 2,2\%$  от общего числа белых кровяных телец (рисунок 4). Через месяц произошло достоверное снижение их уровня до  $33,8 \pm 2,3\%$  ( $P \leq 0,01$ ), а к 60-м суткам относительное содержание этих клеток максимально сократилось до  $27,0 \pm 1,3\%$ , что на 42% ниже исходных величин ( $P \leq 0,001$ ). В разгар яйцекладки на 240-е сутки их содержание выросло до  $45,1 \pm 1,6\%$ , что на 67% выше показателей двухмесячной птицы ( $P \leq 0,001$ ). У кур в возрасте 560 суток относительный уровень псевдоэозинофильных гранулоцитов снизился до  $39,8 \pm 4,4\%$ .

Вторыми по численности клетками среди лейкоцитов являлись лимфоциты. Их относительное содержание у суточных цыплят составило  $44,5 \pm 2,5\%$ . На 30-е сутки показатели выросли на 29% относительно исходных данных ( $P \leq 0,01$ ), на 60-е сутки уровень лимфоцитов достиг  $63,5 \pm 1,4\%$ , увеличившись на 43% ( $P \leq 0,001$ ) по сравнению с исходными величинами. У 100 суточных кур уровень лимфоцитов достоверно снизился до  $50,9 \pm 1,6\%$  ( $P \leq 0,001$ ) относительно показателей двухмесячных кур. К 240-м суткам содержание лимфоцитов сократилось на 20% по сравнению с предыдущим возрастом и составило  $40,9 \pm 1,6\%$  ( $P \leq 0,001$ ), что оказалось самым низким значением на протяжении всего периода наблюдений. На 560-е сутки относительное количество лимфоцитов вернулось к исходным значениям.

Уровень базофильных гранулоцитов в течение первого месяца жизни птицы снизился с  $2,3 \pm 0,3\%$  до  $1,9 \pm 0,2\%$ . При этом у молодняка двухмесячного возраста отмечены минимальные показатели содержания базофилов, которые на 39% отставали от уровня суточных цыплят и составили  $1,4 \pm 0,2\%$  ( $P \leq 0,05$ ). С трёхмесячного возраста до конца наблюдений уровень базофилов незначительно колебался и на 560-е сутки составил  $1,9 \pm 0,2\%$  (рисунок 4).

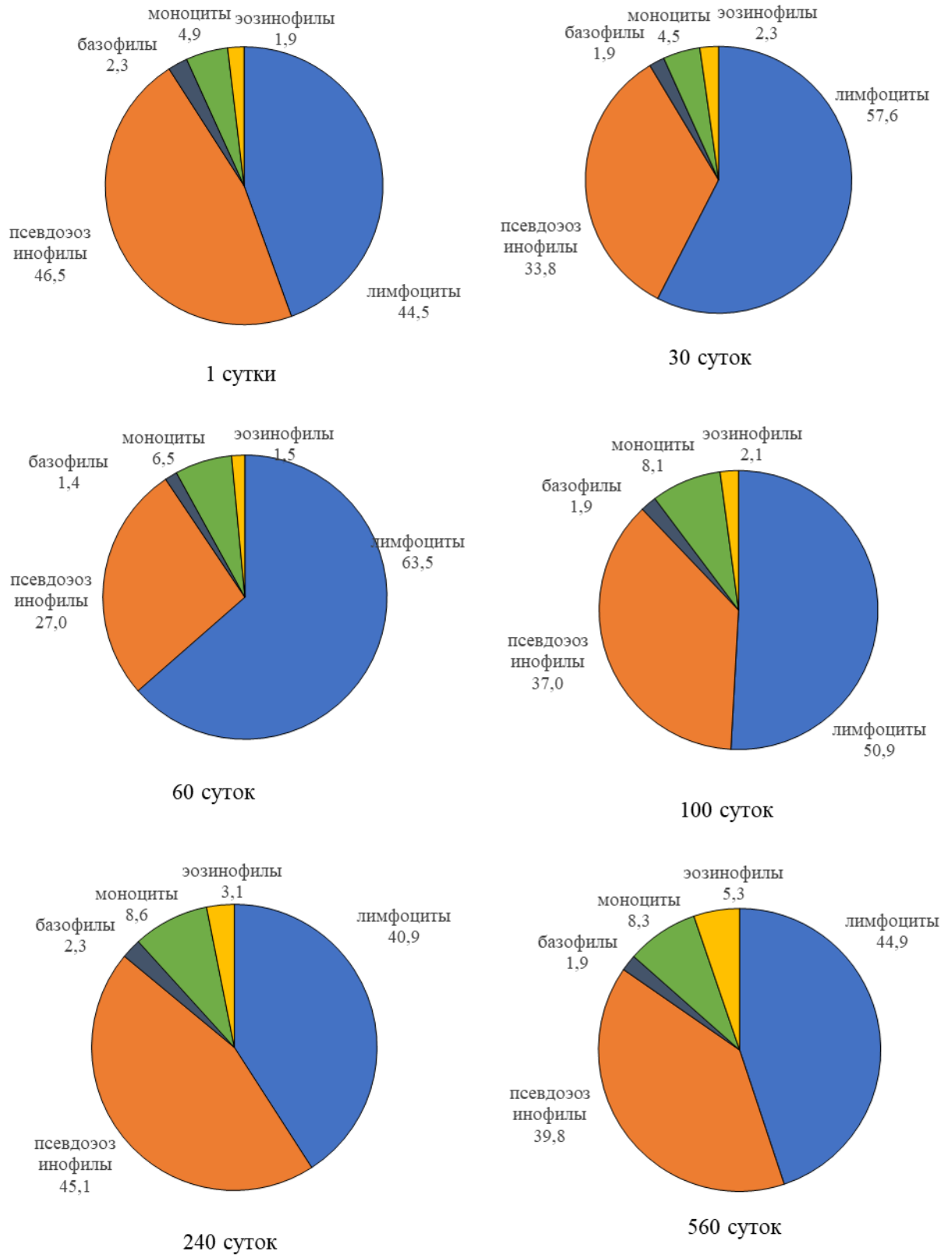


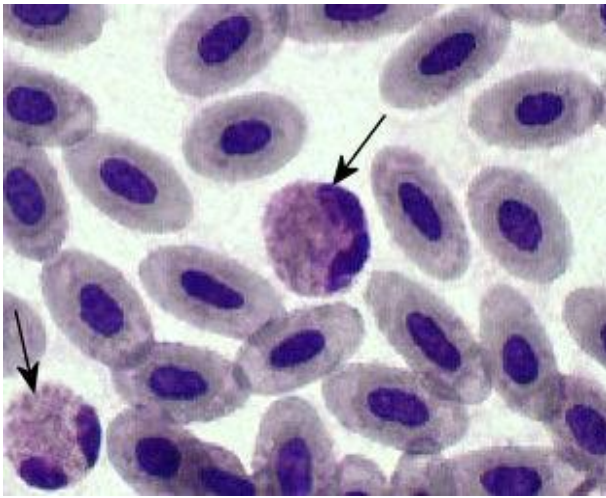
Рисунок 4 – Возрастные особенности клеточного состава лейкоцитов периферической крови кур, %

Содержание эозинофилов в период с первых по 30-е сутки увеличилось с  $1,9 \pm 0,3\%$  до  $2,3 \pm 0,3\%$ . На 60-е сутки отмечено снижение относительного количества этих клеток до  $1,5 \pm 0,2\%$  (рисунок 4). Начиная со 100-суточного возраста, содержание эозинофилов в крови молодняка кур стало расти и достигло максимальных величин к концу наблюдений. У взрослых кур 560-суточного возраста относительное содержание эозинофилов поднялось до  $5,3 \pm 0,6\%$ , что в 2,9 раза выше исходных величин ( $P \leq 0,001$ ).

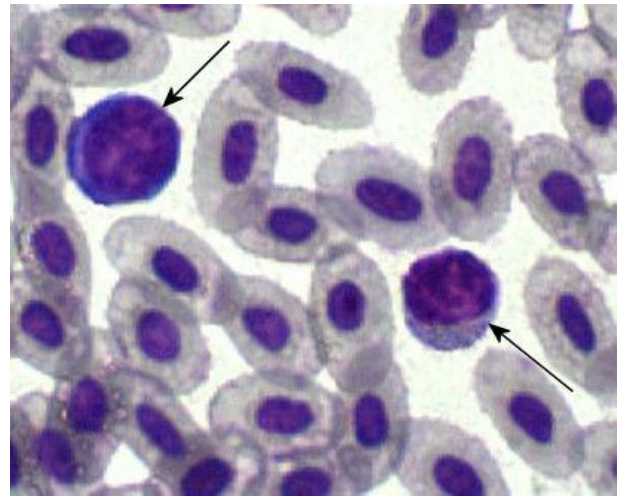
Относительное содержание моноцитов в течение первого месяца жизни находилось на уровне 4,5-4,9%. Ко второму месяцу их число выросло почти на 33% и составило  $6,5 \pm 0,8\%$  (рисунок 4). С третьего месяца жизни до убоя зарегистрированы максимальные показатели уровня моноцитов в крови кур – 8,1-8,6%, что в 1,6-1,8 раза выше исходных величин ( $P \leq 0,01$ ).

Морфологическая характеристика лейкоцитов крови представлена на рисунке 5. Псевдоэозинофилы характеризовались округлой формой, сегментированным ядром и зернистостью цитоплазмы. Отчётливо видны зёрна двух видов – красновато-коричневые удлинённые веретёновидные с заострёнными концами и мелкие круглые гранулы. Лимфоциты содержали крупное округлое или овальное ядро, плотно заполненное грубыми глыбками хроматина. Их цитоплазма узкая, интенсивно синего или фиолетового цвета. У моноцитов форма ядра чаще всего бобовидная, цитоплазма объёмная, серовато-синего цвета с многочисленными вакуолями. Эозинофилы морфологически характеризовались голубоватой цитоплазмой, равномерно заполненной округлыми красноватыми гранулами. Ядро клеток, как правило, состояло из двух сегментов, перемычка между которыми незаметна из-за обилия гранул в цитоплазме. Тромбоциты овальной формы, с полупрозрачной голубоватой цитоплазмой, содержащей незначительное количество мелких красноватых гранул и вакуолей. Ядро овальное, тёмно-фиолетового цвета, плотно заполнено хроматином (рисунок 5). Базофилы встречались на мазках крови достаточно редко и характеризовались

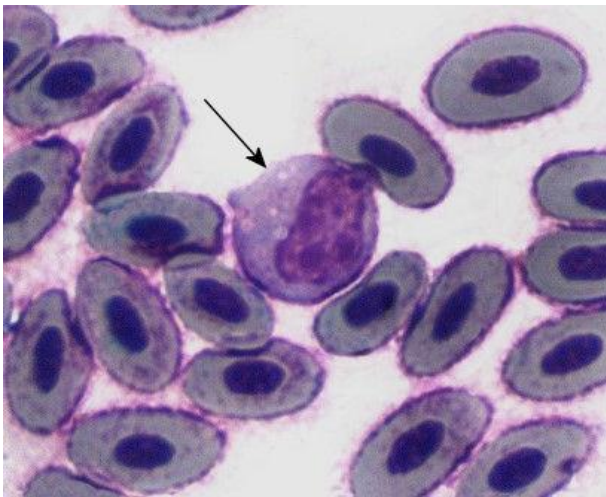
наличием крупных фиолетовых гранул, полностью заполняющих цитоплазму, вследствие чего контуры ядра практически не просматривались.



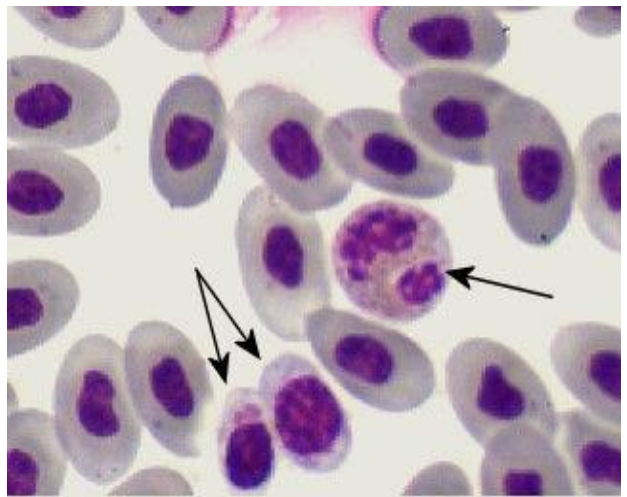
А



Б



В



Г

Рисунок 5 – Клетки крови кур: псевдоэозинофилы (А), лимфоциты (Б), моноцит (В), эозинофил и два тромбоцита (Г) – указано стрелками.

Окраска по Паппенгейму, ув.  $\times 1000$

### 2.2.1.2 Оценка функционального состояния клеток крови кур хемилюминесцентным методом

Хемилюминесцентный метод позволяет оценить функциональное состояние клеток крови по уровню продукции первичных люцигенинзависимых и вторичных люминолзависимых радикалов кислорода в состоянии покоя при спонтанной хемилюминесценции и при активированной реакции после стимуляции клеток частицами латекса. Стимуляция лейкоцитов латексом позволяет исследовать их фагоцитарную активность.

Наиболее информативными параметрами хемилюминесцентной (ХЛ) реакции являются: максимальная активность ХЛ ( $I_{max}$ , имп./с), суммарная продукция свободных радикалов ( $S$ , имп. за 90 мин.), время достижения максимума ХЛ ( $T_{max}$ , мин.), индекс активации (ИА, усл. ед.), удельная антигениндуцированная продукция свободных радикалов на один лейкоцит или фагоцит (имп./кл). На рисунке 6 представлена возрастная кинетика генерации активных форм кислорода (АФК) клетками крови кур.

*Максимальная амплитуда хемилюминесцентной реакции ( $I_{max}$ ).* Определение максимальной амплитуды ХЛ-реакции у кур во все периоды исследования позволило установить значительное преобладание интенсивности генерации первичных люцигенинзависимых кислородных радикалов, таких как супероксиданион, над интенсивностью образования вторичных люминолзависимых радикалов (гипохлорид анион, гидроксильный анион, пероксидный радикал) как при спонтанной, так и при стимулированной частицами латекса хемилюминесценции.

В первые сутки жизни у цыплят максимальная интенсивность активированной и спонтанной люцигенинзависимой ХЛ-реакции превысила показатели люминолзависимой реакции в 11,5 раз и 8,5 раз соответственно (таблица 3).

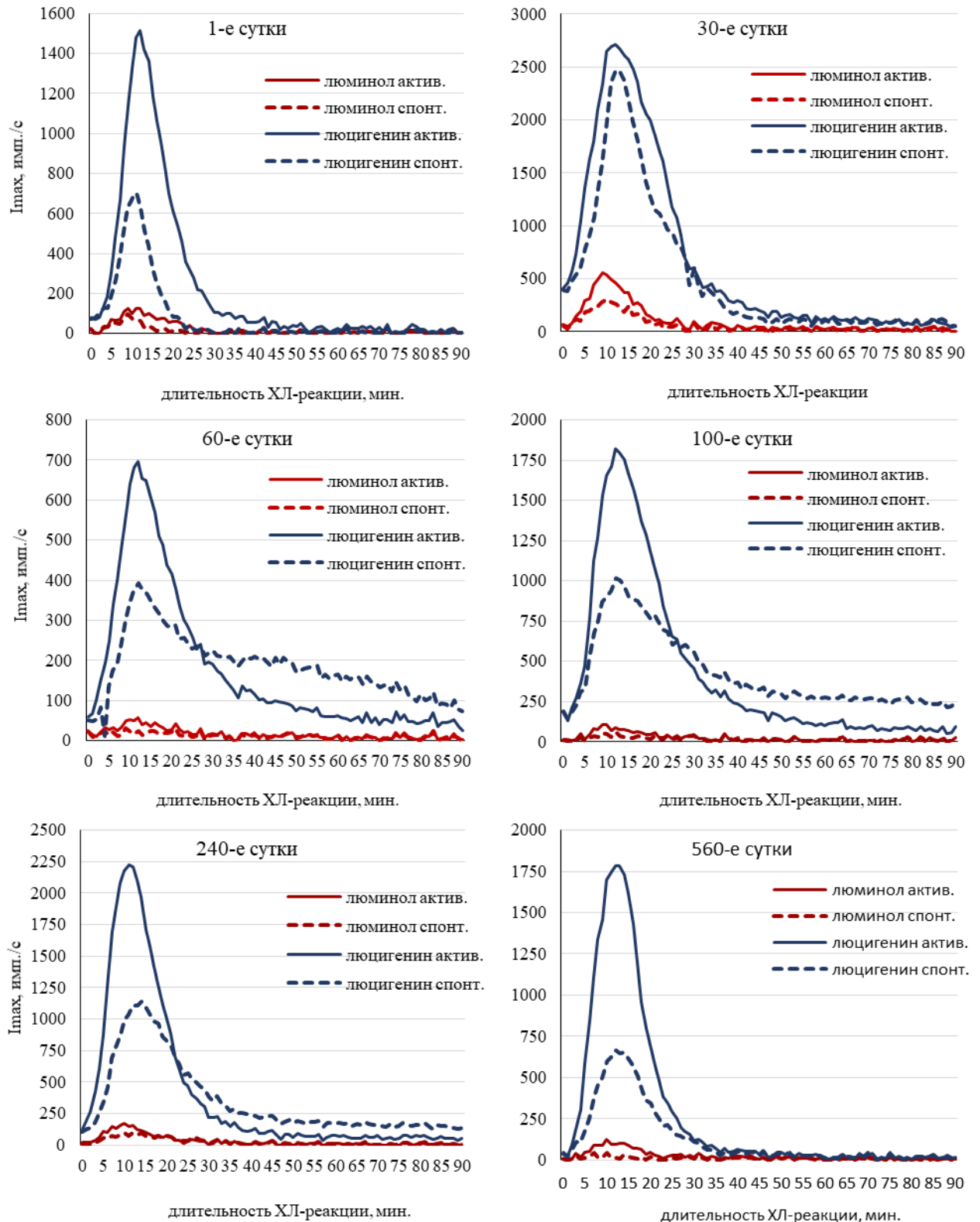


Рисунок 6 – Возрастные особенности кинетики генерации люминол- и люцигенинзависимых активных форм кислорода клетками крови кур яичного кросса «Декалб» при спонтанной и антигениндуцированной латексом хемилюминесценции



Таблица 3 – Возрастные изменения максимальной интенсивности люцигенин- и люминолзависимой продукции АФК клетками крови кур кросса «Декалб», имп./с.

Возраст, сутки	Люминолзависимая ХЛ		Люцигенинзависимая ХЛ	
	активирован.	спонтанная	активирован.	спонтанная
1-е	113,0±16,7	77,8±15,0	1300,8±213,9	665,1±105,9
30-е	136,6±21,8	69,6±19,0	2697,9±393,4*	2441,3±417,3*
60-е	49,3±5,2***■	30,0±3,0***■	700,9±80,5	382,8±65,3
100-е	94,4±8,8	59,3±8,4	1221,5±161,3	783,2±88,4
240-е	162,8±46,3	96,8±27,7	2438,3±644,5	1289,4±313,8
560-е	119,3±24,0	28,4±3,8***■	1936,6±460,3	724,8±164,6

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  и \*\* –  $P \leq 0,01$  относительно исходных величин; ■ –  $P \leq 0,05$  и ■■ –  $P \leq 0,01$  относительно предыдущего возраста

На 30-е сутки жизни индуцированная латексом и спонтанная люцигенинзависимая продукция АФК характеризовалась резким всплеском своей интенсивности. Показатели активированной ХЛ-реакции выросли более, чем в два раза и составили в среднем  $2697,9 \pm 393,4$  имп./с ( $P \leq 0,05$ ), а спонтанной реакции – почти в 3,7 раза и достигли  $2441,3 \pm 417,3$  имп./с. ( $P \leq 0,05$ ). При этом наблюдалась значительная вариабельность индивидуальных показателей хемилюминесценции, что отразилось на уровне достоверности сравниваемых величин. В последующие возрастные периоды максимальная интенсивность хемилюминесценции значительно колебалась.

У молодняка двухмесячного возраста максимальная интенсивность продукции активированных и спонтанных люцигенинзависимых радикалов кислорода резко сократилась как относительно исходных величин – на 40% ( $P \leq 0,05$ ) и 26% соответственно, так и по сравнению с показателями предыдущего возраста – в 3,5 раза ( $P \leq 0,01$ ) и 4,9 раза ( $P \leq 0,05$ ).

Постепенно интенсивность люцигенинзависимой хемилюминесценции нарастала. На третий месяц жизни показатели выросли при спонтанной и индуцированной ХЛ-реакции на 57-59% относительно предыдущего возраста ( $P \leq 0,05$ ). При этом достоверных различий с исходными данными не наблюдалось. На 240-е сутки максимальная интенсивность реакции при активированной люцигенинзависимой ХЛ увеличилась почти в два раза и на 65% при спонтанной реакции по сравнению с данными трехмесячной птицы (таблица 3). В этом возрасте индивидуальные показатели характеризовались значительной вариабельностью, вероятно, связанной с интенсивной яйцекладкой, что заметно снизило степень достоверности сравниваемых величин. В конце наблюдений, у птицы 560-суточного возраста, отмечалось падение показателей на 21% и 44% при активированной и спонтанной ХЛ-реакции соответственно по сравнению с предыдущим возрастом.

Анализ возрастных показателей  $I_{\max}$  люминолзависимой ХЛ-реакции выявил разнонаправленную динамику. Так, у 30-суточных цыплят интенсивность активированной латексом люминолзависимой ХЛ увеличилась на 21%, а спонтанной – сократилась почти на 11% относительно исходных величин. У двухмесячного молодняка кур зарегистрированы самые низкие возрастные показатели  $I_{\max}$  люминолзависимой ХЛ. При этом отмечено достоверное снижение показателей при генерации всех видов АФК в 2,3-2,6 раза по сравнению с исходными данными и на 64% при активированной ХЛ относительно предыдущего возраста ( $P \leq 0,01$ ).

В последующие периоды наблюдений показатель постепенно повышался и к 240-м суткам достиг максимальных величин –  $162,8 \pm 46,3$  имп./с при индуцированной латексом ХЛ и  $96,8 \pm 27,7$  имп./с при спонтанной реакции. Это почти в три раза больше минимальных показателей, зарегистрированных у двухмесячной птицы ( $P \leq 0,05$ ). Значительные индивидуальные колебания интенсивности ХЛ в этом возрасте ведут к низкой достоверности сравниваемых показателей. В 560-суточном возрасте у

кур наблюдались самые низкие показатели интенсивности продукции спонтанных люминолзависимых радикалов –  $28,4 \pm 3,8$  имп./с, что в 2,7 раза меньше исходных величин ( $P \leq 0,01$ ).

Большое значение в оценке функционального состояния клеток при хемилюминесцентном анализе имеют показатели *суммарной продукции (светосуммы)* кислородных радикалов, зарегистрированных в течение всей ХЛ-реакции. Показатели светосуммы люцигенинзависимых активированных и спонтанных АФК у суточных цыплят составили в среднем  $1,53 \pm 0,19 \times 10^6$  и  $0,65 \pm 0,12 \times 10^6$  импульсов за 90 мин. соответственно (рисунок 7).

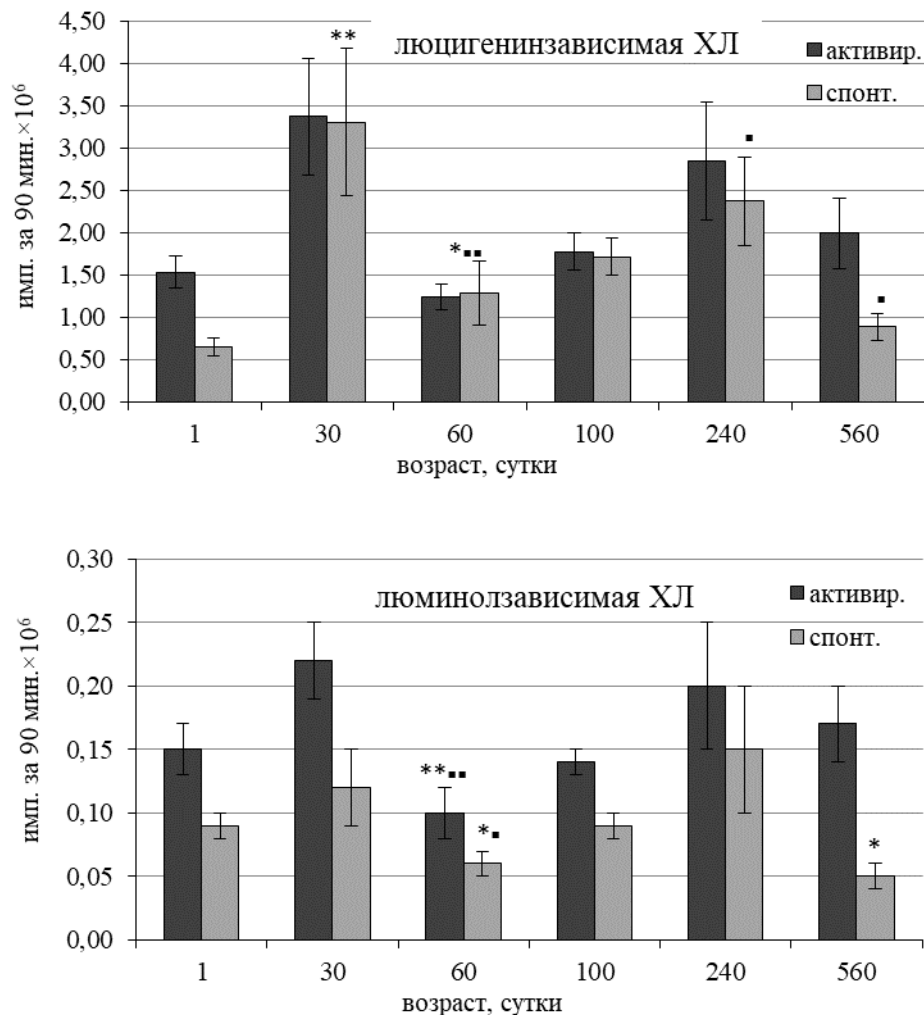


Рисунок 7 – Возрастные изменения суммарной продукции АФК при люцигенин- и люминолзависимой ХЛ клеток крови кур (S, имп. за 90 мин.).  
Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  и \*\* –  $P \leq 0,01$  относительно исходных величин; ■ –  $P \leq 0,05$  и ■■ –  $P \leq 0,01$  относительно предыдущего возраста

К концу первого месяца жизни отмечен максимальный рост суммарной продукции люцигенинзависимых радикалов в два раза при активированной реакции ( $P \leq 0,05$ ) и в пять раз при спонтанной ХЛ ( $P \leq 0,01$ ). Индивидуальные показатели колебались в широком диапазоне от  $0,80 \times 10^6$  до  $10,4 \times 10^6$  импульсов за 90 мин. У молодняка кур двухмесячного возраста суммарная генерация активированных и спонтанных АФК упала по сравнению с предыдущими возрастными показателями более, чем в три раза ( $P \leq 0,01$ ). У птицы 100-суточного возраста наметилась выраженная тенденция к росту показателя и к 240-м суткам светосумма люцигенинзависимых радикалов выросла при активированной реакции в 1,9 раза, а при спонтанной продукции – в 3,7 раза ( $P \leq 0,01$ ) по сравнению с исходными данными. У птицы 560-суточного возраста наблюдалось снижение объёмов активированных АФК на 30%, а спонтанных – в 2,7 раза ( $P \leq 0,01$ ) относительно показателей суточной птицы.

Исследования показали, что суммарная генерация люминолзависимых радикалов кислорода у суточных цыплят в 7-10 раз меньше, чем при генерации первичных люцигенинзависимых АФК. При стимулированной латексом ХЛ-реакции зарегистрировано  $0,15 \pm 0,02 \times 10^6$  имп. за 90 мин., а при спонтанной ХЛ –  $0,09 \pm 0,01 \times 10^6$  имп. за 90 мин. На 30-е сутки жизни светосумма активированных и спонтанных вторичных АФК увеличилась на 40% и 32% соответственно по сравнению с исходными данными. У двухмесячного молодняка кур суммарные объёмы люминолзависимых радикалов достигли минимальных величин. Светосумма сократилась на 74-79% ( $P \leq 0,05$ ) относительно показателей суточного возраста, и более, чем в 2,4 раза по сравнению с предыдущим возрастом 30-суточной птицы ( $P \leq 0,01$ ).

Достоверная разница с показателями суточных цыплят не наблюдалась. У трёхмесячного молодняка кур наметился рост показателей светосуммы кислородных радикалов, продуцируемых клетками крови. Их объёмы не достигали исходных величин, но на 36-54% превышали показатели

предыдущего возрастного периода. Максимальные суммарные объёмы люминолзависимых АФК зарегистрированы у птицы 240-суточного возраста. При активированной ХЛ величина составила  $0,20 \pm 0,05 \times 10^6$  имп. за 90 мин., при спонтанной –  $0,15 \pm 0,05 \times 10^6$  имп. за 90 мин., что в 2-2,7 раза больше, чем показатели двухмесячной птицы ( $P \leq 0,05$ ) и на 26-72% выше исходных величин. К 560-м суткам продукция АФК при активированной люминолзависимой ХЛ-реакции снизилась на 15%. Генерация свободных радикалов при спонтанной хемилюминесценции опустилась до минимальных величин, почти в два раза отставая от исходных показателей ( $P \leq 0,05$ ).

Немаловажное значение в оценке функционального состояния клеток при хемилюминесцентном анализе имеет такой параметр, как *время достижения максимума хемилюминесценции*, который показывает, как быстро клетки способны мобилизоваться и начать генерировать наибольшее количество свободных кислородных радикалов. Особенно важным этот показатель является при индуцированной ХЛ-реакции, поскольку отражает скорость реагирования фагоцитов на антигенное раздражение.

Время достижения максимума активированной люцигенинзависимой хемилюминесценции колебалось в пределах 12-13 мин. При этом минимальные показатели зарегистрированы на 30-е и 240-е сутки, а максимальные – у суточной птицы (таблица 4). При спонтанной люцигенинзависимой ХЛ время достижения максимума колебалось от 11 до 13 мин. У 30-суточной птицы наблюдалось резкое торможение скорости хемилюминесценции почти в два раза относительно исходных величин ( $P \leq 0,05$ ) и большая амплитуда разброса индивидуальных показателей.

Время максимальной ответной реакции клеток при активированной люминолзависимой ХЛ-реакции на протяжении всего периода исследований колебалось от 11 до 14 мин. Минимальные величины зарегистрированы у птицы 60-суточного возраста –  $9,2 \pm 0,7$  мин., что достоверно отличалось от

показателей суточных цыплят ( $P \leq 0,05$ ). Самое продолжительное время максимума ХЛ наблюдалось у птицы 100-суточного возраста –  $14,1 \pm 0,6$  мин.

Таблица 4 – Возрастные изменения времени достижения максимума хемилюминесценции клеток крови кур, мин.

Возраст, сутки	Люцигенинзависимая ХЛ		Люминолзависимая ХЛ	
	активированная	спонтанная	активированная	спонтанная
1-е	$13,4 \pm 0,3$	$11,3 \pm 0,3$	$12,6 \pm 0,5$	$11,9 \pm 0,6$
30-е	$12,2 \pm 0,6$	$12,7 \pm 0,8$	$11,8 \pm 0,9$	$11,9 \pm 2,8$
60-е	$12,6 \pm 0,3$	$20,3 \pm 5,4^*$	$9,2 \pm 0,7$	$10,1 \pm 2,5$
100-е	$13,3 \pm 0,4$	$13,8 \pm 0,5$	$14,1 \pm 0,6$	$22,0 \pm 4,4^*$
240-е	$12,3 \pm 0,3$	$13,6 \pm 0,5$	$11,1 \pm 0,4^*$	$20,6 \pm 8,6$
560-е	$12,6 \pm 0,2$	$13,9 \pm 0,4$	$13,1 \pm 0,4$	$18,9 \pm 4,8$

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  относительно исходных показателей

Спонтанная люминолзависимая ХЛ-реакция отличалась значительным разбросом показателей – от  $10,2 \pm 2,5$  мин. до  $22,0 \pm 4,4$  мин. Достоверные возрастные отличия с исходными величинами зарегистрированы у трёхмесячной птицы ( $P \leq 0,05$ ). Отмечается значительная вариабельность индивидуальных показателей времени достижения максимума, что обуславливает низкую степень достоверности сравниваемых параметров.

Особое значение в трактовке результатов ХЛ-реакции имеет индекс активации (рисунок 8). Он определяется соотношением между суммарными объёмами радикалов, продуцированных при активированной и спонтанной хемилюминесценции и выражается в условных единицах. Показатель демонстрирует потенциальные возможности фагоцитов к генерации «респираторного взрыва» при антигенном раздражении.

У суточных цыплят индекс активации при люцигенинзависимой ХЛ на 38% превысил показатели люминолзависимой ХЛ-реакции и составил

2,38±0,21 усл. ед. На 100-е сутки показатель незначительно превышал 1,0 усл. ед., достоверно отличаясь от исходных величин ( $P \leq 0,001$ ), а у птицы 560-суточного возраста индекса активации поднялся до 2,37±0,29 усл. ед.

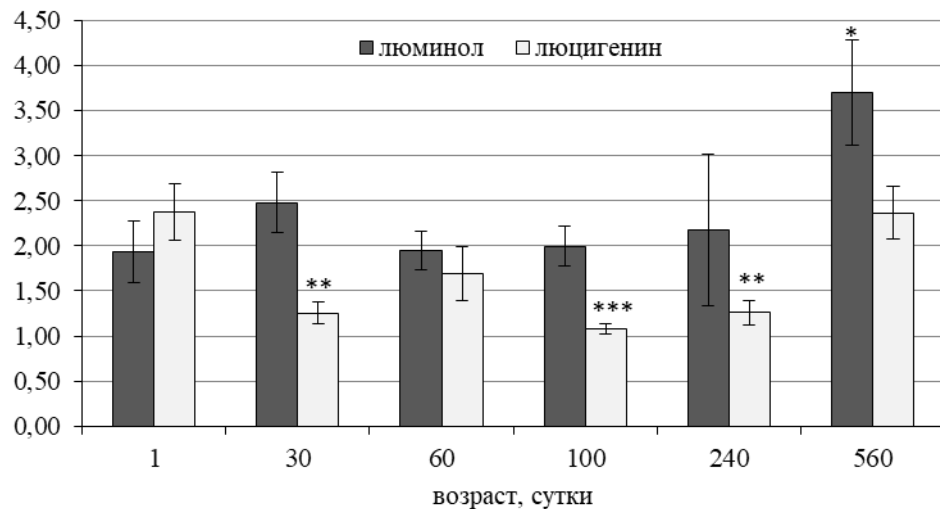


Рисунок 8 – Показатели индекса активации клеток крови кур разного возраста, усл. ед. Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно показателей суточной птицы

При продукции люминолзависимых АФК индекс активации во все периоды исследования, кроме первых суток, превышал показатели люцигенинзависимой ХЛ. У суточных, двух- и трёхмесячных цыплят колебался от 1,93 до 1,99 усл. ед. Однако к концу наблюдений показатель вырос до 3,70±0,58 усл. ед., что на 92% выше исходных показателей ( $P \leq 0,05$ ).

Учитывая светосумму радикалов, общее содержание лейкоцитов, их фагоцитарную активность и степень разведения крови, можно рассчитать удельную продукцию АФК на один лейкоцит или фагоцит (таблица 5).

У суточных цыплят удельная продукция люцигенинзависимых АФК лейкоцитами и фагоцитами крови составила 5,10±1,60 имп./кл. и 8,78±2,38 имп./кл. соответственно. Однако максимальных показателей она достигла у птицы 30-суточного возраста, превысив исходные данные на 31% и 96%. У двухмесячного молодняка кур удельная антигенстимулированная продукция люцигенинзависимых АФК на лейкоцит и фагоцит сократилась до

минимальных величин, в 2,2-3,2 раза отставая от показателей суточных цыплят ( $P \leq 0,05$ ). Постепенно показатели росли и в 240-суточном возрасте в 1,6-2,3 раза превысили минимальные показатели 60-суточного молодняка. В конце наблюдений удельная продукция АФК на лейкоцит сократилась на 47%, а на фагоцит – на 42% по сравнению с показателями суточных цыплят.

Таблица 5 – Возрастные показатели удельной антигенактивированной генерации АФК лейкоцитами и фагоцитами крови кур (имп./кл.  $\times 10^6$ )

Возраст, сутки	Люцигенинзависимая ХЛ		Люминолзависимая ХЛ	
	имп./лейкоцит	имп./фагоцит	имп./лейкоцит	имп./фагоцит
1-е	5,10 $\pm$ 1,60	8,78 $\pm$ 2,38	0,60 $\pm$ 0,20	1,01 $\pm$ 0,31
30-е	6,68 $\pm$ 1,82	17,23 $\pm$ 5,02	0,41 $\pm$ 0,10	1,09 $\pm$ 0,31
60-е	1,48 $\pm$ 0,18*▪	3,67 $\pm$ 0,32*▪	0,12 $\pm$ 0,02*▪	0,29 $\pm$ 0,03*▪
100-е	2,94 $\pm$ 0,32▪▪	9,17 $\pm$ 1,34▪▪	0,27 $\pm$ 0,03▪▪	0,88 $\pm$ 0,12▪▪
240-е	3,65 $\pm$ 0,77	6,05 $\pm$ 1,18	0,25 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,07▪
560-е	2,71 $\pm$ 0,62	5,12 $\pm$ 1,22	0,22 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,08

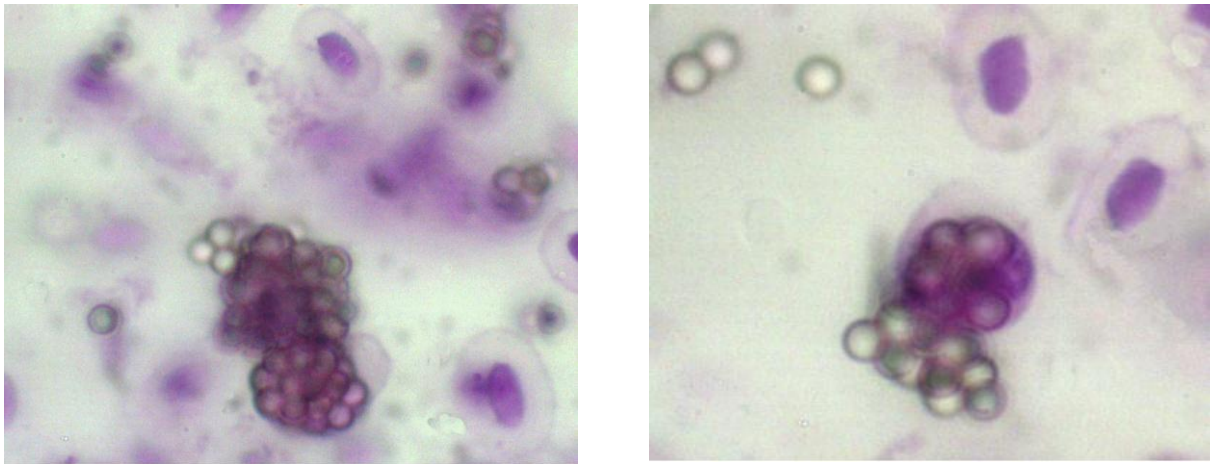
Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  по сравнению с показателями суточной птицы; ▪ –  $P \leq 0,05$  и ▪▪  $P \leq 0,01$  относительно предыдущего возраста

Сходные изменения установлены при генерации люминолзависимых радикалов. Максимальные показатели отмечены у птицы суточного и 30-суточного возраста, а минимальные – у 30-суточных кур. Установлены достоверные межвозрастные отличия ( $P \leq 0,01$ ), а также достоверная разница с исходными показателями у птицы двух- и трёхмесячного возраста ( $P \leq 0,05$ ).

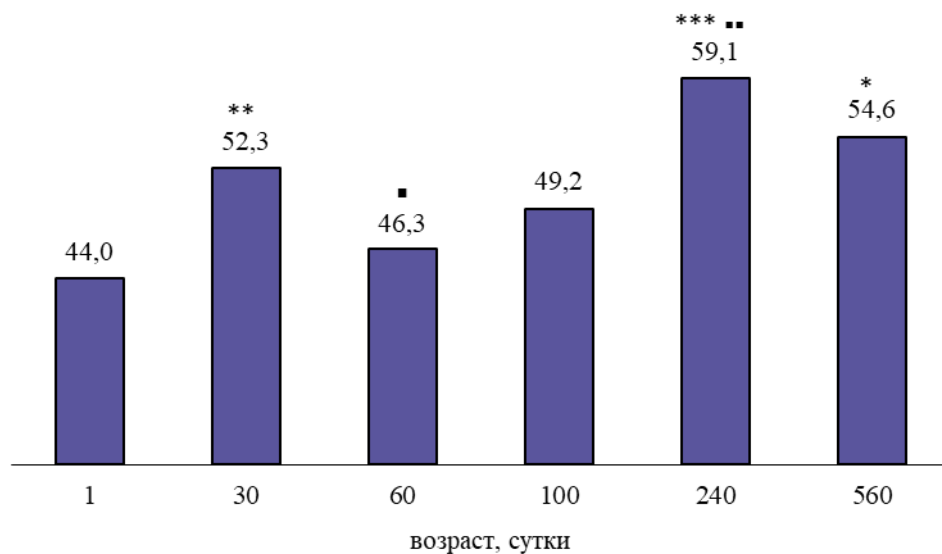
*Фагоцитарная активность.* Для оценки возрастных изменений функционального состояния лейкоцитов крови кур исследована поглотительная активность клеток в отношении частиц латекса. Фагоцитарный индекс определяется количеством фагоцитов с частицами латекса в цитоплазме к общему содержанию лейкоцитов в процентах. Фагоцитарная активность



лейкоцитов крови у цыплят первых суток жизни составила  $44,0 \pm 1,8\%$  (рисунок 9). К концу первого месяца жизни показатель вырос почти на 19% и составил  $52,3 \pm 0,7\%$  ( $P \leq 0,01$ ). У молодняка 60-суточного возраста фагоцитарная активность лейкоцитов упала почти до исходных значений и достоверно отличалась от показателей предыдущего возраста ( $P \leq 0,05$ ).



А



Б

Рисунок 9 – Фагоцитарная активность клеток крови кур: А – фагоцитоз частиц латекса лейкоцитами, окраска 0,25%-ным раствором генцианвиолета,  $\times 1000$ ; Б – возрастные изменения фагоцитарного индекса лейкоцитов крови кур. Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно исходных показателей; ■ –  $P \leq 0,05$  и ■■ –  $P \leq 0,01$  – по сравнению с предыдущим возрастом

У трёхмесячной птицы способность лейкоцитов к фагоцитозу выросла на 12% относительно стартовых показателей и на 6% по сравнению с данными 60-суточного молодняка. Максимальная фагоцитарная активность зарегистрирована у 240-суточной птицы –  $59,1 \pm 2,5\%$ . Это на 34% выше значений суточных цыплят ( $P \leq 0,001$ ) и на 20% больше показателей трёхмесячных кур ( $P \leq 0,01$ ). У птицы 560-суточного возраста способность лейкоцитов к фагоцитозу упала почти на 8% относительно предыдущего возраста, но почти на 24% превышала исходные величины ( $P \leq 0,05$ ).

Таким образом, установлено достоверное снижение общего содержания лейкоцитов крови у кур 240- и 560-суточного возраста. Возрастные особенности клеточного состава лейкоцитов крови характеризуются незначительным преобладанием псевдоэозинофилов у одно- и 240-суточной птицы, выраженным лимфоцитарным профилем крови у молодняка месячного и, особенно, двухмесячного возраста, а также достоверным ростом относительного содержания эозинофилов и моноцитов.

Максимальная фагоцитарная активность лейкоцитов зарегистрирована у птицы 240- и 560-суточного возраста. Низкую активность при фагоцитозе демонстрируют лейкоциты суточных и двухмесячных цыплят, что свидетельствует об их незначительных функциональных возможностях.

Кислородный метаболизм клеток крови кур характеризуется значительным преобладанием продукции люцигенинзависимых радикалов кислорода в состоянии покоя и при стимуляции частицами латекса. Минимальные показатели хемилюминесценции зарегистрированы у двухмесячных кур, что связано не только с низким содержанием радикалообразующих клеток, но и со слабой функциональной способностью клеток к генерации активных форм кислорода, о чём свидетельствуют низкие показатели удельной антигенактивированной продукции радикалов лейкоцитами и фагоцитами крови.

## 2.2.2 Оценка морфофункционального состояния клеток крови перепелов разного возраста

Оценку морфологического и функционального состояния клеток крови перепелов разного возраста оценивали по общему содержанию лейкоцитов, их клеточному составу, фагоцитарной активности и результатам хемилюминесцентного анализа.

### 2.2.2.1 Возрастные особенности морфологических показателей крови перепелов

*Общее содержание лейкоцитов.* Исследования крови клинически здоровых японских перепелов показали незначительные возрастные изменения общего содержания лейкоцитов в процессе постнатального онтогенеза. Количество лейкоцитов у суточной птицы колебалось в небольшом диапазоне от  $10,1 \times 10^9/\text{л}$  до  $14,0 \times 10^9/\text{л}$  и в среднем составило  $12,0 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$ . Следует отметить незначительные колебания индивидуальных показателей экспериментальной птицы, что свидетельствовало об однородности поголовья.

Спустя две недели жизни количество лейкоцитов у молодняка сократилось почти на 17% и составило  $10,0 \pm 1,2 \times 10^9/\text{л}$ . К концу первого месяца жизни количество клеток белой крови выросло до исходных показателей и продолжило расти, достигнув максимума к концу шестого месяца жизни и составив в среднем  $17,5 \pm 2,5 \times 10^9/\text{л}$  ( $P \leq 0,01$ ), а к 240-м суткам жизни число клеток упало до  $4,8 \pm 0,4 \times 10^9/\text{л}$  ( $P \leq 0,001$ ), что могло свидетельствовать о недостаточности иммунных механизмов у старой птицы.

*Клеточный состав лейкоцитов.* Исследование возрастных колебаний клеточного состава лейкоцитов показало, что преобладающими клетками у перепелов первых двух месяцев жизни являлись лимфоциты. Максимальный

уровень лимфоцитов установлен у птицы первых суток жизни –  $69,2 \pm 5,8\%$ . Однако их уровень постепенно снижался и у перепелов 120-суточного возраста опустился до минимальных величин (таблица 6). У двухнедельной птицы содержание лимфоцитов сократилось на 8% относительно исходных показателей, у 30-суточной – на 17%, у двухмесячной – почти на 22%, у 90-суточной – на 35% ( $P \leq 0,05$ ), у 120-суточной – на 36% ( $P \leq 0,01$ ).

У шестимесячных перепелов отмечен подъем уровня лимфоцитов до  $51,4 \pm 1,9\%$ , тем не менее их содержание оставалось достоверно ниже исходных величин ( $P \leq 0,05$ ). У птицы 240-суточного возраста относительное содержание клеток выросло на 17% по сравнению с предыдущим возрастом, но так и не достигло показателей суточных перепелов.

Вторыми по численности клетками среди лейкоцитов крови перепелов являлись псевдоэозинофильные гранулоциты. Их минимальное содержание зарегистрировано у перепелов первых суток жизни –  $28,0 \pm 6,1\%$ . В дальнейшем отмечался поступательный рост их уровня. У двухнедельной птицы показатели выросли на 15% относительно исходных данных, на 30-е сутки – почти на 26%, к концу второго месяца жизни – на 41%, на третьем месяце жизни – более, чем на 85% ( $P \leq 0,01$ ), а к 120-суточному возрасту разница с исходными показателями составила максимальные 88,6% ( $P \leq 0,001$ ). В конце наблюдений, у птицы шести- и восьмимесячного возраста, уровень псевдоэозинофилов сократился, но тем не менее превышал начальные показатели на 64% ( $P \leq 0,01$ ) и 25% соответственно.

Относительное содержание базофильных гранулоцитов практически не имело достоверных межвозрастных отличий. Уровень базофилов в начале постнатального онтогенеза составил  $1,0 \pm 0,6\%$  (таблица 6). После кратковременного снижения у двухнедельной птицы, уровень базофилов повысился до максимальной величины –  $2,0 \pm 0,5\%$  в конце первого месяца жизни. К 60-суточному возрасту содержание этих клеток снизилось до исходных величин, а в конце третьего месяца достигло минимальных

значений, что в три раза меньше уровня базофилов предыдущего возраста ( $P \leq 0,001$ ). В дальнейшем содержание базофилов колебалось в узком диапазоне величин от 0,6 до 1%. Морфология клеток крови перепелов представлена на рисунке 10.

Содержание эозинофилов у суточных перепелов составило в среднем  $1,2 \pm 0,5\%$ . За первые две недели их уровень увеличился на 33%, а затем сократился в два раза у 30-суточной птицы. В дальнейшем их содержание увеличивалось, к трёхмесячному возрасту достигло исходных величин и продолжило свой рост (таблица 6). Максимальные показатели уровня эозинофилов зафиксированы у птицы 240-суточного возраста, они в 2,3 раза превысили исходные величины.

Таблица 6 – Показатели клеток белой крови японских перепелов разного возраста

Возраст сутки	Лейкоцит $\times 10^9/\text{л}$	Клеточный состав лейкоцитов, %				
		лимфоциты	псевдоэоз.	эозиноф.	базофил.	моноциты
1-е	$12,0 \pm 0,7$	$69,2 \pm 5,8$	$28,0 \pm 6,1$	$1,2 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,4$
14-е	$10,0 \pm 1,2$	$63,8 \pm 6,2$	$32,2 \pm 5,4$	$1,6 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,4$
30-е	$11,1 \pm 1,0$	$57,4 \pm 2,4$	$35,2 \pm 1,4$	$0,8 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,2$
60-е	$12,8 \pm 1,4$	$53,8 \pm 3,6$	$39,6 \pm 2,4$	$1,0 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,0$	$2,4 \pm 0,5^{* \blacksquare}$
90-е	$11,9 \pm 0,9$	$45,3 \pm 4,7^*$	$52,0 \pm 4,1^{** \blacksquare}$	$1,2 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,9$
120-е	$8,8 \pm 0,5^{** \blacksquare}$	$44,8 \pm 2,1^{**}$	$52,8 \pm 1,3^{***}$	$1,3 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$
180-е	$15,4 \pm 1,6^{\blacksquare \blacksquare}$	$51,4 \pm 1,9^{* \blacksquare}$	$45,8 \pm 2,8^{** \blacksquare}$	$1,6 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,5$
240-е	$4,8 \pm 0,4^{***}$	$60,3 \pm 5,4$	$35,0 \pm 4,9$	$2,8 \pm 0,7$	$1,0 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,6$

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  по сравнению с показателями суточной птицы;  $\blacksquare$  –  $P \leq 0,05$ ;  $\blacksquare \blacksquare$  –  $P \leq 0,01$  – относительно предыдущего возраста

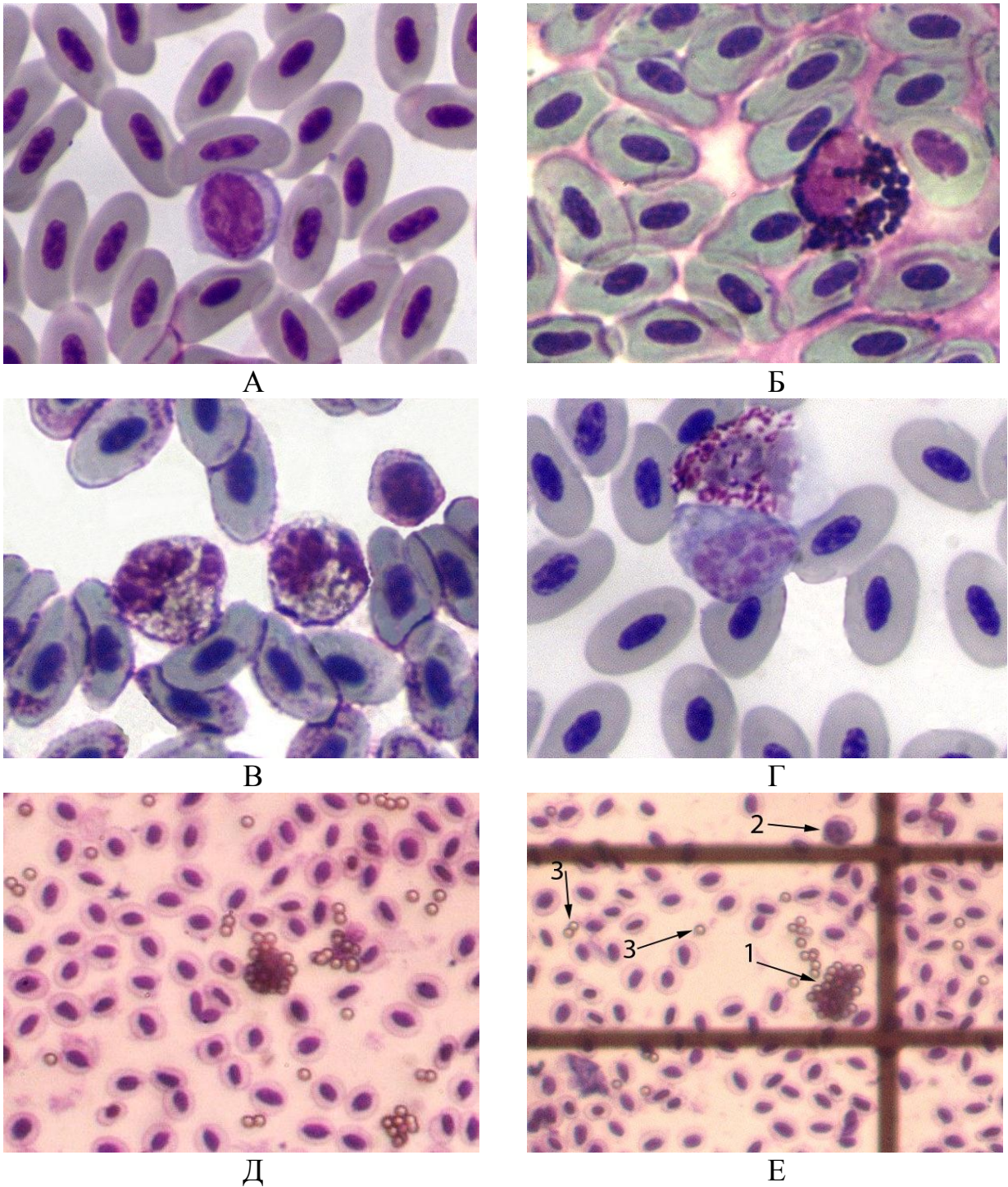


Рисунок 10 – Морфология клеток крови перепелов: А – лимфоцит; Б – базофил в стадии дегрануляции; В – два псевдоэозинофила; Г – моноцит и эозинофил в состоянии дегрануляции (окраска по Паппенгейму,  $\times 1000$ ); Д – лейкоцит с частицами латекса в цитоплазме; Е – фагоциты в камере Горяева: 1 – два фагоцита, 2 – лимфоцит; 3 – свободные частицы латекса (окраска 0,25%-ным генцианвиолетом,  $\times 400$ )

Содержание моноцитов в крови перепелов первого месяца жизни оставалось стабильным и находилось на уровне  $0,6 \pm 0,4\%$ . Однако к 60-суточному возрасту их уровень вырос в четыре раза и достоверно отличался как от суточных показателей ( $P \leq 0,05$ ), так и от данных предыдущего возраста ( $P \leq 0,01$ ). Позднее содержание моноцитов снизилось и в возрасте 120 суток достигло минимальных величин –  $0,5 \pm 0,2\%$ . У птицы 180- и 240-суточного возраста содержание моноцитов сохранялось на одном уровне –  $0,8\%$ .

### **2.2.2.2 Оценка функционального состояния клеток крови перепелов хемилюминесцентным методом**

Показатели продукции всех видов активных форм кислорода (АФК) клетками крови перепелов демонстрировала значительные колебания в разные возрастные периоды.

*Суммарная продукция* первичных люцигенинзависимых АФК значительно преобладала над продукцией вторичных люминолзависимых радикалов, как в состоянии покоя, так и при антигенном раздражении клеток частицами латекса (таблица 7). При активированной ХЛ-реакции объёмы люцигенинзависимых АФК превысили показатели люминолзависимых свободных радикалов в 5-13 раз ( $P \leq 0,01$ ), при спонтанной ХЛ-реакции – в 3-18 раз ( $P \leq 0,01$ ). Причем минимальные отличия в соотношении люминол- и люцигенинзависимых АФК наблюдались у суточной и 240-суточной птицы. Аналогичные особенности спектра свободных кислородных радикалов зарегистрированы нами при исследовании хемилюминесценции клеток цельной крови у кур в постнатальном онтогенезе.

Минимальная суммарная продукция первичных люцигенинзависимых радикалов зарегистрирована в начале и конце наблюдений как при активированной, так и спонтанной ХЛ. При активированной ХЛ показатели светосуммы у перепелов суточного возраста составили  $1,30 \pm 0,31 \times 10^6$  имп. за

90 мин., а у 240-суточной птицы –  $0,82 \pm 0,24 \times 10^6$  имп. за 90 мин. Суммарные объёмы люцигенинзависимых АФК при спонтанной ХЛ у суточных и 240-суточных перепелов находились на одном уровне (таблица 7).

Таблица 7 – Суммарная продукция АФК (S) при люцигенин- и люминолзависимой хемилюминесценции клеток крови японских перепелов в возрастном аспекте (имп. за 90 мин.  $\times 10^6$ )

Возраст, сутки	Люминолзависимая ХЛ		Люцигенинзависимая ХЛ	
	активированная	спонтанная	активированная	спонтанная
1-е	$0,19 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,05$	$1,30 \pm 0,31$	$0,29 \pm 0,02$
14-е	$0,33 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,02$	$4,23 \pm 1,58$	$2,01 \pm 0,88$
30-е	$0,29 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,02$	$2,78 \pm 0,62$	$1,61 \pm 0,94$
60-е	$0,41 \pm 0,15$	$0,12 \pm 0,02$	$3,18 \pm 1,13$	$2,04 \pm 0,76^*$
90-е	$0,48 \pm 0,15$	$0,13 \pm 0,02$	$11,02 \pm 2,82^{**}$	$4,38 \pm 1,50^*$
120-е	$0,62 \pm 0,09^{**}$	$0,09 \pm 0,05$	$7,18 \pm 1,16^{***}$	$2,20 \pm 1,06$
180-е	$1,70 \pm 0,56^*$	$0,35 \pm 0,22$	$25,00 \pm 7,66^{**}$	$13,42 \pm 3,75^{**\blacksquare}$
240-е	$0,15 \pm 0,05^\blacksquare$	$0,40 \pm 0,05^{**}$	$0,82 \pm 0,24$	$0,29 \pm 0,12^{\blacksquare\blacksquare}$

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно показателей суточных перепелов;  $\blacksquare$  –  $P \leq 0,05$ ;  $\blacksquare\blacksquare$  –  $P \leq 0,01$  – по сравнению с предыдущим возрастом

Минимальный объём вторичных люминолзависимых радикалов при спонтанной и индуцированной латексом хемилюминесценции у суточных перепелов составил  $0,11 \pm 0,05 \times 10^6$  и  $0,19 \pm 0,06 \times 10^6$  имп. за 90 мин., а у птицы 240-суточного возраста –  $0,40 \pm 0,05 \times 10^6$  и  $0,15 \pm 0,05 \times 10^6$  имп. за 90 мин. соответственно. У перепелов 240-суточного возраста светосумма индуцированной продукции люминолзависимых АФК слабо отличалась от показателей суточной птицы, но достоверно отставала от показателей предыдущего возрастного периода ( $P \leq 0,05$ ). Суммарная генерация



люминолзависимых радикалов при спонтанной ХЛ-реакции у перепелов 240-суточного возраста в 3,6 раза превышала исходные величины ( $P \leq 0,01$ ).

Незначительные суммарные объёмы кислородных радикалов у перепелов первых суток жизни и у старой птицы свидетельствовали либо о низких функциональных возможностях фагоцитов крови птиц этих возрастов, либо о высокой активности антиоксидантной защиты организма.

Высокий уровень генерации всех видов свободных кислородных радикалов установлен у перепелов 90-, 120- и, особенно, 180-суточного возраста. Межвозрастные отличия в эти периоды жизни птицы характеризовались недостаточной степенью достоверности вследствие высокой вариабельности индивидуальных показателей.

Суммарная продукция люцигенинзависимых радикалов при антигениндуцированной и спонтанной ХЛ-реакции у трёхмесячных перепелов в 8,5-15 раз превысила исходные показатели ( $P \leq 0,01$ ); у 120-суточной птицы – в 5,5-7,6 раза ( $P \leq 0,001$ ); у 180-суточных перепелов – в 19-46 раз ( $P \leq 0,001$ ). Последующее резкое снижение продукции АФК у старой птицы является признаком функционального истощения клеток.

Генерация люминолзависимых кислородных радикалов достигла наибольшего объёма у перепелов четырёх- и шестимесячного возраста при активированной ХЛ-реакции – в три раза и девять раз соответственно ( $P \leq 0,01$ ). При спонтанной ХЛ суммарная продукция вторичных АФК оказалась меньше исходных величин почти на 19% (таблица 8).

Колоссальный выброс свободных радикалов, обладающих высокой реактивностью в отношении биологических молекул, у перепелов шестимесячного возраста свидетельствует о возможности повреждения внутриклеточных и экстрацеллюлярных структур организма.

*Максимальная интенсивность ХЛ-реакции.* Использование люцигенина и люминола в качестве ХЛ-зондов выявило заметное отличие амплитуды максимальной интенсивности продукции первичных и вторичных АФК. Во

все периоды исследования интенсивность активированной и спонтанной люцигенинзависимой реакции во много раз превышала параметры люминолуцигенной ХЛ. Особенно ярко это проявлялось у 90-, 120- и 180-суточных перепелов – в 11-22 раза при активированной и в 19-37 раз при спонтанной ХЛ. Менее выражены отличия данного показателя у птицы суточного и 240-суточного возраста – в два-пять раз.

Таблица 8 – Максимальная интенсивность активированной и спонтанной люцигенин- и люминолуцигенной хемилюминесценции клеток крови перепелов в возрастном аспекте, имп./с

Возраст сутки	Люминолуцигенная ХЛ		Люцигенинзависимая ХЛ	
	активирован.	спонтанная	активирован.	спонтанная
1-е	84,8±33,6	42,8±13,4	381,0±107,3	91,8±8,5
14-е	111,4±12,2	38,2±5,2	1332,8±459,0*	577,6±285,0
30-е	109,2±18,7	30,6±3,3	1183,2±273,3*	409,0±229,4
60-е	214,4±79,2	40,2±4,1	1263,2±331,6*	559,8±189,8*
90-е	168,8±33,9	43,5±5,3	3854,2±755,2****	1158,3±337,1**
120-е	178,6±24,9*	29,6±12,9	2194,0±326,9***	572,0±241,3
180-е	576,8±217,6*	105,8±55,3	6870,8±1923,2**	3996,8±747,6****
240-е	120,3±53,9	30,3±6,1	448,0±172,9	160,7±106,6

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно показателей суточных перепелов; ■ –  $P \leq 0,05$ ; ■■ –  $P \leq 0,01$  – по сравнению с предыдущим возрастом

Амплитуда максимальной интенсивности активированной люцигенинзависимой ХЛ в 3-3,5 раза превысила исходные показатели на 14-е, 30-е и 60-е сутки наблюдений ( $P \leq 0,05$ ). У перепелов трёх- и четырёхмесячного возраста разница со стартовыми величинами составила 6-10 раз ( $P \leq 0,001$ ). Однако отличие достигло пиковых показателей у 180-

суточных перепелов, превышая исходные величины – в 18 раз ( $P \leq 0,01$ ). Незначительное превышение показателей суточных перепелов отмечено в конце наблюдений у 240-суточной птицы – всего на 17%. Аналогичные, но более выраженные изменения максимальной интенсивности, зафиксированы при спонтанной люцигенинзависимой ХЛ.

Люминолзависимая ХЛ характеризовалась низкой амплитудой максимальной интенсивности, как при спонтанной, так и антигенактивированной реакции во все возрастные периоды. При этом интенсивность спонтанной реакции колебалась в пределах 30-43 имп./с, а при активированной ХЛ – от 85 имп./с у суточных перепелов до 214 имп./с – у птицы двухмесячного возраста. Исключение составили показатели шестимесячных перепелов, они превысили исходные величины в 2,4 раза при спонтанной и почти в семь раз при активированной ХЛ-реакции ( $P \leq 0,05$ ). Обращают на себя внимание значительные индивидуальные колебания исследуемого показателя во все возрастные периоды, что указывает на крайнюю неоднородность уровня кислородного метаболизма у отдельных особей и ведёт к снижению степени достоверности сравниваемых величин.

*Время достижения максимума хемилюминесценции* у перепелов ( $T_{\max}$ ) кардинально отличалось от показателей кур, поскольку генерация всех видов АФК у перепелов характеризовалась крайне медленным течением как при спонтанной, так и активированной ХЛ-реакции. Самый быстрый выход ХЛ-кривой на максимум (12-16 мин.) наблюдался у двухмесячной и старой птицы при активированной хемилюминесценции независимо от используемого ХЛ-зонда – люцигенина или люминола (рисунок 11).

Спонтанная генерация всех видов АФК характеризовалась продолжительным выходом на максимум, о чем свидетельствовало торможение ХЛ-реакции и выраженное смещение пика хемилюминесцентной кривой вправо, особенно у перепелов 60-, 90- и 120-суточного возраста (рисунок 11).

Самое длительное время выхода на пик продукции спонтанных люминолзависимых радикалов составило  $64,4 \pm 14,4$  мин. и  $70,0 \pm 7,0$  мин. у перепелов двух- и четырёх месяцев жизни соответственно. Торможение времени достижения максимума ХЛ при активированной люминолзависимой реакции зарегистрировано у перепелов 90- 180- и 240-суточного возраста. Очевидно, при антигенной активации клеток частицами латекса наряду с прооксидантными реакциями запускаются и ферментные механизмы антиоксидантной защиты, «гасящие» образование вторичных свободных кислородных радикалов.

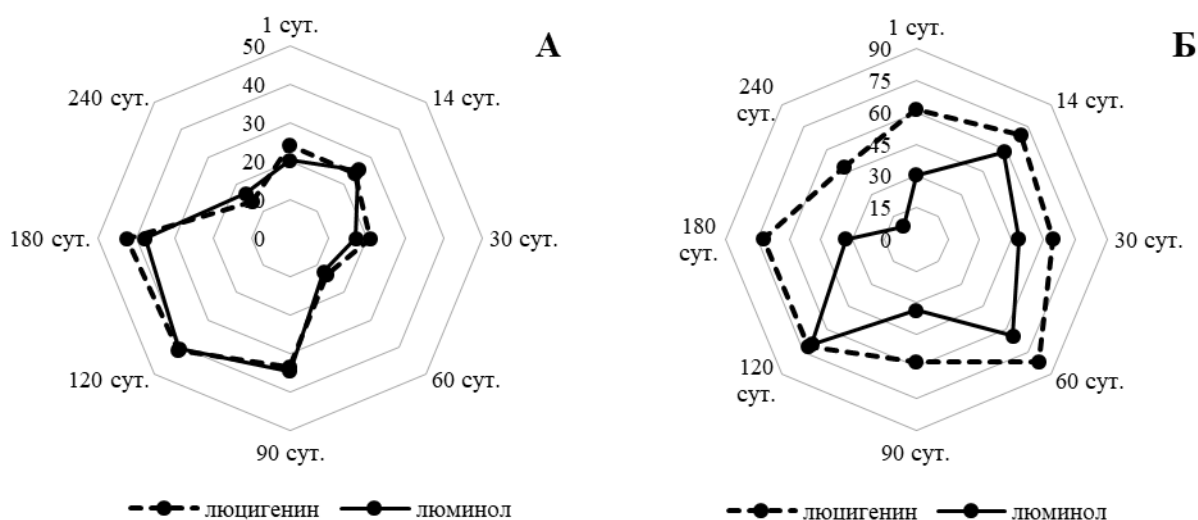


Рисунок 11 – Возрастные особенности времени достижения максимума активированной (А) и спонтанной (Б) хемилюминесценции клеток крови японских перепелов,  $T_{max}$ , мин.

При генерации спонтанных люцигенинзависимых радикалов время достижения максимума ХЛ достигло наибольших величин –  $81,8 \pm 3,7$  мин. и  $72,0 \pm 0,4$  мин. у перепелов 60- и 180-суточного возраста. Показатели спонтанной люцигенинусиленной реакции во все возрастные периоды превышали показатели индуцированной хемилюминесценции, разница

колебалась от 70-73% у 90-, 120- и 180-суточных перепелов ( $P \leq 0,05$ ), до 2,5-6 раз – у птицы других возрастов ( $P \leq 0,001$ ).

Полученные в ходе проведения хемилюминесцентного анализа цифровые данные позволили рассчитать *удельную антигениндуцированную продукцию* свободных радикалов кислорода на один лейкоцит и фагоцит крови перепела (таблица 9).

Таблица 9 – Возрастные показатели удельной генерации АФК лейкоцитами и фагоцитами крови перепелов при люцигенин- и люминолзависимой хемилюминесценции, индуцированной частицами латекса, имп./кл.  $\times 10^6$

Возраст, сутки	Люминолзависимая ХЛ		Люцигенинзависимая ХЛ	
	имп./лейкоцит	имп./фагоцит	имп./лейкоцит	имп./фагоцит
1-е	0,33±0,11	1,92±0,24	2,25±0,64	13,56±1,62
14-е	0,73±0,15	2,26±0,36	7,63±2,17*	27,52±8,71
30-е	0,58±0,19	1,00±0,25*	5,15±1,10*	9,66±2,24
60-е	0,60±0,16	0,89±0,25*	4,50±1,05	6,93±1,90*
90-е	0,83±0,25	1,41±0,40	18,33±4,78**▪	33,76±9,95▪
120-е	1,41±0,21***	2,61±0,50	16,55±2,94***	30,59±6,76*
180-е	2,20±0,75*	5,66±2,82	31,05±10,67*	78,70±32,28
240-е	0,61±0,22	1,18±0,44	3,46±1,06▪	7,24±3,01▪

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$  по сравнению с суточной птицей; ▪ –  $P \leq 0,05$  – относительно показателей предыдущего возраста

Удельная антигенактивированная люцигенинзависимая генерация АФК лейкоцитами крови характеризовалась достоверным ростом относительно исходных величин, кроме показателей 60- и 240-суточной птицы. Максимальные удельные объёмы свободных радикалов на лейкоцит

установлены у перепелов с трёх- до шестимесячного возраста. Они в 7-14 раз превышали показатели суточной птицы и отличались крайней степенью неоднородности, на что указывала высокая вариабельность индивидуальных значений, особенно у птицы 180-суточного возраста (таблица 9). Все исследованные перепела клинически здоровы, однако значительный разброс индивидуальных показателей свободнорадикального метаболизма у взрослых особей может косвенным образом свидетельствовать о доклинической стадии развития тех или иных патологических процессов в их организме.

Удельная продукция люцигенинзависимых АФК активированными фагоцитами крови превысила исходные данные в 2-2,3 раза на 14-е, 90-е и 120-е сутки жизни и почти в шесть раз – у 180-суточных перепелов, однако, вследствие высокой вариабельности значений достоверные различия установлены только у птицы четырёхмесячного возраста ( $P \leq 0,05$ ). Минимальные значения удельной люцигенинзависимой продукции АФК фагоцитами зарегистрированы на 60-е и 240-е сутки.

Исследования показали, что удельная продукция люминолзависимых радикалов лейкоцитами крови во все возрастные периоды превышала стартовые величины. Однако достоверные отличия зафиксированы только у перепелов 120-суточного возраста ( $P \leq 0,001$ ) и на 180-е сутки жизни ( $P \leq 0,05$ ). Удельная продукция люминолзависимых АФК активированными фагоцитами на 30-е и 60-е сутки сократилась более, чем в два раза относительно исходных данных ( $P \leq 0,05$ ), а у птицы 120- и 180-суточного возраста, наоборот, выросла на 34% и в 2,9 раза соответственно.

*Индекс активации.* Немаловажное значение в оценке свободнорадикальных процессов, протекающих в организме, имеет показатель индекса активации. Установлено, что у суточных перепелов индекс активации при образовании люцигенинзависимых радикалов в два раза выше, чем при использовании в качестве ХЛ-зонда люминола (рисунок 12).

В дальнейшем показатели индекса активации при продукции люцигенинзависимых АФК колебались в незначительном диапазоне и на 60-е сутки упали до минимальной величины – 1,6 усл. ед. ( $P \leq 0,05$ ), что являлось, на наш взгляд, признаком низкого уровня неспецифической резистентности двухмесячных перепелов. Всплеск показателей индекса активации установлен у птицы 120-суточного возраста ( $P \leq 0,05$ ).

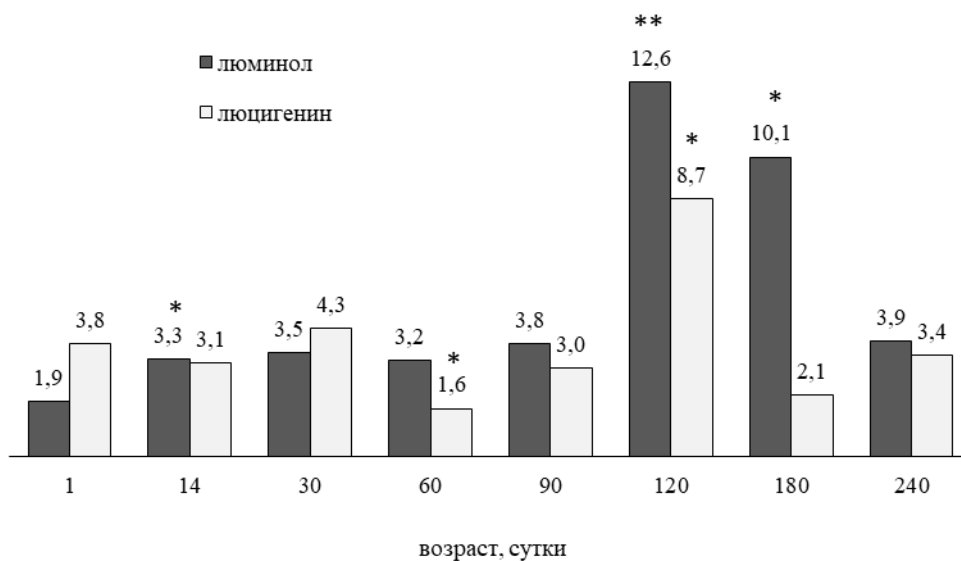


Рисунок 12 – Индекс активации люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции клеток крови японских перепелов разного возраста, усл. ед. Примечание: \*  $P \leq 0,05$  и \*\*  $P \leq 0,01$  – относительно исходных данных

Достоверный рост индекса активации при генерации люминолзависимых АФК отмечен на 14-е и 180-е сутки ( $P \leq 0,05$ ) и, особенно, на 120-е и жизни перепелов ( $P \leq 0,01$ ). Эти показатели в два, семь и пять раз соответственно превысили исходные величины.

*Фагоцитарная активность.* Показатель фагоцитарной активности лейкоцитов представляет соотношение количества клеток с частицами латекса в цитоплазме к общему содержанию лейкоцитов, выраженное в процентах. Отмечены значительные способности фагоцитов крови перепелов к поглощению латекса. В цитоплазме каждого фагоцита насчитывается до семи-девяти и более частиц латекса. Исследование возрастных особенностей

фагоцитарной активности лейкоцитов показало минимальные величины у суточных перепелов –  $15,63 \pm 4,07\%$ , что свидетельствовало о крайне низких функциональных способностях фагоцитов к реакции на раздражение частицами латекса *in vitro* (таблица 10). Спустя две недели показатели выросли более, чем в два раза ( $P \leq 0,05$ ). К концу первого месяца жизни разница со исходными показателями увеличилась в 3,5 раза ( $P \leq 0,001$ ).

Активность фагоцитов интенсивно росла и достигла максимума у 60-суточной птицы –  $68,08 \pm 3,56\%$ , что в 4,36 раза превысило исходные данные ( $P \leq 0,001$ ). Начиная с третьего месяца жизни, способность лейкоцитов к поглощению частиц латекса стала снижаться. Однако высокие значения исследуемого параметра сохранялись у 90- и 120-суточных перепелов, они в 3,72 раза и 3,57 раза превышали показателей суточной птицы ( $P \leq 0,001$ ).

Таблица 10 – Возрастная динамика показателей фагоцитарной активности лейкоцитов крови перепелов

Возраст, сутки	Кол-во, гол.	Фагоцитарная активность, %	% от показателей суточной птицы
1-е	5	$15,63 \pm 4,07$	–
14-е	5	$32,70 \pm 5,07^*$	209
30-е	5	$54,86 \pm 5,49^{***}$	351
60-е	6	$68,08 \pm 3,56^{***}$	436
90-е	6	$58,27 \pm 3,87^{***}$	372
120-е	7	$55,83 \pm 2,80^{***}$	357
180-е	7	$42,76 \pm 3,28^{**}$	274
240-е	5	$51,67 \pm 7,26^{***}$	331

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  по сравнению с суточной птицей



У перепелов 180-суточного возраста зафиксировано сокращение фагоцитарного индекса на 34% относительно показателей предыдущего возраста. В то же время данная величина в 2,74 раза превысила исходные величины ( $P \leq 0,01$ ). К 240-м суткам величина ФА составила в среднем  $51,67 \pm 7,26\%$ , что в 3,31 раза меньше начальных величин ( $P \leq 0,001$ ).

Таким образом, общее содержание лейкоцитов крови перепелов не имеет достоверных межвозрастных различий, за исключением низких показателей у птицы 120- и 240-суточного возраста. Основной клеточной популяцией лейкоцитов первых двух месяцев жизни, в отличие от кур, являются лимфоциты, гранулоцитарный профиль крови характерен для перепелов трёх- и четырёхмесячного возраста.

Функциональные возможности лейкоцитов перепелов достигают максимальных величин в двух-трёхмесячном возрасте, что характеризуется высокими показателями фагоцитарной активности и способностью продуцировать значительные объёмы активных форм кислорода.

Установлено преобладание продукции первичных люцигенинзависимых радикалов клетками крови перепелов, как в спонтанном, так и в активированном состоянии. Минимальная суммарная генерация всех форм АФК отмечена у перепелов суточного и 240-суточного возраста. Стимуляция фагоцитов крови частицами латекса сокращает время достижения максимума хемилюминесценции в пять-семь раз. Полученные данные дополняют сведения о механизмах неспецифической резистентности организма перепелов и имеют теоретическое и прикладное значение в ветеринарии и биологии.

### 2.2.3 Хемилюминесцентный анализ клеток органов иммуногенеза цыплят раннего возраста

Исследование функционального состояния клеток органов иммуногенеза (клоакальной сумки, селезёнки и костного мозга) цыплят раннего возраста показало, что они значительно отличаются интенсивностью кислородного метаболизма и характеризуются функциональной незрелостью.

На ранних этапах развития для органов иммуногенеза свойственны значительные морфологические изменения. Так, линейные размеры селезёнки за три недели постнатального онтогенеза увеличиваются в 5-7 раз (рисунок 13).

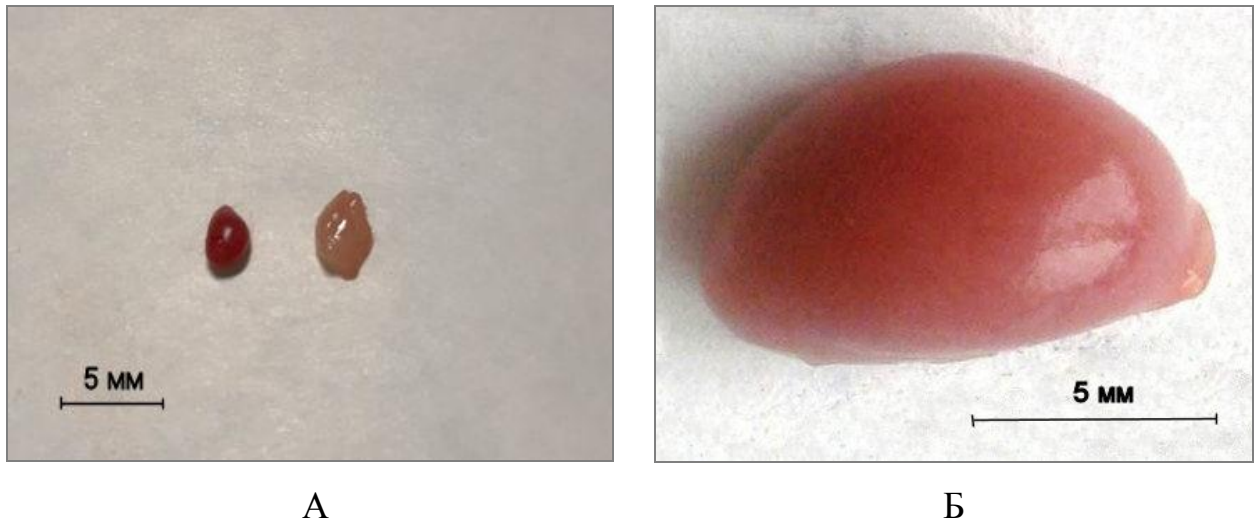
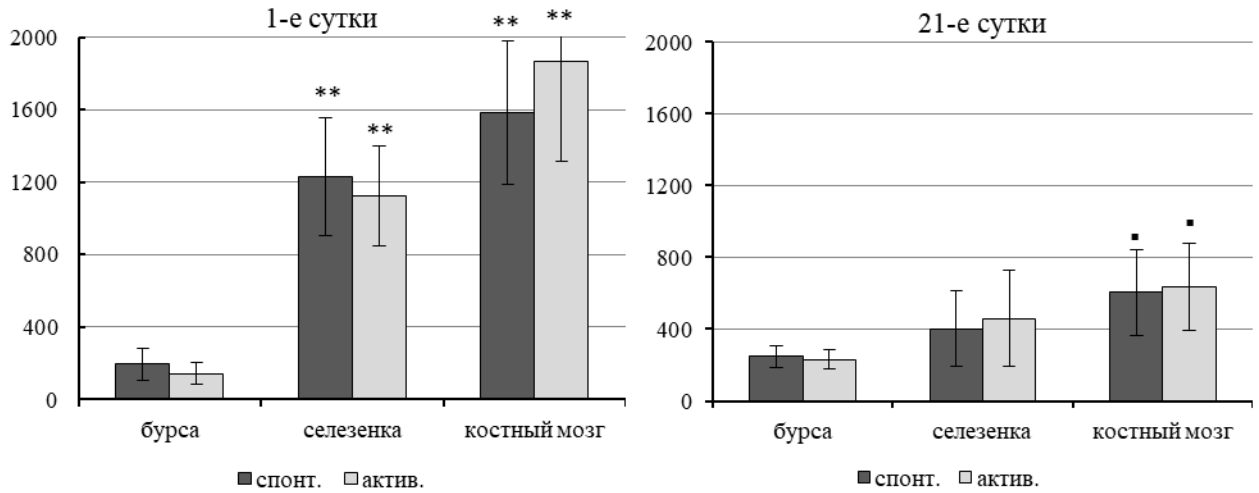


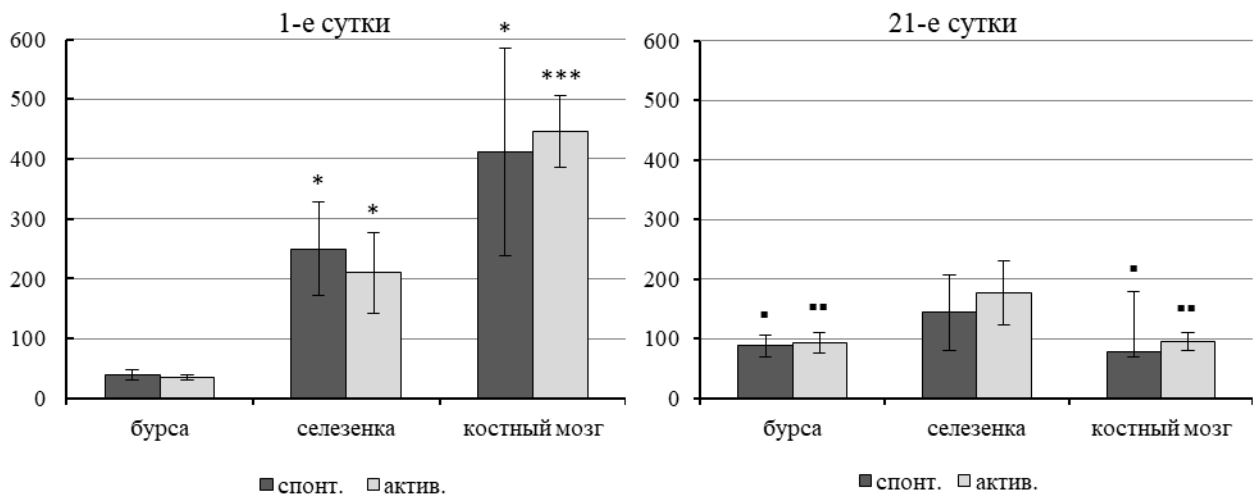
Рисунок 13 – Селезёнка и клоакальная сумка суточного (А) и селезёнка трёхнедельного (Б) цыпленка

При оценке уровня кислородного метаболизма этих органов установлено, что *максимальная интенсивность генерации* первичных люцигенинзависимых АФК (супероксиданиона) клетками органов иммуногенеза, как при спонтанной, так и антигениндуцированной хемилюминесценции в четыре-пять раз превышала показатели продукции люминолзависимых радикалов.

Эти данные согласуются с результатами наших исследований хемилюминесценции клеток крови кур и перепелов и подтверждают видовые особенности течения свободнорадикальных процессов в клетках органов и тканей сельскохозяйственных птиц (рисунок 14).



#### люцигенинзависимая ХЛ



#### люминолзависимая ХЛ

Рисунок 14 – Максимальная интенсивность люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции клеток органов иммуногенеза цыплят раннего возраста, имп./с. Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно показателей клоакальной бursы; ▪ –  $P \leq 0,05$ ; ▪▪ –  $P \leq 0,01$  – по сравнению с суточным возрастом

Самый высокий уровень интенсивности спонтанной и активированной продукции всех видов АФК демонстрировали клетки костного мозга суточных цыплят. Их показатели превысили параметры клеток селезёнки в 1,3-2 раза, а клеток клоакальной сумки – в 8-13 раз ( $P \leq 0,01$ ), что указывало на высокую функциональную активность костномозговых клеток и отсутствие зрелых фагоцитов в клоакальной бурсе цыплят суточного возраста.

Клетки селезёнки демонстрировали высокие значения амплитуды хемилюминесцентной кинетики, однако антигенная активация *in vitro* частицами латекса не усиливала, а подавляла продукцию ими любых форм АФК на 9-16% относительно показателей спонтанной генерации. Аналогичная ответная реакция на антигенное раздражение наблюдалось в клетках клоакальной бursы.

У трёхнедельных цыплят значение максимальной интенсивности спонтанной и активированной генерации люцигенинзависимых АФК клетками костного мозга сократилось относительно показателей суточной птицы в 2,6-2,9 раз ( $P \leq 0,05$ ), а люминолзависимых радикалов кислорода в 4,6-5,2 раза ( $P \leq 0,01$ ). Интенсивность свободнорадикальных процессов в клетках селезёнки цыплят 21-суточного возраста упала почти в три раза при генерации люцигенинзависимых радикалов и на 26-42% при люминолзависимой ХЛ.

Способности клеток клоакальной бursы продуцировать свободные радикалы кислорода за первые три недели жизни выросла в 2,3-2,7 раза при использовании люминола в качестве ХЛ-зонда и на 26-59% – при применении люцигенина, что, на наш взгляд, свидетельствовало о появлении в органе радикалообразующих фагоцитов, обладающих высокой функциональной активностью. Тем не менее, величина максимальной интенсивности люминол- и люцигенинзависимой ХЛ-реакции клетками бursы у трёхнедельной птицы оставалась ниже показателей костномозговых клеток в 2,4-2,8 раза, а клеток селезёнки – в 1,6-2 раза.

*Суммарная продукция АФК.* Минимальные суммарные объёмы всех видов АФК демонстрировали клетки клоакальной бурсы суточных цыплят (рисунок 15). Антигенная стимуляция клеток частицами латекса *in vitro* снижала продукцию первичных люцигенинзависимых радикалов почти на 30% относительно объёмов АФК, полученных при спонтанной ХЛ-реакции. При этом возрастающая величина объёма продукции люминолзависимых АФК антигенактивированных клеток свидетельствовала об активации антиоксидантных агентов, утилизирующих супероксиданионы.

Значения параметров светосуммы люцигенинзависимой хемилюминесценции костномозговых клеток превысили показатели клеток бурсы при спонтанной реакции на 67%, а при активированной кинетике – в 3,5 раза ( $P \leq 0,05$ ). При этом суммарная генерация люминолзависимых радикалов клетками костного мозга превысила показатели клеток клоакальной сумки в пять раз при активированной ( $P \leq 0,001$ ) и в четыре раза – при спонтанной ХЛ ( $P \leq 0,05$ ).

Суммарные объёмы спонтанных и антигенактивированных люцигенинзависимых АФК, образованные клетками селезёнки больше, чем индуцированные клетками клоакальной бурсы на 22% и 91%, а люминолзависимых – в 2,2-2,6 раза ( $P \leq 0,05$ ). Разница между суммарной продукцией спонтанных и индуцированных люцигенинзависимых радикалов, генерируемых клетками костного мозга и селезёнки, составила 37% и 83% соответственно, а люминолзависимых АФК – в 1,6 раза при спонтанной ХЛ и в 2,4 раза при активированной ХЛ-реакции ( $P \leq 0,001$ ).

Следует отметить, что индивидуальные хемилюминесцентные показатели костномозговых клеток у суточной птицы отличались крайней неоднородностью, о чем свидетельствовала высокая вариабельность значений светосуммы (рисунок 15). За три недели наблюдений объёмы продукции люцигенинзависимых АФК клетками костного мозга молодняка кур при спонтанной и активированной ХЛ-реакции сократились в 2-2,4 раза,

а люминолзависимых радикалов – в 3,5-3,7 раза относительно исходных величин ( $P \leq 0,001$ ).

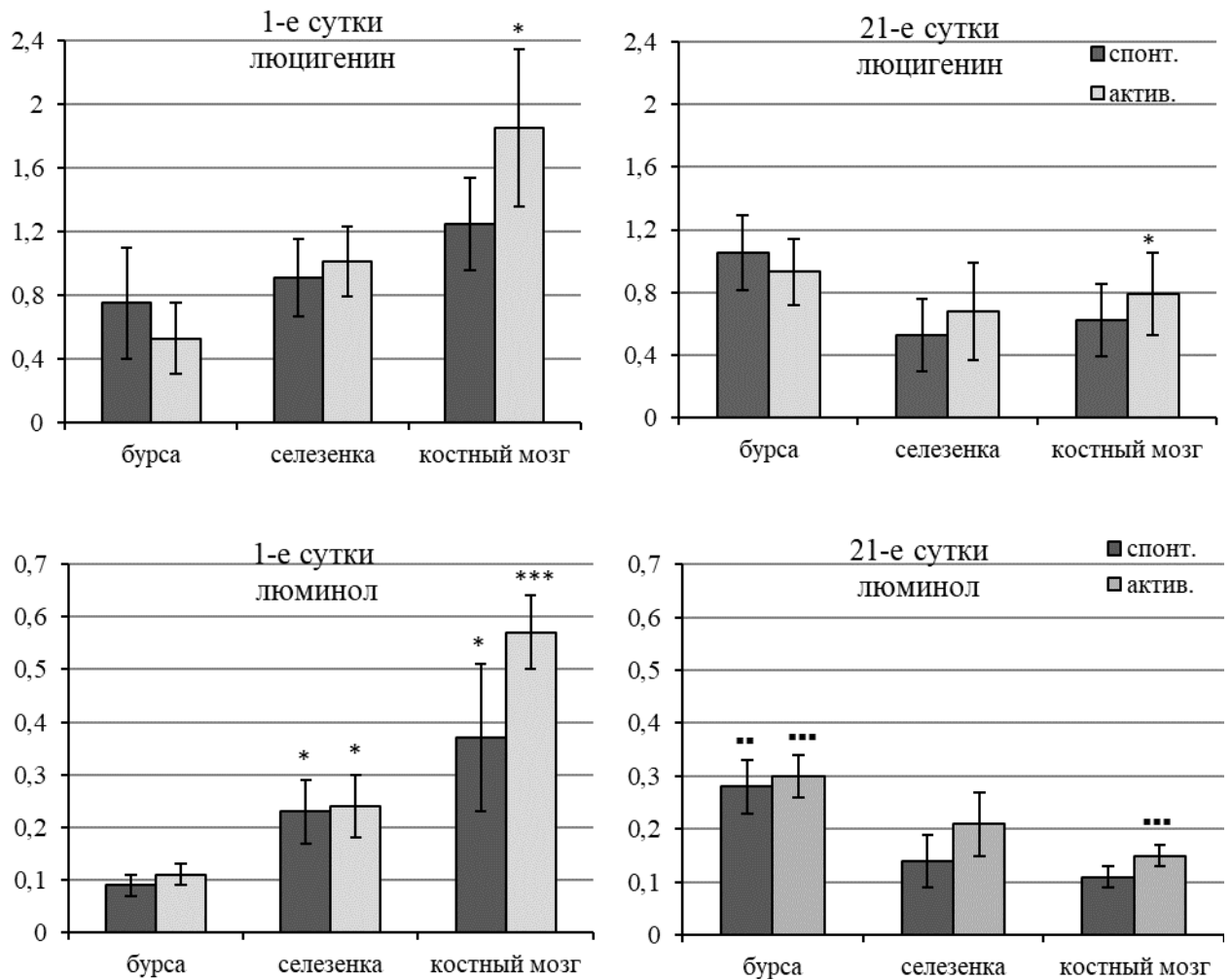


Рисунок 15 – Суммарный объём люминол- и люцигенинзависимых АФК при спонтанной и активированной ХЛ клетками органов иммуногенеза цыплят раннего возраста. Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно показателей клоакальной бурсы; ▪ –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$  – по сравнению с суточным возрастом, имп. за 90 мин.  $\times 10^6$

Клетки селезёнки сократили продукцию АФК на 20-45% относительно показателей суточных цыплят, в то время как клетки клоакальной бурсы увеличили объёмы первичных люцигенинзависимых радикалов в 1,4-1,8 раза,

а вторичных люминолзависимых АФК – почти в три раза по сравнению с исходными данными суточной птицы ( $P \leq 0,01$ ). Спонтанная продукция первичных радикалов клетками бursы преобладала над антигениндуцированной генерацией на 13,5%, что указывало, на наш взгляд, на повышенную активность антиоксидантных компонентов, способных разрушать первичные кислородные радикалы.

Значения параметров *времени достижения максимума хемилюминесценции* отличались в разных органах, на них влиял выбор ХЛ-зонда, антигенная стимуляция клеток и возраст птицы (таблица 11). Самый длительный выход хемилюминесценции на максимум отмечен у клеток клоакальной бursы, наиболее быстрый – у клеток селезёнки.

Таблица 11 – Время достижения максимума (мин.) люминол- и люцигенинзависимой спонтанной и антигениндуцированной *in vitro* хемилюминесценции клеток органов иммуногенеза цыплят раннего возраста

ХЛ-зонд	1-суточные цыплята		21-суточные цыплята	
	спонтанная	активированная	спонтанная	активированная
<i>Клоакальная бурса</i>				
люминол	15,0±5,0	16,3±3,9	14,0±4,6	12,0±4,2
люцигенин	16,8±2,7	19,8±2,9	30,0±6,9	23,5±8,3
<i>Селезёнка</i>				
люминол	7,0±1,2	9,5±0,6	4,5±0,5	6,5±0,6
люцигенин	7,0±0,8**	9,0±1,1**	8,3±1,2*	9,8±1,0
<i>Костный мозг</i>				
люминол	6,0±1,0	9,5±1,5	6,0±1,0	10,3±0,8
люцигенин	6,5±0,5**	9,5±0,3**	10,3±0,8*	12,3±0,4

Примечание: \* –  $P \leq 0,5$ , \*\* –  $P \leq 0,1$  по сравнению с показателями клоакальной бursы

Кинетика хемилюминесценции клеток селезёнки и костного мозга в 2-2,5 раза быстрее достигали максимума, чем показатели клеток клоакальной бursы, как в первые сутки жизни, так и у птицы трёхнедельного возраста. У цыплят суточного возраста антигенное раздражение клеток всех органов частицами латекса тормозила люминол- и люцигенинзависимую ХЛ-реакцию и увеличивала показатели  $T_{max}$  от 9-18% (клоакальная бурса) до 28-67% (селезёнка и костный мозг).

С возрастом клетки органов иммуногенеза отвечали на антигенное раздражение латексом сокращением на 7-19% времени достижения максимума люминолзависимой реакции и торможением люцигенинзависимой ХЛ, особенно выраженным в клоакальной бурсе.

*Индекс активации* является важным параметром функциональной активности клеток. Он показывает потенциальные возможности фагоцитов к генерации свободных радикалов кислорода в ответ на антигенную стимуляцию. Установлено положительное влияние возраста птицы на функциональную активность фагоцитов селезёнки, о чем свидетельствовал рост индекса активации клеток при генерации люминолзависимых АФК с 1,06 до 1,82 усл. ед., то есть на 72% ( $P \leq 0,05$ ), а люцигенинзависимых радикалов – на 9% с 1,16 до 1,27 усл. ед. (рисунок 16). Индекс активации костномозговых клеток за первые три недели жизни снижался при продукции люцигенин- и люминолзависимых АФК на 10%.

Антигенная стимуляция клеток клоакальной сумки у птицы суточного и трёхнедельного возраста подавляла продукцию люцигенинзависимых АФК, что, возможно, связано с активацией внутриклеточных антиоксидантных ферментов, выполняющих функцию перехватчиков первичных свободных радикалов. Это привело к сокращению показателей индекса активации до 0,78 и 0,97 ед. соответственно. При образовании люминолзависимых радикалов индекс активации составил 1,22 ед. и с возрастом сократился на 17% до 1,01 ед.



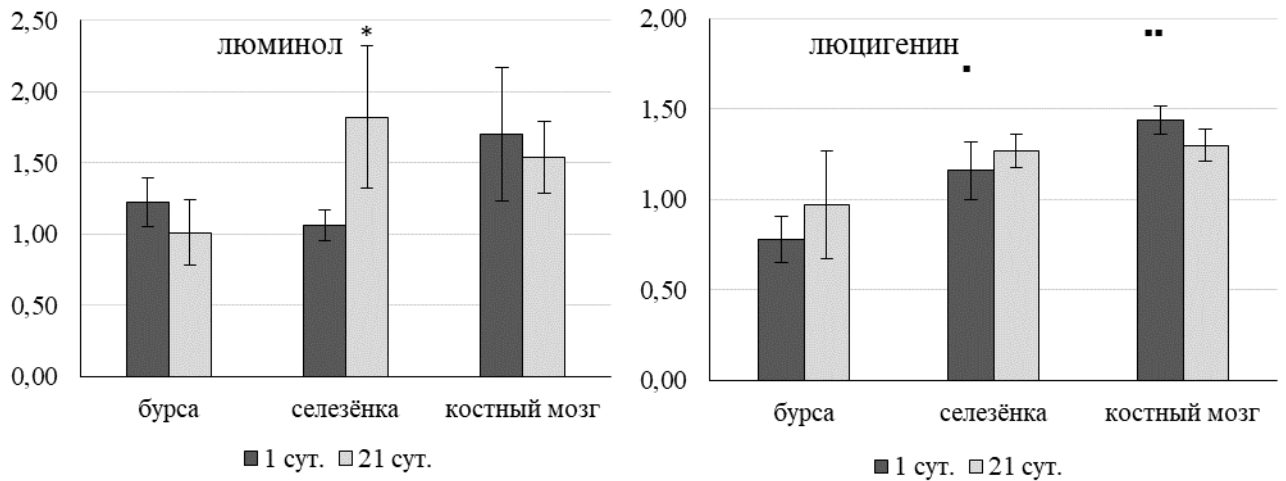


Рисунок 16 – Возрастная динамика показателей индекса активации продукции люминол- и люцигенинзависимых АФК клетками органов иммуногенеза цыплят, усл. ед. Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  относительно показателей суточного возраста; ▪ –  $P \leq 0,05$  и \*\* –  $P \leq 0,01$  по сравнению с показателями бурсы

Таким образом, костномозговые клетки молодняка кур раннего возраста характеризуются высокой активностью кислородного метаболизма. Суспензии клеток селезёнки и, особенно, клоакальной бурсы отличаются низким уровнем течения свободнорадикальных процессов у суточной птицы, и подавлением способности к индукции «респираторного взрыва» при антигенном ответе *in vitro*, что, вероятно, связано с отсутствием или низким содержанием в исследуемых органах зрелых фагоцитов и радикалообразующих клеток, прежде всего гранулоцитов. Потенциальные возможности фагоцитов селезёнки с возрастом увеличиваются, о чем свидетельствует рост индекса активации клеток.

Полученные данные указывают на морфофункциональную незрелость органов иммуногенеза, участвующих в неспецифической защите и иммунных реакциях у птицы раннего возраста.

## 2.2.4 Особенности морфологических показателей и хемилюминесценции крови кур при иммунизациях

Исследована структурно-функциональная характеристика клеток крови молодняка кур при иммунизациях против вирусных и бактериальных инфекций: против инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ); болезни Гамборо (БГ); инфекционного ринита птиц (гемофилеза); комплексной вакцинации против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и синдрома снижения яйценоскости и (НБ+ ИБК+ССЯ).

### 2.2.4.1 Оценка морфофункционального состояния клеток крови при вакцинации кур против инфекционного ларинготрахеита

Иммунизация птицы против инфекционного ларинготрахеита влияла на *общее содержание лейкоцитов* и вызвала умеренный лейкоцитоз. Количество лейкоцитов до вакцинации составило  $7,14 \pm 0,25 \times 10^9/\text{л}$ . Спустя 48 час. после прививки наблюдался рост показателя на 7%, а после 96 час. произошло достоверное увеличение числа лейкоцитов в 2,3 раза относительно исходных контрольных показателей ( $P \leq 0,01$ ).

*Фагоцитарная активность.* Прививка кратковременно стимулировала фагоцитарную активность лейкоцитов крови в отношении частиц латекса (рисунок 17). Через 48 час. после иммунизации фагоцитарный индекс вырос на 41,5% по сравнению с контролем ( $P \leq 0,05$ ), а спустя 96 час. – сократился, тем не менее на 16,5% превышал показатели контроля.

Данные об общем содержании лейкоцитов у привитой птицы и их фагоцитарной активности позволили рассчитать абсолютное содержание фагоцитов в крови (рисунок 18). Количество фагоцитов в поствакцинальный период выросло с  $3,01 \times 10^9/\text{л}$  до  $7,96 \times 10^9/\text{л}$  через 96 час. после иммунизации, то есть в 2,6 раза относительно исходных данных ( $P \leq 0,01$ ).

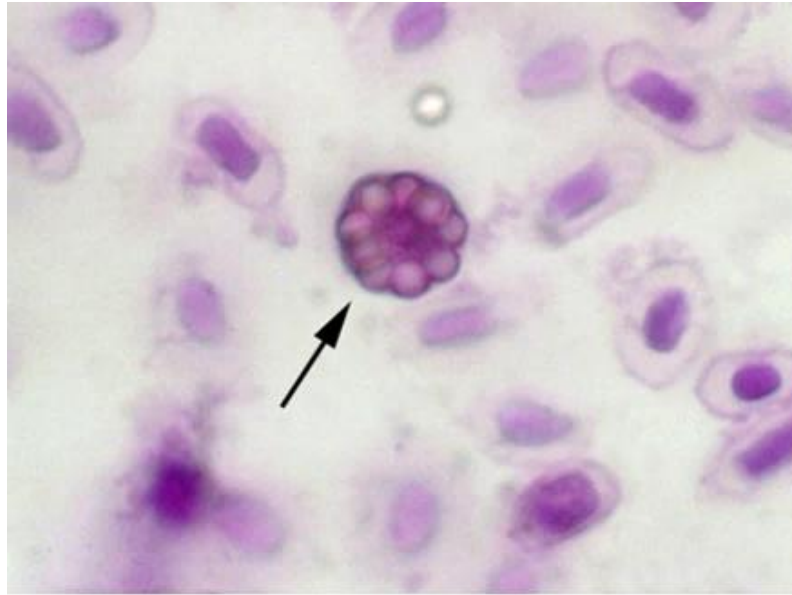


Рисунок 17 – Фагоцит крови с частицами латекса в цитоплазме (указано стрелкой) и свободная частица латекса. Окраска 0,25%-ным генцианвиолетом,  $\times 1000$

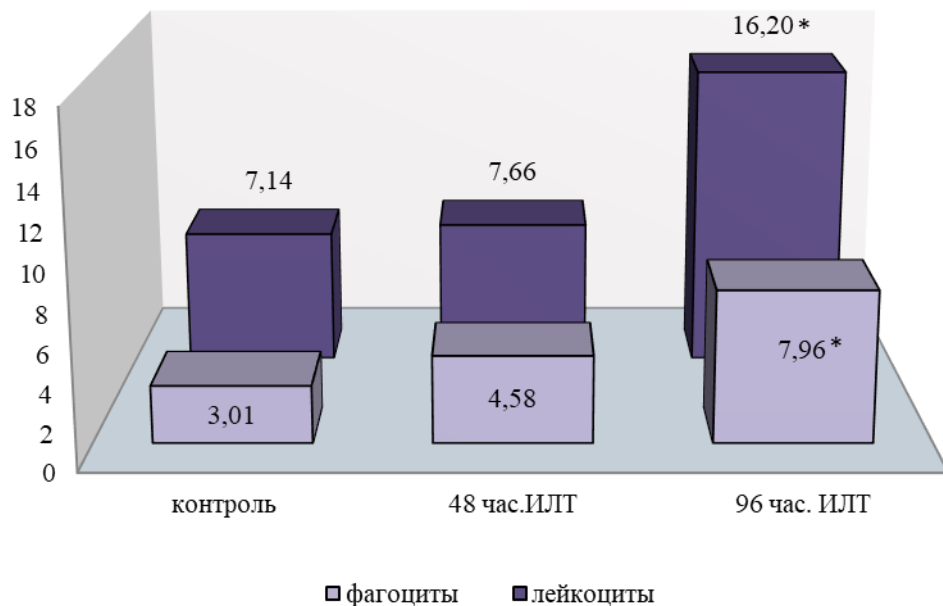


Рисунок 18 – Абсолютное содержание лейкоцитов, в том числе фагоцитов, у привитых против инфекционного ларинготрахеита цыплят,  $\times 10^9/\text{л}$ . Примечание: \* –  $P \leq 0,01$  относительно контроля

*Хемиллюминесцентный анализ.* Вакцинация молодняка кур против ИЛТ влияла на течение свободнорадикальных процессов в клетках крови привитой птицы. *Максимальная интенсивность* продукции люцигенинзависимых АФК при активированной реакции через 48 час. после прививки выросла на 10%, а при спонтанной ХЛ осталась без изменений (таблица 12). Через 96 час. показатели выросли как при активированной, так и спонтанной генерации на 36% и 45% соответственно относительно контроля ( $P \leq 0,05$ ).

Таблица 12 – Максимальная интенсивность продукции люцигенин- и люминолзависимых АФК клетками крови кур, привитыми против ИЛТ при активированной и спонтанной ХЛ-реакции (импульс/с)

Состояние птицы	Люцигенинзависимая ХЛ		Люминолзависимая ХЛ	
	активированная	спонтанная	активированная	спонтанная
контроль	3536,3±704,5	3311,0±796,7	194,0±78,4	76,8±24,2
48 час. ИЛТ	3896,5±948,6	3304,5±794,7	185,5±53,3	131,3±58,9
96 час. ИЛТ	4804,3±1335,2*	4795,0±1539,2*	251,0±92,2	163,0±40,4*

Примечание: \*  $P \leq 0,05$  по сравнению с контролем

Иммунизация незначительно влияла на интенсивность активированной люминолзависимой реакции, но стимулировала спонтанную продукцию АФК на 71%. Через 96 час. показатели при активированной хемиллюминесценции выросли почти на 30%, а при спонтанной – более, чем в два раза с 76,8±24,2 имп./с до 163,0±40,4 имп./с ( $P \leq 0,01$ ).

*Суммарная генерация* первичных и вторичных свободных кислородных радикалов, определяемая в течение всей ХЛ-реакции, незначительно превысила показатели контроля через 48 час. (таблица 13). Через 96 час.

после иммунизации общая продукция люцигенинзависимых АФК выросла в два раза, а люминолзависимых радикалов – в 2,5-3 раза, как в спонтанном, так и активированном состоянии ( $P \leq 0,05$ ). Однако значительные колебания индивидуальных показателей экспериментальной птицы в этот период негативно отразились на степени достоверности сравниваемых величин.

Таблица 13 – Суммарные объёмы продукции спонтанных и активированных люцигенин- и люминолзависимых радикалов кислорода клетками крови молодняка кур, привитого против ИЛТ (имп. за 90 мин.  $\times 10^6$ )

Состояние птицы	Люцигенинзависимая ХЛ		Люминолзависимая ХЛ	
	активированная	спонтанная	активированная	спонтанная
контроль	3,63±0,71	3,58±0,86	0,24±0,09	0,10±0,03
48 час. ИЛТ	3,95±0,92	3,45±0,67	0,26±0,07	0,16±0,06
96 час. ИЛТ	7,51±2,60	7,12±2,48	0,59±0,13*	0,31±0,11

Примечание: \*  $P \leq 0,05$  относительно контроля

*Время достижения максимума хемилюминесценции* – это время наступления максимальной ответной реакции на антигенную стимуляцию фагоцитов частицами латекса, практически не изменялось у привитой птицы через 48 час. после иммунизации. Однако, отмечено значительное торможение генерации люцигенинзависимых и люминолзависимых свободных радикалов через 96 час. после вакцинации (таблица 14). Так, при активированной и спонтанной люцигенинзависимой генерации АФК время достижения максимума хемилюминесценции увеличилось на 44% с 9 до 13 мин. При активированной люминолзависимой реакции время достижения максимума ХЛ выросло с 7 до 11 мин., то есть на 57% – при спонтанной

люминолзависимой ХЛ торможение реакции достигло наибольших величин – с 7 мин. до 18 мин. ( $P \leq 0,01$ ).

Таблица 14 – Время достижения максимума люцигенин- и люминолзависимой хемиллюминесценции фагоцитов периферической крови интактных и привитых против ИЛТ цыплят (мин.)

Группа	Люцигенинзависимая ХЛ		Люминолзависимая ХЛ	
	активирован.	спонтан.	активирован.	спонтан.
контроль	9,0±0,3	9,0±0,3	7,0±0,3	7,0±1,0
48 ч. ИЛТ	9,0±0,3	9,0±1,0	7,0±1,0	7,0±1,0
96 ч. ИЛТ	13,0±1,0	13,0±1,0	11,0±1,0*	18,0±4,0**

Примечание: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$  относительно контроля

Иммунизация цыплят против ИЛТ слабо влияла на показатели *индекса активации* люцигенинзависимых радикалов, но снижала параметры люминолзависимых АФК на 43% через 48 час. ( $P \leq 0,05$ ) и на 18% через 96 час. (рисунок 19).

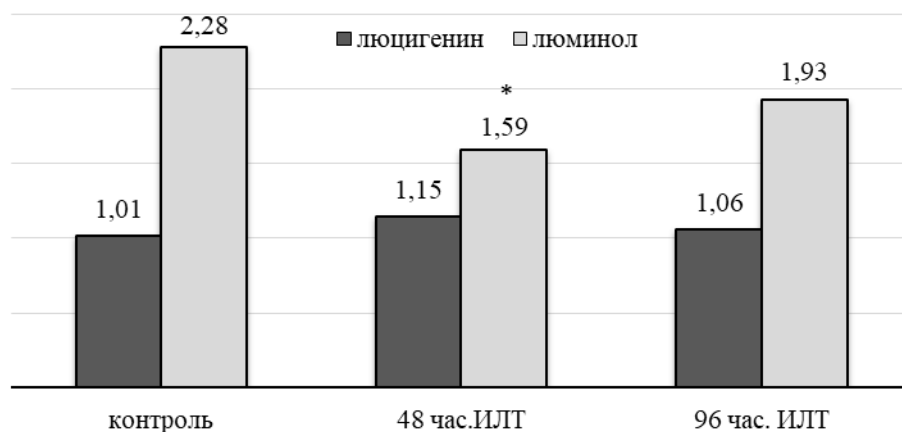


Рисунок 19 – Индекс активации люминол- и люцигенинзависимой хемиллюминесценции фагоцитов крови интактных и привитых против ИЛТ цыплят, усл. ед. Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  относительно контроля

Вакцинация молодняка кур против ИЛТ слабо влияла на *удельную антигенактивированную продукцию радикалов* лейкоцитами и вызывала кратковременное сокращение удельной продукции АФК фагоцитами крови (таблица 15). Через 48 час. после прививки снижение составило 28% при люцигенинзависимой ХЛ и почти 40% – при люминолзависимой реакции ( $P \leq 0,05$ ).

Таблица 15 – Удельная антигенактивированная продукция свободных кислородных радикалов лейкоцитами и фагоцитами крови иммунизированных против ИЛТ цыплят, имп./кл.  $\times 10^6$

Группа	Импульс/лейкоцит $\times 10^6$		Импульс/фагоцит $\times 10^6$	
	люцигенин	люминол	люцигенин	люминол
контроль	10,15 $\pm$ 2,17	0,65 $\pm$ 0,13	24,06 $\pm$ 5,12	1,82 $\pm$ 0,41
48 ч. ИЛТ	10,31 $\pm$ 2,44	0,67 $\pm$ 0,19	17,26 $\pm$ 2,70	1,11 $\pm$ 0,15*
96 ч. ИЛТ	9,27 $\pm$ 1,49	0,73 $\pm$ 0,21	18,86 $\pm$ 3,93	1,49 $\pm$ 0,32

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  относительно контроля

Таким образом, иммунизация молодняка кур против инфекционного ларинготрахеита вызывает умеренный лейкоцитоз, незначительный рост фагоцитарной активности лейкоцитов и количества фагоцитов в периферической крови, незначительно влияет на течение свободнорадикальных процессов, что выражается в слабом усилении максимальной интенсивности ХЛ-реакции и небольшом росте суммарных объёмов свободных радикалов кислорода, как в состоянии покоя, так и при антигенном раздражении фагоцитов частицами опсонизированного латекса через 96 час. после прививки.

### 2.2.4.2 Оценка морфофункционального состояния клеток крови при вакцинации кур против болезни Гамборо и гемофилёза

Вакцинация молодняка кур 21-суточного возраста против вирусной болезни Гамборо (БГ) вызвала умеренный поствакцинальный лейкоцитоз (рисунок 20). Общее содержание лейкоцитов на четвёртые сутки после прививки выросло с  $13,20 \pm 0,58 \times 10^9/\text{л}$  до  $16,03 \pm 0,62 \times 10^9/\text{л}$  ( $P \leq 0,05$ ). На 8-е сутки установлен рост количества лейкоцитов на 37% относительно контрольных показателей, их численность достигла  $18,06 \pm 1,10 \times 10^9/\text{л}$  и достоверно отличалась от исходных величин ( $P \leq 0,01$ ).

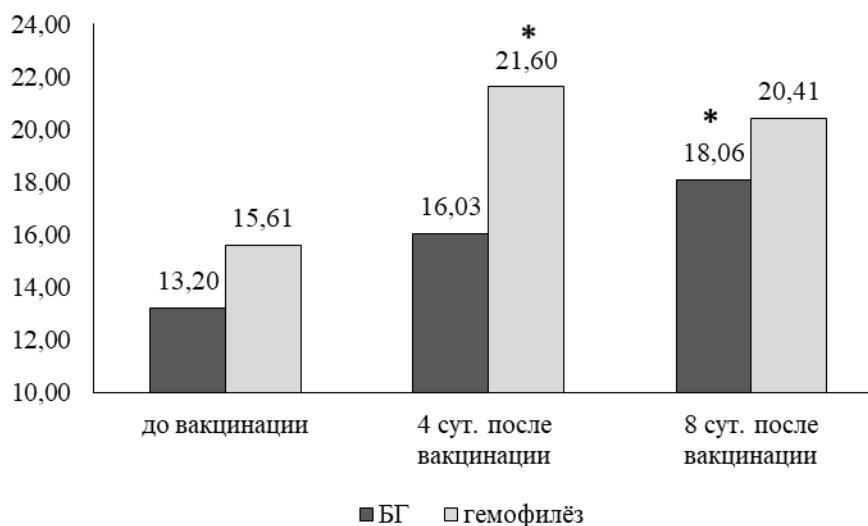


Рисунок 20 – Общее содержание лейкоцитов крови молодняка кур, привитого против болезни Гамборо (БГ) и гемофилёза,  $\times 10^9/\text{л}$ . Примечание: \* –  $P \leq 0,01$  по сравнению с контрольными исходными показателями

Иммунизация 55-суточных цыплят против гемофилёза вызвала повышение общего содержания лейкоцитов почти на 35% по сравнению с показателями крови птицы на четвёртые сутки после вакцинации против болезни Гамборо. Содержание лейкоцитов у опытных цыплят колебалось от  $11,76 \times 10^9/\text{л}$  до  $19,60 \times 10^9/\text{л}$  и в среднем составило  $15,61 \pm 2,24 \times 10^9/\text{л}$  до прививки против гемофилёза. Спустя четверо суток количество лейкоцитов

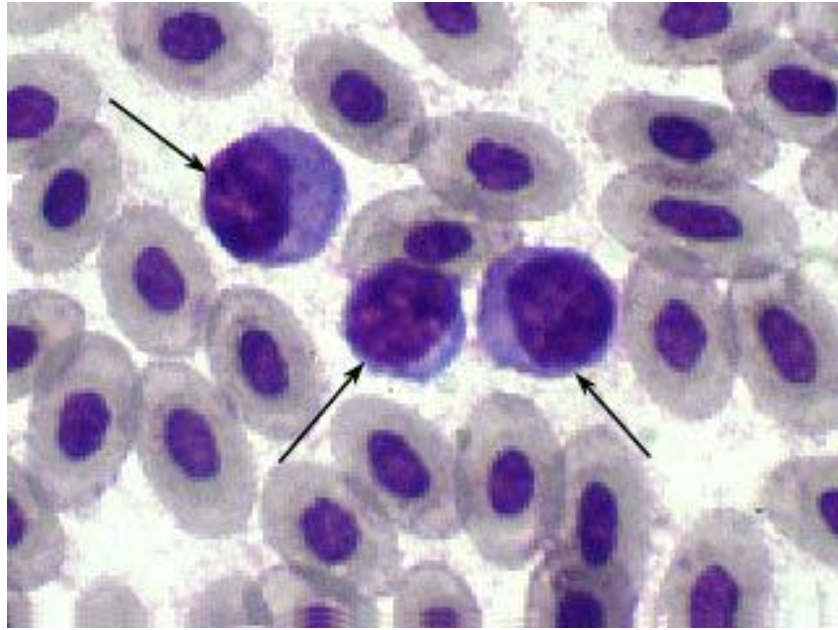


крови превысило контрольные значения почти на 40% и достигло  $21,60 \pm 1,18 \times 10^9/\text{л}$  ( $P \leq 0,01$ ). На восьмые сутки после иммунизации показатели снизились, однако достоверно превышали исходные величины ( $P \leq 0,05$ ).

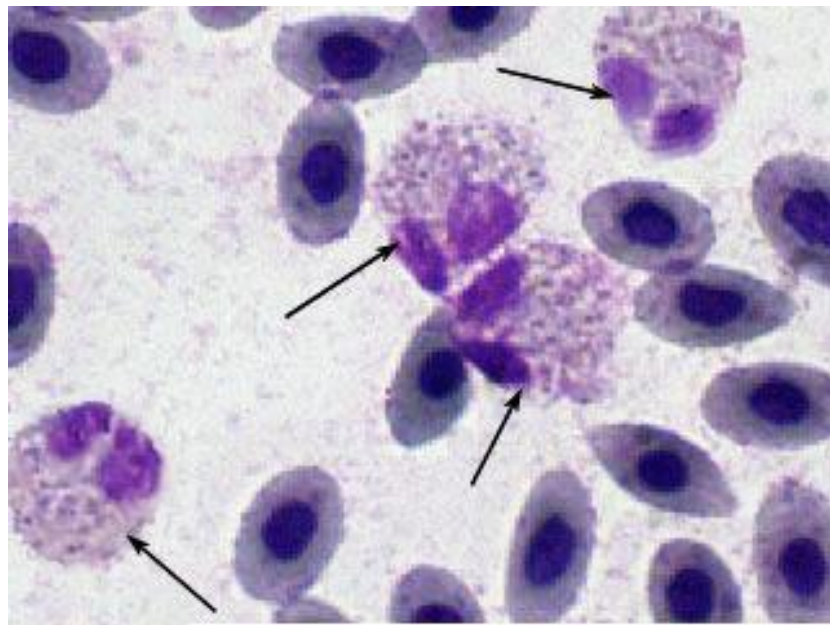
*Клеточный состав лейкоцитов.* Исследование крови привитых кур показало отличия между воздействием на организм вирусного (БГ) и бактериального (гемофилёз) антигенов, которые вызывали разнонаправленные изменения в популяции лейкоцитов. Иммунизация против БГ обусловила рост их общего содержания, прежде всего, за счет лимфоцитов (рисунок 21-А), содержание которых после прививки выросло на 18% относительно исходных данных, а позднее – увеличилось почти на 21% ( $P \leq 0,001$ ). Лимфоцитоз сопровождался сокращением относительного содержания псевдоэозинофилов. Их уровень снизился практически на 30% – с  $37,4 \pm 1,9\%$  перед прививкой до  $25,8 \pm 0,7\%$  на восьмые сутки наблюдений ( $P \leq 0,001$ ).

Вакцинация кур против гемофилёза, причиной которого являются бактерии *Haemophilus gallinarum*, обусловила подъём уровня псевдоэозинофилов и сокращение числа лимфоцитов, что наиболее ярко проявилось в ранний поствакцинальный период (рисунок 21-Б). На четвёртые сутки после вакцинации относительное количество псевдоэозинофилов увеличилось до  $35,4 \pm 3,6\%$ , то есть практически на 30%. В то же время уровень лимфоцитов сократился почти на 20% с  $64,3 \pm 1,6\%$  до  $51,6 \pm 3,9\%$  ( $P \leq 0,05$ ). В последующем содержание в крови псевдоэозинофильных гранулоцитов превысило исходные значения на 9%, а лимфоцитов – на 4%.

Относительный уровень базофилов после иммунизации против БГ составил  $0,5 \pm 0,2\%$ , что в два раза ниже исходных величин ( $P \leq 0,05$ ). Вакцинация кур против гемофилёза привела к сокращению уровня базофилов почти на 31%, однако на восьмые сутки показатели приблизились к исходным значениям. Прививка против БГ слабо влияла на количество моноцитов. В то время как последующая иммунизация птицы против гемофилёза, вызвала рост числа моноцитов с исходных  $4,9 \pm 0,8\%$  до  $9,9 \pm 0,4\%$  на восьмые сутки ( $P \leq 0,001$ ).



А



Б

Рисунок 21 – Морфология клеток крови молодняка кур, иммунизированного против болезни Гамборо (А) и гемофилёза (Б): А – скопления лимфоцитов (указано стрелками); Б – псевдоэозинофильная реакция (указано стрелками). Окраска по Паппенгейму,  $\times 1000$

Относительный уровень эозинофильных гранулоцитов в крови птицы до прививок против БГ и гемофилёза составил  $1,8 \pm 0,1\%$  и  $1,4 \pm 0,2\%$  соответственно. Иммунизация молодняка кур против БГ почти не повлияла на содержание эозинофилов, в то время как прививка птицы против гемофилёза вызвала рост их относительного числа на 74% до  $2,5 \pm 0,4\%$  (рисунок 22).

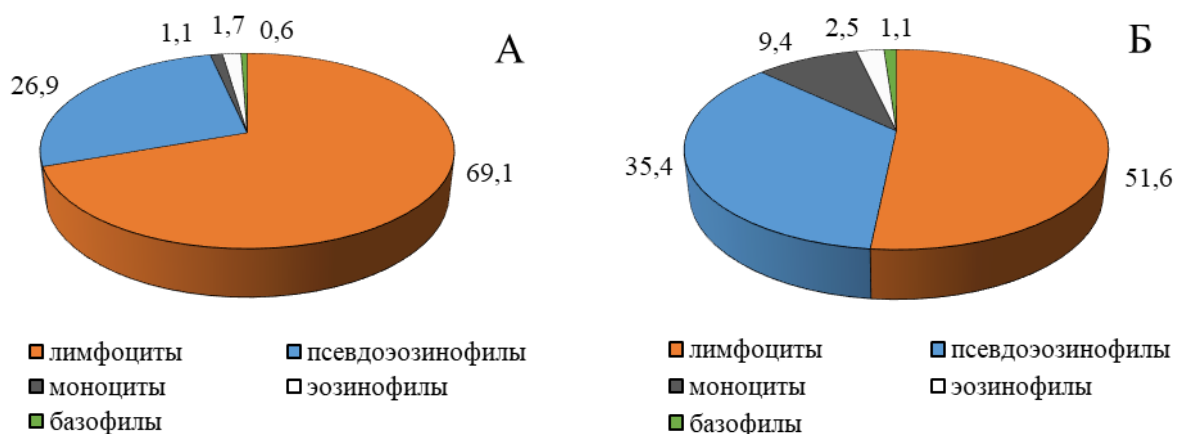


Рисунок 22 – Состав клеточной популяции лейкоцитов крови молодняка кур на четвёртые сутки после иммунизаций против болезни Гамборо (А) и гемофилёза (Б), %

*Фагоцитарная активность лейкоцитов.* Оценка функционального состояния лейкоцитов крови по фагоцитарной активности выявила стимулирующее влияние вакцинаций против БГ и гемофилёза на поглотительную активность фагоцитов (рисунок 23). Вакцинация кур против БГ вызвала поступательный рост фагоцитарного индекса (рисунок 24), который за восемь суток вырос на 32% относительно исходных данных и достиг  $51,8 \pm 1,2\%$  ( $P \leq 0,01$ ). Иммунизация кур против гемофилёза привела к росту активности лейкоцитов в отношении частиц латекса на 42,5% за период наблюдений ( $P \leq 0,01$ ).

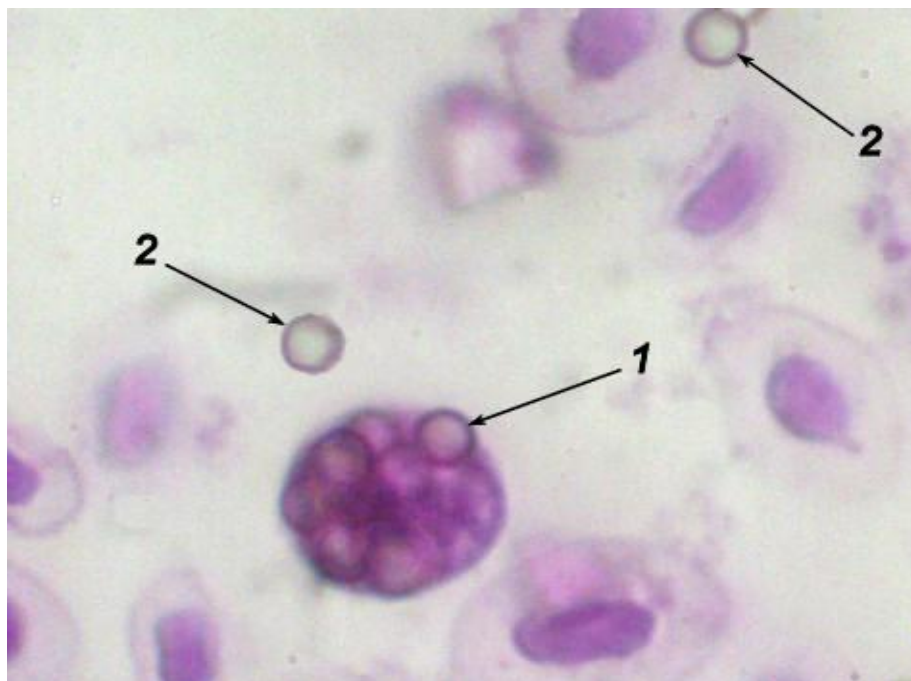


Рисунок 23 – Фагоцитоз частиц латекса лейкоцитом крови (1) и свободные частицы латекса (2). Окраска 0,25% генцианвиолетом,  $\times 1000$

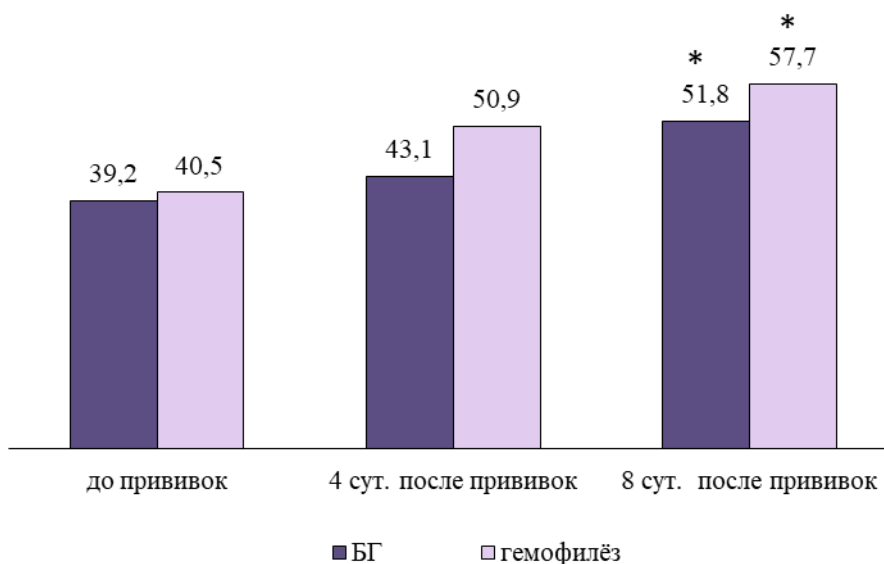


Рисунок 24 – Динамика показателей фагоцитарного индекса у вакцинированного против болезни Гамборо и гемофилёза молодняка кур, %.  
Примечание: \* –  $P \leq 0,01$  относительно исходных данных

*Хемилюминесцентный анализ.* Исследования функциональной активности клеток крови показали, что вакцинации молодняка кур 21- и 55-суточного возраста против болезни Гамборо и гемофилёза изменяли способность лейкоцитов продуцировать активные формы кислорода (АФК) как в состоянии покоя при спонтанной хемилюминесценции, так и при стимуляции клеток частицами латекса при активированной ХЛ.

*Максимальная интенсивность хемилюминесценции* Вакцинация молодняка кур на четвёртые сутки после прививки вызвала рост интенсивности спонтанной и активированной люминолзависимой хемилюминесценции на 15-17% относительно исходных величин, а люцигенинзависимой – на 34% и 83% соответственно. На восьмые сутки после прививки отмечался рост параметров спонтанной реакции и сокращение показателей антигенактивированной хемилюминесценции.

*Суммарный объём* продукции АФК является одним из основных параметров хемилюминесценции и на графике соответствует площади под хемилюминесцентной кривой (рисунок 25).

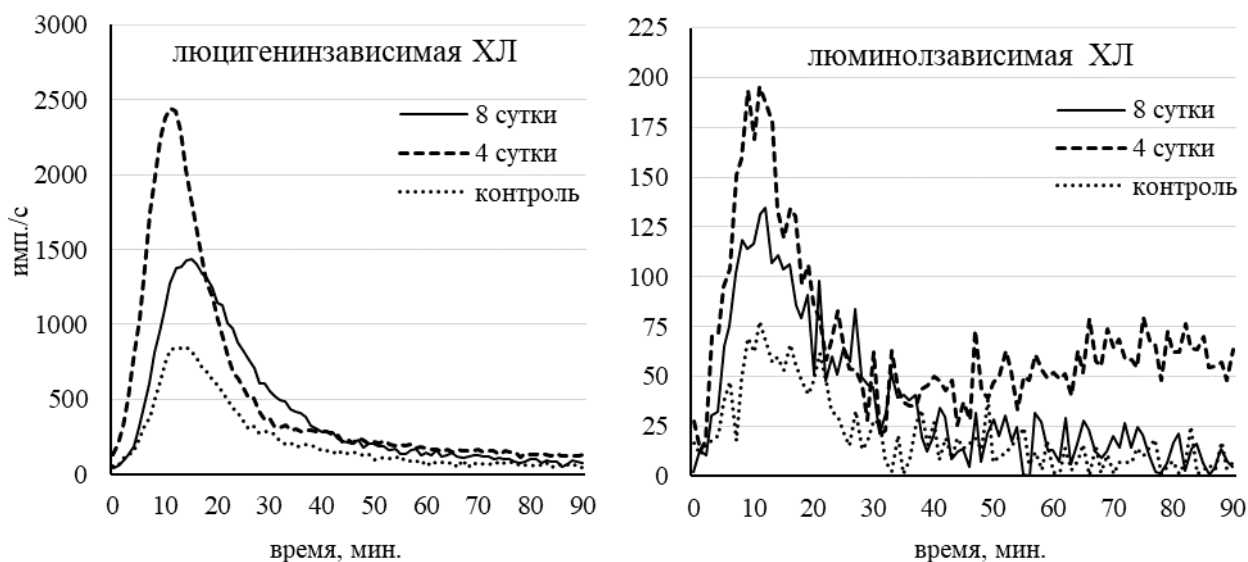


Рисунок 25 – Кинетика антигенактивированной частицами латекса люцигенин- и люминолзависимой хемилюминесценции клеток крови молодняка кур, привитого против гемофилёза

Иммунизация молодняка кур против БГ обусловила рост суммарных объёмов продукции люцигенинзависимых АФК при активированной и спонтанной реакции в два и 2,5 раза соответственно ( $P \leq 0,05$ ). Позднее показатели незначительно сократились, однако превышали исходные значения при активированной ХЛ на 49%, а при спонтанной реакции – в 2,4 раза (таблица 16). Преобладание суммарных объёмов свободных радикалов, продуцируемых клетками, находящимися в состоянии покоя, над светосуммой, генерируемой активированными лейкоцитами, указывает на неспособность фагоцитов привитой птицы отвечать адекватной индукцией «респираторного взрыва» при дополнительных антигенных раздражениях.

Таблица 16 – Суммарные объёмы люцигенин- и люминолзависимых свободных радикалов клетками крови молодняка кур, иммунизированного против болезни Гамборо (БГ) и гемофилёза (импульсов за 90 мин.  $\times 10^6$ )

Состояние птицы	Люцигенинзависимая ХЛ		Люминолзависимая ХЛ	
	активирован.	спонтанная	активирован.	спонтанная
Вакцинация против БГ				
до вакцинации	0,98±0,29	0,71±0,31	0,11±0,02	0,04±0,01
4 сут. после вакцинации	1,94±0,35*	1,98±0,29*	0,13±0,02	0,08±0,02
8 сут. после вакцинации	1,47±0,18	1,71±0,19*	0,10±0,01	0,07±0,01
Вакцинация против гемофилёза				
до вакцинации	1,24±0,15	1,29±0,38	0,10±0,01	0,06±0,01
4 сут. после вакцинации	3,63±0,29**	3,86±0,43**	0,46±0,12**	0,17±0,05*
8 сут. после вакцинации	2,85±0,54*	2,66±0,87	0,25±0,04*	0,10±0,02*

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  и \*\* –  $P \leq 0,01$  относительно исходных данных

Иммунизация молодняка кур против болезни Гамборо незначительно влияла на образование клетками крови люминолзависимых АФК. На четвёртые сутки после вакцинации суммарные объёмы свободных радикалов выросли на 20% при активированной ХЛ-реакции и на 81% – при спонтанной. На восьмые сутки отмечено сокращение продукции кислородных радикалов при активированной люминолзависимой ХЛ-реакции на 7% относительно исходных данных, при этом их спонтанная генерация сохранялась на высоком уровне.

Вакцинация птицы против гемофилёза обусловила значительный подъём генерации всех видов радикалов. На четвёртые сутки суммарные объёмы люцигенинзависимых АФК увеличились почти втрое при активированной и спонтанной ХЛ-реакции относительно исходных величин ( $P \leq 0,01$ ). Это на 87-89% больше, чем показатели четвёртых суток после вакцинации против БГ. На восьмые сутки разница с контролем составила 2 и 2,4 раза при активированной и спонтанной реакции ( $P \leq 0,05$ ) соответственно. Ещё более выраженное влияние прививка против гемофилёза оказала на продукцию люминолзависимых АФК. Их суммарные объёмы на четвёртые сутки поствакцинального периода выросли в 4,5 раза при активированной ХЛ-реакции ( $P \leq 0,01$ ) и в три раза – при спонтанной продукции ( $P \leq 0,05$ ). Позже эти объёмы снизились на 44% и 38% ( $P \leq 0,05$ ). Значительное количество вторичных люминолзависимых кислородных радикалов, особенно продуцируемых клетками в состоянии покоя, по нашему мнению, несут потенциальную угрозу повреждения клеток, поскольку способны запускать механизмы перекисного окисления клеточных мембран.

*Время достижения максимума* активированной люцигенинзависимой хемилюминесценции на четвёртые сутки после вакцинации против БГ сократилось с  $17,4 \pm 2,8$  мин. до  $14,0 \pm 0,3$  мин., а спонтанной, наоборот, увеличилось до  $38,0 \pm 8,2$  мин., то есть более, чем в три раза ( $P \leq 0,01$ ). На 8-е сутки отмечалось ускорение темпов ХЛ-реакции и снижение показателей

$T_{max}$ . Индуцированная и спонтанная люминолзависимая хемилюминесценция замедлилась на восьмые сутки относительно контроля до  $32,5 \pm 11,5$  мин. и  $38,9 \pm 13,6$  мин. соответственно.

У вакцинированной против гемофилёза птицы активированная люминол- и люцигенинзависимая реакция показала разброс времени достижения максимума ХЛ от  $12,3 \pm 0,4$  мин. и  $12,0 \pm 0,2$  мин. до  $21,1 \pm 7,0$  мин. и  $15,8 \pm 0,4$  мин. Спонтанная реакция замедлилась до  $31,1 \pm 8,41$  мин. и  $32,6 \pm 9,4$  мин. соответственно.

*Индекс активации* позволяет определить потенциальные функциональные способности фагоцитов крови отвечать на антигенное раздражение. У трёхнедельного молодняка кур до вакцинации против БГ индекс активации при люцигенин- и люминолзависимой ХЛ-реакции составил  $1,68 \pm 0,28$  и  $2,36 \pm 0,35$  ед. соответственно. Иммунизация обусловила сокращение этого показателя. Спустя четверо суток после прививки показатели индекса активации сократились на 23% и сохранились на этом уровне до конца наблюдений. При этом индекс активации при люцигенинзависимой ХЛ-реакции не только упал ниже исходных величин, но приобрел значения ниже одной единицы ( $P \leq 0,05$ ), что свидетельствовало о функциональной неспособности фагоцитов крови иммунизированного молодняка кур реагировать на внешние антигенные стимуляции.

При иммунизации против гемофилёза индекс активации при образовании первичных люцигенинзависимых радикалов на четвёртые сутки снизился с  $1,69 \pm 0,30$  ед. до  $1,21 \pm 0,22$  ед., а на восьмые сутки показатель незначительно вырос, но не достиг исходных величин. Обратная тенденция наблюдалась при генерации люминолзависимых АФК. На четвёртые сутки после прививки показатели увеличились на 55% и достигли  $3,02 \pm 0,34$  усл. д. ( $P \leq 0,05$ ). Спустя восемь суток индекс понизился до  $2,70 \pm 0,27$  ед.

Иммунизация 21-суточных цыплят против БГ вызвала рост *удельной антигениндуцированной продукции* первичных люцигенинзависимых



свободных радикалов кислорода лейкоцитами и фагоцитами крови на четвёртые сутки после прививки на 50-69% и практически не влияла на показатели люминолзависимой ХЛ-реакции. На восьмые сутки установлено сокращение удельной антигениндуцированной продукции всех видов радикалов лейкоцитами и фагоцитами крови.

Вакцинация молодняка кур против гемофилёза вызвала рост удельной антигениндуцированной продукции АФК на четвертые сутки от 49-58% до 2,1-2,3 раз относительно исходных данных ( $P \leq 0,05$ ), после чего показатели сократились.

Таким образом, вакцинации против болезней Гамборо (вирусная инфекция) и гемофилёза (бактериальная инфекция) вызывают морфологические изменения в крови иммунизированной птицы, что характеризуется поствакцинальным лейкоцитозом и разнонаправленными изменениями клеточного состава лейкоцитов – развитием лимфоцитоза при иммунизации против болезни Гамборо и псевдоэозинофилией и моноцитозом при вакцинации птицы против гемофилёза.

Иммунизации стимулируют фагоцитарную активность лейкоцитов и усиливают интенсивность течения свободнорадикальных процессов, на что указывает рост фагоцитарного индекса и суммарных объёмов продукции всех видов свободных кислородных радикалов как в состоянии покоя, так и при антигенном раздражении клеток частицами латекса *in vitro*, что наиболее выражено при вакцинации против гемофилёза.

Значительные суммарные объёмы свободных радикалов кислорода, генерируемые клетками привитой птицы, особенно, в состоянии покоя, несут потенциальную угрозу повреждения клеточных мембран и свидетельствуют о снижении потенциальных функциональных возможностей фагоцитов крови реагировать на дополнительные внешние антигенные стимуляции.

### 2.2.4.3 Оценка морфофункционального состояния клеток крови при вакцинации кур против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита и синдрома снижения яйценоскости

Внутримышечная иммунизация 100-суточного молодняка кур стимулировала рост *общего содержания лейкоцитов* в крови. Их исходное число составило  $7,96 \pm 0,61 \times 10^9/\text{л}$ , а через час после прививки увеличилось на 3% и продолжило рост, на 22% превысив исходные значения ( $P \leq 0,05$ ).

*Фагоцитарная активность лейкоцитов.* Спустя час после вакцинации активность лейкоцитов крови в отношении частиц латекса сократилась почти на 38% относительно контрольной группы и составила в среднем  $16,65 \pm 1,61\%$  ( $P \leq 0,05$ ), что, вероятно, связано с развитием стрессовой реакции в ответ на процедуру иммунизации и внутримышечное введение вакцины (таблица 17). Через трое суток (72 часа) после прививки активность фагоцитов увеличилась на 62% по сравнению с предыдущими показателями и составила  $27,05 \pm 2,36\%$  ( $P \leq 0,05$ ), что на 1,7% выше исходных величин.

Таблица 17 – Морфофункциональные показатели крови птицы, иммунизированной комплексной вирусвакциной против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и синдрома снижения яйценоскости

Состояние птицы	Общее содержание лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	Фагоцитарная активность, %
до вакцинации	$7,96 \pm 0,61$	$26,59 \pm 3,82$
1 час. после вакцинации	$8,23 \pm 0,84$	$16,65 \pm 1,61^*$
72 час. после вакцинации	$9,70 \pm 0,42^*$	$27,05 \pm 2,36$

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  относительно исходных данных

*Хемилюминесцентный анализ.* Нами установлено, что вакцинация молодняка кур 100-суточного возраста комбинированной инактивированной эмульгированной вирусвакциной против ньюкаслской болезни,

инфекционного бронхита кур и синдрома снижения яйценоскости изменяла показатели кислородного метаболизма фагоцитов крови.

*Максимальная интенсивность* активированной латексом люцигенинзависимой ХЛ-реакции до вакцинации составила  $801,0 \pm 259,1$  имп./с при стимулированной латексом продукции АФК и  $651,9 \pm 189,0$  имп./с при спонтанной хемилюминесценции. Через один час после прививки показатели активированной реакции снизились относительно исходных данных почти на 54% ( $P \leq 0,05$ ), а спонтанной – на 39%. Спустя 72 час. интенсивность реакции у привитой птицы выросла при индуцированной и спонтанной генерации на 17% и 9% относительно интактной птицы. По сравнению с предыдущими показателями иммунизированной птицы (один час.) количество импульсов в секунду увеличилось в 2,5 раза ( $P \leq 0,01$ ) при индуцированной латексом реакции и на 77% – при спонтанной ХЛ и составило  $940,5 \pm 152,1$  имп./с и  $708,1 \pm 160,5$  имп./с соответственно.

Интенсивность генерации вторичных люминолзависимых радикалов, как при индуцированной, так и спонтанной реакции, сократилась на 39% и 41% в течение одного часа после прививки и составила  $54,0 \pm 10,6$  имп./с ( $P \leq 0,05$ ) и  $45,3 \pm 7,0$  имп./с ( $P \leq 0,05$ ) соответственно. Спустя 72 часа интенсивность активированной люминолзависимой ХЛ-реакции возросла более, чем вдвое ( $P \leq 0,05$ ), а спонтанной – на 52% относительно предыдущих данных. По сравнению с исходными показателями непривитой птицы отмечен рост интенсивности активированной ХЛ-реакции на 31%. Показатели спонтанной хемилюминесценции отставали от исходных величин почти на 10%.

*Суммарная продукция* первичных АФК, выявляемых люцигенином, через один час после прививки сократилась практически в два раза при индуцированной латексом реакции и в 1,7 раза – при спонтанной ХЛ. Спустя 72 час. после прививки спонтанная люцигенинусиленная ХЛ-реакция сократилась на 22%, а активированная – почти не отличалась от исходных

величин. При сравнении показателей привитой птицы через час и 72 часа после вакцинации отмечен рост продукции АФК в два раза ( $P \leq 0,01$ ) при активированной ХЛ и на 53% при спонтанной ХЛ (рисунок 26).

Суммарная продукция вторичных люминолзависимых свободных кислородных радикалов уже через один час после прививки сократилась при активированной и спонтанной ХЛ-реакции на 43% ( $P \leq 0,05$ ) и 37% соответственно. Спустя 72 час. показатели светосуммы у привитой птицы выросли на 8% при активированной реакции и упали на 17% при спонтанной хемилюминесценции относительно исходных данных. При сравнении показателей кур через один час и 72 час. после прививки показатели индуцированной ХЛ выросли почти вдвое ( $P \leq 0,01$ ), а спонтанной на 32%.

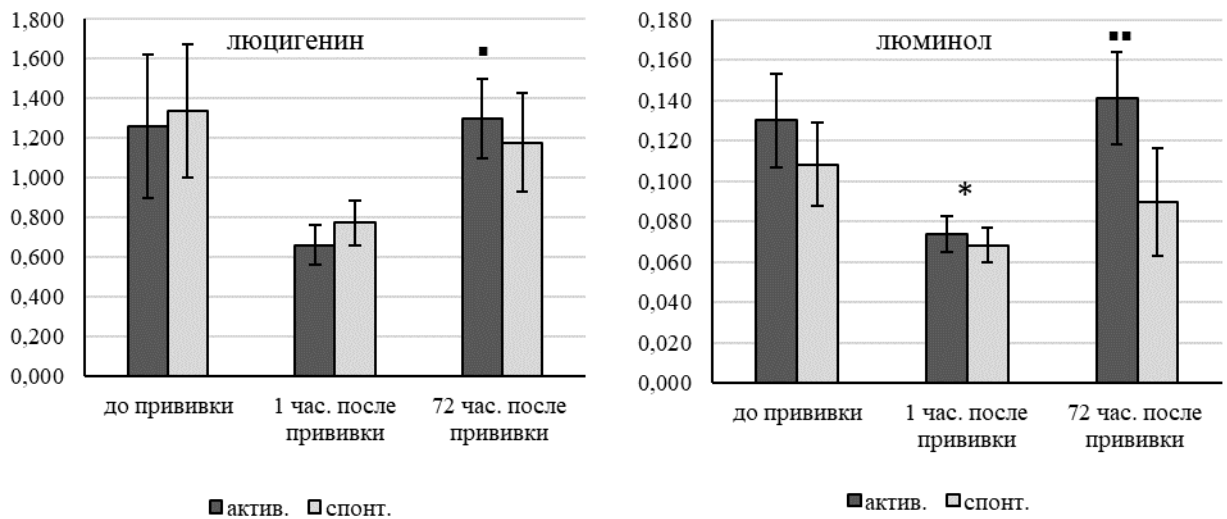


Рисунок 26 – Суммарная генерация люминол- и люцигенинзависимых АФК при активированной и спонтанной хемилюминесценции крови кур, иммунизированных комплексной вакциной против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита и синдрома снижения яйценоскости, импульсы за 90 мин.  $\times 10^6$

*Время достижения максимума ХЛ.* У молодняка кур до вакцинации время достижения максимума ХЛ составляло 13-15 мин. при люцигенинзависимой генерации АФК и 15-18 мин. – при использовании

люминола в качестве ХЛ-зонда. В течение первого часа после вакцинации отмечалось незначительное торможение активированной и спонтанной люцигенинусиленной реакции относительно исходного состояния,  $T_{max}$  составило  $15,2 \pm 0,1$  и  $16,4 \pm 1,0$  мин. соответственно. В то же время темпы люминолусиленной ХЛ-реакция резко замедлились и составили  $22,4 \pm 3,1$  мин. при активированной продукции радикалов и  $26,3 \pm 4,0$  мин. при спонтанной реакции, что на 40-44% больше, чем исходные величины.

Через 72 часа после прививки время наступления максимума индуцированной и спонтанной люцигенинзависимой ХЛ сократилось на 8,5% и 19% и составило  $14,2 \pm 1,3$  мин. и  $13,1 \pm 1,0$  мин. соответственно ( $P \leq 0,05$ ). Реакцию, индуцированную частицами латекса, тормозило с  $16,3 \pm 1,1$  до  $26,4 \pm 4,2$  мин. ( $P \leq 0,05$ ). На третьи сутки после вакцинации (72 час.) наблюдалось достоверное ускорение индуцированной и спонтанной люминолзависимой продукции АФК с  $26,4 \pm 4,2$  мин. до  $13,1 \pm 1,0$  мин. ( $P \leq 0,01$ ).

*Индекс активации* (ИА) позволяет определить потенциальные способности фагоцитов крови отвечать на антигенное раздражение. При продукции люцигенинзависимых АФК через час после прививки показатель опустился ниже единицы и составил  $0,88 \pm 0,11$  усл. ед., что свидетельствовало о неспособности фагоцитов крови реагировать на антигенные стимуляции частицами латекса (рисунок 27). Через час после прививки при люминолзависимой ХЛ-реакции ИА сократился на 44% ( $P \leq 0,05$ ) с  $1,66 \pm 0,51$  усл. ед. до  $1,10 \pm 0,08$  усл. ед.

Спустя 72 часа после вакцинации показатели индекса активации при генерации люминол- и люцигенинзависимых АФК превысили исходные величины на 11% и 35% соответственно. Однако при сравнении показателей привитой птицы через один час и 72 часа после иммунизации, выявлен рост индекса активации на 63% в случае люминолзависимых АФК ( $P \leq 0,01$ ) и на 33% – люцигенинзависимых АФК.

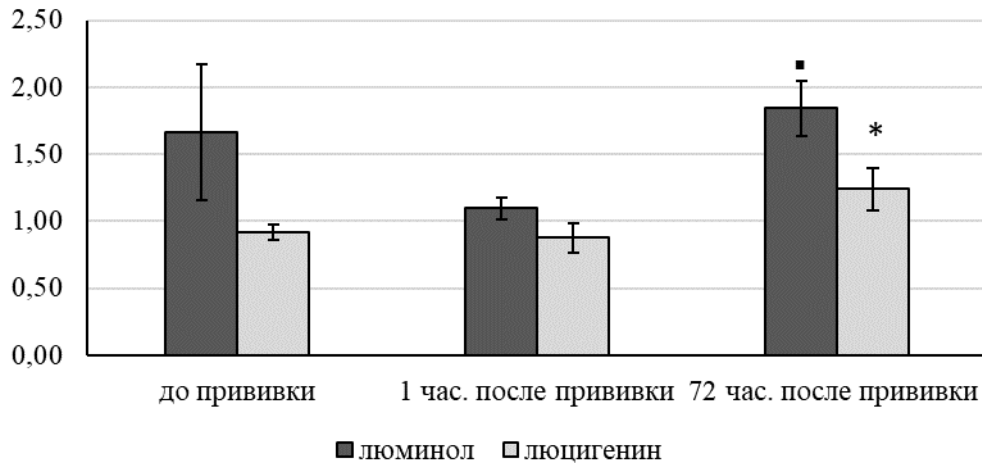


Рисунок 27 – Индекс активации люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции клеток крови молодняка кур при комплексной вакцинации, усл. ед. Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  относительно исходных данных; ■ –  $P \leq 0,01$  относительно предыдущего показателя

*Удельная антигениндуцированная продукция* всех радикалов кислорода лейкоцитами крови сократилась через час после вакцинации на 39-47%, относительно исходных данных. Однако через 72 час. после прививки показатели продукции свободных радикалов выросли на 55-80% по сравнению с предыдущими величинами. Аналогичные результаты получены при анализе удельной генерации АФК фагоцитами крови.

Таким образом, вакцинация кур против ньюкаслской болезни, синдрома снижения яйценоскости и инфекционного бронхита вызывает поствакцинальный лейкоцитоз, сокращает интенсивность ХЛ-реакции, снижает суммарную продукцию радикалов и тормозит время выхода ХЛ-реакции на максимум. Изменения носят кратковременный характер и к концу третьих суток не имеют достоверных отличий от исходных показателей.

### **2.2.5 Влияние низких и высоких температур на морфологические показатели и хемилюминесценцию крови кур**

Исследование влияния низких и высоких температур на морфологию и хемилюминесценцию клеток крови проведено на клинически здоровых цыплятах суточного возраста кросса «Декалб». Были сформированы две опытные группы. В первой группе птица находилась в течение суток при температуре  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ , затем в течение суток при температуре  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Молодняк кур второй группы содержался сутки при температуре  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , а следующие 24 час. под инфракрасной лампой с постепенным нагревом до  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Контролем служили исходные показатели суточной птицы.

*Клиническое состояние цыплят.* При наблюдении за птицей опытных групп, находящейся под внешними высоко- и низкотемпературными воздействиями, установлено изменение их клинического состояния.

Цыплята первой опытной группы в первые два-три часа высокотемпературного воздействия чувствовали себя удовлетворительно, были подвижны, активно перемещались по клетке, клевали корм и пили воду. Через четыре-пять часов появились первые признаки развития стрессовой реакции – вялость и малоподвижность. В последующие часы у птицы нарастали признаки угнетения. К концу первых суток цыплята были малоподвижны, лежали или сидели с закрытыми глазами и растопыренными крыльями, аппетит и жажда отсутствовали, дыхание становилось частым и поверхностным. После прекращения теплового воздействия и перевода цыплят в помещение с температурой  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  их клиническое состояние нормализовалось, птица становилась подвижной, появлялся аппетит и умеренная жажда.

Цыплята второй опытной группы, содержащиеся при пониженной температуре, в течение первых пяти-шести часов стрессового воздействия были малоподвижны, сбивались в угол клетки, жались друг к другу,

отказывались от корма и воды. Однако спустя 14-16 часов наблюдались признаки адаптации к окружающей температуре: цыплята начали активно двигаться, появился аппетит, при этом жажда практически отсутствовала. При перемещении под инфракрасную лампу у птицы постепенно появилась жажда, но аппетит начал исчезать. Продолжительное нахождение при температуре  $40\pm 2^\circ\text{C}$  привело к снижению двигательной активности птицы и нарастанию одышки, поверхностному и учащенному дыханию. Цыплята прятались от света, сидели или лежали с раскрытыми крыльями и закрытыми глазами, аппетит и жажда полностью отсутствовали.

### 2.2.5.1 Морфологические показатели крови цыплят при воздействии низких и высоких температур

*Общее содержание лейкоцитов.* Чередование внешних низких и высоких температур влияли на показатели белой крови цыплят раннего возраста, прежде всего на общее содержание лейкоцитов, их клеточный состав и соотношение гетерофилов и лимфоцитов (рисунок 28).

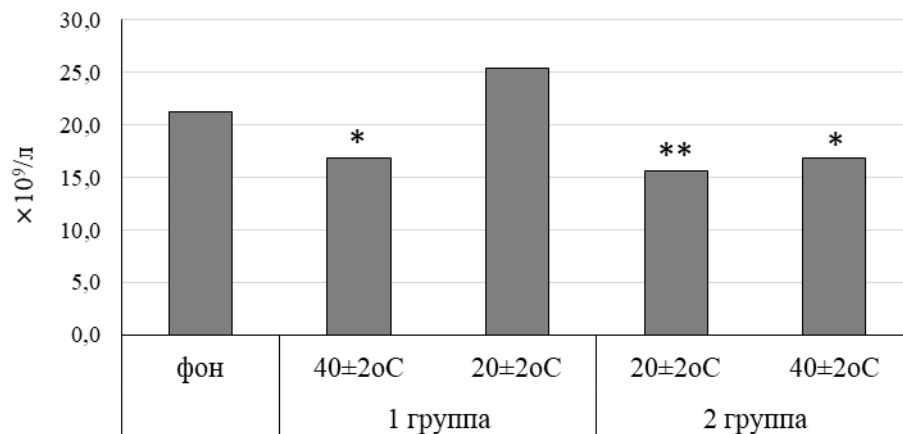


Рисунок 28 – Динамика общего содержания лейкоцитов крови цыплят при высоко- и низкотемпературных воздействиях. Примечание: \* –  $P\leq 0,01$ ; \*\* –  $P\leq 0,001$  относительно фоновых показателей,  $\times 10^9/\text{л}$



Анализ исходных фоновых данных показал, что число лейкоцитов у суточных петушков составило  $21,25 \pm 1,01 \times 10^9/\text{л}$ . Клеточный состав характеризовался преобладанием псевдоэозинофилов ( $46,50 \pm 2,18\%$ ), содержание которых на 4,5% превышало уровень лимфоцитов ( $44,50 \pm 2,11\%$ ).

У цыплят первой группы тепловое воздействие продолжительностью 24 часа привело к достоверному сокращению общего содержания лейкоцитов до  $16,84 \pm 1,20 \times 10^9/\text{л}$ , что на 21% меньше исходных показателей ( $P \leq 0,01$ ). При этом содержание лимфоцитов практически не изменилось, псевдоэозинофилов – снизилось на 8% (рисунок 28), а уровень базофилов, моноцитов и эозинофилов увеличился на 17%, 43% и 73% ( $P \leq 0,01$ ).

Последующее холодовое воздействие привело к росту количества лейкоцитов до  $25,38 \pm 1,46 \times 10^9/\text{л}$ , что на 19% выше фоновых показателей и почти на 51% больше по сравнению с данными предыдущих суток ( $P \leq 0,01$ ). Содержание лимфоцитов сократилось на 13%, а псевдоэозинофилов выросло почти на 7% относительно исходных величин. Наметилась тенденция к возвращению к исходным показателям уровня эозинофилов и базофилов. Относительное содержание моноцитов сохранялось на высоком уровне и свидетельствовало о длительном стрессовом состоянии птицы (рисунок 29).

У цыплят второй опытной группы холодовое воздействие продолжительностью 24 часа вызвало резкое снижение количества лейкоцитов до  $15,58 \pm 0,53 \times 10^9/\text{л}$ , что на 27% ( $P \leq 0,001$ ) ниже фоновых величин и сопровождалось сокращением уровня лимфоцитов на 12%, ростом содержания псевдоэозинофилов и эозинофилов – на 8% и 53% соответственно. Уровень базофилов и моноцитов практически не отличался от исходных величин. Последующее перемещение птицы под инфракрасную лампу привело к слабому росту содержания лейкоцитов по сравнению с предыдущими показателями до  $16,87 \pm 0,70 \times 10^9/\text{л}$ , но их количество, тем не менее, было на 21% ниже фоновых величин ( $P \leq 0,01$ ).

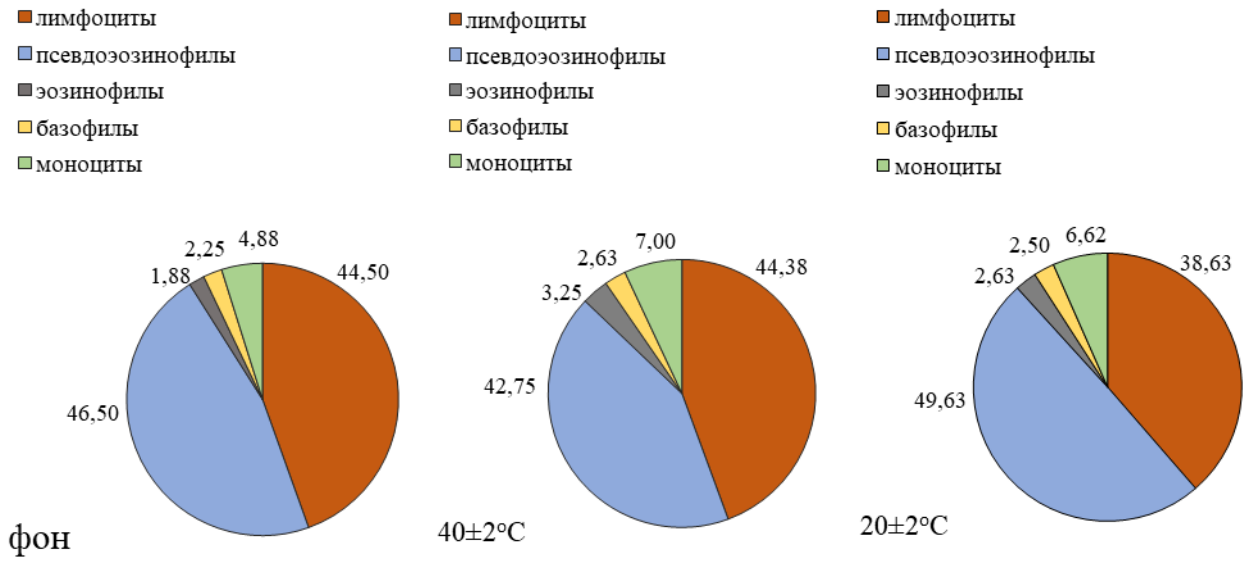
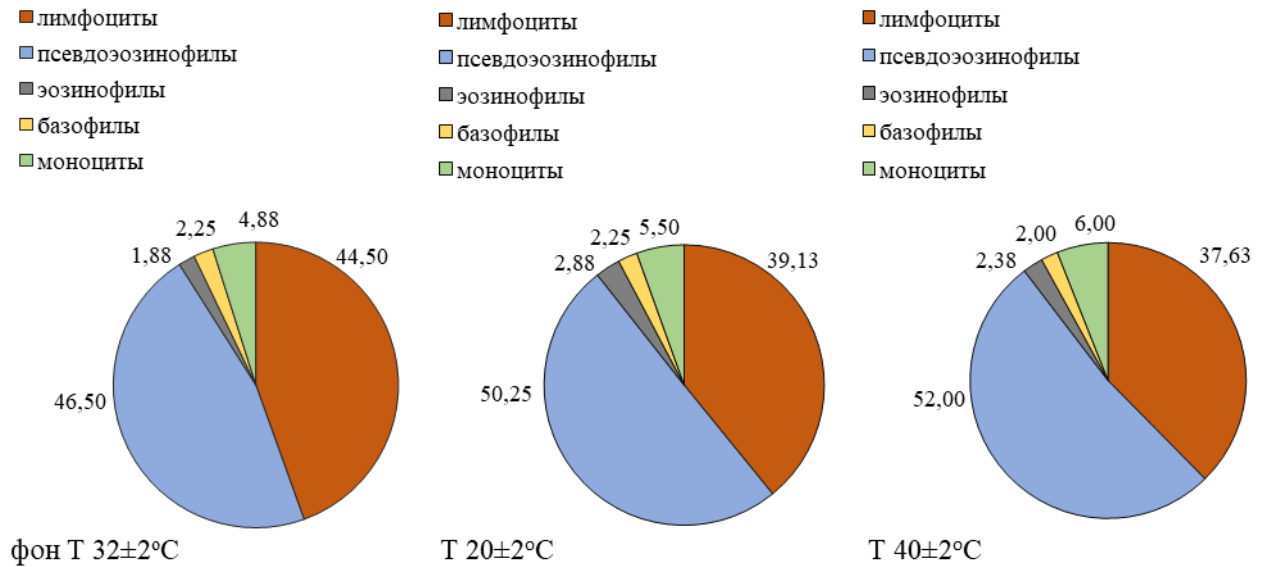
*Первая опытная группа**Вторая опытная группа*

Рисунок 29 – Клеточный состав лейкоцитов крови цыплят при температурных стрессах, вызванных чередованием высоких и низких температур, %

Относительный уровень лимфоцитов снизился на 15,5% ( $P \leq 0,05$ ), базофилов – на 11%, а содержание псевдоэозинофилов, эозинофилов и моноцитов увеличилось на 12%, 26,6% и 23% соответственно по сравнению с исходными показателями.

*Соотношение гетерофилов и лимфоцитов.* Одним из признаков стрессового состояния является увеличение отношения между гетерофилами и лимфоцитами крови (рисунок 30). Исследования показали, что отношение гетерофилов и лимфоцитов в крови птицы первой группы в конце наблюдений увеличилось более, чем на 27% с  $1,08 \pm 0,09$  до  $1,37 \pm 0,17$  ед. ( $P \leq 0,05$ ), а у цыплят второй группы – увеличилось почти на 31% ( $P \leq 0,01$ ) относительно фоновых величин и составило  $1,41 \pm 0,08$  ед., что указывает на развитие температурного стресса у опытной птицы.

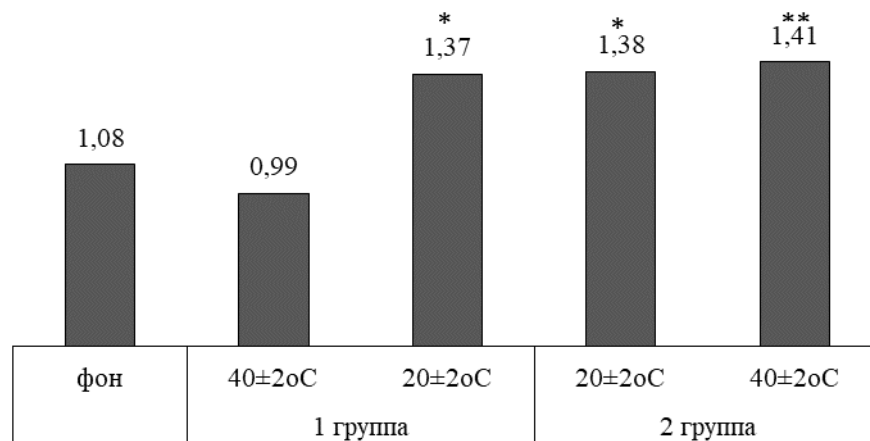


Рисунок 30 – Соотношение гетерофилов и лимфоцитов в крови молодняка кур при воздействии низких и высоких температур, усл. ед.

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$  относительно фоновых величин

### 2.2.5.2 Оценка функционального состояния клеток крови при воздействии низких и высоких температур

Внешние воздействия низких и высоких температур разнонаправленно влияли на интенсивность свободнорадикальных процессов в клетках крови

экспериментальной птицы при моделируемом температурном стрессе, что наглядно показали результаты хемилюминесцентного анализа.

*Максимальная интенсивность ХЛ.* Исходные показатели максимальной интенсивности спонтанной и активированной латексом люминолуциленной ХЛ составили  $68,2 \pm 21,1$  имп./с и  $120,4 \pm 23,0$  имп./с, а люцигенинзависимой –  $646,1 \pm 115,3$  имп./с и  $1561,4 \pm 273,2$  имп./с соответственно. В первой опытной группе тепловой стресс продолжительностью 24 час. вызвал рост максимальной интенсивности продукции люминолуциленных радикалов при активированной и спонтанной ХЛ на 35% и 88%, а при люцигенинзависимой – на 57% и 47% относительно фоновых показателей.

Последующее холодное воздействие тормозило интенсивность люминолуциленной ХЛ-реакции, тем не менее данные превышали исходные величины на 44% при спонтанной продукции АФК и на 21% при активированной реакции. Показатели максимальной интенсивности (амплитуды) люцигенинзависимой хемилюминесценции продолжили расти и увеличились при активированной и спонтанной продукции АФК на 62-65% по сравнению с исходными данными, достигнув  $2525,3 \pm 361,1$  имп./с ( $P \leq 0,05$ ) и  $1065,2 \pm 228,2$  имп./с соответственно.

Во второй опытной группе воздействие низких температур в течение 24 час. привело к снижению максимальной амплитуды спонтанной и активированной люминолуциленной ХЛ-реакции на 15-21% по сравнению с фоновыми величинами. В то же время интенсивность продукции первичных люцигенинзависимых радикалов выросла на 34% при стимулированной хемилюминесценции и на 61% при спонтанной реакции ( $P \leq 0,05$ ).

Последующее увеличение температуры до  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  вызвало незначительный рост интенсивности люминолуциленной активированной продукции АФК и снижение спонтанной генерации, при этом показатели на 15-26% отставали от фоновых величин. Максимальная амплитуда спонтанной люцигенинзависимой ХЛ-реакции увеличилась и почти в два

раза превысила исходные значения ( $P \leq 0,05$ ), интенсивность активированной продукции незначительно сократилась, тем не менее была на 26% выше фоновых данных. Следует отметить значительный разброс индивидуальных показателей в обеих опытных группах, что негативно отразилось на степени достоверности сравниваемых величин.

*Суммарная продукция АФК.* Исследование способности клеток крови птицы к образованию кислородных метаболитов при воздействии низких и высоких температур показало значительный рост суммарных объёмов всех видов свободных радикалов. Так, воздействие высокой внешней температуры продолжительностью 24 час. на цыплят первой группы вызвало рост генерации люцигенин- и люминолзависимых АФК при спонтанной хемилюминесценции на 64% и 71% ( $P \leq 0,05$ ), а при стимулированной реакции – на 12% и 36% соответственно (таблица 18).

Таблица 18 – Суммарная продукция люцигенин- и люминолзависимых АФК при активированной и спонтанной ХЛ клетками крови цыплят при низко- и высокотемпературных воздействиях (импульсов за 90 мин.  $\times 10^6$ )

Температурные условия, °С	Люцигенинзависимые АФК		Люминолзависимые АФК	
	активиров.	спонтанная	активиров.	спонтанная
Исходные фоновые показатели (n=8)				
32±2°С	1,67±0,25	0,57±0,09	0,15±0,02	0,08±0,01
Первая опытная группа (n=20)				
40±2°С 24 часа	2,27±0,28	0,93±0,20	0,17±0,02	0,13±0,03
20±2°С 24 часа	2,14±0,37	1,04±0,19*	0,15±0,25	0,10±0,01
Вторая опытная группа (n=20)				
20±2°С 24 часа	1,96±0,20	1,42±0,19***	0,12±0,01	0,10±0,01
40±2°С 24 часа	3,21±0,41**	3,70±0,70***	0,19±0,03	0,12±0,02

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно исходных данных

Прекращение воздействия теплового фактора и снижение окружающей температуры до  $20\pm 2^\circ\text{C}$  не привело показатели кислородного метаболизма клеток крови к фоновым величинам, несмотря на нормализацию клинического состояния опытных цыплят. Продукция кислородных радикалов, особенно люцигенинзависимых, сохранялась на высоком уровне и отличалась большой вариабельностью индивидуальных показателей.

Хемилюминесцентный анализ крови цыплят второй группы после воздействия в течение 24 час. низких температур показал значительный рост продукции как люцигенинзависимых, так и люминолзависимых свободных радикалов при спонтанной хемилюминесценции – в 2,5 раза ( $P\leq 0,001$ ) и на 34,7% соответственно. Клетки, активированные частицами латекса, демонстрировали разнонаправленные изменения. Генерация активированных первичных радикалов выросла на 17,3%, в то время как образование вторичных люминолзависимых АФК сократилось почти на 22%.

Последовательное увеличение температуры с  $20\pm 2^\circ\text{C}$  до  $40\pm 2^\circ\text{C}$  в течение вторых суток наблюдения привело к росту генерации первичных люцигенинзависимых радикалов кислорода при спонтанной в 6,5 раз ( $P\leq 0,001$ ) и при антигениндуцированной хемилюминесценции в два раза ( $P\leq 0,01$ ). Продукция вторичных люминолзависимых АФК выросла при спонтанной и активированной ХЛ-реакции на 56% и 22% соответственно.

*Время достижения максимума.* Чередование высоких и низких температур у цыплят первой группы вызвало достоверное сокращение времени достижения максимума хемилюминесценции ( $T_{\text{max}}$ ) при образовании всех видов радикалов с 11-13 мин. до 10-11 мин. ( $P\leq 0,01$ ). В то же время у птицы второй опытной группы наблюдалось заметное торможение выхода ХЛ-реакции на максимум до 14-15 мин. при активированной продукции АФК и до 19-26 мин. – при спонтанной генерации ( $P\leq 0,001$ ).

*Индекс активации.* У птицы первой опытной группы индекс активации сократился на 7-13% после 24-часового высокотемпературного воздействия (рисунок 31), а затем под влиянием низких температур упал на 30-39% относительно фоновых показателей ( $P \leq 0,01$ ).

Во второй опытной группе рост продукции АФК при спонтанной хемилюминесценции и снижение объёмов свободных радикалов, продуцируемые клетками, стимулированными частицами латекса *in vitro*, привели при холодовом стрессе к резкому падению индекса активации. При образовании люцигенинзависимых АФК он снизился в два раза ( $P \leq 0,001$ ), а при продукции люминолзависимых – на 43% ( $P \leq 0,05$ ).

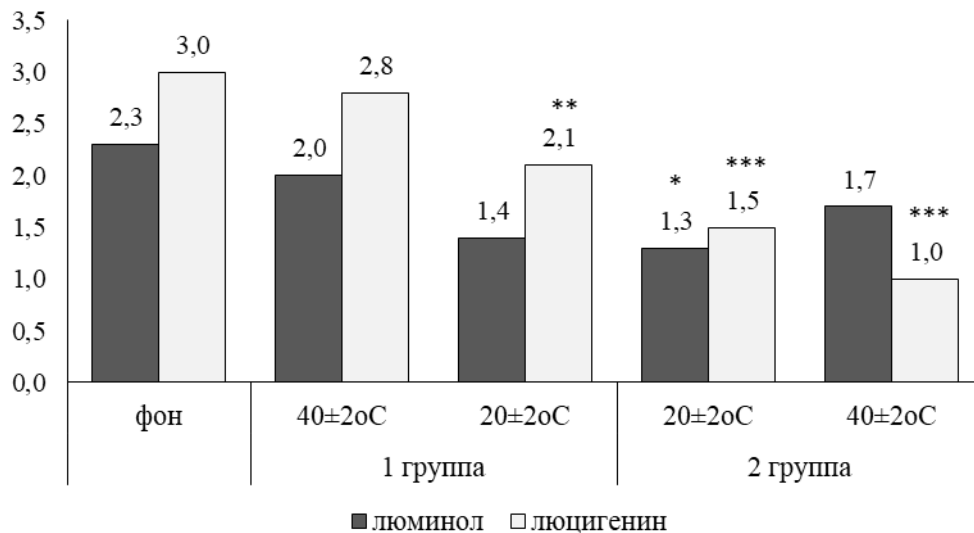


Рисунок 31 – Индекс активации клеток крови цыплят при низко- и высокотемпературных внешних воздействиях по данным хемилюминесцентного анализа, усл. ед.; \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно фоновых показателей

Последующее повышение температуры до  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  вызвало резкий выброс радикалов при спонтанной хемилюминесценции и умеренно повышенную продукцию при активированной реакции, что привело к сокращению индекса активации. При образовании люминолзависимых АФК показатель снизился на 26%, а при генерации люцигенинзависимых

радикалов – в три раза ( $P \leq 0,001$ ) по сравнению с фоновыми величинами. Эти данные свидетельствовали о значительном снижении функциональных возможностей фагоцитов крови птицы реагировать на потенциальные антигенные угрозы при экстремальных температурных воздействиях.

*Удельная продукция АФК.* На основании данных об общем содержании лейкоцитов крови, их фагоцитарной активности, степени разведения крови и суммарной генерации свободных радикалов рассчитаны показатели удельной антигениндуцированной продукции АФК лейкоцитами и фагоцитами крови. В первой группе после 24-часовой высокотемпературной нагрузки удельная продукция люцигенинзависимых АФК на лейкоцит и фагоцит выросла на 57% и 89% ( $P \leq 0,05$ ), а люминолзависимых – на 28% и 50% соответственно (таблица 19). Последующее содержание опытной птицы при пониженной температуре вызвало сокращение параметра до исходного уровня.

Таблица 19 – Удельная антигениндуцированная продукция АФК лейкоцитами и фагоцитами крови цыплят при воздействии низких и высоких температур (импульсов на клетку  $\times 10^6$ )

Температурные условия, °С	Имп./лейкоцит		Имп./фагоцит	
	люцигенин	люминол	люцигенин	люминол
Исходные фоновые показатели (n=8)				
32±2°С	1,58 ± 0,21	0,14 ± 0,02	3,55 ± 0,39	0,32 ± 0,04
Первая опытная группа (n=20)				
40±2°С	2,99 ± 0,56*	0,21 ± 0,03	5,58 ± 0,81*	0,41 ± 0,06
20±2°С	1,73 ± 0,29	0,12 ± 0,02	3,66 ± 0,59	0,25 ± 0,04
Вторая опытная группа (n=20)				
20±2°С	2,54 ± 0,27*	0,16 ± 0,01	5,78 ± 0,47**	0,35 ± 0,03
40±2°С	3,86 ± 0,51***	0,22 ± 0,04	8,33 ± 1,10***	0,46 ± 0,08

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$  относительно исходных показателей



Во второй опытной группе удельная антигенстимулированная продукция люцигенинзависимых АФК лейкоцитами и фагоцитами крови через 24 час. низкотемпературного воздействия выросла на 61% ( $P \leq 0,05$ ) и 63% ( $P \leq 0,01$ ), а люминолзависимых – всего на 14% и 9% соответственно. Последующее воздействие на организм цыплят высокой температуры привело к достоверному увеличению удельной антигениндуцированной продукции люцигенинзависимых радикалов в 2,35-2,44 раза ( $P \leq 0,001$ ).

*Фагоцитарная активность.* Активность фагоцитов крови суточных цыплят в отношении частиц латекса до внешних температурных воздействий составила  $43,99 \pm 1,81\%$  (рисунок 32). Тепловое воздействие в течение первых суток эксперимента умеренно стимулировало фагоцитарную активность лейкоцитов у цыплят первой опытной группы. Фагоцитарный индекс увеличился на 15% по сравнению с контрольными величинами и отличался значительным разбросом индивидуальных показателей ( $50,63 \pm 3,93\%$ ).

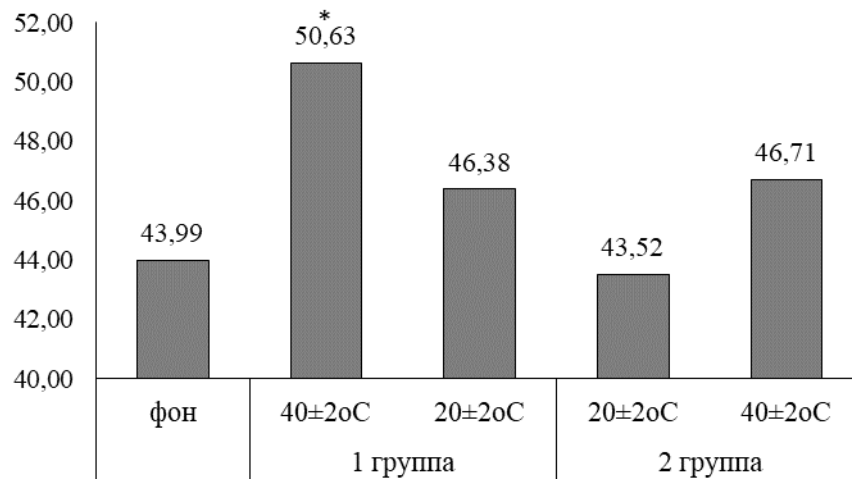


Рисунок 32 – Динамика фагоцитарного индекса лейкоцитов крови цыплят при низко- и высокотемпературных воздействиях, %. Примечание: \* –  $P \leq 0,05$  относительно фоновых величин

Считается, что одной из основных причин повышения функциональной активности лейкоцитов при тепловой нагрузке выступает перестройка

липидного слоя цитоплазматических мембран и увеличение активности интегральных мембранных ферментов [Фисинин В.И., Кавтарашвили А.Ш., 2015]. Последующее понижение внешней температуры до  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  вызвало торможение поглотительной способности фагоцитов крови в отношении частиц латекса и снижение фагоцитарного индекса на 5,5%.

Низкотемпературный стресс продолжительностью 24 часа у птицы второй группы практически не влиял на фагоцитарную активность клеток крови. Последующее нагревание цыплят до  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  вызвало рост показателя на 6,2% по сравнению с фоновыми величинами.

Таким образом, отклонения температуры содержания цыплят раннего возраста в пределах  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  от нормативных показателей, что нередко встречается в производственных условиях, приводят к развитию температурного стресса, который морфологически характеризуется сокращением общего содержания лейкоцитов от 21% до 27% относительно фоновых показателей, снижением популяции лимфоцитов, ростом уровня псевдоэозинофилов, эозинофилов и моноцитов, увеличением соотношения между гетерофилами и лимфоцитами, а также кратковременной стимуляцией фагоцитарной активности лейкоцитов крови на 5-15%.

Температурные стрессы ведут к избыточной продукции свободных радикалов кислорода, которые способны повреждать мембраны клеток и запускать механизмы перекисного окисления липидов. Повышенная генерация радикалов при спонтанной хемилюминесценции клеток, находящихся в состоянии покоя, обуславливает снижение индекса активации и свидетельствует о сокращении функциональных возможностей фагоцитов крови реагировать на антигенные нагрузки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования крови являются одним из наиболее информативных методов оценки морфофункционального состояния организма, поскольку кровь выполняет множество функций, в том числе транспортную, участвует в поддержании постоянной температуры тела, гуморальной регуляции обмена веществ и других жизненно важных процессах. Красные клетки крови участвуют в переносе кислорода и углекислого газа, а клетки белой крови реализуют механизмы неспецифической резистентности и участвуют в иммунных реакциях. На высокую значимость оценки морфологического и функционального состояния клеток крови указывают работы А.А. Ярилина (2010), Ю.Г. Васильева с соавт. (2015), D.J. Weiss, K.J. Wardrop (2010) и других авторов.

По мнению ряда исследователей, в том числе Г.С. Азаубаевой (2012), E.V. Mitchell, J. Johns (2008), M.P. Jones (2015), дифференциация клеток крови и оценка клеточного ответа при экстремальных воздействиях различного генеза являются жизненно важными инструментами, которые помогают судить о состоянии организма, диагностировать наличие того или иного патологического процесса, а также прогнозировать его исход.

Форменными элементами крови являются эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Лейкоциты, также как эритроциты, циркулируют в крови. Однако известно, что лейкоциты способны с помощью псевдоподий перемещаться через сосудистую стенку к месту реализации своих функций [Liu G. et al, 2013].

По данным В.Ф. Вракина, М.В. Сидоровой (1984), В.П. Буркова (2013), И.М. Донник с соавт. (2015), общее количество лейкоцитов в крови взрослой птицы колеблется от  $20 \times 10^9/\text{л}$  до  $40 \times 10^9/\text{л}$ . В то же время В.М. Селянский (1980) утверждает, что содержание лейкоцитов может достигать  $60 \times 10^9/\text{л}$ . Очевидно, что общее число лейкоцитов в крови птиц, в первую очередь зависит от её вида, возраста, породы и функционального состояния организма.

Нами установлено, что в процессе постнатального онтогенеза содержание клеток белой крови у кур современного высокопородного яичного кросса «Декалб» колебалось в незначительном диапазоне  $19-21 \times 10^9/\text{л}$  и сокращалось до  $15-17 \times 10^9/\text{л}$  у двухмесячных цыплят и 560-суточной птицы. Эти данные согласуются с результатами исследований В.Ф. Вракина, М.В. Сидоровой (1984), И.М. Карпутя (1986), И.А. Болотникова, Ю.В. Конопатова (1993) и других авторов.

В то же время Б.Ф. Бессарабов (2009) утверждает, что у молодняка кур раннего возраста число лейкоцитов меньше, чем у взрослой птицы. Известно, что общее содержание клеток белой крови у птиц изменяется после приема корма, усиленной мышечной работы, при различных заболеваниях и отражает, по мнению Г.С. Азаубаева (2012), Е.А. Колесник, М.А. Дерхо (2013), В. Vílková et al. (2017) разное функциональное состояние иммунной защиты.

В наших исследованиях крови японских перепелов установлено, что общее содержание лейкоцитов в процессе постнатального онтогенеза колебалось от  $9,99 \pm 1,27 \times 10^9/\text{л}$  у 14-суточной до  $17,50 \pm 2,58 \times 10^9/\text{л}$  у шестимесячной птицы. Близкие по значениям результаты представлены в работах других авторов. Так, О.А. Багно и А.И. Алексеева (2014) при скармливании перепелам селен- и йодсодержащих добавок зафиксировали колебания числа лейкоцитов в крови контрольной птицы от  $14,40 \pm 1,56 \times 10^9/\text{л}$  у 60-суточных перепелов до  $15,00 \pm 1,32 \times 10^9/\text{л}$  – на 180-е сутки жизни. В то же время встречаются данные о более высоком содержании белых клеток в крови перепелов. Например, при изучении влияния кормосмеси с разным уровнем обменной энергии на морфологические показатели крови перепелов, М.С. Тимончева и Л.Ф. Бодрова (2014) зарегистрировали общее содержание лейкоцитов на уровне  $30-31 \times 10^9/\text{л}$ . В работах Р.Н. Ивановой, И.А. Алексеева (2012) установлено количество лейкоцитов –  $32,29 \pm 0,80 \times 10^9/\text{л}$ . Возможно такие высокие значения связаны с условиями проведения исследований, породными особенностями перепелов или используемыми кормовыми добавками.

Наши исследования клеточного состава лейкоцитов крови и их структурной характеристики у кур и перепелов разного возраста показали, что преобладающими клетками у суточных цыплят являлись псевдоэозинофильные гранулоциты, относительное содержание которых составило 46,5% от общего числа белых кровяных телец. У птицы в возрасте 560 суток перед убоем их относительный уровень сократился до 39%. Полученные результаты согласуются с данным таких авторов как В.М. Селянский (1980), Н.В. Донкова (2004), Е.А. Колесник, М.А. Дерхо (2013). В этих работах относительное содержание псевдоэозинофилов в крови кур составляло 20-55%, при этом у суточных цыплят их число колебалось от 48-55%, а у более взрослой птицы – 20-35%.

В то же время исследование клеточного состава лейкоцитов у перепелов показало, что псевдоэозинофильные гранулоциты являются вторыми по численности клетками. Их общее содержание у суточных перепелов после инкубации составило 28%. Самый высокий показатель наблюдался на третий месяц жизни – 56%, но в возрасте 270 суток он сократился до 27%. Эти показатели соответствуют данным, представленным в работе Е.Г. Турицыной и Е.А. Климовой (2014).

Структурная характеристика псевдоэозинофильных гранулоцитов у исследованных кур и перепелов соответствовала классическому описанию данного вида лейкоцитов у многочисленных авторов, включая работы И.М. Карпутя (1986), И.А. Болотникова и Ю.В. Конопатова (1993), D. Bickford (2007), D.J. Weiss, K.J. Wardrop (2010), Ph. Clark et al. (2009), M.P. Jones (2015). Мы наблюдали округлые клетки диаметром около 11-13 мкм с сегментированным ядром у зрелых клеток и изогнутым палочковидным ядром у более молодых клеток. В то же время И.М. Карпутя (1986) считает, что у птиц сегментация ядер слабо выражена. Цитоплазма исследованных клеток заполнена веретеновидными и округлыми, менее заметными и мелкими гранулами, что соответствовало описанию морфологии псевдоэозинофилов в работах И.М. Карпутя (1986), А.А. Ярилина (2010), E.B. Mitchell, J. Johns (2008), D.J. Weiss, K.J. Wardrop (2010).

Относительное содержание эозинофилов в крови кур разных кроссов, по данным В.М. Селянского (1980), В.Ф. Вракина и М.Ф. Сидоровой (1984), Н.В. Донковой (2004), Е.А. Колесник и М.А. Дерхо (2013), Ю.Г. Васильева (2015), находится в пределах 1-5%. По результатам наших исследований в первые сутки жизни цыплят эозинофилы составили 2%, а у взрослой птицы показатель вырос до 5% и более. Число эозинофилов у перепелов варьировало в диапазоне от 1% в начале постнатального онтогенеза до 2-3% к третьему месяцу жизни. По данным Е.Г. Турицыной и Е.А. Климовой (2014) уровень эозинофилов перепелов разного возраста находится в пределах 1,7-3,5%.

Морфологически эозинофильные гранулоциты исследованных нами птиц не отличались от описанных в работах И.М. Карпутя (1986), Ю.Г. Васильева с соавт. (2015), D. Bickford (2007), E.V. Mitchell, J. Johns (2008), D.J. Weiss, K.J. Wardrop (2010). При световой микроскопии эозинофилы кур и перепелов – это достаточно крупные клетки с голубоватой цитоплазмой, содержащей розовато-красноватые округлые гранулы, и ядром, состоящим из двух долей, соединенных слабо выраженной перемычкой.

Уровень базофильных гранулоцитов у кур и перепелов в наших исследованиях не превышал 1-2%. На их содержание практически не влиял возраст экспериментальной птицы. По данным В.М. Селянского (1980), В.Ф. Вракина, М.Ф. Сидоровой (1984), И.М. Карпутя (1986), Н.В. Донковой (2004), Е.А. Колесник, М.А. Дерхо (2013); Ю.Г. Васильева (2015) содержание базофилов в крови кур в среднем составляет 1,7-4,6%, а у перепелов, по данным Е.Г. Турицыной, Е.А. Климовой (2014) – 0,15-3%. В нашей работе в различные периоды постнатального онтогенеза установлен уровень базофилов от 1,0% до 1,7%. Цитологически базофилы характеризовались крупными размерами, их ядра плохо заметны из-за многочисленных тёмно-фиолетовых округлых гранул, обильно заполняющих цитоплазму.

Многочисленной группой незернистых лейкоцитов являются лимфоциты. В работах В.М. Селянского (1980), И.А. Болотникова и Ю.В. Соловьева (1980)

установлено, что количество лимфоцитов у сельскохозяйственных птиц раннего возраста составляет 40-44%. Однако по данным Н.В. Донковой (2004), Е.А. Колесник, М.А. Дерхо (2013), Е.Г. Турицыной, Е.А. Климовой (2014), М.Р. Jones (2015), С.Ф. Сухановой (2017) у взрослой птицы относительное содержание лимфоцитов достигает 60-68%. В результате наших исследований установлено, что относительное содержание лимфоцитов у цыплят раннего возраста составляло 45%, а у кур старшего возраста – около 60%. Так же мы выяснили, что у перепелов суточного возраста преобладающими клетками, в отличие от кур, являлись лимфоциты, относительное содержание которых в среднем составило  $69,2 \pm 6,6\%$ . У возрастной птицы уровень лимфоцитов опускался до 39%.

Морфологически в крови исследованных нами кур и перепелов разного возраста преобладали малые лимфоциты, характеризующиеся плотным округлым или слегка бобовидным ядром с грубыми зёрнами хроматина, и узким ободком голубоватой цитоплазмы. Средние лимфоциты встречались реже и обладали более крупными размерами и обильной цитоплазмой с хорошо заметным участком просветления вблизи ядра. Немногочисленной группой являлись большие лимфоциты с относительно рыхлым ядром и обильной светло-голубой цитоплазмой. Структурная характеристика лимфоцитов полностью соответствовала описаниям, представленным в трудах В.М. Селянского (1980); И.М. Карпутя (1986); D.J. Weiss, K.J. Wardrop (2010) и других авторов.

На долю моноцитов у здоровых кур разных кроссов и возрастов, по данным Н.В. Донковой (2004), Е.Г. Турицыной (2010); Е.А. Колесник и М.А. Дерхо (2013), приходится до 2-7%. В наших исследованиях установлено, что относительное содержание моноцитов у кур в течение всего первого месяца жизни держалось на уровне 5%, а у взрослой птицы составляло 7%. У молодняка перепелов относительное содержание моноцитов не превышало 1-2%, а у взрослой птицы достигало 3-4%. Моноциты являлись самыми крупными клетками. Они имели неправильную округлую форму, слабо сегментированное

ядро с рыхло упакованным хроматином и обильную голубоватую, нередко вакуолизированную, цитоплазму.

Функциональная характеристика белых клеток крови птиц имеет заметные отличия у разных типов лейкоцитов. Исследования Ю.Г. Васильева с соавт., (2015); G. Liu et al. (2013), N. Strydom, S.M. Rankin (2013), О.А. Коленчуковой и Н.И. Сарматовой (2017) показывают, что псевдоэозинофильные гранулоциты, моноциты и эозинофилы обладают выраженной фагоцитарной активностью и участвуют в реализации механизмов неспецифической резистентности. Фагоцитоз и уничтожение микроорганизмов и клеточных обломков, по данным А. Ройта с соавт. (2000), А.А. Ярилина (2010) и др. сопровождается выбросом свободных радикалов кислорода и индукцией респираторного взрыва. При этом, считается, что базофилы не играют существенной роли в защитных реакциях, хотя и обладают способностью к фагоцитозу.

Многие исследователи, в том числе Л.С. Колабская (1982), Топо-Ока et al. (1983), И.А. Болотников, Ю.В. Конопатов (1993), Б.Ф. Бессарабов (2009), С.Ф. Суханова (2017) и другие авторы считают, что определение фагоцитарной активности лейкоцитов крови не только позволяет оценить функциональное состояние клеток, но и установить уровень неспецифического иммунитета. Как правило, при изучении фагоцитарной активности лейкоцитов используют культуры живых или убитых бактерий. Так, Н.В. Садовников (2002) при определении фагоцитарной активности лейкоцитов крови у цыплят использовал кристаллы кварца, а Г.В. Макарская с соавт. (2011) при изучении возрастных особенностей функциональной характеристики клеток крови кур активировали фагоциты крови латексом. Мы использовали аналогичный способ антигенной стимуляции фагоцитарной активности лейкоцитов с помощью частиц латекса, опсонизированного белками пуловой сыворотки крови взрослых кур.

Нами установлено, что активность фагоцитов в отношении частиц латекса у кур находилась в пределах от 44% в раннем возрасте и поднималась до 59% у птицы старшего возраста. Сходные показатели кур кроссов «Хайсекс уайт» и



«Хайсекс браун» установлены Е.Г. Турицыной с соавт. (2011). По нашим данным уровень фагоцитарной активности лейкоцитов крови у перепелов колебался от 15% у суточного молодняка до 68% у старой птицы. Не смотря на наличие работ Р.Н. Ивановой, И.А. Алексеева (2012); О.А. Багно, А.И. Алексеевой (2014), Е.Г. Турицыной, Е.А. Климовой (2014), Е.З. Лапкиной с соавт. (2016) и других авторов, посвященных изучению морфологии и функционального состояния клеток крови японских перепелов при различных функциональных нагрузках, сведения о фагоцитарной активности лейкоцитов крови отсутствуют.

Среди широкого спектра проявлений функциональной активности лейкоцитов крови различают кислородзависимые и кислороднезависимые процессы. На высокую диагностическую значимость исследований кислородзависимого метаболизма нейтрофилов при бактериальных и вирусных инфекциях указывают Y. Cadroy et al. (2000) и С. Kim, M.C. Dinauer (2001).

По мнению многих авторов оценка функциональной активности клеток хемилюминесцентным методом позволяет обнаружить изменения в механизмах функционирования системы неспецифической резистентности и иммуногенеза на молекулярном уровне [Винник Ю.С. с соавт., 2004; Фархутдинов Р.Р., 2006; Земсков В.М. с соавт., 2013]. Недостаточность и избыточность продукции свободных радикалов может являться пусковым моментом развития многих патологических процессов [Шахов А.Г., 2004; Хабибуллин Р.Р., Федосов А.В., 2006; Мартусевич А.К., Карузин К.А., 2015].

В настоящее время имеются публикации, содержащие сведения о хемилюминесценции клеток крови птиц, в том числе работы Н.В. Садовникова (2002); Н.В. Садовникова с соавт. (2009), Г.В. Макарской с соавт. (2011); Е.Г. Турицыной с соавт. (2011); P. Conlon et al. (1991); M. Chadfield, J. Olsen (2001); M.B. Farnell, H. He, M.H. Kogut (2003); Z. Papp, J.E.G. Smits (2007). Однако отличия в методических подходах авторов к проведению хемилюминесцентного анализа, в том числе выбору хемилюминесцентного зонда, к виду и возрасту экспериментальной птицы, продолжительности проведения ХЛ-реакции и прочее,

не позволяют однозначно трактовать полученные результаты и использовать их в качестве референтных показателей в практической и научной работе.

Нами установлено, что у кур и перепелов суммарная продукция клетками крови первичных люцигенинзависимых АФК (супероксиданиона) в десятки раз преобладала над продукцией вторичных люминолзависимых радикалов (гипохлорид, гидроксил, перекись водорода и др.), как в состоянии покоя, так и при антигенной стимуляции клеток частицами латекса. Аналогичная зависимость установлена Г.В. Макарской с соавт. (2011) при генерации свободных радикалов клетками крови кур и Е.З. Лапкиной с соавт. (2016) при исследовании хемилюминесценции у перепелов. Эти данные указывают на принципиальное отличие кислородного метаболизма клеток крови птиц от рыб [Макарская Г.В. с соавт., 2003], млекопитающих [Дюсенова Г.М., 2006; Ерёмина И.Ю. с соавт., 2010] и человека [Земсков В.М., Барсуков А.А., 1988; Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009; Топо-Ока et al., 1983], у которых преобладает продукция вторичных люминолзависимых кислородных радикалов.

В наших исследованиях низкие показатели кинетики хемилюминесцентной реакции (максимальная интенсивность хемилюминесценции, суммарные объёмы продукции всех видов АФК) зарегистрированы у двухмесячной птицы. В этом же возрасте клетки крови генерировали минимальные количества радикалов в расчете на один лейкоцит и фагоцит, на что указывали низкие показатели удельной антигенактивированной продукции АФК. Кроме того, у молодняка кур 60-суточного возраста наблюдалось резкое замедление спонтанной люцигенинзависимой ХЛ-реакции, о чем свидетельствовали высокие значения времени выхода хемилюминесценции на максимум.

Максимально высокие показатели спонтанной и активированной светосуммы зафиксированы у 30-суточной птицы и в разгар яйцекладки у кур 8-месячного возраста. Г.В. Макарская с соавт. (2011) также наблюдали два пика максимальной активности хемилюминесценции клеток крови кур кроссов «Хайсекс уайт» и «Хайсекс браун». Авторы считают, что всплеск активности

свободнорадикальных процессов на пике яйцекладки в бóльшей степени указывает на нарушения баланса про- и антиоксидантных систем организма птицы, чем на рост функциональных возможностей фагоцитов.

Наиболее высокие показатели индекса активации при люминол- и люцигенинзависимой генерации АФК зарегистрированы у птицы суточного и предубойного возраста. На 30-100-е сутки жизни наблюдались минимальные величины индекса активации, едва превышающие 1,0 усл. ед.

В доступной научной литературе отсутствуют сведения о возрастных особенностях хемилюминесценции клеток крови перепелов. Однако показатели хемилюминесценции клеток крови 70-суточных японских перепелов, представленные в работе З.Е. Лапкиной с соавт. (2016), близки к показателям двухмесячных перепелов, полученным в наших исследованиях. Проведённый нами сравнительный анализ параметров люцигенин- и люминолзависимой хемилюминесценции (максимальная интенсивность, суммарная генерация АФК) у суточных кур и перепелов не выявил достоверно значимых отличий. Однако в дальнейшем кинетика хемилюминесценции клеток крови перепелов при индукции АФК демонстрировала только один пик, приходящийся на 180-е сутки жизни, что соответствовало разгару яйцекладки.

У перепелов первых двух месяцев жизни показатели люцигенин- и люминолзависимой хемилюминесценции сохранялись приблизительно на одном уровне и не имели достоверных отличий от суточной птицы. Рост параметров хемилюминесценции клеток начинался у трёхмесячных перепелов и достигал максимальных величин в разгар яйцекладки, также как у кур. Разница возрастных показателей хемилюминесценции между курами и перепелами, безусловно связана со скороспелостью перепелов, которые начинают яйцекладку в возрасте 40-45 суток, а не в 120-140 суток, как куры. У перепелов 240-суточного возраста, также как у кур перед убоем (560 суток) показатели хемилюминесценции опускались до минимальных величин, что указывало либо на низкие функциональные способности фагоцитов крови, либо о высокой активности

антиоксидантной защиты организма. Удельная генерации АФК лейкоцитами и фагоцитами крови перепелов демонстрировала максимальные величины у птицы 120-180-суточного возраста, что, по нашему мнению, также связано с активной яйцекладкой.

Индекс активации хемилюминесценции клеток крови у перепелов первых трёх месяцев жизни в 1,5-2 раза превышал показатели молодняка кур, а у птицы 120-180-суточного возраста – в четыре-пять раз, что, на наш взгляд, обуславливает высокую устойчивость перепелов к инфекционным заболеваниям. Обращает на себя внимание крайне медленное течение как люцигенин-, так и люминолзависимой хемилюминесценции у перепелов, особенно при спонтанной реакции, поскольку время достижения максимума хемилюминесценции может составлять 70-80 мин., что в 2,5-3,5 раза больше, чем у кур аналогичного возраста.

Сведения о хемилюминесценции клеток органов животных являются чрезвычайно редкими и касаются исключительно лабораторных животных, таких как крысы. Например, имеются публикации Н.С. Матвеевой с соавт. (2007) и С.А. Кантюкова с соавт. (2011) о хемилюминесценции клеток внутренних органов крыс при острых воспалениях. Однако информация о хемилюминесценции клеток органов домашних или диких птиц в доступной литературе отсутствует.

Нами показано, что при хемилюминесцентном анализе клеток костного мозга молодняка кур раннего возраста определялась высокая активность кислородного метаболизма, при этом клетки слабо отвечали на антигенное раздражение частицами латекса выбросом АФК. В то же время клетки клоакальной бурсы отличались низким уровнем течения свободнорадикальных процессов, особенно у суточной птицы, и подавлением способности к индукции «респираторного взрыва» при антигенном ответе *in vitro*. Потенциальные возможности фагоцитов селезёнки суточных цыплят минимальны, но постепенно показатели росли, что свидетельствовало о функциональной незрелости механизмов неспецифической реактивности птицы раннего возраста и незавершенном морфогенезе органов иммунной системы.

На структуру и функцию клеток крови влияет не только возраст птиц, но и различные воздействия, которым они подвергаются при промышленном содержании – это стрессы различного происхождения и многочисленные вакцинации против вирусных и бактериальных инфекций.

В работах И.Н. Громова с соавт. (2004), Л.А. Валеева с соавт. (2007), Е.Г. Турицыной (2010) представлены данные о влиянии иммунизаций против болезни Марека, ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита, ларинготрахеита и других инфекций на морфофункциональное состояние организма привитой птицы. Однако только в работе Е.Г. Турицыной с соавт. (2011) представлены данные об изменениях параметров хемилюминесценции клеток при вакцинациях.

В наших исследованиях установлено достоверное увеличение числа лейкоцитов после иммунизации птицы против инфекционного ларинготрахеита, инфекционной бурсальной болезни (болезни Гамборо), гемофилёза и комплексной вакцинации против синдрома снижения яйценоскости, ньюкаслской болезни и инфекционного бронхита кур. При этом изменялся клеточный состав лейкоцитов крови. Иммунизация молодняка кур живыми вакцинами против вирусных инфекций вызывала значительное увеличение относительного содержания лимфоцитов и сокращение уровня псевдоэозинофильных гранулоцитов. О развитии транзиторных гранулоцитопений при некоторых вирусных инфекциях сообщается в работах Н.И. Бахова с соавт. (2000), И.И. Долгушина и О.В. Бухарина (2001), Н.А. Алексеева (2002), Э.Р. Абдуллазянова с соавт. (2013) и других авторов. По данным А. Ройта с соавт. (2000), снижение уровня нейтрофилов, возникающее при вирусных инфекциях, ведёт к генерализации бактериальных инфекций.

В то же время, по нашим данным, антигенная стимуляция кур против бактериальной инфекции (гемофилёза) приводила к противоположным сдвигам в клеточной популяции лейкоцитов – подъёму уровня псевдоэозинофильных гранулоцитов и снижению числа лимфоцитов. Кроме того, вакцинация против гемофилёза вела к достоверному увеличению уровня моноцитов.

Иммунизации влияли на функциональное состояние лейкоцитов, стимулируя их фагоцитарную активность и усиливая течение свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствовал рост фагоцитарного индекса и суммарных объёмов продукции всех видов кислородных радикалов как в состоянии покоя, так и при раздражении клеток частицами латекса, что наиболее выражено при вакцинации против гемофилёза. В то же время, по данным Е.Г. Турицыной с соавт. (2011), вакцинация птицы против болезни Марека и ньюкаслской болезни способна подавлять как фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови, так и продукцию всех видов кислородных радикалов. Авторы считают, что недостаток АФК, продуцируемых клетками крови, способен негативно влиять на неспецифическую защиту организма и являться одной из причин возникновения поствакцинальных осложнений в виде вспышек бактериальных инфекций.

В то же время избыточные объёмы кислородных радикалов, генерируемые клетками привитой птицы, особенно, в состоянии покоя, несут потенциальную угрозу повреждения клеточных мембран и, по нашему мнению, свидетельствуют о снижении потенциальных возможностей фагоцитов реагировать на дополнительные антигенные стимуляции, на что указывает падение индекса активации, особенно ярко выраженное при вакцинации против болезни Гамборо.

Помимо многочисленных вакцинаций на организм птицы в условиях промышленного производства влияют стрессы различного происхождения. По данным А.В. Мифтахутдинова (2014), И.М. Донник с соавт. (2015), В.И. Фисинина и А.Ш. Кавтарашвили (2015), стрессы оказывают негативное воздействие на морфологические и функциональные показатели клеток крови. В работах J.L. Campo et al. (2008) и В. Bílková et al. (2017) установлено, что разные породы и кроссы кур отличаются разной устойчивостью к стрессам.

Нами установлено, что отклонения температуры содержания цыплят раннего возраста на  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  от нормативных показателей, приводят к развитию температурного стресса, который характеризуется сокращением общего

содержания лейкоцитов, лимфопенией, ростом уровня псевдоэозинофилов, эозинофилов и моноцитов, увеличением соотношения между гетерофилами и лимфоцитами. Сокращение уровня лимфоцитов и появление атипичных клеток в крови при стрессовых состояниях, по мнению А.В. Мифтахутдинова (2011), В.И. Фисинина, П. Сурай (2012), P.F. Cotter (2015), C.G. Scanes (2016), обусловлено значительным выбросом кортикостероидов при стрессах. В то же время С.В. Надеждина с соавт. (2008) утверждают, что интенсивное тепловое воздействие сопровождается не только сокращением числа лейкоцитов, но также лимфоцитозом и нейтропенией.

А.А. Терман (2012), P.F. Cotter (2015), T.L. Lentfer et al. (2015) и другие исследователи считают стандартным инструментом оценки стресса у птицы – определение соотношения гетерофилов и лимфоцитов. Известно, что стрессы резко изменяют соотношение гетерофилов и лимфоцитов в крови птицы [Донник И.М., Дерхо М.А., Харлап С.Ю., 2015; Campo J.L. et al., 2008]. Наши исследования показали, что отношение гетерофилов и лимфоцитов при воздействии высоких и низких температур увеличивается более, чем на 30% относительно фоновых величин. В работе O. Altan et al. (2000) установлено, что при стрессах наблюдается выброс незрелых гетерофилов в кровяное русло и миграция циркулирующих лимфоцитов из крови в ткани, что ведёт к изменению отношения гетерофилы/лимфоциты.

Нами установлено, что тепловой стресс умеренно стимулирует фагоцитарную активность лейкоцитов. Считается, что одной из основных причин повышения функциональной активности лейкоцитов при тепловой нагрузке выступает перестройка липидного слоя цитоплазматических мембран и увеличение активности интегральных мембранных ферментов. Последующее понижение окружающей температуры до  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  вызывает торможение поглотительной способности фагоцитов крови в отношении частиц латекса и снижение фагоцитарной активности. Эти данные согласуются с исследованиями J.L. Campo, M.T. Prieto, S.G. Dávila (2008).

Помимо изменения количества лейкоцитов и их клеточного состава, тепловой стресс у птиц, по данным В.И. Фисинина, А.Ш. Кавтарашвили (2015), характеризуется развитием окислительного стресса, нарушением баланса между продукцией свободных радикалов и количеством нейтрализующих их антиоксидантов, а также стимуляцией фагоцитарной активности лейкоцитов.

В наших исследованиях установлено, что температурные стрессы ведут к избыточной продукции свободных радикалов кислорода, которые способны повреждать мембраны клеток, и снижению индекса активации, что свидетельствует о сокращении функциональных возможностей фагоцитов крови реагировать на антигенные нагрузки. А.Ш. Кавтарашвили, Т.Н. Колокольникова (2010) описали распределение стресс-факторов в птицеводстве по четырёхбалльной шкале. В четыре балла авторы оценивают недостаточный фронт кормления и поения, иерархическую борьбу в группе, плохой уход за птицей, наличие инфекционных и паразитарных болезней, отклонения температуры окружающей среды от нормы (менее 7°C и более 24°C). В три балла – несоответствие птицы по возрасту и развитию, высокий уровень продуктивности, частые изменения температуры и влажности. В два балла – вакцинации, травмы, нарушение распорядка дня. В один балл – рост птицы в первые четыре месяца продуктивности. Следуя указанной классификации, исследованные нами многочисленные вакцинации можно отнести к двухбалльным стрессам, а чередование высоких и низких температур – к трёхбалльным стрессам.

Таким образом, сведения об изменениях гематологических показателей крови современных кроссов сельскохозяйственной птицы, возникающих под влиянием возраста, а также различных по интенсивности, кратности и продолжительности воздействия экстремальных факторов, включая стрессы различного генеза и многократные вакцинации против вирусных и бактериальных инфекций, носят не только общебиологический характер, но имеют большое значение при оценке потенциальных функциональных возможностей клеток крови.



Проведенные нами исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Возрастные изменения морфологических показателей крови кур яичного кросса «Декалб» характеризуются снижением общего содержания лейкоцитов на 240-е и 560-е сутки до  $15,0-15,5 \times 10^9/\text{л}$ , преобладанием псевдоэозинофилов у одно- и 240-суточных кур, лимфоцитарным профилем у птицы первых трёх месяцев жизни и достоверным ростом уровня эозинофилов и моноцитов у взрослых кур.

2. Возрастные изменения функционального состояния лейкоцитов крови кур характеризуются высокой активностью фагоцитов в отношении частиц латекса в 240- и 560-суточном возрасте (55-59%) и низкими показателями – у суточных и двухмесячных цыплят (44-46%). Параметры хемилюминесценции (максимальная интенсивность ХЛ-реакции, суммарная и удельная генерация всех видов АФК лейкоцитами и фагоцитами крови) достигают высоких значений у птицы первого месяца жизни и в разгар яйцекладки на 240-е сутки, достоверно низкие показатели ХЛ-реакции характерны для двухмесячного молодняка и 560-суточных кур.

3. Морфологической особенностью крови перепелов является отсутствие достоверных межвозрастных различий в общем содержании лейкоцитов, за исключением низких показателей у 120- и 240-суточной птицы –  $8,8 \pm 0,5 \times 10^9/\text{л}$  и  $4,8 \pm 0,4 \times 10^9/\text{л}$  соответственно. Основной клеточной популяцией лейкоцитов в первые два месяца жизни, в отличие от кур, являются лимфоциты, с трёхмесячного возраста профиль крови перепелов становится гранулоцитарным.

4. Кислородный метаболизм, отражающий функциональные возможности лейкоцитов крови перепелов, достигает максимальных величин в двух-трёхмесячном возрасте, о чем свидетельствуют высокие показатели фагоцитарной активности и генерация значительных объёмов кислородных радикалов. Минимальные параметры хемилюминесценции отмечены у одно- и 240-суточных перепелов.

5. Для органов иммуногенеза характерна специфическая кинетика хемилюминесценции, которая зависит от возраста цыплят и вида органа. Максимальную активность свободнорадикальных процессов демонстрируют клетки костного мозга суточных цыплят при спонтанной и антигенактивированной

реакции. Клетки селезёнки и, особенно, клоакальной бursы отличаются низкими параметрами ХЛ и слабой индукцией АФК при антигенном ответе *in vitro*. С возрастом в селезёнке наблюдается рост индекса активации, что указывает на появление в органе зрелых радикалообразующих клеток и увеличении потенциальные возможности фагоцитов.

6. На морфологические показатели и хемилюминесценцию клеток крови кур влияют вакцинации против инфекционного ларинготрахеита, болезни Гамборо, гемофилёза и комплексная иммунизация кур против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита и синдрома снижения яйценоскости, что сопровождается лейкоцитозом, активацией фагоцитоза и стимуляцией свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствует рост суммарных объёмов продукции всех видов АФК, особенно при вакцинации против гемофилёза. Значительные объёмы радикалов, генерируемые клетками привитой птицы, особенно, в состоянии покоя, ведут к сокращению индекса активации и несут потенциальную угрозу повреждения клеточных мембран.

7. Особенности морфологических показателей и параметров хемилюминесценции крови кур при моделируемых температурных стрессах проявляются сокращением общего числа лейкоцитов, снижением уровня лимфоцитов, ростом содержания псевдоэозинофилов, эозинофилов и моноцитов, увеличением соотношения между гетерофилами и лимфоцитами и стимуляцией фагоцитарной активности после теплового воздействия и сопровождается избыточной продукцией свободных радикалов клетками крови, особенно при спонтанной хемилюминесценции, что сочетается со снижением индекса активации и свидетельствует о сокращении функциональных возможностей фагоцитов крови.

Результаты проведенных нами комплексных исследований позволяют сделать следующие практические предложения.

1. Рекомендовать ветеринарным специалистам птицефабрик применение хемилюминесцентного анализа при оптимизации технологии содержания птицы и выявления критических точек технологического цикла.

2. Использовать параметры хемилюминесценции крови и суспензии органов в качестве референтных показателей в научных исследованиях при изучении свободнорадикальных процессов и в практической работе при оценке раннего повреждающего действия факторов внешней среды на организм птицы и решении вопроса о целесообразности назначения препаратов с антиоксидантными или прооксидантными свойствами.

3. Результаты возрастных морфологических особенностей и хемилюминесценции крови кур и перепелов использовать при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами, обучающимися специальности «Ветеринария» и направлению подготовки «Биология».

В настоящее время результаты наших исследований используются в практической работе ветеринарных специалистов на ОАО «Птицефабрика Заря» Красноярского края (акт внедрения от 18 июня 2018 г.); включены в научно-практические рекомендации «Факторы технологических процессов и характеристик сырья, влияющие на показатели безопасности мяса птицы и продуктов его переработки» (утверждены Научно-техническим советом ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», протокол № 3 от 6 декабря 2017 г.); используются в учебном процессе при изучении морфологии и физиологии сельскохозяйственных птиц в ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», Российский университет дружбы народов, ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет имени Н.Ф. Катанова», ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет имени А.А. Ежевского».

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

**АФК** – активные формы кислорода

**БГ** – болезнь Гамборо

**ИА** – индекс активации

**ИЛТ** – инфекционный ларинготрахеит птиц

**ИБК** – инфекционный бронхит кур

**НБ** – ньюкаслская болезнь

**ССЯ** – синдром снижения яйценоскости

**ФА** – фагоцитарная активность

**ФИ** – фагоцитарный индекс

**ХЛ** – хемилюминесценция

**ХЛ-зонд** – хемилюминесцентный зонд

**ХЛ-реакция** – хемилюминесцентная реакция

**S** – суммарный объем свободных радикалов за 90 мин. (импульсы)

**I<sub>max</sub>** – максимальная интенсивность хемилюминесценции (импульсы в секунду)

**T<sub>max</sub>** – время достижения максимума хемилюминесценции (мин.)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдуллазянова, Э.Р. Изменение клеточного состава периферической крови у диких уток при экспериментальной гриппозной инфекции / Э.Р. Абдуллазянова, А.В. Зайковская, Е.А. Шерстков, А.М. Шестопапов, М.С. Виноградова, Л.В. Шестопапова // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2013. – Том 11. – Выпуск 3. – С. 78-83.
2. Азаубаева, Г.С. Изменение показателей крови гусынь различных пород в зависимости от периода продуктивности осенней яйцекладки / Г.С. Азаубаева // Вестник Курганского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2012. – Т. 2. – № 21. – С. 18-24.
3. Алексеев, Н.А. Клинические аспекты лейкопений, нейтропений и функциональных нарушений нейтрофилов / Н.А. Алексеев. – СПб: Фолиант, 2002. – 416 с.
4. Алёхин, Е.К. Функциональное состояние нейтрофилов при интоксикации тетрахлорметаном у крыс / Е.К. Алёхин, Л.Ф. Муфазалова, Н.А. Муфазалова // Казанский медицинский журнал. – 2012. – Том 93. – №3. – С. 502-504.
5. Анников, В.В. Анализ гематологических и гистологических данных травматологически больных животных при использовании кафорсена / В.В. Анников, Е.А. Якимчук // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 3. – № 31-1. – С. 114-117.
6. Багно, О.А. Морфологические показатели крови перепелов при скормливании селен- и йодсодержащих добавок / О.А. Багно, А.И. Алексеева // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – № 10 (120). – С 86-90.
7. Бажибина, Е.Б. Методологические основы оценки клинико-морфологических показателей крови домашних животных: учебное пособие / Е.Б. Бажибина, А.В. Коробов, С.В. Серeda, В.П. Сапрыкин. – М.: ООО «Аквариум-Принт», 2005. – 128 с.

8. Бахов, Н.И. Механизм защиты организма от вирусных инфекций: нейтрофильные лейкоциты / Н.И. Бахов, Ю.Ф. Майчук, А.В. Корнев // Успехи современной биологии. – 2000. – Т. 130. – № 1. – С.23-35.
9. Беляева, Е.Ю. Морфофункциональные параметры клеток крови у кур при адаптации к режимам освещения / Е.Ю. Беляева, Л.К. Бусловская, А.Ю. Ковтуненко // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2013. – Т. 23. – № 10. – С. 107-111.
10. Берлов, М.Н. Исследование антимикробной активности миелопероксидазы и лактоферрина / М.Н. Берлов, Е.С. Кораблева, В.Б. Филимонов, В.Н. Кокряков // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2009. Сер. 3. – Вып.1. – С. 83-89.
11. Бессарабов, Б.Ф. Защитные механизмы птицы в постэмбриональном развитии / Б.Ф. Бессарабов // Птицеводство. – 2009. – № 10. – С. 46-47.
12. Бирман, Б.Я. Диагностика, лечение и профилактика иммунодефицитов птиц / Б.Я. Бирман, И.Н. Громов. – Минск: Бизнесофсет, 2004. – 104 с.
13. Богатов, М.А. Влияние малых концентраций железа на интенсивность процессов свободнорадикального окисления у лабораторных животных / М.А. Богатов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. – № 16. – С. 123-124.
14. Болотников, И.А. Гематология птиц / И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев. – Л.: Наука, 1980. – 116 с.
15. Болотников, И.А. Практическая иммунология сельскохозяйственной птицы / И.А. Болотников, Ю.В. Конопатов. – СПб: Наука, 1993. – 208 с.
16. Бурков, П.В. Влияние «геприм для кур» на морфобиохимические показатели крови ремонтного молодняка и последующую продуктивность кур-несушек / П.В. Бурков // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – №1. – С. 39-42.
17. Бусловская, Л.К. Характеристика адаптационных реакций у кур при вибрационном воздействии разной частоты и транспортировке / Л.К.

- Бусловская, Л.К. Бусловская, А.Ю. Ковтуненко // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 6. – С. 80-84.
18. Вагнер, В.К. Количественная оценка теста восстановления нитросинего тетразолия / В.К. Вагнер, О.С. Насонкин, Н.Д. Борискина // Лабораторное дело. – 1989. – № 12. – С.31-33.
  19. Валеева, Л.А. Гемато-цитохимические показатели у кур после вакцинации против болезни Марека / Л.А. Валеева, Ф.З. Авзалов, М.В. Харитонов // Ветеринарный врач. – 2007. – № 3. – С. 8-10.
  20. Васильев, Ю.Г. Ветеринарная клиническая гематология: учебное пособие / Ю.Г. Васильев, Е.И. Трошин, А.И. Любимов. – СПб: Лань, 2015. – С. 165-218.
  21. Веснина, Ж.В. Влияние рентгеноконтрастных веществ на основе йода и гадолиния на клеточный состав крови и морфологию почек / Ж.В. Веснина, Н.В. Литовченко, А.М. Гуляев, М.В. Фадеев, Ю.Б. Лишманов // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – № 4 – С. 45-50.
  22. Винник, Ю.С. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа / Ю.С. Винник, А.А. Савченко, О.В. Теплякова, С.В. Якимов, Е.Ю. Тепляков // Сибирский медицинский журнал. – 2004. – № 5. – С. 11-16.
  23. Вихман, А.А. О сравнительной иммунофизиологической характеристике лахвинского и тремлянского карпов: Труды ВНИИПРХ / А.А. Вихман, Е.В. Таразевич. – М., 1992. – С. 39-48.
  24. Вишняков, А.И. Возрастная динамика изменения показателей периферической крови птицы при действии гамма-излучения различной дозировки / А.И. Вишняков, Е.А. Уварова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – № 10 (159). – С. 50-52.
  25. Владимиров, Ю.А. Лекции по медицинской биофизике / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина: учебное пособие. – М.: Издательство МГУ; ИКЦ «Академкнига», 2007. – 432 с.

26. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т.49. – С. 341-388.
27. Власенко, В.С. Метаболическая активность нейтрофилов периферической крови при лейкозе крупного рогатого скота / В.С. Власенко, А.И. Иванов, Т.С. Дудолодова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – С. 37-41.
28. Власенко, В.С. Оценка функциональной активности нейтрофилов крови морских свинок, инфицированных R-формой бруцелл / В.С., Власенко, Л.В. Дегтяренко, А.И. Иванов // Теоретические и практические аспекты развития современной ветеринарной науки: Тр. КазНИВИ. – 2012. – Т. 58. – С. 67-72.
29. Волкова, М.А. Оценка иммунного ответа цыплят на заражение изолятом метапневмовируса птиц / М.А. Волкова, А.В. Ирза, И.В. Бахчин, П.С. Ярославцева, Т.И. Ерошина // Труды федерального центра охраны здоровья животных. Владимир. – 2015. – Том 13. – № 1. – С. 113-123.
30. Вракин, В.Ф. Анатомия и гистология домашней птицы: учебник / В.Ф. Вракин, М.В. Сидорова. – М.: Колос, 1984. – С. 211-217.
31. Галеев, Р.Ф. Проблема гемобластозов сельскохозяйственных животных и птиц / Р.Ф. Галеев // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2007. – № 9. – С. 18-22.
32. Горшков, Г.И. Испытание лечебной эффективности полиоксидония при синдроме ММА у свиней / Г.И. Горшков, А.Я. Хмельков, Е.Г. Яковлева, Р.В. Анисько // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 8. – С. 69-71.
33. Громов, И.Н. Иммуноморфогенез у кур, вакцинированных против инфекционного ларинготрахеита / И.Н. Громов, В.С. Прудников, Б.Я. Бирман // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2004. – № 2. – С. 30-34.



34. Дегтяревская Т.Ю. Реакция эозинофилов в крови молодняка овец при экспериментальном диктиокаулезе и после комплексного лечения / Т.Ю. Дегтяревская // Российский паразитологический журнал. – 2016. – №3 (37). – С. 370-373.
35. Дерхо, М.А. Интегральные индексы интоксикации как критерий оценки уровня эндогенной интоксикации при бабезиозе собак / М.А. Дерхо, Е.С. Самойлова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2011. – Том 207. – С. 177-182.
36. Долгушин, И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин, О.В. Бухарин. – Екатеринбург: Ин-т клеточ. и внутриклеточ. симбиоза УрО РАН, 2001. – 277 с.
37. Домосканов, И.С. Гематологические показатели поросят при кишечных нематодозах и после дегельминтизации фебталом / И.С. Домосканов, М.Ш. Акбаев // Российский паразитологический журнал. – 2011. – № 4. – С. 83-85.
38. Донкова, Н.В. Цитофункциональная эндоэкология сельскохозяйственных птиц при воздействии лекарственных ксенобиотиков: монография / Н.В. Донкова. – Красноярск: Изд-во КрасГАУ, 2004. – 268 с.
39. Донник, И.М. Клетки крови как индикатор активности стресс-реакций в организме цыплят / И.М. Донник, М.А. Дерхо, С.Ю. Харлап // Аграрный вестник Урала. – 2015. – № 5(135). – С. 68-71.
40. Дюсенова, Г.М. Применение хемилюминесценции иммунокомпетентных клеток крови для прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 16.00.02 / Г.М. Дюсенова. – Новосибирск, 2006. – 20 с.
41. Ерёмина, И.Ю. Возрастные особенности кислородного метаболизма клеток крови крупного рогатого скота / И.Ю. Ерёмина, Г.В. Макарская, С.В. Тарских // Вестник КрасГАУ. – 2010. – № 11. – С.128-135.
42. Ермашкевич, Е.И. О возможности применения лейкоцитарных индексов в комплексной диагностике субклинических гепатозов у кур-несушек / Е.И.

- Ермашкевич, Л.В. Клетикова, А.Н. Мартынов, Н.Н. Якименко // Успехи современной науки и образования. – 2016. – № 2. – С. 161-165.
43. Ермолина, С.А. Морфобиохимический статус крови у телят, больных бронхопневмонией и диспепсией / С.А. Ермолина, А.В. Ермолин, А.А. Ивановский // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – № 4. – С. 50-53.
44. Ерохин, В.В. Избирательное влияние легочного сурфактанта на разные субпопуляции альвеолярных макрофагов при туберкулезе / В.В. Ерохин, Л.Н. Лепеха, И.В. Бочарова, А.В. Курынина, Г.Е. Онищенко // Вестник РАМН. – 2012. – № 11. – С. 22-28.
45. Жуков, А.П. Информативность лейкоцитарных индексов в лабораторном скрининге лёгочной патологии у телят / А.П. Жуков, Е.Б. Шарафутдинова, А.П. Датский // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – № 3. – С. 101-104.
46. Жуков, В.М. Применение малавита в птицеводстве / В.М. Жуков, Н.М. Семенихина // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2016. – № 5 (139). – С. 113-116.
47. Зарубина, И.В. Противовоспалительная и иммуномодулирующая активность метапрота, трекрезана и полиоксидония и их комбинаций при экспериментальном бронхолегочном воспалении у крыс / И.В. Зарубина, Е.В. Мокренко, А.В. Болехан, П.Д. Шабанов // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2016. – Т. 15. – № 1. – С. 5-13.
48. Земсков, В.М. Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток): методические рекомендации / В.М. Земсков, А.А. Барсуков. – М.: Институт иммунологии МЗ СССР, 1988. – 20 с.
49. Земсков, В.М. Фундаментальные и прикладные аспекты анализа кислородного метаболизма фагоцитарных клеток / В.М. Земсков, А.А. Барсуков, Д.А. Гнатенко, Н.С. Шишкина, А.Н. Куликова, М.Н. Козлова // Успехи современной биологии. – 2013. – № 5. – С. 469-480.

50. Зинкин, В.Ю. Фотометрический НСТ-тест с нейтрофилами крови человека и его клинико-иммунологическая значимость у больных с травмой опорно-двигательного аппарата: автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.Ю. Зинкин. – М., 2004. – 18 с.
51. Иванова, Р.Н. Морфология, биохимические показатели крови, продуктивность и сохранность перепелов при использовании пробиотической добавки к корму «бацелл» / Р.Н. Иванова, И.А. Алексеев // Российский журнал. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2012. – № 1. – С. 168-172.
52. Кавтарашвили, А.Ш. Стресс в промышленном птицеводстве и методы его предупреждения / А.Ш. Кавтарашвили, Т.Н. Колокольникова // РацВетИнформ. – 2010. – № 4. – С. 13-19.
53. Кантюков, С.А. Состояние процессов свободно-радикального окисления при остром поражении печени / С.А. Кантюков, Л.В. Кривохижина, Р.Р. Фархутдинов // Человек. Спорт. Медицина. – 2011. – № 39 (256). – С. 107-112.
54. Карпуть, И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных / И.М. Карпуть. – Минск: Ураджай, 1986. – 183 с.
55. Ковтуненко, А.Ю. Морфофункциональные параметры эритроцитов крови кур при адаптации к фотодесинхронозу / А.Ю. Ковтуненко // Актуальные вопросы современной науки. – 2015. – № 1 (5). – С. 18-21.
56. Кокряков, В.Н. Катионные белки лизосом нейтрофильных гранулоцитов при фагоцитозе и воспалении / В.Н. Кокряков // Вопросы медицинской химии. – 1990. – №6. – С.13-16.
57. Колабская, Л.С. Естественная резистентность птиц. В кн. Справочник ветеринарного врача птицеводческого предприятия / Л.С. Колабская. – М.: Колос, 1982. – С. 237-243.

58. Коленчукова, О.А. Специфика фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов в ответ на воздействие / О.А. Коленчукова, Н.И. Сарматова // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – № 5. – С. 189.
59. Колесник, Е.А. Сезонная динамика физиологических параметров крови и их связь с уровнем сохранности бройлеров / Е.А. Колесник, М.А. Дерхо // Вестник Томского государственного университета. – 2013. – № 368. – С. 186-188.
60. Колесников, П.В. Сравнительные гематологические показатели при болезнях вирусной этиологии у собак с острой сердечно-сосудистой недостаточностью / П.В. Колесников // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса. – 2014. – № 2 (34). – С. 89-91.
61. Концевова, А.А. Применение рефлексотерапии для лечения заболеваний органов пищеварения у собак / А.А. Концевова // Вестник РУДН. Серия Агронимия и животноводство. – 2008. – № 1. – С. 86-91.
62. Коровин, Р.Н. Лабораторная диагностика болезней птиц: справочник / Р.Н. Коровин, В.П. Зеленский, И.А. Грошева. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 244-245.
63. Костылева, О.А. Стафилококкозы собак и кошек (клиника, лечение) / О.А. Костылева // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2005. – № 2 (18). – С. 49-52.
64. Крайнов, В.В. Гематологические показатели у инвазированных гетеракисами цыплят после их дегельминтизации / В.В. Крайнов, М.Х. Лутфуллин // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2013. – С. 173-175.
65. Кривохижина, Л.В. Хемилюминесценция тромбоцитов. Использование метода хемилюминесценции для определения активности тромбоцитов / Л.В. Кривохижина, С.А. Кантюков, Е.Н. Ермолаева, Д.Н. Кривохижин // Вестник Тюменского ГАУ. – 2013. – № 6. – С. 174-181.

66. Курятова, Е.В. Применение препарата «Малавит» у телят при острых гастроэнтеритах неинфекционной этиологии / Е.В. Курятова, // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2005. – № 4. – С. 33-35.
67. Лапкина, Е.З. Влияние травяной добавки на основе крапивы двудомной (*urtica dioica*) и звездчатки средней (*stellaria media*) в кормлении японских перепелов на параметры генерации активных форм кислорода клетками их цельной крови / Е.З. Лапкина, Г.В. Макарская, Л.С. Тирранен // Вестник КрасГАУ. – 2016. – № 12. – С.44-50.
68. Люто, А.А. Морфология клеток крови коров с серопозитивной и гемосомнительной реакцией на лейкоз / А.А. Люто, М.М. Филиппьев, Н.В. Донкова // Вестник КрасГАУ. – 2012. – №10. – С. 144-148.
69. Мазинг, Ю.А., Старосельская И.Я. Оценка надежности лизосомально-катионного теста для лабораторной диагностики / Ю.А. Мазинг, И.Я. Старосельская // Лабораторное дело. – 1981. – № 10. – С. 82-84.
70. Мазихова, А.М., Беккиева С.А., Юсупов А.О., Чиляев С.Ш. Влияние трематодозных инвазий на морфологический состав крови крупного рогатого скота / А.М. Мазихова, С.А. Беккиева, А.О. Юсупов, С.Ш. Чиляев // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 4. – С. 163-164.
71. Майорова, О.В. Динамика фагоцитарной активности лейкоцитов в крови у свиней разных пород при коррекции воднитом / О.В. Майорова, Г.В. Молянова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – С. 88-92.
72. Макарская, Г.В. Люминол- и люцигенинзависимая хемилюминесценция клеток цельной крови кур в постнатальном онтогенезе / Г.В. Макарская, С.В. Тарских, Е.Г. Турицына // Доклады РАСХН. – 2011. – № 3. – С. 46-48.
73. Макарская, Г.В. Хемилюминесцентный анализ функциональной активности фагоцитирующих клеток крови рыб / Г.В. Макарская, В.Н. Лопатин, С.В. Тарских // Доклады академии наук. – 2003. – Т. 390. – № 3. – С.420-422.

74. Мансурова, Е.А. Динамика изменений гематологических показателей при желудочно-кишечных болезнях животных / Е.А. Мансурова, Е.М. Ленченко // Аграрная наука. – 2011. – № 6. – С. 30-32.
75. Мартусевич, А.К. Оксидативный стресс и его роль в формировании дизадаптации и патологии / А.К. Мартусевич, К.А. Карузин // Биорадикалы и Антиоксиданты. – 2015. – Т. 2. – № 2. – С. 5-18.
76. Матвеева, Н.С. Активированная люцигенином хемилюминесценция клеток животных / Н.С. Матвеева, О.Б. Любицкий, А.Н. Осипов, Ю.А. Владимиров // Биофизика. – 2007. – Т. 52. – № 6. – С. 1120-1127.
77. Маянский, А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция / А.Н. Маянский // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6. – № 3. – С. 3-13.
78. Маянский, Д.Н. Лекции по клинической патологии: руководство для врачей / А.Н. Маянский. – М.: ГЭОТАР, 2008. – 464 с.
79. Мерзленко, Р.А. Гепатоз у лакирующих коров и его клинико-биохимические корреляты / Р.А. Мерзленко, М.Н. Заздравных, В.В. Дронов, Г.И. Горшков // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 6. – С. 78-80.
80. Миколенко, О.Н. Анализ проявлений мочекаменной болезни у кошек / О.Н. Миколенко, Ю.А. Ватников // Российский ветеринарный журнал. Сер. Мелкие домашние животные. – 2015. – № 6. – С. 14-16.
81. Минзюк, Т.В. Бактерицидный катионный белок в лейкоцитах морских млекопитающих / Т.В., Минзюк, Н.Н. Кавцевич // Вестник МГТУ. – 2013 – Т. 16. – №3. – С. 506-511.
82. Мифтахутдинов, А.В. Взаимосвязь стрессовой чувствительности кур и развития адаптационных реакций в условиях промышленного содержания / А.В. Мифтахутдинов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 9 (83). – С. 65-68.
83. Мифтахутдинов, А.В. Особенности проявления лейкоцитарной реакции на транспортировку у цыплят с неодинаковой чувствительностью к стрессу /

- А.В. Мифтахутдинов, А.И. Кузнецов // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 4. – С. 62-68.
84. Мифтахутдинов, А.В. Экспериментальные подходы к диагностике стрессов в птицеводстве / А.В. Мифтахутдинов // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 2. – С. 20-30.
85. Мкртчян, М.Э. Патогенное воздействие трематод и их ассоциаций на организм хозяина / М.Э. Мкртчян, С.О. Мовсисян // Российский паразитологический журнал. – 2015. – № 4. – С. 66-71.
86. Муравьев, Р.А. Механизм бактерицидной активности в фагосомах нейтрофилов / Р.А. Муравьев, П.Г. Бут, В.А. Фомина [и др.] // Известия АН. Серия Биологическая. – 2002. – № 4. – С. 437-441.
87. Нагоев, Б.С. Катионный белок лейкоцитов и его значение: методические указания / Б.С. Нагоев. – Нальчик, 1982.
88. Надеждин, С.В. Изменения функциональной активности лейкоцитов в условиях острого перегревания организма / С.В. Надеждин, М.З. Федорова, Н.А. Павлов, Е.В. Зубарева // Научные ведомости. – 2008. – № 3 (43) – С. 5-11.
89. Науменко, П.А. Гематологические показатели крови у телят молочного периода выращивания / П.А. Науменко, Е.А. Комкова, Х.М. Зайналабдиева, Д.Л. Арсанукаев // Вестник Орловского ГАУ. – 2013. – № 1 (13). – С. 122-125.
90. Новикова, И.А. Клиническая и лабораторная гематология / И.А. Новикова, С.А. Ходулева. – Минск: Высш. школа, 2013. – 446 с.
91. Павленко, О.Б. Состояние гомеостаза при осложнении субклинического мастита с острым послеродовым эндометритом у коров / О.Б. Павленко, С.М. Сулейманов // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2014. – № 4. – С. 79-81.
92. Пацула, Ю.И. Ускоренный метод визуализации восстановленного нитросинего тетразолия для оценки функциональной активности

- нейтрофилов / Ю.И. Пацула, В.С. Власенко // Ветеринария и кормление. – 2009. – № 4. – С. 20-21.
93. Пигаревский, В.Е. Лизосомально-катионный тест: методическое письмо / В.Е. Пигаревский, Ю.А. Мазинг. – Ленинград, 1987. – 13 с.
94. Погорелова, Н.А. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления молока коров, больных послеродовым эндометритом / Н.А. Погорелова, В.Е. Высокогорский, Н.В. Стрельчик // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 4. – С. 76-80.
95. Пронина, Г.И. Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья / Г.И. Пронина. – Оренбург: Известия ОГАУ, 2008. – С. 160-163.
96. Рожина, О.И. Вторичные иммунодефициты животных вирусной этиологии / О.И. Рожина // Научно-исследовательские публикации. – 2015. – 121 с.
97. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д.М. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
98. Садовников, Н.В. Использование метода биохемилюминесценции и ферментативной антиокислительной системы крови для оценки функционального состояния цыплят в норме и гипотрофии / Н.В. Садовников // БИО. – 2002. – № 4. – С. 16-17.
99. Садовников, Н.В. Общие и специальные методы исследования крови птиц промышленных кроссов / Н.В. Садовников, Н.Д. Предыбайло, Н.А. Верещак, А.С. Заслонов. – Екатеринбург; Санкт-Петербург, 2009. – 85 с.
100. Староселов, М.А. Иммунобиологические показатели инфицированных вирусом лейкоза КРС и больных лейкозом коров в сравнении с интактными / М.А. Староселов, Н.Ю. Басова // Научный журнал Кубанского ГАУ. – 2008. – № 6 (40). – С. 1-8.



101. Суханова, С.Ф. Морфобиохимические показатели неспецифического иммунитета гусынь и гусят-бройлеров, потреблявших Лив 52 вет / С.Ф. Суханова // Вестник АПК Ставрополя. – 2017. – № 2 (26). – С. 109-120.
102. Сычева, М.В. Модификация метода восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами коз / М.В. Сычева, В.М. Мешков, Н.М. Лившиц, А.И. Смолягин, И.Н. Чайникова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2005. – С. 95-97.
103. Терман А.А. Влияние транспортировочного стресса на динамику соотношения гетерофилов к лимфоцитам крови у цыплят с разной стрессовой чувствительностью под действием лития цитрата / А.А. Терман // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 209. – С. 293-298.
104. Тимончева, М.С. Влияние кормосмеси с разным уровнем обменной энергии на морфологические показатели крови перепелов / М.С. Тимончева, Л.Ф. Бодрова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2014. – № 4 (48). – С. 100-102.
105. Ткаченко, Е.А. Лейкоцитарные индексы при экспериментальной кадмиевой интоксикации мышей / Е.А. Ткаченко, М.А. Дерхо // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2014. – № 3 (47). – С. 81-83.
106. Трубкин, А.И. Фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови у разных видов животных / А.И. Трубкин, М.В. Харитонов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – С. 238-244.
107. Турицына, Е.Г. Оценка метаболической активности лейкоцитов птиц в постнатальном онтогенезе и при вирусных антигенных воздействиях / Е.Г. Турицына // Аграрный вестник Урала. – 2009. – № 7 (61). – С. 76-79.

108. Турицына, Е.Г. Особенности кислородного метаболизма клеток крови кур при иммунизациях // Е.Г. Турицына, Г.В., Макарская, С.В. Тарских / Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2011. – № 2. – С.84-89.
109. Турицына, Е.Г. Динамика параметров хемилюминесценции клеток органов иммуногенеза цыплят раннего возраста / Е.Г. Турицына, Г.В. Макарская, С.В. Тарских, П.Ю. Царев // Вестник КрасГАУ. – 2013. – № 9. – С. 171-175.
110. Турицына, Е.Г., Климова Е.А. Морфологическая и цитометрическая характеристика лейкоцитов крови перепелов в возрастном аспекте / Е.Г. Турицына, Е.А. Климова // Вестник КрасГАУ. – 2014. – № 9. – С. 157-160.
111. Тэмл, Х. Атлас по гематологии: практическое пособие по морфологической и клинической диагностике / Х. Тэмпл. – М: МЕДпресс-информ, 2010. – 207 с.
112. Узбекова, С.Е. Влияние имунофана на неспецифическое фагоцитарное звено иммунитета организма, облученного фракционированной дозой в отдаленном периоде / С.Е. Узбекова, Б.А. Жетписбаев, А.К. Мусайнова, Д.Е. Узбеков, Г.С Шалгимбаева // Наука и здравоохранение. – 2013. – № 1. – С. 50-51.
113. Фархутдинов, Р.Р. Свободнорадикальное окисление: мифы и реальность (избранные лекции) / Р.Р. Фархутдинов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2006. – № 1. – С. 146-152.
114. Фисинин В.И. Первые дни жизни цыплят: от защиты от стрессов к эффективной адаптации / В.И. Фисинин, П. Сурай // Птицеводство. – 2012. – № 2. – С. 11-15.
115. Фисинин, В.И. Тепловой стресс у птицы. Сообщение 1. Опасность, физиологические изменения в организме, признаки и проявления / В.И. Фисинин, А.Ш. Кавтарашвили // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 15. – № 2. – С. 162-171.
116. Хабибуллин, Р.Р. Теоретические и практические аспекты процесса люминолзависимой хемилюминесценции в живых организмах / Р.Р.

- Хабибуллин, А.В. Федосов // Башкирский химический журнал. – 2006. – Т. 13. – № 2. – С.106.
117. Харлап, С.Ю. Особенности лейкограммы цыплят в ходе развития стресс-реакции при моделированном стрессе / С.Ю. Харлап, М.А. Дерхо, Т.И. Середя // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – № 2 (52). – С. 103-105.
118. Хейхоу, Ф.Г.Дж. Гематологическая цитохимия / Ф.Г.Дж. Хейхоу, Д. Кваглино. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.
119. Хидирова, Л.Д. Воспалительные реакции при повреждении миокарда в эксперименте / Л.Д. Хидирова, Н.Н. Маянская // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2012. – № 8 (5). – С. 717-720.
120. Чернявских, С.Д. Сезонные колебания показателей фагоцитоза эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов позвоночных животных / С.Д., Чернявских, М.З. Федорова, Е.В. Масленникова // Научные ведомости. Серия Естественные науки. – 2011. – Вып. 16. – № 15 (110). – С. 68-73.
121. Шахов, А.Г. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных заболеваний / А.Г. Шахов // Свободные радикалы в патогенезе заболеваний животных: мат-лы науч.-практ. конф. – Воронеж, 2004. – С.3-10.
122. Ширшев, С.В. Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов по степени гашения биолюминесценции / С.В. Ширшев, Е.М. Куклина, С.А. Заморина, И.В. Некрасова, Н.М. Никитина // Иммунология. – 2014. – № 6. – С. 312-316.
123. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
124. Altan, O. Effects of heat stress on some blood parameters in broilers / O. Altan, A. Altan, M. Qabuk, H. Bayraktar // Turkish Journal Veterinary Animal Science. – 2000. – Vol. 24. – P. 145-148.
125. Baikench, M.G. Eosinophiles, IgE et helminthiasis / M.G. Baikench, G.I. Magnaval // Rev. Med. Vet. – 1993. – Vol. 144. – № 12. – P. 967-974.

126. Bickford, D. Identifying Avian Blood Cells / D. Bickford // Focus: exotics. – 2007. – Vol 28. – № 8. – P. 1050-1056.
127. Bílková, B. Different breeds, different blood: Cytometric analysis of whole blood cellular composition in chicken breeds / B. Bílková, Z. Bainová, J. Janda, L. Zita, M. Vinkler // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2017. – Vol. 188. – P. 71-77.
128. Braga, P.C. Antioxidant activity of hyaluronic acid investigated by means of chemiluminescence of equine neutrophil bursts and electron paramagnetic resonance spectroscopy / P.C. Braga, D.M. Sasso, N. Lattuada // J. Vet. Pharmacol. Ther. – 2015. – № 1 (38). – P. 48-54.
129. Cadroy, Y. Polymorphonuclear leukocytes modulate tissue factor production by mononuclear cells: role of reactive oxygen species / Y. Cadroy, D. Dupouy, B. Boneu, H. Plaisancie // J. Immunol. – 2000. – Vol. 164 (7). – P. 3822-3828.
130. Campo, J.L. Effects of housing system and cold stress on heterophil-to-lymphocyte ratio, fluctuating asymmetry, and tonic immobility duration of chickens / J.L. Campo, M.T. Prieto, S.G. Dávila // Poultry Science. – 2008. – Vol. 87. – № 4. – P. 621-626.
131. Chadfield, M. Determination of the oxidative burst chemiluminescent response of avian and murine-derived macrophages versus corresponding cell lines in relation to stimulation with Salmonella serotypes / M. Chadfield, J. Olsen // Vet. Immunol. Immunopath. – 2001. – Vol. 80. – № 3-4. – P. 289-308.
132. Clark, Ph. Atlas of Clinical Avian Hematology / Ph. Clark, W. Boardman, S. Raidal. – United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2009. – 200 p.
133. Conlon, P. Oxygen radical production by avian leukocytes / P. Conlon, D. Smith, T. Gowlett // Can. J. Vet. Res. – 1991. – Vol. 55 (2). – P. 193-195.
134. Cotter, P.F. Atypical lymphocytes and leukocytes in the peripheral circulation of caged hens / P.F. Cotter // Poultry Science. – 2015. – № 7. – P. 1439-1445.
135. De Guise S., Flipo D., Boehm J.R. et al. Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry / S. De Guise, D. Flipo, J.R.

- Boehm [et al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 1995. – Vol. 47. – № 3-4. – P. 351-362.
136. Desmidt, M. Oxygenation activity of chicken blood phagocytes as measured by luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence / M. Desmidt, A. Van Nerom, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, M.T. Ysebaert // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1996. – № 53. – P. 303-311.
137. Docan, A. Haematological response of the European cattle *Silurus glanis* reared at different densities in «flow-through» production system / A. Docan, V. Cristea, I. Grecu, L. Dediu // *Archiva Zootechnica*. – 2010. – № 13. – P. 63-70.
138. Dri, P. Oxidative metabolism of chicken polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis / P. Dri, B. Bisiacchi, R. Cramer [et al.] // *Molecul. Cell Biochem.* – 1978. – Vol. 22. – P.159- 166.
139. Dri, P. Phagocytosis in pup and adult harbour, grey and harp seals / P. Dri, B. Bisiacchi, R. Cramer [et al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2010. – Vol. 134. – № 3-4. – P. 160-168.
140. Egami, M.I. Topochemistry of blood cells of the *Gallus domesticus* (Aves, Galliforme) / M.I. Egami, W.S. Sasso // *Rev. Bras. Biol.* – 1991. – № 1 (51). – P. 211-214.
141. Faulker, K. Luminol and lucigenin as detectors for  $\bullet\text{O}_2^-$  / K. Faulker, I. Fiodorovich // *Free Radical Biol. Med.* – 1993. – Vol. 15. – P. 447-451.
142. Ferdous, F. A comparative examination of thrombocyte/platelet immunity / F. Ferdous, T.R. Scott // *Immunol. Lett.* – 2015. – № 163. – P. 32-39.
143. Guimarãesa, M.C.C. Macrophages from chickens selected for high antibody response produced more nitric oxide and have greater phagocytic capacity / M.C.C. Guimarãesa, L.V.C. Guillermoa, M.F.R. Mattac [et al.] // *Vet. Immunol. Immunopath.* – 2011. – Vol. 140. – P. 317-322.
144. Huang, H.S. Platelets in inflammation and immune modulations: functions beyond hemostasis / H.S. Huang, H.H. Chang // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. – 2012. – № 60. – P. 443-451.

145. Jones, M.P. Avian hematology / M.P. Jones // Clin. Lab. Med. – 2015. – Vol. 35. – № 3. – P. 649-655.
146. Kim, C. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways / C. Kim, M.C. Dinauer // J. Immunol. – 2001. – Vol.166. –P. 1223-1232.
147. Lentfer, T.L. H/L ratio as a measurement of stress in laying hens – methodology and reliability / T.L. Lentfer, H. Pendl, S.G. Gebhardt-Henrich, E.K. Fröhlich, E. Von Borell // Br. Poultry Science. – 2015. – Vol. 56. – № 2. – P. 157-163.
148. Liu, G. Modulation of neutrophil development and homeostasis / G. Liu, H. Yang, X. Chen [et al.] // Curr. Mol. Med. – 2013. – Vol. 13. – № 8. – P. 1270-1283.
149. Ma, H. Monocytes-macrophages phagocytosis as a potential marker for disease resistance in generation 1 of dwarf chickens / H. Ma, Z.H. Ning, Y. Lu, H.B. Han, S.H. Wang, J.F. Mu, J.Y. Li, Z.X. Lian, N. Li // Poultry Science. – 2010. – Vol. 89. – № 9. – P. 2022-2029.
150. Magrisso, M.Y. Functional states of polymorphonuclear leukocytes determined by chemiluminescent kinetic analysis / M.Y. Magrisso, Alexandrova M.L., Markova V.I., Bechev B.G., Bochev P.G. // Luminescens. – 2000. – № 15. – P. 143-151.
151. Maxwell, M.H. The avian heterophil leucocyte: a review / M.H. Maxwell, G.M. Robertson // World's Poultry Science Journal. – 1998. – Vol. 54. – P. 155-178.
152. Merrill, G.A. Effects of inhibitors on chicken polymorphonuclear leukocyte oxygenation activity measured by use of selective chemiluminogenic substrates / G.A. Merrill, R. Bretthauer, J. Wright-Hicks [et al.] // Comparative Medicine. – 2001. – Vol. 51. – P. 16-21.
153. Mitchell, E.B. Avian hematology and related disorders / E.B. Mitchell, J. Johns // Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract. – 2008. – Vol. 11. – №3. – P. 501-522.
154. Pack, B.H., Fikrig S.M., Smithwich E.M. Infection and nitrobluetetrazolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid // Lancet. – 1968. – Vol.11. – № 2. – P.532-534.

155. Papp, Z. Validation and novel applications of the whole-blood chemiluminescence assay of innate immune function in wild vertebrates and domestic chickens / Z. Papp, J.E.G. Smits // *J. of Wildlife Diseases*. – 2007. – Vol. 43. – № 4. – P. 623-634.
156. Prin, L. Polinucleare eosinophile et receptor glucocorticoide / L. Prin, P. Lefebvre, V. Gruart // *Rev. Allergology*. – 1990. – № 30. (2). – P. 83-85.
157. Scanes, C.G. Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio / C.G. Scanes // *Poultry Science*. – 2016. – № 9. – P. 2208-2215.
158. Strydom, N. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease / N. Strydom, S.M. Rankin // *J. Innate Immun*. – 2013. – Vol. 5. – № 4. – P. 304-314.
159. Sun, S.F. Stronger in vitro phagocytosis by monocytes-macrophages is indicative of greater pathogen clearance and antibody levels in vivo / S.F. Sun Pan Q.Z. Hui, X., B.L. Zhang, H.M. Wu, H. Li, W. Xu, Q. Zhang, J.Y. Li, X.M. Deng, J.W. Chen, Z.X. Lian, N. Li // *Poultry Science*. – 2008. – Vol. 87. – № 9. – P. 1725-1733.
160. Tono-Oka, N. Chemiluminescence of whole blood: 1. A simple method for the estimation of phagocytic function of granulocytes and opsonic activity in whole blood / N. Tono-Oka, V. Norihito, M. Takohide // *Clinic. Immunol. Immunopathol*. – 1983. – Vol. 26. – № 1. – P. 66-75.
161. Van Neron, A. Lucigenin- and Luminol-Enhanced Chemiluminescence in Turkey Monocytes / A. Van Neron, M. Desmidt, R. Ducatelle, F. Haesebrouck // *J. Biolumin.Chemilumin*. – 1997. – № 3. – P. 207-214.
162. Weiss, D.J. *Veterinary hematology* / D.J. Weiss, K.J. Wardrop / 6<sup>th</sup> Edition. Blackwell; Publishing Ltd. – 2010. – P. 263-323.

**ПРИЛОЖЕНИЯ**



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет»

**ФАКТОРЫ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ  
И ХАРАКТЕРИСТИК СЫРЬЯ, ВЛИЯЮЩИЕ  
НА ПОКАЗАТЕЛИ БЕЗОПАСНОСТИ МЯСА ПТИЦЫ  
И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ**

*Научно-практические рекомендации*

Красноярск 2018

ББК 36.93  
Ф 18

*Рецензент*

*Т.Н. Борсук, начальник отдела государственного ветеринарного надзора за обеспечением здоровья животных, безопасностью продукции животного происхождения и лабораторного контроля Управления Россельхознадзора по Красноярскому краю*

**Составители:**

**Н.В. Донкова, Т.Ф. Лефлер, А.А. Мороз,  
Т.С. Лебедева, П.Ю. Царев**

Ф 18 **Факторы технологических процессов и характеристик сырья, влияющие на показатели безопасности мяса птицы и продуктов его переработки:** науч.-практ. рекомендации / Н.В. Донкова, Т.Ф. Лефлер, А.А. Мороз [и др.]; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2018. – 80 с.

Рассмотрено нормативно-правовое регулирование обеспечения безопасности и качества мяса птицы и продуктов его переработки, обобщены сведения о требованиях безопасности к технологическим процессам при выращивании цыплят-бройлеров, процессах производства продуктов убоя птицы, проанализированы факторы технологических процессов, а также характеристик сырья, отрицательно влияющих на показатели безопасности, представлена методика комплексной оценки качества и безопасности мяса и мясных продуктов на основе микроструктурного и хемилюминесцентного анализа.

Предназначено для специалистов птицеводческих предприятий: ветеринарных врачей, зооинженеров, технологов, преподавателей, аспирантов и студентов.

ББК 36.93

Рекомендовано к изданию научно-техническим советом  
Красноярского государственного аграрного университета  
(протокол № 3 от 6.12.2017)

© Коллектив авторов, 2018  
© ФГБОУ ВО «Красноярский  
государственный аграрный университет», 2018

**Выписка**

из протокола № 3 от 06 декабря 2017 года  
заседания Научно-технического совета Красноярского ГАУ

**Присутствовало:** 16 чел. из 17 членов НТС

**Повестка дня:**

Рассмотрение научно-практических рекомендаций

**Слушали:**

Научно-практические рекомендации «Факторы технологических процессов и характеристик сырья, влияющие на показатели безопасности мяса птицы и продуктов его переработки», подготовленные коллективом авторов – Донковой Н.В., Лефлер Т.Ф., Мороз А.А., Лебедевой Т.С., Царевым П.Ю.

Рецензент Борсук Т.Н., начальник отдела государственного ветеринарного надзора за обеспечением здоровья животных, безопасностью продукции животного происхождения и лабораторного контроля Управления Россельхознадзора по Красноярскому краю, дала положительный отзыв на научно-практические рекомендации.

**Постановили:**

Научно-практические рекомендации «Факторы технологических процессов и характеристик сырья, влияющие на показатели безопасности мяса птицы и продуктов его переработки», авторов Донковой Н.В., Лефлер Т.Ф., Мороз А.А., Лебедевой Т.С., Царева П.Ю. утвердить и рекомендовать к использованию в ветеринарной практике Красноярского края.

Председатель научно-технического  
совета Красноярского ГАУ



В.Л. Бопп

Секретарь совета



М.Э.Михеева

06 декабря 2017 г.

Подпись   
ЗАВЕРЯЮ, канцелярия ФГБОУ ВО  
"Красноярский ГАУ" 



**УТВЕРЖДАЮ**  
Директор ОАО «Птицефабрика Заря»  
И.В. Исаев  
« 18 » \_\_\_\_\_ 2018 года



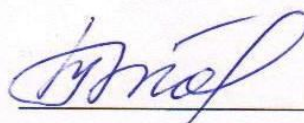
### АКТ

внедрения материалов научной работы Царева Павла Юрьевича в ОАО  
«ПтицефабрикаЗаря» Емельяновского района Красноярского края

В течение 2012-2018 гг. Царевым П.Ю. в ОАО «Птицефабрика Заря» отобрана кровь от клинически здоровых кур яичного кросса «Декалб» с суточного до 560-суточного возраста (96 образцов); кровь от молодняка кур кросса «Хайсекс уайт» и «Декалб», привитых против инфекционного ларинготрахеита, инфекционной бурсальной болезни, гемофилёза, комплексной вакцинации против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и синдрома снижения яйценоскости (100 образцов); живые цыплята суточного возраста (72 гол.).

В работе ветеринарных специалистов птицефабрики используются результаты исследований Царева П.Ю., посвященные особенностям продукции свободных радикалов клетками крови кур разного возраста, влиянию вакцинаций и температурных стрессов на образование активных форм кислорода. Хемилюминесцентный анализ позволяет контролировать состояние органов и тканей кур на молекулярном уровне и выявлять ранее повреждающее действие внешних факторов. Низкий уровень образования свободных радикалов способен запускать механизмы проявления бактериальных инфекций, а их избыток несёт потенциальную угрозу повреждения внутренних органов птицы.

Главный ветеринарный врач  
ОАО «Птицефабрика Заря»



Т.В. Тощая

**УТВЕРЖДАЮ:**

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО

государственный

университет

А.А. Ежевского»

«Иркутский

аграрный

имени

Иваньо Я.М.

«30» 06 2018 г.

**СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ**

Результаты научных исследований, проводимых Царевым Павлом Юрьевичем по теме кандидатской диссертации — «Оценка морфофункционального состояния тканей и органов у кур и перепелов методом хемилюминесцентного анализа», рассмотрены и приняты к использованию в учебном процессе при чтении лекций, проведении лабораторно-практических занятий и научно-исследовательской работы кафедры анатомии, физиологии и микробиологии. Результаты исследований достойны для включения в руководство по морфологии и физиологии тканей и органов иммуногенеза сельскохозяйственных птиц.

Материалы рассмотрены на заседании кафедры анатомии, физиологии и микробиологии «9» июня 2018 г., протокол № 10

Зав. кафедрой анатомии, физиологии и микробиологии, д.б.н., профессор

Н.И. Рядинская

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ



Российский университет  
дружбы народов (РУДН)

АГРАРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

Ул. Минлухо-Маклая, д. 8, кор. 2, Москва, Россия, 117198  
Телефон/факс: +7 (495)-434-70-07, +7 (495)-434-31-66  
e-mail: agro@pochta.rudn.ru

АСД 1-11/106 д.р. 06 20 18

№

### Справка о внедрении

Результаты научных исследований аспиранта кафедры «Анатомии, патологической анатомии и хирургии» ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет» Царева Павла Юрьевича на тему: «Оценка морфофункционального состояния тканей и органов у кур и перепелов методом хемилюминесцентного анализа» используются, как справочный материал в учебном процессе, на лекционных и лабораторно-практических занятиях в департаменте ветеринарной медицины аграрно-технологического института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН).

Материалы рассмотрены на заседании департамента ветеринарной медицины « 20 » июня 2018 г., протокол №11

Директор департамента  
ветеринарной медицины АТИ РУДН  
доктор ветеринарных наук,  
профессор

Ватников Ю.А.



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке и инновациям  
ФГБОУ ВО "Хакасский государственный  
университет им. Н.Ф. Катанова"

*А.А. Попов* Попов А. А.  
28 » июня 2018 г.

### СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ

материалов научной работы аспиранта Царева Павла Юрьевича в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедры ветеринарной медицины сельскохозяйственного института

Материалы научных исследований аспиранта кафедры «Анатомии, патологической анатомии и хирургии» Красноярского государственного аграрного университета Царева Павла Юрьевича на тему: «Оценка морфофункционального состояния тканей и органов у кур и перепелов методом хемилюминесцентного анализа» приняты к использованию в учебном процессе кафедры «Ветеринарной медицины» Хакасского государственного университета им. Н.Ф. Катанова по дисциплинам: «Анатомия животных», «Цитология, гистология, эмбриология», «Патологическая физиология», а так же используются в научно-исследовательской работе кафедры. Приняты к использованию в учебном процессе и научно-исследовательской работе нижеследующие материалы научных исследований: «Закономерности возрастных изменений морфологических показателей и параметров хемилюминесценции крови кур и японских перепелов», «Кинетика продукции активных форм кислорода клетками органов иммуногенеза кур раннего возраста», «Влияние иммунизаций на морфологические показатели и хемилюминесценцию крови кур», «Особенности морфологических показателей и параметров хемилюминесценции крови кур при моделируемых температурных воздействиях».

Материалы рассмотрены на заседании кафедры ветеринарной медицины « 24 » мая 2018 г. протокол № 15

Зав. кафедрой ветеринарной медицины  
ФГБОУ ВО "Хакасский государственный  
университет им. Н.Ф. Катанова,  
д-р.ветеринар.наук, доцент

Е.Л. Безрук

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и инновационной работе  
ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный  
аграрный университет», профессор

В.Ю. Морозов

2018 г.



Карта обратной связи

Результаты научных исследований Царева Павла Юрьевича по теме кандидатской диссертации «Оценка морфофункционального состояния тканей и органов у кур и перепелов методом хемилюминесцентного анализа» внедрены в учебный процесс и используются в научно-исследовательской работе на кафедре паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора С.Н. Никольского.

Материалы рассмотрены на заседании кафедры паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора С.Н. Никольского, протокол № 27 от 25 июня 2018 г.

*Наименование организации*

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»,  
кафедра паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им.  
профессора С.Н. Никольского

*Почтовый адрес*

355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.  
Тел. (8652) 35-22-82, факс (8652) 71-58-15.  
E-mail: [inf@stgau.ru](mailto:inf@stgau.ru). Web-сайт: [www.stgau.ru](http://www.stgau.ru)

И.о. зав. кафедрой паразитологии и ветсанэкспертизы,  
анатомии и патанатомии им. профессора  
С.Н. Никольского, д.б.н., доцент

О.В. Дилекова

УТВЕРЖАЮ  
 Ректор ФГБОУ ВО Красноярский ГАУ  
*Н.В. Рыжикова*  
 «25» \_\_\_\_\_ 2018 г.



СПРАВКА

о внедрении материалов кандидатской диссертации Царева Павла Юрьевича в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедры «Анатомии, патологической анатомии и хирургии» Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины Красноярского государственного аграрного университета

Материалы научных исследований аспиранта кафедры «Анатомии, патологической анатомии и хирургии» Красноярского государственного аграрного университета Царева Павла Юрьевича на тему: «Оценка морфофункционального состояния тканей и органов у кур и перепелов методом хемилюминесцентного анализа» приняты к использованию в учебном процессе кафедры «Анатомии, патологической анатомии и хирургии» Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины Красноярского государственного университета по дисциплинам: «Анатомия животных», «Цитология, гистология, эмбриология», «Патологическая физиология», а также используются в научно-исследовательской работе кафедры. Приняты к использованию в учебном процессе и научно-исследовательской работе нижеследующие материалы научных исследований:

- закономерности возрастных изменений морфологических показателей и параметров хемилюминесценции крови кур и японских перепелов;
- кинетика хемилюминесцентной продукции активных форм кислорода клетками органов иммуногенеза кур раннего возраста;
- особенности морфологических показателей и параметров хемилюминесценции крови кур при моделируемых температурных воздействиях.

Материалы рассмотрены на заседании кафедры «Анатомии, патологической анатомии и хирургии» института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины Красноярского ГАУ (протокол № 9 от 07 мая 2018 г.).

Зав. кафедрой анатомии,  
 патологической анатомии и хирургии,  
 доктор ветеринар. наук, профессор

*Н.В. Донкова*

Н.В. Донкова