

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПТИЦЫ

Логвинова Татьяна Ивановна, научный сотрудник лаборатории микробиологии, ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста.

Аннотация. Изучены показатели клеточных факторов естественной резистентности организма по половой принадлежности и представлена лейкоцитарная формула помесной птицы (русская белая × корниш).

Ключевые слова: естественная резистентность, фагоцитарная активность, псевдоэозинофилы, лейкограмма.

Центральным звеном клеточных факторов естественной резистентности является фагоцитоз, обуславливающих иммунитет при многих инфекционных заболеваниях. У здоровых животных, не подвергавшихся инфицированию, активность фагоцитоза может свидетельствовать о степени их готовности и агрессивности к возможному попаданию в организм инфекционного начала.

С момента открытия фагоцитарной теории, созданной нашим соотечественником, лауреатом Нобелевской премии И.И. Мечниковым прошло более 100 лет. Однако, его учение о фагоцитозе по-прежнему занимает весомое место среди теорий иммунитета.

В настоящее время процесс фагоцитоза рассматривают как ряд последовательных взаимосвязанных стадий. К ним относятся движение, адгезия, поглощение, дегрануляция, образование активных форм кислорода и азота, киллинг и расщепление объекта фагоцитоза.

Оценка фагоцитарной активности является частью комплексного лабораторного исследования животных и птицы. Детальное изучение фагоцитарного процесса с помощью лабораторных методов может быть основанием для постановки или подтверждения окончательного диагноза [1].

В рамках данной публикации ставилась задача изучить клеточные факторы естественной резистентности организма и определить лейкоцитарную формулу исследуемого молодняка птицы.

Изучение клеточных факторов защиты иммунитета птицы, актуально при оценке состояния здоровья птицы различных генотипов. Немаловажным представляется проведение таких исследований и в аспекте половой принадлежности.

Объектом исследования служила цельная кровь молодняка птицы: помеси пород русская белая и корниш, мясо-яичного направления продуктивности, разделенных на 2 группы по половой принадлежности (петушки n=58, курочки n=58) в возрасте 9 недель. Определены показатели клеточных факторов защиты организма птицы и выведена лейкоцитарная формула.

О состоянии естественной резистентности организма птицы судили по фагоцитарной активности лейкоцитов. Фагоцитарную активность (ФА)

лейкоцитов определяли по Гостьеву [2] в собственной модификации, с использованием бактериальной взвеси суточной музейной тест-культуры *Escherichiacoli*M-17-02 .

Для исследования 0,5 мл цельной крови вносили в короткую серологическую пробирку и добавляли 0,5 мл инокулюма суточной музейной культуры тест-штамма *E.coli*M-17-02 с концентрацией по оптической плотности 4,5 McF. Пробирку с приготовленной смесью встряхивали и термостатировали при температуре 37°C в течении 30 минут. Через каждые 10 минут пробирку встряхивали, затем из крови готовили тонкие мазки, фиксировали 96% этиловым спиртом и окрашивали по методу Романовского-Гимза. Мазок просматривали под иммерсией при окуляре WF 16X и объективе 90.

При микроскопии мазка подсчитывали число фагоцитировавших лейкоцитов (у птиц гетерофилы или псевдоэозинофилы – основные фагоцитарные лейкоциты, гранулярные лейкоциты, являющиеся аналогом нейтрофилов млекопитающих) из общего числа подсчитанных.

Величина ФА позволяет оценить резервные возможности нейтрофилов по поглощению и нейтрализации микробов. Фагоцитоз характеризуется тремя показателями: 1. Фагоцитарная активность. 2. Фагоцитарное индекс 3. Фагоцитарное число.

Фагоцитарная активность (ФА) выражается процентным отношением активных, участвовавших в фагоцитозе лейкоцитов к общему числу подсчитанных лейкоцитов и рассчитывается по формуле:

$$\%ФА = \frac{Ф_a}{Ф_п} * 100$$

где $Ф_a$ - число участвовавших в фагоцитозе лейкоцитов; $Ф_п$ - общее число подсчитанных лейкоцитов.

Фагоцитарный индекс (ФИ) определяется средним числом фагоцитированных микробов, приходящихся на один активный лейкоцит. Среднее число бактерий в одном фагоците. Этот показатель характеризует интенсивность фагоцитоза. Вычисляется по формуле:

$$ФИ = \frac{Мф}{Л_a}$$

где $Мф$ - общее число фагоцитированных микроорганизмов; $Л_a$ - число активных лейкоцитов.

Фагоцитарное число (ФЧ) является дополнительным показателем, характеризующим как агрессивность лейкоцитов, так и их активность и вычисляется по формуле:

$$ФЧ = \frac{Мф}{Л_о}$$

где $Мф$ - общее число фагоцитированных микроорганизмов; $Л_о$ - число подсчитанных лейкоцитов.

Лейкоцитарная формула - процентное содержание всех видов лейкоцитов в периферической крови (лейкограмма, лейкоформула).

Лейкоцитарную формулу определяли на основании дифференциального подсчета 100 лейкоцитов в окрашенном мазке под микроскопом с иммерсией (объектив 90, окуляр WF 16X).

Лейкоциты в зависимости от плотности распределяются в мазках неравномерно: нейтрофилы, базофилы, эозинофилы — по периферии, ближе к краям; моноциты, лимфоциты — ближе к середине. При подсчёте лейкоцитов использовали метод Филиппченко, состоящий в том, что мазок мысленно делили на 3 части: начальную, среднюю и конечную (трёхпольный метод). Подсчёт вели по прямой линии поперёк мазка от одного его края к другому. В каждой части подсчитывали одинаковое количество клеток, учитывали 100 лейкоцитов. Определяли вид каждого лейкоцита и отмечали каждую клетку на 11-клавишном счетчике. При подсчете 100 лейкоцитов, на счетчике раздавался сигнал (звонок). В окошечках счетчика против каждого вида лейкоцитов визуализировали их количество в 100 лейкоцитах, т. е. процентное содержание (лейкограмма) [3]

Статистическую обработку результатов проводили с применением программных пакетов Microsoft Office Excel 2003, с использованием методов описательной статистики. Достоверность различий устанавливали по t-критерию Стьюдента, различия считали статистически достоверными при $p \leq 0,01$.

Результаты исследований. Фагоцитарная активность отражает готовность организма животного защищаться и уничтожать проникшие в него патогенные микроорганизмы при непосредственном контакте. За это отвечают белые клетки крови – лейкоциты. Величина ФА позволяет оценить резервные возможности лейкоцитов по поглощению и нейтрализации микробов [4].

На основании показателей клеточных факторов естественной резистентности организма птицы дана оценка клеточного иммунитета животных в зависимости от пола. Так, по фагоцитарной активности псевдоэозинофилов у особей женского и мужского пола отмечены незначительные различия (47,05% и 46,52%), а по фагоцитарному индексу у особей мужского пола показатель значительно выше по сравнению с особями женского пола и составили 19,39 и 4,01, соответственно (табл.1).

Таблица 1

Показатели клеточных факторов естественной резистентности птицы

Показатели	Корниш×Русская белая	
	Муж (n=58)	Жен(n=58)
ФА, %	46,52±1,01	47,05±1,21
ФИ	19,39±15,86	4,01±0,16
ФЧ	1,62±0,07**	1,87±0,08**

Примечание: ** $p \leq 0,01$

Таким образом, в ходе исследования выявлены достоверные различия ($p \leq 0,01$) по фагоцитарному числу помесной птицы. Это свидетельствует об

интенсивности фагоцитоза у данной группы животных и обусловлено усилением работы различных клеточных систем фагоцитов, что согласуется с литературными данными, согласно которым у самцов отмечается выше фагоцитарная активность и более высокая скорость роста. Полученные результаты могут быть использованы для оценки клеточного иммунитета птицы и разработки референтных интервалов для птицы различных генотипов.

Половые различия ученые связывают с различиями между полами в микрофлоре пищеварительной системы, так как ее состав оказывает значительное влияние на переваривание, всасывание и метаболизм питательных веществ в организме хозяина. Микрофлора желудочно-кишечного тракта тесно связана с его иммунной системой и состоянием здоровья [5].

Известны также работы, демонстрирующие разницу в составе микрофлоры и его прогнозируемых функциях у животных в зависимости от пола [6]. Song J.S., Kogut M.H. и соавторы сообщают, что микрофлора кишечника кур содержит большое таксономическое разнообразие видов и значительный потенциал их геномов, оказывающий влияние на здоровье и продуктивность животных и птиц [7,8].

Для более полной оценки естественной резистентности организма молодняка птицы изучили процентное содержание всех видов лейкоцитов (лейкограмма, лейкоформула), представленное в таблице 2.

Таблица 2

Лейкограмма помесного молодняка птицы, %

Группы птиц	Лимфоциты	Моноциты	Псевдозозинофилы		Базофилы	Эозинофилы
			П	С		
Корниш× Русская белая (жен)	64,98±0,88	0,75±0,15	16,42±0,70	0,25±0,07	0,53±0,21	17,16±0,64
Корниш× Русская белая (муж)	67,10±1,12	0,82±0,09	15,19±0,82	0,23±0,06	0,51±0,11	16,08±0,61
Норма ¹	34,0-82,0	3,0-9,5	14,0-33,0	0-1,0	1,5-5,0	4,0-26,5

¹Нормы определены по И. А. Болотникову и Ю. В. Смолу (1980)

Согласно физиологическим показателям лейкоцитов у кур по Болотникову И.А. и Смолу Ю.В. клетки белой крови исследуемого помесного молодняка птицы находились в пределах нормы. Выявлены значительные различия по содержанию лимфоцитов у петушков (67,10±1,12%) по сравнению с курочками (64,98±0,88%), что может быть обусловлено активизацией защитной функции организма.

Отмечены незначительно сниженные показатели базофилов (0,53 %, 0,51%) и моноцитов – 0,75%, 0,82% соответственно, что может быть связано с возрастом [9]. Снижение моноцитов может наблюдаться при вирусных

инфекциях, в том числе недавно перенесенных. Снижение базофилов не имеет клинического значения из-за малого количества клеток (1,5-5,0 %).

Данные исследования являются частью комплексной оценки по изучению клеточных факторов защиты организма птицы в зависимости от половой принадлежности и могут быть использованы для оценки неспецифической резистентности организма.

Библиографический список

1. Климова Е.М. Исторические аспекты изучения фагоцитоза. Современные представления о фагоцитарном процессе. / Е.М. Климова, М.О. Иваненко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Т. 24(63). 2011. №4. - С. 110-118.

2. Плященко С. И. Естественная резистентность организма животных / С. И. Плященко, В. Т. Сидоров. - Л.: Колос, Ленингр. отд-ние, 1979. - 184 с 1979

3. Смолин С.Г. Физиология системы крови : метод. указания / С.Г.Смолин. - Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск. - 2014. – 50 с.

4. Khaitov R.M. Immunologiya // Moscow, 2015.

5. Лаптев Г.Ю. Экспрессия генов иммунитета и адаптации и состав микробиома у родительского поголовья кур и петухов (*Gallusgallus*L.) линий СМ5 и СМ9 кросса Смена 9 / Г.Ю. Лаптев, Е.А. Ёылдырым, Л.А. Ильина, В.А. Филиппова, К.А. Калиткина, Е.С. Пономарева, А.В. Дубровин, Д.Г. Тюрина, В.И. Фисинин, И.А. Егоров, Т.А. Егорова, В.А. Манукян, Т.Н. Ленкова // Сельскохозяйственная биология. – 2023. - Т.58, - №2, - С. 313-332

6. Wankhade U.D. Sex-specific changes in gut microbiome composition following blueberry consumption in C57BL/6J mice / U.D. Wankhade, Y. Zhong, O.P. Lazarenko, S.V. Chintapalli, B.D. Piccolo, J.-R. Chen, K. Shankar // Nutrients, -2019. - 11(2): 313 (doi: 10.3390/nu11020313).

7. Song J.S. Engineering the microbiome for animal health and conservation / J.S., Song, D.C., Woodhams, C. Martino, C. Allaband, A. Mu, S. Javorschi-Miller-Montgomery, J.S. Suchodolski, R. Knight // Experimental Biology and Medicine, - 2019. - 244(6): 494-504 (doi: 10.1177/1535370219830075).

8. Kogut M.H. The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry/ M.H. Kogut // Animal Feed Science and Technology. - 2018. - 250(1): 32-40 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008).

9. Болотников, И. А. Гематология птиц / И. А. Болотников. – Ленинград : Наука. Ленинградское отделение. -1980. – 116 с.