

УДК 619: 616. 98: 579. 843. 95: 636. 598: 612. 015

АКТИВНОСТЬ КИСЛОЙ И ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗ У ГУСЯТ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ НАТРИЯ ТИОСУЛЬФАТА

Радченко С.Л., Никандров В.Н., Громова Л.Н., Шоломицкий Д.В.
 УО "Витебская государственная академия ветеринарной медицины"

Пастереллез (холера) птиц – широко распространенная инфекционная болезнь птиц, которая наносит большой экономический ущерб птицеводческим хозяйствам. В комплексе мероприятий по предупреждению пастереллеза птиц ведущее место занимает вакцинопрофилактика. В РНИУП "ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАН РБ" разработана жидкая инактивированная эмульсин-вакцина против пастереллеза птиц из шт. "КМИЭВ-26, 27, 28". При этом биохимические реакции в органах иммунной системы гусей, привитых данной вакциной, мало изучены. Ряд исследователей для усиления иммуногенных свойств вакцин рекомендуют применять иммуностимуляторы [1,2], однако их влияние на биохимические аспекты формирования поствакцинального иммунитета изучено недостаточно.

Известно, что клетки иммунной системы птиц обладают высокой фосфатазной активностью. В-лимфоциты (заселяющие бурсу Фабрициуса птиц и В-зависимые зоны периферических органов иммунитета) обладают высокой активностью щелочной фосфатазы, а Т-лимфоциты (заселяющие тимус и Т-зависимые зоны периферических органов иммунной системы) и макрофаги - высокой активностью кислой фосфатазы. Щелочная фосфатаза (ЩФ) – фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (К.Ф. 3.1.3.1.) - гидролизует разные синтетические субстраты при оптимальном рН 10,0: при физиологических условиях фермент может использовать

различные субстраты [5]. Кислая фосфатаза (КФ) – фосфомоноэстераза II - проявляет оптимальное действие при рН=4,6 (К.Ф. 3.1.3.2.). ЩФ является гликопротеидом, по структуре это димер с кажущейся значительной вариацией молекулярной массы фермента в разных тканях [6]. ЩФ - металлофермент, в состав его активного центра входит атом цинка. Полагают, что атом цинка повышает активность фермента, обеспечивая конформационные изменения и гидролиз моноэфиров ортофосфорной кислоты [7]. Каждый мономер содержит три металлосвязывающих центра. Лишенный ионов цинка фермент теряет активность, но восстанавливает ее после добавления металла [4]. При рН 9,5 и избытке ионов Zn^{+2} образуется тетрамер. Каждая субъединица имеет большой a/b домен, имеющий b -структуру, окруженную a -спиралью, и малый домен спиралевидной структуры [8]. Установлено, что только 2 атома цинка определяют каталитическую активность фермента, а 2 других необходимы для поддержания его структуры [9].

Активность фермента возрастает в присутствии ионов магния, для оптимальной активности необходимо адекватное соотношение ионов магния и цинка [5].

Существует теория, которая сводит эти реакции к частному случаю трансферазных реакций. Процессы гидролиза могут рассматриваться как перенос части молекулы субстрата к гидроксильной

группе воды. Этим объясняется действие ЩФ в качестве трансферазы, которая переносит освобождающийся фосфорный остаток на молекулу акцептора. Субстратами ЩФ являются различные моноэфиры фосфорной кислоты (ROH), как алифатические (глицерол-1-фосфат, глицерол-2-фосфат), так и ароматические (4-нитрофенилфосфат), аминокислоты, углеводы, нуклеотиды и белки.

Предполагается, что фермент участвует в транспорте фосфата и обеспечивает его образование там, где возникает потребность в нем [10].

Учитывая взаимосвязь активности фосфатаз с процессами иммуногенеза, нами была поставлена задача изучить динамику их активности в органах иммунной системы гусят (тимусе, бурсе Фабрициуса, селезенке и железе Гардера) при иммунизации против пастереллеза инактивированной вакциной из шт. "КМИЭВ-26, 27, 28" (БелНИИЭВ) с использованием натрия тиосульфата. Натрия тиосульфат, являясь производным тиосерной кислоты, обладает выраженными антиоксидантными свойствами. Механизм действия натрия тиосульфата обусловлен наличием в его молекуле серы в степени окисления -2 (S^{2-}), восстанавливающей группы $-S-H$ третичной структуры белков, в том числе и ферментов, препятствуя их денатурации.

Натрия тиосульфат стимулирует функцию макрофагов, Т-хелперов, оказывая положительное влияние на выработку иммунитета против инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии. Кроме того, наличие в молекуле натрия тиосульфата атомов серы в степени окисления -2 , выступающих в роли восстановителя, обуславливает также антиоксидантное и противовоспалительное действие препарата. Именно поэтому введение натрия тиосульфата совместно с вакцинами снижает их реактогенность.

Исследования были проведены на 45 гусятах 16-37-дневного возраста, подобранных по принципу аналогов и разделенных на 3 группы, по 15 птиц в каждой.

Интактная птица 1-ой группы служила контролем.

Гусят 2-ой группы иммунизировали жидкой инактивированной вакциной против пастереллеза птиц согласно временному наставлению по ее применению, однократно, подкожно, в дозе 0,5 мл (без иммуностимулятора).

Птице 3-й группы вакцину вводили совместно с иммуностимулятором 7%-ным водным раствором натрия тиосульфата. Иммунизацию птиц опытных групп проводили в 16-дневном возрасте.

На 7-ой, 14-й и 21-й дни после вакцинации по 5 гусят из каждой группы убивали. Из органов иммунной системы (тимус, бурса Фабрициуса, селезенка, железа Гардера) готовили 4%-ные гомогенаты на трис-сахарозном буфере (PH-7,3). Активность щелочной фосфатазы в органах иммунной системы гусят определяли способом Бодански. Метод основан на ферментативном гидролизе бета-глицерофосфата. Освобожденный фосфат, реагируя с фосфомолибденовой кислотой, дает желтый комплекс, который при действии восстановителей трансформируется в фосфомолибденовую синь. Учет реакции производили путем фотометрии раствора при длине волны 620-640 нм. Данный метод позволяет одновременно вести определение активности щелочной и кислой фосфатаз (КФ и ЩФ).

Наши исследования показали, что наиболее высокая активность щелочной фосфатазы отмечалась в бурсе Фабрициуса. У гусят контрольной группы в течение всего срока исследования активность ЩФ составляла $2,23 \pm 0,27 - 2,75 \pm 0,31$ МЕ/г.

На 7-е сутки эксперимента данный показатель у птиц 2-й группы превышал контрольные значения в 1,6 раза ($P < 0,05$), а у птиц 3-й группы в 2 раза ($P < 0,05$). На 14-й день после вакцинации у птиц 2-й и 3-й групп активность ЩФ была выше, чем в контроле, соответственно в 2 и 2,1 раза ($P < 0,05$). На 21 день опыта у иммунизированных гусят 2-й группы сохранялась тенденция к повышению активности ЩФ (рис. 1).

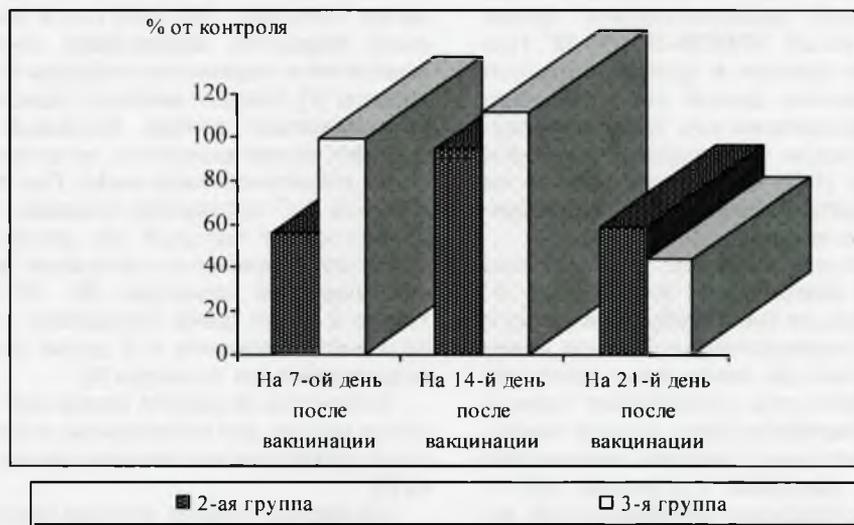


Рис. 1. Активность щелочной фосфатазы в бурсе Фабрициуса вакцинированных гусят (в процентах от контроля)

Увеличение активности ЩФ в бурсе вакцинированных гусят может указывать на усиление выработки В-лимфоцитов, необходимых для формирования гуморального иммунитета.

В селезенке контрольных гусят активность ЩФ на 7-й день эксперимента составила $1,29 \pm 0,08$ МЕ/г. У иммунных птиц 2-й и 3-й групп отмечалось увеличение данного показателя в 1,5 и 1,6 раза ($P < 0,05$) по сравнению с контролем. К 14-у дню опыта активность фермента была выше у иммунизированных птиц обеих групп в 2,3-3 раза ($P < 0,01$). На 21-е сутки эта тенденция сохранялась.

В железе Гардера иммунных птиц 2-й и 3-й групп на 7-й день после вакцинации отмечалось достоверное повышение активности ЩФ по сравнению с контролем в 1,8 – 2 раза, а на 14-й день – в 1,4 и в 2 раза ($P_{1-2} < 0,05$; $P_{1-3} < 0,01$) соответственно. На 21-й день опыта в железе Гардера у птиц 2-й группы активность ЩФ превышала контрольное значение в 2,5 раза ($P_{1-2} < 0,001$).

На 7-й день эксперимента активность кислой фосфатазы в тимусе интактных гусят 1-ой группы была на уровне $2,32 \pm 0,29$ МЕ/г. У иммунных птиц 2-ой и 3-й групп данный показатель был выше, чем в контроле, соответственно в 1,6 ($P_{1-2} < 0,05$) и 2,3 ($P_{1-3} < 0,01$) раза. Это, вероятно, указывает на увеличение выработки Т-лимфоцитов, маркером которых является КФ.

На 14-й день активность КФ в тимусе птиц 1-3-й групп существенно не изменялась по сравнению с предыдущим сроком исследования. При этом у птиц 3-й группы указанный показатель превышал контрольные значения в 1,8 раза ($P_{1-3} < 0,01$). На 21-й день опыта наблюдалось выравнивание данного показателя и статистически достоверных различий между группами не обнаружено.

В селезенке гусят контрольной группы на 7-й день после вакцинации активность КФ составляла $2,93 \pm 0,31$ МЕ/г. У иммунных птиц 2-й и 3-й групп данный показатель был выше, чем в контроле, в 2,4 раза ($P < 0,01$). Повышение активности КФ в селезенке привитых утят указывает на возможное увеличение количества Т-лимфоцитов, обеспечивающих реакции клеточного иммунитета.

На 14-й день эксперимента активность КФ в селезенке контрольных гусят возросла по сравнению с предыдущим сроком исследования в 1,5 раза ($4,35 \pm 0,37$ МЕ/г) и оставалась на таком уровне до конца исследования. Вместе с тем, у вакцинированной птицы 2-й группы произошло снижение данного показателя в 1,5 раза ($P < 0,05$). Снижение активности КФ в селезенке привитых птиц свидетельствует, вероятно, о затухании реакций клеточного иммунитета в эти сроки.

На 21-й день у птиц 2-й и 3-й групп данный показатель статистически достоверно не отличался от контроля.

В железе Гардера 8-дневных гусят контрольной группы (на 7-й день опыта) активность КФ составляла $3,00 \pm 0,26$ МЕ/г. У вакцинированных птиц 2-й группы данный показатель повысился по отношению контролю в 1,3 раза ($P < 0,05$). К 14-у дню эксперимента активность ЩФ у непривитой птицы не изменялась по сравнению с предыдущим сроком, а

у птиц 2 и 3-й групп происходило увеличение активности по отношению к контролю в 1,6-2 раза ($P < 0,01$) в эти сроки.

На 21-й день после вакцинации в железе Гардера у птиц, иммунизированных с применением натрия тиосульфата, активность КФ превышала контрольное значение в 1,43 ($P < 0,05$).

Полученные данные находят подтверждение в литературе. Вакцинация ремонтного молодняка кур против ньюкаслской болезни вызывала достоверное повышение активности фосфатаз тимуса, селезенки и сыворотки крови. Активность КФ в тимусе иммунных птиц повышалась на 30% по сравнению с контролем. В селезенке регистрировалось одновременное повышение активности ЩФ и КФ на 12-20% [3].

Громова Л.Н. в своих исследованиях отмечала увеличение активности КФ и ЩФ в тимусе, бурсе Фабрициуса, селезенке и железе Гардера гусят, вакцинированных против вирусного гепатита [4].

По данным Печниковой И.В. с соавторами, в сыворотке крови морских свинок, вакцинированных против чумы, активность кислой фосфатазы возрастала в 25-30 раз при иммунизации штаммом "К-1" и в 10-12 раз – штаммом "ЕВ". При этом активность щелочной фосфатазы повышалась в 8-10 раз. К 30 суткам активность фосфатаз полностью восстанавливалась [11].

Заключение

Иммунизация гусят против пастереллеза инактивированной вакциной шт. "КМИЭВ-26, 27, 28" вызывает увеличение активности кислой и щелочной фосфатаз в тимусе, бурсе Фабрициуса, селезенке и железе Гардера. Поскольку ЩФ является маркером В-лимфоцитов, а КФ – Т-лимфоцитов, повышение активности данных ферментов может косвенно указывать на увеличение числа Т- и В-лимфоцитов, обеспечивающих реакции клеточного и гуморального иммунитета. Кроме того, усиление процессов дефосфорилирования может свидетельствовать о напряженности метаболических процессов в центральных и периферических органах иммунной системы вакцинированных утят. Применение иммуностимулятора натрия тиосульфата способствует большему возрастанию фосфатазной активности и, следовательно, более высокой напряженности обменных процессов.

Литература: 1. Бирман Б.Я., Громов И.Н. Диагностика, лечение и профилактика иммунодефицитов птиц. – Мн.: Бизнесофсет, 2004. – 102 с. 2. Большакова Е.И. Применение натрия тиосульфата в качестве иммуностимулятора при иммунизации свиней против сальмонеллеза // Ученые записки ВГАВМ. – Витебск, 1998. – Т. 34. – С. 109-110. 3. Активность кислой и щелочной фосфатаз у ремонтного молодняка кур в период вакцинации против болезни Гамборо с использованием иммуностимулятора натрия тиосульфата / И.Н. Громов, В.С. Прудников, В.И. Гидранович, Д.С. Голубев // Ученые записки Витебской государственной академии ветеринарной медицины. – Витебск, 1998. – Т. 34. – С. 120-122. 4. Громова Л.Н. Биохимический мониторинг утят, вакцинированных против энтеровирусного гепатита: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.04 / ВГАВМ. – Витебск. – 2005. – 21с. 5. Творогова М.Г., Титов В.Н. Щелочная фосфатаза: методические приемы определения и диагностическое значение // Лабо-

- раторная дело. – 1991. – № 6. – С. 10-17. 6. Meyer-Sabellek W., Sinha P., Kottgen E. Alkaline phosphatase. Laboratory and clinical implications // J. Chromatogr. – 1989. – Vol. 429. – P. 419-444. 7. Gettins P., Metzler M., Coleman J. Alkaline phosphatase. 31 P NMR probes of the mechanism // J. boil. Chem. – 1985. – Vol. 259. – P. 4994-4997. 8. Besman M., Coleman J.E. Isozymes of bovine intestinal alkaline phosphatase // J. boil. Chem. – 1985. – Vol. 260. – P. 1190-1193, 2875-2883. 9. Otvos J.P., Armitage J.M. Determination by cadmium-113 nuclear magnetic resonance of the structural basis for metal ion dependent anticooperativity in alkaline phosphatase // Biochemistry. – 1980. – Vol. 19. – P. 4021-4024. 10. Ehle H., Muller E., Horn A. Alkaline phosphatase of the calf intestine hydrolyzes phospholipids // FEBS Letters. – 1985. – Vol. 183. – P. 2-7. 11. Печникова И.В., Харькова Н.М., Тинкер А.И. Изменение активности в организме подопытных животных, привитых вакцинами ЕВ и К-1, приготовленными на различных средах высушивания // Иммунология и иммунопрофилактика чумы и холеры. – Саратов, 1980. – С. 85-87.