

**ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЕ СООТНОШЕНИЯ В КРОВИ ГУСЯТ,
ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА**

Радченко С.Л., Германович Н.Ю., Никандров В.Н., Бирман Б.Я.
УО "Витебская государственная академия ветеринарной медицины"
УО "Витебский государственный университет им. П.М. Машерова"
РНИУП "ИЗВ им. С.Н. Вышелесского НАН Б", г. Минск, Республика Беларусь

До настоящего времени недостаточно изученной является роль окислительных процессов и антиоксидантной системы в формировании иммунного ответа на различные виды вакцин.
www.vsavm.by

применяемых в животноводстве и птицеводстве. Применение, как живых, так и инактивированных вакцин вызывает напряжение иммунитета у вакцинированных животных и птиц. Известно, что функционирование иммунной системы тесно связано с протеканием окислительных процессов: образование активных форм кислорода (АФК) в организме происходит в условиях нормальной активности клеток – фагоцитов, моноцитов, эозинофилов крови и тканевых макрофагов [1]. В ответ на воздействие бактерий и ряда химических веществ на рецепторы клеток фагоцитов происходит резкое возрастание скорости образования супероксидных радикалов этими клетками с одновременным повышением потребления ими O_2 иногда более чем в 20 раз [2,3]; образующийся в лимфоцитах $OH\cdot$ является одним из активаторов запуска клеточной пролиферации и дифференциации. Поэтому его удаление из клетки с помощью «перехватчиков» приводит к ингибированию митогенеза [4,5].

Однако, хотя ПОЛ (перекисное окисление липидов) на стационарном уровне является нормальным физиологическим процессом, а пероксиды - продуктами обмена метаболизирующих клеток [6], пусковые и защитные системы, не допускающие нарушения стационарного процесса, должны функционировать на любой стадии окисления [7]. При повышении концентрации активных форм кислорода и продуктов ПОЛ выше физиологически необходимой, возможно нарушение метаболических процессов (продукты ПОЛ ингибируют лактатдегидрогеназу, сукцинатдегидрогеназу, цитохромоксидазу, трипсин, папаин, РНК-азу и др. и возникновение патологических состояний [8]. При иммунном ответе усиливаются пролиферативные процессы, в частности, синтез иРНК, а одной из основных «мишеней» свободных радикалов служат нуклеиновые кислоты и белки [8]. Избыточная активация свободнорадикальных процессов в результате повышенного образования в биофазе активных форм кислорода сопровождается нарушением рецепторных взаимодействий и деструктивными изменениями в системе как клеточного, так и гуморального иммунитета. Кроме того, не только свободные радикалы, но и продукты ПОЛ, такие как малоновый диальдегид (МДА), *in vivo* реагируют с нуклеиновыми кислотами, белками, фосфолипидами. Реакции МДА с нуклеиновыми кислотами идут преимущественно по N-атому гуанина или цитозина с образованием циклических производных [9]. Реакции с белками и аминокислотами идут главным образом по свободной аминогруппе с образованием 1:2 аддуктов [9]. Аналогично 1:1 и 1:2 аддукты образуются в реакциях с фосфатидилсеринем и фосфатидилэтаноламином. Показано также, что эндогенный МДА, реагируя с фосфатидилсеринем и фосфатидилэтаноламином эритроцитарной мембраны, способствует миграции этих фосфолипидов с внутренней стороны бислоя к наружной, увеличивает мембранную проницаемость [9]. Поскольку формирование иммунитета тесно связано с окислительными процессами, интерес представляет изучение концентраций продуктов ПОЛ и активности некоторых антиоксидантных ферментов при вакцинации гусят инактивированной эмульсин-вакциной против пастереллеза и сочетанного применения этой вакцины с иммуномодуляторами – тималином и калия оротатом.

Материалы и методы. Исследования проведены на 60 гусятах-аналогах 13-37-дневного возраста, разделенных на 4 группы, по 15 птиц в каждой. Интактная птица 1-ой группы служила контролем. Гусят 2-ой группы иммунизировали эмульсин-вакциной против пастереллеза согласно временному наставлению по ее применению, в 16-дневном возрасте, 1-кратно, подкожно, в дозе 0,5 мл в область нижней трети шеи. Гусят 3-ой группы иммунизировали совместно с иммуностимулятором тималином в дозе 1 мг/кг массы тела птицы. Предварительно 10 мг тималина растворяли в 10 мл вакцины. Гусятам 4-й группы вакцину вводили совместно с иммуностимулятором калия оротатом. Его задавали перорально в течение семи дней (за 3 дня до иммунизации и 4 дня после иммунизации) в дозе 15 мг/кг массы один раз в сутки.

На 7-ой, 14-й и 21-й дни после вакцинации по 5 гусят из каждой группы убивали.

Получение крови осуществляли с соблюдением правил асептики и антисептики в стерильные пробирки [10]. Кровь стабилизировали гепарином (2,0-2,5 Ед / мл). Эритроцитарную массу после отделения плазмы ресуспендировали в охлажденном изотоническом растворе натрия хлорида и повторно центрифугировали. Процедуру повторяли трижды для полного удаления плазмы. Полученные отмывые эритроциты хранили в холодильнике при температуре $+4^{\circ}C$ не более 48 часов [11]. Гемолизаты готовили непосредственно перед определением активности ферментов и содержания субстратов добавляем к эритроцитарной массе бидистиллированной воды.

Определение активности каталазы проводили по методу Королюк М.А. с соавт. [12]. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Активность глутатионпероксидазы с перекисью водорода в качестве субстрата определяли методом Nafetal D.D. et al [13]. Активность СОД определяли по методу Костюк В.А с соавт. - спектрофотометрический метод определения активности СОД, основанный на определении степени торможения реакции окисления кверцетина [14]. За 1 условную единицу активности фермента принимали 50% ингибирования. Об интенсивности ПОЛ судили по количеству ТБК-активных продуктов, определяемых по методу Ohkawa [15].

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами с использованием пакета программ «Excel».

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что на 7-ой день после вакцинации гусят инaktivированной эмульсин-вакциной против пастереллеза концентрация диеновых конъюгатов (первичных продуктов перекисного окисления) статистически достоверно не изменялась, а малонового диальдегида, выявляемого по реакции с тиобарбитуровой кислотой, увеличивалась в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой и составила $312,2 \pm 28,23$ нмоль/г плазмы крови. В последующие сроки наблюдалось повышение показателя в 1,47, 1,52 раза по сравнению с контролем соответственно на 14 и 21 сутки после вакцинации. Увеличение количества вторичных продуктов перекисного окисления липидов при практически неизменной концентрации первичных продуктов ПОЛ может свидетельствовать о том, что запуск свободнорадикальных реакций после вакцинации происходит на более ранние сроки. Вторичные продукты ПОЛ, в отличие от первичных, более стабильные и поэтому можно регистрировать повышение их уровня и в более поздние сроки. Полученные данные согласуются с литературными данными, характеризующими биохимические изменения при других бактериальных инфекциях: усиление ПОЛ происходит в легочной ткани и плазме при развитии экспериментального туберкулеза легких, при развитии лептоспироза происходит усиление ПОЛ в плазме [16]. Считается, что основная роль в усилении ПОЛ принадлежит эндотоксину, который помимо активации нейтрофилов может непосредственно повреждать эндотелиальные клетки и вызывать нейтрофил-зависимый окислительный стресс [3,16]. Подтверждением усиления перекисного окисления липидов при вакцинации является положительное влияние на иммунную и антиоксидантную системы препаратов с антиокислительным действием селекор и лигфол при введении стелным коровам вакцины против колибактериоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита и супоросным свиноматкам вакцины против сальмонеллеза, колибактериоза и энтеротоксемии свиней [16]. Интенсификацию окислительных процессов при вакцинации отмечают также и другие авторы [17, 18]. Например, Слащилин В.А. и Кардашов А.М. отмечали, что вакцинация телят против инфекционного ринотрахеита вызывает в первые дни увеличение концентрации первичных продуктов ПОЛ и МДА до 40% [18].

У гусят 3-ей группы наблюдалось повышение концентрации МДА в 1,2 раза в плазме крови на 7-ые сутки после вакцинации по сравнению со 2-ой группой. Это может свидетельствовать об усилении тимиолом антиоксидантной защиты. Хотя Слащилин В.А. и Кардашов А.М. при применении тимогена в период вакцинации телят против инфекционного ринотрахеита не обнаружили интенсификации окислительных процессов по уровню МДА [18]. Данные различия могут быть обусловлены видовыми особенностями. В последующие сроки статистически достоверных изменений показателей гусят 3-ей по сравнению со 2-ой обнаружено не было. У гусят 4-ой опытной группы (сочетанное применение вакцины с калия оротатом) статистически значимых различий по сравнению с гусятами 2 группы обнаружено не было.

Активность антиоксидантных ферментов изменялась следующим образом: активность СОД в эритроцитах гусят 2-ой группы снижалась на 7-ой день на 37% по сравнению с контролем, к 21 суткам происходила стабилизация показателя и существенных отличий от контроля не было выявлено. Некоторые авторы указывают на стабилизацию антиоксидантных ферментов в онтогенезе к 22-28 суткам [19]. Снижение активности СОД может быть вызвано повышением концентрации пероксида водорода, который ингибирует фермент по принципу отрицательной обратной связи. Косвенным подтверждением повышения концентрации пероксида водорода может служить также повышенная активность каталазы. Так, активность каталазы в плазме у гусят 2-ой группы была выше по сравнению с 1-ой группой на 45%, 36% и 21% на 7, 14 и 21 сутки после вакцинации соответственно. Активность глутатионпероксидазы в плазме гусят 2-ой группы повышалась по сравнению с 1-ой группой на 25%, 17% и 15% соответственно на 7, 14 и 21 сутки после вакцинации. Это может свидетельствовать о том, что в плазме крови ведущая роль по утилизации пероксидов принадлежит каталазе, а не глутатионпероксидазе. У гусят 3-ей и 4-ой группы на 7-е сутки отмечалось повышение активности каталазы по сравнению с гусятами 2-ой группы на 27% и 15% соответственно.

Заключение.

Вакцинация гусят против пастереллеза вызывает повышение концентрации вторичных продуктов ПОЛ в 1,4, 1,47 и 1,52 раза по сравнению с контрольной группой на 7, 14 и 21 сутки после вакцинации соответственно.

Активность СОД после вакцинации на 7-ые сутки снижается, к 21 суткам происходит стабилизация показателя, активность каталазы и глутатионпероксидазы увеличены во все сроки исследования по сравнению с контролем. Причем увеличение активности каталазы выражено сильнее, что может свидетельствовать о ведущей роли каталазы по утилизации пероксидов в плазме крови гусят.

Литература. 1. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.- Новосибирск: Наука, 1983. - 264 с. 2. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биологической химии. - Т. XXXI. - М., 1990. - С.180-209. 3. Neutrophil activation after burn injury: contributions of the classic complement pathway and endotoxin / Davis C.F., Moore F.D., Rodrick M.L., Faaron D.T., Mannick J.A. // Surgery. - 1987. - V. 102. - №3. - P.477-484. 4. Novogrodsky A., Ravid A., Rubin L. A. Et al. Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1982. - Vol.79. - P.1171-1174. 5. Зайцев В.В. Свободнорадикальные процессы и метаболизм гидроперекисей в гепатоцитах // Гепатцит: функционально-метаболические свойства: Сб. ст. / Под ред. Л.Д. Лукьянова. - М: Наука, 1985. - С.125-145. 6. Бори-

Ученые записки УО ВГАВМ, том 42, выпуск 2

сюк М.В., Зинчук В.В., Корнейчик В.Н. Кислород и свободные радикалы // Кислород и свободные радикалы. - Гродно, 1996. - С.4-7. 7. Ursini F. The Multilevel System Against Lipid peroxidation in Living Tissues // Oxygen Free Radicals Shock. Int., Workshop, Florence, May 31-June 1, 1985. - Basel, 1986. - P.9-14. 8. Владимиров Ю.А. Роль нарушения свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов // Пат. физиология и эксп. терапия.- 1989. - №4. - С.7-18. 9. Draper H.H., Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde // Xenobiotica: Taylor and Francis, London, N.Y., Philadelphia. - 1990 - V.20. - №9. - P.901-907. 10. Лабораторные методы исследования в клинике /Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. - М.: Медицина, 1987. - 368 с. 11. Мусатова Н.В., Лопатина Н.И. Влияние условий хранения на перекисное окисление липидов в эритроцитах // Лаб. дело.- 1986.- №12.- С.21-21. 12. Метод определения активности каталазы / Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. // Лаб. дело. - 1988. - №1. - С.16-18. 13. Hafeman D.G., Sundler R.A., Hoekstra W.G. Effect of glutathione dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat // J. Nutrithion. - 1974. - V.104. - №5. - P.580-587. 14. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксид-дисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии.- 1984. - № 4.-С. 88-91. 15. Ohkawa H., Ohishi N., Yagy K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Analytical biochemistry. - 1979. - V. 95. - № 2. - P.351-358. 16. Шахов А.Г. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных заболеваний //Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных.-Материалы международной научно-практической конференции 21-23 сентября 2004 года г. Воронеж-Воронеж, 2004- С.3-10. 17. Жаркой Б.Л., Рецкий М.И. Влияние активных форм кислорода на функциональную активность компонентов иммунной системы//Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных.-Материалы международной научно-практической конференции 21-23 сентября 2004 года г. Воронеж-Воронеж, 2004- С.40-44. 18. Слащилин В.А., Кардашов А.М. Влияние природного иммуномодулятора на перекисное окисление липидов при вакцинации телят против инфекционного ринотрахеита /Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях - Материалы международной научно-практической конференции 23-25 сентября 2002 г - С.546-547. 19. О.О. Данченко, В.В. Калитка. Механизмы формирования системы антиоксидантного захисту в гусей в эмбриогенезі та ранньому постнатальному періоді/Укр. Біохім журнал, 2002, т.74, №4-С 120-124.