

На правах рукописи



ДАНИЛИШИН
Юрий Богданович

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУНИТЕТА И ГЕМОСТАЗА
ПРИ ГИПОФИЗАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
(экспериментальное исследование)

14.00.53 — геронтология и гериатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург-2005

Работа выполнена в лаборатории возрастной клинической патологии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Научные руководители:

доктор медицинских наук
Рыжак Галина Анатольевна

заслуженный деятель науки России,
доктор медицинских наук, профессор
Кузник Борис Ильич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
Кветной Игорь Моисеевич

доктор медицинских наук, профессор
Шанин Всеволод Юрьевич

Ведущая организация:

ГУ Научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Минздрава России (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «29» сентября 2005 г в «12»
часов на заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-
Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН (197110, г.
Санкт-Петербург,
пр. Динамо, д. 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского
института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Автореферат разослан «16» июля 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

 Л.С. Козина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Известно, что центральными органами иммунитета у млекопитающих и человека являются вилочковая железа и красный костный мозг [Петров Р.В., 1986, 2000; Хаитов Р.М. и др., 1995, 2001; Ярилин А.А., 1999, 2001; Черешнев В.А. и др., 2002; Miller J., Ducker P., 1967; Bemet F., 1971]. У птиц же органом, обеспечивающим созревание и дифференцировку В-лимфоцитов, а также приобретение ими иммуноглобулиновых рецепторов, служит сумка Фабрициуса [Болотников И.А., 1982; Степанов А.В., 1995; Степанов А.В. и др., 2002; Bemet F., 1971; Moriya C, 1987; Glide B., 1995;].

Вместе с тем, установлено, что на состояние центральных органов клеточного и гуморального иммунитета оказывает влияние гипофиз. В частности, гипофизэктомия у различных животных приводит к инволютивным изменениям в тимусе [Корнева Е.А. 1988, 1999; Патеюк А.В. др. ,2002,2003,2004; Кузник Б.И. и др. 2002, 2003, 2004; Nagy T., Berszi I., 1978; Kalden J.R. et al., 1980; Cross R.J. et al., 1982; Manelli N. et al., 1989]. У гипофизэктомированных крыс число клеток и митотический индекс в вилочковой железе значительно уменьшаются, а количество лимфоидных клеток падает более чем в два раза [Kalden J.R. et al., 1980; Cross R.J. et al., 1982]. Одновременно в тимусе резко снижается концентрация тимозина, оказывающего влияние на созревание и приобретение специфических рецепторов Т-лимфоцитами [Dosek D.C., Koup R.A., 2000], а также наблюдается угнетение гуморального иммунитета [Девоино Л.В., Ерёмин О.Ф. 1977, 1993; Патеюк А.В. и др., 2003; Nagy T., 1978; Cross R.J.,1982].

Следует заметить, что в большинстве случаев исследования по изучению роли гипофиза в регуляции клеточного и гуморального иммунитета проводились на взрослых животных [Девоино Л.В.; Cross R.J.1982; Fabris N., 1988,1989; Manelli П., 1989]. Более того, до сих пор практически отсутствуют наблюдения, в которых изучалась бы взаимосвязь гипофиза и центрального органа гуморального иммунитета у птиц — сумки Фабрициуса в возрастном аспекте. Исключением служат лишь выполненные в последние годы работы А.В. Патеюка (2004), А.В. Патеюка и др. (2004), Б.И. Кузника и др. (2004), в которых показано, что у старых кур влияние гипофиза на центральные органы иммунитета значительно ослабевает. Из полученных данных сделан чрезвычайно важный вывод, что гипофиз в перинатальном периоде определяет дальнейшую функцию центральных органов иммунитета. В последующем тимус и bursa (а у человека и вышших животных, по всей видимости, костный мозг) могут осуществлять свою деятельность самостоятельно, не нуждаясь в воздействиях гипофиза.

Вместе с тем, с нашей точки зрения, цитируемые работы освещают не все аспекты проблемы. Авторы осуществляли гипофизэктомию или в первый день жизни цыплят, или у старых кур. До сих пор остаётся неясным, как будет протекать деятельность вилочковой железы и сумки Фабрициуса у птиц между указанными сроками.

Известно, что иммунитет тесно связан с системой гемостаза и неспецифической резистентностью, и все они вместе составляют единую гуморальную защитную систему организма [Кузник Б.И., Цыбиков Н П., 1982; Кузник Б.И. и др., 1984-2004; Витковский Ю.А. и др., 1998- 2000]. Более того, существует иммунный механизм регуляции системы гемостаза, осуществляемый, с одной стороны, за счет образования аутоантител к активированным факторам свертывания крови и фибринолиза [Цыбиков Н.Н. и др., 1984,2004; Кузник Б.И. и др., 1989-2004], а с другой - за счёт продукции провоспалительных и противовоспалительных питокинов [Кузник Б.И. и др., 1998-2002; Витковский Ю.А. и др., 1997-2004]. Однако играет ли гипофиз существенную роль в регуляции взаимосвязи между иммунитетом и гемостазом, до последнего времени остается неясным.

Всё сказанное свидетельствует о том, что избранная тема исследования является актуальной и имеет важное теоретическое и практическое значение.

Цель и задачи исследования. Целью исследования явилось изучение роли гипофиза в регуляции клеточного и гуморального иммунитета, свёртывания крови и фибринолиза при старении.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить особенности клеточного и гуморального иммунитета у кур различного возраста.
2. Изучить возрастные особенности свёртывания крови и фибринолиза у кур.
3. Установить, как влияет гипофизэктомия, произведенная у цыплят на 1, 5, 20, 45 дни жизни, годовалых и старых кур, на состояние клеточного и гуморального иммунитета.
4. Изучить влияние гипофизэктомии, произведенной у кур в разном возрасте, на свёртываемость крови и фибринолиз.

Научная новизна. Установлено, что у цыплят и кур по мере старения наступает депрессия клеточного и гуморального иммунитета, что выражается в инволюции тимуса и бursы, уменьшении числа лейкоцитов, лимфоцитов, антителообразующих клеток, атителозависимой клеточной цитотоксичности, титра агглютининов а гемолизинов.

У кур в отличие от млекопитающих независимо от возраста и содержания контактных факторов свёртывания отсутствует так называемый хагеманзависимыш (ХИазависимый) фибринолиз.

По мере старения у кур развивается гиперкоагуляция и тормозится фибринолитическая активность крови.

Установлено, что неонатальная гипофизэктомия, проведенная в первые часы жизни цыплят, приводит к резкому снижению массы тела, тимуса и селезёнки, но способствует значительному увеличению веса бursы. Одновременно при этом уменьшается количество лейкоцитов, снижаются число антителообразующих клеток (АОК) и индекс антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), резко уменьшается концентрация гемагглютининов и гемолизинов, возникает гиперкоагуляция и депрессия фибринолиза. При удалении гипофиза на 5 день жизни цыплят, изменения со стороны иммунитета и гемостаза выражены в значительно меньшей степени, чем у птиц с неонатальной гипофизэктомией. Показано, что чем старше птицы, тем менее интенсивно удаление гипофиза влияет на состояние иммунитета и гемостаза. У старых (5-6 лет) кур эти изменения практически отсутствуют.

Теоретическая и практическая ценность. На основании полученных данных предложена гипотеза, объясняющая роль гипофиза в регуляции клеточного и гуморального иммунитета, свёртывания крови и фибринолиза. Приведены убедительные данные, доказывающие, что в первые часы, а, возможно, дни жизни цыплят гипофиз запускает функции центральных органов клеточной и гуморального иммунитета - вилочковой железы и сумки Фабрициуса. В дальнейшем функционирование этих органов, хотя и с меньшей интенсивностью процессов, может происходить и без участия гипофиза.

В основе возникающих после гипофизэктомии гиперкоагуляции и депрессии фибринолиза лежат нарушения иммунного механизма регуляции системы гемостаза.

Основные положения, выносимые на защиту

1. По мере старения у птиц снижается масса тимуса и бursы, уменьшается индекс антителозависимой клеточной цитотоксичности, титр гемагглютининов и гемолизинов,

развивается гиперкоагуляция и тормозится фибринолиз. У кур различного возраста отсутствует хагеманзависимый фибринолиз.

2. Гипофизэктомия у цыплят, проведенная в первые дни жизни, сопровождается нарушениями клеточного и гуморального иммунитета, развитием гиперкоагуляции и депрессией фибринолиза. Такие цыплята отстают в росте, у них отмечается уменьшение массы тела, тимуса и селезенки, в то время как масса бursы резко возрастает. Антителозависимая клеточная цитотоксичность, титр гемагглютининов и гемолизинов у них практически не определяется. Такие цыплята нежизнеспособны и погибают после 45 дня жизни.

3. Гипофизэктомия, произведенная на пятые сутки после появления цыплят на свет, сопровождается менее выраженными изменениями со стороны клеточного и гуморального иммунитета, свёртывания крови, фибринолиза, по сравнению со сдвигами, обнаруженными после удаления гипофиза у птиц в первые часы жизни

4. Гипофизэктомия, осуществлённая через три недели и полтора месяца после появления цыплят на свет, приводит к относительно незначительным сдвигам со стороны клеточного и гуморального иммунитета, свёртывания крови и фибринолиза. При удалении гипофиза у зрелых и старых кур изменения со стороны иммунитета и гемостаза практически отсутствуют.

5. Гипофиз в первые часы и дни жизни цыплят запускает деятельность тимуса и бursы, после чего их функции, как центральных органов клеточного и гуморального иммунитета, хотя и с меньшей интенсивностью процессов, могут осуществляться и без его участия.

Апробация работы и реализация результатов исследований. Материалы исследований докладывались и обсуждались на заседаниях кафедр нормальной и патологической физиологии, на проблемных комиссиях «Физиология и патология иммунитета и гемостаза» и «Геронтология и гериатрия» Читинской государственной медицинской академии, на заседаниях Читинского физиологического и геронтологического обществ, а также Ученого совета Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, на симпозиуме «Физиология иммунной системы» XIX Всероссийского съезда физиологов им. академика И.П. Павлова (Екатеринбург, сентябрь, 2004), научной конференции, посвященной пятидесятилетию кафедры нормальной физиологии Читинской медицинской академии (октябрь 2004), Европейском конгрессе по иммунологии и аллергологии (Москва, февраль 2005)

Результаты работы внедрены в учебный процесс на кафедрах нормальной и патологической физиологии Читинской государственной медицинской академии, кафедре медико-биологических основ физической культуры Забайкальского государственного педагогического университета и вошли в книгу Б.И. Кузника «Физиология и патология системы крови», одобренную Министерством высшего образования и здравоохранения Российской Федерации в качестве дополнительной литературы для изучения нормальной и патологической физиологии. Кроме того, материалы диссертационной работы вошли в учебник «Физиология человека» (редакторы В.М. Покровский и Г.Ф. Приходько), одобренный Министерством здравоохранения РФ для преподавания в высших учебных медицинских заведениях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 118 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам исследования, собственных исследований, обсуждения полученных результатов исследований, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 14 таблицами. Список цитируемой литературы включает 233 наименования, из них 125 отечественных и 108 иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследования были выбраны в качестве экспериментальных животных птицы, поскольку они являются единственными представителями животного мира, у которых имеется специализированный орган гуморального иммунитета - сумка Фабрициуса, что облегчает решение поставленных задач.

Экспериментальные исследования проводили на 345 цыплятах породы Леггорн КРОСС-288, 20 годовалых и 25 старых курах в возрасте 5-6 лет. 185 цыплят первых часов, дней и месяцев жизни, а также 10 зрелых и 15 старых кур подвергались гипофизэктомии. У 160 цыплят, 10 зрелых и 10 старых кур производили ложную операцию. У всех без исключения птиц через 1,5 месяца после операции исследовали состояние иммунитета и гемостаза. Если гипофизэктомия была проведена на 1, 5 и 45 сутки жизни цыплят, то показатели иммунитета у них определяли на 5, 10, 21 и 45 сутки после произведенной операции. При операции, осуществленной на 20 день жизни, исследования иммунитета и гемостаза осуществляли на 21 и 45 день после оперативного вмешательства.

Все птицы находились в одинаковых условиях вивария при искусственном освещении и получали стандартные корма.

1.1. Гипофизэктомия

Кур оперировали в первые 6 часов после рождения, а также в 1, 5, 10, 21, 45 дни, 1 год и 5-6 лет после рождения по методу, разработанному А.В. Патеюком (1995, 2004). Птицам под гексеналовым наркозом после обработки операционного поля 70% раствором спирта на середине третьей небной складки делали прокол неба основной кости и дна турецкого седла иглой диаметром 1,2 мм. Далее извлекали иглу и по образованному каналу в область турецкого седла вводили шипцы для биопсии от эндоскопа до метки на шипцах (метка устанавливалась опытным путем), зажимали и отсекали шипцами гипофиз и извлекали из черепной коробки. Дефект кости замещали стерильным стоматологическим воском. На поврежденный участок слизистой неба наносили слой медицинского клея БФ с раствором бриллиантовой зелени. Качество удачения гипофиза контролировали при последующем забое птицы.

1.2. «Ложные» операции

Кур того же возраста, составивших контрольную группу, подвергали ложной операции, для чего воспроизводили все этапы вмешательства за исключением удаления гипофиза. После операции животные как подопытной, так и контрольной групп в течение 5 дней получали антибиотики (левомецетин) в дозе 2 мг на 1 цыпленка, а помещение, где они содержались, обрабатывали бактерицидной лампой.

1.3. Забор крови

Кур под гексеналовым наркозом фиксировали на спине, вскрывали брюшную полость по средней линии и с помощью специального устройства забирали кровь из брюшной аорты в объеме 4-5 мл. Приспособление для взятия крови базируется на системе замкнутых силиконизированных трубочек и сосуда для сбора крови, в котором создается отрицательное давление. Один конец устройства соединен с силиконизированной иглой, другой - с отсосом. Сосуд для сбора крови находится на электровстряхивателе для быстрого смешивания крови с антикоагулянтом.

У 45-дневных цыплят, годовалых и старых кур кровь получали из подкрыльцовой вены пластмассовыми шприцами.

Для получения сыворотки кровь брали пластмассовым шприцем без антикоагулянта.

1.4. Определение иммунологических показателей

Цыплят, зрелых и старых кур дважды за 10 и 5 суток до исследования иммунизировали эритроцитами барана (внутрибрюшинно вводили 7×10^9 клеток на 1 кг массы тела). Иммунологические показатели определяли в реакциях гемагглютинации и гемолиза к ксеногенным эритроцитам, а в селезенке животных регистрировали количество антителообразующих клеток по методу A.Cunningham (1986). Кроме того, в мазках периферической крови экспериментальных птиц, окрашенных по Романовскому-Гимза подсчитывали лейкоцитарную формулу. Количество лейкоцитов определяли в камере Горяева по общепринятым методам.

1.5. Определение уровня антителозависимой клеточной цитотоксичности

У подопытных кур извлекали селезенку. Готовили клеточную суспензию в растворе Хенкса, который затем фильтровали через капроновую сетку. Суспензию клеток дважды отмывали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин. Жизнеспособность клеток, определяемая методом суправитальной окраски 0,1% раствором трипанового синего, во всех исследованиях превышала 90%. В качестве клеток-мишеней использовали эритроциты барана, трижды отмытые по 10 минут и осажденные центрифугированием при 400 g. Взвесь эритроцитов барана (2,5%) смешивали с равным объемом гипериммунной антисыворотки кролика в субагглютинирующем разведении (1:500). Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C, затем отмывали 3 раза раствором Хенкса и доводили до необходимой концентрации. Используемую антисыворотку предварительно инактивировали в течение 30 минут при температуре 56°C. Полученную суспензию клеток селезенки интактных и иммунизированных животных смешивали с эритроцитами барана в соотношении 20:1 (абсолютные значения, соответственно, 20×10^6 и 1×10^6) в 2 мл раствора Хенкса без фенолового красного и инкубировали в течение 4 ч при температуре 37°C. После инкубации смесь клеток центрифугировали в течение 20 мин при 200 g и собирали супернатант.

Цитопатогенность клеток-киллеров оценивали спектрофотометрическим методом по выходу гемопротеинов в инкубационную среду из лизированных эритроцитов. Контролем служили пробы, содержащие интактные эритроциты барана. Спонтанный лизис сенсibilизированных и интактных эритроцитов был одинаковым и в большинстве случаев имел значения, близкие к нулю. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 412 нм на спектрофотометре СФ-46. Уровень антигелозависимой клеточной цитотоксичности оценивали по индексу цитотоксичности (ИЦ), определяемому по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_1 - E_2}{E_{\max}} \times 100\%$$

где: E_1 - оптическая плотность проб, содержащих эффекторные клетки и сенсibilизированные эритроциты, E_2 - оптическая плотность супернатантов, содержащих эффекторные клетки и интактные эритроциты, E_{\max} - оптическая плотность супернатантов при максимальном гемолизе соответствующего числа эритроцитов (гемолиз проводили дистиллированной водой).

1.6. Исследование свёртываемости крови и фибринолиза

Исходя из того, что система гемостаза у различных животных [Балуда В.П. и др., 1978; Мельникова С.Л., Мельников В.В., 1994; Мищенко В.П., Мищенко И.В., 2003], в

том числе и у кур [Кузник Б.И., Патеюк А.В., 2003] подвержена сезонным сдвигам, все наши исследования проведены в летний период одного и того же года.

Изучали следующие показатели, характеризующие общую коагуляционную активность крови, отдельные фазы коагуляции и фибринолиза.

1. Время свёртывания крови.
2. Время рекальцификации плазмы.
3. Каолиновое время.
4. Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) по способу M.J. Lagien, C. Weiland (1957) в модификации З.С. Баркагана (1975).
5. Протромбиновое время.
6. Тромбиновое время.
7. Концентрация фибриногена.
8. Активность факторов VIII, DC, X, XI и XII.
9. Фибринолитическая активность эулобулиновой фракции.
10. Хагеманзависимый фибринолиз.

Все перечисленные методы исследования вошли в современные руководства по изучению системы гемостаза [Баркаган З.С, Момот А.П., 2001] и не нуждаются в дополнительном описании. Для исследования системы гемостаза использовали реактивы одной и той же фирмы и одной и той же серии «Технология стандарт».

1.7. Статистическая обработка материалов исследования

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики для связанных и не связанных между собой наблюдений. Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента (вероятность ошибочной оценки $P < 0,01$; $P < 0,001$) [Венчиков А.И., Венчиков В.А., 1974]. Определяли следующие показатели: M - средняя арифметическая, S - среднее квадратичное отклонение, m - ошибка средней арифметической.

Статистическую обработку материалов исследования выполняли с использованием стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа [Statistica for Windows Release 4.3 Copyright Stat Soft. Inc., 1993].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Возрастные особенности системы иммунитета у кур

Известно, что по мере созревания кур у них в значительной степени наступает атрофия тимуса и сумки Фабрициуса. Вместе с тем, мы не нашли работ, в которых было бы детально описано, как изменяются показатели клеточного и гуморального иммунитета по мере старения кур

Нами проведены исследования на цыплятах, зрелых и старых курах, у которых сопоставлены показатели клеточного и гуморального иммунитета, начиная с первых часов жизни и заканчивая глубокой старостью. Полученные при этом данные представлены в таблице 1.

Как видно из приведенной таблицы, по мере роста цыплят и увеличения массы тела до 1 года масса тимуса постепенно возрастает. Так, к 5 дню она увеличивается в 2,5 раза, а к 65 - в 8 раз. Между тем, у старых кур, по сравнению с годовальными курами, масса тимуса значительно уменьшается. Очевидно, эта реакция обусловлена инволюцией тимуса. Более того, как показывают наблюдения, к пятилетнему возрасту тимус практически полностью замещается жировой тканью. Об этом также свидетельствует постепенное уменьшение после 21 дня жизни цыплят соотношение массы тимуса и массы тела: отношение массы тимуса к массе тела достигает максимума на 5-10 сутки жизни, а затем снижается, достигая минимума у старых кур.

Таблица 1

Состояние иммунитета у кур различного возраста

Изучаемый показатель	Возраст птиц								
	Часы	5 суток	10 суток	20 дней	45 дней	66 дней	90 дней	1 год	5-6 лет
Масса тела, г	32,7±1,6	48,4±1,9	69,5±1,4	95,7±1,8	296,4±6,2	382,6±8,4	425,4±9,2	1673,5±12,8	1835,2±14,7
Масса тимуса, мг	47,6±2,3	112,8±3,1	154,2±3,9	105,7±3,1	151,6±4,7	386,3±7,2	392,5±8,4	932,4±8,4	843,2±7,7
Масса тимуса/ масса тела, $\times 10^{-3}$	1,47±0,11	2,33±0,11	2,21±0,12	1,1±0,13	0,51±0,08	1,01±0,03	0,92±0,02	0,56±0,04	0,46±0,03
Масса бурсы, мг	73,2±1,2	87,4±2,8	109,4±1,3	160,8±2,2	387,4±3,6	678,2±7,2	749,4±8,2	128,4±8,1	95,9±6,3
Масса бурсы/ масса тела, $\times 10^{-3}$	2,28±0,05	1,81±0,07	1,57±0,09	1,68±0,12	1,31±0,07	1,83±0,02	1,76±0,11	0,08±0,02	0,05±0,01
Масса селезенки, мг	62,4±2,4	92,5±2,9	153,8±7,7	165,4±2,5	1478,5±15,7	1568,2±12,3	1683,5±14,5	3472,6±10,2	2957,3±15,6
Масса селезенки/ масса тела, $\times 10^{-3}$	1,93±0,07	1,91±0,09	2,21±0,09	1,74±0,12	5,03±0,04	4,1±0,03	3,96±0,08	2,07±0,05	1,61±0,04
Число клеток в селезенке, $\times 10^8$	21,6±0,8	38,3±1,2	56,4±0,9	47,2±0,7	48,6±1,4	51,2±1,2	68,5±1,6	138,4±7,5	115,2±4,1
Индекс АЗКЦ	2,7±0,4	7,5±0,5	13,6±0,8	24,7±0,8	22,4±0,6	23,7±0,4	25,8±0,3	25,3±0,3	21,7±0,4
Количество АОК, $\times 10^6$	4,8±0,6	14,3±0,9	23,6±0,9	28,4±1,1	40,8±1,5	42,1±1,2	48,3±1,4	45,3±1,4	39,5±1,8
Титр гемолитинов, \log_2	2,1±0,2	2,8±0,2	3,8±0,2	4,1±0,3	5,2±0,2	5,7±0,3	5,9±0,2	5,6±0,2	5,1±0,1
Титр гемагглютининов, \log_2	2,8±0,2	3,6±0,3	4,2±0,2	5,3±0,3	5,8±0,2	6,7±0,3	7,0±0,2	6,9±0,3	6,2±0,2
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	16,5±1,3	19,7±1,5	21,6±1,5	23,4±1,8	25,6±1,2	28,5±0,8	29,4±1,1	30,3±1,2	28,4±1,1

Масса бursы по мере развития цыплят постепенно возрастает и достигает максимальных величин на 90 день жизни птиц, а к 1 году резко (почти в 6 раз) снижается, что связано с её инволюцией. К старости масса бursы по отношению к её весу у трехмесячных кур уменьшается почти в 9 раз. Известно, что бурса достигает своего максимального развития к 8-12 неделе жизни цыплёнка, после чего её функции начинают угасать [Бернет Ф., 1971; Болотников И.А., Конопатов Ю.В., 1993; Степанов А.В., 1988,1994; Степанов А.В и др., 2002]. Полученные нами данные полностью соответствуют сведениям, имеющимся в литературе.

Отношение массы бursы к массе тела имеет максимальное значение в первый день жизни, к 5-10 дню жизни оно уменьшается и затем остаётся на одних и тех же цифрах до трёхмесячного возраста. Очень низкие величины этого показателя в возрасте 1 года и 5-6 лет (уменьшение в 25-35 раз по сравнению с величинами в возрасте 45 дней) свидетельствуют об инволюции сумки Фабрициуса.

Как следует из данных таблицы 1, масса селезёнки у цыплят достигает наибольших величин в возрасте 1 года, а затем незначительно снижается. По всей видимости, у старых кур происходит частичная атрофия этого органа. Следует заметить, что отношение массы селезёнки к весу тела остаётся стабильным до 21 суток. К 45 дню жизни цыплят этот показатель достигает наибольших величин, увеличиваясь по сравнению с первыми часами жизни более чем в 2,5 раза, а затем начинает постепенно снижаться. В возрасте 1 года этот показатель становится таким же, как при появлении цыплёнка на свет. У старых кур соотношение массы селезёнки к массе тела становится меньше, чем у цыплят первых часов жизни. Всё это свидетельствует о том, что по мере старения птиц в большей степени изменения возникают во внутренних органах, тогда как за счёт ожирения масса тела может даже возрастать, что и наблюдалось в наших исследованиях.

В то же время, число клеток селезёнки в первые часы жизни крайне мало и составляет в среднем $(21,6 \pm 0,8) \times 10^6$. Уже к 5 дню жизни птиц количество клеток в селезёнке увеличивается почти в 2 раза. Если учесть, что к этому сроку масса селезёнки увеличивается всего в 1,5 раза, то следует прийти к выводу, что плотность клеток в селезёнке возрастает. В дальнейшем по мере развития цыплят число клеток в селезёнке несколько снижается, хотя резко увеличивается масса селезёнки. К 3-х месячному возрасту число клеток в селезёнке увеличивается по сравнению с первыми часами жизни в 3,1 раза, тогда как масса селезёнки к этому сроку повышается более чем в 26 раз. У уюдовалых кур число клеток в селезёнке достигает максимума, ибо увеличивается более чем в 2 раза по сравнению с трёхмесячными цыплятами. Пропорционально в этом возрасте возрастает и масса селезёнки. У старых кур число клеток в селезёнке снижается по сравнению с молодыми (в возрасте 1 года) ($P < 0,05$) и одновременно падает и её масса.

Индекс АЗКЦ на десятый день жизни цыплят (в первые дни жизни его точно определить невозможно, так как для этого требуется двойная иммунизация эритроцитами барана, между которыми должно пройти пять дней) относительно низок. К 21 дню он достигает максимума, увеличиваясь по сравнению с десятым днём жизни в 1,7 раза, и остаётся стабильным, незначительно колеблясь в ту и другую сторону до старости кур. Количество АОК в селезёнке в первые часы жизни очень мало и составляет $(4,8 \pm 0,6) \times 10^6$, к 5 дню их содержание возрастает в 3 раза, к 10 - в 5, а к 21 - в 6 раз. В дальнейшем число АОК постепенно продолжает нарастать и достигает максимума к 90 дню жизни - $(48,3 \pm 1,4) \times 10^6$. К старости число АОК достоверно уменьшается - до $(39 \pm 1,8) \times 10^6$ ($P < 0,05$).

Определение титра апмпотининов и гемолизинов в первые дни жизни не заслуживает внимания по тем же причинам, что и выяснения АЗКЦ. У 10-дневных цыплят эти

показатели довольно велики. В дальнейшем по мере взросления цыплят титр агглютининов и гемолизинов постепенно нарастает, достигая максимума к 3-х месячному возрасту. У старых кур по сравнению с трехмесячными эти показатели снижаются, хотя остаются на сравнительно высоких цифрах, приближаясь к величинам полуторамесечных цыплят.

Значительный интерес представляет динамика числа лейкоцитов и лейкоцитарной формулы. В первые часы жизни содержание лейкоцитов у цыплят приблизительно такое же, как и у новорожденного ребёнка - $(16,5 \pm 1,3) \times 10^9/\text{л}$. Однако, если у ребёнка уже в первые сутки количество лейкоцитов падает и вскоре достигает величин, характерных для взрослых, то у цыплят наблюдается совершенно иная динамика. У них число лейкоцитов по мере взросления постепенно увеличивается, достигая максимума к двухмесячному возрасту, и сохраняется приблизительно на одних и тех же величинах до старости.

Все представленные данные говорят о том, что, несмотря на инволюцию тимуса и бурсы, у кур, как и у млекопитающих, до старости сохраняются относительно высокие, хотя и более низкие, чем у молодых птиц, показатели иммунитета.

3.2. Возрастные особенности системы гемостаза у кур

При этом были определены время свёртывания крови и рекальцификации плазмы, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), каолиновое, протромбиновое и тромбиновое время, концентрация фибриногена, тотальный эуглобулиновый и хагеманзависимый фибринолиз (табл. 2).

Как показали проведенные исследования, у цыплят, проживших в условиях лаборатории при искусственном освещении 1 сутки, 5, 10 и 20 дней, показатели свёртывания крови и фибринолиза были приблизительно такими же, как и в первый день жизни. Исключение составляли лишь несколько сокращенное время свёртывания крови (на 9%), рекальцификации плазмы (на 10%) и АЧТВ (на 16%) у 20-дневных цыплят по сравнению с птицами первых пяти дней жизни ($P < 0,05$). По всей видимости, эти сдвиги связаны с появлением у птиц контактных факторов свёртывания крови [Зубаиров Д.А. и соавт., 2003].

У цыплят, проживших 45 дней, по сравнению с птицами первого дня жизни, время свёртывания крови было удлинено на 13%, рекальцификации плазмы - на 11%, каолиновое время - 13,5% и тромбиновое время - на 19%, а фибринолиз проявлял тенденцию к усилению (всего на 5%). Такая же картина сохранялась и по отношению к другим (2, 5, 10 и 20 дней) срокам наблюдения. Возможно, эти сдвиги связаны с гормональными перестройками у птиц: исследованиями И.А. Болотникова и Ю.В. Конопатова (1993) показано, что в полуторамесечном возрасте у кур значительно увеличивается содержание половых гормонов.

У годовалых кур, по сравнению с цыплятами первых 20 дней жизни каких-либо существенных отклонений в изучаемых показателях свёртывания крови не обнаружено. В то же время, у годовалых кур по сравнению с 45-дневными цыплятами, выявлялась гиперкоагуляция, о чем свидетельствовало сокращение времени свёртывания крови (на 12%), рекальцификации плазмы (на 16%) и каолинового времени (на 15%).

Наиболее значительно свёртываемость крови и фибринолиз изменялись у 5-6-летних кур. У них сокращались время свёртывания крови и рекальцификации плазмы, каолиновое время и АЧТВ ($P < 0,05$) не только по отношению к 45-дневным цыплятам, но и годовалым курам. Кроме того, у кур в возрасте 5-6 лет повышалось содержание фибриногена (данные не достоверны, но вероятны; $P < 0,2$).

Следовательно, явная гиперкоагуляция по отношению ко всем возрастным группам выявляется лишь у 5-6 летних кур.

Таблица 2

Состояние свёртывающей системы крови и фибринолиза у кур разного возраста

Изучаемый показатель	Возраст цыплят, дни						Возраст кур, лет	
	1	2	5	10	20	45	1	5-6
Время свертывания крови, с	506,3±7,4	479,8±8,2	492±9,6	478,2±10,4	465,4±9,6	571,0±11,2*	502±8,3 [#]	488,5±9,2 [#]
Время рекальцификации плазмы, с	356,1±6,2	347,3±8,2	358,2±10,4	345±4,1	321,4±6,3	396,3±5,3*	332,1±5,8 [#]	315,7±4,9 [#]
Каолиновое время, с	237,4±7,1	234±6,9	253,3±6,3	251,4±7,8	232,5±4,6	269,9±12,3*	229,2±5,3 [#]	214,3±4,1 [#]
Сокращение времени рекальцификации каолином, %	33	32	30	28	28	34	34	32
АЧТВ	49,6±1,7	8,7±1,2	51,6±2,1	45,2±1,8	41,1±1,2	45,7±1,6	45,5±1,9	37,1±2,1 [#]
Сокращение времени рекальцификации каолинцефалином, %	82	66	86	90	87,5	87	87	88
Протромбиновое время, с (стандартный тромбoplastин)	134,3±4,6	134,7±4,3	133±5,1	136,3±4,5	129,7±4,1	133,5±6,4	131,3±4,3	124,1±5,1
Тромбиновое время, с	25,7±0,9	25,4±1,2	26,6±1,4	24,2±1,6	26,3±1,3	30,6±1,4	27,2±1,8	25,6±1,4
Фибриноген, г/л	12,8±0,8	12,5±1,4	12,1±1,2	13,2±1,1	12,6±1,2	11,2±1,1	13,2±1,6	14,9±1,5
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	226,1±11,3	221,5±9,7	232±10,2	226±8,9	221,8±9,4	216,2±7,30	221,4±8,2	239,6±9,3
Скорость растворения 1 г фибрина, мин	17,4±1,2	17,8±1,4	19,9±1,6	17,3±1,1	17,1±1,8	18,1±1,4	16,7±1,1	15,7±1,2
Хагеманзависимый фибринолиз, мин	245,2±10,6	243,1±8,3	238,0±9,2	240,9±7,9	242,5±7,8	204,8±8,1	212,6±9,4	207,3±8,7

* P<0,05 по сравнению с показателем в возрасте 1 дня;

[#] P<0,05 по сравнению с показателем в возрасте 45 дней;[†] P<0,05 по сравнению с показателем в возрасте 1 года.

Наши наблюдения свидетельствуют о том, что под воздействием каолина время рекальцификации плазмы у кур разного возраста сокращается одинаково (на 28 - 34%). Известно, что эта реакция обусловлена активацией контактных факторов (XII и XI). Между тем, у однодневных и пятидневных цыплят факторы XI и XII отсутствуют (Кузник Б.И., Патеюк А.В., 2003).

Но если у цыплят первых дней жизни фактор Хагемана и РТА не выявляются, то почему сокращается время рекальцификации под воздействием каолина? На этот вопрос пока не существует ответа. Для решения его требуется проведение тщательных исследований.

В наших экспериментах у птиц независимо от возраста время рекальцификации плазмы под влиянием каолин-цефалина (АЧТВ) сокращалось на 80-90%. Эти факты лишний раз свидетельствуют о том, что у кур, как и у млекопитающих, внутренний механизм свёртывания крови, включающий появление теназного комплекса, играет далеко не последнюю роль.

У цыплят, зрелых и старых кур не выявлено существенных колебаний фибринолитической активности крови и скорости растворения фибринового сгустка. Всё это говорит о чрезвычайной стабильности фибринолиза у птиц разного возраста.

Мы также попытались ответить на вопрос, насколько сбалансированы общая коагуляционная активность крови и фибринолиз у цыплят и старых кур. С этой целью мы высчитали 4 коэффициента тромбоопасности, характеризующие отношение времени свёртывания крови, рекальцификации плазмы, каолинового времени и АЧТВ к общей фибринолитической активности крови. При этом все показатели принимались за условные единицы (табл. 3). Напомним, что чем ниже коэффициент, тем больше опасность развития тромбоэмболических заболеваний [Кузник Б.И. и др., 2002].

Таблица 3

Коэффициенты тромбоопасности у кур различного возраста

Исчисляемый показатель	Цыплята: дни жизни						Куры: годы жизни	
	1	2	5	10	20	45	1 год	5-6 лет
K_1	2,23±0,2	2,17±0,16	2,12±0,21	2,11±0,3	2,1±0,2	2,84±0,15	2,28±0,1	2,06±0,12
K_2	1,59±0,1	1,56±0,1	1,59±0,13	1,52±0,16	1,4±0,12	1,97±0,11	1,5±0,12	1,4±0,14
K_3	1,04±0,08	1,1±0,1	1,20±0,2	1,12±0,12	1,04±0,12	1,24±0,1	1,0±0,08	0,92±0,03
K_4			0,26±0,03	0,2±0,02		0,18±0,02		0,19±0,02

K_1 – отношение времени свёртывания к времени лизиса сгустка;

K_2 – отношение времени рекальцификации к времени лизиса сгустка;

K_3 – отношение каолинового времени к времени лизиса сгустка;

K_4 – отношение АЧТВ к времени лизиса сгустка.

Как видно из представленных данных, у 45-дневных цыплят оказались самые высокие коэффициенты, что говорит о наименьшей опасности возникновения тромбозов. Кстати, опасность возникновения тромбоэмболических осложнений и ДВС-синдрома у детей первых дней жизни гораздо выше, чем в возрасте от 1 месяца и старше [Баркаган З.С., 1988; Баркаган Л.З., 1989]. По-видимому, аналогичная закономерность свойственна не только млекопитающим, но и птицам.

У годовалых, 5-летних и старых кур коэффициенты тромбоопасности самые низкие и, следовательно, опасность возникновения тромбоэмболических осложнений, а также развития ДВС при стрессорных ситуациях и заболеваниях более велика, чем у цыплят. Аналогичная закономерность наблюдается также у людей. Между тем, у кур опасность возникновения тромбоэмболических состояний по сравнению с человеком менее велика, что обусловлено стабильностью фибринолитической активности крови.

Таким образом, полученные нами данные позволяют считать, что у кур в возрасте 5 лет и старше развивается гиперкоагуляция, но, в отличие от человека, остаётся стабильной фибринолитическая активность крови, благодаря чему у них в меньшей степени, чем у людей, возникают тромбозомболические осложнения.

3.3. Влияние гипопизэктомии на состояние иммунитета у кур различного возраста

Основной задачей наших исследований явилось изучение состояния иммунитета после гипопизэктомии у кур различного возраста. Эти опыты были проведены на 65 цыплятах. Гипопизэктомия осуществлялась в первые часы, а также на 5, 21 и 45 день жизни цыплят. Кроме того, удаление гипопиза проводилось у 10 годовалых (зрелых) и 15-5-6-летних (старых) кур. Наряду с гипопизэктомией одновременно в те же сроки у цыплят (55), зрелых (10) и старых (10) кур осуществляли ложную операцию. При этом открывали доступ в черепную коробку, однако гипопиз не удаляли.

Все исследования иммунологической реактивности осуществляли на 45 сутки после оперативного вмешательства.

У неонатально гипопизэктомированных цыплят по сравнению с ложнопериорированными резко снижалась масса тела ($294,0 \pm 7,8$ г в контроле и $130 \pm 5,4$ г в опыте, $P < 0,001$). Полученные данные вполне объяснимы, ибо падение массы тела, бесспорно, зависит от отсутствия соматотропного гормона гипопиза

Значительные изменения у неонатально гипопизэктомированных цыплят выявлены в иммунных органах. Масса тимуса у них снижалась почти в 3 раза и одновременно уменьшалось соотношение массы тимуса к массе тела. Последний факт говорит о том, что инволюция тимуса у таких цыплят происходила значительно сильнее, чем изменения в костно-суставном и мышечном аппаратах.

Вес бурсы Фабрициуса у цыплят с удалённым гипопизом в первые часы жизни к моменту наблюдения увеличивался более чем в 3,5 раза. Последнее, как было показано в работах А.В. Патеюка и др. (2003), связано с растяжением бурсы не прошедшими дифференцировку, а потому не покинувшим бурсу, лимфоцитами. При этом соотношение массы бурсы к массе тела возрастало более чем в 8,5 раза. Масса селезенки у неонатально гипопизэктомированных птиц уменьшалась почти в 9 раз, тогда как отношение массы селезенки к массе тела снижалось всего в 4 раза. Эти факты лишней раз свидетельствуют о том, что изменения в вегетативных органах по сравнению с соматическими при неонатальной гипопизэктомии выражены в большей степени.

Плотность клеток в селезенке у птиц, которым гипопизэктомия была проведена в первый день жизни, возрастала приблизительно в 3 раза. Последний факт свидетельствует о том, что заселившие селезенку лимфоциты не выходят в кровоток. В селезенке уменьшалось количество стромальных элементов, а число АОК снижалось в 3,4 раза. У таких цыплят выявлялся чрезвычайно низкий титр агглютининов и гемолизинов (их практически не удавалось определить) и с большим трудом приходилось оценивать неспецифическую антителозависимую клеточную цитотоксичность - АЗКЦ, настолько она была низкой (в контроле $24,8 \pm 1,2$, в опыте $0,66 \pm 0,03$ ЕД, $P < 0,001$). Число лейкоцитов у гипопизэктомированных цыплят оказалось резко сниженным (в контроле $29,8 \pm 1,3 \times 10^9$ /л, в опыте $19,3 \pm 1,2 \times 10^9$ /л, $P < 0,001$).

Следует особо отметить, что среди неонатально гипопизэктомированных цыплят наблюдался довольно значительный падёж (погибло 9 из 35 прооперированных птиц в опыте и всего 1 из 25 в контроле).

Таблица 4

Показатели состояния иммунной системы у цыплят, прооперированных на 1,5 и 21 дни жизни

Изучаемый показатель	Срок проведения гипофизэктомии					
	1 сутки		5 сутки		21 сутки	
	К1	ГЭ	К1	ГЭ	К1	ГЭ
Смертность, количество	1	9	0	2	0	1
Масса тела, г P	294,0±7,8	130,6 ±5,4 <0,001	296,4±6,2	169,8±7,3 <0,001	382,6±8,4	235,5±6,7 <0,001
Масса тимуса, мг P	161,7±6,5	57,5±2,9 <0,001	151,6±4,7	68,5±2,9 <0,001	386,3±7,2	149,1±5,2 <0,001
Масса тимуса/масса тела, ×10 ⁻³ P	0,55±0,33	0,44±0,01 <0,001	0,51±0,08	0,40±0,07 <0,001	1,01±0,03	0,63±0,02 <0,001
Масса бursы, мг P	353,0±3,3	1319,1±5,2 <0,001	387,4±3,6	925,7±5,3 <0,001	678,2±7,2	383,6±8,1 <0,001
Масса бursы /масса тела, ×10 ⁻³ P	0,12±0,01	1,01±0,06 <0,001	0,13±0,07	0,54±0,09 <0,001	0,18±0,02	0,16±0,02 <0,001
Масса селезенки, мг P	1558,6±9,5	178,4±7,2 <0,001	1478,5±15,7	451,6±10,3 <0,001	1568,2±12,3	1147,4±10,1 <0,001
Масса селезенки/ масса тела, ×10 ⁻² P	0,52±0,01	0,13±0,02 <0,001	0,50±0,04	0,27±0,05 <0,001	0,41±0,03	0,48±0,02 <0,1
Количество клеток в селезенке, ×10 ⁶ /л P	48,2±4,6	133,4±10,8 <0,001	48,6±1,4	97,2±1,1 <0,001	51,2±1,2	57,1±1,3 <0,01
Индекс АЗКЦ P	24,8±1,2	0,66±0,03 <0,001	22,4±0,6	12,2±0,4 <0,001	23,7±0,4	20,1±0,4 <0,1
Количество АОК, ×10 ⁶ P	41,2±4,1	12,1±1,2 <0,001	40,8±1,5	22,6±1,1 <0,001	42,1±1,2	35,4±1,2 <0,1
Титр гемолизинов, log ₂ P	5,1±0,2	0,4±0,3 <0,001	5,2±0,2	3,6±0,1 <0,001	5,7±0,3	5,0±0,2 <0,1
Титр гемагглютининов, log ₂ P	5,8±0,3	0,5±0,2 <0,001	5,8±0,2	3,9±0,3 <0,001	6,7±0,3	5,9±0,2 <0,1
Количество лейкоцитов, ×10 ⁹ /л P	29,8±1,3	19,3±1,2 <0,001	25,6±1,2	22,7±1,4	28,5±0,8	25,7±1,2

У цыплят, гипофизэктомированных на 5 сутки жизни, через 45 дней после операции также отмечалось значительное снижение массы тела (в 1,6 раза), резко уменьшалась масса тимуса (в 2,2 раза) и селезенки (более чем в 3 раза). Вместе с тем, соотношение массы селезенки к массе тела в этой группе птиц уменьшалось не столь значительно, как у цыплят с удаленным гипофизом в первые часы жизни (всего в 1,9 раза). Плотность клеток в селезенке у птиц, прооперированных на 5 день жизни, увеличивалась всего лишь в 2 раза. В этой группе птиц масса бursы через 45 дней после гипофизэктомии увеличивалась в 2,5 раза, тогда как соотношение массы бursы к массе тела повышалось в 4 раза.

У цыплят с удаленным гипофизом на пятый день жизни не столь значительно падала ЛЗКЦ (с 22,4±0,6 в контроле до 12,2±0,4 МЕ в опыте, P<0,001), в меньшей степени снижалось число АОК в селезенке (менее чем в 2 раза), и сравнительно слабо уменьшался титр агглютининов и гемолизинов. Количество лейкоцитов у опытных

птиц по сравнению с контрольными практически не изменялось. В этой группе падёж птиц был еще довольно значителен (2 цыплёнка из 10).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у птиц с удалённым гипофизом на 5 день жизни сохраняются реакции клеточного и гуморального иммунитета, хотя они протекают на более низком уровне, чем у интактных (ложнооперированных) цыплят.

Если у цыплят гипофиз был удалён на 20-21 сутки, то через 45 дней у них масса тела и тимуса снижалась в меньшей степени, чем у птиц, оперированных на 5 сутки и тем более в первые часы жизни. Вместе с тем, у них значительно сильнее изменялось соотношение между массой тимуса и тела. У таких птиц масса бursы не только не увеличивалась, но даже снижалась пропорционально массе тела, благодаря чему соотношение массы тела и бursы практически не изменялось. В этой группе птиц масса селезёнки по сравнению с контролем падала относительно слабо (всего в 1,3 раза), число клеток в селезёнке лишь слегка возрастало (в среднем на 11%), а число АОК, АЗКЦ, титр агглютининов и гемолизинов, а также количество лейкоцитов практически не изменялись.

Следовательно, если гипофизэктомия была произведена через 3 недели после появления цыплят на свет, то показатели клеточного и гуморального иммунитета у них изменялись незначительно.

У кур, гипофизэктомированных на 45 день жизни, через полтора месяца в значительно меньшей степени, чем у птиц, прооперированных на 1, 5 и 21 сутки, снижалась масса тела, тимуса и селезёнки. При этом масса бursы уменьшалась менее резко, чем у птиц, прооперированных на 5 день после появления на свет, хотя соотношение массы бursы и тела при этом явно снижалось. Число клеток в селезёнке, АЗКЦ и количество АОК у таких цыплят слегка уменьшались, а титр агглютининов, гемолизинов и число лейкоцитов имели лишь слабую тенденцию к снижению.

У кур, гипофизэктомированных в годовалом возрасте, масса тела уменьшалась всего лишь на 25%, а масса тимуса по сравнению с контролем снижалась на 1/3. При этом не изменялось соотношение массы тимуса к массе тела. Масса бursы также уменьшалась приблизительно на 25%, и её отношение к массе тела не изменялось. Вместе с тем, масса селезёнки снижалась довольно резко (на 45%) и в значительной степени уменьшалось соотношение её веса к весу тела. Количество клеток в селезёнке и число лейкоцитов в крови у гипофизэктомированных птиц в этом возрасте практически не изменялось, а индекс АЗКЦ, титр агглютининов и гемолизинов имели лишь слабую тенденцию к снижению.

Если куры были гипофизэктомированы в 5-6-летнем возрасте, то у них сдвиги в изучаемых показателях были приблизительно такими же, как и у годовалых кур. Исключение составляло лишь слабое уменьшение числа лейкоцитов и титра гемоглобину.

Таким образом, наибольшие сдвиги в изучаемых показателях клеточного и гуморального иммунитета наблюдались в том случае, если птицы были прооперированы в первые часы жизни. После 45 дня специфическая защита у них практически была сведена к нулю, в результате чего наступал массовый падёж таких птиц. Если у птиц гипофиз был удалён на 5 день жизни, то иммунитет у них сохранялся, хотя и иммунные процессы протекали на более низком уровне. Удаление гипофиза после 20 дней жизни практически не сказывалось на изучаемых показателях клеточного и гуморального иммунитета.

Таблица 5

**Показатели состояния иммунной системы у цыплят, прооперированных в
возрасте 45 дней, 1 года и 5-6 лет**

Изучаемый показатель	Срок проведения гипофизэктомии					
	45 дней		1 год		5-6 лет	
	К 0	ГЭ 1	К 0	ГЭ 1	К 0	ГЭ 2
Смертность, количество						
Масса тела, г P	425,4±9,2	336,8±7,6 <0,001	1673,5±12,8	1184,7±9,8 <0,001	1835,2±14,7	1267,3±10,3 <0,001
Масса тимуса, мг P	392,5±8,4	267,2±7,1 <0,001	932,4±8,4	621,7±7,7 <0,001	843,2±7,7	524,5±6,9 <0,001
Масса тимуса/масса тела, ×10 ³	0,92±0,02	0,79±0,02 <0,01	0,56±0,04	0,52±0,03	0,46±0,03	0,41±0,02
Масса бурсы, мг P	749,4±8,2	412,5±7,6 <0,001	128,4±8,1	96,5±7,6 <0,01	95,9±6,3	78,3±5,6 <0,01
Масса бурсы / масса тела, ×10 ³	1,76±0,11	1,23±0,12 <0,001	0,08±0,02	0,08±0,02	0,05±0,01	0,06±0,01
Масса селезенки, мг P	1683,5±14,5	1193,2±13,7 <0,001	3472,6±10,2	1986,3±10,7 <0,001	2957,3±15,6	1473,6±13,2 <0,001
Масса селезенки/масса тела, ×10 ² P	3,96±0,08	3,55±0,07 <0,01	2,07±0,05	1,68±0,04 <0,001	1,61±0,04	1,16±0,03 <0,001
Количество клеток в селезенке, ×10 ⁶ /л P	68,5±1,6	51,6±1,3 <0,001	138,4±7,5	149,6±5,8	115,2±4,1	132,8±5,6
Индекс АЗКЦ P	25,8±0,3	21,8±0,2 <0,01	25,3±0,3	24,2±0,2 <0,1	21,7±0,4	18,4±0,3 <0,1
Количество АОК, ×10 ⁶ P	48,3±1,4	40,7±1,1 <0,01	45,3±1,4	40,7±1,3 <0,1	39,5±1,8	31,5±1,6 <0,1
Титр гемолизонов, log ₂ P	5,9±0,2	5,4±0,3	5,3±0,2	4,8±0,1 <0,1	5,1±0,1	4,2±0,2 <0,1
Титр геммагглютининов, log ₂ P	7,0±0,2	6,5±0,2 <0,1	6,9±0,3	6,2±0,2 <0,1	6,2±0,2	4,6±0,2 <0,01
Количество лейкоцитов, ×10 ⁹ /л P	29,4±1,1	26,1±1,0	30,3±1,2	27,1±1,3	28,4±1,1	24,4±1,4 <0,1

Полученные данные позволяют считать, что гипофиз необходим только в первые дни жизни для запуска деятельности центральных органов иммунитета — тимуса и сумки Фабрициуса у птиц. Вполне возможно, что у млекопитающих такую же пусковую функцию гипофиз осуществляет и над деятельностью костного мозга и лимфоидных образований, играющих существенную роль в развитии и дифференцировке В-лимфоцитов. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

В следующей серии наблюдений изучали изменение состояния иммунитета на протяжении 45 дней у птиц с удалённым в первые часы жизни гипофизом. При этом исследования проводились на 5, 10, 21 и 45 дни после удаления гипофиза. Следует отметить, что в этой группе был очень высокий падеж птиц - из 63 гипофизэктомированных цыплят на различных сроках после операции погибло 17, тогда как в контроле всего лишь 1 из 52 ложнооперированных птиц (P<0,001).

Если цыплята подверглись неонатальной гипофизэктомии, то уже через 5 дней у них по сравнению с контролем наблюдалось значительное снижение массы тела, тимуса и селезенки, а также уменьшение числа лейкоцитов АОК, АЗКЦ, титра агглютининов и гемолизонов. В то же время, наиболее резкие сдвиги в изучаемых

показателях иммунитета у них проявлялись к 45 дню после оперативного вмешательства.

На основании наших исследований можно с уверенностью говорить о том, что гипофиз оказывает такое же влияние на центральные органы иммунитета, какое тимус и бурса проявляют в отношении созревания и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов. Мы считаем, что гипофиз является важным органом, без которого у птиц невозможен запуск многочисленных иммунологических функций тимуса и бursы, а у млекопитающих, по всей видимости, и костного мозга.

3.4. Состояние системы гемостаза после гипофизэктомии у кур различного возраста

Одной из основных задач наших исследований явилось выяснение вопроса, какое влияние оказывает гипофизэктомия, произведенная на различных сроках жизни кур, на систему гемостаза

Вначале изучали изменения, которые произойдут в системе свёртывания крови у птиц с удалённым гипофизом в первые часы жизни, на 5, 21 и 45 сутки, а также у годовалых и 5-6-летних кур. Все исследования проводились на 45 день после гипофизэктомии. Одновременно ставились контрольные опыты на цыплятах и курах того же возраста, которым была проведена ложная операция (табл. 6).

Как видно из представленных данных, наиболее выраженные сдвиги в изучаемых показателях системы гемостаза отмечались у неонатально оперированных цыплят. У них значительно сокращалось время свёртывания крови и рекальцификации плазмы, АЧТВ, каолиновое, протромбиновое и тромбиновое время, увеличивалось содержание фибриногена и тормозился фибринолиз.

Если у цыплят был удалён гипофиз в возрасте 5 дней, то изменения со стороны системы гемостаза были не столь ярко выражены. В этих экспериментах выявлялось лишь увеличение времени рекальцификации и скорости лизиса эуглобулинового сгустка, а также повышение концентрации фибриногена.

Аналогичная картина наблюдалась у цыплят, у которых гипофиз был удалён на 21 сутки жизни. Наконец, при удалении гипофиза у цыплят в полуторамесячном возрасте, а также у зрелых и старых кур, через 45 дней после оперативного вмешательства не происходило достоверных сдвигов в изучаемых тестах, характеризующих состояние свёртываемости крови и фибринолиза.

В дальнейшем исследовали свёртываемость крови и фибринолиз у гипофизэктомированных цыплят, зрелых и старых кур в разные сроки после оперативного вмешательства. Оказалось, что у цыплят с удалённым в первые часы жизни гипофизом уже на пятые сутки развивалась выраженная гиперкоагуляция: сокращалось время свёртывания крови, рекальцификации плазмы, каолиновое, протромбиновое и тромбиновое время, увеличивалось содержание фибриногена и тормозился фибринолиз. Через 10 и 21 день после удаления гипофиза эти сдвиги в большинстве случаев хотя и сохранялись, но носили менее выраженный характер. Вместе с тем, через 45 дней после гипофизэктомии вновь наступали выраженные сдвиги в исследуемых тестах системы гемостаза. Напомним, кстати, что к этому сроку наиболее сильно изменялось состояние клеточного и гуморального иммунитета.

Таблица 6

Состояние свертывающей системы крови птиц на 45 сутки после гипофизэктомии, произведенной на различных сроках жизни

Изучаемый показатель	Срок проведения гипофизэктомии											
	1 сутки		5 суток		21 сутки		45 суток		1 год		5-6 лет	
	Контроль	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт
Время свертывания крови, с P	516,5±13,6	372,5±12,5	518,3±6,2	493,2±7,4	521,5±5,2	486,±7,3	513,2±9,4	487,6±7,3	502,2±8,3	483,1±8,8	478,5±9,2	456,3±8,4
		< 0,001				<0,05				<0,01		<0,1
Время рекальцификации плазмы, с P	369,4±9,0	252,7±15,7	346,7±6,1	285,6±5,7	351,3±5,7	307,2±6,3	349,5±7,2	331,7±8,3	332,1±5,8	318,3±7,9	315,7±4,9	301,3±5,8
		< 0,001		<0,001		<0,01				<0,1		<0,1
Каолиновое время, с P	264,9±12,6	178,7±14,9	232,5±4,8	212,5±6,2	236,2±5,1	217,1 ±5,6	231,4±7,3	226,5±6,4	229,2±5,3	211,5±6,7	204,3±4,1	191,6±6,2
		< 0,001		<0,05		<0,05				<0,1		<0,1
Протромбиновое время, с P	141,5±6,1	88,2±6,0	137,2±5,1	128,4±4,6	140,4±4,8	128,3±5,2	136,7±5,6	131,3±5,5	131,3±4,3	126,2±4,5	124,1±5,1	118,4±4,2
		< 0,001										
Тромбиновое время, с P	29,1±0,8	19,2±0,9	28,4±1,4	26,9±1,2	30,1±1,2	26,4±0,8	28,4±1,1	25,2±1,2	27,2±1,8	25,9±1,2	25,6±1,4	21,4±1,2
		< 0,001										
АЧТВ, с P	56,7±2,8	48,4±2,4	45,7±1,6	40,4±1,9	49,3±1,3	43,6±1,2	45,2±1,2	40,2±1,3	42,5±1,9	38,3±1,7	37,1±2,1	30,8±1,7
		<0,05				<0,05		<0,05				<0,1
Фибриноген, г/л P	11,9±1,2	19,1±1,3	12,5±1,1	16,7±1,4	13,1±1,2	15,3±1,3	12,5±1,1	13,1±1,2	13,2±1,6	14,3±1,3	15,2±1,7	17,8±1,5
		< 0,001		<0,05								
Эуглобулиновый фибринолиз, мин P	234,2±3,1	308,2±12,2	216,3±7,4	283,8±8,1	212,4±6,1	241,5±7,2	218,3±8,5	231,3±8,3	221,4±8,2	233,4±8,7	237,6±9,3	249,7±9,3
		<0,001		<0,01		<0,05						
Хагематозависимый фибринолиз, мин P	201,6±9,5	273,4±10,2	204,8±8,1	256,1±7,9	192,8±7,3	226,4±8,9	194,2±8,1	211,4±7,3	212,6±9,4	225,7±7,3	207,3±8,7	218,4±6,8
		<0,001		0,01		<0,05						

Если у цыплят гипофиз был удалён на пятые сутки жизни, то уже через 5 дней отмечалось сокращение времени свёртывания крови, каолинового времени и времени рекальцификации плазмы, а также торможение фибринолитической активности крови. При этом АЧТВ проявляло лишь тенденцию к уменьшению, а содержание фибриногена - к повышению ($P < 0,1$). Эти сдвиги сохранялись на протяжении всего срока наблюдений (45 дней) без существенных колебаний. Вместе с тем, изменение основных показателей свёртывания крови и фибринолиза у цыплят, прооперированных на 5 день жизни, были выражены в значительно меньшей степени, чем у птиц с неонатальной гипофизэктомией.

При гипофизэктомии у цыплят, произведенной на 20 день жизни, через 3 недели после операции нарушения в свёртываемости крови и фибринолизе были выражены приблизительно в такой же степени, как и у цыплят с неонатальной гипофизэктомией к пятому дню после операции. Однако через полтора месяца у таких птиц изменения в системе коагуляционного гемостаза значительно уменьшились и соответствовали таковым у цыплят с удалённым гипофизом на 5 день жизни.

У птиц с гипофизом, удалённым в полуторамесячном возрасте, через 5 дней после операции время свёртывания крови, АЧТВ, время рекальцификации плазмы, каолиновое, протромбиновое и тромбиновое время изменялось наиболее значительно. К этому сроку резко повышалась концентрация фибриногена и тормозился фибринолиз. Эти изменения были выражены приблизительно в такой же степени, как у цыплят, прооперированных в первые часы жизни. Однако в дальнейшем, через 3 недели и особенно через полтора месяца после гипофизэктомии, обнаруженные сдвиги в значительной степени нивелировались и приближались к норме.

Представленные данные позволяют придти к выводу, что гипофиз оказывает регулирующее влияние не только на иммунитет, но и на свёртываемость крови и фибринолиз. Эти влияния осуществляются через центральные органы иммунитета - вилочковую железу и сумку Фабрициуса (у кур). Исходя из многочисленных наблюдений [Кузник Б.И. и др., 1981-2004; Цыбиков Н.Н. и др. 1984-2004; Витковский Ю.А. и др. 1997-2002; Патеев А.В. и др., 2003], можно сделать вывод о том, что сдвиги при гипофизэктомии со стороны системы гемостаза связаны не только с изменением гормонального фона, но и в значительной степени обусловлены нарушением иммунологической регуляции физиологических функций.

ВЫВОДЫ

1. Масса тимуса у цыплят к пятым суткам после рождения увеличивается в 2,5 раза, а к шестьдесят пятому дню - в 8 раз, достигая максимума в возрасте одного года, и в дальнейшем значительно снижается. Вместе с тем, отношение массы тимуса к массе тела достигает максимальных величин к 5-10 дню жизни цыплёнка, а затем постепенно уменьшается к старости.

2. Наибольшая масса бursы отмечается у трёхмесячных цыплят, к годовалому возрасту она уменьшается в 6, а к старости - в 9 раз. Максимальное отношение массы бursы к массе тела выявляется в первый день жизни цыплят, к 5-10 дню оно снижается и сохраняется на постоянных цифрах до трёхмесячного возраста птиц. В дальнейшем отношение массы бursы к массе тела у кур резко падает, становясь минимальным к старости.

3. Масса селезёнки у птиц прогрессивно увеличивается, достигая, как и масса тела, максимума к 1 году, а затем к старости снижается. Отношение массы селезёнки к массе тела становится максимальным к 45 дню жизни и по мере старения уменьшается. При этом число клеток в селезёнке по мере старения кур возрастает, увеличиваясь максимально к 1 году и несколько снижаясь в старости. Число АОК в селезенке до 90 дня жизни цыплят постепенно увеличивается, а к 1 году и особенно к старости заметно снижается.

4. Индекс АЗКЦ у цыплят достигает максимума к 21 дню жизни и до одного года остаётся стабильным, снижаясь к старости. Содержание лейкоцитов, гематоглобинов и гемолизинов у кур становится максимальным к 45 дню жизни и сохраняется на стабильных цифрах до одного года, к старости несколько уменьшаясь.

5. У кур к старости развивается гиперкоагуляция, о чем свидетельствует сокращение времени свёртывания крови и рекальцификации плазмы, каолинового времени и АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени. Одновременно у птиц наступает депрессия фибринолиза, благодаря чему возрастают коэффициенты тромбоопасности. Под воздействием каолина у кур различного возраста не наблюдается активация фибринолиза

6. Гипофизэктомия, произведенная в первые часы жизни цыплят, приводит к резкому уменьшению массы тела, тимуса, сумки Фабрициуса и селезёнки. При этом одновременно происходит сокращение числа лейкоцитов, уменьшение содержания клеток, в том числе АОК, в селезенке, угнетением АЗКЦ, снижение уровня гематоглобинов и гемолизинов, развивается выраженная гиперкоагуляция и депрессия фибринолиза. Указанные сдвиги постепенно нарастают и достигают максимума к 45 дню после операции. Масса бursы в первые 20 дней после гипофизэктомии снижается, а к 45 дню возрастает в 5-9 раз.

7. Гипофизэктомия, произведенная на 5 день жизни цыплят, приводит к менее существенным сдвигам в изучаемых показателях иммунитета и гемостаза, чем у птиц с удалённым в первый день жизни гипофизом. Обнаруженные изменения достигают максимума уже к 5 дню после оперативного вмешательства и сохраняются на одном и том же уровне на протяжении всего срока исследования (45 дней).

8. Степень изменения показателей клеточного и гуморального иммунитета, свёртывания крови и фибринолиза зависит от возраста кур, в котором произведена гипофизэктомия. При проведении гипофизэктомии у старых кур эти сдвиги практически отсутствуют.

9. Гипофиз у птиц осуществляет свои влияния на клеточный и гуморальный иммунитет через его центральные органы - тимус и бурсу. Сдвиги в состоянии свёртывающей системы крови и фибринолиза у гипофизэктомизированных птиц носят преимущественно вторичный характер и обусловлены нарушением иммунологической регуляции системы гемостаза.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. *Докупай М.А.* Сезонные изменения показателей иммунитета у интактных цыплят/ М.А. Джулай, А.В. Патеюк, Л.М. Баранчугова, Ю.Б. Данилишин // Забайкальский медицинский вестник. - 2004. - № 4. - С. 34-37.
2. *Кузник Б.И.* Влияние гипофизэктомии на показатели иммунитета, эритропоэза, свертывания крови и фибринолиза у цыплят и старых кур/ Б.И. Кузник, А.В. Патеюк, Ю.Б. Данилишин, Е.В. Люлькина, М.А. Джулай, Л.М. Баранчугова // Медицинская иммунология. — 2004. - Т. 6, № 3-5. - С. 235-236.
3. *Кузник Б.И.* Новые данные о роли гипофиза в регуляции иммунитета и гемостаза/ Б.И. Кузник, А.В. Патеюк, Ю.Б. Данилишин, М.А. Джулай, Е.В. Люлькина, Л.М. Баранчугова // Рос. физиол. журн. - 2004. - Т. 90, № 8. - С. 112-113.
4. *Кузник Б.И.* Пепгидные механизмы регуляции иммунитета и гемостаза/ Б.И. Кузник, А.В. Патеюк, М.А. Джулай, Н.Н. Цыбиков, В.Л. Цепелев, Л.В. Степатов, Л.М. Баранчугова, Ю.Б. Данилишин, Е.В. Люлькина // Вопросы современной педиатрии. - 2005. - Т. 4, приложение № 1. - С. 160-161.
5. *Патеюк А.В.* Возрастные особенности системы гемостаза у кур/ А.В. Патеюк, Б.И. Кузник, Ю.Б. Данилишин, Е.В. Люлькина, Н.С. Чипизубова // Забайкальский медицинский вестник. - 2004. - № 4. - С. 78-80.
6. *Патеюк А.В.* Сезонные изменения показателей иммунитета у интактных цыплят/ А.В. Патеюк, Л.М. Баранчугова, Ю.Б. Данилишин, М.А. Джулай // Забайкальский медицинский вестник. - 2004. - № 4. - С. 77.
7. *Патеюк А.В.* Состояние иммунитета и гемостаза у неонатально гипофизэктомированных цыплят: в кн. Гипофиз. Иммунитет и гемостаз/ А.В. Патеюк, Б.И. Кузник, М.А. Джулай, Ю.Б. Данилишин, Е.В. Люлькина // Чита, 2003. - С. 30-35.

Данилишин Ю.Б. Возрастные особенности иммунитета и гемостаза при гипопитарной недостаточности // Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.53 - СПб., 2005.-22 с.

Формат 60x84 1/8. Объем 1,0 усл. п.л.

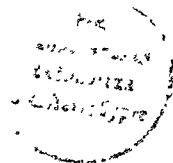
Тираж 100 экз. Заказ 03-08. Бесплатно.

Подписано к печати 23.05.2005

Отпечатано с готового оригинал-макета

Издательство «Система»

15 11.30 2005



1721