

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной
медицины, Республика Беларусь

Рецензент – член редколлегии «Вісник ЖНАЕУ» д.вет.н. Горальський Л. П.

**МОРФОЛОГИЯ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ ПТИЦ ПРИ
АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ,
ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА, ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ И
СИНДРОМА СНИЖЕНИЯ ЯЙЦЕНОСКОСТИ**

Доведено, що застосування асоційованої інактивованої вакцини проти ньюкаслівської хвороби, інфекційного бронхіту, інфекційної бурсальної хвороби та синдрому зниження несучості обумовлює розвиток у паренхіматозних органах птахів як імуноморфологічних, так і патогістологічних змін. Імуноморфологічні зміни характеризуються лімфоїдно-макрофагальною та плазмоклітинною інфільтрацією, утворенням лімфатичних вузликів у печінці, підшлунковій залозі, нирках та наднирковій залозі. Реактогенні властивості вакцини проявляються розвитком нетривалої зернистої та жирової дистрофії гепатоцитів, вакуольної дистрофії панкреоцитів, зернистої дистрофії епітелію нирок, гіпертрофії епітеліоцитів кіркових тяжів надниркових залоз, появою великих потворних фолікулів та лакуноподібних структур у щитоподібній залозі. Результати гістологічного дослідження печінки та нирок підтверджуються даними скануючої електронної мікроскопії.

Постановка проблеми

Общераспространенными клиническими критериями оценки реактогенности вакцинных препаратов является степень выраженности общих и местных реакций [7, 8]. Общие поствакцинальные реакции проявляются повышением температуры тела, признаками интоксикации организма, изменениями показателей крови, мочи, активности индикаторных ферментов и метаболитов ферментов. При оценке местных реакций учитывается гиперемия и инфильтрация в месте введения вакцины, а также увеличение и болезненность лимфатических узлов.

Предварительная оценка вакцинных препаратов производится на лабораторных животных, у которых наряду с термометрированием и взвешиванием проводят при вскрытии макроскопический осмотр внутренних органов и гистологическое исследование иммунной и нервной систем. По мнению многих авторов эти параметры, хотя и необходимы, но не дают полного представления о степени нежелательных воздействий вакцинных препаратов и, как правило, не позволяют прогнозировать и предупреждать поствакцинальные осложнения.

Анализ последних исследований

На этапе клинических испытаний [7, 8, 11], кроме обычных клинических обследований и кожных тестов на неродственные антигены, определяют *in vitro* абсолютное и относительное содержание лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов цитотоксическим тестом, методом розеткообразования, люминесцентным методом с помощью моноклональных антител к поверхностным маркерам клеток, фагоцитарную активность микро- и макрофагов, функциональную активность Т- и В-лимфоцитов, содержание в сыворотке иммуноглобулинов и специфических антител. Предлагается также критерий оценки повреждающего действия вакцин на гематологические показатели, в целом на стволовые кроветворные клетки в тестах определения эндо- и экзоколониобразования в селезенке. Однако известные методы анализа клеточного и гуморального иммунитета трудоемки требуют сложного специального оборудования и дорогостоящих реактивов.

Наиболее близким аналогом контроля реактогенности и иммунологической эффективности вакцин для млекопитающих и птиц является иммуноморфологическое исследование [3, 4], которое направлено на установление иммуноморфологических и иммунопатологических изменений в месте введения вакцины, центральных (красный костный мозг, тимус, клоакальная bursa у птиц) и периферических (селезенка, лимфоузлы, лимфоидная ткань органов пищеварения, дыхания, кожи, железа третьего века и слезная железа у птиц) органах иммунитета. При этом объектами исследования являются кусочки органов и тканей, полученные от лабораторных и интактных животных в разные сроки после вакцинации. Кусочки органов фиксируют в жидкости Карнуа, 10%-ном растворе нейтрального формалина. Зафиксированный материал подвергают уплотнению путем заливки в парафин по общепринятой методике, а также замораживанием [6, 9, 10]. Гистологические срезы кусочков органов, залитых в парафин, готовят на санном и роторном (маятниковом) микротоме. После депарафинирования гистосрезы окрашивают гематоксилин-эозином по Брассе.

При изучении костного мозга наряду с оценкой миелограммы выводят парциальные формулы различных групп кроветворных клеток. В тимусе и клоакальной бурсе определяют абсолютные размеры коркового и мозгового вещества долек тимуса и лимфоидных узелков бursы, площадь элементов стромы и паренхимы. Для объективной оценки характера изменений в месте введения вакцины и в периферических органах иммунной системы птиц определяют содержание Т- и В-лимфоцитов, лимфо- и плазмобластов, незрелых и зрелых плазмочитов, митозов, подсчитывают число и размеры лимфоидных узелков.

Следует отметить, что применение данного способа позволяет установить структурные изменения только на уровне иммунной системы. Однако

морфологические изменения в неиммунных органах, сопровождающие вакцинный процесс, изучены недостаточно. Наряду с этим известно, что вакцины, попадая во внутреннюю среду, наряду с иммунобиологической перестройкой вызывают комплекс адаптационных реакций, отражающих кратковременное расстройство гомеостаза. Вакцинный процесс, обусловленный введением специфических биопрепаратов, является отражением сложного по характеру взаимодействия макроорганизма и антигена и не ограничивается только изменениями со стороны иммунной системы. Практически все органы и системы организма участвуют в создании особого состояния – иммунологической перестройки [1, 2, 5]. Поэтому изучение морфологических изменений в неиммунных органах птиц при вакцинации является одним из критериев оценки остаточной реактогенности биопрепарата.

Цель и задачи исследований

Целью наших исследований явилось изучение морфологических изменений в паренхиматозных органах молодняка кур при парентеральной ассоциированной иммунизации против ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционной бурсальной болезни (ИББ) и синдрома снижения яйценоскости (ССЯ).

Объекты и методика исследований

В опыте было использовано 400 птиц 110–дневного возраста, подобранных по принципу аналогов и разделённых на 2 группы по 200 птиц в каждой. Молодняк кур 1 (опытной) группы иммунизировали против НБ, ИБК, ИББ и ССЯ жидкой инактивированной эмульсин–вакциной, разработанной в ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси. Вакцину вводили согласно инструкции по ее применению, в 110-дневном возрасте, однократно, внутримышечно, в область грудных мышц, в дозе 0,5 мл. Интактная птица 2 группы служила контролем. За всей птицей было установлено клиническое наблюдение. На 3, 7, 14, 21 и 28 дни после вакцинации по 4-5 птиц из каждой группы убивали. Для морфологических исследований от птиц отбирали кусочки печени, почек, поджелудочной железы, щитовидной железы и надпочечников.

Для гистологического исследования кусочки органов фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, жидкости Карнуа, 96% этиловом спирте, надсмольной воде (жидкость НВ). Зафиксированный материал подвергали уплотнению путем заливки в парафин по общепринятой методике [8]. Срезы готовили на санном микротоме, депарафинировали в ксилоле и спирте, окрашивали гематоксилин–эозином и по Браше, просветляли и заключали в бальзам [8, 9]. Гистологические и иммуноморфологические исследования проводили с помощью светового микроскопа «БИОМЕД-6» (Россия). Полученные данные документированы микрофотографированием с использованием цифровой системы считывания и ввода видеоизображения

«ДСМ-510», а также программного обеспечения по вводу и предобработке изображения «ScopePhoto».

Кусочки печени и почек, предназначенные для сканирующей электронной микроскопии, отмывали фосфатным буфером с $\text{pH}=7,3$ при $t=37^{\circ}\text{C}$, а затем фиксировали 10%-ным нейтральным формалином [10, 12]. Обезвоживание материала проводили в спиртах возрастающей концентрации, а высушивание – на воздухе. Высушенные кусочки хранили в эксикаторе с силикагелем. Напыление золотом проводили в вакуумной камере. Изучение объектов проводили в сканирующем (растровом) электронном микроскопе «LEO 1420» (Германия) с ускоряющим напряжением 20 кВ и максимальной разрешающей способностью 10 нм. Для визуализации изображения, микроморфометрии и микрофотосъемки использовали программно-аппаратный комплекс «SEM SYSTEM LEO 32» (Германия). Цифровые данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Excel 2003.

Результаты исследований

Установлено, что в печени вакцинированных птиц на 3 и 7 дни эксперимента выявлялась зернистая дистрофия отдельных гепатоцитов. В части печеночных долек регистрировали мелкокапельную жировую дистрофию, застойные явления. В области триад и в дольках выявлялись диффузные и очаговые скопления лимфоидно-макрофагально-плазмноклеточные инфильтраты и гранулемы (рисунки 1; 2). На 14 день эксперимента в междольковой соединительной ткани и печеночных дольках происходило формирование лимфоидных узелков. В дольках выявлялись признаки зернистой и жировой дистрофии, умеренный серозный отек. В отдаленные сроки (на 21 и 28 дни эксперимента) у иммунизированных птиц наблюдалось постепенное восстановление паренхимы печени.

В поджелудочной железе птиц опытной группы на 3 день эксперимента отмечались признаки вакуольной дистрофии отдельных glanduloцитов. На 7 и 14 дни после вакцинации в междольковой соединительной ткани регистрировалась выраженная лимфоидно-макрофагальная инфильтрация. В интерстиции железы обнаруживались многочисленные лимфоидные узелки крупных размеров (рисунки 3; 4). В этот срок исследований наблюдалось полное восстановление паренхимы органа. В другие сроки исследований в поджелудочной железе молодняка кур 1 и 2 групп существенных структурных изменений не обнаруживалось.

В почках вакцинированного молодняка кур на 3 день эксперимента обнаруживалась зернистая дистрофия отдельных эпителиоцитов мочеобразующих канальцев. На 7 и 14 дни структура эпителия канальцев постепенно приходила в норму. В интерстициальной соединительной ткани формировались очаговые скопления лимфоцитов и гистиоцитов, а также

единичные лимфоидные узелки. В отдаленные сроки (на 21 и 28 дни опыта) структурные изменения в почках подопытных птиц не выявлялись.

В щитовидной железе молодняка кур 1 группы на 3 и 7 дни после иммунизации отмечалось постепенное замедление резорбции коллоида, что приводило к его накоплению и уплотнению, появлению расширенных фолликулов с признаками деструкции. Межфолликулярная соединительная ткань была инфильтрирована небольшим количеством лимфоцитов и гистиоцитов. К 14 дню после вакцинации на периферии органа преобладали средние и крупные фолликулы удлинено неправильной формы, заполненные гомогенным коллоидом, и выстланные изнутри уплощенными тироцитами. Здесь же выявлялись лакунообразные зоны деструкции фолликулов, заполненные клеточным детритом, лимфоцитами и макрофагами. Интерстициальная ткань была инфильтрирована лимфоцитами, макрофагами и единичными фибробластами. В центральной зоне железы преобладали мелкие и средние фолликулы с вакуолизированным коллоидом.

На 21 и 28 дни опыта происходило нарастание компенсаторно-приспособительных и восстановительных процессов. При этом клеточный детрит на месте разрушенных фолликулов утилизировался макрофагами, в межфолликулярной соединительной ткани отмечалась пролиферация фибробластов. В паренхиме железы появлялись мелкие новообразованные фолликулы.

При исследовании надпочечников птиц опытной группы было установлено, что иммунизация птиц против ИББ вызвала выраженную морфологическую перестройку паренхимы и иммунного аппарата железы. При этом на 3 день эксперимента наблюдалась выраженная гипертрофия эпителиоцитов кортикальных тяжей. Иммуноморфологические реакции проявлялись обширной клеточной инфильтрацией стромы органа. В составе инфильтрата преобладали лимфобласты, плазмобласты, лимфоциты, гистиоциты. На 7 и 14 дни эксперимента паренхима надпочечников обильно инфильтрировалась зрелыми и бластными формами лимфоцитов, гистиоцитами, а также плазматическими клетками разной степени зрелости. В интерстициальной ткани появлялись многочисленные лимфоидные узелки. Отмечено постепенное ослабление гипертрофии кортикальных тяжей. На 21 и 28 дни после вакцинации в глубине капсулы органа выявлялись единичные лимфоидные узелки, а также диффузные скопления лимфоцитов.

При сканирующей электронной микроскопии препаратов печени рисунок среди элементов паренхимы выделялись печеночные трубки, имеющие извилистый ход, а также синусоидные капилляры с кровью.

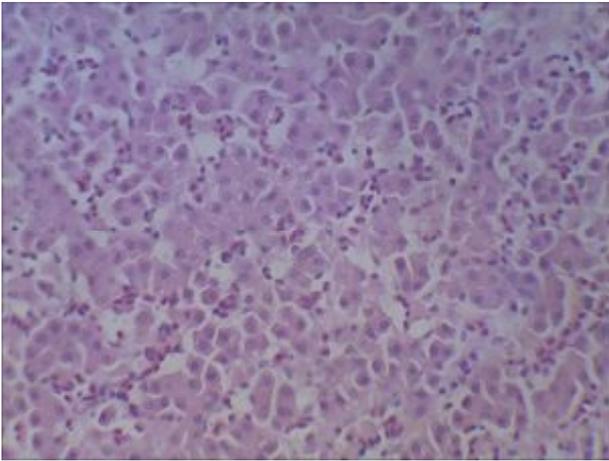


Рисунок 1. Гепатоциты в печени интактного молодняка кур 133-дневного возраста без структурных отклонений. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Микрофото. Ув.: x 480

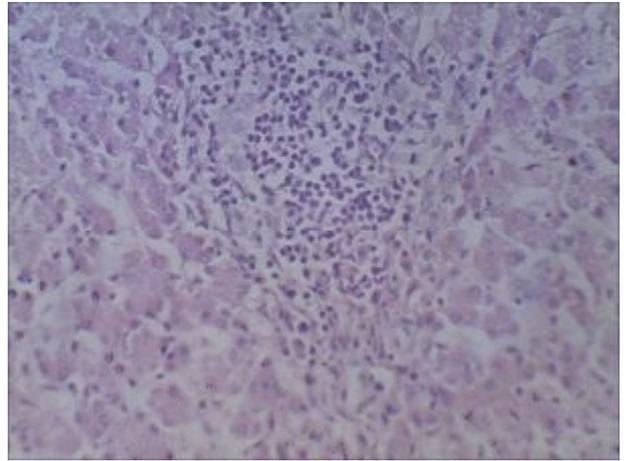


Рисунок 2. Мелкокапельная жировая дистрофия отдельных гепатоцитов в печени птиц опытной группы. В дольках выявляются скопления лимфоцитов и макрофагов. 3 день после вакцинации. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Микрофото. Ув.: x 480

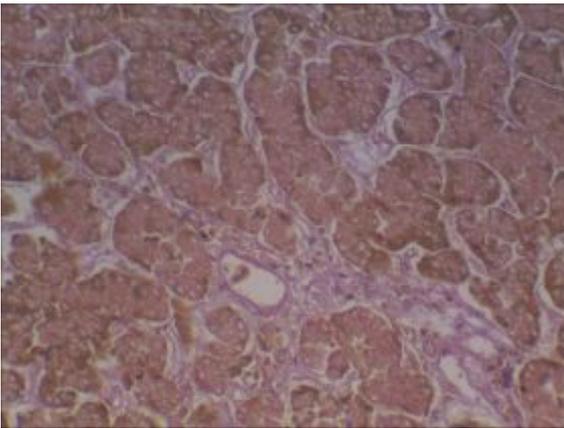


Рисунок 3. Нормальная структура ацинусов поджелудочной железы птиц 2 группы (контроль). 14 день эксперимента. Метод Генденгайна. Биомед-6. Микрофото. Ув.: x 480

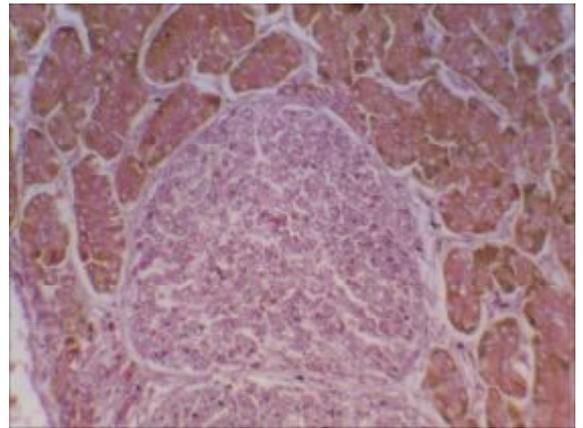


Рисунок 4. Формирование лимфоидных узелков в поджелудочной железе молодняка кур 1 группы. 14 день после вакцинации. Метод Генденгайна. Биомед-6. Микрофото. Ув.: x 480

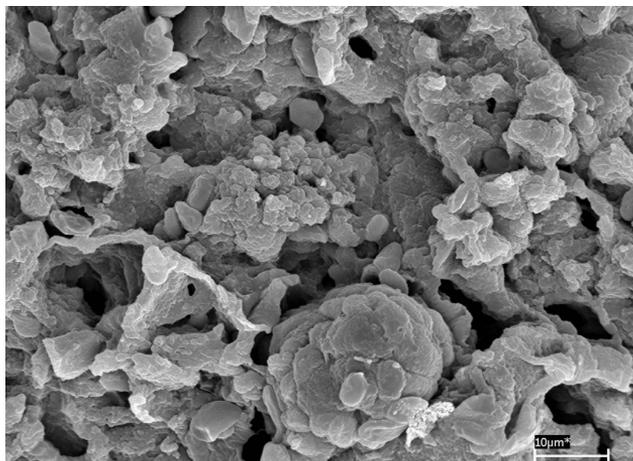


Рисунок 5. Нормальное состояние мочеобразующих канальцев в почках интактного молодняка кур 133-дневного возраста. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 700

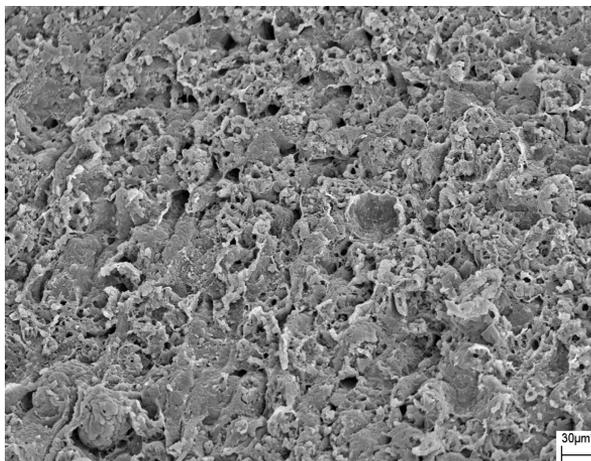


Рисунок 6.12. Нарушение структуры мочеобразующих канальцев в почках птиц на 3 день после вакцинации против ИБК. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 200

Границы между гепатоцитами и эндотелиоцитами были нечеткими. Гепатоциты и эндотелиальные клетки имели многочисленные выпячивания плазмолеммы различной высоты. Иммунизация молодняка кур против НБ, ИБК, ИББ и ССЯ приводила к незначительной отечности гепатоцитов и клеток Купфера на 3 и 7 дни опыта.

В препаратах почек основные структурные компоненты паренхимы и стромы просматривались достаточно хорошо. Сосудистые клубочки представляли шаровидные структуры с выраженной капиллярной сетью. Мочеобразующие канальцы имели примерно одинаковую толщину и просвет. При большом увеличении в нефроцитах обнаруживались многочисленные выпячивания и складки плазмолеммы. В тонких прослойках соединительной ткани выявлялись тонкие, светлые пучки коллагеновых волокон и капилляры, выстланные уплощенными эндотелиальными клетками. Здесь же присутствовали единичные лимфоциты и макрофаги.

В почках кур подопытной группы на 3 и 7 дни эксперимента отмечалось набухание нефроцитов, разрыв отдельных клеток на фрагменты. При этом канальцы теряли свои очертания (рисунки 5; 6).

Выводы и перспективы дальнейших исследований

1. Иммуноморфологические реакции в печени птиц в ответ на введение жидкой инактивированной эмульсин–вакцины против НБ, ИБК, ИББ и ССЯ характеризуются выраженной макрофагальной, лимфоидной и плазмноклеточной инфильтрацией долек и междольковой соединительной ткани с появлением гранулем, а также формированием узелковой лимфоидной ткани. Применение

указанной вакцины обуславливает также развитие в печени непродолжительных патоморфологических изменений, которые проявляются зернистой и мелкокапельной жировой дистрофией отдельных гепатоцитов.

2. В поджелудочной железе вакцинированных птиц развиваются непродолжительная вакуольная дистрофия панкреатитов, а также выраженные иммуноморфологические изменения в виде лимфоидно–макрофагальной инфильтрацией органа с образованием лимфоидных узелков.

3. Применение инактивированной вакцины против НБ, ИБК, ИББ и ССЯ вызывает в почках птиц развитие лимфоидно–макрофагальной реакции, формирование узелковой лимфоидной ткани, а также непродолжительной зернистой дистрофии эпителия мочеобразующих канальцев.

4. Под влиянием компонентов вакцины в щитовидной железе молодняка кур происходила значительная структурная перестройка, сопровождающаяся коллоидной дистрофией, появлением крупных уродливых фолликулов, формированием единичных лакунообразных структур на месте комплекса разрушающихся фолликулов, фагоцитозом некротического детрита, развитием компенсаторно–приспособительных и восстановительных процессов.

5. Морфологические изменения в надпочечниках иммунизированного молодняка кур характеризуются кратковременной гипертрофией эпителиальных клеток кортикальных тяжей, лимфоидно–макрофагальной реакцией, плазматизацией паренхимы и стромы, формированием узелковой лимфоидной ткани.

6. Результаты гистологического исследования печени и почек подтверждаются данными сканирующей электронной микроскопии.

Изучение структурных изменений паренхиматозных органов в комплексе с иммуноморфологическими исследованиями позволяет дать наиболее объективную и точную оценку и реактогенности разрабатываемых и внедряемых в производство вакцин.

Литература

-
1. *Болотников И. А.* Стресс и иммунитет у птиц / *И. А. Болотников, В. С. Михкиева, Е. К. Олейник.* – Л.: Наука, 1983. – 118 с.
 2. *Болотников И. А.* Иммунология. Иммунитет. Иммунологические реакции / *И. А. Болотников, Н. А. Добротина, С. Н. Лызлова.* – Петрозаводск, 1989. – 94 с.
 3. *Громов И. Н.* Морфология иммунной системы птиц при вакцинации против вирусных болезней / *И. Н. Громов.* – Витебск : ВГАВМ, 2010. – 286 с.
 4. *Жаков М. С.* Иммуноморфология и иммунопатология: метод. указания / *М. С. Жаков, В. С. Прудников.* – Витебск : ВВИ, 1992. – 37 с.
 5. *Конопатов Ю. В.* Основы иммунитета и кормление сельскохозяйственной птицы / *Ю. В. Конопатов, Е. Е. Макеева.* – Санкт–Петербург: Петролазер, 2000. – 120 с.

6. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия / *Р. Лилли*; под ред. *В. В. Португалова*; пер. с англ. *И. Б. Краснов* [и др.]. – М.: Мир, 1969. – С. 577–592.

7. *Медуницин Н. В.* Побочное действие вакцин / *Н. В. Медуницин* // Иммунология. – 1995. – № 2. – С. 6–8.

8. *Медуницин Н. В.* Вакцинология / *Н. В. Медуницин*. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Триада-Х, 2004. – С. 177–185.

9. *Меркулов Г. А.* Курс патогистологической техники / *Г. А. Меркулов*. – Л.: Медицина, 1969. – С. 234–240.

10. Микроскопическая техника: Руководство / *Д. С. Саркисов* [и др.]; под ред. *Д. С. Саркисова, Ю. Л. Петрова*. – М.: Медицина, 1996. – С. 453–473.

11. *Сергеев В. О.* Вирусы и вирусные вакцины / *В. О. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер*. – М.: Библионика, 1997. – С. 217–220.

12. *Уикли Б. С.* Электронная микроскопия для начинающих / – *Б. С. Уикли* под ред. *В. Ю. Полякова*; пер. с англ. *И. В. Викторова*. – М.: Мир, 1975. – С. 223–234.
