

Евгения Геннадьевна Турицына

Красноярский государственный аграрный университет, профессор кафедры анатомии, патологической анатомии и хирургии, доктор ветеринарных наук, доцент, Красноярск, Россия

E-mail: turitsyna@mail.ru

Галина Владимировна Макарская

Институт вычислительного моделирования СО РАН, старший научный сотрудник отдела технологического мониторинга природной среды, кандидат биологических наук, Красноярск, Россия

E-mail: mgv@icm.krasn.ru

Светлана Вениаминовна Тарских

Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр СО РАН», ведущий инженер сектора иммунологии, Красноярск, Россия

E-mail: s.tarskikh@inbox.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК КРОВИ ПЕРЕПЕЛОВ И КУР ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

В статье описаны результаты хемилюминесцентного анализа клеток крови перепелов и кур, находящихся в различных функциональных состояниях. Изучена спонтанная и антигениндуцированная in vitro частицами латекса люцигенин- и люминолзависимая хемилюминесценция клеток крови птицы суточного возраста, в период роста, в начале и на пике яйцекладки. Вследствие разной скороспелости возраст функциональной нагрузки у кур и перепелов отличался. Определена амплитуда максимальной активности хемилюминесценции (ХЛ); время достижения максимума; суммарные объемы радикалов; индекс активации. Установлено, что у кур и перепелов в клетках крови преобладает продукция люцигенинзависимых свободных радикалов в спонтанном и активированном состоянии. Свободнорадикальные процессы у перепелов, особенно при спонтанной хемилюминесценции, протекают в 2–6 раз медленнее, чем у кур. Функциональное напряжение организма в разгар яйцекладки инициирует образование максимальных объемов активных форм кислорода как в состоянии покоя, так и при антигенной стимуляции клеток частицами латекса, что характеризует высокую активность прооксидантных систем и снижение уровня антиоксидантной защиты организма. Высокие значения индекса активации у перепелов во все периоды исследования, кроме суточного возраста, свидетельствуют о значительных потенциальных способностях клеток крови к генерации свободных радикалов в ответ на антигенное раздражение, что, вероятно, является одной из причин высокой устойчивости перепелов к инфекционным заболеваниям. Полученные данные дополняют сведения о кислородном метаболизме и механизмах неспецифической резистентности организма сельскохозяйственной птицы при разных функциональных нагрузках и имеют теоретическое и прикладное значение в ветеринарии и птицеводстве.

Ключевые слова: хемилюминесценция, клетки крови, перепела, куры, свободные радикалы кислорода, люцигенин, люминол.

Evgeniya G. Turitsyna

Krasnoyarsk State Agrarian University, Professor at the Department of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: turitsyna@mail.ru

Galina V. Makarskaya

Institute of Computational Modeling SB RAS, Senior Researcher, Department of Environmental Monitoring Technologies, Candidate of Biological Sciences, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: mgv@icm.krasn.ru

Svetlana V. Tarskikh

International Scientific Center for Research of Extreme States of the Organism of the FRC "Krasnoyarsk Scientific Center of the SB RAS", Leading Engineer at the Immunology Sector, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: s.tarskikh@inbox.ru

QUAILS AND HENS' BLOOD CELLS CHEMILUMINESCENCE COMPARATIVE EVALUATION UNDER DIFFERENT PHYSIOLOGICAL STATES

The paper describes the results of chemiluminescence analysis of blood cells of quails and chickens in different functional states. The spontaneous and antigeninduced in vitro lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood cells of birds of day-old age, during growth, at the beginning and at the peak of oviposition, was studied. Due to different early maturity, the age of functional load in chickens and quails was different. The amplitude of the maximum activity of chemiluminescence (CL) was determined; time to peak; total volumes of radicals; activation index. It was found that in chickens and quails, the production of lucigenin-dependent free radicals in a spontaneous and activated state predominates in blood cells. Free radical processes in quails, especially with spontaneous chemiluminescence, proceed 2–6 times slower than in chickens. The functional tension of the body in the midst of oviposition initiates the formation of maximum volumes of reactive oxygen species both at rest and during antigenic stimulation of cells with latex particles, which characterizes the high activity of prooxidant systems and a decrease in the level of antioxidant defense of the body. High values of the activation index in quails in all periods of the study, except for the day-old age, indicate significant potential abilities of blood cells to generate free radicals in response to antigenic irritation, which is probably one of the reasons for the high resistance of quails to infectious diseases. The obtained data supplement the information on oxygen metabolism and mechanisms of nonspecific resistance of the poultry organism at different functional loads and have theoretical and applied significance in veterinary medicine and poultry farming.

Key words: chemiluminescence, blood cells, quail, chickens, oxygen free radicals, lucigenin, luminol.

Введение. Одной из наиболее востребованных и наукоемких отраслей животноводства в Российской Федерации является птицеводство, позволяющее внести значительный вклад в обеспечение продовольственной безопасности страны [1]. Большое распространение в птицеводстве получило промышленное содержание кур и перепелов. Оба вида птиц относятся к отряду куриных и имеют сходное строение внутренних органов, однако отличаются размерами, температурой тела, скороспелостью, периодом инкубации и яичной продуктивностью [2]. Считается, что вследствие высокой температуры тела и значительной интенсивности обменных процессов перепела более устойчивы к инфекционным заболеваниям и воздействию многочисленных стрессов.

Промышленное содержание птицы связано с многочисленными стрессами, способными

инициировать развитие свободнорадикальных патологий. При слабом стрессе образование свободных радикалов находится под контролем антиоксидантной системы. При действии сильного и продолжительного стресса количество свободных радикалов нарастает, что ведет к метаболическому дисбалансу и, как следствие, повреждению клеток, проблемам роста, развития и продуктивности птицы [3]. Для предотвращения развития окислительного стресса у сельскохозяйственных птиц предлагается использовать антиоксиданты [4]. В этой связи становится актуальной оценка уровня продукции свободных радикалов в организме птиц и выявление межвидовых отличий при различных функциональных нагрузках с помощью современных методов диагностики.

Цель исследований. Дать сравнительную оценку свободнорадикальных процессов у перепелов и кур при различных функциональных состояниях.

Задачи исследований: изучение хемиллюминесцентной кинетики (ХЛ) спонтанной и антигениндуцированной *in vitro* частицами латекса генерации люцигенин- и люминолзависимых свободных радикалов клетками крови кур и перепелов суточного возраста, в период роста, в начале и на пике яйцекладки.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на базе сектора иммунологии Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма при Президиуме ФИЦ КНЦ СО РАН. Объектом исследований являлись куры яичного кросса «Декалб» и японские перепела. Материалом для исследований служила венозная кровь птицы при различных физиологических состояниях – сразу после вылупления, в период роста, в начале яйцекладки и на пике яйцекладки. Вследствие разной скороспелости птицы возраст периода роста у кур составил 60–65 суток, у перепелов 25–30 суток; начало яйцекладки у кур – 110–120 суток, у перепелов – 45–50 суток; пик яйцекладки у кур – 270 суток, у перепелов – 180 суток. Всего исследовано 56 образцов крови кур и 38 крови перепелов.

Кинетику свободнорадикальных процессов изучали с помощью хемиллюминесцентного анализа по методу Топо Оке N.V. et al. в модификации Makarskaya G.V. et al. для клеток крови птиц [5]. Исследовали спонтанную и активированную *in vitro* частицами латекса генерацию свободных радикалов клетками крови. Для усиления ХЛ-реакции использовали люцигенин (специфичный в отношении супероксиданиона $O_2^{\cdot-}$) и люминол ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , $HClO^{\cdot-}$), обладающие избирательностью в отношении первичных и вторичных активных форм кислорода (АФК). Определены амплитуда максимальной активности (I_{max} , имп/с); время достижения максимума (T_{max} , мин); суммарные объемы радикалов, продуцированных клетками в течение ХЛ-реакции (S , имп. за 90 мин); индекс активации ($IA = S_{акт}/S_{спонт}$, усл. ед.).

Статистическая обработка цифровых данных проведена методом вариационной статистики с помощью программ MS Excel 2010. Межвидовые различия параметров ХЛ считали достоверными при $P \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Интенсивность ХЛ-реакции у птиц зависела от усилителя хемиллюминесценции. При использовании люцигенина амплитуда реакции в 5–13 раз превышала показатели люминолусиленной реакции как у перепелов, так и у кур при разных физиологических состояниях (рис. 1). Спонтанная продукция АФК характеризовалась более низкими показателями, чем генерация радикалов при активировании клеток частицами латекса ($P \leq 0,05$). Эти результаты согласуются с данными других авторов [6]. Помимо общих признаков кинетика свободнорадикальных процессов у перепелов и кур имела видовые отличия.

У суточных перепелов интенсивность спонтанного и активированного образования радикалов при спонтанной и активированной люцигенинзависимой ХЛ составила $91,8 \pm 8,6$ имп/с и $381,0 \pm 107,4$ имп/с. соответственно, что в 5–7 раз меньше, чем у суточных цыплят ($P \leq 0,001$). Это может быть связано с высоким относительным содержанием лимфоцитов в крови перепелов первых дней жизни, в то время как у суточных цыплят в крови преобладают гранулоцитарные лейкоциты, являющиеся основным источником свободных радикалов [7].

В период роста у перепелов показатели I_{max} выросли, а у цыплят – сократились относительно исходных данных (рис. 1). С началом половой зрелости активность генерации АФК начала расти и достигла максимальных величин в разгар яйцекладки. У перепелов показатели продукции люцигенинзависимых радикалов при активированной и спонтанной ХЛ превысили исходные показатели в 14 и 42 раза соответственно ($P \leq 0,001$). У кур активность образования АФК была менее интенсивна и показатели I_{max} выросли не более чем в два раза относительно исходных величин ($P \leq 0,05$).

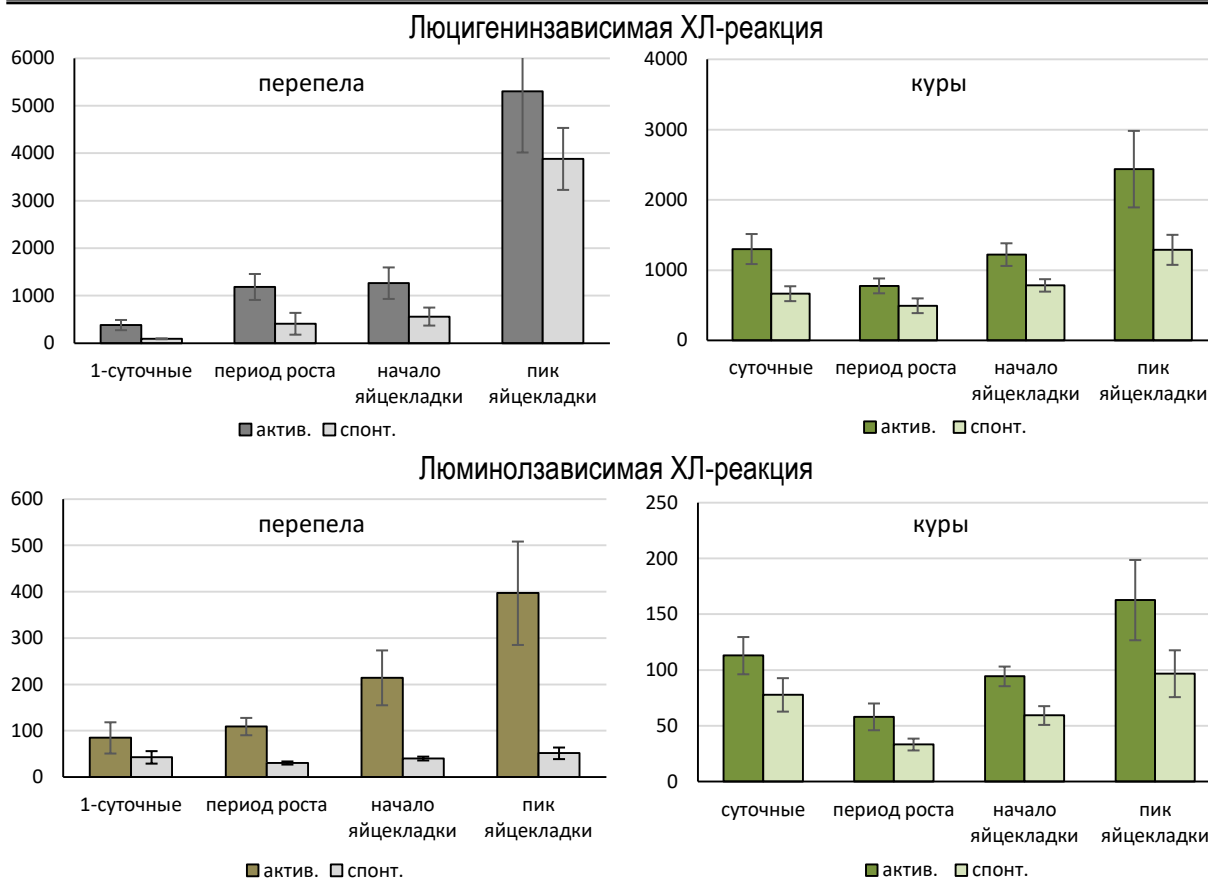


Рис. 1. Максимальная интенсивность активированной и спонтанной продукции АФК (I_{max} , имп/с) клетками крови перепелов и кур в разных функциональных состояниях по люцигенин- и люминолзависимой хемилюминесценции

Образование люминолзависимых радикалов антиген-активированными клетками крови у перепелов постоянно росло и достигло максимальных величин на пике яйцекладки (рис. 1). У молодняка кур показатели I_{max} в период роста сократились почти в 2 раза относительно исходных величин; в начале половой зрелости наблюдался рост показателей и в разгар яйцекладки интенсивность активированной реакции у кур составила 163 ± 36 имп/с, что в два раза меньше ($P \leq 0,05$), чем у перепелов, при таком же функциональном состоянии организма. При этом активность спонтанной люминолзависимой ХЛ-реакции у кур во все периоды исследований почти в 2 раза превышала показатели перепелов.

Суммарная продукция почти всех видов АФК клетками крови суточных перепелов и цыплят не имела достоверных отличий. Исключение составила спонтанная генерация люцигенинзависимых радикалов, которая у цыплят более чем в 2

раза превысила показатели перепелов ($P \leq 0,05$). В период роста светосумма всех видов АФК при активированной ХЛ-реакции у перепелов в 2–3 раза превысила показатели кур ($P \leq 0,01$). Достоверных межвидовых отличий в объемах спонтанной продукции АФК не установлено.

Начало яйцекладки привело к активизации свободнорадикальных процессов как при спонтанной, так и антиген-индуцированной продукции. Несмотря на большую разницу объемов люцигенинзависимых радикалов у перепелов и кур, цифровые данные не обладали статистической достоверностью вследствие значительной вариабельности полученных значений. При активированной люминолзависимой ХЛ суммарная генерация АФК клеток крови у перепелов в 3 раза превысила показатели кур и составила $410,2 \pm 118,3 \times 10^3$ имп. за 90 мин ($P \leq 0,05$). Показатели спонтанной продукции люминолзависимых АФК у перепелов почти на 33 % выше, чем у кур аналогичного состояния (табл.).

**Суммарная продукция люцигенин- и люминолзависимых АФК
при активированной и спонтанной хемилюминесценции клеток крови
перепелов и кур при разных функциональных состояниях, S имп. за 90 мин $\times 10^6$**

Физиологическое состояние организма	Люцигенинзависимая ХЛ		Люминолзависимая ХЛ	
	Активирован.	Спонтанная	Активирован.	Спонтанная
Перепела				
Суточные	1,29±0,31	0,29±0,24*	0,19±0,06	0,11±0,05
Период роста	2,78±0,52**	1,61±0,94	0,29±0,06**	0,09±0,02
Начало яйцекладки	3,18±0,83	2,04±0,76	0,41±0,18*	0,12±0,02
Пик яйцекладки	18,50±4,68**	11,53±3,74*	1,30±0,45*	0,13±0,04
Куры				
Суточные	1,53±0,19	0,65±0,11*	0,15±0,02	0,09±0,01
Период роста	1,24±0,16**	1,29±0,38	0,10±0,02**	0,06±0,01
Начало яйцекладки	1,77±0,22	1,71±0,22	0,14±0,01*	0,09±0,01
Пик яйцекладки	2,84±0,70**	2,37±0,52*	0,20±0,05*	0,15±0,05

* – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$ разница между показателями перепелов и кур аналогичного физиологического состояния.

В разгар яйцекладки продукция всех видов свободных радикалов у птиц достигла максимальных объемов. Показатели люцигенинзависимой ХЛ-реакции у перепелов превысили светосумму АФК у кур при спонтанной продукции в 5 раз ($P \leq 0,05$) и при активированной – в 6,5 раза ($P \leq 0,01$). Объемы радикалов при люминолзависимой активированной ХЛ у перепелов в 6,6 раза больше, чем у кур ($P \leq 0,05$). Результаты спонтанной люминолзависимой ХЛ указывали на отсутствие достоверных межвидовых различий и слабое влияние физиологического состояния на суммарную генерацию вторичных АФК, что, возможно, является особенностью свободнорадикальных процессов у птиц.

Объективным показателем ХЛ-реакции является индекс активации, который указывает на потенциальные способности клеток крови отве-

чать на антигенные раздражения генерацией «респираторного взрыва». У кур физиологическое состояние организма почти не влияло на индекс активации клеток при генерации люминолзависимых радикалов (рис. 2, А). При продукции люцигенинзависимых АФК минимальные показатели зафиксированы в начале и на пике яйцекладки (рис. 2, Б), что могло свидетельствовать о низком уровне неспецифической защиты организма кур в эти периоды жизни.

Индекс активации при образовании люминолзависимых АФК у суточных перепелов не отличался от показателей цыплят, в период роста и начале яйцекладки увеличился и на пике яйцекладки поднялся до максимальных величин, превысив показатели взрослых кур в 4,5 раза ($P \leq 0,01$).

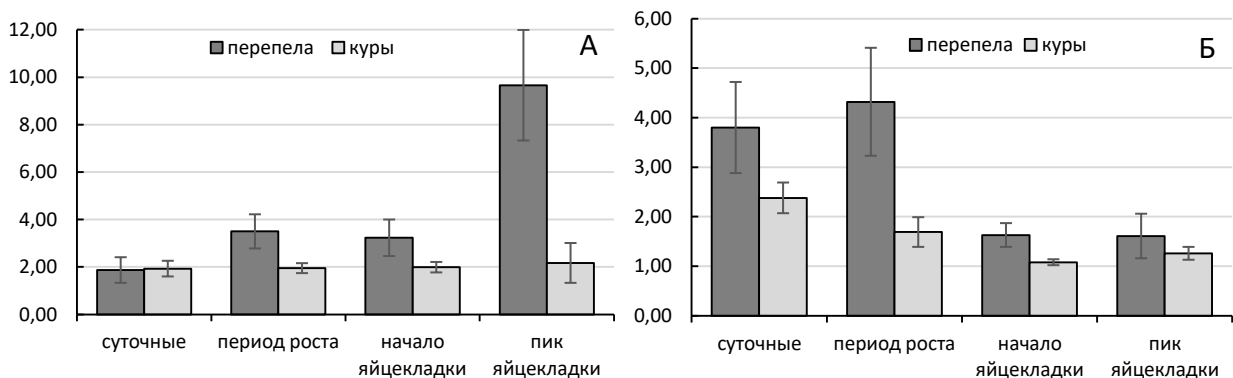


Рис. 2. Индекс активации клеток крови перепелов и кур при люминол- (А) и люцигенинзависимой (Б) хемилюминесценции при различных функциональных состояниях организма, усл. ед.

Индекс активации клеток крови при генерации люцигенинзависимых АФК у суточных перепелов (рис. 2, Б) превысил данные цыплят почти на 60 %, а в период роста – в 2,6 раза ($P \leq 0,05$). С началом полового созревания и в разгар яйцекладки показатель люцигенинзависимых АФК у перепелов сократился в 2,3–2,7 раза относительно предыдущих величин ($P \leq 0,05$), но не имел достоверных отличий от параметров хемилюминесценции клеток кур.

Время наступления максимума хемилюминесценции (T_{max} , мин) демонстрирует период, за который клетки достигают наибольшей продукции свободных радикалов. При активированной люминолзависимой ХЛ достоверные отличия параметров T_{max} между перепелами и курами установлены в разгар яйцекладки – 38 и 11 мин соответственно ($P \leq 0,001$).

При спонтанной генерации люминолзависимых АФК у суточных перепелов параметры T_{max} в 5,2 раза превышали показатели суточных цыплят ($P \leq 0,05$), в период роста – в 6,5 раза ($P \leq 0,001$), в начале полового созревания – в 2,9 раза ($P \leq 0,01$), в разгар яйцекладки – в 1,6 раза.

Время достижения максимума активированной люцигенинзависимой ХЛ у кур составляло 12–13 мин. У перепелов минимальные величины T_{max} отмечены в начале яйцекладки (13 мин), максимальные – на пике яйцекладки (43 мин), что в 3,5 раза выше, чем у кур ($P \leq 0,001$).

При спонтанной генерации люцигенинзависимых радикалов время достижения максимума ХЛ у кур колебалось от 11 до 22 мин. У перепелов минимальные величины T_{max} отмечены у суточных перепелов (30 мин), максимальные – в начале и на пике яйцекладки (82 и 72 мин соответственно). Во все периоды исследования T_{max} у перепелов при спонтанной продукции люцигенинзависимых АФК превышало показатели кур: у суточной птицы – в 3 раза ($P \leq 0,05$); в период роста – 2 раза ($P \leq 0,05$); в начале яйцекладки – почти в 6 раз ($P \leq 0,001$); на пике яйцекладки – в 5 раз ($P \leq 0,001$).

Выводы. Свободнорадикальные процессы, протекающие в клетках крови кур и перепелов, характеризуются преобладанием генерации люцигенинзависимых кислородных радикалов в спонтанном и активированном состоянии независимо от физиологических нагрузок.

Процессы спонтанного образования радикалов в клетках крови перепелов, особенно при спонтанной хемилюминесценции, протекают в 2–6 раз медленнее, чем у кур, на что указывают высокие показатели времени достижения максимума ХЛ.

Функциональное напряжение организма птиц в разгар яйцекладки инициирует образование максимальных объемов АФК как в состоянии покоя клеток, так и при их антигенной стимуляции латексом, что характеризует высокую активность прооксидантных систем и снижение уровня антиоксидантной защиты организма.

Высокие значения индекса активации у перепелов во все периоды исследования, кроме суточного возраста, свидетельствуют о значительных потенциальных способностях клеток крови к генерации свободных радикалов в ответ на антигенное раздражение, что, вероятно, является одной из причин высокой устойчивости перепелов к инфекционным заболеваниям.

Полученные данные дополняют сведения о кислородном метаболизме и механизмах неспецифической резистентности организма сельскохозяйственной птицы при разных функциональных нагрузках и имеют теоретическое и прикладное значение в ветеринарии и птицеводстве.

Список источников

1. Буяров А.В., Буяров В.С. Роль отрасли птицеводства в обеспечении продовольственной безопасности России // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2020. № 7. С. 84–95.
2. Азарнова Т.О., Попова В.А., Найденский М.С. и др. Эффективность реализации антиоксидантного и обменостимулирующего действия глутатиона в промышленном перепеловодстве // Ветеринарный фармакологический вестник. 2020. № 3. С. 70–80.
3. Мифтахутдинов А.В. Экспериментальные подходы к диагностике стрессов в птицеводстве // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 2. С. 20–30.
4. Остапчук П.С., Зубоченко Д.В., Куевда Т.А. Роль антиоксидантов и использование их в животноводстве и птицеводстве (обзор) //

- Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2019. № 2. С. 103–117.
5. *Makarskaya G.V., Tarskikh G.V., Turitsyna E.G.* Luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of chicken whole-blood cells during postnatal ontogeny // *Russian Agricultural Sciences*. 2011. Vol. 37, № 3. PP. 254–257.
 6. *Лапкина Е.З., Макарская Г.В., Турранен Л.С.* Влияние травяной добавки на основе крапивы двудомной (*Urtica dioical.*) и звездчатки средней (*Stellaria medial.*) в кормлении японских перепелов на параметры генерации активных форм кислорода клетками их цельной крови // *Вестник КрасГАУ*. 2016. № 12. С.44–50.
 7. *Царев П.Ю.* Морфофункциональные особенности лейкоцитов крови кур и перепелов в постнатальном онтогенезе // *Вопросы прикладной морфологии и патологии животных: мат-лы научного семинара / Краснояр. гос. аграр. ун-т. Красноярск, 2017. С. 34–37.*
3. *Miftahutdinov A.V.* `Eksperimental'nye podhody k diagnostike stressov v pticevodstve // *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*. 2014. № 2. S. 20–30.
 4. *Ostapchuk P.S., Zubochenko D.V., Kuevda T.A.* Rol' antioksidantov i ispol'zovanie ih v zhivotnovodstve i pticevodstve (obzor) // *Agramaya nauka Evro-Severo-Vostoka*. 2019. № 2. S. 103–117.
 5. *Makarskaya G.V., Tarskikh G.V., Turitsyna E.G.* Luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of chicken whole-blood cells during postnatal ontogeny // *Russian Agricultural Sciences*. 2011. Vol. 37, № 3. PP. 254–257.
 6. *Lapkina E.Z., Makarskaya G.V., Tirranen L.S.* Vliyanie travyanoy dobavki na osnove krapivy dvudomnoj (*Urtica dioical.*) i zvezdchatki srednej (*Stellaria medial.*) v kormlenii yaponskih perepelov na parametry generacii aktivnyh form kisloroda kletkami ih cel'noj krvi // *Vestnik KrasGAU*. 2016. № 12. S.44–50.
 7. *Carev P.Yu.* Morfofunkcional'nye osobennosti lejkocitov krvi kur i perepelov v postnatal'nom ontogeneze // *Voprosy prikladnoj morfologii i patologii zhivotnyh: mat-ly nauchnogo seminaru / Krasnoyar. gos. agrar. un-t. Krasnoyarsk, 2017. S. 34–37.*

Preferenes

1. *Buyarov A.V., Buyarov V.S.* Rol' otrasli pticevodstva v obespechenii prodovol'stvennoj bezopasnosti Rossii // *Vestnik Kurskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii*. 2020. № 7. S. 84–95.
2. *Azamova T.O., Popova V.A., Najdenskij M.S.* i dr. `Effektivnost' realizacii antioksidantnogo i

