

Профилактика и коррекция гисто-биохимических нарушений у эмбрионов кур

Т.О. Азарнова, канд. биол. наук, С.Ю. Зайцев, докт. биол. наук, докт. хим. наук, М.С. Найденский, докт. сельхоз. наук, И.С. Ярцева, А.Е. Бобылькова

ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологий имени К.И. Скрябина»

Ключевые слова: биологическое окисление, инкубация, перекисное окисление липидов, развитие, стресс, цыплята

Сокращения: АТФ — аденозинтрифосфорная кислота, БАВ — биологически активные вещества, ДВ — действующее вещество, МДА — малоновый диальдегид, МТ — масса тела, ОШ — основания Шиффа, ПОЛ — перекисное окисление липидов, СОД — супероксиддисмутаза

Введение

В настоящее время в птицеводстве повсеместно применяют промышленную инкубацию. Однако, даже самые современные и дорогостоящие инкубаторы полностью не соответствуют всем особенностям эмбриогенеза птицы. Кроме того, в масштабах промышленной инкубации невозможно исключить сбоев в работе машины. Негативное действие на развитие эмбрионов оказывают и другие факторы: перенос яиц в выводные шкафы, их обработка антисептическими растворами, ошибки персонала на производстве и проч.

Недостатки инкубаториев влекут за собой патологические отклонения в метаболизме на уровне клеток, тканей, органов, в результате чего наблюдают дистрофические и диспластические изменения у эмбрионов. Как следствие, возрастают показатели отхода инкубации, вывод некондиционного молодняка, снижаются МТ цыплят, уровень их естественной резистентности, отмечают задержку роста. Все это приводит к значительному снижению рентабельности хозяйства, отрасли.

В основе указанных негативных явлений нередко лежит чрезмерная активизация свободно-радикальных процессов, значительное повышение интенсивности ПОЛ и дисбаланс обменных процессов. Среди наиболее значительных последствий нарушения метаболизма нужно указать патологию питания и дыхания тканей, вызывающую некрозы, изменение функциональной активности и чрезмерную активацию апоптоза клеток, в результате чего орган неправильно развивается, теряет возможность выполнять свою функцию в организме [1]. Дистрофические процессы в тканях обуславливают дисплазию органов у эмбриона, что в итоге отражается на проценте выводимости цыплят [2]. Аэрозольная обработка комплексом натуральных метаболитов — коламином, янтарной кислотой и миковитом (препарат «Рибав») — позволяет компенсировать и предотвратить данные процессы.

С учетом литературных данных и наших предыдущих исследований [1], мы пришли к выводу, что естественный метаболит — коламин может быть интересен для коррекции вышеописанного процесса. За счет возможного превращения в холин, он может через флавинадениндинуклеотид поддерживать работу митохондриальной дыхательной цепи, препятствуя энергетическим потерям, предотвращая возможность развития гипоксических состояний. Кроме того, коламин является предшественником важнейших фосфолипидов — кефалинов и лецитинов [9].

Однако, для любых синтетических процессов необходим энергетический субстрат. В качестве такового мы подобрали янтарную кислоту — важнейший интермедиат цикла Кребса [11]. С помощью анаплеротических (возмещающих) реакций это вещество способно предотвращать нарушение синтеза АТФ [6]. Кроме того, участвуя в работе митохондриальной дыхательной цепи, метаболит может препятствовать развитию гипоксии [7].

Рибав — препарат, ДВ которого — заменимые и незаменимые аминокислоты, отдельные из которых обладают антиоксидантной активностью, способен поставлять мономеры белка, необходимые для развития эмбрионов. Препарат используют для повышения резистентности и нормализации обмена веществ у животных, профилактики и терапии кишечных заболеваний неспецифической этиологии, терапии субклинических маститов у коров, дерматитов [4]. В настоящее время препарат производится биотехнологическим центром «Рибав».

В нашей работе особое внимание было уделено профилактике структурных нарушений тканей, возникающих при стрессе, путем однократного использования комплекса вышеуказанных естественных метаболитов. Ранее нами была разработана оптимальная схема сочетанного применения данных БАВ для стимуляции эмбриогенеза кур [1].

Цель работы

Изучить эффективность использования комплекса коламина, янтарной кислоты и препарата «Рибав» для профилактики и коррекции гисто-биохимических нарушений, возникающих при стрессе, в развитии систем тканей и органов у эмбрионов кур.

Материалы и методы

Исследования проведены на ФГУП ППЗ «Птичное» на яйцах кур кросса «Шейвер белый». Были сформированы опытная и контрольная группы по принципу аналогов, с учетом времени снесения яиц, сроков хранения и массы. Возраст родительского стада составлял 250 дней, в каждую партию входило по 306 яиц. Яйца помещали в одинаковые инкубаторы, производимые компанией «Севекс». Яйца опытной группы обрабатывали комплексом коламина янтарной кислоты и препарата «Рибав» аэрозольным способом перед закладкой в инкубатор и на 19-е сутки раствором коламина.

На первые сутки после вывода по 10 цыплят опытной и контрольной группы были использованы для анализа интерьерных показателей и гистологического исследования органов, у 5 цыплят каждой группы была взята кровь для биохимического анализа.

Для определения биохимических и гистологических показателей использовали общепринятые методы [5]. В частности, метод определения *пероксидазы* основан на определении скорости реакции окисления бензидина пероксидом водорода при участии фермента с образованием окрашенного продукта реакции, имеющего максимум поглощения при 520 нм. Определение *СОД* основано на торможении восстановления бесцветных тетразолиевых солей супероксидными анионрадикалами, при котором происходит их превращение в окрашенные соединения (формазаы). Метод определения *оснований Шиффа* основан на том, что диальдегиды и ряд других конечных продуктов ПОЛ, взаимодействуя с N-концевыми остатками аминокислот, аминокислотных фосфолипидов, образуют конъюгирующие флуоресцирующие соединения типа оснований Шиффа — комплексы липопротеинов, входящих в состав внутриклеточного образования — липофусцина. Метод определения *МДА* основан на том, что при высокой температуре в кислой среде МДА реагирует с 2-теобарбитуровой

кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса, имеющего максимум поглощения при 532 нм.

Для гистологических исследований были отобраны органы у опытных и контрольных цыплят. Гистопрепараты готовили с использованием микротомы и окрашивали гематоксилином и эозином [10].

Результаты

Протекторное действие комплекса препаратов на реакции биологического окисления проявилось в значительном снижении выработки цитотоксичных продуктов ПОЛ в виде МДА и ОШ (табл. 1).

1. Показатели ПОЛ и антиоксидантной защитной системы ($M \pm m$, $n=5$).

Группа	Пероксидаза ед.опт.пл./л*с	СОД, акт/мг гемоглобина	ОШ, отн. ед/мл	МДА, мкмоль/л
Контроль	26,0±1,4	1,50±0,16	0,40±0,01	1,60±0,05
Опыт	48,0±1,2***	2,90±0,09***	0,20±0,04**	1,10±0,17

Примечание: здесь и далее в таблицах * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по t -критерию при сравнении с контролем.

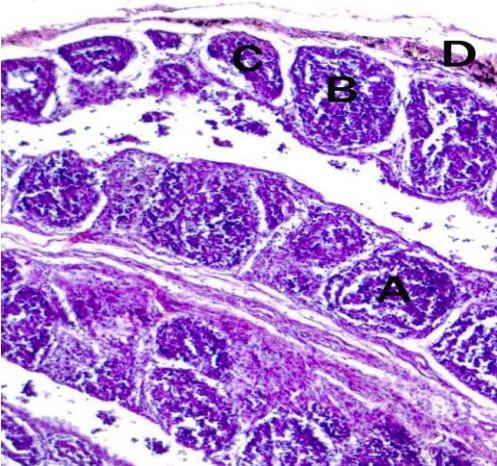
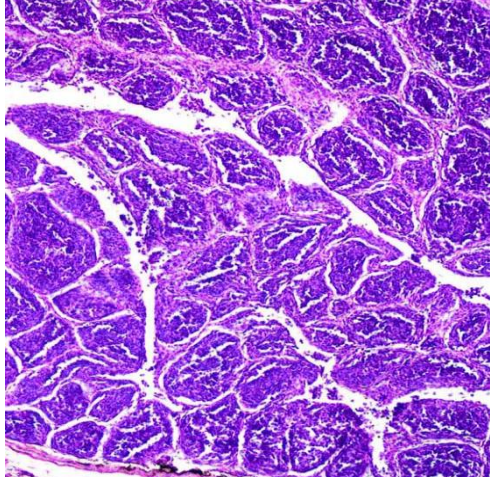
В опытной группе отмечено повышение активности ферментов антиоксидантной защиты — пероксидазы в 1,8 раза и СОД в 1,9 раза ($P < 0,001$) и снижение уровня ОШ ($P < 0,01$) в 2 раза по сравнению с контролем. Следует отметить, что все вышеуказанные биохимические показатели не превышают референтных значений (верхней границы физиологической нормы).

Снижение интенсивности ПОЛ оказало стимулирующее влияние на развитие внутренних органов (табл. 2).

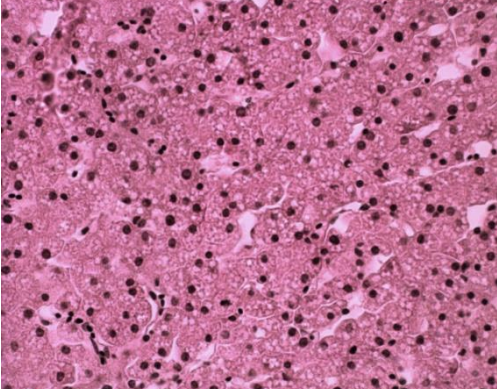
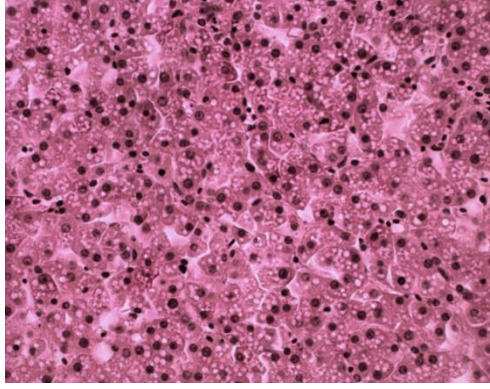
2. Интерьерные показатели суточных цыплят, г ($M \pm m$, $n=5$).

Показатели	Контроль	Опыт
Масса цыпленка, г	39,922±0,48	41,123±0,50
Желточный мешок, с остаточным желтком	6,401±0,27	4,973±0,33*
Печень	1,341±0,01	1,390±0,01*
Сердце	0,226±0,02	0,250±0,01
Селезенка	0,013±0,0004	0,015±0,0005*
Мышечный желудок	2,894±0,019	2,951±0,017*
Железистый желудок	0,406±0,015	0,487±0,017*
Фабрициева сумка	0,079±0,003	0,089±0,003*

В опытной группе снизилось количество остаточного желтка на 24,5 %, что свидетельствует о лучшем использовании питательных веществ организмом цыплят и увеличилась масса селезенки на 25 %, мышечного желудка на 2 %, железистого желудка на 20 %, фабрициевой сумки на 12,6 %. Масса органов увеличилась не за счет соединительной ткани, а за счет структурных компонентов (рис. 1...6).

	
<p>Рис. 1. Фабрицева сумка цыпленка из контрольной группы. Окрашивание гематоксилином и эозином, ок. x10, об. x10). Лимфоидные фолликулы округлой (а), овальной (b), полигональной (с) формы, разделены прослойками соединительной ткани (d)</p>	<p>Рис. 2. Фабрицева сумка цыпленка из опытной группы. Окрашивание гематоксилином и эозином; ок. x10, об. x10. Гиперплазия с увеличением числа лимфоидных фолликулов</p>

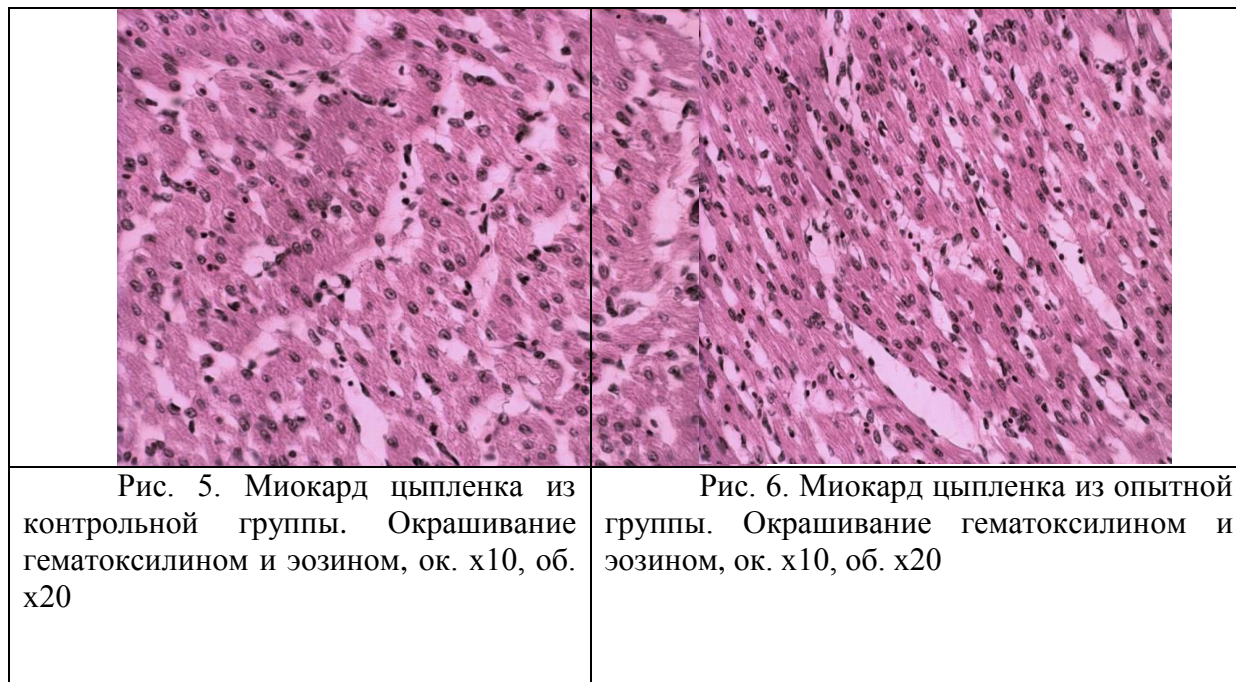
Фабрицева сумка у цыплят контрольной группы мало дифференцирована на корковое и мозговое вещество, слабо выражена дольчатость. Однако присутствует хорошая наполненность лимфоцитами (рис. 1). В сравнении с контролем, фабрицева сумка у цыплят опытной группы (рис. 2) лучше дифференцирована на корковое и мозговое вещество, лучше выражены лимфоидные фолликулы, содержащие большее количество лимфоцитов.

	
<p>Рис. 3. Печень цыпленка из контрольной группы. Окрашивание гематоксилином и эозином, ок. x10, об. x40</p>	<p>Рис. 4. Печень цыпленка из опытной группы. Окрашивание гематоксилином и эозином ок. x10, об. x40</p>

У цыплят контрольной группы дольчатая структура печени слабо визуализируется (рис. 3), печеночные пластинки неравномерно распределены, большое количество соединительной ткани. У цыплят опытной группы (рис. 4) дольчатая

структура органа также слабо визуализируется, но более четко выражены печеночные пластинки, образованные гепатоцитами, отмечено незначительное разрастание соединительной ткани. В обеих группах наблюдали среднекапельную жировую дистрофию печени, что, по данным Г.К. Отрыганьева (1964), не является патологией для сельскохозяйственной птицы.

У цыплят контрольной группы (рис. 5) волокна миокарда структурированы слабо, хорошо выражена рыхлая волокнистая соединительная ткань, исчерченность средняя. У цыплят опытной группы (рис. 6) волокна расположены более структурно, рыхлая соединительная ткань выражена плохо, большое количество сократительных и проводящих кардиомиоцитов, исчерченность высокая.



Кроме того, положительное влияние препаратов на органогенез способствовало высокой эмбриональной жизнеспособности, что выразилось в снижении всех отходов инкубации и обусловило повышение вывода цыплят и выводимости яиц в опытной партии на 10,0 % и на 7,34 % соответственно по сравнению с контролем.

Выводы

Результаты исследования дают основание заключить, что применение комплекса БАВ (коламина, янтарной кислотой и препарата «Рибав») эффективно предотвращает чрезмерную генерацию свободных радикалов, препятствует интенсификации процессов ПОЛ и сбоям в работе митохондриальной дыхательной цепи. Это является важным условием для полноценного развития и функционирования тканевых и органных систем, а также жизнеспособности эмбрионов кур.

Библиография

1. Азарнова Т.О. Применение экологически безопасного препарата Рибав для стимуляции эмбрионального и постэмбрионального развития яичных цыплят: автореф. дисс... канд. биол. наук. — М., 2006.

2. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин Ю.Б., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс.— СПб.: Наука,1992.
3. Билян А.Ф., Овселян А.М., Осипова Э.Н. Перекисное окисление липидов в норме и патогенезе различных заболеваний / Сб. науч. тр. Инст. биохимии НАН Армении. — Ереван, 1988, 48-53 с.
4. Бойко И.А., Мерзленко О.В. Влияние препарата рибав на обмен веществ и продуктивность уток. Проблемы с/х производства на современном этапе и пути их решения / Тез. докл. 1-й междуна. научно-практ. конф. — Белгород, 1997.
5. Кондрахин И.П. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. —М.: Агропромиздат,1985.
6. Кондрашова М.Н. Регуляция янтарной кислотой энергетического обеспечения и функционального состояния ткани. — Пушкино: ОНТИ, 1979.
7. Лузбаев К.В. Зоогигиеническое обоснование повышения резистентности и продуктивности бройлеров путем использования янтарной кислоты: автореф. дис.... канд. с/х. наук. — М.,1995.
8. Мерзленко О.В., Науменко Л.И. Оценка физиологического состояния кур-несушек и инкубационных качеств яиц после применения препарата Рибав / Тез. докл. Конференции «Проблемы с/х производства на современном этапе и пути их решения». — Белгород, :1997.
9. Степанян С.Г., Геворкян Р.А. Коламин-фосфат и сульфат меди как средство повышения естественной устойчивости цыплят к кокцидиозу // Зоологический сборник Института зоологии Академии наук Армянской ССР, 1987, **XXI**: 162—167.
10. Aughey E. Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates. — Manson Publishing, 2010.
11. Cuppett S. Natural antioxidants — are they a reality? Natural antioxidants. Chemistry, health effects, and applications. Ed. F. Shahid L — Champaign, Illinois: AQCS Press, 1997.

T.O. Azarnova, M.S. Naidenskiy, S.Yu. Zaitsev, A.E. Bobilkova, I.S. Yartseva.
Prevention and correction of physiological and biochemical disturbances in the embryos of egg chickens. Intensive industrial incubation exposes the organism of the chicken to additional loads of stress in the process of embryogenesis. This results in the formation of excessive amounts of free radicals, which, in their turn, cause metabolic disturbances. All these negative processes result in tissue dystrophia, which leads to the dysplasia of the embryo and, consequently, has a negative influence upon the percentage of chickens' hatchability. Aerosol processing of eggs by the complex of natural metabolites: kolamin, Mikovit (Ribav) and succinic acid makes it possible to compensate and prevent these processes.