

СТАТЬИ

УДК 619:615.33

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРОВИ
И УРОВЕНЬ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЦЫПЛЯТ
НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТИЛОЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ****Касьяненко Е.Ф.***Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург,
e-mail: kasyanenko@rambler.ru*

Изучение действия продуктов микробиологического синтеза на физиолого-биохимический состав крови и иммунологический гомеостаз, в частности на неспецифические реакции защиты организма, носит высокоинформативный характер, позволяющий выявить ранние признаки их положительного или отрицательного влияния. Основной задачей исследования являлось выяснение влияния производных макролида тилозина: фармазина-Т, фразидина-50 и фармазина на гематологические, биохимические показатели крови и иммунный статус цыплят в критический период иммунодефицита в возрасте с 5 по 20 день жизни. Изменение показателей крови и факторов естественной гуморальной защиты изучали в динамике. Уровень бактерицидной активности сыворотки крови, бета-лизина и лизоцима использовали как показатель иммунологической реактивности организма. Анализ проведенных исследований подтвердил, что фармазин-Т, фразидин-50 и фармазин в терапевтических дозах в критические дни иммунодефицита цыплят (с 5 по 20 дни жизни) повышали белковый обмен и насыщение крови гемоглобином, оказывали ростостимулирующее действие. Фармазин-Т и фразидин-50 стимулировали естественную резистентность, повышая бактерицидную активность сыворотки крови, лизоцима и бета-лизина. Фармазин влияния на иммунитет не оказывал. В результате проведенных исследований пришли к выводу, что совместное применение иммуностимуляторов с фармазином-Т и фразидином-50 в терапевтических дозах при краткосрочной терапии нецелесообразно.

Ключевые слова: макролиды, тилозиновые антибиотики, иммунологический гомеостаз, цыплята, бактерицидная активность сыворотки крови, лизоцим, бета-лизин

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF BLOOD
AND THE LEVEL OF NATURAL RESISTANCE OF CHICKENS DURING
THE USE OF TYLOSIN ANTIBIOTICS****Kasyanenko E.F.***Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Saint-Petersburg, e-mail: kasyanenko@rambler.ru*

The study of the effect of microbiological synthesis products on immunological homeostasis, in particular on the nonspecific reactions of the body protection, is highly informative, allowing to identify early signs of their positive or negative impact. The main objective of the study was to determine the influence of derivatives of the macrolide tylosin: farmazine-T, fradizine-50 and farmazine on hematological and biochemical parameters of blood and on the immune status of the chicks during the critical period of immune deficiency from the 5th to the 20th day of life. Changes in blood counts and in factors of natural humoral protection were studied in dynamics. Bactericidal activity of blood serum, beta-lysine and lysozyme were used as an indicator of immunological reactivity. The analysis of the research showed that farmazine – T, fradizine – 50 and farmazine in therapeutic doses in the critical days of immunodeficiency of the chicks (from the 5th to the 20th day of life) raised protein metabolism and blood saturation with hemoglobin. They had growth effect. Farmazine – T and fradizine – 50 stimulated natural resistance by raising bactericidal activity of blood serum, lysozyme and beta-lisine. Farmazine had no effect on immunity. As a result of the studies concluded that the combined use of immunostimulants with farmazin-T and fradizin-50 in therapeutic doses in short-term therapy is not appropriate.

Keywords: macrolides, tylosin antibiotics, immunological homeostasis, chickens, bactericidal activity of blood serum, lysozyme, beta-lysine

В настоящее время все большее признание получает изучение влияния продуктов микробиологического синтеза на иммунологический гомеостаз, в частности на неспецифические реакции защиты организма, обладающие высокой информативностью показателей и позволяющие выявлять ранние признаки их положительного или отрицательного влияния. Это относится в первую очередь к антибиотикам, так как при действии их на организм зачастую отсутствует токсический эффект даже от приме-

нения больших доз. Среди них выделяется группа макролидов – малотоксичные, высокоэффективные антибиотики, обладающие антимикробным, иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, более полно изученные в медицине. Установлено, что действие макролидов на иммунную систему зависит от антибиотика, дозы и продолжительности их применения. Они могут усиливать иммунный ответ, а при длительном применении, наоборот, вызывать иммуносупрессию. По одной из теорий

механизм их влияния состоит в способности макролидов к аккумуляции в лейкоцитах (нейтрофилы, моноциты, макрофаги) и их хемотаксису (миграции лейкоцитов из сосудистого русла) к очагу инфекции [1, 2]. Макролиды стимулируют фагоцитоз, ускоряют и облегчают дифференциацию макрофагов и увеличивают их киллерную активность. Они стимулируют окислительный (респираторный) взрыв в фагоцитах, наступающий после рецепции и захвата микроорганизмов и образования губительных для бактерий метаболитов кислорода и азота. В зависимости от концентрации и длительности терапии макролиды повышают или понижают синтез и поступление противовоспалительных факторов-цитокинов: туморнекротизирующих факторов (TNF) и интерлейкинов (IL) – 1, 6, 8, 10 из лейкоцитов, фагоцитов и клеток дыхательного эпителия. Предположительно, что макролиды влияют на регуляцию экспрессии генов (процесс передачи генетической информации от ДНК), участвующих в синтезе цитокинов в эукариотических клетках [3]. Наибольшая иммуномодуляторная активность обнаружена у широко используемых в медицине – азитромицина и кларитромицина [4]. Исключительно интересным фактом является не только стимуляция иммунной защиты, но и прекращение активации иммунитета по мере стихания инфекционного процесса [5]. По химическому строению антибиотики подгруппы тилозина относятся к макролидам и широко применяются в ветеринарной практике. Структура тилозина представляет собой 16-членный макролид, в состав которого входит тиланолидное кольцо и три сахара: микаминоза, микароза и мициноза. Данные о влиянии тилозиновых антибиотиков на иммунитет ограничены и получены в основном на лабораторных животных: свиньях и собаках. Препараты этой группы широко применяются в птицеводстве. Поэтому изучение влияния на уровень естественной резистентности птиц представляло несомненный интерес.

Естественная резистентность цыплят по данным Л.С. Колабской у молодняка кур мясных и яичных пород с 5- до 20-дневного возраста определяется на низком уровне, так как иммунная система находится в стадии формирования. У цыплят выявлено два критических физиологических периода, связанных с возрастными иммунодефицитами. Первый период – 4–5-й день постнатального развития, когда происходит рассасывание желточного мешка – главного органа кроветворения и лимфопоэза в эмбриональный период развития. Второй период начинается с 14–15 дня жизни,

когда происходит распад овариальных иммуноглобулинов матери [6]. По данным литературных источников период полураспада материнских антител происходит от 5 дня жизни до месяца в зависимости от иммунного статуса родителей [7]. В эти критические моменты жизни организм очень чувствителен к возбудителям болезней, особенно к заражению микоплазмой, так как микроб может распространяться трансовариально [8]. Предложенные для борьбы с микоплазмозом тилозиновые антибиотики особенно актуальны.

Основной задачей эксперимента было изучение влияния производных тилозина: фармазина-Т (Болгария), фармазина (Болгария) и фразизина-50 (Россия) на физиолого-биохимический состав крови и иммунный статус цыплят в критический период иммунодефицита в возрасте с 5 по 20 день жизни при краткосрочном применении. А также целесообразности одновременного применения тилозиновых антибиотиков и иммуномодуляторов.

Материалы и методы исследования

Фармазин-Т (Ф-Т) – техническая форма тилозина фосфата, изготавливаемая путем высушивания культуральной жидкости после ферментации актиномицета, в одном грамме которого содержится 100 мг антибиотика. Кроме АДВ в нем содержится 18,84% минеральных веществ (CaCO₃, NaCl и др.), 30% белков и значительное количество свободных аминокислот: метеонин, аланин, глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, фенилаланин, лейцин и др. Фразизин-50 (Ф-50) в 1 грамме содержит 50 мг тилозина фосфата и наполнитель, в состав которого входят свободные аминокислоты, витамины, ферменты, макро- и микроэлементы, липиды, в том числе фосфолипидные фракции. Фармазин (Ф) – растворимый 50% порошок тилозина тартрата. Исследование проводили на цыплятах кросса «Бройлер-6» в возрасте от 1 до 20 дней. Бройлеров разделяли на четыре группы по принципу аналогов. Птице первой группы назначали фармазин-Т (Ф-Т) в дозе 10 г/кг корма, второй – фразизин-50 (Ф-50) – в дозе 20 г/кг корма, третьей фармазин (Ф) – в дозе 1 г/л питьевой воды в течение 5 дней. Суточная доза по активно действующему веществу (АДВ) была одинаковой и составляла 80–85 мг/кг. Четвертая группа служила чистым контролем. Через 5, 10 и 20 дней с начала назначения препаратов брали кровь из подкрыльцовой вены и изучали следующие показатели: СОЭ, количество эритроцитов и лейкоцитов, содержание гемоглобина (HGB) и общего белка (Tb), бактерицидную

активность сыворотки крови, активность лизоцима и активность бета-лизуна.

Реакцию СОЭ проводили микрометодом Панченкова, реакцию оценивали через час. Подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов проводили в камере Горяева. Из биохимических показателей определяли содержание гемоглобина колориметрическим методом, общий белок в сыворотке крови рефрактометрическим методом по В.В. Рудакову и соавт. Оценку влияния на иммунологический статус проводили по показателям естественной резистентности: бактерицидной активности сыворотки крови, активности лизоцима и бета-лизуна. Бактерицидная активность сыворотки крови (БАС) – свойство свежей сыворотки вызывать гибель в ней бактерий, обусловленный совокупным действием многих факторов, в том числе бета-лизуна и лизоцима. Уровень БАС является показателем активности фагоцитоза, а именно нейтрофилов и моноцитов, определяя антимикробные свойства крови и оценивая состояние иммунной системы. БАС крови устанавливали фотоэлектроколориметрическим методом (ФЭКМ) по О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой в модификации ВНИВИП. Важная роль в естественной резистентности принадлежит лизоциму. Он активизирует как фагоцитоз, так и образование антител, выполняет роль регулятора клеточной дифференциации, а также повышает эффективность системы комплемента и пропердина. Активность лизоцима в сыворотке крови определяли фотоэлектроколориметрическим методом (ФЭКМ) по А.Г. Дорофейчику в модификации ВНИВИП. Бета-лизуна – тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови, синтезируемый тромбоцитами. Активность В-лизуна в сыворотке крови птиц выясняли

ФЭКМ по О.В. Бухарину и соавт. в модификации ВНИВИП. Изменение параметров естественной гуморальной защиты, изучаемое в динамике, может быть использовано как показатель иммунологической реактивности организма [9]. Падение уровня БАС, лизоцима и бета-лизуна указывает на глубокие нарушения в иммунитете и является неблагоприятным прогностическим признаком. Кроме этого следили за динамикой роста цыплят и рассчитывали коэффициент роста. Коэффициент роста цыплят определяли по формуле

$$K = Wt / Wo,$$

где Wt и Wo – масса соответственно на начало и конец опыта.

Результаты исследований и их обсуждение

В ходе работы выяснили, что ни один из испытуемых антибиотиков не влиял на количество эритроцитов, лейкоцитов и СОЭ. Эти показатели находились в пределах физиологической нормы и находились на уровне аналогичных референтных показателей. На всех этапах исследований концентрация гемоглобина была наиболее высокой в группах птиц, получавших Ф-Т и Ф-50. Так, на двадцатый день эксперимента под действием Ф-Т уровень HGB составлял $119,3 \pm 0,29$ г/л, что превышало контрольный показатель на 18,9%, под действием Ф-50 – $115,8 \pm 0,14$ г/л, что было выше уровня референта на 15,5%. У цыплят, которым выпаивали фармазин, этот показатель также достоверно превышал контрольные значения на 9,6% и был равен $109,9 \pm 0,24$ г/л. Концентрация гемоглобина во всех группах при этом не выходила за рамки физиологической нормы (рис. 1).

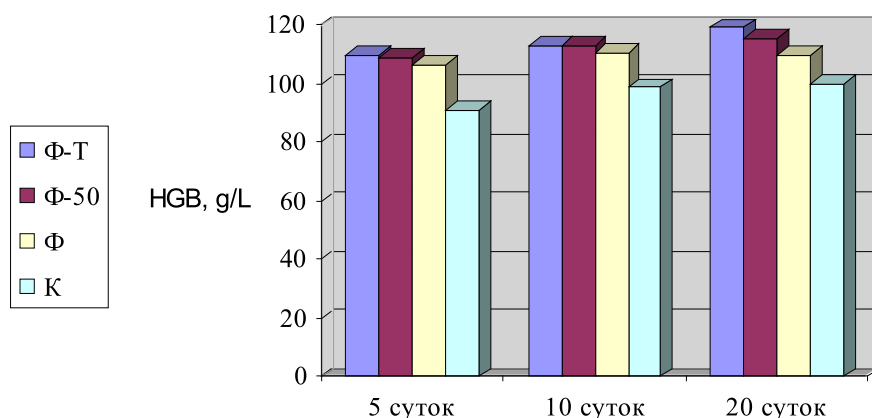


Рис. 1. Уровень гемоглобина в различные сроки после применения фармазина-Т, фразидина-50 и фармазина ($M \pm m$)

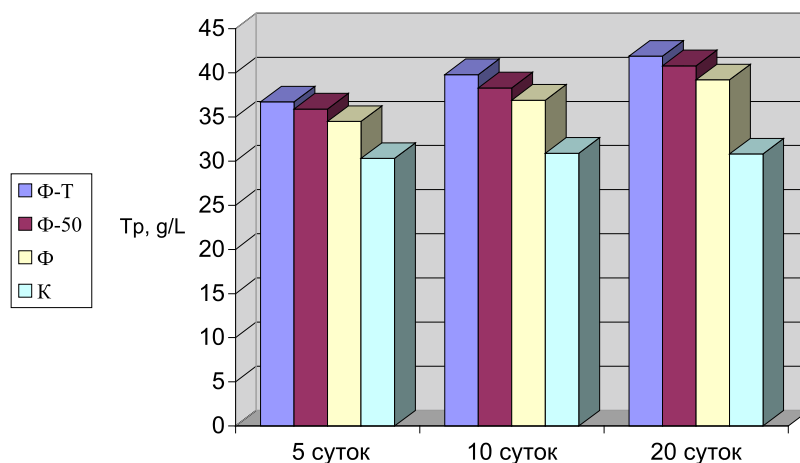


Рис. 2. Уровень общего белка в различные сроки после применения фармазина-Т, фразидизина-50 и фармазина ($M \pm m$)

Динамика содержания общего белка представлена на рис. 2. Прослеживается постепенное достоверное повышение его уровня к концу эксперимента. У бройлеров, получавших фармазин-Т, уровень общего белка (Тр) был наиболее высоким через 20 суток – $41,9 \pm 0,06$ г/л и превышал контрольный показатель на 35,7%. К концу исследования под действием фразидизина-50 концентрация общего белка была выше контроля на 32,5% и составляла $40,8 \pm 0,14$ г/л, а под действием фармазина – $39,2 \pm 0,25$ г/л, что было выше референта на 27,3%.

При выращивании цыплят мясных пород объективным показателем является динамика роста. Потребность тканей в поступлении кислорода и питательных веществ в ростовой период возрастает. Под действием антибиотиков повышение белкового обмена и уровня гемоглобина коррелировало с более активным наращиванием живой массы. В ходе исследований выяснили, что через 5 дней коэффициент роста бройлеров всех опытных групп был выше – 1,67–1,71 против контроля 1,56, но различия были недостоверны. Через 10 суток регистрировали наибольший прирост массы у цыплят, получавших фармазин-Т (коэффициент роста 3,35) и фразидизин-50 (коэффициент роста 3,26). Птицы, получавшие фармазин, немного отставали (коэффициент роста 3,19). Цыплята в контрольных группах хуже росли и развивались. Они были менее активны, не так интенсивно оперялись. Через 20 суток различия проявились наиболее ярко. Коэффициенты роста превышали референтный показатель на 56,7 – 53,7% и составляли для Ф-Т – 6,36, для Ф-50 – 6,34, для Ф – 6,24 против контрольного 4,06. Помимо тилозина Ф-Т и Ф-50 содержат в составе на-

полнителя другие биологически активные вещества, способствующие улучшению обмена веществ и насыщению необходимыми нутриентами, что необходимо учитывать при анализе ростостимулирующей активности антибиотиков для животных [10]. Поэтому Ф-Т и Ф-50 показали более высокий уровень обмена и наращивание живой массы по сравнению с фармазином и контролем. Анализируя показатели естественной резистентности, отметили повышение активности лизоцима на протяжении всего периода исследования у птиц, получавших фармазин-Т. Активность лизоцима в группах бройлеров, получавших фразидизин-50, также превышала контрольный через 10–20 дней. У цыплят, которым выпаивали фармазин, процент лизиса достоверно повышался по отношению к референту только на 20 день исследований. Активность бета-лизина через 5–10 дней изменялась незначительно. Только через 20 дней эксперимента зафиксировали достоверное увеличение этого показателя у птиц получавших Ф-Т на 15,1%, а Ф-50 на 12,6%. БАС увеличивалась только в группе птиц, получавших Ф-Т в среднем на 12,7–15,4% и Ф-50 – на 11,1–12,5% по сравнению с контролем. Изменения в динамике этого показателя под действием Ф носили недостоверный характер (таблица).

Заключение

Проведенный анализ показал, что под действием фармазина-Т, фразидизина-50 и фармазина усиливался белковый обмен, повышалось насыщение крови гемоглобином. Бройлеры лучше росли и развивались. Наибольший ростостимулирующий эффект отметили у фармазина-Т и фразидизина-50.

Показатели естественной резистентности в различные сроки применения фармазина-Т, фразидина-50 и фармазина (М ± м)

Показатели	Время, сутки	Фармазин-Т	Фразидин-50	Фармазин	Контроль
Активность лизоцима, % лизиса	5	13,31 ± 1,06*	13,10 ± 1,67	12,98 ± 1,27	11,06 ± 1,08
	10	13,11 ± 0,92*	12,95 ± 0,63*	12,75 ± 0,08	10,54 ± 0,91
	20	13,56 ± 1,36*	12,92 ± 1,15*	12,53 ± 1,04*	10,33 ± 0,16
Активность бета-лизина, % лизиса	5	33,53 ± 2,16	34,64 ± 2,29	33,98 ± 3,12	33,61 ± 1,27
	10	30,96 ± 0,92	31,15 ± 3,08	30,64 ± 2,27	30,29 ± 0,68
	20	32,86 ± 1,57*	32,17 ± 1,56*	31,19 ± 1,91	28,56 ± 1,14
Бактерицидная активность, %	5	21,30 ± 2,72	20,05 ± 0,28	19,98 ± 3,16	19,81 ± 1,34
	10	27,24 ± 0,19*	26,21 ± 1,25*	23,89 ± 1,19	23,60 ± 1,12
	20	33,98 ± 1,64*	33,92 ± 1,79*	32,56 ± 2,21	30,14 ± 0,69

Примечание: * – P < 0,05 – рассчитана по сравнению с контролем.

При краткосрочном применении (5 суток) в терапевтических дозах фармазин-Т (10 г/кг корма) и фразидин-50 (20 г/кг корма) обладали иммуностимулирующим действием, повышали естественную резистентность цыплят. В ходе эксперимента наблюдали достоверное увеличение БАС, активности лизоцима и к 20 дню исследований – активности бета-лизина. Фармазин в дозе 1 г/л питьевой воды иммуностимулирующего влияния не оказывал, но и не угнетал естественную резистентность цыплят. По результатам исследования можно сделать вывод. При краткосрочной терапии (5 суток) в терапевтических дозах применение тилозиновых антибиотиков фармазина-Т и фразидина-50 совместно с иммуномодуляторами нецелесообразно. Дальнейшее изучение влияния тилозиновых производных на иммунологический гомеостаз птиц представляет несомненный научный интерес.

Список литературы

1. Bulska Magdalena, Orszulak-Michalak Daria. Immunomodulatory and anti-inflammatory properties of macrolides. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2014. Vol. 27. no. 1. P. 61–64. [Electronic resource]. URL: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/cipms.2014.27.issue-1/cipms-2014-0015/cipms-2014-0015.pdf> (date of access: 15.09.2019).
2. Zarogoulidis P. et al. Macrolides: from in vitro anti-inflammatory and immunomodulatory properties to clinical

practise in respiratory diseases. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2012. Vol. 68. P. 479–503. [Electronic resource]. URL: https://www.researchgate.net/publication/51820039_Macrolides_From_in_vitro_anti-inflammatory_and_immunomodulatory_properties_to_clinical_practice_in_respiratory_diseases (date of access: 15.09.2019).

3. Деблик А.Г. Функциональная морфология периферических органов иммунитета цыплят при применении пробиотиков: автореф. дис. ... канд. ветер. наук: 16.00.02. Уфа, 2007. 18 с.

4. Rubin B.K., Henke M.O. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease. *Chest.* 2004. Vol. 125. P. 70–78.

5. Карпов О.И. Макролиды как противовоспалительные агенты. *Medi.ru.* 2007. [Электронный ресурс]. URL: <https://medi.ru/info/3512/> (дата обращения: 15.09.2019).

6. Колбаская Л.С., Попова В.Д., Маккаевская Е.А., Колупаева Е.Д. Рекомендации по определению показателей естественной резистентности крови птиц. СПб., 1980. 34 с.

7. Садовников Н.В., Придыбайло Н.Д., Верещак Н.А., Заслонов А.С. Общие и специальные методы исследования крови птиц промышленных кроссов. Екатеринбург – Санкт-Петербург: Уральская ГСХА, НИП «АВИВАК», 2009. С. 6.

8. Черкасова В.В., Зеленский К.С. Гематологические и биохимические показатели крови цыплят-бройлеров в онтогенезе // *Известия Оренбургского аграрного университета.* 2009. № 4 (24). С. 60–63.

9. Балаклиец Н.И. Основы учения об иммунитете // *Очерки по микробиологии. Микроорганизмы: жизнедеятельность, распространение и взаимодействие.* 2011–2019. [Электронный ресурс]. URL: <http://mikrobio.balakliets.kharkov.ua/contents-3-1-1.html> (дата обращения: 15.09.2019).

10. Радуль А.Л. Содержание общего белка в крови цыплят при разном уровне обеспеченности рациона треонином // *Ветеринария Кубани.* 2012. № 3. С. 27–28.