

В. Г. Вертипрахов, Д. А. Ксенофонов, Е. А. Колесник, Н. В. Овчинникова



**МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
КРОВИ
У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ**



Москва 2022

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В. Г. Вертипрахов, Д. А. Ксенофонтов, Е. А. Колесник,
Н. В. Овчинникова

**МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ
У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ**

Учебное пособие

Москва 2022

УДК 619:616-7:636.5(075)

ББК 48.47я72

М 80

Рекомендовано к использованию в учебном процессе ученым советом института
Зоотехнии и биологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Коллектив авторов:

Владимир Георгиевич Вертипрахов, доктор биологических наук;
Дмитрий Анатольевич Ксенофонтов, доктор биологических наук;
Евгений Анатольевич Колесник, доктор биологических наук; Ната-
лья Владимировна Овчинникова

Морфо-биохимические исследования крови у сельскохозяйственной птицы: учеб. пособие / В. Г. Вертипрахов, Д. А. Ксенофонтов, Е. А. Колесник, Н. В. Овчинникова, под ред. В. Г. Вертипрахова; ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева». – Москва: РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2022. – 134 с.

ISBN 978-5-9675-1938-3

В учебном пособии представлены данные о морфологических и биохимических исследованиях крови птицы классическими методами, а также с использованием современных биохимических анализаторов. Включённые морфо-физиологические иллюстрации существенно повышают качество освоения дифференциальной диагностики клеток крови. Наименования клеток крови даны в соответствии с действующей Гистологической ветеринарной номенклатурой Международного комитета по ветеринарной гистологической номенклатуре. Приведены результаты исследования сотрудников лаборатории физиологии ФНЦ «ВНИТИП» РАН по изучению влияния генетических факторов и условий окружающей среды на морфо-биохимические показатели крови у мясных и яичных кур. Показаны примеры использования индексов для физиолого-биохимического мониторинга состояния здоровья и питания сельскохозяйственной птицы, в том числе при диагностике микотоксикозов. Пособие предназначено для обучающихся по биологическим направлениям подготовки, аспирантов, научных сотрудников, зоотехнических и ветеринарных специалистов и работников производственных лабораторий птицеводческих и животноводческих предприятий.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
1 Общие сведения о системе крови у птицы	7
1.1 Морфология клеток	12
1.1.1 Эритроциты	12
1.1.1.1 Гемоглобин	14
1.1.2 Лейкоциты	17
1.1.3 Тромбоциты	19
1.2 Порядок взятия крови у птицы	21
1.3 Подсчет клеток крови	26
1.3.1 Устройство счетной камеры Горяева и подсчет в ней клеток крови	27
1.3.1.1 Подсчет количества эритроцитов колориметрическим способом	36
1.3.2 Подсчет количества лейкоцитов	39
1.3.2.1 Лейкоцитарная формула	42
1.3.3 Определение количества тромбоцитов	49
1.3.4 Использование гематологического анализатора для определе- ния морфологических показателей крови птиц	51
1.4 Техника приготовления мазков крови	52
1.4.1 Фиксация и хранение	55
1.4.2 Окраска мазков крови	56
2 Биохимические исследования крови птицы	68
2.1 Определение биохимических показателей крови птицы с использованием биохимических анализаторов	69
2.2 Определение активности пищеварительных ферментов в крови пти- цы при помощи биохимических анализаторов	76
2.3 Влияние возраста птицы на биохимические показатели крови	82
2.4 Биохимические показатели крови кур в постпрандиальный период	92
2.5 Влияние кросса и породы кур на биохимию крови	96

2.6 Влияние биологически активных добавок на биохимические показатели крови кур и цыплят-бройлеров	108
2.7 Влияние компонентов рациона на биохимические показатели крови кур-несушек	114
2.8 Влияние уровня макро- и микроэлементов на биохимические показатели крови кур-несушек	118
Список литературы	123

ВВЕДЕНИЕ

Морфологические и биохимические показатели крови имеют важное значение в определении физиологического статуса и состояния здоровья сельскохозяйственных животных и птицы. В последние десятилетия произошло значительное обновление приборной базы научных лабораторий, на смену классическим методам исследования пришли автоматические гематологические и биохимические анализаторы с предназначенными для них наборами реактивов, что привело к повышению скорости анализа и более высокой точности исследований, и требует определения новых референтных значений. Научная литература имеет обширный и комплексный материал по морфологии и биохимии крови у птиц (Луценко Е.В., 2012; Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2015; Закржевская К.С. и соавт., 2016). В этой связи, в данном учебном пособии нами приводятся результаты собственных исследований, их сопоставление с литературными данными.

При диагностике физиологического состояния птицы наиболее эффективным методом является определение количества лейкоцитов и гематокрита крови, поскольку данные показатели быстро реагируют на развитие патологических процессов в организме при различных заболеваниях (Торшков А.А., 2010; Пономарев В.А., 2014; Макаев Ш.А., 2016). Однако, имеющиеся в клинической практике стандартные методы для исследования крови млекопитающих не подходят для исследования крови у птицы, ввиду их физиологических особенностей. В крупных исследовательских центрах количество форменных элементов в крови измеряют с помощью гематологических анализаторов. Но не все анализаторы рассчитаны на исследования крови птицы, что приводит к искаженным или вовсе не достоверным результатам.

Метод подсчета эритроцитов в камере Горяева нашел наиболее широкое применение в связи с его простотой и доступностью. Принцип метода состоит

в уменьшении концентрации форменных элементов, что на фоне сетки Горяева позволяет производить подсчет их количества.

Известно, что при использовании данного метода возникает погрешность, связанная с содержанием ядра в эритроците у птицы, вследствие чего, можно неправильно идентифицировать форменные элементы и отнести их к другой группе клеток (эритроциты и тромбоциты у птицы содержат ядро). Для устранения данной погрешности был предложен метод подсчета форменных элементов (Садовников Н. В., 2009). Метод основан на подкрашивании основной жидкости для камеры Горяева. В данном учебном пособии мы представляем модифицированный метод подсчета эритроцитов и лейкоцитов, позволяющий отличать клетки крови в камере Горяева и наиболее точно подсчитывать их.

Приведённые морфофизиологические микрофотографии с актуальной номенклатурой значительно облегчают освоение дифференциальной диагностики клеток крови птиц, имеющих существенные отличия от млекопитающих (Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2019; Колесник Е. А., 2021).

Нами впервые выполнено исследование активности пищеварительных ферментов в плазме крови птицы, причем одновременно всех основных ферментов: амилазы, липазы и трипсина, что позволило установить корреляцию между ними в крови и дуоденальном содержимом (Вертипрахов В. Г., Грозина А. А., 2017). В учебном пособии мы изложили особенности определения основных биохимических показателей крови у кур разного направления продуктивности с использованием современных биохимических автоматического и полуавтоматического проточного анализаторов.

Предлагаемое учебное пособие предназначено для обучающихся по биологическим направлениям подготовки, аспирантов, научных сотрудников, зоотехнических, ветеринарных и биологических специалистов, а также работников производственных лабораторий птицеводческих и животноводческих предприятий.

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СИСТЕМЕ КРОВИ У ПТИЦЫ

Образование крови (гемопоз) или кроветворение – сложный процесс образования, развития и созревания форменных элементов крови. Кроветворение осуществляется в специальных органах кроветворения. **Часть кроветворной системы организма, которая непосредственно связана с выработкой красных клеток крови, называется эритроном.** Эритроном не является каким-либо одним органом, а рассеян по всей кроветворной ткани костного мозга (Калион Г. В., 2012).

К центральным органам кроветворения птицы относят эмбриональный желточный мешок, костный мозг, тимус, фабрициевую сумку (бурсу).

Желточный мешок является первичным и главным кроветворным органом эмбриона. Он формируется в первые дни развития эмбриона, желточная масса которого служит энергетическим материалом. Перед вылуплением желточный мешок втягивается в брюшную полость, затем в течение нескольких суток желток рассасывается (Конопатов Ю. В., Макеева Е. Е., 2000). Формирование крови в стенке желточного мешка достигает максимума активности на 11–12 день инкубации, уменьшаясь к 18 дню.

Костный мозг обнаруживается и функционирует на 12 день. Он не является активным в это время, но постепенно повышает свою активность к окончанию инкубации, когда становится основным источником клеток крови (Бернет Ф. М., 1971; Болотников И. А., 1987; Конопатов Ю. В., 1993). Быстрое увеличение числа эритроцитов и лейкоцитов в костном мозге отмечается в период первых четырех дней постинкубационного периода. Костный мозг становится центральным лимфоидным органом (Болотников И. А., Соловьев Ю. В., 1980). Д. Х. Хамидов и соавт. (1978), изучая процесс кроветворения у птицы, представили данные (табл.1.1), в которых выявлена степень активности очага кроветворения от низкой (+) до максимальной (++++).

Таблица 1.1 – Активность различных очагов кроветворения у птицы

Вид гемопозза	Очаги гемопозза				
	почка	селезенка	кишечник	печень	костный мозг
Эритропозз	-	+	-	-	++++
Миелопозз	+	+	+	+	++++
Лимфопозз	++	++++	+++	++	+

Данные ученые утверждают, что у птицы кроветворение происходит, главным образом, в костном мозге и лимфоидной ткани, очаги которой обнаруживаются почти во всех органах (селезенке, кишечнике, печени, почках и др.), в том числе и в собственно костном мозге.

Особыми лимфоидными органами птицы являются *фабрициева сумка и вилочковая железа*, где формируются популяция тимуснезависимых лимфоцитов, определяемых как В-лимфоциты (Гильмутдинов Р. Я. и соавт., 2005).

Тимус у птицы состоит из 6–7 пар долей, расположенных в два ряда: первый – на шее, второй – прилегает к трахее. Наиболее развит тимус у молодой птицы. Зачатки тимуса появляются на 5–7 сутки развития эмбриона, на десятые сутки в тимусе можно обнаружить лимфоциты, где и происходит их созревание. Затем Т-лимфоциты покидают тимус, поступая в селезенку, в лимфоидные образования слизистых оболочек кишечника, в бронхиальную лимфоидную ткань. Количество выходящих из тимуса лимфоцитов составляет $7,4 \cdot 10^7$ штук в сутки, что достаточно для полного обновления в течение 2–3 месяцев всего циркулирующего лимфоцитарного пула (Кяйвяряйнен Е. И., 2003; Митюшников В. М., 2002).

К периферическим (вторичным) лимфоидным органам птицы относятся: селезенка, лимфоидные узлы слепых отростков, гардерова железа, скопления лимфоидных элементов глотки, гортани, бронхов и кишечника и небольшие скопления лимфоидных клеток в других органах и тканях (Конопатов Ю. В., Макеева Е. Е., 2000).

У куриных лимфатических узлов, подобных таковым у млекопитающих, нет. Некоторые исследователи установили, что у кур имеются лимфатические узлы, сгруппированные на заднем и среднем участках шеи. В каждую группу входят три – четыре или три – пять единичных узлов. У молодых кур эти узлы желтоватого цвета, у более старых буровато-серого или серого. Однако обнаружить их трудно (Жаров А.В. и соавт., 2000).

Отсутствие лимфатической системы с многочисленными узлами у птицы компенсируется рассеянными по всему организму скоплениями лимфоидной ткани, способной активно реагировать на любой антигенный стимул (Болотников И.А. и соавт., 1987). Участки скопления периферической лимфоидной ткани обнаруживаются в селезенке, в подслизистой оболочке пищеварительного тракта, на всем протяжении от глотки до клоаки, в слепых отростках, эзофагеальной миндалине железистого желудка, а также в виде небольших скоплений лимфоидных клеток в коже, печени, легких, поджелудочной железе и в других органах и тканях (Rayne F., 1971). По данным V.G. Bang et al. (1968), кроме того, обнаружены лимфоидные образования в слезном протоке (малые лимфоциты и центры размножения), гардеровой железе (плазматические клетки), в ее протоках (небольшие скопления лимфоцитов) и в протоках латеральных носовых желез (плазматические клетки).

Лимфоидные образования селезенки, стенки кишечника, портальной области печени также варьируют. У птицы лимфоидные узлы размером 0,1–2,5 мм локализуются с различными интервалами вдоль лимфатических сосудов в области ног (Biggs B., 1957).

Разделение кроветворения на лимфоидное и миелоидное у птицы выражено слабо, напряженность эритропоэза у кур – минимальная (Хамидов Д.Х. и соавт., 1978).

Объем крови принято сравнивать с массой тела и выражать в процентном соотношении. У различных видов птиц имеются свои параметры данного критерия. В таблице 1.2 представлены данные о количестве крови в организме разных видов птиц.

Таблица 1.2 – Количество крови у различных видов птиц (Гильмутдинов Р. Я., и соавт., 2005)

Вид птицы	Количество крови	
	в организме, мл	в процентах к массе тела
Пингвин хохлатый	-	15,1
Чомга	98,9	16,2
Поганка малая	35,6	17,2
Баклан большой	230	12,4
Баклан малый	84,3	15,3
Гусь серый	469,5	12,8
Гусь холмогорский	414	8,1
Утка пекинская	257	9,9
Кряква	78,8	10,3
Утка серая	98,2	10,2–11,4
Луток	43,3	6,9
Свистуха	116,7	20,2
Нырок красноголовый	102	15,6
Чернеть хохлатая	83,4	14,4
Чернеть морская	118	11,7
Индейка	911	10,2
Цесарка	129	7,5–9,5
Курица	106	6,5–9
Лысуха	57,9	9,7
Стрепет	107,5	14,4
Цапля серая	379,5	21
Выйль большая	89,3	10,6
Голубь	27,4	7,8–9,2
Фазан	49,5	6
Сокол	49,5	6
Сова	49,5	6
Гагара	49,5	6

Как видно из таблицы, большим количеством крови из представленных видов птиц, отличаются цапля серая (379,5 мл) и гусь серый (469,5 мл). Несмотря на то, что объем крови у гуся серого больше на 90 мл (12,8 %), но относительно живой массы тела, по объему крови лидирует цапля серая (21 %).

Клетки крови птицы имеют морфофункциональные особенности по сравнению с млекопитающими животными. Эритроциты у птицы в зрелом состоянии содержат ядро, которое образует двустороннюю выпуклость клетки. Кроме того, они крупнее по размерам и имеют овальную форму. Наличие ядра в эритроците значительно затрудняет получение достоверных результатов с использованием общепринятых методик для подсчета форменных элементов (рис. 1.1, 1.2).

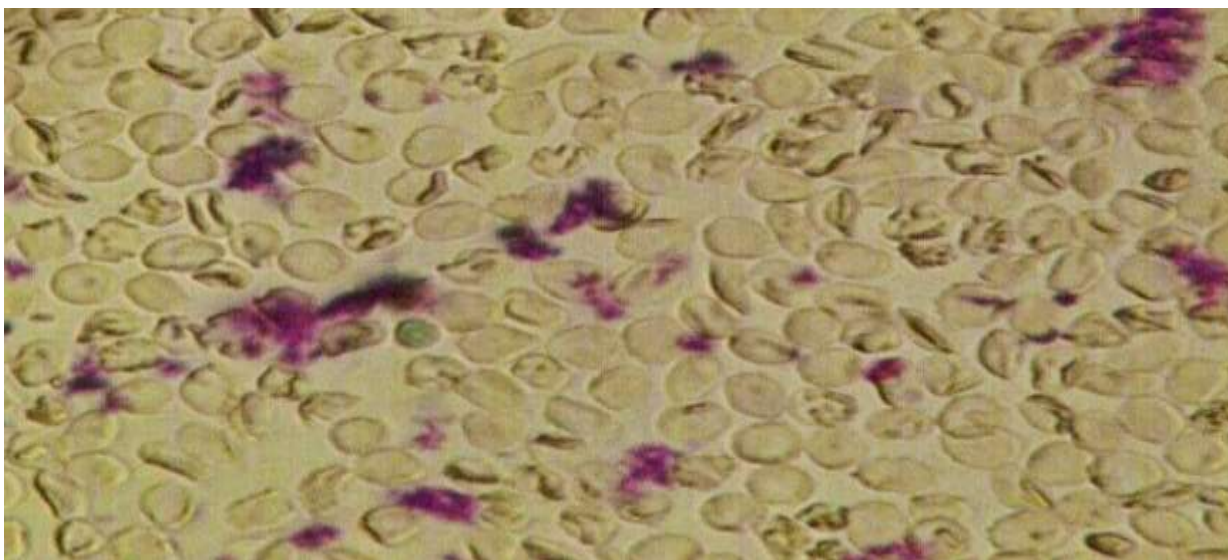


Рисунок 1.1 – Кровь млекопитающего (увеличение в 40 раз)

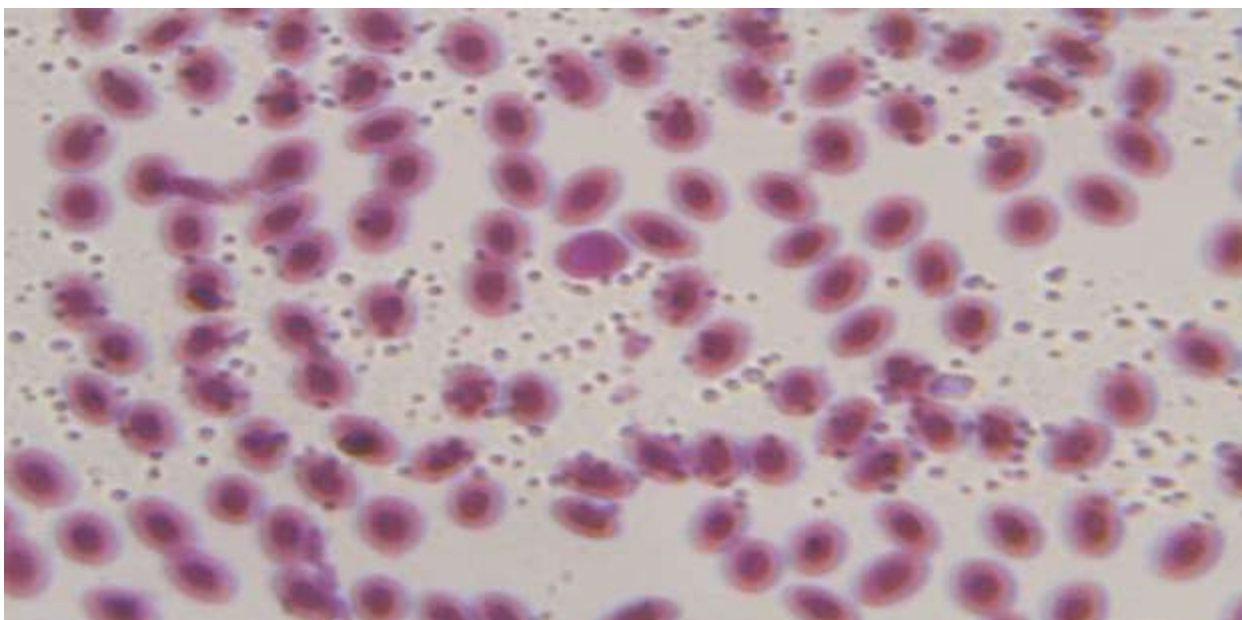


Рисунок 1.2 – Кровь птицы. Мазок. Лейкоциты. Эритроциты (увеличение в 40 раз)

Контрольные вопросы

1. Назовите органы кроветворения у птиц.
2. В чем проявляется особенность строения эритроцитов у птиц?
3. Чем компенсируется отсутствие лимфатических узлов у птиц?
4. Охарактеризуйте роль тимуса в кроветворении.

1.1 Морфология клеток

1.1.1 Эритроциты

Количество и размер эритроцитов (красные кровяные тельца) могут меняться не только в зависимости от вида птиц, но и у одного и того же вида, даже у одной и той же особи, в зависимости от сезона года. Например, у петухов породы леггорн в осенне-зимний период в одном миллилитре крови насчитывается 3,312 млн. эритроцитов, у петухов породы Род-Айланд – 3,333 млн. эритроцитов. В период с февраля по сентябрь их количество соответственно возрастает до 3,644 млн. и 3,585 млн. единиц.

Количество эритроцитов меняется в зависимости от возраста птицы: у цыплят до 5 дневного возраста в среднем их бывает 2,3 млн. единиц, к 3–4 месячному возрасту число эритроцитов достигает показателей взрослой птицы (Селянский В. М., 1972).

В нормальной картине крови птиц встречаются молодые формы эритроцитов – полихроматофильные эритроциты, отличительной особенностью которых является слабо базофильная (голубого цвета) цитоплазма вследствие недостаточной концентрации гемоглобина для оксифильной (ацидофильной) окраски (рис. 1.3) (Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2019).

В мазке нормальной крови эритроциты имеют сравнительно одинаковую форму. Размеры эритроцитов составляют в среднем 11–12 мкм по длинной оси и 6–8 мкм по короткой. У птицы они представляют собой вытянутые эллипсоиды с резко оксифильной цитоплазмой, насыщенной гемоглобином.

Ядро, которое образует двухстороннюю выпуклость, интенсивного синевioletового цвета с плотной структурой хроматина. Протоплазма эритроцитов птицы красится ацидофильно, ядро – базофильно (рис. 1.3) (Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2019).

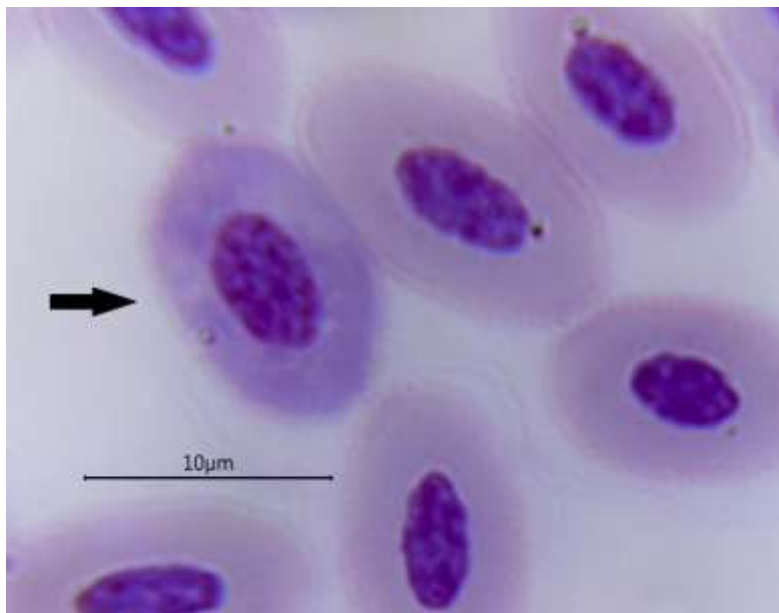


Рисунок 1.3 – Кровь птицы. Мазок. Зрелые эритроциты и полихроматофильный эритроцит (показан стрелкой), в ядрах различима структура хроматина (здесь и далее цена деления масштабной линейки десять микрометров (10 µm))

Количество эритроцитов у кур колеблется в пределах $3-4 \cdot 10^{12}$ единиц на один литр (Гусаков В. К., 2002). Эритроциты наполнены вязкой коллоидной жидкостью, состоящей на 60 % из воды и на 40 % из сухого вещества. В составе сухого вещества имеется 90 % гемоглобина, 5,8 % других белков и 4,2 % остальных веществ (липиды, глюкоза, минеральные вещества).

Функции эритроцитов заключаются в переносе кислорода от легких к тканям, участии в транспорте углекислого газа от тканей к легким, транспортировке питательных веществ, участии в поддержании кислотности крови на относительно постоянном уровне, адсорбировании на своей поверхности ядов и переносе к клеткам мононуклеарной системы фагоцитов (Герасименко В. В., 2011).

Увеличение в рационе количества лецитина (содержащегося в желтке яиц) и скармливание птицам печени способствует повышению количества

эритроцитов. Поступление большого количества воды в организм птицы и задержка ее в крови увеличивает объем плазмы, но количество эритроцитов остается прежним, и кровь в какой-то степени разжижается. Поэтому в одном миллилитре крови эритроцитов становится меньше. При уменьшении содержания воды, количество эритроцитов в единице объема крови увеличивается. Разжижение крови можно наблюдать в жаркие дни, при повышении температуры в птичниках, когда птицы много пьют и относительно мало принимают корма, а сгущение, – если птице при таких условиях не дают достаточного количества воды (Селянский В. М., 1972).

Данные по количеству эритроцитов в крови у разных видов птиц, приведены в таблице 1.7.

1.1.1.1 Гемоглобин

Гемоглобин – дыхательный пигмент крови, состоящий из белка глобина и протатической группы – гемма. Глобин по строению близок к альбумину, синтезируется в печени, представляет хелатный комплекс протопарферина с двухвалентным железом.

Основная функция гемоглобина – перенос кислорода от легких тканям. Гемоглобин участвует в транспорте углекислого газа из тканей в легкие, в поддержании кислотно-основного равновесия в организме, то есть обладает буферными свойствами. Он способен соединяться с оксидом углерода, образуя карбоксигемоглобин, а также с некоторыми химическими веществами с образованием метгемоглобина. Эти соединения не способны переносить кислород от легких тканям. Данные о концентрации гемоглобина в крови некоторых видов птиц представлены в таблице 1.3.

А. Kostelecka-Murcya et al. (1993) отмечают уменьшение концентрации гемоглобина в крови пропорционально увеличению массы тела у 22 видов изученных ими птиц массой от 6 до 170 г.

Таблица 1.3 – Концентрация гемоглобина в крови у некоторых видов птиц

Вид птицы	Концентрация гемоглобина, г%	Авторы
Фазан	13,2	П. А. Верболович, 1957
Тетерев-косач	16,3	
Петух	13,8	
Гусь дикий	15,8	
Гусь домашний	16,6	
Утка дикая	13,6	
Утка домашняя	14,9	
Баклан	15,5	
Сип белоголовый	13,9	
Коршун	17,9	
Гриф	13,0	
Орел-могильник	15,2	
Курица	7,3–9,7	О. К. Разбесов, 1977
Свиристель	16,7±0,8	Л. П. Шкляр, 1975
Снегирь	15,6±0,9	
Синица большая	16,6±0,21	
Журавль уссурийский	14,3±1,3 (12,6–16,8)	С. Hawkey et al., 1983
Журавль-красавка	14,9±1 (13,1–16,2)	
Журавль венценосный	15,6±1,9 (11,9–8,8)	
Журавль даурский	13,9	
Журавль канадский	16,2	
Журавль черный	15,8 (15,6–16)	
Журавль серый	16,7 (16,5–17,1)	
Скворец	8,3	Т. Н. Глазкова и соавт., 1979
Пингвин хохлатый	17,3	П. А. Коржуев и соавт., 1979
Чомга	10,8	
Поганка малая	7,8	
Баклан большой	6,9	
Баклан малый	7,3	
Гусь серый	5,7	
Гусь холмогорский	9,1	
Утка пекинская	6,2	
Кряква	6,9	
Утка серая	6,1	
Луток	11,5	
Свистуха	5,3	

Продолжение таблицы 1.3

Вид птицы	Концентрация гемоглобина, г%	Авторы
Нырок красноголовый	12,1	
Чернеть хохлатая	10,7	
Чернеть морская	12,0	
Индейка	8,9	
Цесарка	10,0	
Курица	7,7	
Лысуха	8,9	
Стрепет	4,8	
Цапля серая	2,4	
Выпь большая	7,8	

Гемоглобин (Hb) окрашен в красный цвет. Он относится к сложным белкам-хромопротеидам и состоит из белка – глобина и небелковой группы – гем, содержащей железо. Свойства гемоглобина обуславливаются как группой, содержащей железо, так и белковым компонентом (глобином). Количество гемоглобина в крови определяют колориметрическим методом (Селянский В.М., 1972).

Таблица 1.4 – Содержание гемоглобина в крови птиц в зависимости отвозраста и породы птицы (Селянский В. М., 1972)

Порода и пол птицы	Количество гемоглобина, грамм на 100 миллилитров крови
Петух породы белый леггорн	10,2
Курица	8,9
Цыпленок	6,7
Петушок в возрасте 4–6 месяцев	12,8
Куры породы Род-Айланд	9,4
Куры породы белый плимутрок	9,8
Цесарки, индейки, утки, гуси	12,5

Общая поверхность эритроцитов в крови кур составляет около 2600 м². Благодаря большой поверхности, эритроциты легко воспринимают кислород и способствуют быстрому установлению газового равновесия между гемоглобином и плазмой крови во время прохождения ее через легочные и тканевые капилляры.

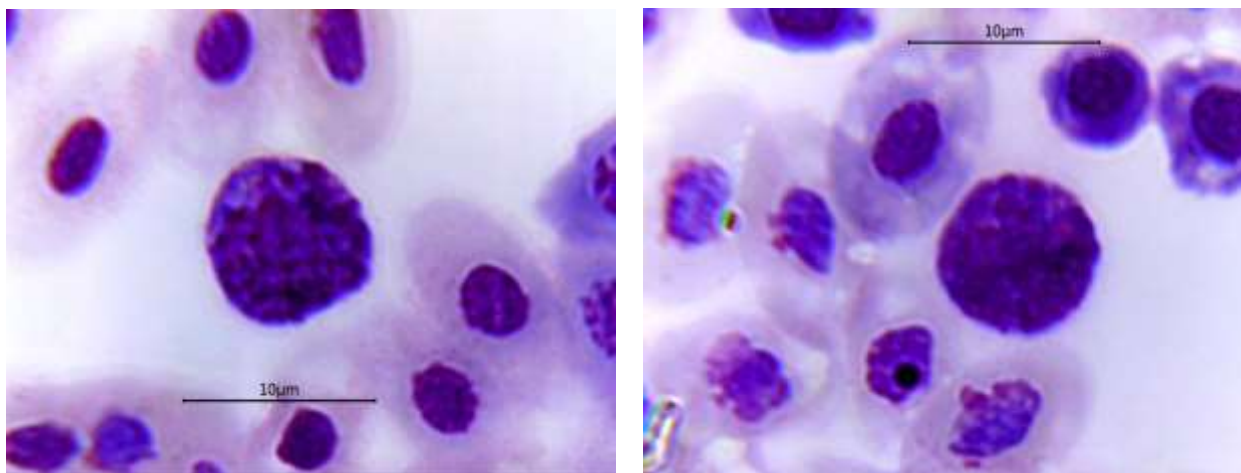
Содержание гемоглобина в эритроцитах обуславливает кислородную емкость крови. У птицы каждый грамм гемоглобина связывает 1,4–1,41 мл кислорода, у человека – 1,36 мл. Следовательно, кровь кур различного живого веса, содержащая 22–33 г гемоглобина, может связать при полном его окислении 30–46,2 мл кислорода, уток – 56–78,4, гусей – 168–182 мл (Селянский В. М., 1972).

1.1.2 Лейкоциты

Лейкоциты – белые кровяные клетки, которые имеют цитоплазму и ядро. Их подразделяют на две большие группы – **зернистые (гранулоциты)** и **незернистые (агранулоциты)**.

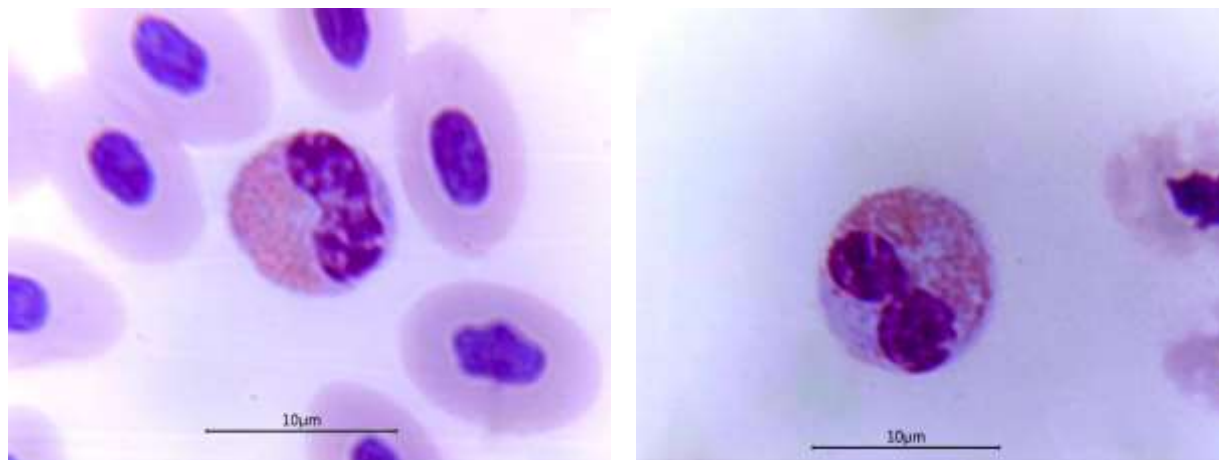
Зернистые лейкоциты содержат в цитоплазме зернышки (гранулы). К ним относятся **базофилы, эозинофилы и нейтрофилы**. Незернистые (агранулоциты) лейкоциты делятся на **лимфоциты и моноциты**.

Базофилы – сравнительно крупные, округлые клетки, размером 12–14 мкм в диаметре. В крови их содержится 1,0–3,0 %. Ядро базофилов округлое, овальное, палочковидное или сегментированное, просматривается плохо вследствие перекрытия базофильными гранулами. Цитоплазма и гранулы окрашены в фиолетово-синий цвет (рис. 1.4, 1.5) (Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2019). Эти клетки выделяют вещества, угнетающие рост вирусов, содержат гепарин, активируют обмен веществ в соединительной ткани, участвуют в реакциях иммунитета.



Рисунки: 1.4; 1.5 – Кровь птицы. Мазок. Базофилы. Обильные базофильные гранулы маскируют структуру ядра

Эозинофилы относятся к клеткам крупных размеров (10–14 мкм в диаметре). В крови их содержится от 6,0 до 10,0 %. В зрелых клетках ядро лежит эксцентрично, состоит чаще всего из двух сегментов, соединенных тонкой перемычкой, но бывают и палочкоядерные эозинофилы. Ядро окрашено в красно-фиолетовый цвет. Цитоплазма клеток нежно голубого цвета (рис. 1.6, 1.7) (Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2019).



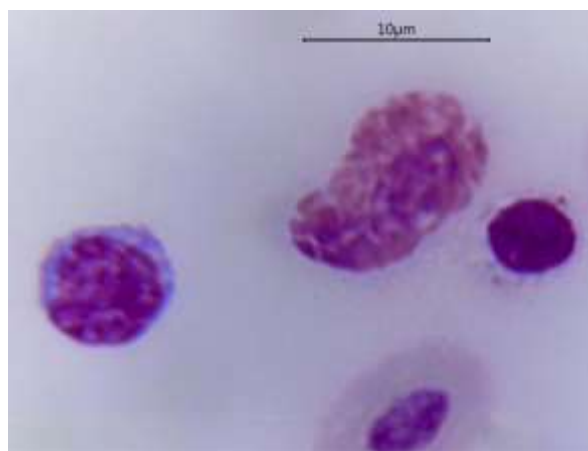
Рисунки: 1.6; 1.7 – Кровь птицы. Мазок. Палочкоядерный эозинофил и сегментоядерный эозинофил

Гетерофилы (корректный для птиц эквивалент наименования нейтрофилов млекопитающих; устаревший синоним – псевдоэозинофилы) – клетки с бесцветной цитоплазмой и сегментированным ядром, хроматином светло-фиолетового цвета, светло-розовой зернистостью в виде веретена с острым концом (Колесник Е. А., 2021).

Различают следующие гетерофилы (нейтрофилы):

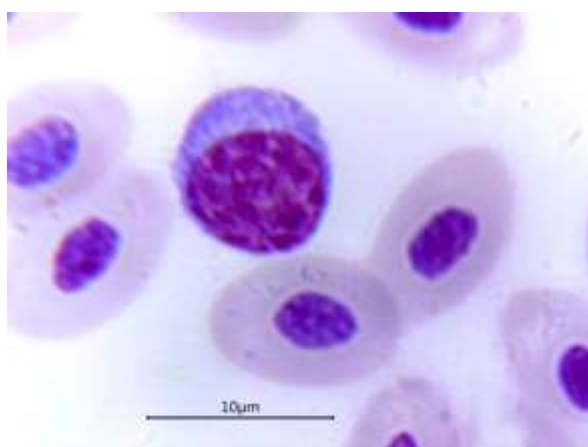
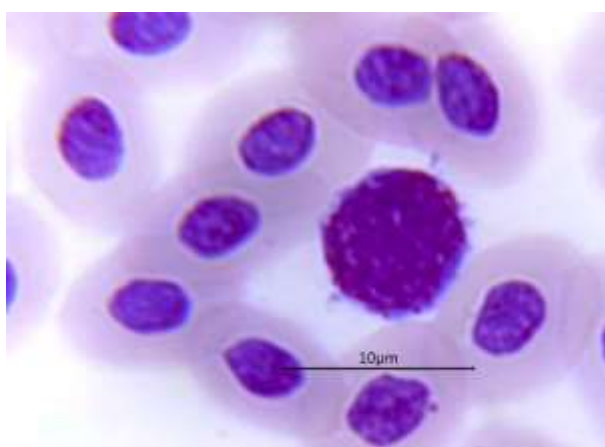
1) с круглыми гранулами (юные формы), которые напоминают эозинофилы, но крупнее их; края гранул кажутся несколько размытыми, окрашены в красный цвет; ядра имеют менее рельефный рисунок и окрашены менее интенсивно, чем у эозинофилов;

2) с палочковидной грануляцией в протоплазме; гранулы окрашены более интенсивно, чем у нейтрофилов с круглыми гранулами; ядра более пикнотичны; иногда имеются два ядра, расположенных у полюсов клетки (рис. 1.8, 1.9) (Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2019).



Рисунки: 1.8; 1.9 – Кровь птицы. Мазок. Сегментоядерные гетерофилы (нейтрофилы)

Клетки *лимфоцитов* имеют ядро, окрашенное в фиолетово-розовый цвет и цитоплазму голубого цвета. *Большие и средние лимфоциты* меньше юной формы, 6–9 мкм в диаметре, с более плотным ядром и более узким ободком цитоплазмы. *Малый лимфоцит* – зрелая клетка диаметром 5–8 мкм, с еще более плотным хроматином в ядре, чем у среднего лимфоцита (рис. 1.10, 1.11, 1.12) (Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2019).

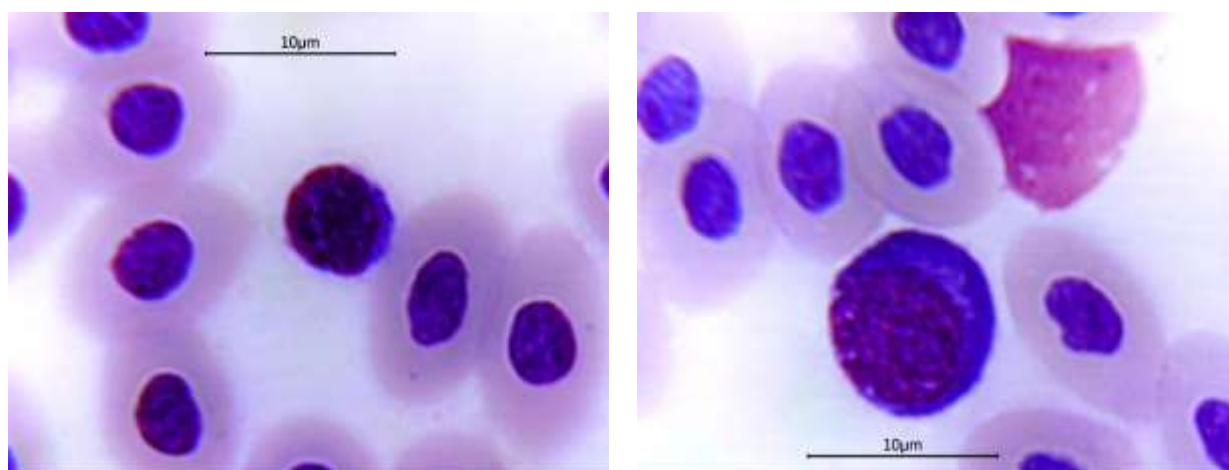


Рисунки: 1.10; 1.11 – Кровь птицы. Мазок. Большой узкоплазменный лимфоцит и большой широкоплазменный лимфоцит

Цитоплазма лимфоцита лишь в виде очень тонкого ободка покрывает ядро, часто на мазках может быть не видна вовсе. Лимфоциты в кровяном русле находятся до 2–6 часов. *Активно выходя в окружающие ткани, они участвуют в реакциях специфического иммунитета, являются предшественниками*

антитело образующих клеток – так называемых плазматических клеток или плазмоцитов (рис. 1.13). Характерными особенностями плазмоцитов являются эксцентрично расположенное ядро, перинуклеарное просветление (светлый ободок вокруг ядра) и насыщенно базофильная цитоплазма (рис. 1.13) (Колесник Е.А., Дерхо М.А., 2019).

Лимфоциты служат носителями иммунологической памяти, участвуют в местных аллергических реакциях и реакциях отторжения. Лимфоциты делятся на тимусзависимые Т-лимфоциты и бурсозависимыми В-лимфоциты. У птиц 60–65 % составляют Т-лимфоциты и 30–35 % В-лимфоциты.

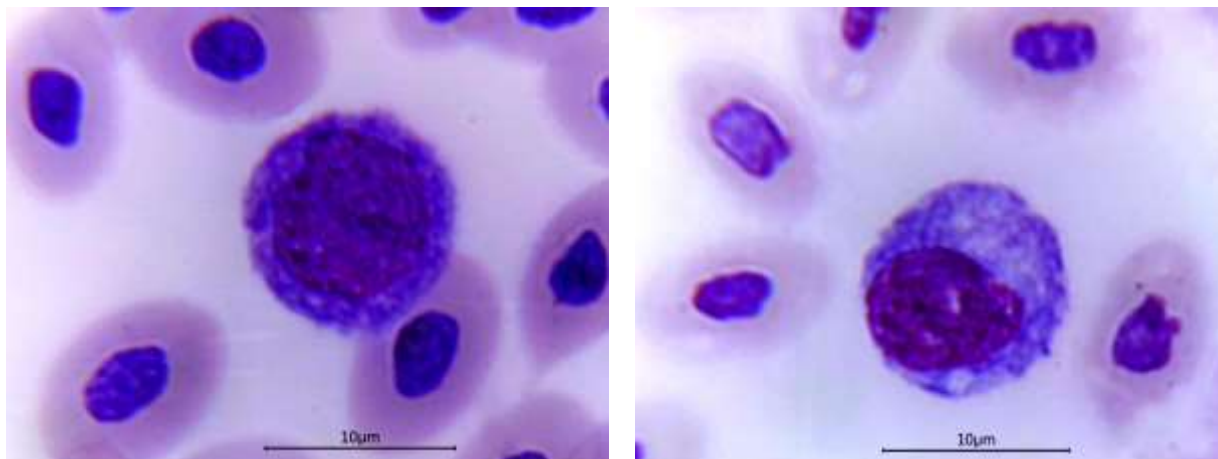


Рисунки: 1.12; 1.13 – Кровь птицы. Мазок. Малый лимфоцит и плазматический лимфоцит (плазмоцит)

Моноциты – самые крупные клетки крови, которых у кур 4–10 %. Ядро окрашено в розово-фиолетовый цвет. Клетки диаметром 10–17 мкм, с крупным ядром овальной, почковидной или подковообразной формы. Цитоплазма серо-голубого или серовато-синего цвета, довольно обширная, нередко с псевдоподиями (рис. 1.14, 1.15) (Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2019).

Моноциты в крови бывают короткое время. Функцию свою осуществляют в тканях, где их накапливается в 25 раз больше, чем в крови. Выходя в ткани, превращаются в истинные макрофаги, способные к амебоидному движению. *Они фагоцитируют и переваривают бактерии, чужеродные белки, отжившие клетки и их обломки.* В отличие от других клеток, зрелые

моноциты способны делиться, особенно находясь в очаге воспаления. Чтобы ознакомиться с различными формами лейкоцитов необходимо научиться приготавливать мазки крови и выводить лейкограмму (Кудрявцева Е. Н., 2002).



Рисунки: 1.14; 1.15 – Кровь птицы. Мазок. Моноциты

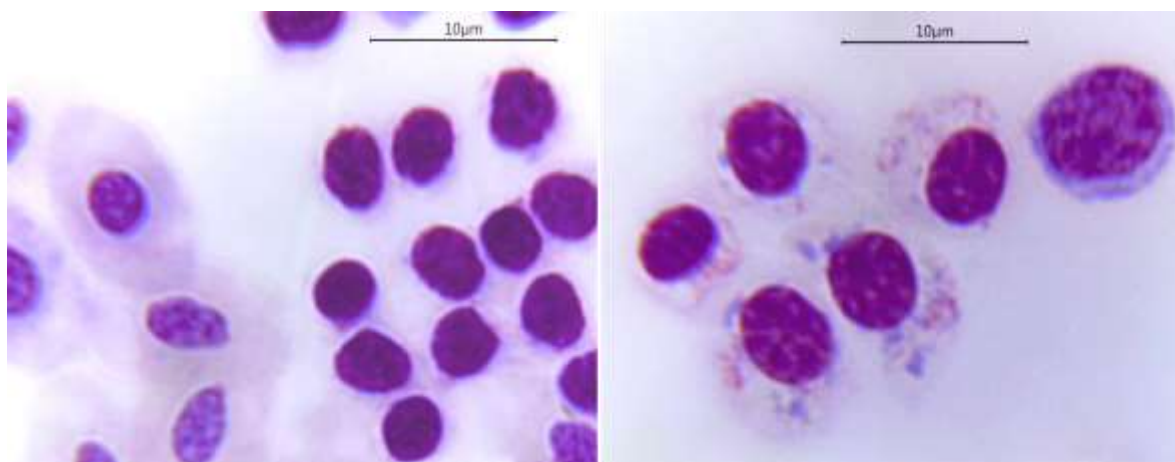
Данные по количеству лейкоцитов в крови у разных видов птиц приведены в таблице 1.12.

Для выявления патологических изменений в клетках крови, дифференциации лейкоцитов при выведении лейкограммы, определения молодых и атипичных клеток крови, используют окрашенные мазки. Окрашенным мазком пользуются для изучения величины, формы, окраски и структуры эритроцитов и детального ознакомления с белой кровью. Исследуют мазок под микроскопом с иммерсионной системой.

При дифференциации клеток обращают внимание на следующие морфологические признаки: величина клеток, форма клеток, соотношение ядро – цитоплазма (тем больше, чем моложе клетка), форма ядра, хроматиновая структура ядра, ядрышки (нуклеолы). Ядрышки (нуклеолы) содержатся в ядрах молодых, зародышевых клеток крови. Они круглой или овальной формы и окрашены в светло-синий или светло-фиолетовый цвет. В ядре зрелых клеток нуклеолы отсутствуют (Беляков И. М., 1979; Колесник Е. А., 2021).

1.1.3 Тромбоциты

Тромбоциты являются мелкими клетками. Они имеют округлую или веретенообразную форму с тупыми концами. Ядро тромбоцитов округлое, находится в центре, пикнотичное, с сетчатым плотным хроматином. У полюса ядро имеет 1–3 хроматиновых азурофильных зернышка. Ядро по Романовскому окрашено в сине-фиолетовый цвет, вокруг которого выделяется более светлая перинуклеарная зона. Цитоплазма окрашена в цвета от нежно-розового до серовато-голубого, может быть сравнительно широкой и включать различной формы ацидофильные и базофильные гранулы. Тромбоциты в мазке лежат группами (рис. 1.16, 1.17) (Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2019).



Рисунки: 1.16; 1.17 – Кровь птицы. Мазок. Тромбоциты. В узкоплазменной или широкоплазменной цитоплазме тромбоцитов видны ацидофильные и базофильные полиморфные гранулы

Тромбоциты участвуют в процессе свертывания крови, выделяя тромбоцитарные факторы. Служат строительным материалом для первичного тромба. Выделяют ретрактозимы, которые необходимы для уплотнения кровяного сгустка. Выделяют тромбоцитарный фактор роста, который стимулирует деление клеток. Тромбоциты укрепляют стенки кровеносных сосудов и переносят различные вещества (серотонин, АТФ, ферменты, гормоны и др.). Они обладают способностью к фагоцитозу, именно поэтому, в мазках тромбоциты могут иметь широкую цитоплазму (рис. 1.17) (Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2019).

Тромбоциты кур обычно немного меньше эритроцитов. Размеры их варьируют от 5,5 до 4,6*12,9 мкм (рис. 1.16, 1.17). В отличие от эритроцитов, форма клеток напоминает неправильный эллипс с небольшими выпячиваниями протоплазмы. Протоплазма окрашена в нежный серовато-голубой цвет. В ней встречаются отдельно лежащие или многочисленные гранулы (рис. 1.16, 1.17). Ядро тромбоцита может быть круглым, но чаще оно имеет форму неправильного овала. Ядро располагается в центре клетки или несколько эксцентрично, окрашено в розовато-фиолетовый цвет. Количество тромбоцитов у кур достигает $30-100 \cdot 10^9$ единиц на один литр крови. (Кудрявцева Е. Н., 2002).

Данные по количеству тромбоцитов в крови у разных видов птиц приведены в таблице 1.12.

Контрольные вопросы

1. Какие факторы влияют на количественное содержание эритроцитов в крови птицы?
2. Перечислите функции эритроцитов.
3. Дайте определение «кислородная емкость крови».
4. Назовите особенности строения лимфоцитов у птицы.
5. Какие морфологические признаки лейкоцитов имеют дифференциальное значение?
6. Назовите особенности морфологии тромбоцитов кур.

1.2 Порядок взятия крови у птицы

Существует несколько способов взятия крови у птицы – из вены на ноге, из вены на крыле, из яремной вены и когтя.

Проще всего взять кровь из когтя, но это довольно болезненно, и кровь может быть загрязнена пометом или едой. Обычно кровь из когтя течет медленно, и часто красные кровяные клетки в таких пробах успевают разрушиться, что влияет на результаты анализа. Вена на крыле и вена на ноге – хорошие места для взятия крови, но они быстро схватываются, что не очень хорошо для животного, находящегося в стрессе.

Большой объем крови лучше брать из яремной вены на шее. У большинства видов эта вена довольно крупная, и из нее удобно брать кровь. Обычно правая вена больше левой, и ее можно увидеть на большом бесперьевом участке кожи над зобом, на правой стороне шеи. Забор крови из яремной вены возможен у большинства видов, включая маленьких птиц, вроде канареек и волнистых попугаев, но затруднен у голубей, так как у них довольно диффузное сплетение вен вместо одной большой (Linda P., 1993; Margaret A., 2006; Branson W., 1994; James W., 2004).

Взятие крови у эмбрионов птицы. Перед взятием крови, эмбрион, вынутый из инкубатора, просматривают на овоскопе, находят самый крупный сосуд и карандашом на скорлупе отмечают место взятия крови. В отмеченном месте осторожно с помощью ножниц и пинцета снимают скорлупу, разрезают подскорлупную оболочку и пипеткой осторожно отсасывают аллантоисную жидкость. При этом объем содержимого яйца уменьшается и обеспечивается возможность свободного поднятия кровеносного сосуда на скорлупу у места вскрытия. Чтобы избежать попадания аллантоисной жидкости в пробу крови, кровеносный сосуд подсушивают фильтровальной бумагой, а затем разрезают ножницами (Садовников Н.В. и соавт., 2009).

Объем крови, который безболезненно можно забрать у птицы, зависит от ее размера и состояния здоровья. Обычно здоровая птица может потерять до 10 % от общего объема крови без каких-либо проблем (общий объем кровисоставляет примерно 10 % от массы тела птицы). Например, при массе птицы 500 г, объем ее крови составит 50 мл, что означает, что для анализа можно взять 5 мл (Linda P., 1993; Margaret A., 2006; Branson W., 1994; James W., 2004).

Взятие крови из гребня. Для подсчета форменных элементов требуется всего несколько капель крови. У птицы их можно получить из сережки или гребня (Ромейс Б., 1953). Перед взятием крови птица фиксируется двумя руками за крылья и конечности, или завертывается в полотенце. Для каждого препарата нужно брать свежую выступившую каплю крови, стирая остатки предыдущей.

На месте предполагаемого разреза или укола тщательно удаляют перья. Кожу дезинфицируют, обезжиривают (сначала протирают ватой со спиртом, затем эфиром) и высушивают. Затем проводят укол глубиной 2–3 мм кончиком скальпеля или иглой. Первую выступившую каплю крови вытирают. Затем набирают кровь в меланжер для подсчета лейкоцитов, затем в меланжер для подсчета эритроцитов и, наконец, на предметных стеклах делают мазок. Выдавливать каплю крови на месте укола не следует, так как в этом случае на поверхность кожи выходит больше плазмы и меньше форменных элементов. После каждой манипуляции остатки крови стирают ватой (Бойко В. И. 1958). **Для исследования биохимических или морфологических показателей кровь берут из вены.** Птицу фиксируют в спинном положении (рис. 1.18) и производят взятие крови. Кровь берут из подкрыльцовой вены (cutanea ulnaris), на внутренней стороне крыла над локтевым сочленением, в количестве два миллилитра.

При этом перо выдергивают, вену сдавливают пальцем в участке локтевого сустава, прокол делают под углом локтевого изгиба, соблюдая правила

асептики и антисептики. После взятия крови место пункции на несколько минут зажимают сухим стерильным тампоном.

Для того, чтобы меньше стрессировать птицу можно выполнять взятие крови из большой плюсневой вены (рис. 1.19). Внутренняя, или большая плюсневая вена проходит по медиальной поверхности плюсны, ближе к плантарному краю, располагаясь непосредственно под кожей. Не доходя 1–1,5 см до метадорзального сустава, вена направляется косо вперед и вверх на переднюю поверхность сустава. На этом участке она ясно выступает под кожей в виде косога валика. Этот участок и рекомендуется для взятия крови.

С внутренней стороны плюсны любой конечности, приблизительно на один сантиметр ниже метатарзального сустава, после предварительного очищения и обработки спиртом, обычной препаровальной иглой прокалывается кожа и одновременно вена, при этом иглу пропускают не более чем на один миллиметр. При необходимости получить сравнительно большое количество крови место прокола кожи протирают антикоагулянтом, а стопу птицы массируют. Вытекающую кровь собирают путем прикладывания пробирки или другой посуды к ранке кожи. После отбора крови место укола прижимается ватным тампоном, смоченным йодом.

Для морфологических исследований рекомендуют специальные вакуумные пробирки, где в качестве антикоагулянта используется ЭДТА – фиолетовая крышка (стерильные вакуумные пробирки, объемом 4,0 мл, Jiangxi Hongda Medical Equipment Group Ltd, 39, China). Для биохимических исследований рекомендуют пробирки с литий-гепарином (зеленая крышка) или с активатором свертывания (красная крышка).

Сразу после взятия крови пробирку следует медленно перевернуть шесть – восемь раз для полного смешивания крови с реагентами. Пробу крови для отделения форменных элементов от плазмы или сыворотки центрифугируют при скорости 3 000 оборотов в минуту в течение 3 минут. Желательно взятие крови выполнять в утренние часы перед кормлением.



Рисунок 1.18 – Взятие крови из подкрыльцовой вены у бройлера



Рисунок 1.19 – Взятие крови из большой плюсневой вены у цыплят-бройлеров

Получение сыворотки крови у птицы. Кровь у птицы следует брать натошак, без ограничения питьевой воды, в возрасте 1–20 дней тотально, а с 30-дневного возраста – из подкрыльцовой вены без шприца по 5–6 мл индивидуально в стерильные пробирки. Важно, чтобы кровь не подвергалась резким температурным колебаниям. Поэтому взятие крови лучше проводить в помещении при температуре выше 20 °С. После свёртывания сгусток крови необходимо обвести по внутреннему краю пробирки тонкой спицей и отстаивать сыворотку в течение 15–20 минут в термостате или водяной бане при температуре 39 °С.

Если в помещении температура меньше 20 °С, то пробирки с кровью после её взятия сразу же помещают в термос или в сосуд с тёплой водой (39 °С), затем в термостат на 15–20 минут при температуре 39 °С, после чего кровь оставляют на отстаивание сыворотки при комнатной температуре не менее одного часа.

Исследование сыворотки крови следует проводить в течение суток после взятия крови. Определение показателей естественной резистентности организма птицы необходимо проводить с учётом возраста, породы, особенностей кормления, содержания птицы и ветеринарно-санитарных мероприятий, проводимых в птицеводческих хозяйствах (Садовников Н. В., 2009).

Практические задания

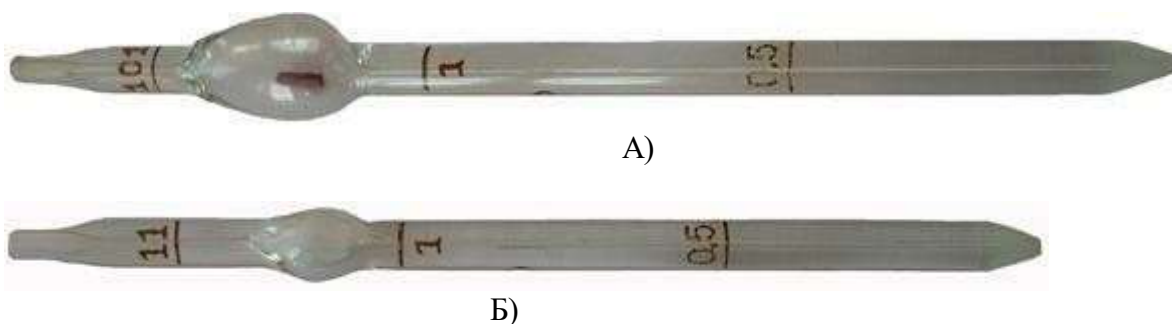
1. Определите на курице основные сосуды, которые используют для забора крови.
2. Отработайте технику взятия крови из подкрыльцовой вены у кур.

1.3 Подсчет клеток крови

Взятие крови осуществляют с помощью специальных смесителей. Смеситель представляет собой капилляр с ампулообразным расширением. В ампуле находится стеклянная бусинка для перемешивания разведенной крови (в меланжере для подсчета эритроцитов – бусинка красного цвета, лейкоцитов – прозрачная.) На капиллярах нанесена градуировка – метки 0,5 и 1,0. Третья метка находится над ампулой: для подсчета эритроцитов – 101, лейкоцитов – 11 (рис. 1.20).

Для подсчета эритроцитов в меланжер набирают кровь до метки 0,5 или 1,0 и раствор до метки 101. При этом кровь разбавляется в 200 или в 100 раз. В меланжер для подсчета лейкоцитов набирают кровь до метки 0,5 или 1,0, а раствор до метки 11, при этом кровь разбавляется в 20 или в 10 раз.

В качестве разбавляющего раствора для подсчета эритроцитов применяют 3-процентный раствор хлорида натрия, так как в гипертоническом растворе эритроциты сморщиваются и становятся заметнее. При подсчете лейкоцитов кровь разбавляют 5-процентным раствором уксусной кислоты. Она растворяет оболочки форменных элементов, и в поле зрения остаются только ядра лейкоцитов. Уксусную кислоту подкрашивают метиленовым синим, при этом ядра лейкоцитов становятся видны отчетливее.



- А) при подсчете форменных элементов эритроцитов;
Б) при подсчете форменных элементов лейкоцитов

Рисунок 1.20 – Меланжеры для разбавления крови

Следует отметить, что в лабораториях кровь разбавляют не только в смесителях, но и в пробирках. Для этого в пробирку сначала наливают разбавляющий раствор (для подсчета эритроцитов в объеме 4 мл, а лейкоцитов – 0,4 мл), затем добавляют в него 0,02 мл крови. После раствор и кровь тщательно перемешивают, и разведенной кровью (1:200 и 1:20 соответственно) заполняют счетную камеру (Роскин Г. И., 1946).

1.3.1 Устройство счетной камеры Горяева и подсчет в ней клеток крови

Камера Горяева представляет собой специальное устройство для подсчета форменных элементов крови. На ее поверхности нанесена сетка, разделяющая пространство на квадраты: большие и маленькие. Это толстое прямоугольное стекло с двумя сетками, выгравированными на его поверхности (рис. 1.21).



Рисунок 1.21 – Камера Горяева

Сетки отделены одна от другой поперечной канавкой, во избежание затекания жидкости. Двумя глубокими продольными канавками сетки отделены от стеклянных прямоугольных пластинок, к которым притирают шлифованное покровное стекло. Плоскость поверхности этих пластинок находится на 0,1 мм выше плоскости, в которой нанесены сетки. Камера состоит из 225 больших квадратов (рис. 1.22). Сто больших квадратов не разлинованы; 25 – разделены, каждый из которых на 16 малых квадратов объемом 1/4 000 мкл.

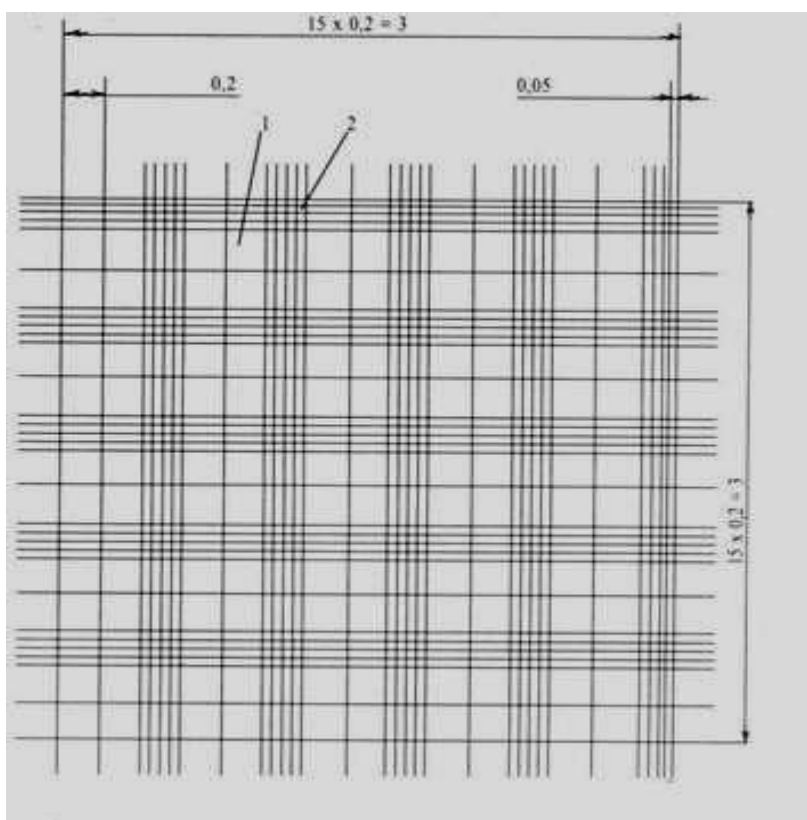


Рисунок 1.22 – Сетка Горяева

Камеру перед заполнением промывают водой и насухо вытирают. На участок камеры, где нанесены сетки, укладывают обезжиренное покровное стекло. При этом нижняя поверхность камеры должна находиться на третьих пальцах обеих рук, двумя вторыми пальцами ее придерживают спереди. Двумя пальцами притирают покровное стекло, плавно продвигая его по поверхности

прямоугольных пластинок, до появления цветных колец Ньютона в местах соприкосновения покровного стекла с поверхностью пластинок камеры.

Каплю исследуемой жидкости пипеткой помещают перед щелью, образованной покровным стеклом и пластинкой камеры Горяева с нанесенной сеткой. Капля должна заполнить камеру самотеком (под действием капиллярных сил). Необходимо следить, чтобы в пространстве над сеткой не было пузырьков воздуха и избытка жидкости.

До начала подсчета следует оставить счетную камеру на одну – две минуты для осаждения форменных элементов. Камеру кладут на столик микроскопа, который настраивают на малое увеличение (объектив 8–9, окуляр 10 или 15). Подсчет производят при несколько опущенном конденсоре (Георгиевский В. И., 1976). Во избежание двукратного подсчета клеток, находящихся на линиях сетки, пользуются правилом буквы «Г»: считают клетки, относящиеся к данному квадрату и лежащие внутри квадрата и на левой и на верхней границе; клетки, пересекающие правую и нижнюю границу, не подсчитывают.

Принцип метода состоит в удобной для использования уменьшенной концентрации форменных элементов для подсчета эритроцитов в камере Горяева (Георгиевский В. И., 1976).

Эритроциты и тромбоциты птицы в отличие от эритроцитов и тромбоцитов животных содержат ядро, которое раствор уксусной кислоты (жидкость Тюрка) не разрушает, что препятствует подсчету лейкоцитов. Подсчет эритроцитов и лейкоцитов осуществляют одновременно в камере Горяева по общепринятой методике.

Для окрашивания используют окраску по Фриеду и Лукачевой в модификации И.А. Болотникова (0,9 г хлорида натрия, 3,35 г хлорида кальция, 90 мл дистиллированной воды, 6 мл краски Гимза, 3 мл однопроцентного спиртового раствора метилвиолета, 1 мл 12-процентного формалина). Кровь разводят этой краской в меланжере для эритроцитов.

Лейкоциты окрашиваются в фиолетовый цвет, а эритроциты остаются неокрашенными.

В проведенных нами исследованиях, мы изменили количественные соотношения солей: 0,08 г хлорида натрия, 0,4 г хлорида кальция, 9 мл дистиллированной воды, 0,6 мл краски Гимза, 0,3 мл однопроцентного спиртового раствора метилвиолета и 0,1 мл 12-процентного формалина, разведенного солевым раствором хлорида натрия и хлорида кальция.

Это позволило сделать прокрашивание клеток более мягким, а деформацию эритроцитов свести к минимуму. После разведения крови краской, раствор оставляли на 15 минут, для лучшего прокрашивания. Перед заполнением камеры раствор встряхивался (аккуратным перемешиванием в течение 30 секунд). Далее заполняли камеру Горяева, оставляли на 2 минуты (для прекращения движения клеток) и производили подсчет (рис. 1.23).

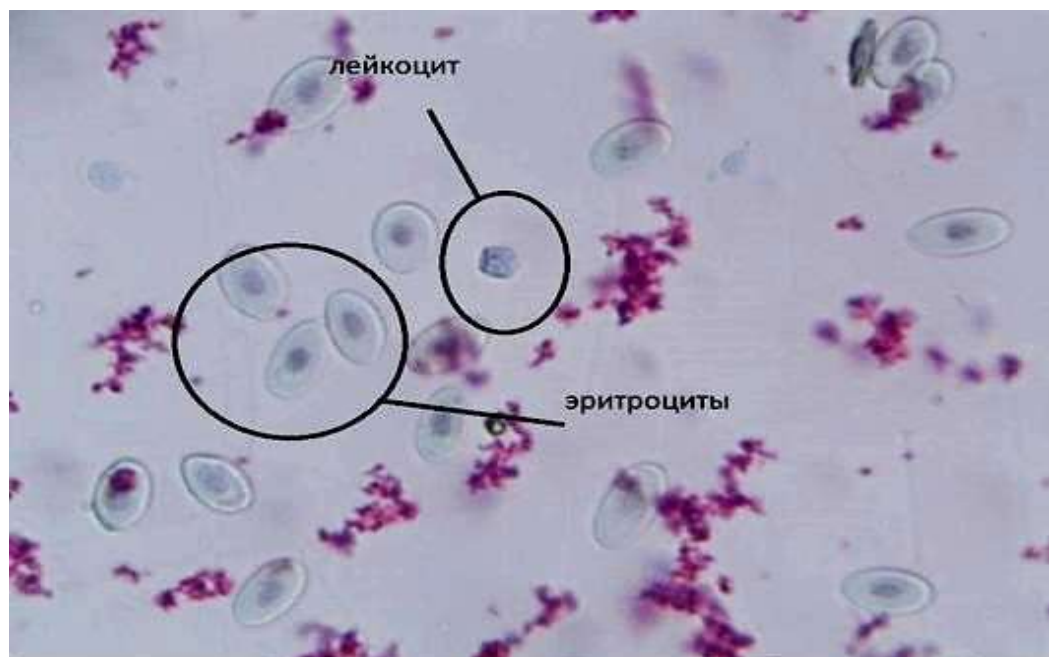


Рисунок 1.23 – Эритроциты и лейкоциты крови цыплят-бройлеров

В лаборатории физиологии Федерального научного центра «Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства» Российской академии наук разработан метод окраски форменных элементов крови для подсчета в камере Горяева.

Состав красителя включает азур-эозин по Романовскому. При растворении он представляет собой глицерино-метанольный раствор, содержащий 5-процентную смесь азур-эозина по Романовскому сухого и азура П.

Так как реактив азур-эозин по Романовскому в растворе – огнеопасен и токсичен, следует соблюдать правила безопасной работы: работу проводить под тягой при хорошо действующей вентиляции, в перчатках, вдали от открытого огня. При попадании красителей в глаза или на слизистые промывать их большим количеством воды.

Приготовление красящего раствора с красителем азур-эозин включает:

1. Приготовление физиологического раствора. На аналитических весах взвешивают навеску 0,9 г хлорида натрия. Помещают навеску в мерную колбу вместимостью 100–200 мл и растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

2. Смешивают 150 мкл (0,15 мл) красителя азур-эозин и 45 мл полученного физиологического раствора.

Для проведения определения 4 мл полученного красящего раствора помещают в пробирку и добавляют 20 мкл (0,02 мл) крови. Этим раствором клетки крови окрасятся в течение 2 минут, после чего его помещают в камеру Горяева для исследования.

Окраска форменных элементов крови азур-эозином по Романовскому в растворе выглядит следующим образом:

- 1) ядра эритроцитов окрашиваются в бирюзовый цвет;**
- 2) цитоплазма лейкоцитов окрашивается в вишнево-фиолетовый или голубой цвет;**

3) тромбоциты окрашиваются в коричневый цвет.

Техника подсчета в камере Горяева. Каплей разведенной крови заполняют счетную камеру Горяева и после осаждения в камере подсчитывают клетки под микроскопом. Сетка Горяева разделена на 100 больших (по 4 квадрата вместе) и 400 малых квадратов (по 16 квадратов вместе). Площадь малого квадрата равна $1/400 \text{ мм}^2$, объем – $1/4 \text{ 000 мм}^3$. Большие квадраты по площади соответствуют 16 малым. Малые квадраты служат для подсчета эритроцитов, большие – для подсчета лейкоцитов.

Считают эритроциты в 80 маленьких квадратах (5 больших квадратов). Подсчету подлежат в каждом маленьком квадрате эритроциты, находящиеся внутри него, а также замкнутые полностью или частично верхней и левой границами квадрата. При этом не считают клетки, касающиеся правой и нижней границ квадрата. Для подсчета берут большие квадраты, лежащие по диагонали. Число эритроцитов, подсчитанных в каждом маленьком квадрате, складывают и получают их общее количество (рис. 1.24) (Садовников Н. В., 2009).

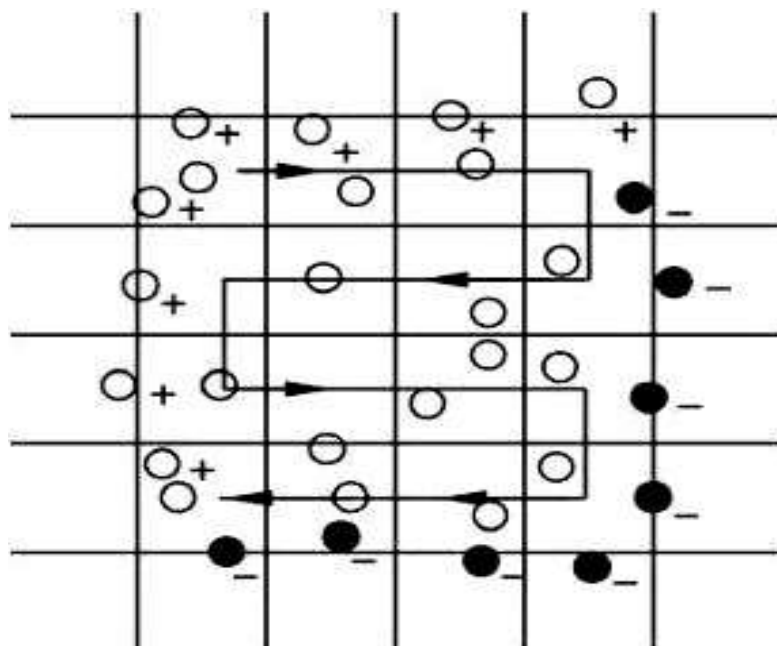


Рисунок 1.24 – Порядок подсчета эритроцитов

Подсчет количества эритроцитов в 1 миллилитре крови ведут по формуле(1.1):

$$X = \frac{A * 4\ 000 * B}{b} \quad (1.1)$$

где X – число эритроцитов в одном миллилитре крови;

a – число эритроцитов, подсчитанных в 80 квадратах;

b – степень разведения крови;

b – число сосчитанных квадратов.

Для того, чтобы найти количество эритроцитов в одном литре крови, необходимо полученный результат умножить на 10^6 .

Если количество эритроцитов выше нормы, то это явление называется эритроцитоз, а если меньше, – эритропения или анемия. *Увеличение количества эритроцитов в крови (эритроцитоз) встречается при гемоконцентрации (ложный эритроцитоз), а также при усилении эритропоэза на фоне неизменной интенсивности гемолиза (истинный эритроцитоз). Уменьшение количества эритроцитов в крови может наблюдаться при гемодилуции (ложная эритропения)* (Георгиевский В. И., 1976).

У птицы безъядерные эритроциты присутствуют в большем, чем у низших позвоночных, количестве, имеют овально-вытянутую форму обычного эритроцита, реже – округлую, присущую безъядерным эритроцитам млекопитающих. Иногда вместо ядра видны лишь его отдельно лежащие фрагменты.

По мнению И. А. Болотникова, Ю. В. Соловьева (1980), одними из механизмов освобождения эритроцитов от собственного ядра являются кариорексис и кариолизис. Среди зрелых эритроцитов птицы изредка появляются двуядерные клетки, размеры их сопоставимы, цитоплазма оксифильна. В некоторых случаях отмечены клетки с неправильным

Морфо-биохимические исследования крови у сельскохозяйственной птицы
ядром, самых причудливых очертаний. Считается, что генетический материал эритроцитов птицы является неактивным (зарепрессированным), доказательством чего служит отсутствие в ядре диффузного хроматина (эухроматина) и ядрышек, где должен происходить (но у птицы не происходит) синтез различных видов РНК (Газарян К. М. и соавт., 1971; Cameron J., Prescott D., 1963; Scherrer K. et al., 1966).

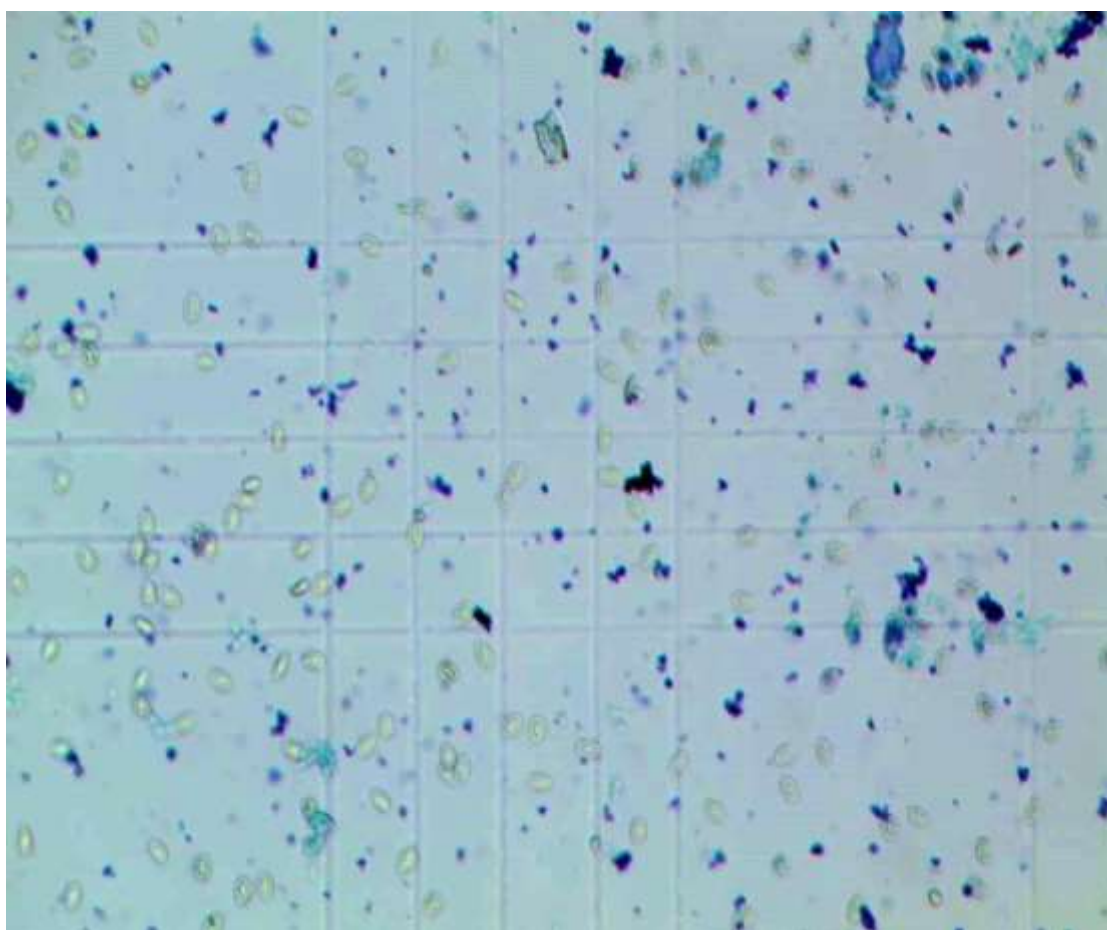


Рисунок 1.25 – Камера Горяева. Эритроциты. Куры –несушки (увеличение в 10 раз)

Данные об эритроцитарных индексах крови некоторых видов птиц представлены в таблице 1.5.

Таблица 1.5 – Эритроцитарные индексы крови у некоторых видов птиц
(Гильмутдинов Р. Я., 2005)

Вид птицы	Авторы	Эритроцитарные индексы			
		MCV, мкм ³	МСН, пг	МСНС, %	
Курица		84,0 ±1,4	-	-	
Свиристель	Л. П. Шкляр, 1975	109,5±4,4	40,3±1,3	37,1±0,8	
Снегирь		94,9±0,6	34,9±1,7	37,2±1,8	
Синица большая		126,4±3,4	42,8±1,3	34,4±0,6	
Фазан		116,7	54,9	47,0	
Тетерев-косач	П. А. Верболович, 1957	127,4	52,7	41,3	
Петух		116,8	43,1	36,9	
Гусь дикий		146,0	61,0	41,8	
Гусь домашний		146,0	63,7	43,7	
Утка дикая		156,4	56,4	36,1	
Утка домашняя		152,2	59,7	39,2	
Баклан		156,1	62,3	39,9	
Беркут		142,0	61,8	43,5	
Сип белоголовый		151,1	60,4	40,0	
Коршун		170,6	77,9	45,6	
Гриф		193,2	70,4	36,4	
Орел-могильник		191,3	65,9	34,4	
Журавль уссурийский		С. Hewkey et al., 1983	191,1±8,6 (180,3-203,7)	54,8±4,5 (56-68,8)	34,3±1,5 (32,7-37,2)
Журавль-красавка			162±6,6 (154-172)	55,6±2,4 (51,5-60)	34,3±1,1 (32,6-36,2)
Журавль венценосный	171,2±7,4 (156,5-181,8)		64,3±3 (59,8-70,2)	36,2±2,3 (34,5-39,2)	
Журавль даурский	195,6		62,9	32,3	
Журавль канадский	164,3		57,9	35,2	
Журавль черный	177 (175-179)		66,1 (65,4-66,7)	37,3 (37,2-37,4)	
Журавль серый	177 (173-186)		62,1 (55-67,6)	34,9 (31,7-36,3)	

Примечание: MCV – объем эритроцитов в крови, мкм³; МСН – среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг; МСНС – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, %.

Практические задания

1. Ознакомьтесь с оборудованием и приборами, которые применяют для подсчета форменных элементов крови.
2. Под микроскопом при малом увеличении рассмотрите счетную камеру Горяева (обратите внимание на расположение больших и малых квадратов).
3. Ознакомьтесь с техникой приготовления растворов, используемых в морфологическом анализе крови.

1.3.1.1 Подсчет количества эритроцитов колориметрическим способом

Стабилизированную кровь набирают в капилляр Сали (0,02 мл) и вносят в пробирку с 4 мл 3-процентного раствора хлорида натрия. Капилляр промывают этим же раствором дважды. Пробирки с содержимым встряхивают и оставляют в штативе на 30–40 минут. Определение количества эритроцитов производят на фотоэлектрическом колориметре при красном светофильтре (длина волны 625–700 нм).

В кювету на 3 мм³ наливают исследуемый раствор и определяют его экстинкцию против 3-процентного раствора хлорида натрия (Кудрявцева Е. Н., 2002). Результаты определяются по калибровочной таблице 1.6.

Таблица 1.6 – Содержание эритроцитов в одном литре крови кур (10^{12} на литр)

Экстинкция раствора	Количество эритроцитов у кур, $10^{12}/л$	Экстинкция раствора	Количество эритроцитов у кур, $10^{12}/л$	Экстинкция раствора	Количество эритроцитов у кур, $10^{12}/л$
0,3	1,69	0,43	2,26	0,56	2,97
0,31	1,64	0,44	2,31	0,57	3,03
0,32	1,69	0,45	2,37	0,58	3,08
0,33	1,74	0,46	2,42	0,59	3,12
0,34	1,79	0,47	2,47	0,60	3,18
0,35	1,85	0,48	2,52	0,61	3,23

Продолжение таблицы 1.6

Экстинкция раствора	Количество эритроцитов у кур, $10^{12}/л$	Экстинкция раствора	Количество эритроцитов у кур, $10^{12}/л$	Экстинкция раствора	Количество эритроцитов у кур, $10^{12}/л$
0,36	1,9 0	0,49	2,57	0,62	3,29
0,37	1,9 5	0,50	2,63	0,63	3,35
0,38	2,0	0,51	2,69	0,64	3,46
0,39	2,0 5	0,52	2,74	0,65	3,51
0,40	2,1 1	0,53	2,8	0,66	3,57
0,41	2,1 6	0,54	2,85	0,67	3,62
0,42	2,2 1	0,55	2,91	0,68	3,67
				0,69	3,73
				0,70	3,78

П. А. Верболович (1957) представил количество эритроцитов в крови уразличных видов птиц (табл. 1.7).

Таблица 1.7 – Количество эритроцитов в крови у некоторых видов птиц

Вид птицы	Эритроциты, $*10^6/мм^3$
Фазан	2,4
Тетерев-косач	3,1
Петух	3,2
Гусь дикий	2,6
Гусь домашний	2,6
Утка дикая	2,4
Утка домашняя	2,5
Баклан	2,8
Беркут	2,5
Сип белоголовый	2,3
Коршун	2,3
Гриф	1,8
Орел-могильник	2,3
Курица	$1,7 \pm 0,5 - 2,8 \pm 0,5$ (* $10^{12}/л$)

В ряду видов птиц рекордсменом по количеству эритроцитов является петух – $3,2 \cdot 10^6 / \text{мм}^3$ и тетерев-косач – $3,1 \cdot 10^6 / \text{мм}^3$.

Изменения в количестве эритроцитов и гемоглобина имеются также у птиц одного, но разных продуктивных направлений. В таблице 1.8 представлены данные по курам мясного и яичного направления.

Таблица 1.8 – Содержание эритроцитов и гемоглобина у мясных и яичных кур (Герасименко В. В., 2011)

Показатель	Направление продуктивности кур	
	мясные	яичные
Эритроциты, $\cdot 10^{12}/\text{л}$	4,20–4,38	1,86–3,24
Гемоглобин, г/л	88,7–91,3	95,4–98,2

Из данных таблицы видно, что мясные куры по количеству эритроцитов превосходят яичных на 40,56 %, но по содержанию гемоглобина показатель ниже, чем у яичных кур на 7,03 %.

Практические задания

1. Ознакомьтесь с техникой разведения крови в меланжере для подсчета количества эритроцитов.
2. Подготовьте счетную камеру Горяева.
3. Определите количество эритроцитов в одном миллилитре крови кур и сравните полученные данные с табличными показателями нормы.

1.3.2 Подсчет количества лейкоцитов

Лейкоциты – бесцветные клетки с ядром. В одном миллилитре крови содержится лейкоцитов у кур – 22–34 тыс., индеек – 32–34 тыс., уток – 34–35 тыс., гусей – 37,9–38,6 тыс. *Количество лейкоцитов может меняться в зависимости от условий содержания, породных и видовых особенностей птицы и других причин. Число лейкоцитов повышается при различных заболеваниях, после приема корма и усиленной мышечной работы* (Селянский В. М., 1972).

При определении количества лейкоцитов пользуются методом подсчета эритроцитов, но с некоторыми изменениями. Кровь разводят в 10 или в 20 раз смесителе для лейкоцитов. Дистиллированная вода вызывает разрушение эритроцитов. Ледяная уксусная кислота придает прозрачность протоплазме лейкоцитов. Краска (генцианвиолет) окрашивает ядра лейкоцитов в фиолетовый цвет.

В пробирку вносят 0,4 мл жидкости Тюрка (100 миллилитров 1–3-процентного раствора ледяной уксусной кислоты и один миллилитр однопроцентного раствора метиленового синего) и капиллярной пипеткой 0,02 мл крови. Содержимое пробирки аккуратно перемешивают.

Лейкоциты подсчитывают не менее чем в 25 больших квадратах, начиная с левого верхнего угла сетки и далее сверху вниз, по диагонали направо (20 квадратов) – четыре квадрата в верхнем правом углу и один квадрат в левом нижнем углу. Клетки подсчитывают в 25 квадратах и умножают на два. Количество лейкоцитов у всех видов птиц по сравнению с млекопитающими животными в несколько раз выше и колеблется в широких пределах (от 20 до 40 тысяч в одном миллилитре крови) (Садовников Н. В., 2009).

Вычисляют количество лейкоцитов в одном миллилитре крови по формуле (1.2):

$$= a * 250 * \frac{в}{б} \quad (1.2)$$

где X – количество лейкоцитов в одном миллилитре крови;

a – общее количество лейкоцитов, подсчитанных в 25 больших квадратах;

250 миллилитров – объем одного большого квадрата;

$в$ – степень разведения крови;

$б$ – количество больших квадратов, в которых подсчитывались лейкоциты

(Бойко В. И., 1958).

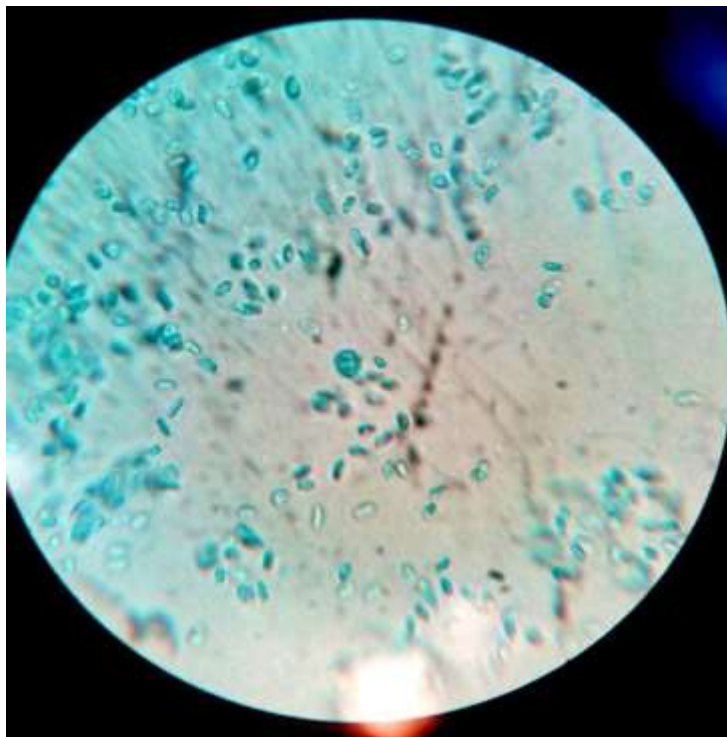


Рисунок 1.26 – Камера Горяева. Подсчет лейкоцитов (увеличение в 40 раз)

Увеличение количества лейкоцитов в крови называется лейкоцитозом, а уменьшение – лейкопенией. *Снижение количества лейкоцитов в крови всегда имеет патологический характер. Тогда как их повышение может быть физиологическим, то есть возникать у здоровых животных (лейкоцитоз пищевой, миогенный, при беременности), и патологическим (Георгиевский В. И., 1976).*

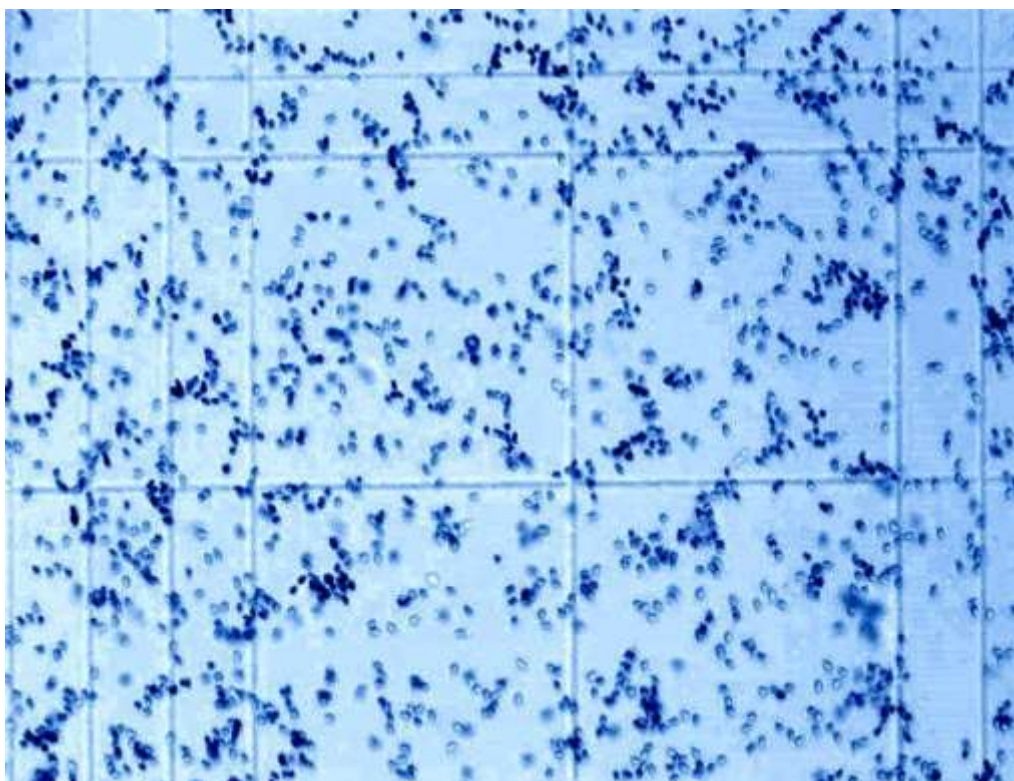


Рисунок 1.27 – Лейкоциты. Камера Горяева. Окраска АВИВАК (кровь курицы-несушки)

Так же в ветеринарной практике с целью коррекции нарушения обмена веществ, повышения иммунологической реактивности, сохранности молодняка, улучшения качества яиц и массы птицы применяют большое количество разнообразных средств. В этой связи следует иметь в виду, что все эти средства могут оказать своеобразное действие как на количество лейкоцитов в целом, так и на отдельные их виды.

Среди витаминов особую роль отводят аскорбиновой кислоте. Добавка к рациону суточных петушков-бройлеров кросса «Смена-4» в течение пяти дней привела к изменениям не только концентрации лейкоцитов, но и сдвигу в лейкоцитарной формуле (табл. 1.9).

Высокие дозы аскорбиновой кислоты способствовали снижению числа лейкоцитов в периферической крови петушков.

Таблица 1.9 – Влияние высоких доз аскорбиновой кислоты на показатели белой крови у 38 суточных петушков кросса «Смена-4» (Лебедева И., Верещак Н., Маслюк А., 2006)

Показатели	Группа цыплят		
	контрольная	первая опытная	вторая опытная
Лейкоциты, тыс./мкл	40,60±0,45	39,40±0,84	32,00±1,00
Нейтрофилы, %	22,20±2,07	20,00±1,58	19,40±1,40
Эозинофилы, %	3,00±0,50	3,60±0,67	3,20±0,89
Моноциты, %	2,80±0,55	3,60±0,67	4,20±0,65
Базофилы, %	0,40±0,45	0	0,60±0,45
Лимфоциты, %	71,60±2,77	72,80±2,19	72,6±2,64

Практические задания

1. Ознакомьтесь с техникой разведения крови в меланжере для подсчета количества лейкоцитов.
2. Подготовьте счетную камеру Горяева.
3. Определите количество лейкоцитов в одном миллилитре крови кур и сравните полученные значения с табличными показателями нормы.

1.3.2.1 Лейкоцитарная формула

Процентное соотношение между различными группами лейкоцитов называется лейкоцитарной формулой. *Лейкоцитарную формулу определяют путем подсчета лейкоцитов в окрашенных мазках крови. Подсчитывают обычно 100 или 200 клеток и выражают в процентах* (Лупинова Е. А., 2015).

В мазках лейкоциты, в зависимости от плотности, размера и удельного веса, распределяются неравномерно: нейтрофилы, базофилы и эозинофилы – по периферии, ближе к краям; моноциты и лимфоциты – ближе к середине.

Г. А. Симонян и Ф. Ф. Хисамутдинов (1995) считают, что моноциты, как более крупные клетки, располагаются по краю мазка. Подобное неравномерное распределение особенно выражено при медленном приготовлении мазка. При подсчете лейкоцитов используются методы Шиллигина (четырёхпольный метод – количество лейкоцитов определяется в четырех участках мазка) и Филипченко (трехпольный метод – лейкоциты определяются в трех участках – начальном, среднем и конечном). Подсчет ведется по прямой линии поперек мазка, от одного края к другому.

В период постнатального развития в лейкограмме у кур происходят возрастные изменения. Н. А. Голубева (2009) провела анализ количественного и качественного соотношения лейкоцитов крови у цыплят-бройлеров кросса «Смена-4» при напольном и клеточном содержании (табл. 1.10).

Таблица 1.10 – Лейкограмма цыплят-бройлеров кросса «Смена- 4»

Возраст	Условия содержания	Лейкограмма				
		базофилы	эозинофилы	нейтрофилы	лимфоциты	моноциты
однисутки	-	-	-	-	98,50±0,96	1,50±0,96
три недели	напольное	-	7,50±1,25	4,00±0,82	83,50±1,50	5,00±1,91
	клеточное	-	1,00±1,00	23,50±4,99	72,00±4,16	3,50±2,87
шестинедель	напольное	2,50±0,96	11,50±1,50	24,50±2,63	56,50±1,89	5,00±1,00
	клеточное	3,50±0,96	6,00±3,45	23,50±2,99	66,0±1,41	1,00±0,58

Исследованиями установлено, что к трехнедельному возрасту произошло не только достоверное уменьшение лимфоцитов, но и появились другие виды лейкоцитов. К шестинедельному возрасту у цыплят появились базофилы, увеличилось содержание эозинофилов.

Н. А. Голубевой (2009) был сделан вывод о том, что способ содержания птицы оказал влияние на лейкограмму. У трехнедельных цыплят при напольном содержании количество эозинофилов и лимфоцитов больше, а

нейтрофилов – меньше, чем у цыплят-аналогов при клеточном содержании. Отличительные особенности в распределении клеток белой крови были у шестинедельных цыплят: при напольном содержании процент эозинофилов, нейтрофилов и моноцитов был больше, тогда как при клеточном содержании в крови преобладали лимфоциты.

В таблице 1.11 приведены физиологические (референсные) показатели белой крови и лейкограмма у кур.

Таблица 1.11 – Лейкограмма у кур, %

Виды птиц	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы			Лимфоциты	Моноциты	Автор
			ю	п	с			
Куры (Gallina)	1,0–3,0	6,0–10,0	0	0	24,0–30,0	52,0–60,0	4,0–10,0	А.А.Смирнов, 1978
Куры (Gallina)	1,0–3,0	6,0–10,0	0	-	24,0–30,0	52,0–60,0	4,0–10,0	М.Медведева, 2008
Куры (Gallina)	1,0–3,0	6,0–10,0	-	-	24,0–30,0	52,0–60,0	4,0–10,0	Н.С. Мотузко и др., 2000
Куры мясные кросса «Конкурент-2» (Gallina)	2,7–3,0	3,1–3,2	0,6–0,7	5,9–6,8	20,3–23,5	53,9–58,4	8,7–9,2	Л.Ахметова и др., 2012
Суточные цыплята-бройлеры кросса «Смена-2» (Gallinaceus)	1,40	3,20	-	-	25,20	68,00	2,20	НПФ «Исследовательский центр» // http://vetom.ru/

Продолжение таблицы 1.11

Виды птиц	Базо-фи-лы	Эозино-фи-лы	Нейтрофилы			Лимфо-циты	Моно-циты	Автор
			ю	п	с			
0-суточныецып-лята- бройлеры кросса «Смена-2» (Gallinaceus)	2,00	4,00	-	-	25,00	65,80	3,00	ИПФ «Ис-следова-тельский центр» // http://vetom.ru/
Цыплята-брой-лерыкросса Cobb- Avian 48 (Gallinaceus)	2,0–4,0	5,0–8,0	-	-	19,0–29,0	56,0–59,0	8,0–10,0	Е. В. Лу-ценко, 2012

Белые клетки крови защищают организм от инфекции. Их несколько ти-пов, и каждый тип подсчитывается отдельно. Белые кровяные клетки, или лейкоциты, образуются в основном в костном мозге.

Лейкограмма птицы может варьировать в зависимости от индивиду-альных особенностей особи, а также от времени, когда был сделан анализ. Возраст, условия содержания, занятия в течение дня – все это может по-влиять на количество лейкоцитов (Linda P., 1993; Margaret A., 2006; Branson W., 1994; James W., 2004).

В таблице 1.12 приведены видовые особенности лейкоформулы крови птицы (Болотников И. А., Соловьев Ю. В. (1980); Hawkey C. et al. (1983)).

В таблицах 1.13 и 1.14 представлена лейкограмма здоровых кур. Но значения авторов расходятся. В лейкограмме, представленной И. А. Болот-никовым, количество базофилов больше на 1,2 %, эозинофилов на 7,2 %, лимфоцитов на 2 %, моноцитов на 1 %, относительно данных А. А. Куд-рявцева. Что касается нейтрофилов, то палочкоядерные нейтрофилы, по данным А. А. Кудрявцева, больше на 3,5 %, а сегментоядерные отсутству-ют.

Таблица 1.12 – Лейкоформула крови у различных видов птиц

Вид птицы	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы		Лимфоциты	Моноциты
			зернистые	палочковидные		
Курица	3,2 (1,5–5)	15,2	0,5	23,5	58	6
Индейка	2,5 (0,6–9,5)	2	23	46	48	1
Утка	2 (0,5–5)	8	1	35	49	5
Гусь	2 (0,5–4)	3,5	6	30	55	4,2
Журавль уссурийский	2,4 (0–8)	3,6	гетерофилы		20±8	0
			72±12 (56–94)			
Журавль-красавка	2,4 (0–6)	4	73±10		19±10	1,8
Журавль венценосный	3 (0–7)	5+4	76±9		15±7	0,7
Журавль даурский	0	0	71		29	0
Журавль канадский	0	16	46		36	0
Журавль черный	3,5 (0–7)	25	38		32	1,5
Журавль серый	3,5 (1–8)	21	48		24	4

Таблица 1.13 – Лейкограмма здоровых кур по И. А. Болотникову и Ю. В. Смолову (1980)

Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы		Лимфоциты	Моноциты
		зернистые	палочковидные		
1,5–,0 (3,2)	4,0–6,5 (15,2)	0–1,0 (0,5)	14,0–33,0 (23,5)	34,0–82,0 (58,0)	3,0–9,5 (6,0)

Таблица 1.14 – Лейкограмма здоровых кур по А. А. Кудрявцеву

Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы		Лимфоциты	Моноциты
		Палочко-ядерные	Сегментоядерные		
1,0–3,0 (2,0)	6,0–10,0 (8,0)	24,0–30,0 (27,0)	-	52,0–60,0 (56,0)	10,0–14,0 (7,0)

Увеличенное количество лейкоцитов (лейкоцитоз) может говорить об инфекции, воспалении, некрозе или повреждении тканей. К увеличению количества белых кровяных клеток может привести стресс, а также их количество может быть слегка повышено у молодняка моложе шести месяцев (Linda P., 1993; Margaret A., 2006; Branson W., 1994; James W., 2004).

Для определения лейкоцитарной формулы нужно приготовить мазок крови и покрасить его. Окрашенный и высушенный мазок исследуют под микроскопом с иммерсией. На мазок наносят каплю иммерсионного масла, остом рожно опускают объектив (с увеличением 90х) до соприкосновения с маслом, затем объектив приподнимают на один миллиметр.

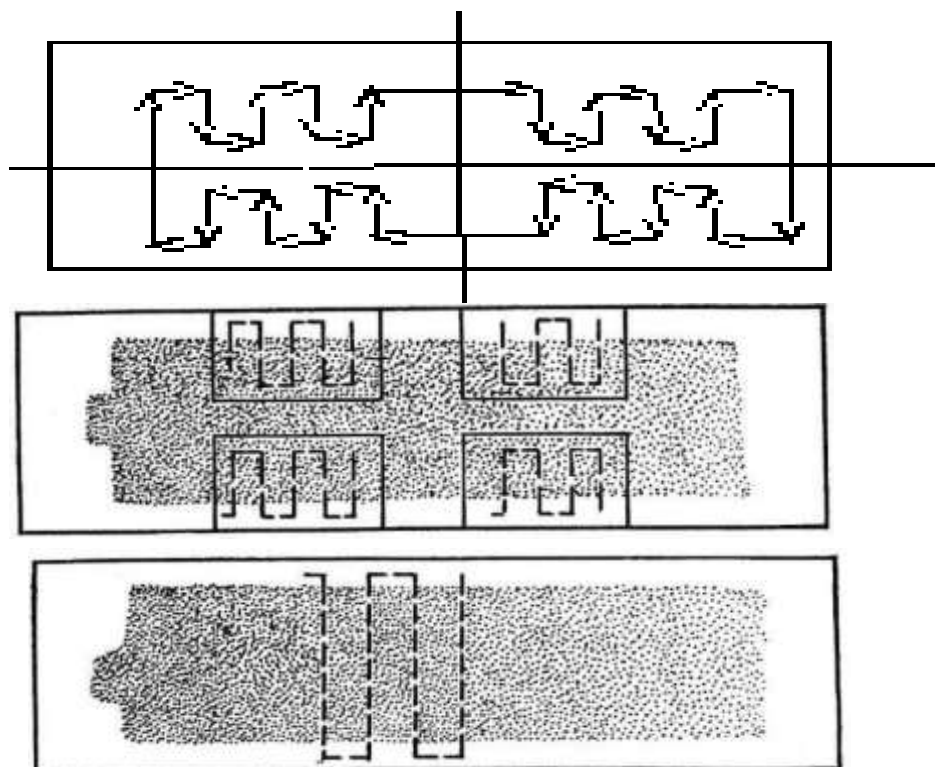


Рисунок 1.28 – Схема движения по мазку крови при исследовании морфологии лейкоцитов

При этом силы поверхностного натяжения удерживают масло в контакте с линзой. После этого настраивают поле зрения, медленно опуская объектив до появления контуров клеток. Для окончательной фокусировки используют микровинт. В поле зрения (рис. 1.27) основную площадь занимают эритроциты и один – несколько лейкоцитов. Двигаясь по мазку, исследуют лейкоциты в каждом поле зрения. При движении по мазку крови рекомендуется пересекать мазок по схеме (рис. 1.28).

Лейкоциты рассеяны в препарате неравномерно. Поэтому для исследования мазка применяют четырехполосный метод. Выбирают четыре участка по краям мазка – два в начальной его части (один против другого) и два в конце. Отметив избранные точки каплей кедрового масла, мазок помещают на предметный столик у микроскопа и укрепляют клеммой. Чтобы не сосчитать дважды один и тот же лейкоцит, подсчет ведут, точно следуя горизонтальным и вертикальным линиям просмотра мазка. Сначала устанавливают в поле зрения верхний левый участок мазка. Определяют, к какой группе относятся попавшие в поле зрения лейкоциты, и результаты сразу же записывают в определенные графы таблицы Егорова черточкой. Затем передвигают препарат вверх на одно поле зрения и снова подсчитывают лейкоциты и т.д. После этого препарат в поле зрения под микроскопом последовательно передвигают два раза влево и возвращают вниз к краю мазка путем трехкратного передвижения.

Подсчитав, таким образом, не менее 100–300 клеток белой крови, определяют процент каждого вида клеток, что и составит лейкоцитарную формулу. Для этого нужно сосчитать количество обнаруженных в мазке и записанных в таблице клеток по горизонтальным линиям. Если общее количество подсчитанных клеток равно 200, то полученное число по каждой группе лейкоцитов нужно разделить на два. Это и будет процент лейкоцитов данной группы в лейкоцитарной формуле (Бойко В. И., 1958).

1. Подготовьте мазок крови для определения лейкоцитарной формулы.
2. Произведите подсчет разных форм лейкоцитов в ста клетках (определите процентное соотношение).
3. Сравните полученные результаты с табличными данными и сделайте выводы.

1.3.3 Определение количества тромбоцитов

Содержание тромбоцитов определяют из соотношения их количества к количеству эритроцитов. *Зная количество эритроцитов в одном миллилитре крови, легко определить количество тромбоцитов. В норме на 1 000 эритроцитов приходится 25–50 тромбоцитов (2,5–5 %) (Бойко В. И., 1958).*

Количество тромбоцитов подсчитывают в камере Горяева. Для этого пипеткой отмеряют в пробирку 4,0 мл разбавителя. В капилляр от гемометра Сали набирают кровь до отметки (0,02 мл). Обтерев кончик капилляра ваткой и опустив его в разбавитель, кровь медленно выдувают и этим же раствором дважды промывают капилляр. Пробирку закрывают резиновой пробкой, и содержимое тщательно перемешивают. В капилляр Сали набирают содержимое пробирки и заряжают камеру. Подсчет тромбоцитов производится во всех больших разграфленных на 16 маленьких квадратах. Тромбоциты встречаются в виде скоплений по 5–10 клеток (Кудрявцева Е. Н., 2002).

Подсчет количества тромбоцитов в одном микролитре крови ведут по формуле (1.3):

$$= \frac{A * 4\ 000 * 200}{400} \quad \text{или} \quad A * 2\ 000$$

где X – количество тромбоцитов в одном микролитре крови;

A – количество тромбоцитов, сосчитанных в 400 маленьких квадратах;

$1/4\ 000\ \text{мм}^3$ – объем одного маленького квадрата;

200 – степень разведения крови;

400 – количество маленьких квадратиков (Кудрявцева Е. Н., 2002).

Тромбоциты играют важную роль в процессе свертывания крови.

Тромбоциты у кур имеют веретенообразную форму, их размер – 8,5–5,5 μ , у гусей – 6,7–4,4 μ ; у индеек тромбоциты удлинённые. В одном микролитре крови у кур насчитывается 32–100 тыс., у гусей – 50–200 тыс., у уток – 70–120тыс. тромбоцитов. Это количество непостоянно, так как тромбоциты быстро разрушаются и их подсчет затрудняется (Селянский В. М., 1972). Количествотромбоцитов у разных видов птиц приведено в таблице 1.13.

Таблица 1.13 – Форменные элементы крови (Никитин В. Н., Кудрявцев А. А., Ско-робогатова А. М.)

Показатель	Куры	Гуси	Утки	Индеек
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	3,5 (3–4)	3(2,5–3,5)	3,5(2,5–4,5)	2,7
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	40 (20–60)	20(15–30)	25(20–30)	34,1
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	75(32–100)	100(50–200)	90(70–120)	48,0

По количеству тромбоцитов лидируют гуси, у которых их количество в крови насчитывается до 200 штук. Минимальное количество тромбоцитов у индеек – до 48 штук в среднем.

Таблица 1.14 – Изменение содержания эритроцитов, гемоглобина и гематокрита у цыплят кросса «Смена» в зависимости от возраста (Ноздрин Г. А., Иванова А. Б., Шевченко А. И., Шевченко С. А., 2009)

Показатель	Возраст цыплят, суток		
	1	20	40
Гемоглобин, г/л	88,36 \pm 2,02	79,70 \pm 2,29	82,68 \pm 2,54
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	2,12 \pm 0,11	1,94 \pm 0,10	2,18 \pm 0,15
Гематокрит, %	20,00 \pm 2,17	21,20 \pm 0,66	22,00 \pm 0,89

Таблица 1.15 – Референсные величины содержания эритроцитов и гемоглобина у разных видов птиц (Мотузко Н. С., Никитин Ю. И., Марценюк А. П., 2000)

Показатель	Вид птицы				
	куры	гуси	утки	голуби	индейки
Гемоглобин, г/л	80–120	90–135	100–250	100–170	70–110
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	3,0–4,0	2,5–3,5	3,0–4,5	3,0–4,0	2,5–3,5

Практические задания

1. Ознакомьтесь с техникой разведения крови для подсчета количества тромбоцитов.
2. Подготовьте счетную камеру Горяева.
3. Определите количество тромбоцитов в одном миллилитре крови кур и сравните полученные данные с табличными показателями нормы.

1.3.4 Использование гематологического анализатора для определения морфологических показателей крови птиц

В настоящее время для подсчета клеток крови в лабораториях шире применяются гематологические анализаторы. Для подсчета клеток крови у птиц такие анализаторы не могут применяться по причине наличия ядра в эритроцитах крови птицы. В то же время подсчет большого количества проб не всегда возможен вручную с помощью камеры Горяева.

Поэтому нами был разработан метод подсчета форменных клеток крови (лейкоцитов, эритроцитов), измерения концентрации гемоглобина и эритроцитарных индексов, определения лейкоцитарной формулы на автоматическом гематологическом анализаторе для ветеринарии DF-50 производства компании Dymind Biotech (КНР) с использованием соответствующих наборов реагентов (рис. 1.29).



Рисунок 1.29 – Определение морфометрических показателей крови на гематологическом анализаторе DF-50

1.4 Техника приготовления мазков крови

Кровь и лимфа – трофическая соединительная ткань. Препаратом служит мазок крови на предметном стекле. Можно рассматривать и свежую кровь в виде висячей капли. Для этого нужно иметь специальные предметные стекла с луночкой. Препарат рассматривают и изучают под большим увеличением. По мере высыхания препарата эритроциты уменьшаются в размере, утрачивают форму, покрываются выступами и бугорками и приобретают форму тутовой ягоды. Кроме эритроцитов, на препарате при его передвижении можно заметить лейкоциты. Их количество в крови значительно меньше, чем эритроцитов (Бойко В. И., 1958).

Мазки крови можно получить на чистых обезжиренных предметных стеклах. Для этого их моют в мыльной воде или с содой, складывают в стеклянные банки и заливают на 2–3 дня концентрированной серной кислотой (обезжиривают). Затем моют в водопроводной воде, ополаскивают дистиллированной водой, высушивают и помещают в банку, в которой находится смесь эфира и спирта (1:1). В этом растворе приготовленные стекла могут храниться длительное время. Перед использованием стекла извлекают из банки пинцетом, высушивают на воздухе или протирают чистым полотенцем.

Мазки легче готовить из свежей крови, но можно использовать стабилизированную кровь (предохраненную от свертывания). Предметное стекло обычно фиксируют в левой руке между большим и указательным пальцами, или кладут на ровную поверхность и наносят небольшую каплю крови глазной пипеткой на край стекла. Первую каплю крови снимают ватой, вторую используют для приготовления мазка. Вторую каплю крови помещают на край чистого обезжиренного предметного стекла и делают мазок с помощью другого предметного стекла со шлифованным краем. Кровь берут стеклом под углом 45° , слева от капли и слегка продвигают вправо до соприкосновения с каплей, пока она не расплывется по ребру шлифовального стекла, после чего быстрым и легким движением стекло ведут слева направо (рис. 1.30, 1.31).

Вследствие наличия ядер в эритроцитах, мазки крови кур должны быть значительно тоньше, чем мазки крови других животных. Мазок должен быть достаточно тонким, чтобы клетки крови располагались в один слой. В тоже время следует избегать чрезмерного надавливания, чтобы не допустить деформации лейкоцитов. Приготовленные мазки высушивают на воздухе и затем фиксируют и окрашивают с использованием нескольких способов. На высушенном мазке (в его начале) пишут номер птицы и дату.



Рисунок 1.30 – Приготовление мазка крови

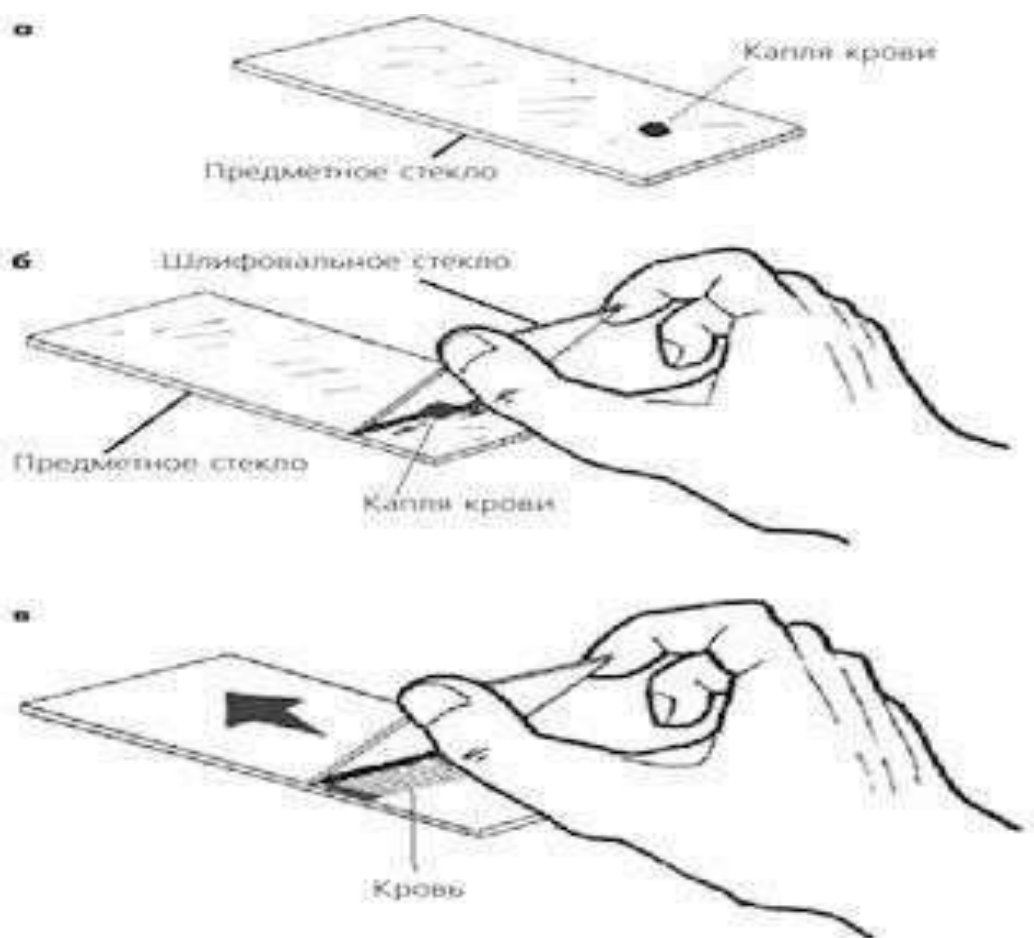


Рисунок 1.31 – Приготовление мазка крови

1.4.1 Фиксация и хранение

Для лучшей сохранности мазков, а также перед их окраской, мазки фиксируют. Наиболее надежным способом фиксации является фиксация препарата метиловым спиртом в течение 3–5 минут. Фиксировать мазки крови можно также в абсолютном этиловом спирте (20–30 минут), ацетоне (5 минут), смеси спирта с эфиром в равных частях (10–20 минут).

Для фиксации мазки помещают в чашки или ванночки, куда наливают один из фиксаторов. Мазки должны быть хорошо покрыты жидкостью и не соприкасаться намазанными поверхностями друг с другом.

Перед окрашиванием мазков по Май – Грюнвальду, Лейшману и по ускоренному методу Гимза они не фиксируются, так как фиксирующие элементы содержатся в самой краске (Бойко В.И., 1958).

Хранить мазки можно в шкафах, ящиках или папках. Мазки можно также хранить, обернув их бумагой или в специальных контейнерах (рис. 1.32).



Рисунок 1.32 – Хранение препаратов

1.4.2 Окраска мазков крови

Окрашивание мазков требует внимания и опыта. Прекрасно приготовленный и хорошо фиксированный мазок можно испортить при окраске. Причинами неудач могут быть низкие качества краски и погрешности в методике окрашивания. Существует несколько способов окрашивания.

Окраска по Романовскому – Гимза. Окраску фиксированных мазков производят свежеприготовленным водным раствором краски Романовского – Гимза. Готовую краску Романовского – Гимза разводят из расчета 2–3 капли (~60 мкл) на один миллилитр нейтральной дистиллированной воды. Для получения хорошей окраски кислотность воды должна составлять примерно 6,8–6,9.

Для окрашивания одного препарата требуется 4–5 мл раствора краски. Окрашивание производят нанесением водного раствора краски каплями на горизонтально расположенный на подставках в ванночке мазок до полного покрытия мазка. Красят 15–20 минут, после чего смывают краску холодной водопроводной водой и высушивают мазок на воздухе (Селянский В. М., 1972). Летом мазки окрашивают в течение 15–20 минут. Раствор краски сменяют через 10–15 минут от начала окрашивания, подливая свежий раствор на край предметного стекла. Затем раствор краски смывают легкой струей нейтральной воды.

Хорошо отмытый препарат высушивают в вертикальном положении и затем погружают на несколько секунд в спирт для лучшей дифференциации ядер клеток белой крови. Не смывая спирта, препарат высушивают и исследуют под микроскопом. Правильно окрашенный мазок имеет тонкий красновато-фиолетовый оттенок (Бойко В. И., 1958).

Окраска по Романовскому – Гимзу позволяет при микроскопировании увидеть эритроциты, лейкоциты, тромбоциты. Однако время окрашивания

образцов на выявление эритроцитов и лейкоцитов значительно варьирует, составляя от 20 минут до одного часа (за счёт того, что при каждом приготовлении получается краситель с разным титром), а для выявления тромбоцитов длительность окрашивания увеличивается до 1,5–3 часа. Кроме того, этот способ не позволяет обнаружить ретикулоциты (Лупинова Е. А., 2015).

Ускоренная окраска по Гимзу. Мазки без фиксации укладывают на дно бактериологической чашки, покрывают 15–20 каплями смеси концентрированного раствора краски Гимза и чистого ацетона (поровну). Во избежание испарения чашку накрывают стеклом. Через минуту добавляют 8–10 мл слабощелочной дистиллированной воды. Воду хорошо смешивают покачиванием чашки и оставляют на 5–10 минут, после чего мазки крови споласкивают, высушивают и исследуют под микроскопом (Бойко В. И., 1958).

Окраска по Май – Грюнвальду. Поверхность мазка покрывают 20–25 каплями раствора Май – Грюнвальда, который быстро, в течение 3 минут, фиксирует мазок. Так как краска быстро испаряется, нужно следить, чтобы поверхность мазка не высыхала. Через 3 минуты краску разводят, приливая 3–5 миллилитров нейтрализованной дистиллированной воды, и окрашивают в течение минуты. После этого водный раствор краски сливают.

Не смывая дистиллированной водой, остатки краски удаляют осторожно пропускной бумагой и покрывают поверхность мазка обычным раствором Гимза. Через 20 минут краску смывают струей воды и препарат высушивают (Бойко В. И., 1958). Окраска по Май – Грюнвальду проводится без предварительной фиксации (краска растворена в метиловом спирте). Однако на фоне хорошо окрашенной цитоплазмы эритроцитов ядра прокрашиваются в бледно-голубой цвет, что затрудняет проведение карิโอметрии (Лупинова Е. А., 2015).

Метод Паппенгейма. Это комбинированный, высокодиагностичный цитологический протокол. При использовании данного метода предварительной фиксации мазка не требуется, так как краситель Май – Грюнваль

да готовят на метиловом спирте. На мазок наносят 2 мл готового красителя Май - Грюнвальда на 3 минуты, затем приливают столько же дистиллированной воды и смешивают с красителем. Через одну минуту краску сливают. Не ополаскивая, мазок докрасивают красителем Романовского – Гимза, приготовленным из расчета 15 капель готового красителя на 10 мл воды. Окрашиваниемазка проводят 10–15 минут, затем смывают краску сильной струей воды (Липунова Е. А., 2015). Этот способ окрашивания хорошо выявляет зернистость протоплазмы клеток красителем Май – Грюнвальда и четко окрашивает структуру ядра раствором красителя Романовского – Гимза (смотреть: «1.1 Морфология клеток», рис. 1.3 – 1.17) (Колесник Е. А., 2021).

Окраска азур-эозином основана на крашении красителем Романовского, приготовленном на метиловом спирте. При этом фиксация и окрашивание идут одновременно. Недостаток способа состоит в том, что для определения тромбоцитов следует использовать подщелоченный азур-эозин, а для определения эозинофилов – подкисленный азур-эозин, то есть фактически проводить два исследования (Лупинова Е. А., 2015).

Окрашивание красителем по Лейшману предполагает использование нефиксированных мазков, так как готовят краску на фиксаторе – метиловом спирте. Способ Лейшмана отличается от способа Романовского – Гимза лишь применяемым красителем и продолжительностью периодов фиксации и окраски. При этом способе применяют краситель, получаемый растворением смеси азура I, метиленового синего и желтого водорастворимого эозина в количестве 0,2 г в 10 мл абсолютного метилового спирта. Продолжительность фиксации неразбавленным красителем составляет 3–4 минуты, а окраски с равным количеством воды – 5–10 минут.

Этот способ экономичен – окраска мазка занимает 13 минут (первые три минуты мазок помещают в неразбавленный краситель-фиксатор, а в последующие 10 минут доокраску проводят в разбавленном красителе). Недостатком такого окрашивания является использование дистиллированной воды для приготовления разбавленного красителя и промывки мазков. Несоблюдение

кислотности среды приводит к получению некачественных мазков, что снижает достоверность результатов (Ромейс Б., 1953).

Окрашивание кармином. Кармин – это одна из старинных красок, применяемых в микроскопии. Кармин является экстрактом кошенили, паразитических насекомых *Hemiptera Coccus cacti*. Кармин встречается только в жировом теле и яичном желтке самок этих насекомых. Кармин дает отличное и чёткое окрашивание ядер и является незаменимой краской для тотального окрашивания мелких организмов, эмбрионов, а также самых различных объектов для изучения их микроскопической анатомии. Отличные результаты дает кармин в применении к простейшим.

При осторожном нагревании в спирту при температуре 70 °С, растворяют 1 г карминовой кислоты, 0,5 г хлористого алюминия и 4 г хлористого кальция. После охлаждения раствор фильтруют. Краска пригодна как для тотальных объектов, так и для срезов. Продолжительность окрашивания составляет от нескольких минут до нескольких часов. Если объект перекрашен, то его дифференцируют в подкисленном уксусной кислотой (2–3%), спиртом при температуре 70 °С (Ромейс Б., 1953).

Окраска гематоксилином. Гематоксилин – экстракт из кампешевого дерева. Гематоксилин сам не является красителем, но легко окисляясь, дает сильно красящий гематеин, который, в свою очередь, выделяет различные продукты окисления, не применимые для крашения. Приготовленные растворы гематоксилина должны в течение некоторого времени (примерно 2–3 недели) созревать, то есть должно произойти окисление гематоксилина в гематеин. Но ни гематоксилин, ни гематеин не способны давать окрашивание без протрав, с которыми они образуют солеобразные соединения – лаки. В качестве протрав используют соли алюминия, железа, меди, хрома, молибдена или ванадия.

В литературе имеется весьма большое число методов окраски с помощью железных лаков гематоксилина. Наиболее важным является *метод Гейденгайна*, значительное применение имеют также *методы Гансена, Рего и Вейгерта*. Все эти методы применяются для окраски срезов и мазков. При использовании этих методов готовят два раствора:

- 1) протрава: трехпроцентный водный раствор железных квасцов (пригодны только светло-фиолетовые кристаллы);
- 2) краска: растворяют 0,5 г гематоксилина в 10 см³ спирта при температуре 96 °С и затем добавляют 90 см³ дистиллированной воды; раствор должен созреть в течение месяца; перед употреблением раствор разводят пополам дистиллированной водой; свои красящие свойства раствор сохраняет долгое время (Ромейс Б., 1953).

Окраска по Нохту. Данный способ используют для исследования клеток костного мозга. Для получения костномозгового пунктата костный мозг при помощи резинового баллона выдувают из проксимальной трети бедренной кости цыпленка (курицы) на часовое стекло. Для приготовления мазков костного мозга полученное содержимое бедренной кости в смеси 1:1 с физиологическим раствором наносят на предметное стекло и растирают шлифованным стеклом в виде тонкого слоя. С целью предохранения свертывания костномозгового пунктата и уменьшения деформации клеток мазки делают на слегка подогретых предметных стеклах. Окраску мазков проводят по Нохту. Подсчет миелограммы осуществляют на 500 или 1000 клеток.

При использовании окраски по Нохту готовят растворы:

- 1) растворяют один грамм азура II в одном литре дистиллированной воды;
- 2) растворяют один грамм водорастворимого желтого эозина в одном литре дистиллированной воды.

Каждый раствор хорошо перемешивают и оставляют созревать, при ежедневном встряхивании, на 10–14 дней. Перед окрашиванием раствор

краски готовят смешиванием 25 мл первого раствора (0,1 % раствора азура П), 20 мл второго раствора (0,1% раствора эозина) с 55 мл нейтральной дистиллированной водой. Краску наливают на фиксированный мазок и окрашивание длится в зависимости от температуры воздуха 25–45 минут. Затем мазки смывают водой и высушивают на воздухе (Бойко В. И., 1958).

Способ Алексеева. Отличительными признаками данного способа является то, что окрашивание нестабилизированной крови производят однопроцентным раствором бриллианткрезилблау в течение 20–40 минут при температуре 18–20 °С. Причем, для обеспечения сохранности клеток крови объединение и ламинарное перемешивание крови с красителем проводят в замкнутом объеме (например, в пробирке) в течение 30 секунд при той же температуре.

Приготовленный и высушенный мазок фиксируют в концентрированном растворе по Лейшману, приготовленном на буферном растворе, в течение 10 минут, и промывают в том же буферном растворе. В пробирку вносят 0,1 мл краски однопроцентного бриллианткрезилблау, приготовленного на физиологическом растворе (при кислотности 2,95–3), добавляют 0,1 мл крови и перемешивают в течение 30 секунд при температуре 18–20 °С, путем осторожного прокручивания пробирки, не допуская при этом резких движений.

Окраску производят при комнатной температуре в течение 20–40 минут. Делают мазок на предметном стекле, затем его подсушивают. Мазок фиксируют в концентрированном растворе красителя-фиксатора по Лейшману в течение 3 минут. Не промывая, мазок помещают для докраски на 10 минут в разбавленный раствор красителя по Лейшману, приготовленный на буферном растворе (при кислотности 6,8–7,2). После докраски мазок промывают тем же буферным раствором. Его подсушивают и проводят микроскопирование под иммерсией.

Для буфера готовится два раствора:

1) 9,5 г натрия фосфорнокислого двузамещенного безводного или 22,7 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного доводится до 1 000 мл дистиллированной водой;

2) 9,07 г калия фосфорнокислого однозамещенного доводится до 1 000 мл дистиллированной водой.

В колбу на 1 000 мл вносится 63 мл первого раствора и 37 мл второго раствора, которые доводятся до 1 000 мл дистиллированной водой (кислотность полученного раствора должно находиться в пределах 6,8–7,2) (Липунова Е. А., 2015).

Метод окраски мазков крови, применяемый в лаборатории физиологии Федерального научного центра «Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства» Российской академии наук. Представляемый метод окраски мазков крови состоит из следующих этапов:

1. Делают мазок.
2. Высушивают на воздухе.
3. Фиксируют 5–7 минут в этиловом спирте, мазком вниз.
4. Высушивают.
5. Окрашивают.

Состав красителя включает: 0,9 г хлорида натрия, 3,35 г хлорида кальция, 90 мл дистиллированной воды, 6 мл краски Гимза, 3 мл однопроцентного спиртового раствора метилвиолета, 1 мл 12-процентного раствора формалина, разведенного раствором солей (0,9 г хлорид натрия, 3,35 г хлорид кальция и 90 мл дистиллированной воды). Перечисленные компоненты смешивают, отмеряют 10 мл полученного красителя и добавляют 10 капель красителя Май – Грюнвальда и 2 мл Генциан виолета.

Полученный раствор выдерживают 1–1,5 часа, в зависимости от температуры в помещении, промывают дистиллированной водой и микроскопируют с иммерсионным маслом.

Преимущество метода состоит в том, что основной состав красителя подходит для подсчета форменных элементов в камере Горяева, и это позволяет производить подсчет и окраску мазков с наименьшими затратами во времени и не требует дополнительных реактивов. Результаты окраски представлены на рисунках 1.33–1.35.

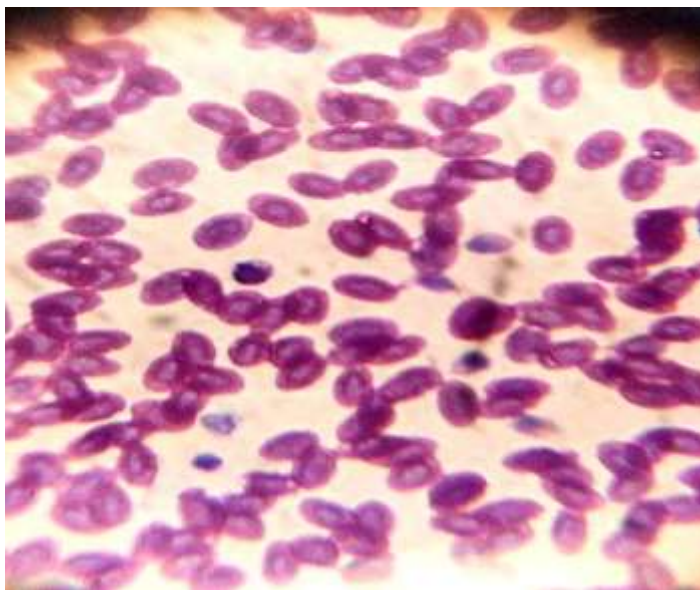


Рисунок 1.33 – Мазок крови. Курица-несушка.
Окраска по Фриеду и Лукачевой в модификации И. А. Болотникова.
Увеличение в 40 раз, окуляр 10 х

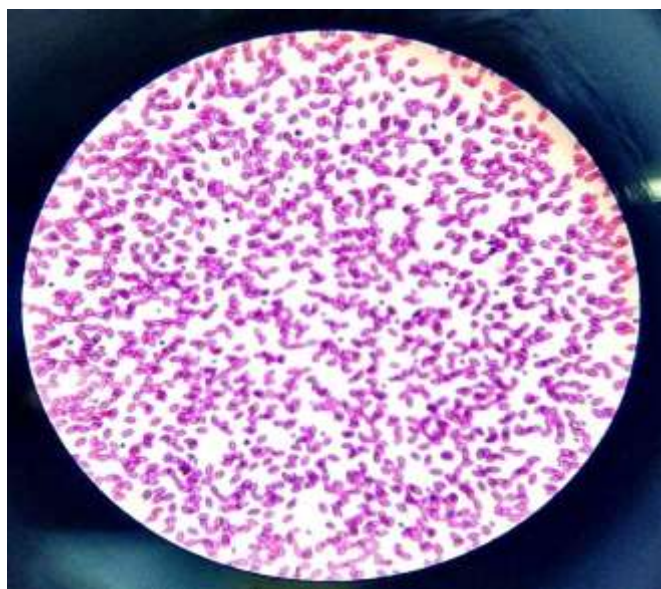


Рисунок 1.34 – Мазок крови.
Окраска по Фриеду и Лукачевой в модификации И. А. Болотникова.
Увеличение в 10 раз, окуляр 10 х

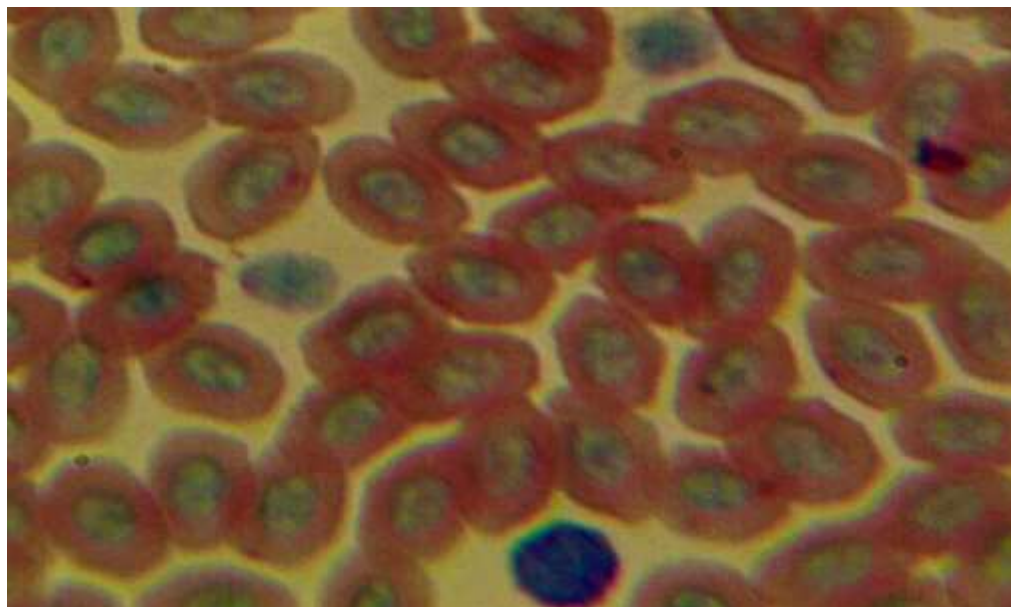


Рисунок 1.35 – Мазок крови. Курица-несушка.
Окраска Романовского – Гимза. Увеличение в 100 раз, окуляр 10 х

Приведем пример практического использования метода окраски. Для проведения гематологического исследования использовалась кровь цыплят-бройлеров кросса «Смена-8». Птицы содержались в виварии Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства Российской академии наук в зоотехнических условиях, соответствующих нормам (Имангулов Ш. А., 2006; ГОСТ Р 52837-2007). Подсчет форменных элементов крови выполнялся по методике, предложенной Фриедом и Лукачевой, в модификации И. А. Болотникова, подробно описанной Н. В. Садовниковым, Н. Д. Придыбайло, Н. А. Верещаком (2009).

Статистическая обработка результатов исследований производилась с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2010.

Результаты исследований показывают, что у суточных мясных цыплят наблюдается низкий уровень гематокрита крови, а уровень гемоглобина, наоборот, имеет относительно высокий показатель по сравнению с последующими возрастными периодами. Наиболее значительный подъем показателей эритроцитов крови наблюдается к 40-суточному возрасту мясных

цыплят, что связано, в том числе с интенсивным ростом и функциональным становлением систем организма. Уровень гематокрита крови с возрастом гибридов и цыплят исходных линий увеличивается, что обусловлено становлением организма и совершенствованием процессов крови в процессах жизнедеятельности организма.

Показатели гемоглобина крови имеют тенденцию к снижению с возрастом, наиболее этот процесс заметен до 20-суточного возраста – уменьшение на 9,8 %, после 21-суточного возраста идет увеличение данного показателя на 3,7 %. Динамика уровня эритроцитов в крови мясных кур уменьшается к 21-суточному возрасту на 8,5 % по сравнению с предыдущими показателями, далее, к 40-дневному возрасту увеличивается на 12,4 %.

Существенных различий в показателях лейкоцитов между гибридами и цыплятами исходных линий до 40-суточного возраста не наблюдается. Между гибридами и цыплятами исходных линий имеются отличия по количеству эритроцитов (в 20-суточном и 40-суточном возрасте).

Показатель количества эритроцитов в крови относительно живой массы у мясных цыплят имеет динамику, сначала увеличения, затем снижения с возрастом. Относительно гемоглобина, к 20-суточному возрасту показатель уменьшился на 9,8 %, эритроциты – на 8,5 %, а гематокрит, наоборот, увеличился на 6 %. Из чего можно сделать вывод, что физиологическое состояние птицы определяют по совокупности гематологических показателей. Результаты исследования морфологических показателей крови являются основополагающими в оценке клинического и иммунологического статуса птицы, поскольку раскрывают резистентность организма и устойчивость к различным заболеваниям (табл. 1.15).

Таблица 1.15 – Влияние на морфологические показатели крови цыплят-бройлеров кросса «Смена-8» 30-35-суточного возраста кормовой добавки Синкра™ AVI 101ТРТ

Показатель	Группы, n=12	
	контрольная	опытная
WBC, 10⁹/L	40,0±2,76	45,7±1,16
Neu, %	44,8±2,0	44,1±2,4
Lym, %	50,1±2,85	50,0±3,42
Mon, %	1,7±0,73	0,4±0,08
Eos, %	3,5±0,32	5,2±0,59*
Bas, %	0,1±0,07	0,2±0,04
RBC, 10¹²/L	2,1±0,04	2,3±0,05*
HGB, g/L	105±2,29	119±2,37*
HCT	0,25±0,01	0,28±0,01
MCV, fL	116,7±0,60	120,6±0,87*
MCH, pg	48,9±0,29	50,5±0,41
MCHC, g/L	419±2,3	420±1,3
RDW CV	0,1±0,003	0,1±0,006
RDW SD, fL	50,6±0,77	54,7±0,55*

Примечание: * различия достоверны по отношению к контрольной группе при $p \leq 0,05$.

По количеству лейкоцитов существенных различий между группами не установлено. Исключение составляют эозинофилы, количество которых в крови цыплят опытной группы на 1,7 % выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Это оказывает влияние на показатель **индекса иммунореактивности**, предложенный Д. О. Ивановым и др. (2014), который определяется по соотношению суммы лимфоцитов и эозинофилов к моноцитам. В данном случае показатели индекса иммунореактивности в контрольной и опытной группе существенно различаются, соответственно, 31,5 и 138,0, что свидетельствует о пониженной реактивности в контрольной группе и возможности заболевания при низкой резистентности организма. Количество эритроцитов (Red Blood Cells, RBC) повышалось на 8,7 % при введении в рацион бройлеров кормовой добавки.

Подтверждение в повышении метаболизма у цыплят-бройлеров опытной группы наблюдалось в следующих показателях крови.

Гемоглобин (Hemoglobin, HGB) – дыхательный пигмент крови, состоящий из белка глобина, который синтезируется в печени, и простатичес-

кой группы – гема. Основная функция гемоглобина состоит в переносе кислорода от легких тканям. Гемоглобин участвует в транспорте углекислого газа из тканей в легкие, в поддержании кислотно-щелочного равновесия в организме, то есть обладает буферными свойствами. Количество гемоглобина в крови у цыплят-бройлеров при использовании кормовой добавки повышалось по сравнению с контролем на 11,8 %.

Гематокрит (Hematocrit, HCT) – соотношение объема плазмы и форменных элементов крови, выраженное в процентах по объему. В опытной контрольной группе существенных различий по этому показателю не наблюдалось.

Средний объем эритроцита (Mean corpuscular volume, MCV) – средний корпускулярный объем при использовании в рационе бройлеров кормовой добавки повышался на 3,3 %.

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (Mean corpuscular Hemoglobin, MCH) – показатель степени насыщения эритроцита гемоглобином. В данном опыте существенных различий при использовании кормовой добавки не обнаружено.

Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (Mean cell Hemoglobin concentration, MCHC) – показатель насыщенности эритроцитов гемоглобином. Результаты показывают, что концентрация гемоглобина в эритроците в опытной группе не изменялась.

Показатели по размеру эритроцитов (RDW CV и RDW SD) имели различия по разнице между наибольшим и наименьшим эритроцитами в пользу цыплят опытной группы. Следовательно, биохимические и гематологические показатели крови цыплят-бройлеров реагировали на введение в рацион кормовой добавки.

2 БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ ПТИЦЫ

Между пищеварительной системой и обменом веществ существует многосторонняя связь, которая обеспечивается благодаря транспортной и регуляторной функции крови. Она выражается не только в тонкой координации пищеварительной деятельности и обмена, обусловленной нервной и гормональной регуляцией, но и в наличии специальных функций желудочно-кишечного тракта, способствующих протеканию химических процессов в тканях.

Связующим звеном между пищеварительной системой и тканями является кровь, которая выполняет многообразную роль в организме, имеющую тесную связь с секреторной и ферментативной функцией пищеварительного тракта. Наши экспериментальные данные подтверждают научную гипотезу (Rothman S., Liebow C., Isenman L., 2002; Коротько Г. Ф., 2013) о кругообороте пищеварительных ферментов и наличии их в плазме крови (Вертипрахов В. Г., Грозина А. А., Долгорукова А. М., 2016).

В литературе имеются данные возрастной динамики панкреатических ферментов в ткани поджелудочной железы и плазме крови у цыплят-бройлеров (Егоров И. А., Вертипрахов В. Г. и др., 2017), которые являются основой для физиолого-биохимического мониторинга состояния здоровья и питания сельскохозяйственной птицы (Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2017). Известно (Назарова Е. Н., 2012; Котлярова О. С., 2013), что с возрастом у кур происходят изменения биохимических показателей крови, однако данные исследований в этом вопросе малочисленны и разноречивы (Пономарев В. А. и др., 2014), а в сравнительном аспекте между исходными линиями мясных кур и гибридами – практически отсутствуют.

Оценка физиологических показателей, одним из которых является биохимия крови, является важной составляющей селекционной работы при создании новых пород и успешного внедрения их на рынок. При этом определение физиологического статуса позволяет проводить диагностику стрессовых

и патологических состояний (Метревели Т. В., 2005; Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2015). Биохимические исследования крови дают возможность проводить мониторинг функционального состояния организма, работы печени, почек, поджелудочной железы и других органов, а также контролировать процессы белкового, углеводного, жирового и минерального обмена веществ.

В специальной литературе представлен обширный, но разноречивый материал по биохимии крови кур разных кроссов (Насонов И. В., Буйко Н. В., Лизун Р. П. и др., 2014; Alagawany M., 2017; Lala A. O., Ajayi O. L., Okwelum N., Oso A. O., Fakorede T. V., Adebayo T. A., Jagbojo J. E., 2018). Отметим, что в последние десятилетия приборная база научных лабораторий значительно обновилась, и на смену классическим методам пришли полуавтоматические и полностью автоматизированные биохимические анализаторы. В результате скорость и точность исследований повысились, а это предполагает установление новых референсных значений изучаемых показателей.

2.1 Определение биохимических показателей крови птиц с использованием биохимических анализаторов

В лаборатории физиологии Федерального научного центра «Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства» Российской академии наук биохимические исследования крови производятся на полуавтоматическом анализаторе Sinnowa BS3000P («SINNOWA Medical Science & Technology Co., Ltd», Китайская Народная Республика) с использованием биохимических наборов («ДИАКОН-ВЕТ», Россия). Далее мы приводим рекомендации по выполнению биохимических исследований при определении основных показателей в крови птицы.



Рисунок 2.1 – Выполнение биохимических исследований крови птицына проточном биохимическом анализаторе SINNOWA BS3000P (КНР)(лаборант-исследователь М. В. Кошечева)

Щелочная фосфатаза

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 0С.

Схема определения:

- 1) Запуск реакции образцом. Для приготовления монореагента смешивают четыре части реагента один с одной частью реагента два. Для исследований в проточной кювете к монореагенту в объеме 500 мкл добавляют сыворотку или плазму крови в объеме 10 мкл. Измеряют образец.
- 2) Запуск реакции субстратом. В проточную кювету наливают 400 мкл реагента один, добавляют к нему 10 мкл сыворотки или плазмы крови, затем перемешивают и инкубируют 5 минут. Добавляют 100 мкл реагента два, перемешивают. Измеряют образец.

Примечание. Если изменение оптической плотности превышает значение 0,25, то сыворотку разводят в пять раз 0,9-процентным раствором хлорида натрия, и полученный результат умножают на разведение. Значение фактора рекомендуется проверять по мультиколебратору.

Холестерин

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 °С.

Измерение холостой пробы. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл дистиллированной воды, перемешивают. Инкубируют в течение 3 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробу.

Измерение стандарта. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл контрольного образца, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы. Концентрация стандарта указана на этикетке флакона.

Измерение образца. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл пробы, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С или 30 минут при комнатной температуре. Измеряют пробы.

Примечание. Если концентрация холестерина превышает 19,4 ммоль/л, то сыворотку разводят 0,9-процентным раствором хлорида натрия, и полученный результат умножают на разведение.

Триглицериды

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 °С.

Измерение холостой пробы. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл дистиллированной воды, перемешивают. Инкубируют в течение 3 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы.

Измерение стандарта. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл контрольного образца, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы. Концентрация стандарта указана на этикетке флакона.

Измерение образца. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл пробы, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С или 20 минут при комнатной температуре. Измеряют пробы.

Примечание. Если концентрация триглицеридов в пробе превышает 11,4 ммоль/л, то сыворотку разводят 0,9-процентным раствором хлорида натрия и полученный результат умножают на разведение.

Глюкоза

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 °С.

Измерение холостой пробы. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл дистиллированной воды, перемешивают. Инкубируют в течение 3 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробу.

Измерение стандарта. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл контрольного образца, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы. Концентрация стандарта указана на этикетке флакона.

Измерение образца. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 5 мкл пробы, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С или 20 минут при комнатной температуре. Измеряют пробы.

Примечание. Если концентрация глюкозы в пробе превышает 22,2 ммоль/л, то сыворотку разводят 0,9-процентным раствором хлорида натрия, и полученный результат умножают на разведение.

Общий белок

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 °С.

Измерение холостой пробы. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 10 мкл дистиллированной воды, перемешивают. Инкубируют в течение 3 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробу.

Измерение стандарта. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 10 мкл контрольного образца, перемешивают. Инкубируют в течение 10 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы. Концентрация стандарта указана на этикетке флакона.

Измерение образца. В проточную кювету вносят 500 мкл реактива и 10 мкл пробы, перемешивают. Инкубируют в течение 10 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы.

Кальций

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 °С.

Приготовление монореагента. Смешивают четыре части реагента один содной частью реагента два.

Измерение холостой пробы. В проточную кювету вносят 500 мкл монореагента и 5 мкл дистиллированной воды, перемешивают. Инкубируют в течение 3 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробу.

Измерение стандарта. В проточную кювету вносят 500 мкл монореагента и 5 мкл контрольного образца, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы. Концентрация стандарта указана на этикетке флакона.

Измерение образца. В проточную кювету вносят 500 мкл монореактива и 5 мкл пробы, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы.

Примечание. Если концентрация кальция в пробе превышает 5,0 ммоль/л, то сыворотку разводят 0,9-процентным раствором хлорида натрия, и полученный результат умножают на разведение.

Фосфор

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 °С.

Приготовление монореагента. Смешивают четыре части реагента один содной частью реагента два.

Измерение холостой пробы. В проточную кювету вносят 500 мкл монореагента и 5 мкл дистиллированной воды, перемешивают. Инкубируют в течение 3 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробу.

Измерение стандарта. В проточную кювету вносят 500 мкл монореагента и 5 мкл контрольного образца, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы. Концентрация стандарта указана на этикетке флакона.

Измерение образца. В проточную кювету вносят 500 мкл монореактива и 5 мкл пробы, перемешивают. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 37 °С. Измеряют пробы.

Примечание. Если концентрация фосфора в пробе превышает 7,5 ммоль/л, то сыворотку разводят в два раза 0,9-процентным раствором хлорида натрия, и полученный результат умножают на разведение.

Аланинаминотрансферазы (АЛТ)

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 °С.

Схема определения:

1. Запуск реакции образцом. Для приготовления монореагента смеси берут четыре части реагента один с одной частью реагента два. Для исследований в проточной кювете к монореагенту в объеме 500 мкл добавляют сыворотку или плазму крови в объеме 50 мкл. Закачивают содержимое кюветы в анализатор.
2. Запуск реакции субстратом. В проточную кювету наливают 400 мкл реагента один, добавляют к нему 50 мкл сыворотки или плазмы крови, затем перемешивают и инкубируют одну минуту. Далее добавляют 100 мкл реагента два, перемешивают и помещают кювету в кюветное отделение.

Примечание. Если изменение оптической плотности превышает значение 0,16, то сыворотку разводят в пять раз 0,9-процентным раствором хлорида натрия, и полученный результат умножают на разведение. Реакционная смесь готовится по одной кювете непосредственно перед забором пробы в проточную кювету. Значение фактора рекомендуется проверять по мультиколебратору.

Аспаратаминотрансферазы (АСТ)

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до температуры измерения. Температура измерения составляет плюс 37 °С.

Схема определения:

1. Запуск реакции образцом. Для приготовления монореагента смешивают четыре части реагента один с одной частью реагента два. Для исследований в проточной кювете к монореагенту в объеме 500 мкл добавляют сыворотку или плазму крови в объеме 50 мкл. Закачивают содержимое кюветы в анализатор.

2. Запуск реакции субстратом. В проточную кювету наливают 400 мкл реагента один, добавляют к нему 50 мкл сыворотки или плазмы крови, затем перемешивают и инкубируют одну минуту. Далее добавляют 100 мкл реагента два, перемешивают и закачивают содержимое кюветы в анализатор.

Примечание. Если изменение оптической плотности превышает значение 0,16, то сыворотку разводят в пять раз 0,9-процентным раствором хлорида натрия, и полученный результат умножают на разведение. Реакционная смесь готовится по одной кювете непосредственно перед забором пробы в проточную кювету. Значение фактора рекомендуется проверять по мультиколебратору.

2.2 Определение активности пищеварительных ферментов в крови птицы при помощи биохимических анализаторов

Определение амилазы

Исследования проводятся на биохимическом анализаторе Nemwell 2 900 (T) (Awareness Technology, Inc., США) с использованием необходимого набора реагентов (HUMAN GmbH, Германия).

Для определения панкреатической амилазы, 200 μ l буферного раствора с кислотностью 7,15 (состав которого включает Goods buffer, NaCl, MgCl₂, α -Glucosidase, monoclonal antibodies against salivary amylase, sodium azide) смешивают с 4,0 μ l плазмы крови и инкубируют при температуре 37 °C в течение трех минут. Затем добавляют субстрат кислотностью 7,15

(включающий Goods buffer, EPS-G7, sodium azide) в количестве 50 μ l и инкубируют в течение двух минут, после чего считают оптическую плотность (absorbance) с использованием фильтра 405 нм, через 1, 2 и 3 минуты и вычисляют среднее значение $\Delta A/\text{min}$.



Рисунок 2.2 – Определение активности пищеварительных ферментов в крови у птицы на биохимическом анализаторе Hemwell 2900 (T) (Awareness Technology, Inc., США) (ведущий научный сотрудник, канд. биол. наук А. А. Грозина)

Определение липазы

Исследования выполняют на биохимическом анализаторе Hemwell 2900 (T) (Awareness Technology, Inc., США) с использованием необходимого набора реагентов (HUMAN GmbH, Германия).

Для определения липазы, 200 μ l буферного раствора кислотностью 8,0 (состав которого включает Goods buffer, aurodesoxycholate, Desoxycholate, Calcium ions, colipase sodium azide) смешивают с 4,0 μ l плазмы крови и инкубируют при температуре 37 $^{\circ}$ C в течение пяти минут. Затем добавляют субстрат кислотностью 4,0 (включающий Tartrate buffer, lipase substrate,

пропан-1-ол) в количестве 50 μ l и инкубируют в течение двух минут, после чего считают оптическую плотность (absorbance) с использованием фильтра 580 нм через одну и две минуты и вычисляют среднее значение $\Delta A/\text{min}$.

Определение активности трипсина

Для определения трипсина используют буферный раствор кислотностью 8,2 и раствор $N\alpha$ – benzoyl – DL – arginine 4 – nitroanilide hydrochloride (BANI, BAPNA, США).

Подготовка пробы. Перед началом работы реактивы, пробы и кюветы прогревают до комнатной температуры.

Измерение образца. В проточную кювету последовательно добавляют 450 мкл буферного раствора кислотностью 8,2 и 10 мкл исследуемого образца, затем перемешивают и инкубируют в течение 3 минут при температуре 37 °С. После этого добавляют 50 мкл BAPNA, перемешивают содержимое кюветы. Измеряют образцы.

Примеры определения общих протеиназ и трипсина в крови птицы

Активность пищеварительных ферментов в крови определяют для диагностики состояния поджелудочной железы. Из биохимических методов исследования может быть использован метод с применением в качестве субстрата BAPNA (Михайлова А. Г. и др., 2014). Нами изучены для сравнения результаты два метода определения активности протеиназ и трипсина в крови птицы (Вертипрахов В. Г., Грозина А. А., 2018).

Одним из них является метод определения протеиназ сока поджелудочной железы по уменьшению концентрации казеина при калориметрическом контроле (Батоев Ц. Ж., 1971), который описан В. Г. Вертипраховым (2004).

Сущность метода заключается в том, что в качестве субстрата для протеиназ используется 0,1-процентный раствор казеина, очищенный по Гаммерстону. Ход реакции останавливается 15-процентным раствором трихлор-

уксусной кислоты, которая изменяет прозрачность раствора вследствие денатурации остатков белка, и, в зависимости от экстинкции раствора по оптической плотности при длине волны 450 нм, рассчитывается количество оставшегося субстрата. Активность фермента выражается в миллиграммах расщепленного казеина одним миллилитром сока в течение минуты, мг/ (мл. мин).

Нами предложен метод определения трипсина на основе результатов исследований А. Г. Михайловой и др. (2014), приспособленный для полуавтоматического проточного биохимического анализатора SINNOWA BS-3000P (Китайская Народная Республика).

В эппендорф набирают 450 мкл буферного раствора кислотностью 8,2 – реактив один, и добавляют 50 мкл реактива два, содержащего субстрат для трипсина. Реактив два готовят следующим образом: порошок benzoyl – DL – arginine 4 – nitroanilide hydrochloride из расчета 5 мг растворяют в одном миллилитре диметилсульфоксида. Раствор хранят в холодильнике при температуре плюс 4–5 °С не более трех месяцев.

Реактивы один и два тщательно перемешивают, переворачивая закрытый эппендорф 2–3 раза, и инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 3 минут. После этого добавляют 10 мкл исследуемого материала (плазма крови, панкреатический сок, разбавленный раствором Рингера в соотношении 1:100) и запускают реакцию определения активности в биохимическом анализаторе кинетическим методом. Активность фермента выражают в единицах в одном литре, что соответствует расщепленному мкмоль субстрата в одном литре за одну минуту (мкмоль/ (л. мин)).

Статистическая обработка результатов включает расчет среднего значения (M) и среднеквадратичного отклонения от средней ($\pm m$) с использованием компьютерной программы Excel. Достоверность различий оценивают по t-критерию Стьюдента. Различия считают статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследований показывают, что между показателями активности протеиназ, полученными разными методами наблюдаются общие закономерности (табл. 2.1).

Таблица 2.1 – Корреляция между показателями активности протеиназ панкреатического сока кур, полученными разными методами (n=66)

Активность протеиназ		Активность протеиназ		Активность протеиназ	
мг/ (мл. мин)	ед/л	мг/ (мл. мин)	ед/л	мг/ (мл. мин)	ед/л
116	1814	50	1880	116	2478
174	2667	133	2727	183	2171
274	3058	149	2987	166	2083
274	3055	266	3752	149	2674
299	3012	158	2725	174	3169
340	3351	299	3820	166	2700
66	1944	100	2926	75	1866
158	3548	191	3315	83	2707
249	2778	332	3696	183	2540
241	2280	290	2911	183	2474
249	2281	324	3728	207	2751
315	3456	324	2480	257	2749
91	2324	58	1267	66	2506
133	2593	58	2105	103	2577
282	2677	191	3760	193	2864
274	2950	232	2561	246	2747
266	2767	174	3147	206	2752
183	3511	124	3112	196	2666
75	2556	58	2017		
83	3688	75	1879		
274	2869	174	2677		
249	3649	306	2867		
307	4332	249	2803		
307	3440	349	3467		r=0,59

Данные, приведенные в таблице 2.1, свидетельствуют о том, что между показателями существует связь и, следовательно, разные методы отражают

аналогично процессы изменения активности фермента в постпрандиальную фазу пищеварения.

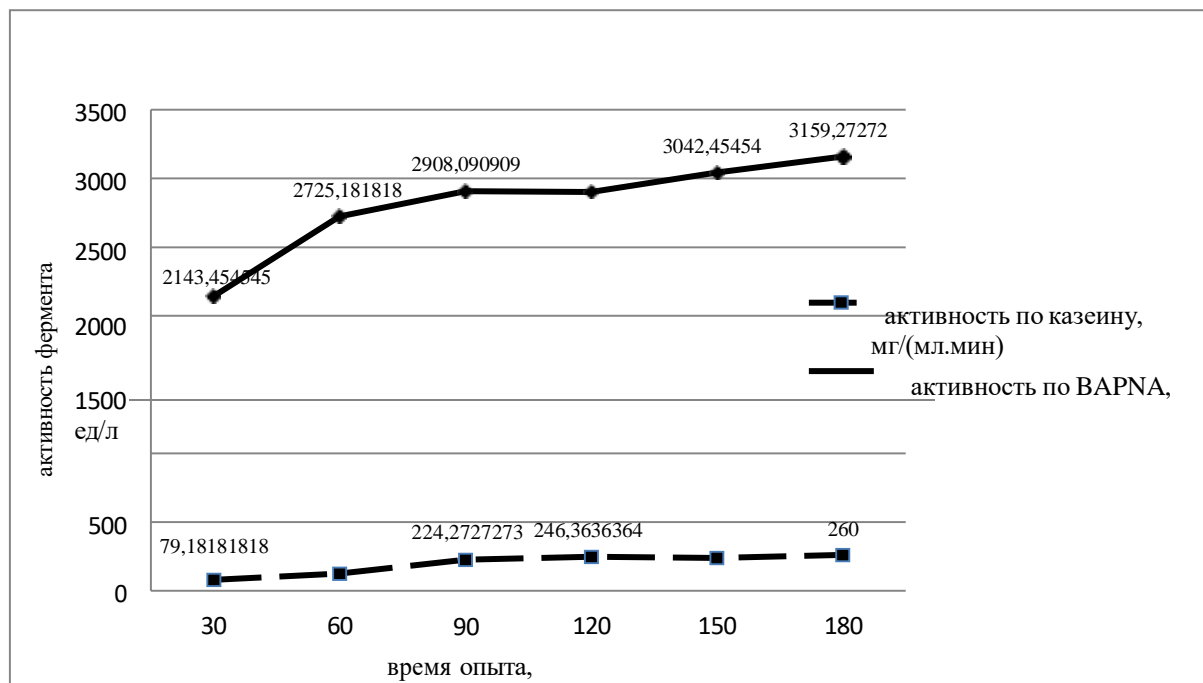


Рисунок 2.3 – Динамика активности общих протеиназ и активности трипсина в постпрандиальный период при определении разными методами

Для того, чтобы лучше представить динамику выделения протеолитических ферментов после кормления необходимо построить диаграмму с интервалом сбора панкреатического сока через каждые 30 минут (рис. 2.3).

Кривые, изображающие активность протеиназ, имеют особенности на 60 и 120 минуте опыта, однако закономерности увеличения ферментативной активности в обоих случаях сохраняются.

Контрольные вопросы

1. Опишите основной принцип работы биохимического анализатора крови.
2. Какое значение имеет определение биохимического состава крови у птиц?
3. В чем заключается подготовка проб сыворотки крови к исследованию?

2.3 Влияние возраста птицы на биохимические показатели крови

В процессе обмена веществ органические и минеральные вещества направляются как из пищеварительного тракта в кровь, так и поступают из крови в кишечник для того, чтобы обеспечить гомеостаз в организме животных. Белки являются важнейшей составной частью плазмы крови (Кузник Б. И., 2002; Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2017). *Приблизительно около 60 % всех белков плазмы приходится на долю альбумина, который выполняет основную роль в поддержании онкотического давления крови, а также выполняет транспортную и питательную функции, остальная часть приходится на α и β -глобулины и другие белки плазмы, в том числе ферменты (трипсин, амилаза, липаза).*

Результаты исследований показывают, что у цыплят суточного возраста содержание белка в плазме крови значительно ниже, чем в последующие периоды жизни (табл. 2.2), что связано с низкой функцией биосинтеза белка (Кузник Б. И., 2002).

Показатель общего белка крови уже к 7-суточному возрасту резко увеличивается (на 33,9–48,5 %) и достигает максимального значения. Причем у цыплят исходной линии Б-9 количество белка в плазме крови превышает уровень гибридов и цыплят исходной линии Б-5 на 5,4 % ($P < 0,1$). К 14-суточному возрасту количество белка в плазме крови снижается до 33,1 г/л и сохраняется на этом уровне в течение двух недель жизни. В дальнейшем к 28-суточному возрасту, увеличиваясь до 40,6–41,7 г/л ($P < 0,05$), и сохраняется на этом уровне до 35-суточного возраста.

Вопросы обмена липидов в организме птицы имеют важное значение, поскольку липиды являются энергоёмким субстратом – при окислении 1,0 г жира образуется 9,3 ккал энергии, что в 2,2 раза больше, чем при окислении белков и углеводов. *Жиры мобилизуют кальций из внутриклеточного депо,*

Таблица 2.2 – Биохимические показатели крови у мясных цыплят в онтогенезе (n=20, M±m)

Возраст цыплят, исходные линии и их гибриды	Показатели					
	живая масса цыплят, г	общий белок, г/л	холестерин, ммоль/л	триглицериды, ммоль/л	кальций, ммоль/л	фосфор, ммоль/л
1-суточные						
Линия Б-5	44,8±0,25	27,2±0,36	5,3±0,04	2,3±0,05	3,0±0,10	3,5±0,13
Линия Б-9	43,2±0,23	27,6±0,70	5,2±0,06	2,4±0,03	3,1±0,008	3,7±0,25
Гибриды (Б59)	44,7±0,14	28,9±0,68	5,2±0,09	2,4±0,08	3,1±0,006	4,1±0,27
7-суточные						
Линия Б-5	136,1±1,67	38,9±0,92	5,3±0,05	2,1±0,02	4,3±0,11	2,1±0,03
Линия Б-9	121,8±1,36*	41±0,84	5,3±0,02	2,2±0,04	4,3±0,05	2,2±0,04
Гибриды (Б59)	136,1±1,55	38,7±0,81	5,2±0,05	2,4±0,03	4,3±0,05	2,4±0,23
14-суточные						
Линия Б-5	278,0±4,91	33,8±1,18	5,2±0,03	3,3±0,07	4,3±0,15	2,6±0,07**
Линия Б-9	252,3±4,32**	33,1±1,27	5,2±0,04	3,3±0,04	5,5±0,12*	2,6±0,11**
Гибриды (Б59)	313,4±7,62	34,1±0,48	5,9±0,10	3,4±0,10	4,6±0,06	2,1±0,09
21-суточные						
Линия Б-5	578,1±13,93**	35,2±0,67	3,7±0,03	3,2±0,04	3,8±0,11	1,8±0,09
Линия Б-9	499,0±11,41**	34,8±1,14	3,8±0,04	3,1±0,04	4,1±0,13	1,8±0,05
Гибриды (Б59)	677,5±19,50	33,7±0,49	3,8±0,02	3,2±0,06	4,0±0,09	1,7±0,12
28-суточные						
Линия Б-5	967,1±24,31**	38,7±1,04	3,8±0,04	3,1±0,02	3,5±0,19**	1,9±0,07*
Линия Б-9	796,0±2,62**	40,6±0,82	3,8±0,04	3,1±0,02	4,5±0,13	1,9±0,05*
Гибриды (Б59)	1146,1±38,43	39,8±1,27	4,2±0,12	3,2±0,06	4,3±0,06	2,4±0,21
35-суточные						
Линия Б-5	1609,2±26,91**	41,4±1,31	4,6±0,12	3,3±0,11	2,8±0,05	2,3±0,04
Линия Б-9	1394,0±30,62**	41,7±0,81	4,4±0,05	2,9±0,02	3,0±0,03	2,2±0,05
Гибриды(Б59)	1996,3±98,31	40,7±2,04	4,5±0,07	3,2±0,18	3,1±0,22	2,3±0,04

регулируют многие биологические процессы в крови, являются стимуляторами пищеварительной функции поджелудочной железы и повышают уровень липазы в панкреатическом соке. В организме нейтральные жиры находятся в форме запасного и протоплазматического жира, в состав которого входят фосфолипиды и липопротеиды.

Холестерол – одноатомный циклический спирт, который входит в состав внешних клеточных мембран (Метревели Т. В. 2005), из него синтезируется прегненолон – предшественник всех стероидов (альдостерон, кортизол, кортикостерон, прогестерон, эстрадиол, тестостерон, холевые и др. желчные кислоты, витамины группы Д) (Колесник Е. А., Дерхо М. А., 2017). Триглицериды, или истинные жиры – это производные трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот.

В настоящей работе мы ставили задачу изучить показатели холестерина и триглицеридов в возрастном и сравнительном аспекте у гибридов и цыплят исходных линий. Данные, представленные в таблице 2.2, показывают, что у суточных цыплят уровень холестерина и триглицеридов не отличается от взрослой птицы.

В онтогенезе наблюдается снижение показателей холестерина в 21-суточном возрасте на 30,2 % у цыплят отцовской линии, на 27,0 % у цыплят материнской линии и цыплят-бройлеров по сравнению с суточным возрастом. В дальнейшем этот уровень сохраняется до 35-суточного возраста, в котором наблюдается увеличение значений холестерина на 21,0 %, 15,8 % и 7,1 % соответственно по сравнению с предыдущим периодом.

Уровень триглицеридов в крови к 14-суточному возрасту увеличивается на 43,5 % и на 37,5 % у цыплят отцовской и материнской линии и на 41,7 % у цыплят-бройлеров по сравнению с суточным возрастом. Такой уровень липидов в крови сохраняется до 35-суточного возраста птицы.

Биологическое значение минеральных веществ характеризуется их ролью в поддержании нормального водного баланса и распределении воды в организме, кислотно-щелочного равновесия, в возникновении возбуждения в нервах и мышцах, проводимости нервных импульсов по нервным волокнам и т.д. Минеральные вещества входят либо в опорные ткани (кальций), либо в соединения, богатые энергией (сера, фосфор). Они оказывают влияние на ферментативную активность и функции живого организма. В этом отношении большая роль принадлежит кальцию, фосфору, магнию и целому ряду микроэлементов (Азарнова Т. О., Найденский М., Бобылькова А., 2012).

Главная особенность минерального обмена кур состоит в том, что процессы поступления в организм минеральных веществ и их выведение не уравновешены между собой, поэтому поступление и контроль в организме минеральных веществ оказывает влияние на показатели продуктивности птицы.

Около 50 % кальция плазмы крови находится в ионизированном виде, 45 % – связано с альбуминами, около 5% – с фосфатами и цитратами. Уровень кальция в крови определяется балансом ряда процессов всасывания в кишечнике, перераспределения между клеточными пространствами организма, обмена в костях и выведения почками. Эти процессы находятся под контролем парагормона, тиреокальцитонина и активной формы витамина D (Бессарабов Б. Ф., Алексеева С. А., Клетикова Л. В., 2008). Все виды обмена в организме неразрывно связаны с превращением фосфорной кислоты. Фосфор встречается главным образом в виде аниона PO_4 . Он принимает участие в обеспечении организма энергией, а также в метаболических процессах.

Результаты исследований показывают, что у цыплят, вылупившихся из яйца, количество кальция в плазме крови имеет достаточно низкий уровень, который уже в первую неделю постэмбриональной жизни повышается на 38,7 %, и такое содержание его в крови остается до 35-суточного возраста с небольшими колебаниями.

В 14-суточном возрасте отмечаются различия по содержанию кальция в плазме крови гибридов и цыплят линии Б-9. У последних количество кальция достоверно выше по сравнению с гибридами (на 19,6 %, $P < 0,001$) и цыплятами линии Б-5 (21,8 %, $P < 0,01$). В 28-суточном возрасте наблюдаются увеличение содержания кальция в крови у гибридов по сравнению с цыплятами линии Б-5 (на 18,6 %). В 35-суточном возрасте наблюдается снижение уровня кальция в плазме крови до $2,8 \pm 0,05$ и $3,0 \pm 0,03$ ммоль/л у цыплят исходных линий и до $3,1 \pm 0,22$ ммоль/л у гибридов. Количество фосфора у суточных цыплят имеет высокий показатель, затем снижается к 7-суточному возрасту в 1,7 раза (табл. 2.2). В дальнейшем некоторый спад отмечается в 21-суточном возрасте, далее в 28-суточном возрасте следует подъем, который сохраняется до 35-суточного возраста. Между группами наблюдаются отличия по уровню фосфора в плазме крови в 14-суточном возрасте (преобладает у цыплят исходных линий на 23,8 % по сравнению с гибридами) и 28-суточном возрасте (содержание фосфора выше в плазме крови гибридов на 20,8 % по сравнению с цыплятами исходных линий).

В суточном возрасте соотношение между кальцием и фосфором составляет 1:0,8–1:0,7, что связано с эмбриональным периодом и соответствующим минеральным обменом. В 7-суточном возрасте соотношение изменяется в сторону увеличения кальция до 1,9:1, а к 14-суточному возрасту увеличивается до 2,2:1 (у гибридов), 2.1:1 (у цыплят исходной линии Б-9) и снижается до 1,6:1 (у цыплят исходной линии Б-5). В 28-суточном возрасте кальций-фосфорное соотношение изменяется в большую сторону у цыплят линии Б-9 (2,4:1), а в 35-суточном возрасте снижается до следующих значений: у гибридов (1,3:1), цыплят линии Б-9 (1,4:1), цыплят линии Б-5 (1,2:1).

Кровь наряду с транспортной, выполняет регуляторную функцию, благодаря наличию гормонов, пептидов и т. д. Известно (Rothman S., Liebow C., Isenman L., 2002; Коротько Г. Ф., 2013), что пищеварительные ферменты

поступают в кровь, выполняя там регуляторную функцию (Laporte J. C, Tremolieres J., 1971). Поэтому биохимический анализ крови был бы не полным без данных о возрастных изменениях пищеварительных ферментов в плазме крови у мясных кур.

Таблица 2.3 – Возрастные изменения активности пищеварительных ферментов в плазме крови цыплят-бройлеров (n=20, M±m)

Возраст цыплят, исходные линии и их гибриды	Активность амилазы		Активность липазы		Активность трипсина	
	в плазме крови, U/L	Отношение к массе птицы, г	в плазме крови, U/L	Отношение к массе птицы, г	в плазме крови, U/L	Отношение к массе птицы, г
1-суточные						
Линия Б-5	827±132,9	18,45	15±0,8	0,33	203±12,7	4,53
Линия Б-9	929±92,9	21,5	15±0,9	0,35	191±11,2	4,42
Гибриды(Б59)	671±50,5	15,0	14±0,3	0,31	224±12,1	5,01
7-суточные						
Линия Б-5	704±66,3	5,17	25±1,7	0,18	29±5,2	0,21
Линия Б-9	926±107,9	7,60	23±1,5	0,19	21±1,9	0,17
Гибриды(Б59)	1001±21,4	7,35	23±1,5	0,17	19±4,3	0,14
14-суточные						
Линия Б-5	583±56,6	2,10	20±3,7	0,07	30±3,7	0,11
Линия Б-9	832±136,3	3,29	21±2,3	0,08	30±1,4	0,12
Гибриды(Б59)	1296±358,3	4,13	16±1,7	0,05	29±3,5	0,09
21-суточные						
Линия Б-5	382±39,0	0,66	15±0,5	0,02	29±3,6	0,05
Линия Б-9	445±103,7	0,89	14±1,3	0,03	23±3,2	0,05
Гибриды(Б59)	525±95,0	0,77	18±2,2	0,03	23±2,1	0,03
28-суточные						
Линия Б-5	564±124,0	0,58	10±1,4	0,01	18±1,2	0,02
Линия Б-9	642±82,3	0,81	11±0,6	0,01	20±1,4	0,02
Гибриды(Б59)	516±86,7	0,45	10±1,4	0,01	19±1,4	0,02
35-суточные						
Линия Б-5	510±71,3	0,32	22±2,2	0,01	16±1,1	0,01
Линия Б-9	605±86,3	0,43	18±1,1	0,01	12±2,5	0,01
Гибриды(Б59)	298±28,2	0,15	20±2,8	0,01	23±3,6	0,01

С возрастом (табл. 2.3) у исходных линий мясных кур наблюдается снижение активности амилазы до 21-суточного возраста: у цыплят отцовской линии на 53,8 %, у материнской линии – на 52,1%. К 35-суточному возрасту наблюдается повышение амилалитической активности в плазмекрови соответственно на 15,5 % и 17,2 % по сравнению с суточным возрастом. Если рассматривать активность амилазы на единицу (грамм) живой массы, то показатель неуклонно снижается с возрастом: у 1-суточных цыплят отцовской линии в 57,6 раз к 35-суточному возрасту, у цыплят материнской линии – в 50,0 раз. У гибридов динамика амилазы в онтогенезе имеет подъем с суточного до 14-суточного возраста на 93,1 %, а в дальнейшем отмечается резкий спад ферментативной активности в плазме крови на 55,6 % по сравнению с суточными цыплятами. Показатель соотношения активности амилазы к живой массе бройлеров за 35 сутки выращивания снижается в 100 раз, что значительно (почти в 2 раза) выше, чем у особей исходных линий.

В активности липазы в онтогенезе нами выделены изменения: с суточного до 7-суточного возраста активность фермента увеличивается на 66,7 % (отцовская линия, $p < 0,001$), 53,3 % (материнская линия, $p < 0,001$) и 64,3 % (гибриды, $p < 0,001$). В дальнейшем наблюдается снижение активности липазы в плазме крови к 21-, 28-суточному возрасту в 2,5–2,3 раза у всех групп цыплят с подъемом к 35-суточному возрасту до уровня 7-суточных цыплят. Показатель отношения активности липазы на единицу массы птицы показывает снижение фермента с суточного до 30-суточного возраста у цыплят отцовской линии в 33 раза, материнской – в 35 раз, гибридов – в 31 раз. Результаты показывают, что в крови суточных цыплят наблюдается высокая активность трипсина, что может быть связано с выработкой достаточного количества ингибиторов, сдерживающих активность фермента в период эмбриогенеза. К 7-суточному возрасту активность трипсина в плазме крови снижается у цыплят отцовской линии в 7 раз, мате-

ринской – в 9,1 раза, у гибридов – в 11,8 раза. В дальнейшем наблюдается постепенное снижение активности трипсина к 28-, 35-суточному возрасту, как в абсолютных величинах, так и относительно живой массы. В целом относительный показатель активности трипсина на единицу живой массы (грамм) снижается за 35-суточный период исследований у цыплят отцовской линии в 453 раза, у материнской – в 442 раза, у гибридов – в 501 раз. Это можно объяснить ингибированием протеолитической активности эмбриона в яйце в связи с наличием легкоусвояемых форм белка для биосинтеза организма (Егоров И. А., Вертипрахов В. Г., Грозина А. А. и др., 2017). Следовательно, относительное снижение активности пищеварительных ферментов в плазме крови с возрастом свидетельствует о снижении обменных процессов в организме и выполнении ферментами, особенно трипсином, регуляторной функции.

Роль поджелудочной железы не ограничивается вопросами пищеварения. Она выполняет эндокринную функцию, вырабатывая гормоны (инсулин, глюкагон, соматостатин), а также участвует в регуляции обмена веществ за счет поступления панкреатических ферментов в кровь (Коротько Г. Ф., 2013). Поэтому в задачу исследований входило изучение активности ферментов поджелудочной железы в плазме крови у цыплят-бройлеров в возрастном аспекте (табл. 2.4).

Таблица 2.4 – Активность панкреатических ферментов в плазме крови в постэмбриональный период у цыплят-бройлеров

Возраст, суток	Амилаза, ед/л	Липаза, ед/л	Протеазы, ед/л
1	671±50,0	14±0,3	14±1,3
7	1001±21,4*	23±1,5*	15±1,5
14	1296±358,3*	16±1,7	11±0,5
21	525±101,4	18±2,2	10±3,6
28	516±86,7	10±1,4*	13±1,6
35	298±28,5*	20±2,8*	8±1,6*
Среднее	718±163,5	17±2,0	12±1,2

Примечание: *различие с показателем в суточном возрасте достоверно, при $p < 0,05$.

Анализ возрастных изменений амилалитической активности плазмы крови показывает, что в течение двух недель постэмбрионального развития отмечается повышение активности амилазы на 49,1 % (7-суточный возраст) и на 93,1 % (14-суточный возраст). Это может быть связано с быстрым ростом поджелудочной железы и дефицитом вновь синтезируемых ферментов, и, как следствие, развитием процесса интенсивной секреции ферментов из крови (Коротько Г. Ф., 2013) для удовлетворения возрастающих потребностей организма в гидролазах. С 21-суточного возраста цыплят наблюдается снижение активности амилазы в плазме крови до конца выращивания: в 35-суточном возрасте активность становится ниже, чем у суточных цыплят более, чем в два раза.

Аналогичная возрастная динамика отмечается в активности протеолитических ферментов: с возрастом активность снижается и в 35-суточном возрасте показатель становится ниже на 42,9 %, чем в суточном возрасте. Это можно объяснить участием протеаз плазмы крови в регуляции кровяного давления. С возрастом этот показатель становится выше (Георгиевский В. И., 1978), а процессы ассимиляции в организме, наоборот, снижаются. Между активностью протеаз в ткани поджелудочной железы и плазмы крови установлена отрицательная корреляция ($r = \text{минус } 0,75$).

Активность липазы в плазме крови увеличивается к 7-суточному возрасту на 64,3 %, затем следует снижение к 28-суточному возрасту на 28,6 %, который сменяется подъемом на 42,8 % по сравнению с суточным возрастом.

Таким образом, результаты исследований позволяют сделать заключение о том, что у суточных мясных цыплят наблюдается низкий уровень в плазме крови общего белка, триглицеридов, кальция, а уровень фосфора и холестерина, наоборот, имеет достаточно высокий уровень. Наиболее значительный подъем основных показателей крови наблюдается к 7-суточному возрасту у мясных цыплят, что связано с интенсивным ростом и функциональным становлением пищеварительной системы.

Уровень общего белка в плазме крови с возрастом гибридов и цыплят исходных линий увеличивается, что обусловлено становлением организма и совершенствованием белково-образовательной функции, исходя из многогранной роли белка крови в процессах жизнедеятельности организма.

Показатели липидного обмена имеют тенденцию к снижению с возрастом, наиболее этот процесс заметен после 21-суточного возраста. Динамика уровня триглицеридов в крови имеет обратную тенденцию, увеличиваясь к 14-суточному возрасту на 41,6–57,1 % по сравнению с предыдущими показателями.

Существенных различий в показателях общего белка между гибридами и цыплятами исходных линий до 35-суточного возраста не наблюдается. Междугибридами и цыплятами исходных линий имеются отличия по уровню кальция (в 14-, 28-суточном возрасте), фосфора (в 14-, 28-суточном возрасте), холестерина (в 14-28-суточном возрасте) и триглицеридов (в 7-суточном возрасте). Показатель активности пищеварительных ферментов относительно живой массы в крови у мясных кур имеет динамику снижаться с возрастом, причем имеются особенности у разных ферментов.

2.4 Биохимические показатели крови кур в постпрандиальный период

Изменение активности пищеварительных ферментов в секрете поджелудочной железы после кормления установлено еще в работах исследователей в лаборатории И. П. Павлова. Однако, динамика трипсина в крови после кормления, особенно у птицы, до настоящего времени полностью не изучена. Эти процессы имеют диагностическое значение не только в определении состояния панкреас, но и как маркеры адаптации панкреатической секреции к разному по составу корму и различным биологически активным добавкам. Нами экспериментально показано, что активность трипсина существенно увеличивается после приема корма (табл. 2.4).

Таблица 2.4 – Влияние приема корма на активность трипсина в соке поджелудочной железы и плазме крови кур ($M \pm m$, $n=11$)

Периоды опыта, мин	Панкреатический сок		Плазма крови	
	активность, ед/л	в процентах от базальной активности	активность, ед/л	в процентах от базальной активности
0–30 мин (до приема корма)	2143±133,6	100,0	75±2,3	100,0
30–60 (постпрандиальная фаза)	2725±168,5	127,2	134±10,8	178,7
60–90	2908±139,1	135,7	129±12,3	172,0
90–120	2901±131,2	135,4	-	
120–150	3042±143,6	141,9	-	
150–180	3159±127,3	147,4	96±8,9	128,0

Результаты исследований показывают, что в плазме крови активность трипсина в постпрандиальную фазу увеличивается интенсивнее, чем в панкреатическом соке – на 51,5 %. Динамика активности трипсина в панкреатическом соке через три часа опыта увеличивается на 20,2 % по сравнению с первым периодом после приема корма, а в плазме крови, наоборот, снижается за аналогичный период на 50,7 %. Это указывает на участие трипсина в регуляции панкреатической секреции в нейрогуморальную фазу в результате выделения в кровь гормонов секретина и холецистокинина.

Установлено (Rothman S., Liebow C., Isenman L, 2002), что холецистокинин является ингибитором трипсина, и это может влиять на активность фермента в плазме крови в нейрогуморальную фазу регуляции панкреатической секреции. Соотношение активности трипсина в панкреатическом соке и плазме крови составляет в среднем 26:1. Зная указанное соотношение трипсина, можно по активности трипсина в крови прогнозировать гидролиз протеина в кишечнике.

Результаты исследований на петухах породы Леггорн в возрасте одного года представлены в таблице 2.5.

Результаты исследований показывают, что после приема корма наиболее существенные изменения происходят в активности трипсина. Активность амилазы и липазы в плазме крови после приема корма не изменяется на достоверную величину. Причем интервал после приема корма имеет значение.

Наибольшее увеличение активности трипсина в крови отмечается после 30 и 60 минут после приема корма (на 67,1–66,0 %) по сравнению с фоновым уровнем активности. Через 180 минут после приема корма активность трипсина в крови снижается на 24,8 % по сравнению с показателем после 30-минутного воздействия корма на пищеварительную систему птицы (рис. 2.4).

Таблица 2.5 – Активность пищеварительных ферментов (ед/л) и показатели Fe(NO)n(мкМ/л) в крови петушков до и после приема корма (M±m, n=5)

Показатели	Трипсин, У/л	Амилаза, У/л	Липаза, У/л	Fe(NO)n, мкМ/л
1 До кормления	76±2,3	277±55,1	14±0,8	11,8±0,80
1.1 Через 30 минут после приема корма	127±11,4	337±55,1	12±0,6	29,8±2,03
1.2 В процентах к фону	167,1*	121,7	85,7	252,5*
2 До кормления	53±2,8	278±19,1	19±1,2	10,1±0,81
2.1 Через 60 минут после приема корма	88±4,6	270±24,8	18±1,7	18,6±1,93
2.2 В процентах к фону	166,0*	97,1	94,7	184,4*
3 До кормления	59±3,3	324±55,4	16±0,9	12,4±1,25
3.1 Через 180 минут после приема корма	84±9,6	477±123,1	14±1,3	17,2±1,85
3.2 В процентах к фону	142,3*	147,2	87,5	138,7*

Примечание: * – разница между до и после кормления достоверна, p<0,05.

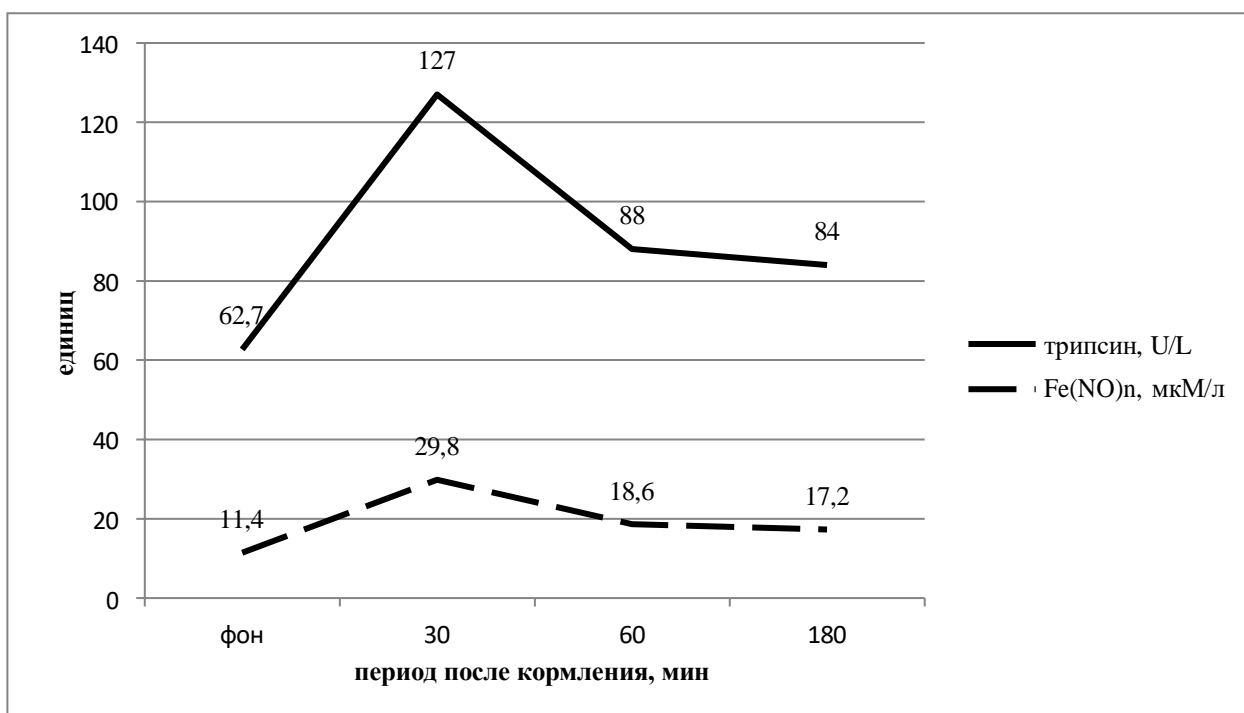


Рисунок 2.4. – Динамика активности трипсина и содержание Fe(NO)n после приема корма у петушков

Доноры оксида азота в плазме кур представлены соединениями типа Fe(NO)n. Ими представлен весь пул нитрозосоединений. Содержание нитрозолиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа, содержащих тиолатные лиганды (ДНКЖ/RSH), а также высокомолекулярных нитратов, способных трансформироваться в ДНКЖ/RSH, не превышало 100 нМ. Содержание нитрита и RNNO также не превышало 100 нМ.

Содержание Fe(NO)n в плазме крови петухов во всех случаях увеличилось после кормления. Максимального значения повышение их содержания по сравнению с исходным уровнем наблюдалось через 30 минут после приема корма (на 52,5 %). В дальнейшем наблюдалось снижение этого показателя, соответственно до 84,4 % и 38,7 % по сравнению с исходной величиной через 60 и 180 минут (рис. 2.4).

Концентрация нитрата в плазме существенно не различалась до и после кормления и составляла 80–90 мкМ.

Таким образом, прием корма достоверно повышает активность трипсина и содержание доноров NO в плазме крови петушков максимально через 30

минут после кормления, а затем постепенно показатели снижаются, приближаясь через 180 минут после приема корма исходному уровню.

Аналогичные результаты были получены на курах-несушках при использовании в рационе биологически активных добавок (табл. 2.6).

Изучение биохимических показателей в динамике после приема корма показывает, что наиболее мобильными показателями являются изменение активности в плазме крови трипсина и содержание глюкозы. Так, активность трипсина в постпрандиальную фазу пищеварения увеличивается при использовании в рационе подкислителя в 2,1 раза через один час после приема корма, в 2,1 раза – при использовании протеазы и в 1,7 раза – при добавлении в корм усилителя вкуса с чесночным ароматом. Содержание глюкозы в крови кур увеличивается через один час после кормления при использовании протеазы на 21,0 %, при добавлении в корм усилителя вкуса с чесночным ароматом – на 20,0 % ($p \leq 0,05$).

Таблица 2.6 – Биохимические показатели крови кур породы Хайсекс белый в препрандиальную и постпрандиальную фазу

Показатель	Группа		
	ОР + подкислитель	ОР + протеаза	ОР + чеснок
Трипсин, ед/л	$\frac{162 \pm 42,5}{345 \pm 25,4^*}$	$\frac{175 \pm 23,4}{362 \pm 56,1^*}$	$\frac{179 \pm 38,1}{310 \pm 32,3^*}$
Общий белок, г/л	$\frac{44 \pm 5,9}{43 \pm 3,7}$	$\frac{39 \pm 3,8}{39 \pm 3,9}$	$\frac{30 \pm 2,8}{34 \pm 5,3}$
Щелочная фосфатаза, ед/л	$\frac{1287 \pm 183,7}{1317 \pm 152,3}$	$\frac{589 \pm 82,2}{1304 \pm 387,7}$	$\frac{1014 \pm 147,4}{1010 \pm 184,6}$
Холестерин, ммоль/л	$\frac{2,0 \pm 0,86}{3,2 \pm 1,01}$	$\frac{3,3 \pm 0,53}{2,1 \pm 0,64}$	$\frac{2,4 \pm 0,51}{1,8 \pm 0,47}$
Триглицериды, ммоль/л	$\frac{4,0 \pm 0,87}{3,8 \pm 0,06}$	$\frac{6,8 \pm 0,86}{5,3 \pm 0,48}$	$\frac{5,7 \pm 0,97}{5,1 \pm 0,67}$
Глюкоза, ммоль/л	$\frac{6,5 \pm 0,20}{7,0 \pm 0,75}$	$\frac{6,2 \pm 0,35}{7,5 \pm 0,2^*}$	$\frac{7,0 \pm 0,23}{8,4 \pm 0,42^*}$

Примечание: в числителе приведены показатели до кормления, в знаменателе через один час после кормления; * – разница с состоянием натощак достоверна, $p \leq 0,05$.

Таким образом, прием корма оказывает влияние на активность трипсина в плазме крови у птицы, что следует учитывать при выполнении лабораторных исследований.

2.5 Влияние кросса и породы кур на биохимию крови

Исследования крови выполняли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BS-3000P (Китайская Народная Республика), используя наборы по определению кальция, фосфора, общего белка, холестерина, триглицеридов, щелочной фосфатазы компании «ДИАКОН-ВЕТ» (Россия).

Сравнительные исследования выполняли на курах разных пород. Объектом исследования служили петушки породы леггорн в возрасте 90–120 суток, цыплята-бройлеры 30–42-суточного возраста, мясные куры исходных линий – Б5 (отцовская линия) и Б9 (материнская линия) разведения СГЦ «Смена» 30–60-суточного возраста.

Таблица 2.7 – Морфологические показатели крови у мясных кур прародительских линий и гибридов

Показатель	Куры прародительских линий, возраст 250 суток		Цыплята-бройлеры, 35 суток
	Линия Б6	Линия Б7	
WBC, 10^9 /л	20–40	20–40	20–40
Neu, %	24–30	24–30	30–35
Lym, %	52–60	52–60	55–60
Mon, %	2–5	2–5	2–5
Eos, %	3–5	3–5	3–5
Vas, %	0–1	0–2	0–1
RBC, 10^{12} /л	2–4	2–4	2–4
HGB, г/л	80–120	80–120	90–130
HCT, %	20–25	20–25	35–39

Таблица 2.8 – Биохимические показатели крови у мясных кур прародительских линий и гибридов

Показатель	Прародительские линии, возраст 250 суток				Цыплята-бройлеры, возраст 35 суток
	Линия Б5	Линия Б9	Линия Б6	Линия Б7	
Трипсин, ед/л	100,0–130,0	110,0–140,0	210,0–240,0	170,0–200,0	60,0–80,0
Общий белок, г/л	33,1–41,7	33,0–41,0	30,0–38,0	31,9–39,6	28,0–35,0
Триглицериды, ммоль/л	3,1–4,0	2,9–4,0	3,1–4,7	2,7–5,6	3,2–4,0
Холестерин, ммоль/л	3,2–4,6	3,2–4,8	1,3–1,6	1,8–1,9	3,2–4,5

Морфо-биохимические исследования крови у сельскохозяйственной птицы

Щелочная фосфатаза, ед/л	790,0–1 000,0	730,0–1000,0	170,0–600,0	150,0–450,0	1 200,0–2 500,0
Кальций, ммоль/л	2,8–3,8	3,0–4,5	1,6–3,6	1,9–3,9	3,1–4,3
Фосфор, ммоль/л	1,8–2,3	1,8–2,2	1,0–2,0	0,9–2,0	1,7–2,3
Глюкоза, ммоль/л	7,6–9,5	7,6–10,0	5,5–10,0	5,9–9,0	6,9–9,0
Трипсин, ед/л	100,0–130,0	110,0–140,0	210,0–240,0	170,0–200,0	60,0–80,0
Общий белок, г/л	33,1–41,7	33,0–41,0	30,0–38,0	31,9–39,6	28,0–35,0
Триглицериды, ммоль/л	3,1–4,0	2,9–4,0	3,1–4,7	2,7–5,6	3,2–4,0

Примечание: в качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия 1:20

Птицы содержались в виварии Федерального научного центра «Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства» Российской академии наук, кормление осуществлялось в соответствии с нормами для соответствующих кроссов и линий. Для выполнения исследований кровь брали у птицы в состоянии натощак после 16-часового голодания из подкрыльцовой вены, в количестве 2–3 мл с добавлением цитрата натрия. Кровь центрифугировали при скорости 5 000 оборотов в минуту на протяжении 5 минут и определяли в плазме крови активность пищеварительных ферментов.

Активность трипсина в плазме крови изучали, используя в качестве субстрата бензоил-аргинин нитроанилид гидрохлорид (BAPNA), на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BS3000P (Китайская Народная Республика) кинетическим методом (Mikhailova, A. G., 2014). Активность амилазы и липазы в плазме крови выполняли на биохимическом автоматическом анализаторе Chem Well 2900 (T) (США) с использованием соответствующих наборов реагентов HUMAN GmbH (Германия).

Статистическую обработку результатов исследований выполняли с использованием компьютерной программы Excel. Достоверность результатов определяли при помощи таблиц Стьюдента, разница считалась достоверной при $P < 0,05$.

Таблица 2.9 – Соотношение активности пищеварительных ферментов в крови разных пород кур

Показатели	Липаза, U/L	Трипсин, U/L	Амилаза, U/L	Индекс пищеварительных ферментов крови
Цыплята- бройлеры кросса «Смена-8»	20±4,1	29±2,0	244±37,2	9,1
Молодняк кур отцовской линии Б5	29±2,2	35±5,4	395±43,5	12,1
Молодняк кур материнской линии Б9	15±0,9	29±0,5	290±25,1	10,5
Петушки породы леггорн	19±1,24	47±2,6	273±19,1	6,2

Анализ активности пищеварительных ферментов в панкреатическом соке, дуоденальном химусе и плазме крови цыплят-бройлеров указывает на наличие определенной связи, обусловленной, главным образом, составом рациона (Laporte J. C., Tremolieres J., 1971). Для того, чтобы сопоставить соотношение панкреатических ферментов в плазме крови у разных пород кур нами выполнены параллельные исследования, результаты которых представлены в таблице 2.9.

Данные показывают, что **наименьший процент ферментативной активности имеет липаза – фермент, который в кишечнике обеспечивает гидролиз жиров до глицерина и жирных кислот.** Как правило, этот показатель связан с уровнем сырого жира в рационе (Sjovall J. Et al., 2000). В эмульгировании жира в кишечнике большая роль отводится желчным кислотам, которые у птиц выделяются в двенадцатиперстную кишку в составе желчи одновременно с панкреатическим соком, поскольку протоки открываются общей папиллой. Долгое время считалось, что желчные кислоты являются активаторами протеаз.

Однако, как установлено, при использовании чистых препаратов панкреатической липазы, желчные кислоты ингибируют этот фермент (Fuljio

I., 1986). С учетом наличия энтерогепатической циркуляции желчных солей, которая у человека за сутки составляет 6–10 циклов (Алиев А. А., 1982), можно предположить, что процессы энтеропанкреатической циркуляции ферментов происходят параллельно, возвращая в кровь липазу. В данном случае минимальный уровень липазы наблюдается у кур материнской линии Б9 мясного направления продуктивности СГЦ «Смена» (4,5 %), у петушков породы леггорн – 5,6 %. Показатели активности липазы и её процентное соотношение у цыплят-бройлеров и их отцовской линии Б5 СГЦ «Смена» имеют соответственно 6,8 и 6,3 %, что связано, по-видимому, с интенсивностью обмена веществ и ростом мясной птицы.

Что касается количества трипсина в соотношении активности пищеварительных ферментов крови, то наибольший в процентном выражении показатель отмечается у петушков породы леггорн – 13,9 %, у бройлеров – 11,9 %, мясных кур материнской линии Б9 – 8,7 %, мясных кур отцовской линии Б5 – 7,6 %.

Наибольший процент в индексе пищеварительных ферментов принадлежит амилазе – ферменту, который гидролизует углеводы рациона до простых мономеров, способных всасываться в кровь. Самый высокий уровень данного фермента в соотношении пищеварительных ферментов в плазме крови наблюдается у материнской линии мясных кур Б9 (86,8 %), далее следуют отцовская линия мясных кур Б5 (86,0 %), бройлеры (83,3 %), петушки породы леггорн (80,5 %).

В научной литературе широко используется термин **амилаза-протеазное соотношение ферментов, который определяет тип питания животных** (Батоев Ц. Ж., 2001). Однако если рассматривать все три направления обмена веществ: белковый, углеводный, жировой, а также ферменты, которые участвуют в гидролизе соответствующих субстратов, то следует разделить их на более стабильную группу в плазме крови (амилаза и липаза) и более лабильную протеолитическую (трипсин). Следовательно, соотношения пищеварительных ферментов в крови птицы

можно выразить следующей формулой:

$$\text{ИПФК} = \frac{\text{Л} + \text{А}}{\text{Т}} \quad (2.1)$$

где ИПФК – индекс пищеварительных ферментов крови,

Л – активность липазы, U/L;

А – активность амилазы, U/L; Т – активность трипсина, U/L.

Результаты показывают, что из представленных групп птицы минимальный уровень ИПФК отмечен в организме петушков породы леггорн. У бройлеров этот показатель выше на 46,7 %, у молодняка материнской линии – на 69,3 %. У молодняка отцовской линии мясной птицы линии Б5 ИПФК характеризуется преобладание в рационе углеводного компонента, и уровень ИПФК на 95,2 % выше, чем у петушков породы леггорн. Таким образом, **чем ниже показатель ИПФК, тем рацион относительно богаче протеином и процессы обмена направлены на биосинтез белка в организме птицы. В обратной ситуации преобладает углеводный тип питания.**

Расчет корреляции между живой массой и ИПФК у петушков показывает, что существует средняя отрицательная связь между исследуемыми показателями, которая имеет отличия до и после кормления (табл. 2.10).

Следовательно, **индекс пищеварительных ферментов крови имеет связь с живой массой птицы и может служить критерием, позволяющим определять физиологические показатели пищеварительной системы и здоровье поджелудочной железы разных животных, обусловленных определенным уровнем питания и обмена веществ. Причем исследования показывают, что ключевым ферментом, который оказывает влияние на ИПФК является трипсин, поскольку активность его существенно (почти в 2 раза) увеличивается через один час после кормления, в то время как активность амилазы и липазы в плазме крови существенно не изменяются.**

Таблица 2.10 – Изменение активности пищеварительных ферментов и ИПФК в крови петушков породы леггорн после приема корма

Живая масса, г	Трипсин, U/L		Амилаза, U/L		Липаза, U/L		Индекс пищеварительных ферментов крови	
	до кормления	после кормления	до кормления	после кормления	до кормления	после кормления	до кормления	после кормления
1678	53,4	124	249,8	361,4	5,7	7,2	4,8	3
1486	56,3	141	226,7	216,1	4,8	12,8	4,1	1,6
1365	30,8	55,2	210,1	180	5,4	5,8	7	6
1606	38,4	68,8	176,9	196,5	18	8,7	5,1	3
1614	41,9	75,1	246,8	99,7	4,6	6,9	6	1,4
1704	42,7	90,8	374,9	397	10,7	12,4	9	4,5
1758	38,7	71,8	193	195,5	15,6	11,3	5,4	2,9
1651	57,7	73,9	583	216,6	18,5	25,5	10,4	3,3
1645	62,1	117,2	358,3	167,9	24,6	23,7	6,2	1,6
1690	59,2	91,5	286	229,7	14,8	20,7	5,1	2,7
1706	48,6	72,8	205,1	234,7	11,7	21,1	4,4	3,5
1601	32,5	40,9	198,5	321,7	23,4	33,3	6,8	8,7
1682	28	66,1	285,1	252,3	18	25,7	10,8	4,2
1451	25	66,3	228,7	578,5	15,5	31,2	9,8	9,2
среднее	43,9	82,6	273,0	260,5	13,7	17,6	6,8	3,9
r							-0,08	-0,42

Известно, что углеводный обмен определяется количеством глюкозы в крови, которая заметно возрастает после кормления. Расчет корреляции между трипсином и глюкозой показывает, что в межпищеварительный (базальный) период до кормления эта связь имеет неустойчивый характер ($r = 0,31$). После кормления, то есть в постпрандиальную (стимулированную приемом пищи) фазу, корреляция имеет прямую зависимость – чем больше в крови активность трипсина, тем больше количество глюкозы ($r = 0,77$). Эти данные, с учетом связи инсулина и глюкозы, подтверждают результаты многочисленных исследований на животных *in vivo* и *in vitro* о роли инсулина в регуляции экзокринной секреции поджелудочной железы (Можейко Л. А., 2016).

Нами установлена обратная корреляция между активностью трипсина в крови у петушков и частотой сердечных сокращений, которая увеличивается через один час после кормления и достигает значения $r = \text{минус } 0,85$, что сложно объяснить только парасимпатическим влиянием блуждающего нерва.

Следовательно, комплексная оценка активности трех основных пищеварительных ферментов в плазме крови позволяет определить функциональные возможности и здоровье пищеварительной системы, а также её способность адаптироваться к характеру питания.

Вопросам изучения происхождения в циркулирующей крови ферментов пищеварительных желез посвящено несколько научных работ (Коротько Г.Ф., 2013; Rothman S., Leibow C., Isenman L., 2002). Авторами указывается три основных пути поступления пищеварительных ферментов в кровь:

- 1) в процессе поступления ферментов в протоки часть из них попадает в межклеточное пространство, а оттуда в кровеносные капилляры, то есть эндосекретируется;
- 2) транспорт из протоков пищеварительных желез («уклонение» ферментов) трансцеллюлярным путем при высоком интрадуктальном давлении секрета;
- 3) транспорт из подвздошной кишки в кровь и лимфу.

Ферменты, циркулирующие в крови и выполняющие роль сигнальных молекул, выполняют регуляторную функцию. Согласно гипотезе J.C. Laporte и J. Tremolieres (1971), трипсин принимает участие в ретроградном торможении его синтеза в поджелудочной железе, а различные ингибиторы трипсина стимулируют выделение протеаз в составе панкреатического сока.

Что касается адаптации ферментов к составу рациона, то этот факт подтвержден результатами физиологических опытов на фистульных животных в лаборатории академика И.П. Павлова и современными морфофизиологическими методами на уровне клетки (Можейко Л.А., 2017). Данные по корреляции трипсина в крови и поджелудочной железе малочисленны и носят

дискуссионный характер, поэтому входят в планы наших дальнейших исследований.

Таким образом, предложенный нами индекс пищеварительных ферментов крови, который рассчитывается как сумма активности амилазы и липазы, деленная на активность трипсина, может быть использован в качестве критерия оценки нормальной физиологии пищеварительной системы у разных пород, кроссов птицы, а также здоровья и адаптации секреторной функции поджелудочной железы к типу питания животных.

Экспериментальные данные показывают, что биохимические показатели крови у разных кроссов кур значительно различаются (табл. 2.11).

Таблица 2.11 – Биохимические показатели крови мясных исходных линий, гибрида, и Хайсекс белый (n=30)

Показатель	Линия Б5(корниш)	Линия Б9 (плимутрок)	Гибрид Б59	Хайсекс-белый
Трипсин, ед/л	123,9 ± 8,20	118,3 ± 6,40	75,8 ± 2,86	154,3 ± 10,06
Общий белок, г/л	41,4 ± 1,31	41,6 ± 0,81	40,7 ± 2,04	39,2 ± 0,68
Триглицериды, ммоль/л	4,6 ± 0,12	4,4 ± 0,05	4,5 ± 0,18	3,5 ± 0,24
Холестерин, ммоль/л	3,3 ± 0,11	2,9 ± 0,02	3,2 ± 0,07	2,1 ± 0,15
Щелочная фосфатаза, ед/л	850,0 ± 60,00	787,3 ± 54,27	1825,6 ± 91,94	1142,6 ± 89,36
Мочевая кислота, мкмоль/л	258,6 ± 19,24	242,2 ± 18,13	117,9 ± 9,97	185,8 ± 10,55
Кальций, ммоль/л	2,8 ± 0,05	3,0 ± 0,03	3,1 ± 0,22	2,2 ± 0,10
Фосфор, ммоль/л	2,3 ± 0,04	2,2 ± 0,05	2,3 ± 0,04	0,5 ± 0,03
АЛТ, ед/л	9,1 ± 0,83	8,9 ± 0,42	12,0 ± 0,65	8,8 ± 0,41
АСТ, ед/л	179,6 ± 5,12	176,3 ± 6,37	254,4 ± 10,86	198,8 ± 3,45
Глюкоза, ммоль/л	9,45 ± 0,41	9,65 ± 0,25	6,9 ± 0,30	8,4 ± 0,24

Наибольший уровень трипсина наблюдается у кур-несушек, что превышает активность в плазме крови у бройлеров на 50,8 % ($p < 0,05$). Уровень трипсина родительских линий между собой не имеет значительной разницы. Известно, что трипсин является панкреатическим ферментом, который регулирует не только деятельность поджелудочной железы по принципу обратной связи (Laporte J. C., Tremolieres J., 1971), но и участвует в регуляции метаболизма в составе калликреин-кининовой системы в роли активатора кининогенов.

Ранее нами установлена зависимость между обменными процессами у кур и активностью пищеварительных ферментов, в результате чего предложен индекс пищеварительных ферментов крови, где наибольшей лабильностью обладает активность трипсина (Фисинин В.И., Вертипрахов В.Г., Грозина А. А., 2018). *Наиболее вероятно, что различия в активности трипсина в таблице 2.11 связаны с генетическим потенциалом птицы и режимом кормления.*

Отмечены некоторые различия между кроссами в содержании общего белка в плазме крови. Уровень общего белка в крови у кур-несушек на 3,8 % меньше, чем у гибрида и на 5,3 % меньше, чем у родительских линий. *Концентрация белка, азотистых веществ закономерно повышаются в связи со спецификой рационов бройлеров, который характеризуется высоким содержанием сырого протеина, а также генетически обусловленным темпом роста и метаболизма.*

Мочевая кислота является основным конечным продуктом белкового обмена у птицы. Её показатели имеют значительные колебания, связанные с питанием и физиологическими особенностями кроссов. Так, высокие показатели мочевой кислоты наблюдаются в крови родительских линий, тогда как в крови бройлеров ее уровень ниже на 52,8 %, у яичных кур показатель уступает мясным курам на 25,7 %.

Щелочная фосфатаза – это неспецифический фермент, катализирующий гидролиз многих фосфорных эфиров и присутствующий в плазме в форме изоферментов. Основным источником щелочной фосфатазы у молодых растущих животных – костная ткань. Установлено, что *увеличение активности щелочной фосфатазы в крови наблюдается при нарушении минерального обмена, что связано с увеличением интенсивности обмена кальция и фосфора между костной тканью и организмом.*

Так как бройлер обладает высокой скоростью роста и интенсивным обменом веществ, его организм должен полностью сформироваться за короткий промежуток времени. Это приводит к тому, что для образования прочного костяка необходимо большое количество кальция. Данные таблицы 2.11 показывают, что в крови уровень кальция у бройлера выше на 29,04 %, чем у кур-несушек и на 9,68 %, чем у родительской линии Б5.

Также относительно высокий уровень щелочной фосфатазы наблюдается у кур-несушек кросса Хайсекс белый – 1 142,6 ед/л. Известно, что получаемый с кормом кальций, восполняет только 60 % потребности несушек в этом элементе для непосредственного формирования скорлупы яйца, а недостающее количество поступает из костной ткани птицы, что приводит к увеличению уровня фермента в крови.

Активность АЛТ и АСТ значительно выше у гибрида Б59, в то время как показатели родительских линий и кур-несушек не имеют существенных отличий. Наиболее вероятно, что высокая активность трансаминаз связана с интенсивным обменом веществ и высокой скоростью роста.

Липиды в организме животных играют огромную энергетическую роль. При их окислении выделяется в два раза больше тепла, чем при окислении углеводов и белков. В организме нейтральные жиры находятся в форме запасного и протоплазматического жира, в состав которого входят фосфолипиды и липопротеиды. Холестерол – одноатомный циклический спирт, входящий в состав внешних клеточных мембран, является предшественником

стероидных гормонов (альдостерон, кортизол, кортикостерон, прогестерон, эстрадиол, тестостерон, холевые и другие желчные кислоты, витамины группы D). Триглицериды, или истинные жиры – это производные трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот.

По данным исследований, *уровень триглицеридов и холестерина в крови родительских линий и их гибрида находится примерно на одном уровне, тогда как у кур-несушек концентрация триглицеридов меньше на 22,2 %, а холестерина на 36,4 %.*

Таким образом, можно сделать вывод, что **биохимические показатели крови индивидуальны для каждого кросса, породы птицы. Сведения об изменении биохимических показателей крови позволяют проследить метаболизм в организме птицы, что особенно актуально при клинко-физиологической оценке состояния здоровья птицы и выведении новых кроссов.**

Контрольные вопросы

1. Какие факторы оказывают влияние на изменения ферментного состава крови?
2. Какое значение имеет определения минеральных веществ в сыворотке крови?
3. Изменения каких биохимических показателей крови зависит от возраста птицы?
4. Дайте определение «индекса пищеварительных ферментов крови», от каких факторов он зависит?

2.6 Влияние биологически активных добавок на биохимические показатели крови кур и цыплят-бройлеров

Анализ активности панкреатических ферментов в дуоденальном химусе и плазме крови цыплят-бройлеров показывает, что наибольшей лабильностью ферментов амилазы, липазы и трипсина обладает плазма крови при использовании в рационе различных биологически активных добавок (табл. 2.12).

Таблица 2.12 – Биохимические показатели крови кур породы Хайсекс белый при использовании в рационе биологически активных добавок (n=20, M±m)

Показатели	Группа			
	контрольная	подкислитель	протеаза	усилитель вкуса (чеснок)
Трипсин, ед/л	162±22,9	148±19,4	147±16,6	179±20,6
Общий белок, г/л	34,6±2,47	40,2±3,4	34,0±4,08	30,2±2,34
Щелочная фосфатаза, ед/л	1129±118,7	1241±144,3	589±82,2*	1014±177,4
Холестерин, ммоль/л	1,9±0,32	1,9±0,36	2,3±0,68	1,7±0,28
Триглицериды, ммоль/л	4,9±0,43	4,1±0,36	5,6±0,61	4,9±0,53
Глюкоза, ммоль/л	6,5±0,14	6,2±0,16	5,9±0,22	6,9±0,27

Примечание: * – разница с контролем достоверна, p<0,05.

Результаты исследований показывают, что достоверные изменения наблюдаются в активности щелочной фосфатазы при использовании в рационе протеазы (100 грамм на одну тонну корма). Активность фермента в данном случае уменьшается на 47,8 % по сравнению с контролем, что, по видимому, связано с изменением функции печени. Остальные биохимические показатели плазмы крови при использовании в рационе кур биологически активных добавок остаются без изменений, что согласуется с результатами исследований секреторной функции поджелудочной железы кур.

Таблица 2.12 – Биохимические показатели крови кур породы Хайсекс белый в пре-прандиальную и постпрандиальную фазы

Показатели	Группы		
	подкислитель	протеаза	усилитель вкуса
Трипсин, ед/л	$\frac{162 \pm 42,5}{345 \pm 25,4^*}$	$\frac{175 \pm 23,4}{362 \pm 56,1^*}$	$\frac{179 \pm 38,1}{310 \pm 32,3^*}$
Амилаза, ед/л	$\frac{251 \pm 31,0}{330 \pm 52,2}$	$\frac{214 \pm 43,1}{218 \pm 32,7}$	$\frac{227 \pm 42,5}{242 \pm 44,3}$
Липаза, ед/л	$\frac{80 \pm 2,6}{79 \pm 4,8}$	$\frac{66 \pm 13,6}{86 \pm 1,5}$	$\frac{70 \pm 7,6}{95 \pm 2,5^*}$
Общий белок, г/л	$\frac{44 \pm 5,9}{43 \pm 3,7}$	$\frac{39 \pm 3,8}{39 \pm 3,9}$	$\frac{30 \pm 2,8}{34 \pm 5,3}$
Щелочная фосфатаза, ед/л	$\frac{1287 \pm 183,7}{1317 \pm 152,3}$	$\frac{589 \pm 82,2}{1304 \pm 387,7}$	$\frac{1014 \pm 147,4}{1010 \pm 184,6}$
Холестерин, ммоль/л	$\frac{2,0 \pm 0,86}{3,2 \pm 1,01}$	$\frac{3,3 \pm 0,53}{2,1 \pm 0,64}$	$\frac{2,4 \pm 0,51}{1,8 \pm 0,47}$
Триглицериды, ммоль/л	$\frac{4,0 \pm 0,87}{3,8 \pm 0,06}$	$\frac{6,8 \pm 0,86}{5,3 \pm 0,48}$	$\frac{5,7 \pm 0,97}{5,1 \pm 0,67}$
Глюкоза, ммоль/л	$\frac{6,5 \pm 0,20}{7,0 \pm 0,75}$	$\frac{6,2 \pm 0,35}{7,5 \pm 0,2^*}$	$\frac{7,0 \pm 0,23}{8,4 \pm 0,42^*}$

Примечание: в числителе приведены показатели до кормления, в знаменателе – через один час после кормления; * – разница с состоянием натощак достоверна, $p < 0,05$.

Изучение биохимических показателей в динамике после приема корма показывает, что наиболее мобильными показателями являются изменение активности в плазме крови трипсина и содержание глюкозы.

Так, активность трипсина в постпрандиальную фазу пищеварения увеличивается при использовании в рационе подкислителя в 2,1 раза через один час после приема корма, в 2,1 раза – при использовании протеазы и в 1,7 раза – при добавлении в корм усилителя вкуса с чесночным ароматом. Активность липазы после приема корма увеличивается на достоверную величину при использовании усилителя вкуса на 35,7 %. Содержание глюкозы в крови кур увеличивается через один час после кормления при использовании протеазы на 21,0 %, при добавлении в корм усилителя вкуса с чесночным ароматом – на 20,0 % ($p < 0,05$).

Нашими предыдущими исследованиями показано, что подкислитель не оказывает существенного влияния на активность пищеварительных ферментов поджелудочной железы. Результаты свидетельствуют о том, что через 30 минут после приема корма, когда происходит увеличение сокоотделения, в опытный период показатель ниже более чем в 2 раза, а на 150-й минуте опыта, что соответствует нейрорхимической фазе регуляции секреции, сокоотделение поджелудочной железы снижается на 27,3 % по сравнению с контролем.

Анализ динамики активности ферментов (амилазы, липазы и протеаз) после приема корма указывает на незначительное увеличение протеолитической активности (1,2–12,4 % по сравнению с контролем) в сложнорефлекторную фазу, связанную с вкусовыми качествами корма. Следовательно, эффективность применения подкислителя в большей мере зависит от терапевтического действия на патогенную микрофлору кишечника и поддержку его здоровья.

Экспериментальные данные (Борисенко К. В., Вертипрахов В. Г., 2018) показали, что использование экзогенной протеазы на пшенично-соевых рационах кур-несушек не дает положительного ответа со стороны секреторной функции поджелудочной железы, поскольку наблюдается снижение протеолитической активности секрета в первые 60 минут после приема корма. Следовательно, механизм положительного влияния данного препарата на продуктивность и конверсию корма у птицы может быть связан с гидролизом части протеина в зобе кур, состоянием микрофлоры вследствие воздействия на неё экзогенной протеазы.

Результаты проведенных экспериментов (Фисинин В. И., Егоров И. А., Вертипрахов В. Г. и др., 2017) позволили установить реакцию кур на введение в рацион добавки, повышающей вкусовые качества, что еще раз доказывает наличие у них вкусовых рецепторов в ротовой полости. В опытный период (8 суток) у кур добавка препарата Garlic allicin усиливает амилолитическую и протеолитическую активность в одном миллилитре

секрета, но суммарная активность ферментов в объеме сока за 180 минут существенно не изменяется. Анализ механизма адаптации в постпрандиальную фазу указывает на усиление активности фермента в сложнорефлекторный период, обусловленный реакцией рецепторов на вкус пищи и условно рефлекторным фактором. Адаптация в течение восьми суток связана с резким (в 2 раза) повышением протеолитической активности на третьи сутки и последующим снижением активности протеиназ до уровня исходной активности фермента.

В экспериментах на цыплятах-бройлерах кросса «Смена 8» и молодняке кур его исходных линий изучена активность пищеварительных ферментов в дуоденальном содержимом и плазме крови на фистулированных особях при использовании в рационе биологически активных добавок нескольких типов (препарат на основе спорового пробиотика, смесь низкомолекулярных органических кислот, препарат на основе комплекса фитобиотика Интебио, кормовая добавка с ферментативной активностью, содержащая комплекс натуральных живых бактерий) (Фисинин В.И., Егоров И.А., Вертипрахов В.Г. и др., 2017).

Установлено, что по активности амилазы в дуоденальном химусе гибриды превосходят цыплят родительской породы плимутрок на 22,0 %, корниш – на 35,8 %, а по активности липазы – соответственно в 5,8 и 2,3 раза, что связано с высоким содержанием сырого жира в комбикорме бройлеров. При этом активность протеаз у гибридов оказалась ниже, чем у породы плимутрок (на 9,0 %, $p < 0,05$), но выше, чем у цыплят породы корниш (на 32,3 %, $p < 0,001$). Показатели активности амилазических ферментов в плазме крови у мясных кур имели обратную тенденцию по сравнению с пищеварительными ферментами в кишечнике. В динамике остальных ферментов плазмы крови существенных различий не наблюдалось. Использование в рационе мясных кур низкомолекулярных органических кислот и ферментного препарата оказывает стимулирующее влияние на активность пищеварительных ферментов

в дуоденальном химусе и плазме крови в соответствии с физиологическими особенностями птицы.

Таким образом, **наши экспериментальные данные позволяют заключить, что при использовании в рационе кур-несушек подкислителя, содержащего фумаровую кислоту, протеазы и усилителя вкуса с чесночным запахом (100 грамм на одну тонну корма) биохимические показатели крови не имеют существенных отклонений от контроля, за исключением активности щелочной фосфатазы, которая уменьшается при добавлении в корм протеазы на 47,8 %.**

Наблюдается увеличение активности липазы при добавке к корму подкислителя на 66,7 % и усилителя вкуса на 45,8 %. Следует отметить, что из всех исследуемых показателей наиболее лабильными в постпрандиальную фазу являются активность трипсина, в отдельных случаях, – липазы, и содержание глюкозы, которые увеличиваются соответственно по сравнению с состоянием до кормления в 1,7–2,1 раза, на 35,7 % и на 20,0–21,0 %.

Результаты исследования биохимических показателей крови при введении в рацион цыплят-бройлеров кормовой добавки Синкра™ AVI приведены в таблице 2.13 (Вертипрахов В.Г., Борисенко К.В., Овчинникова Н.В., Сирухи М.Н., 2020).

Результаты показывают, что *применение кормовой добавки способствует повышению количества общего белка в плазме крови на 7,7 %, что оказывает положительное влияние на белковый обмен и гомеостаз в организме. Снижение в крови трипсина на 18,2 % и липазы на 7,0 % указывает на более активные процессы переваривания питательных веществ в кишечнике, поскольку наличие пищеварительных ферментов в крови следует рассматривать как гуморальный путь регуляции ферментов по принципу обратной связи в поджелудочной железе.*

Таблица 2.13 – Влияние на биохимические показатели крови цыплят-бройлеров кросса «Смена-8» 30-35-суточного возраста кормовой добавки Синкра™ AVI 101

Показатель	Группа, n=12	
	контрольная	опытная
Активность трипсина, ед/л	55±2,7	45±3,3*
Активность липазы, ед/л	7,2±0,22	6,7±0,14*
Активность щелочной фосфатазы, ед/л	1490±196,3	1562±149,7
АЛТ, ед/л	10,9±0,47	10,7±0,38
АСТ, ед/л	217,9±5,93	213±5,83
Общий белок, г/л	25,8±0,53	27,8±0,76*
Холестерин, ммоль/л	1,8±0,16	1,9±0,10
Глюкоза, ммоль/л	6,7±0,42	7,2±0,23*

Примечание: * различия достоверны по отношению к контрольной группе, при $p < 0,05$.

Кроме того, доказано участие трипсина в регуляции тонуса кровеносных сосудов в составе калликреин-кининовой системы, где фермент активирует калликреин и способствует выработке брадикинина, который участвует в расширении диаметра кровеносных сосудов, регуляции артериального давления и повышении проницаемости капилляров, что не может не отразиться на доступности питательных веществ на тканевом и клеточном уровне.

Снижение активности липазы и повышение уровня глюкозы в крови на 7,5 % ($p < 0,05$) является признаком повышения обменных процессов, которые требуют затрат энергии. Следовательно, изменения в биохимических показателях крови у цыплят-бройлеров имеют физиологический смысл и способствуют повышению метаболизма на фоне применения кормовой добавки.

2.7 Влияние компонентов рациона на биохимические показатели крови кур-несушек

Биохимические показатели крови животных отражают состояние обменных процессов в организме, поэтому трудно представить, чтобы изменения в рационе липидного компонента не повлияло на показатели крови кур-несушек (табл. 2.14).

Таблица 2.14 – Биохимические показатели крови кур-несушек при использовании в их рационе разных растительных масел (n=10, M±m)

Показатель	Корм с содержанием 2,6 % масла			
	подсолнечного	соевого	рапсового	льняного
Трипсин, ед/л	89±11,3	164±20,3*	167±11,5*	84±7,0
Амилаза, ед/л	336±51,3	319±29,5	341±30,1	394±27,6
Липаза, ед/л	43±2,3	25±1,1*	22±1,4*	37±2,0
АлАТ, ед/л	18±5,3	8±0,9*	7±0,9*	5±0,9*
АсАТ, ед/л	129±6,0	153±7,2*	140±9,2	145±14,1
Коэффициент де Ритиса	7,2	19,1	20,0	29,0
Общий белок, г/л	35±1,3	40±1,9	39±1,3	34±0,73
Триглицериды, ммоль/л	2,3±0,30	5,3±0,64*	4,9±0,36*	2,8±0,17
Холестерин, ммоль/л	1,9±0,16	2,4±0,21	2,2±0,22	2,2±0,16
Щелочная фосфатаза, ед/л	2056±253,5	3040±439,5	2514±638,5	2701±178,1
Индекс щелочная фосфатаза/трипсин	23,1	18,5	15,0	32,1

Примечание: * – разница с контролем достоверна, $p < 0,05$.

Наиболее высокий показатель активности трипсина в плазме крови соответствует соевому и рапсовому маслу, что превышает контроль (под солнечное масло) соответственно на 84,3 и 87,6 % ($p < 0,05$). Активность трипсина при добавлении в корм льняного масла соответствует контролю).

Нужно отметить, что активность трипсина при использовании соевого и рапсового масла находится на верхней границе физиологической нормы для кур-несушек, что может быть связано с наличием антипитательных факторов (ингибитора трипсина) в данных маслах.

По активности амилазы существенных различий в плазме крови кур не отмечается. Активность липазы самая высокая в крови кур, получавших добавку подсолнечного масла, что согласуется с экзокринной функцией поджелудочной железы. При добавке соевого масла в рацион кур активность липазы снижается на 41,9 % ($p < 0,05$), при добавке рапсового – на 48,8 % ($p < 0,05$), льняного – на 14,0 % ($p < 0,05$). *Следовательно, активность липазы в плазме крови изменяется параллельно активности фермента в панкреатическом соке.* Результаты изменения дуоденальной липазы и активности липазы в крови получены при добавлении в рацион бройлеров препарата желчных кислот, что согласуется с нашими экспериментальными данными (Lai W., Huang W., Dong B., Cao A., Zhang W., Li J., Wu H., Zhang L., 2018).

Анализ активности аминотрансфераз показывает, что эти показатели также подвержены зависимости от липидного компонента корма. Наиболее критичное значение коэффициента Ритиса отмечается при добавке в корм льняного масла.

Уровень активности щелочной фосфатазы в крови кур не имеет существенных различий между периодами, хотя тенденция увеличения фермента наблюдается при использовании соевого масла. Повышение активности фермента щелочной фосфатазы является результатом общей реакции организма, что сопровождается нарушением процессов окислительного фосфорилирования в органах и тканях и изменением проницаемости клеточных мембран (Клетикова Л. В., 2014).

При использовании соевого и рапсового масел заметно возрастает уровень триглицеридов в крови, что указывает на высокую доступность

данных жиров для организма кур-несушек. Количество усвоенной в кишечнике жирной кислоты зависит от того, какую позицию она занимает относительно глицерина. Важно знать, что только те жирные кислоты, которые занимают позицию Р2, хорошо всасываются. Это связано с тем, что липазы имеют разную степень воздействия на жирные кислоты в зависимости от расположения последних. Так, при использовании соевого масла количество липидов в крови увеличивается на 130,0 %, рапсового – на 113,0 % по сравнению с подсолнечным.

Индекс щелочной фосфатазы к протеазам (трипсину) в данной таблице согласуется с результатами экзокринной функции поджелудочной железы (Вертипрахов В. Г., Грозина А. А., Фисинин В. И., 2020), **так как самый низкий показатель индекса отмечен при использовании рапсового масла.** Данные о взаимосвязи щелочной фосфатазы в кишечнике и крови были получены при изменении компонентов в составе рациона цыплят-бройлеров (Лазарева Н. Ю., 2019). Это свидетельствует о том, что при добавлении рапсового масла идет наиболее эффективное усвоение протеина корма при оптимальной функции пищеварительных желез (поджелудочной железы и печени). Данные подтверждают «нагруженный» метаболизм печени и поджелудочной железы при использовании льняного масла, в этом случае отмечается увеличение индекса щелочная фосфатаза/трипсин до 32,1. Следовательно, соотношение щелочной фосфатазы и протеаз имеет диагностическое значение и может служить индикатором физиологического состояния пищеварительного канала.

Из данных таблицы 2.15 видно, что **существенные изменения отмечаются в показателях, отвечающих за белковый обмен и процессы, связанные с окислением питательных веществ. Активность трипсина в опытный период снижается на 31,8 %.**

Таблица 2.15 – Биохимические показатели крови кур-несушек кросса Хайсекс белый при использовании в рационе разных по ингредиентному составу кормов

Показатели	Контроль(корм 1)	Опыт (корм 2)	В процентах контролю
Трипсин, ед/л	154±16,8	105±10,8*	-31,8
Амилаза, ед/л	166±9,3	202±27,8	+21,7
Липаза, ед/л	38±2,5	32±2,2	-15,8
Общий белок, г/л	23,5±1,4	38,6±3,4*	+64,2
Мочевая кислота, мкмоль/л	95±10,3	109±14,9	+14,7
Глюкоза, ммоль/л	2,8±0,58	4,1±0,91	+46,4
Щелочная фосфатаза, ед/л	853±85,0	503±81,1*	-41,0
Холестерин, ммоль/л	2,6±0,7	3,9±0,9	+50,0
Триглицериды, ммоль/л	5,6±1,63	8,7±2,76	+55,3

Примечание: * – разница с контролем достоверна, $p < 0,05$.

Учитывая, что контрольный рацион содержит соевый жмых, активность трипсина в крови не превышает оптимальный уровень. *Переход птиц на рацион аналогичный по уровню протеина, но отличный по ингредиентному составу (соевый жмых заменили подсолнечным жмыхом) способствует снижению активности трипсина в крови, очевидно, по причине изменения содержания ингибиторов трипсина и активности протеаз в кишечнике* (Фисинин В. И., Вертипрахов В. Г., Грозина А. А., 2018). Это обусловлено наличием хлорогеновой кислоты в подсолнечном жмыхе, ингибирующей трипсин и липазу (Андрианова Е. Н., Егоров И. А., Присяжная Л. М. и др., 2016).

Уровень общего белка в контрольной группе ниже оптимального, что обусловлено, по-видимому, дефицитом полноценных белков в рационе, наличием лимита аминокислот. Не случайно, что использование опытного комбикорма вызывает повышение в пределах погрешности мочевой кислоты и увеличение содержания общего белка в крови на 64,2 %, который достигает нормального физиологического уровня для кур-несушек.

Снижение щелочной фосфатазы на 41,0 % свидетельствует об изменении функции печени, которая вырабатывает данный фермент, гидролизующий фосфорные связи.

2.8 Влияние уровня макро- и микроэлементов на биохимические показатели крови кур-несушек

Опыты, выполненные на десяти курах кросса Хайсекс белый 6–7-месячного возраста, в рационе которых изменяли уровень кальция позволили определить взаимосвязь между содержанием кальция в корме и крови птицы.

Результаты исследования показывают, что при различном содержании кальция в рационе кур-несушек активность трипсина и содержание кальция и фосфора в крови может отличаться (табл. 2.16).

Таблица 2.16 – Активность пищеварительных ферментов в плазме крови при разном количестве кальция в рационе кур (n=30, M±m)

Показатель	Содержание кальция в рационе, %		
	3,0	3,6 (контроль)	4,2
Трипсин, ед/л	150±44,2	216±38,1	174±45,0
Содержание кальция в крови, ммоль/л	1,9±0,4	2,1±0,3	2,8±0,7
Содержание фосфора в крови, ммоль/л	0,3±0,05*	0,7±0,06	0,8±0,04

Примечание: * – отличия достоверны по сравнению с оптимальным уровнем кальция в корме (выделен жирным), при $p < 0,05$.

Содержание кальция в крови кур при увеличении его в корме не имеет существенных различий. Содержание фосфора в крови при уменьшении кальция в корме до 3,0 % снижается на 57,2 % по сравнению с контролем (3,4 % кальция). Следовательно, можно считать, что активность пищеварительных ферментов имеет связь с содержанием кальция в рационе птицы. Между количеством общего

кальция в крови и активностью трипсина существует устойчивая отрицательная корреляция, коэффициент которой равен минус 0,52.

2.9 Влияние добавки Cr₂O₃ на пищеварение и биохимию крови кур-несушек при вводе её в корм в микродозах (100 мкг/кг корма) к разным по ингредиентному составу кормам

Опыты выполняли на курах кросса Хайсекс белый 10–12-месячного возраста в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [30]. Для получения содержимого 12-перстной кишки птицу оперировали, вживляя канюлю в 12-перстную кишку напротив места впадения панкреатических и желчных протоков.

Физиологический опыт выполняли методом групп-периодов (по 5 голов в каждой), сформированных методом аналогов, в которых в основной рацион дополнительно вводили Cr₂O₃ (ООО «Платина», Москва, метод получения плазмохимический синтез, диаметр 91 нм, удельная поверхность 9 м²/г, Z-потенциал 93±0,52 мВ, содержание хрома 99,8 %).

Условия содержания и кормления кур в период эксперимента соответствовали нормам Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства (2014). Корма приготовлены на основе пшеницы и ячменя. Корм № 1 содержал соевый жмых в количестве 19,4 %, а корм № 2 – 21,4 % подсолнечного жмыха.

При этом обменная энергия в кормах была одинаковой (265 ккал на 100 грамм корма). Корм на основе подсолнечного жмыха содержал на 2,11 % больше сырой клетчатки, и на 1,07 % больше сырого жира. Схема опыта представлена в таблице 2.17.

Таблица 2.17 – Схема опыта

Особенности кормления	Период	
	контроль	опыт
Корм 1	основной рацион, в состав которого содержится ингредиент – соевый жмых	основной рацион плюс ультрадисперсный препарат Cr ($d \leq 100$ нм) в дозе 100 мкг/кг
Корм 2	основной рацион, в состав которого содержится ингредиент – подсолнечный жмых	основной рацион плюс ультрадисперсный препарат Cr ($d \leq 100$ нм) в дозе 100 мкг/кг

Данные о влиянии микродобавки хрома на активность ферментов крови и биохимические показатели на фоне разных по ингредиентному составу кормов представлены в таблице 2.18.

Таблица 2.18 – Биохимические показатели крови кур-несушек кросса Хай-секс белый при использовании в рационе разных по ингредиентному составу кормов и микродобавки хрома ($n=5$, $M \pm m$)

Показатель	Корм с добавкой соевого жмыха		Корм с добавкой подсолнечного жмыха	
	Контроль № 1 (ОР)	Опыт № 1 (ОР + Cr) (100 мкг/кг)	Контроль № 2 (ОР)	Опыт № 2 (ОР + Cr) (100 мкг/кг)
Амилаза, ед/л	288 ± 18,8	397 ± 32,7*	271 ± 25,0	407 ± 35,2*
Липаза, ед/л	58 ± 2,8	62 ± 7,5	61 ± 3,0	63 ± 0,2
Трипсин, ед/л	202 ± 43,7	154 ± 16,8	95 ± 37,9	135 ± 53,6
Глюкоза, ммоль/л	11,3 ± 0,40	8,3 ± 0,51*	12,0 ± 0,33	9,9 ± 0,42*
Щелочная фосфатаза, ед/л	1155 ± 161,3	853 ± 97,3	1293 ± 68,8	1635 ± 185,6
Общий белок, г/л	41,9 ± 1,9	33,0 ± 1,1*	42,44 ± 1,7	38,66 ± 2,3
Триглицериды, ммоль/л	1,8 ± 0,30	1,4 ± 0,21	3,6 ± 0,40	4,3 ± 0,40
Мочевая кислота, ммоль/л	245 ± 34,7	182 ± 19,1	233 ± 21,1	180 ± 16,2
АЛТ, ед/л	7,7 ± 0,91	5,4 ± 0,53*	7,9 ± 0,54	7,5 ± 0,91
АСТ, 1 ед/л	197,2 ± 8,81	118,3 ± 16,63*	211,2 ± 6,65	190,2 ± 11,21

Примечание: ОР – основной рацион; * – различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Данные свидетельствуют о том, что биохимические показатели крови у кур не имеют существенных различий при использовании в рационе разных по ингредиентному составу кормов, за исключением триглицеридов, которые в 2 раза выше в контроле № 2 по сравнению с контролем № 1. Это указывает на лучшее усвоение жира при одинаковой активности липазы в дуоденальном содержимом.

При добавлении хрома на фоне соевой белковой добавки наблюдается увеличение активности амилазы в плазме крови на 37,8 %, а остальные показатели имеют тенденцию снижения по сравнению с контролем: трипсин – на 23,8 %, глюкоза – на 26,3 %, щелочная фосфатаза – на 26,1 %, общий белок – на 21,4 %, триглицериды – на 22,2 %, мочевая кислота – на 25,7 %, АЛТ – на 29,9 %, АСТ – на 40,1 %.

При использовании микродобавки хрома на фоне рациона с подсолнечным жмыхом в биохимических показателях увеличивается лишь активность амилазы на 50,1 %, при одновременном снижении глюкозы в крови на 17,2 % ($p < 0,05$). В опытный период независимо от рациона при введении добавки оксида хрома отмечается повышение активности амилазы в крови на 37,8–50,2 %, при этом содержание глюкозы снижается соответственно на 26,6–17,5 %, что свидетельствует об улучшении усвоения глюкозы. С этим согласуется наличие между активностью амилазы в дуоденальном содержимом и содержанием глюкозы в крови корреляции, которая в опытный период имеет коэффициенты – 0,72 и минус 0,45.

При содержании птицы на пшеничном рационе с добавкой соевого жмыха введение оксида хрома способствует снижению активности липазы в содержимом кишечника, при этом биохимические показатели крови кур-несушек уменьшаются на 22–40 % в пределах физиологической нормы.

Таким образом, независимо от ингредиентов рациона наиболее объективными показателями при увеличении количества хрома в кормах являются увеличение активности трипсина и снижение содержания глюкозы в крови птицы.

Контрольные вопросы

1. Какие факторы кормления влияют на биохимический состав сыворотки крови?
2. Как влияет на минеральный состав сыворотки крови введение в рацион витаминно-минеральных подкормок?
3. Опишите влияние различных рационов кормления на биохимические показатели крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарнова, Т. О. Гипотеза раннего развития эмбрионов / Т. О. Азарнова, М. С. Найденский, А. Е. Бобылькова // Животноводство России. – 2012. – № 7. – С.13-15.
2. Активность пищеварительных ферментов в дуоденальном химусе и плазме крови у исходных линий и гибридов мясных кур при использовании биологически активных добавок в рационе / В. И. Фисинин, И. А. Егоров, В. Г. Вертипрахов [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Том 52. – № 6. – С. 1226-1233.
3. Алиев, А. А. Лимфа и лимфообращение у продуктивных животных / А. А. Алиев. – Ленинград : Наука, 1982. – 288 с.
4. Астраханцев, А. А. Переваримость питательных и использование минеральных веществ кормосмесей у кур-несушек при скармливании кормовых добавок с различными формами селена / А. А. Астраханцев // Известия Великолукской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 1. – С. 2-6.
5. Батоев, Ц. Ж. Физиология пищеварения птиц / Ц. Ж. Батоев. – Улан-Удэ : Издательство Бурятский государственного университета, 2001. – 214 с.
6. Бауман, В. К. Кальций и фосфор: обмен и регуляция у птиц / АН Латвийской ССР. Ин-т биологии. – Рига : Зинатне, 1968. – 270 с.
7. Беляков, И. М. Методические рекомендации по клиническому исследованию системы кровообращения сельскохозяйственных животных / И. М. Беляков. – Москва : ВАСХНИЛ, 1979. – 83 с.
8. Бернет Ф. Клеточная иммунология / пер. с англ. Л. Б. Меклера [и др.] ; под ред. и с предисл. проф. А. Е. Гурвича. – Москва : Мир, 1971. – 542 с.
9. Бессарабов, Б. Ф. Лабораторная диагностика клинического и иммунобиологического статуса у сельскохозяйственной птицы: учебник/ Б.Ф. Бессарабов, С.А. Алексеева, Л.В. Клетикова. – Москва: КолосС, 2008. - 150 с.

10. Биологические основы минерального питания сельскохозяйственной птицы / В. А. Медведский, М. В. Базылев, Л. П. Большакова, Х. Ф. Мунаяр // Научное обозрение. Биологические науки. – 2016. – № 2. – С. 93-108.
11. Бойко, В. И. Лабораторно-практические занятия по анатомии и физиологии сельскохозяйственных животных / В. И. Бойко. – Москва : Сельхозгиз, 1958. – 208 с.
12. Болотников, И. А. Гематология птиц / И. А. Болотников. – Ленинград : Наука. Ленинградское отделение, 1980. – 116 с.
13. Борисенко, К. В. Активность пищеварительных ферментов при добавке в корм бройлеров протеазы / К. В. Борисенко, В. Г. Вертипрахов // Птицеводство. – 2018. – № 10. – С. 20-23.
14. Боруk, В. В. Эффективность применения комплексных препаратов аминокислот («абиопептид») и микроэлементов («ферропептид») на различных стадиях онтогенеза бройлеров : дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук : 06.02.05 / Боруk Василий Васильевич ; Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина. – Москва, 2012. – 162 с.
15. Василюк, Я. В. Эффективность ферментных препаратов зарубежных фирм в кормлении бройлеров / Я. В. Василюк, О. Н. Почебут // Материалы III международной научно-практической конференции (Витебск, 4–5 ноября 1999 г.). – Витебск, 1999. – Том 35. – С. 122-124.
16. Вертипрахов, В. Г. Внешнесекреторная функция поджелудочной железы кур-несушек (*Gallus gallus* L.) при добавлении в корм различных растительных масел / В. Г. Вертипрахов, А. А. Грозина, В. И. Фисинин // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Том 55. – № 4. – С. 726-737.
17. Вертипрахов, В. Г. Особенности секреторной функции поджелудочной железы цыплят-бройлеров и возможности коррекции пищеварения животных ферментными препаратами на цеолитовой основе : дис. на соиск. учен. степ.

докт. биол. наук : 03.00.13 / Вертипрахов Владимир Георгиевич ; Новосибирский государственный аграрный университет. – Новосибирск, 2004. – 283 с.

18. Вертипрахов, В. Г. Оценка состояния поджелудочной железы методом определения активности трипсина в крови птицы / В. Г. Вертипрахов, А. А. Грозина // Ветеринария. – 2018. – № 12. – С.51-54.

19. Вертипрахов, В. Г. Экзокринная функция поджелудочной железы кур при добавлении в корм подкислителя / В. Г. Вертипрахов, А. А. Грозина // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2018. – Том 48. – № 6. – С. 63-69.

20. Вишняков, А. И. Последствия антропогенного влияния на состав крови цыплят-бройлеров / А. И. Вишняков, А. А. Торшков // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2009. – № 4(24). – С. 166-167.

21. Влияние кормовой добавки СИНКРА™ на биохимические и морфологические показатели крови цыплят-бройлеров / В. Г. Вертипрахов, К.В. Борисенко, Н. В. Овчинникова, М. Н. Сирухи // Птица и птицепродукты. – 2020. – № 3. – С. 42-45.

22. Возрастные изменения секреторной функции и микрофлоры кишечника у цыплят родительских форм и гибридов мясных кур / И. А. Егоров, В. Г. Вертипрахов, А. А. Грозина А.А. [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Том 52 (4). – С. 757-766.

23. Георгиевский, В. И. Практическое руководство по физиологии сельскохозяйственных животных : учебное пособие / В. И. Георгиевский. – Москва : Высшая школа, 1976. – 352 с.

24. Герасименко, В. В. Гематологические показатели у цыплят-бройлеров при введении в рацион лактобактерий и селена / В. В. Герасименко, Т. В. Коткова, Е. А. Назарова // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 8. – С. 88-89.

25. Горожанин, Л. С. Возрастные особенности гуморальной регуляции эритропоэза / Л. С. Горожанин // Успехи физиологических наук. – 1979. – Том 10. – № 1. – С. 124-135.

26. Гусаков, В. К. Подсчет форменных элементов крови у кур : учебно-методическое пособие / В. К. Гусаков, Е. Н. Кудрявцева, А. В. Островский. – Витебск: Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, 2002. – 15 с.

27. Дерхо, М. А. Значение гематологических показателей в оценке сохранности птиц / М. А. Дерхо, М. А. Зубкова // Эволюция современной науки: сборник статей международной научно-практической конференции (Киров, 5 апреля 2016 г.). – Уфа : ООО «АЭТЕРНА», 2016. – С. 40-42.

28. Джафаров, А. И спользование органических кислот в птицеводстве / А. Джафаров // Комбикорма. – 2010. – №5. – С. 67.

29. Динамика активности пищеварительных ферментов и содержания депонированного оксида азота в плазме крови петушков после кормления /В. И. Фисинин, В. Г. Вертипрахов, В. Ю. Титов, А. А. Грозина // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2018. – Том 104. – № 8. – С. 976-983.

30. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.) // ЭБ Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова : [сайт]. – URL: msu.ru/bioetika/doc/konv.doc. (дата обращения: 08.06.2021).

31. Жаров, А. В. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных / А. В. Жаров, А. П. Стрельников; под ред. А.В. Жарова. – Москва :КолосС, 2010. – 471 с.

32. Закржевская, К. С. Влияние возраста на липидный обмен и яйценоскость кур-несушек в условиях экосистемы птицефабрики / К. С. Закржевская, М. А. Дерхо, Т. И. Середа // АПК

России. – 2016. – Том 75. – № 1. – С. 25-29.

33. Использование смеси низкомолекулярных органических кислот в комбикормах для цыплят-бройлеров / И. А. Егоров, В. Г. Вертипрахов, Т. Н. Ленкова [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2017. – № 5. – С. 26-28.
34. Кавардаков, Ю. Я. Влияние бентонита на морфологические показатели крови кур-несушек / Ю. Я. Кавардаков, В. М. Романов // Естествознание и гуманизм : сборник научных трудов. – Том 5. Современный мир, природа и человек. – Серия 1. – Томск : ООО «Крокус», 2008. – С. 72-73.
35. Карпуть, И. М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных / И. М. Карпуть. – Минск : Ураджай, 1986. – 183 с.
36. Клетикова, Л. В. Динамика обмена кальция и фосфора у высокопродуктивных кур в зависимости от периода яйцекладки /Л. В. Клетикова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 1. – С. 57-58.
37. Клинические и биохимические показатели крови птиц : монография / В. В. Пронин, Л. В. Клетикова, Л. В. Маловичко [и др.]. – Иваново : ПресСто, 2014. – 287 с.
38. Колесень, В. П. Применение подкислителей кормов в кормлении кур-несушек и цыплят-бройлеров / В.П. Колесень // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сборник научных трудов. – Том 37. Зоотехния. – Гродно: Гродненский ГАУ, 2017. – С. 91-98.
39. Колесник, Е. А. Комплексная оценка роли гормональных и метаболических факторов в процессах роста и развития у цыплят-бройлеров / Е. А. Колесник, М. А. Дерхо // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2015. – № 4. – С. 69-78.
40. Колесник, Е. А. Об участии холестерина, прогестерона, кортизола и липопротеинов в возрастных изменениях обмена веществ у цыплят-бройлеров промышленного кросса / Е. А. Колесник, М. А. Дерхо // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – № 4. – С. 749-756. – doi: 10.15389/agrobiology.2017.4.749rus. – EDN: ZFTYCSJ.

41. Колесник, Е. А. Характеристика проблематики морфофизиологии клеток крови неонатального онтогенеза кур. Сообщение II. характеристика дифференциальных морфофизиологических маркеров форменных элементов крови птиц / Е. А. Колесник, М. А. Дерхо // АПК России. – 2019. – Т. 26. – № 4. – С. 644-652. – doi: 10.5281/zenodo.4385940 – EDN: ВМУВW1.
42. Колесник, Е. А. Адаптационный гомеостаз в раннем онтогенезе бройлерных кур и его гормональная регуляция в технологической среде жизнедеятельности : диссертация ... доктора биологических наук : 03.03.01 – Физиология / Колесник Евгений Анатольевич; [Место защиты: ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана»]. – Троицк, 2021. – 297 с.
43. Конопатов, Ю. В. Основы иммунитета и кормления сельскохозяйственной птицы: научное издание / Ю. В. Конопатов, Е. Е. Макеева. – Санкт-Петербург: Петролазер, 2000. – 113 с.
44. Коротько, Г. Ф. Формирование ферментного компонента секретов пищеварительных желез (обзор) / Г. Ф. Коротько // Физическая культура, спорт – наука и практика. – 2013. – № 1. – С. 51-57.
45. Кропачев, Д. В. Действие биологически активных препаратов фагостим и поливедрим при интоксикации птицы свинцом и кадмием : автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук : 03.00.16, 06.02.04 / Кропачев Дмитрий Валерьевич ; НГАУ. – Новосибирск, 2004. – 17 с.
46. Кузник, Б. И. Физиология и патология системы крови / Б. И. Кузник. / Чита : Читинская государственная медицинская академия, 2002. – 319 с.
47. Лазарева, Н. Ю. Жиры в кормлении бройлеров / Н. Ю. Лазарева // Птицеводство. – 2019. – № 2. – С. 37-40.
48. Методика проведения научных и производственных исследований по кормлению сельскохозяйственной птицы. Молекулярно-генетические методы определения микрофлоры кишечника / сост.: И.А. Егоров. Сергиев Посад : ВНИТИП, 2013. – 51 с.

-
49. Метревели, Т. В. Биохимия животных : учебное пособие /Т. В. Метревели; под ред. Н. С. Шевелева. – Санкт-Петербург : Лань, 2005. –295 с.
50. Михалева, М. С. Содержание эритроцитов и лейкоцитов в крови мясных кур / М. С. Михалева, В. Г. Вертипрахов // Птица и птицепродукты. –2018. – № 6. – С. 54-56.
51. Можейко, Л. А. Влияние сахарного диабета на экзокринную деятельность поджелудочной железы. Часть 2. Роль нарушений паракринной регуляции в патогенезе экзокринной панкреатической недостаточности / Л. А. Можейко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – № 3. – С. 18-23.
52. Можейко, Л. А. Морфофизиологическое обоснование непараллельной экзокринной секреции ферментов поджелудочной железы / Л. А. Можейко // Новости медико-биологических наук. – 2017. – Том 15. – №1. – С. 72-76.
53. Морфо-биохимические показатели крови у бройлеров при коррекции рациона солями и наночастицами Cu / Ш.А. Макаев, Е.А. Сизова, В.Л. Королев [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2016.–Том 51.–№ 6.–С.903-911.
54. Назарова, Е. А. Физиолого-биохимический статус и продуктивные качества цыплят-бройлеров при комплексном использовании лактоамиловорина и селенита натрия : дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук : 03.01.04 / Назарова Екатерина Алексеевна ; Оренбургский государственный аграрный университет. – Боровск, 2012. – 170 с.
55. Нужно ли учитывать содержание хлорогеновой кислоты в подсолнечнике при оценке качества продуктов его переработки? / 4Е. Н. Андрианова, И. А. Егоров, Л. М. Присяжная [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2016. – № 2. – С. 39-41.
56. Обоснование норм кальция в питании птиц // ЭБ. Агроархив. Сельскохозяйственные материалы : [сайт]. – URL: agro-archive.ru/603-obosnovanie-norm-kalciya-v-pitanii-ptic.html (дата обращения: 08.06.2021).
57. Общие и специальные методы исследования крови птиц

промышленных кроссов / Н. В. Садовников, Н. Д. Придыбайло, Н. А. Верещак, А. С. Заслонов. – Екатеринбург – Санкт-Петербург : Уральская государственная сельскохозяйственная академия, 2009. – 86 с.

58. Пищеварение и обмен веществ у мясных кур при экспериментальном микотоксикозе / В. Г. Вертипрахов, Н. Н. Гогина, А. А. Грозина [и др.] // Ветеринария. – 2017. – № 6. – С. 17-20.

59. Практикум по физиологии сельскохозяйственных животных : учебное пособие / П. Н. Котуранов, В. К. Гусаков, Ю. И. Никитин [и др.]; подред. П. Н. Котуранова. – Минск : Ураджай, 2000. – 280 с.

60. Рекомендации по кормлению сельскохозяйственной птицы / Ш. А. Имангулов, И. А. Егоров, Т. М. Околелова [и др.]. – 2-е изд., перераб. и доп. – Сергиев Посад: ВНИТИП, 2006. – 143 с.

61. Рекомендации по кормлению сельскохозяйственной птицы / В. И. Фисинин, И. А. Егоров, В. К. Менькин. – Москва : Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства Российской академии сельскохозяйственных наук; Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева, 2003. – 143 с.

62. Руководство по оптимизации рецептов комбикормов для сельскохозяйственной птицы / В. И. Фисинин, И. А. Егоров, Т. Н. Ленкова [и др.]. – Сергиев Посад : Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства Российской академии сельскохозяйственных наук, 2014 – 155 с.

63. Сандул, П. А. Эффективность применения бройлерам концентрата витаминов Е и F из рапсового масла / П. А. Сандул // Учёные записки: научно-практический журнал. – 2007. – Том 43. – Выпуск 1. – С. 210-112.

64. Селянский, В. М. Анатомия и физиология сельскохозяйственной птицы / В. М. Селянский. – Москва : Колос, 1972. – 280 с.

65. Торшков, А. А. Влияние арабиногалактана на продуктивные качества цыплят-бройлеров / А. А. Торшков // Известия Оренбургского

- государственного аграрного университета. – 2010. – № 3(27). – С. 203-205.
66. Фисинин, В. И. Внешнесекреторная функция поджелудочной железы кур (*Gallus gallus* L.) в зависимости от ингредиентов рациона / В. И. Фисинин, В. Г. Вертипрахов, А. А. Грозина // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – № 53(4). – С. 811-819.
67. Фисинин, В. И. Новые подходы к оценке функции пищеварения у кур / В. И. Фисинин, В. Г. Вертипрахов, А. А. Грозина // Российская сельскохозяйственная наука. – 2018. – №1. – С. 49-53.
68. Харлап, С. Ю. Особенности лейкограммы цыплят в ходе развития стресс-реакции при моделированном стрессе / С. Ю. Харлап, М. А. Дерхо // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – № 1(52). – С. 103-105.
69. Хорошевская, Л. В. Новые подходы к повышению мясной продуктивности птицы на основе использования нетрадиционных кормов и биологически активных веществ : дис. на соиск. учен. степ. докт. с.-х. наук : 06.02.10; 06.02.08 / Хорошевская Людмила Викторовна ; Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции. – Волгоград, 2016. – 398 с.
70. Чуличкова, С. А. Лейкоцитарные индексы как индикатор иммунного статуса организма коров на ранних сроках стельности / С. А. Чуличкова, М. А. Дерхо // Агропромышленный комплекс России. – 2016. – Том 75. – С. 42-46.
71. Шамсутдинова, И. Р. Изменения морфологических показателей крови лабораторных животных при введении наночастиц серебра per os / И. Р. Шамсутдинова, М. А. Дерхо // Агропромышленный комплекс России. – 2015. – Том 73. – С. 166-170.
72. Abundant proliferating cells within early chicken taste buds indicate a potentially «built-in» progenitor system for taste bud growth during maturation in hatchlings / Z. Wang, Y. Yoshida, N. E. Kramer [et al.] // Histol Histopathol. – 2019.

– Vol. 34. – P. 503-511.

73. An update on the sense of taste in chickens: A better developed system than previously appreciated / H.-X. Liu, P. Rajapaksha, Zh. Wang [et al.] // *Journal of Nutrition Food Science*. – 2018. – Vol. 8. – № 2. – P. 686-671.

74. Carpenter, James W. *Exotic Animal Formulary* / James W. Carpenter. – Saunders, 2004. – 564 p.

75. Cloning, sequencing, expression, and characterization of thermostability of oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans*, a novel psychrophilic protease / A. G. Mikhailova, R. F. Khairullin, L. D. Rumsh [et al.] // *Protein Expression and Purification*. – 2014. – Vol. 93. – P. 63-76.

76. Effects of dietary supplemental bile acids on performance, carcass characteristics, serum lipid metabolites and intestinal enzyme activities of broiler chickens / W. Lai, W. Huang, B. Dong [et al.] // *Poultry Science*. – 2018. – Vol. 97(1). – P. 196-202.

77. Feedback regulation of human pancreatic secretion: Effects of protease inhibition on duodenal delivery and small intestinal transit of pancreatic enzymes / P. Layer, J. B. Jansen, L. Cherian [et al.] // *Gastroenterology*. – 1990. – Vol. 98. – P. 1311-1319.

78. Kudo, K. Distribution of taste buds in layer-type chickens: scanning electron microscopic observations / K. Kudo, S. Nishimura, S. Tabata // *Journal of animal science*. – 2008. – Vol. 79. – P. 680-685.

79. Laporte, J. C. Régulation hormonale de la sécrétion enzymatique du pancréas exocrine / J. C. Laporte, J. Tremolieres // *Comptes rendus de l'Académie des Sciences. Serie D*. – 1971. – Vol. 273. – P. 1205-1207.

80. Lindenmaier, P. The taste end-organs of the chicken / P. Lindenmaier, M. R. Kare // *Poultry Science Journal*. – 1959. – Vol. 38. – P. 545-550.

81. Pancreatic hyper secretion in dogs with obstructive jaundice / F Iijima, F Yamagishi, K Iwatsuki // *Japanese Journal of Pharmacology*. – 1986. – Vol. 40. – P.533-539.

82. Kudo, K. The number of taste buds is related to bitter taste sensitivity in layer and broiler chickens / K. Kudo, J. Shiraishi, S. Nishimura [et al.] // *Journal of animal science*. – 2010. – Vol. 81. – P. 240-244.
83. Ravindran, V. Feed Enzymes: The science, practice, and metabolic realities / V. Ravindran // *Journal of Applied Poultry Research*. – 2013. – Vol. 22. – № 3. – P. 628-636.
84. Rothman, S. Conservation of digestive enzymes / S. Rothman, C. Leibow, L. Isenman // *Physiological Reviews*. – 2002. – Vol. 82. – P. 1-18.
85. Sjovall, J. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy / J. Sjovall, H. Reys // *Annals of Internal Medicine*. – 2000. – Vol. 32. – P. 94-106.
86. The Correlation between the Activities of Digestive Enzymes in the Pancreas and Blood Serum in Chicken / V. G. Vertiprakhov, A. A. Grozina, V. I. Fisinin, I.