

На правах рукописи



00348 1265

Датченко Оксана Олеговна

**Морфофункциональная характеристика органов
иммуногенеза кроликов при применении
биологически активных соединений**

16.00.02 - патология, онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

2 9 100100

Оренбург - 2009

Диссертационная работа выполнена на кафедре внутренних незаразных болезней ФГОУ ВПО «Самарская государственная сельскохозяйственная академия»

Научный руководитель - кандидат ветеринарных наук,
доцент Воробьев Анатолий Викторович

Официальные оппоненты: - заслуженный ветеринарный врач РФ, доктор ветеринарных наук, профессор
Жуков Алексей Петрович

кандидат биологических наук, доцент
Джихан Ольга Николаевна

Ведущая организация - ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Защита диссертации состоится 20 ноября 2009 года в «16» часов на заседании диссертационного совета ДМ 220.051.01 при ФГОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет» по адресу: 460795, г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке, а с авторефератом на сайте <http://www.orensau.ru> ФГОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет».

Автореферат разослан «14» октября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета, профессор



Тайгузин Р.Ш.

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. Недостаточность иммунной системы является одним из ведущих факторов в развитии основных патологических процессов у животных, усугубляя течение болезней (Шахов А.Г., 2000; Бурень В.М., Давидюк Д.С., Донченко Г.В., 2002; Гаффаров Х.З. Иванов А.В., Непоклонов Е.А., Равилов А.З., 2002; Федоров Ю.Н., 2006; Спиридонов Г.Н., 2007; Ноа N.T., Vassigalupi L., 2000).

В настоящее время широкое распространение для профилактики и лечения многих аномальных изменений в организме получили препараты на основе живых микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами (Панин А.Н., Серых Н.И., Малик Е.В., 1996; Каширская Н.Ю., 2000; Тараканов Б.В., 2000; Тараканов Б.В., Николичева Т.А., 2000; Игнатов П.Е., 2002; Зинченко Е.В., 2003; Понюхов В.А., Аликин Ю.С., Юшков Ю.Г., 2004; Яркина Я.И., 2005).

В развитии патологических процессов ведущее значение отводится системе естественной резистентности и иммунологической реактивности организма (Юсупов Р.Х., 2007). Использование средств активирующих данные показатели позволяет изменить степень проявления первичного заболевания (Реутова Е.А., 1995; Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000; Онищенко Г.Г., Алешкина В.А., Афанасьева С.С., 2002; Данилевская Н.В., Субботин В.В., 2003; Золотарева Н.А., 2003; Федоров Ю.Н., 2005; Славецкая М.Б., 2006; Воробьев А.В., Садов К.М., 2007).

Имеется выраженная связь между морфологической структурой иммунокомпетентных органов и их функциональной деятельностью. Установлено, что многочисленным функциональным звеньям и подзвеньям иммунной системы соответствуют свои структурные эквиваленты, обеспечивающие в тесной взаимосвязи с другими системами иммунный гомеостаз организма (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000; Серых М.М., 2002; Асоян Г.Л., Овчаренко Т.М., 2008; Михайлов Е.В., Сулейманов С.М., Овчаренко Т.М., 2008; Луговская С.Н., Козинец Г.И., 2009).

Характер морфологических изменений в тимусе и лимфоидных образований брюшной полости при совместном использовании пробиотических и иммуностимулирующих препаратов остается не до конца изученным.

Диссертационная работа является разделом плана научно-исследовательской работы факультета биотехнологии и ветеринарной медицины Самарской ГСХА «Создать новые, усовершенствовать существующие средства и методы борьбы с возбудителями массовых инфекционных болезней молодняка продуктивных животных».

Работа выполнялась по государственной целевой научно-технической программе, регистрационный номер 15070.7721017, шифр работ по программе 08.02.02.

1.2 Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы являлось комплексное изучение гематологических показателей и морфофункциональных изменений в тимусе и лимфоидных образованиях брюшной полости кроликов под влиянием пробиотического и иммуностропного препаратов с рабочим названием «Спороноормин жидкий» (СН) и «Споропротектин» (СП).

Для достижения указанной цели поставлены следующие задачи:

1. Определить влияние биологически активных соединений на гематологические, биохимические и иммунологические показатели крови лабораторных животных;
2. Изучить организацию гистоструктур тимуса, селезенки, мезентериальных лимфатических узлов и лимфоидных образований тонкого кишечника у интактных кроликов;
3. Оценить гистологические изменения в тимусе при сочетанном применении «Спороноормина жидкого» и «Споропротектина»;
4. Определить влияние сочетанного применения «Спороноормина жидкого» и «Споропротектина» на гистоструктуру селезенки, мезентериальных лимфатических узлов и лимфоидных образований тонкого кишечника кроликов.

1.3 Научная новизна. Впервые изучено влияние сочетанного применения экспериментальных препаратов с пробиотическими («Спороноормин жидкий») и иммуностропными («Споропротектин») свойствами на кроликах.

На основании комплексных клинических, гематологических, биохимических, иммунологических и гистологических исследований определено их влияние на морфофункциональный статус кроликов.

Впервые представлен анализ пластичности лимфоидных органов как мультикомпонентной системы под влиянием сочетанного применения экспериментальных препаратов. Доказана возможность коррекции клеточных и гуморальных факторов естественной резистентности животных. На основании сравнительных исследований получены новые данные и подтверждены некоторые закономерности изменений клеточного состава лимфоидных органов и тканей.

1.4 Практическая и теоретическая ценность работы. На основании комплексных клинических, гематологических, биохимических, иммунологических и морфологических исследований установлено, что «Спороноормин жидкий» и «Споропротектин» позволяют активизировать клеточные и гуморальные факторы иммунной системы, реализуют генетический потенциал естественной резистентности животных.

Фактический материал диссертационной работы может быть использован: при написании соответствующих разделов справочной литературы и учебных пособий по иммунологии, в учебном процессе по гистологии; при проведении научных исследований, связанных с изучением

гисто - морфологических особенностей тимуса, селезенки, мезентериальных лимфатических узлов и лимфоидного аппарата тонкого кишечника кроликов.

1.5 Апробация результатов научных исследований. Материалы диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на: Международных научно-практических конференциях (Новосибирск, 2004, Самара, 2005; Краснодар, 2009); Всероссийских научно-практических конференциях (Саратов, 2004; Москва, 2005); в сборнике научных трудов (Самара, 2004); Межрегиональной научно - практической конференции (Самара, 2005); Межвузовской научно-практической конференции (Самара, 2007).

1.6 Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в шести научных работах, опубликованных в материалах научно-практических конференций, в том числе две из них в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

1.7 Внедрение. Научные разработки вошли в документ Временные рекомендации по применению пробиотика «Спорономина жидкого» и препарата «Споропротектина» в ветеринарии в порядке производственных испытаний (утверждены Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства Самарской области 10 ноября 2005 г., Рег. № 30/258, 30/252 соответственно).

Материал работы используется в учебном процессе и научно-исследовательской работе ФГОУ ВПО «Самарская ГСХА», ГНУ Самарская научно-исследовательская ветеринарная станция РАСХН, ФГОУ ВПО «Новосибирский ГАУ», ФГОУ ВПО «Пензенская ГСХА», ФГОУ ВПО «Чувашская ГСХА», ФГОУ ВПО «Казанская академия ветеринарной медицины».

1.8 Основные научные положения, выносимые на защиту.

1. «Спорономина жидкий» и «Споропротектин» оказывают благоприятное влияние на клинико-физиологические показатели животных;

2. Воздействие «Спорономина жидкого» и «Споропротектина» на организм животных сопровождается структурными морфофункциональными изменениями в тимусе;

3. Изменение ультраструктуры лимфоидных образований брюшной полости под влиянием «Спорономина жидкого» и «Споропротектина».

1.9 Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на русском языке на 125 страницах компьютерного набора и состоит из оглавления, общей характеристики работы, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, предложений, списка использованной литературы и приложений. Список использованной литературы включает 210 источников, из них 26 зарубежных авторов. Материалы диссертации иллюстрированы 1 схемой, 13 таблицами, 24 микрофотографиями с объектов и 14 графиками.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные и клинические исследования работы проведены на базе кафедры внутренних незаразных болезней ФГОУ ВПО «Самарская государственная сельскохозяйственная академия», ГНУ «Самарская научно-исследовательская ветеринарная станция» Российской академии сельскохозяйственных наук, центральной научно-исследовательской лаборатории и на кафедре патологической анатомии Самарского государственного медицинского университета.

В качестве модельных антигенов были использованы: перорально – «Спорономин жидкий», состоящий из представителей микроорганизмов родов *Bacillus* и *Lactobacillus*. В одном мл. препарата содержится $1-2 \times 10^9$ представителей рода *Bacillus* и не менее $2-5 \times 10^9$ представителей родов *Lactobacillus*. В качестве прямого активатора лимфоидных образований брюшной полости - «Споропротектин», состоящий из полного бактериального инактивированного антигенного комплекса непатогенных бактерий рода *Bacillus*.

В качестве опытной модели использовали беспородных кроликов. В опыте использовали 20 кроликов в возрасте двух месяцев. Было сформировано по принципу пар-аналогов две группы животных, с примерно одинаковой живой массой - по 10 голов. Критерием для отбора являлась их живая масса в двух - месячном возрасте, которая в среднем составляла $1,3 \pm 0,04$ кг. Отбирались клинически здоровые животные, своевременно вакцинированные и обработанные против инвазионных заболеваний. Общее физиологическое состояние животных устанавливали по методикам, принятым в клинической практике (Воронин Е.С., 2003).

Контрольным животным вводили внутрибрюшинно физиологический раствор в дозе 1 мл на животное один раз в неделю в течение месяца. Кроликам опытной группы «Споропротектин» вводили внутрибрюшинно 1 мл. на животное один раз в неделю в течение месяца. Одновременно вводили «Спорономин жидкий» перорально утром за 30 мин до кормления три раза в день, один раз в неделю в течение одного месяца в дозе один мл. на животное.

От кроликов каждой группы отбор проб крови осуществлялся до введения препаратов, через восемь, 24 часа после инъекции и далее однократно в неделю утром за час до кормления из полости сердца, для определения гематологических, биохимических и иммунологических изменений.

По завершению опыта через 30 дней животные были выведены из эксперимента. В процессе вскрытия проводился отбор материала для дальнейших исследований, представляющих собой комплекс гистоморфометрических исследований по общепринятым методикам.

Материалом исследования служили тимус, селезенка, мезентериальные лимфатические узлы, тонкий кишечник.

Научно-исследовательская работа проводилась с использованием методов:

1. клинико-физиологических – определение температуры тела, частоты пульса и дыхательных движений – общепринятыми в физиологии.

2. гематологических – определение СОЭ по методу Панченкова, определение уровня гемоглобина - фотоэлектроколориметрически, подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов проводился с использованием гемацитометра «Пикоскель PS - 4». Выводили лейкоцитарную формулу.

3. биохимических - уровень общего белка определяли рефрактометрическим методом, и белковые фракции турбодиметрическим методом.

4. иммунологических - фагоцитарную активность нейтрофилов крови (ФАНК) определяли по методу А.И. Иванова и Б.А. Чухловича (1967). В качестве тест-культуры использовали *E. coli* О₁₅₇, выращенную в течение суток в МПА.

Бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) определяли по методу О.В. Бухарина и В.Л. Созыкина (1972), с использованием тест-культуры *V. subtilis* (штамм 83 ГКИ им. Л.А. Тарасевича).

Лизоцимную активность сыворотки крови устанавливали по О.В. Бухарину (1971) с применением суточной культуры *Micrococcus luteus* (штамм 2665 ГКИ Л.А. Тарасевича).

Изучение содержания Т- и В-лимфоцитов в периферической крови проводили методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК и ЕАС-РОК) по И.М. Карпуть, Л.М. Пивовар, И.З. Севрюк и др. (1992).

5. морфо-гистологических. Абсолютную массу селезенки определяли на электронных весах ВЛКТ-500 г.

Для гистологических исследований избранный материал фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина, заливали в парафин и готовили парафиновые срезы толщиной 5-8 мкм. Депарафинированные срезы для обзорных исследований окрашивали гематоксилином Майера и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону (Меркулов Г.А., 1969; Кононский А.И., 1976; Артишевский А.А., Леонтьев А.С., 1999).

Морфометрическое исследование проводили с помощью компьютерной системы анализа изображений «Видео-тест Морфо» с осуществлением предварительных замеров и подтверждением гипотезы о нормальном распределении признаков в изучаемых группах.

Проводили измерения диаметра лимфоидных фолликулов кортикального слоя лимфатических узлов, белой пульпы селезенки и диаметра центров размножения тех же фолликулов. Подсчитывали число лимфоидных узелков в стенке тонкого кишечника в 10 полях зрения (ок. 7,

об. 2) на площади 10 мм^2 , число иммунокомпетентных клеток в лимфоидных фолликулах лимфатических узлов, тимоцитов в мозговой зоне тимуса, спленоцитов в корковой зоне лимфоидных фолликулов и красной пульпе селезенки в 10 полях зрения (ок. 7, об. 90) на площади 1 мм^2 . Из относительных параметров для оценки соотношения площади тканей в исследуемых органах применяли вычисление объемной плотности корковой и мозговой зоны тимуса, кортикального и мозгового слоев лимфатических узлов, белой и красной пульпы селезенки.

Цифровой материал экспериментальных данных обработан методом вариационной статистики на достоверность различия сравниваемых показателей с использованием критерия Стьюдента, принятым в биологии и медицине, с применением программного комплекса Microsoft Excel 7.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клинико-физиологические изменения в организме кроликов после применения биологически активных соединений

Показатели температуры, пульса и дыхания у животных контрольной и опытной групп имели некоторые отклонения, но были в пределах физиологических норм в течение всего периода наблюдений. На конец опыта сохранность поголовья в контрольной и опытной группе составила 100%.

При анализе живой массы и среднесуточного прироста во время эксперимента отмечено, что применение «Споронормина жидкого» и «Споропротектина» позволяет интенсифицировать рост опытных животных на 19,68% в сравнении с контрольной группой.

На основании предварительно составленной схемы исследований в конце опыта проводился убой животных контрольной и опытной группы для последующего морфометрического анализа. При вскрытии подопытных кроликов была установлена хорошая упитанность, визуальный осмотр показал, что отклонения в развитии внутренних органов отсутствуют.

При контрольном убое, у опытных кроликов селезенка нормальных размеров и ее масса составляет в среднем $1,2 \pm 0,05 \text{ г.}$, в контрольной группе - $0,96 \pm 0,08 \text{ г.}$ Относительная масса органа животных в контрольной группе составила 1,89, в опытной 2,36%. Абсолютная и относительная масса селезенки у животных опытной группы превалировала над аналогичными показателями в контроле на 20,1%.

3.2 Гематологические показатели кроликов

При изучении гематологических показателей отмечено волнообразное изменение уровня эритроцитов. В начале опыта количество красных клеток крови практически не изменялось и составляло в среднем $6,7 \pm 0,1 \cdot 10^{12}/\text{л}$ в

обеих группах. Начиная с седьмого дня, у кроликов опытной группы, которым вводили экспериментальные препараты, их количество планомерно увеличивалось на достоверную величину ($p < 0,01$). Аналогичная картина наблюдалась до окончания опыта (21 день). Уровень гемоглобина в крови кроликов опытной группы был выше, чем у контрольных животных на 7, 14 и 21 – й дни опыта (при $p \leq 0,05$). Число клеток белой крови не обнаружило значимых изменений ни в опытной, ни в контрольной группе. В течение всех серий лейкоциты варьировали в пределах $(4,5 \pm 0,4 \cdot 10^9/\text{л})$.

Содержание палочкоядерных нейтрофилов в крови контрольных животных находилось на уровне общепринятой нормы с небольшими отклонениями. Число их в крови животных обеих групп в среднем составило $2,0-4,8\%$. Количество сегментоядерных нейтрофилов в крови животных контрольной группы колеблется от $26,2 \pm 2,67\%$ до $35,6 \pm 1,32\%$. Через сутки после введения препаратов в крови опытных животных появились юные нейтрофилы ($0,5 \pm 0,03\%$), через неделю и даже на 14-й день опыта их количество практически не меняется. Но в конце эксперимента их количество доходит до $1,5 \pm 0,03\%$.

В начале опыта количество лимфоцитов в лейкограмме составило в контрольной группе $65,5 \pm 7,13$, а в опытной $69,7 \pm 3,50\%$. За весь период наблюдения в контрольной группе данный показатель на менялся и держался на уровне фона. В опытной группе, через восемь часов после инъекции их количество снизилось. На седьмой день эксперимента уровень лимфоцитов у опытных животных возрастает на статистически достоверную величину и составляет $74,1 \pm 1,86\%$ ($p \leq 0,001$). Далее результат принципиально не менялся на всем протяжении наблюдений. Уровень лимфоцитов в крови опытных животных на седьмой, 14 и 21 дни опыта составил $75-77\%$ ($p \leq 0,001$), а у контрольных – $56-62\%$.

Количество моноцитов в начале эксперимента составило в контрольной группе $0,9 \pm 0,16$, в опытной $0,6 \pm 0,02\%$. За период наблюдений их количество в опытной группе колеблется от $0,2 \pm 0,14$ до $0,8 \pm 0,34\%$. Анализируя изменения данного показателя, отмечено, что через восемь часов после введения препаратов их количество в циркулирующей крови вдвое снижается, по сравнению с фоном, что можно объяснить рекрутизацией моноцитов за пределы кровеносного русла для активации клеточной линии мононуклеарной фагоцитирующей системы. Через сутки от начала эксперимента в организме их количество увеличивается до $0,7 \pm 0,03$, что свидетельствует о стимуляции миелоидного роста гемопоэза. На седьмой и 14-й день исследования в крови животных опытной группы снова происходит снижение данного показателя до $0,2 \pm 0,14$ и $0,1 \pm 0,06\%$ соответственно. Происходит повторная рекрутизация моноцитов за пределы кровеносного русла. И только на 21-й день опыта их количество приближается к фоновому показателю и составляет $0,8 \pm 0,34\%$.

Таким образом, анализ данных позволяет отметить, что показатели,

характеризующие морфологические особенности крови кроликов, на всех этапах исследования не имели заметных отклонений от физиологической нормы. Вместе с тем нами установлено, что введение животным «Спорономина жидкого» и «Споропротектина» стимулирует процесс кроветворения, что подтверждается данными, полученными в ходе проведенных исследований. Отмечено достоверное увеличение в периферической крови содержания эритроцитов, гемоглобина, моноцитов и лимфоцитов.

3.3 Биохимические показатели и неспецифическая резистентность

По результатам исследований количество общего белка на начало эксперимента в контрольной и опытной группе составляло $59,3 \pm 0,99$ и $61,0 \pm 1,42$ г/л соответственно. Однако в контрольной группе, на протяжении всего опыта его вариабельность не была достоверной. Анализ полученных результатов показал, что уровень содержания общего белка в сыворотке крови опытных животных превышает его уровень в контроле, с седьмого дня опыта и значение в среднем составило $63,9 \pm 1,42$ г/л.

При изучении белковых фракций нами прослежены следующие закономерности. В начале эксперимента показатели белковых фракций сыворотки крови животных контрольной и опытной групп находились примерно на одном уровне и их общее значение для альбуминов, альфа-, бета-, гамма - глобулинов составило соответственно $20,2 \pm 0,26$, $28,2 \pm 2,11$, $45,7 \pm 1,96$, $5,9 \pm 0,26\%$.

Через сутки в опытной группе животных увеличилось количество альфа-глобулинов ($30 \pm 2\%$), и достоверно увеличилось количество гамма – глобулинов $7,0 \pm 0,31\%$ ($p \leq 0,01$). На седьмой день опыта продолжается повышение этих фракций. С 14-го по 21-й дни опыта количество альфа-глобулинов плавно снижается до начального значения. Количество гамма – глобулинов, начиная с седьмого дня опыта, увеличивается на достоверную величину и к 21-му дню составляет $11,1 \pm 0,76\%$ ($p \leq 0,001$).

В своих исследованиях мы изучали изменение клеточных (фагоцитарная активность нейтрофилов) и гуморальных (бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови) факторов естественной резистентности контрольных и опытных животных.

Анализ фагоцитарной активности показал, что начальные показатели в обеих группах исследований были одинаковые ($42,8 \pm 1,76\%$). Но динамика в контроле была стабильной и практически не претерпевала изменений на всем протяжении исследования, а в опытной группе были отмечены отчетливые изменения. Через сутки и через неделю после введения препаратов данный показатель в опытной группе повысился до $48,1 \pm 1,55$ и $52 \pm 2,02$ соответственно ($p \leq 0,001$). Через две недели от начала эксперимента фагоцитарная активность плавно снижается до $45 \pm 2,53$, но на 21-й день

озвращается к значению $53,5 \pm 3,2$. Установлено, что у животных опытной группы повысилась клеточная защитная реакция. Фагоцитарная активность лейкоцитов у этих животных составила 48-53%, тогда как у контрольных животных этот показатель был на уровне – 33-42%.

При изучении бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК) нами отмечено некое волнообразное изменение, наиболее яркое в опытной группе животных. Отмечено, что в контрольной группе четких тенденций в динамике не прослеживалось за все время наблюдений. В опытной группе через восемь и 24 часа от начала опыта БАСК достоверно увеличивается до $6,04 \pm 1,67$ и $78,9 \pm 0,61\%$ соответственно ($p < 0,001$). На седьмой день плавно снижается до $54,8 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$) и держится на этом уровне еще неделю. К 1-му дню БАСК достигает достоверного значения $65,9 \pm 1,2\%$. У контрольных животных этот показатель был на уровне – 50-57%. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что сыворотка крови кроликов опытной группы обладает более выраженной бактерицидной активностью.

Экспериментальные препараты оказали влияние на уровень лизоцимной активности сыворотки крови (ЛАСК) кроликов. ЛАСК в начале наблюдений у контрольной и опытной группы животных была практически одинаковой и составила $5,3 \pm 0,26$ и $5,8 \pm 0,19\%$ соответственно. Динамика в контроле была стабильной и не менялась на всем протяжении эксперимента. Показатели в опыте значительно превзошли контроль, начиная со второго дня. Уровень ЛАСК через сутки и через неделю после инъекции составил $27,4 \pm 1,92$ и $45,9 \pm 5,49\%$, изменения носили достоверный характер ($p < 0,001$). Показатели достигли пика на 14-й день опыта ($49,1 \pm 2,61\%$; $p < 0,001$), затем снизились до $42,3 \pm 3,63\%$ ($p < 0,001$).

Факторы естественной резистентности реагируют на введение препаратов уже в течение ближайших часов, но по лизоцимной активности показатель продолжает увеличиваться в течение нескольких недель остальные показатели дают только одномоментный всплеск. Это можно расценить как признаки, позитивно влияющие на усиление общей сопротивляемости организма.

3.4 Иммунологические показатели крови кроликов

В ходе эксперимента было зафиксировано количественное изменение лимфоцитов у кроликов опытной группы. Если в начале опыта количество лимфоцитов в обеих группах было примерно одинаковым, то уже на седьмой день в группе, получавшей препараты, происходит увеличение данного показателя на достоверную величину ($p \leq 0,001$). Такая картина длится до завершения исследований. Уровень лимфоцитов в крови опытных животных на седьмой, 14 и 21 дни опыта составил 75-77% ($p \leq 0,001$), а у контрольных – 56-62%. Отмечено, что «Спороноормин жидкий» и «Споропротектин»

активизируют лимфоцитопоз, с последующим количественным увеличением лимфоцитов в циркулирующей крови.

На начало опыта исходные показатели количества Т-лимфоцитов в контрольной группе были ниже, чем в опытной. Их количество в контроле составило $50,2 \pm 1,21\%$, в опыте $58,5 \pm 1,66\%$. Динамика в контроле была стабильной. В опытной группе через сутки и через неделю после введения препаратов отмечена тенденция к снижению количества Т- лимфоцитов до $56,3 \pm 1,51\%$ на достоверную величину. На 14-й день происходит скачок и их количество увеличивается до $65,4 \pm 1,64\%$, а на 21-й день происходит плавное снижение ($p < 0,001$).

Еще большая разница была отмечена при сравнении результатов по содержанию В-лимфоцитов. Если в контрольной группе их количественное содержание составило $26,5 \pm 0,91 - 32,1 \pm 1,53\%$ и не претерпело изменений, то в опытной группе наблюдалось следующее. Содержание В-лимфоцитов в крови опытных животных при введении препаратов увеличивается уже через сутки с начального значения $26,5 \pm 0,71$ до $29 \pm 2,14$. На седьмой, 14 и 21-й дни опыта количество В-лимфоцитов составляло $29,9 \pm 0,96$; $34,1 \pm 1,53$; $36,8 \pm 1,42\%$, изменения достоверны ($p < 0,05$).

Анализ динамики содержания Т- и В-лимфоцитов у кроликов на фоне применения «Спорономина жидкого» и «Споропротектина» свидетельствует об их выраженном стимулирующем эффекте на лимфоидное звено.

3.5 Морфологические изменения в тимусе и периферических органах иммунной системы

Гистологический рисунок тимуса кроликов контрольной группы был недостаточно четким за счет слабо выраженного деления на корковую и мозговую зоны, только малая заселенность мозговой зоны тимоцитами позволяла определять границы зон. Тельца вилочковой железы (тельца Гассалья) либо не определялись, либо были единичными (рис. 1).

В препаратах животных опытной группы отмечено сохранение дольчатого рисунка, а также расширение корковой и мозговой зон с хорошо выраженной границей. Наиболее существенно увеличилась мозговая зона с широкими светлыми полями размножения и более густым заселением тимоцитами. Постоянно встречались хорошо развитые, четко очерченные тельца вилочковой железы (тельца Гассалья) разных размеров (рис. 2). Клетки мозговой зоны тимуса находятся на разной стадии созревания, что свидетельствует об активизации процессов, происходящих в иммунной системе.

Количество тимоцитов на 1 мм^2 мозговой зоны тимуса у контрольных и опытных животных составило $20 \pm 1,4 \cdot 10^3$ и $28 \pm 2,4 \cdot 10^3$ соответственно.

Структурные элементы селезенки контрольной и опытной групп были хорошо выражены. При гистологическом изучении препаратов селезенки контрольной группы животных отмечено, что капсула утолщена, в белой пульпе лимфоидные фолликулы располагались равномерно и правильно, были монотонными по размерам. Преобладали фолликулы с небольшими центрами размножения или с отсутствием светлых центров. По клеточному составу корковой зоны лимфатического фолликула преимущественным компонентом были зрелые лимфоциты. В синусах кроме лимфоцитов в небольшом количестве встречались макрофагальные клетки. В пульпе преобладали клетки гистоцитарного и фибробластического ряда, за счет гиперпластических процессов.

В гистологических препаратах селезенки опытной группы кроликов капсула хорошо выражена, не утолщена. Паренхима умеренно кровенаполнена. В стенке кровеносных сосудов пульпарного и трабекулярного типов видны умеренные процессы пролиферации эндотелия.

Со стороны белой пульпы отмечено усиление разброса фолликулов по величине, наряду с лимфоидными фолликулами среднего диаметра встречались более крупные с большими светлыми центрами, а также небольшие фолликулы со вторичными центрами размножения в них.

Если величина диаметра фолликула изменилась умеренно по отношению к контрольной группе, что связано с выраженным различием лимфоидных фолликулов по размерам, то появление и увеличение диаметра центров размножения в опытной группе наблюдений очевидно как визуально, так и по результатам вариационной статистики с высокой степенью достоверности ($p < 0,05$).

Указанная реакция, преимущественно со стороны белой пульпы, привела к изменению соотношения белой и красной пульпы, относительная плотность белой пульпы в опытной группе наблюдений на 37,1% превысила значение в контрольной группе (результаты достоверны с заданным уровнем вероятности 95%). При анализе площади фолликула и центра размножения фолликула селезенки было установлено, что данные показатели в опытной группе наблюдений превалировали над аналогичными к контроле на 27,89% и 97,83% соответственно.

Повышение морфофункциональной активности селезенки сопровождалось увеличением количества спленоцитов в фолликулах и красной пульпе. При этом количество иммунокомпетентных клеток в корковой зоне лимфоидных фолликулов и в красной пульпе селезенки опытной группы превысило аналогичные показатели в контрольной группе на 20,6% и 27% соответственно.

Число спленоцитов на 1 мм^2 красной пульпы в контрольной группе составило $12 \pm 1,4 \cdot 10^3$, в опытной $16 \pm 1,8 \cdot 10^3$.

В мезентериальных лимфатических узлах кроликов контрольной группы гистологическая структура была сохранена с четким выделением

кортикальной и мозговой зон. Лимфоидные фолликулы кортикальной зоны имели небольшие и в некоторых случаях нечетко определяемые центры размножения, значительного разброса по величине фолликулов не отмечалось. Клеточный состав фолликулов был преимущественно представлен лимфоцитами на разных стадиях созревания. Толщина коркового вещества мезентериальных лимфатических узлов у контрольных животных неравномерна по протяжению, лимфоидные узелки встречаются редко, имеют небольшие размеры, а плотность популяции в их герминативных центрах меньше, чем в опыте. Значимо меньше количество средних и малых лимфоцитов, ретикулярных клеток. В мозговых тяжах снижено количество средних лимфоцитов и возросло число малых.

В гистологических препаратах мезентериальных лимфатических узлов опытной группы при сохранении гистоархитектоники органа отмечено расширение кортикальной зоны за счет увеличения размеров фолликулов, что объективизировано данными морфометрических исследований.

Объемная плотность кортикальной зоны лимфатических узлов в опытной группе наблюдений на 35,6% превысила значение в контроле, средний диаметр фолликула – на 54,2%. В фолликулах были расширены центры размножения, среднее значение диаметра превышает контрольные значения более чем в 2 раза. Площадь фолликула и центра размножения фолликула лимфатического узла в опытной группе превосходила аналогичные показатели в контроле на 57,94% и 75,57% соответственно.

В мезентериальных лимфатических узлах опытных животных корковое вещество занимает больше половины площади среза узла, в нем чаще встречаются лимфоидные узелки, среди них преобладают узелки с герминативными центрами. Размер лимфоидных узелков и их герминативных центров, больше чем у контрольной группы в два раза. Иногда узелки располагаются в два ряда. В герминативных центрах значимо выше содержание бластов и больших лимфоцитов

Выявляется большое количество макрофагов, преимущественно расположенных по ходу кровеносных сосудов. Характеристика клеточных популяций свидетельствует об увеличении количества ретикулярных и плазматических клеток, малых и средних лимфоцитов. В мозговых тяжах содержание плазматических клеток выше, чем у контрольных животных. Число иммунокомпетентных клеток на 1 мм^2 фолликулов в контрольной группе наблюдений составило $25 \pm 1,3 \cdot 10^3$, в опытной - $29 \pm 1,5 \cdot 10^3$.

Таким образом, морфологическое исследование тимуса и периферических органов иммунной системы кроликов показало, что применение «Спорономина жидкого» и «Споропротектина» не вызывает патологических изменений в органах иммунной системы.

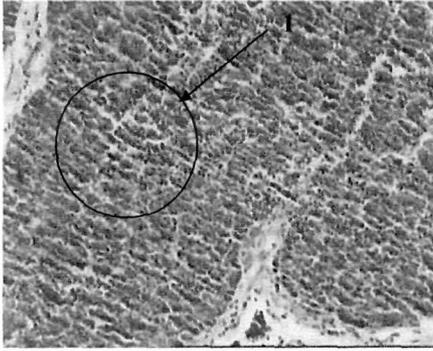


Рис. 1. - Тимус в контрольной группе.
Мозговая зона
1 - тельца вилочковой железы
отсутствуют.
Окраска гематоксилином и эозином.
Ув. об. 40, ок. 7

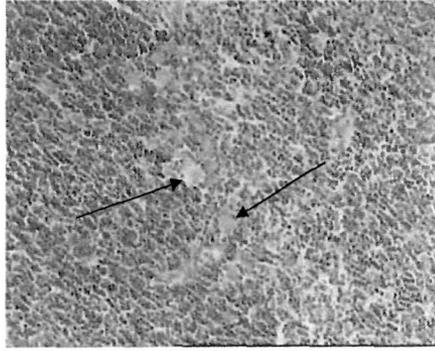


Рис. 2. - Тимус в опытной группе.
Мозговая зона
Тельца вилочковой железы.
Окраска – гематоксилином и эозином.
Ув. об. 40, ок. 7

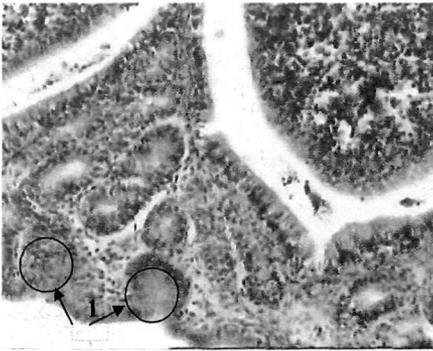


Рис. 3. - Слизистая оболочка тонкой кишки в контрольной группе.
1 - цилиндрический выстилающий эпителий ворсин, умеренно выраженное количество лимфоидных клеток в строме без четко выраженных лимфатических узелков. Окраска гематоксилином и эозином.
Ув. об. 40, ок. 7

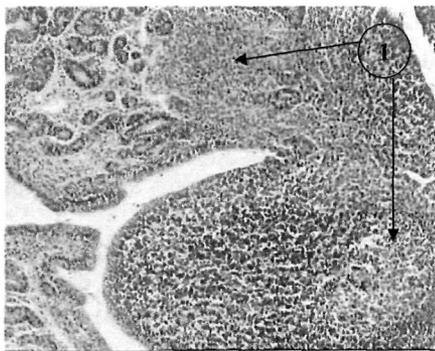


Рис. 4. - Слизистая оболочка тонкой кишки в опытной группе.
1 - лимфоидная ткань стенки тонкой кишки представлена четко сформированными фолликулами с образованием центров размножения. Окраска гематоксилином и эозином.
Ув. об. 2, ок. 7

Данные препараты улучшают процесс формирования элементов иммунокомпетентных клеток. Это в свою очередь приводит к более активному формированию клеточного и гуморального иммунитета.

3.6 Морфологические изменения кишечника после применения биологически активных соединений

При гистологическом исследовании контрольной группы животных было выявлено, что слизистая оболочка тонкого кишечника была выстлана цилиндрическим однослойным эпителием с наличием единичных бокаловидных клеток. Ворсинки высокие, четкие, полностью покрыты эпителием, в строме и межкрипталльной зоне клеточность выражена незначительно, в клеточном составе встречались иммунокомпетентные клетки. Число лимфоидных узелков в стенке тонкой кишки на 10 мм² площади составило 8,2±1,5 (рис. 3).

Со стороны тонкого кишечника в опытной группе обращали на себя внимание признаки повышения функциональной активности с нарастанием различия в высоте ворсин и глубине крипт, пролиферацией выстилающего цилиндрического эпителия, нарастанием количества бокаловидных клеток. Число иммунокомпетентных клеток, как в строме ворсин, так и в межкрипталльной зоне слизистой оболочки нарастало.

Отмечались более крупные и отчетливо сгруппированные лимфатические узелки в стенке тонкой кишки, число лимфоидных узелков на 10 мм² площади составило 14,5, разница в показателе с контрольной группой наблюдений составила 76,8% (p<0,05) (рис. 4). Имеет место гиперплазия лимфоцитарной ткани с образованием лимфатических фолликулов с макрофагальной реакцией в активных центрах.

Применение экспериментальных препаратов стимулировало местный иммунитет, что отразилось на лимфоидных образованиях тонкого кишечника лабораторных животных.

Таким образом, состояние органов центральной (тимус) и периферической иммунной системы (селезенки, лимфатических узлов), местной иммунной системы кишечника в опытной группе наблюдений свидетельствует о повышении иммунологической активности.

4 ВЫВОДЫ

1. После применения экспериментальных препаратов (Спороноормин жидкий, Споропротектин) отмечены изменения гематологических показателей и морфогистологической структуры в тимусе и лимфоидных образованиях брюшной полости кроликов, характеризующиеся признаками гиперплазии ретикулярных элементов.

2. Гематологические показатели у животных опытной группы исследований характеризовались увеличением количества эритроцитов на

14,3 %, гемоглобина на 15,7 %, умеренным лимфоцитозом и моноцитозом, повышением количества белков гамма-глобулиновой фракции на 30,6 %.

3. Фагоцитарная активность лейкоцитов у опытных животных превышала контроль и составила 48-53%, бактерицидная активность сыворотки крови кроликов находилась на уровне 54-78%, активность мурамидазы повысилась до 27,4-49,1%. Количество В- и Т- лимфоцитов в опытной группе превалировало над контрольной на 12,7 и 12,4 % соответственно.

4. Тимус у интактных животных характеризовался слабо выраженным делением на корковую и мозговую зону, малой заселенностью мозговой зоны тимоцитами, единичными тельцами вилочковой железы. В селезенке преобладали фолликулы с небольшими центрами размножения. Лимфоидные фолликулы кортикальной зоны мезентериальных лимфатических узлов характеризовались наличием герминативных центров с малой плотностью популяции лимфоцитов. В строме и межкрипталльной зоне тонкого отдела кишечника наблюдалось незначительное количество иммунокомпетентных клеток.

5. В тимусе опытных животных отмечено повышение объемной плотности мозговой зоны, что сопровождалось увеличением количества телец вилочковой железы и тимоцитов на 29%.

6. В селезенке увеличилось количество спленоцитов в фолликулах и красной пульпе. Число иммунокомпетентных клеток в корковой зоне лимфоидных фолликулов и в красной пульпе превысило показатели контрольной группы на 20,6% и 27% соответственно. В мезентериальных лимфатических узлах отмечено повышение объемной плотности кортикальной зоны на 35,6%, увеличение среднего диаметра фолликулов и центров размножения, с преобладанием ретикулярных и плазматических клеток, малых и средних лимфоцитов.

7. В тонком кишечнике отмечается увеличение числа лимфоидных узелков, с макрофагальной реакцией в активных центрах лимфатических фолликулов на фоне большого количества бокаловидных клеток.

5 ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Материалы диссертационной работы могут быть использованы в учебном процессе на ветеринарных, биологических факультетах высших и средних учебных заведений, и в НИИ, а также при написании соответствующих разделов учебных пособий.

2. Данные препараты могут быть использованы для стимуляции естественной резистентности и иммунологической реактивности животных, а также для активации тимуса и лимфоидных образований.

3. Препараты «Спороноормин жидкий» и «Споропротектин» могут быть рекомендованы для апробации на продуктивных животных для стимуляции естественной резистентности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Воробьев, А.В. Динамика белковых фракций сыворотки крови под влиянием бактериального иммуностимулятора / А.В. Воробьев, А.В.Савинков, О.О. Датченко, Ю.А. Курлыкова, В.А. Тиняков // Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и образования: Сб. науч. тр. II Международной науч.-практич. конф. - Самара, 2005. - С. 33-35.

2. Датченко, О.О. Морфо-функциональные изменения некоторых лимфоидных органов под влиянием пробиотического и иммуностимулирующего препаратов / О.О. Датченко, А.В. Воробьев, В.А. Тиняков // Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и образования: Сб. науч. тр. II Международной науч.-практич. конф. - Самара, 2005.- С. 35-37.

3. Савинков, А.В. Влияние бактериального липополисахаридного иммуностимулятора на иммунологический статус здоровых кроликов / А.В. Савинков, А.В. Воробьев, Ю.А. Курлыкова, О.О. Датченко, М.В. Савинкова // Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и образования: Сб. науч. тр. II Международной науч.-практич. конф. - Самара, 2005.- С. 37-39.

4. Датченко, О.О. Влияние липополисахаридного иммуностимулятора на некоторые органы иммуногенеза / О.О. Датченко, А.В. Воробьев // Известия федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарская государственная сельскохозяйственная академия» - Самара, 2007. - выпуск №1. - С. 47-49.

5. Датченко, О.О. Влияние иммуностимулирующего и пробиотического препаратов на морфологические показатели органов периферической иммунной системы лабораторных животных / О.О. Датченко, А.В. Воробьев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - Оренбург, 2009. –№ 1 (21) – С. 223-225.

6. Воробьев, А.В. Морфофункциональные изменения лимфатических узлов и стенки кишечника под влиянием биологически активных соединений / А.В. Воробьев, О.О. Датченко // Труды Кубанского государственного аграрного университета. Научный журнал Серия «Ветеринарные науки» - Краснодар, 2009. - №1 (ч. 2.). - С. 21-22.

Особая благодарность за помощь в проведении исследований заведующей Центральной научно-исследовательской лаборатории, доктору медицинских наук, профессору Воловой Л.Т., зав. кафедрой патологической анатомии, доктору медицинских наук, профессору Федориной Т.А. Самарского ГМУ.

ЛР № 020444 от 10.03.98 г.
Подписано в печать 14.10.2009.
Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная
Усл. печ. л. 1.
Заказ 1805 тираж 100

Редакционно-издательский центр Самарской ГСХА
446442, Самарская обл., пос. Усть-Кинельский, ул. Учебная 2
Тел.: (84663) 46-2-44, 46-2-47
Факс 46-2-44
E-mail: ssaariz@mail.ru