

На правах рукописи



Мерзлякова Елена Анатольевна

**ДЕЙСТВИЕ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА ДАФС-25
НА ГИСТОЛОГИЧЕСКУЮ И ГИСТОХИМИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ
НЕКОТОРЫХ ТКАНЕЙ И ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ БЫЧКОВ И
НОРОК**

16.00.02 – патология, онкология, морфология животных

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

2009

Санкт-Петербург 2009

Диссертационная работа выполнена в ФГОУ ВПО «Ижевская Государственная Сельскохозяйственная Академия».

Научный руководитель: кандидат ветеринарных наук, доцент Трошина
Татьяна Алексеевна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, доцент Лаковников
Евгений Альфредович
доктор ветеринарных наук, профессор Усенко
Владимир Иванович

Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Уральская Государственная Академия
Ветеринарной Медицины»

Защита состоится «13» ноября 2009 года «13» часов на заседании диссертационного совета Д 120.059.01 ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургской Государственной Академии Ветеринарной Медицины» по адресу 196084, Санкт-Петербург, Черниговская, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО Санкт-Петербургской Государственной Академии Ветеринарной Медицины

Автореферат разослан «12» октября 2009 года и размещен на сайте
www.spbgavm.ru

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор ветеринарных наук,



О.В. Крячко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Удмуртская Республика находится в зоне с преобладанием дерново-подзолистых почв, в которых содержание микроэлементов, таких как селен, йод, магний, фтор, медь очень низкое. Критическим значением содержания селена в почве считают 0,5 мг/кг, в то время как в УР, как и во многих других регионах РФ, его содержание значительно ниже указанной цифры. Содержание селена в растительных кормах нашей зоны ниже 0,06-0,1 мг/кг сухого вещества, что считается абсолютно недостаточным (Старков М.В., 2008).

В условиях современного ведения скотоводства и звероводства животные подвергаются стрессовому воздействию в периоды проведения массовых зоотехнических и ветеринарных мероприятий, при перегруппировках и транспортировках (Ляпин О.А., 1998; Сутыгина А.В., 2009). К серьёзным стрессовым факторам относится кормовой стресс, особенно сильное влияние он оказывает на норок. При несбалансированном рационе у этого вида животных развиваются жировой гепатоз или токсическая дистрофия печени. Зачастую, падеж зверей от этих заболеваний может достигать, в различных возрастных группах, до 35% (Болкисев Г.Б., 2008). Своё негативное влияние оказывают и микотоксины грибов, поражающие корма (Гуськова А.М. и др. 1999; Enjalbert F. et al. 2006). Это ведет к нарушению гомеостаз и влечет за собой сдвиг в балансе между образованием свободных радикалов и активностью антиоксидантных систем. В результате в организме животных возникает окислительный стресс (Кармолиев Р.Х., 1999; Алексеев В.В., 2008). Селен, входя в систему антиоксидантной защиты организма, способен предотвращать его возникновение (Talas ZS. et al., 2009). Значит, своевременное введение этого микроэлемента может способствовать профилактике заболеваний и потере продуктивности. Исследования, проведенные на протяжении последних лет, показали исключительное значение селена в животноводстве (Иванова Л.В., 2008; Колосова О.В., 2008; Бушуева И.С., 2009).

Однако остаются не исследованными влияния препаратов селена, применяемых при выращивании сельскохозяйственных животных, на структуру внутренних органов.

На данный момент многие хозяйства стремятся добавлять к основному рациону минеральные добавки, в состав которых входит селен. Однако они не всегда соответствуют потребностям животных. Следует учитывать, что в состав премиксов могут включаться микроэлементы, обладающие антагонистическим действием. Известно, что наибольший положительный эффект дают селеносодержащие препараты на органической основе (Джакупов И.Т., 2009). Одним из них является синтетический препарат ДАФС-25 (диацетофенилселенид). В тоже время подробного комплексного морфологического анализа влияния селенорганических препаратов на организм животных в доступной литературе не приведено. Данные по изменению гистологических и особенно гистохимических свойств

внутренних органов носят отрывочный характер (Клейменов Р.В., 2004; Кулешов К.А., Трифонов Г.А., 2008).

Цель и задачи исследования. Выявление эффектов, оказываемых селеносодержащим препаратом ДАФС-25 на гистологическую и гистохимическую структуру печени, почек, селезенки, лимфатических узлов и поперечнополосатых мышечных тканей бычков и норок, и сравнение его действия с селенитом натрия.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Изучить действие ДАФС-25 на гистологическую организацию печени, состояние внутриклеточных ферментов в гепатоцитах, сопоставить их с изменениями показателей периферической крови бычков и норок в сравнении с действием селенита натрия.

2. Выяснить возможные эффекты изучаемых соединений селена на структурно-функциональные показатели почечной паренхимы откормочных бычков и норок.

3. Определить структурно-функциональные изменения в поперечнополосатой скелетной и сердечной мышечных тканях бычков и норок при применении органической и неорганической формы селена.

4. Выяснить состояние иммунокомпетентных органов (лимфатических узлов, селезенки) при применении ДАФС-25 и селенита натрия у бычков и норок.

Научная новизна исследования. Впервые изучено действие селеноорганического препарата ДАФС-25 на гистологическую и гистохимическую структуру внутренних органов крупного рогатого скота и норок в различных дозировках, выявлено его влияние на накопление и распределение липидов в печени, почках, скелетной и сердечной мышечных тканях. Дано обоснование к применению ДАФС-25 в условиях животноводческих комплексов по откорму крупного рогатого скота и звероферм в Удмуртской Республике.

Практическая значимость работы. Выполненные исследования и полученные результаты позволили рекомендовать препарат ДАФС-25 для активизации биохимических процессов в организме животных, повышения иммунной защиты, профилактики и лечения жирового гепатоза норок. В инъекционной форме в дозах 0,2 и 0,1 мг/кг живой массы бычкам; норкам в дозе 0,1 и 0,05 мг/кг живой массы, а так же норкам внутрь с кормом из расчета 2 г/т кормосмеси. Исследования являются фундаментальными для понимания особенностей клеточных реакций внутренних органов на введение селеносодержащих препаратов на органической основе.

Внедрение результатов исследования в практику: На основе исследований были разработаны «Методические рекомендации по использованию селеноорганического препарата ДАФС-52 для профилактики гипоселенозов, повышения эффективности адаптивных качеств и продуктивности с/х животных», утвержденные начальником ГУВ УР Бурдовым Г.Н. от 20 сентября 2007г.; Оформлен патент «Способы

профилактики жировой дистрофии пушных зверей», зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ - № 2008 128 815/13 (035551).

Основные положения, выносимые на защиту:

-Гистологическое и гистохимическое состояние печени и почек бычков и норок при введении ДАФС-25.

-Структурные и биохимические показатели мышечной ткани бычков и норок на фоне применения ДАФС-25.

-Состояние иммунокомпетентных систем организма под влиянием ДАФС-25.

-Динамика биохимических показателей крови бычков и норок при введении ДАФС-25.

Апробация работы. Основные результаты исследований, положения и выводы диссертации доложены и одобрены при обсуждении отчетов НИР (2005-2008), на ежегодных научно-практических конференциях ФГОУ ВПО «Ижевская ГСХА»: Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы аграрной науки и пути их решения» (Ижевск, 2005); Всероссийской научно-практической конференции «Научное обеспечение реализации национальных проектов в сельском хозяйстве» (Ижевск, 2006); IV Всероссийской научно-практической конференции «Здоровье и здоровый образ жизни: состояние и перспективы» (Смоленск, 2006); VIII Конгресс международной ассоциации морфологов (Орел, 2006); Всероссийской научно-практической конференции «Инновационное развитие АПК. Итоги и перспективы» (Ижевск, 2007); Всероссийской научно-практической конференции «Научный потенциал аграрному производству (Ижевск, 2008).; Всероссийской научно-практической конференции «Научный потенциал – современному АПК» (Ижевск 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в которых отражены основные результаты научных исследований.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, списка литературы и приложения. Работа изложена на 170 страницах машинописного текста, содержит 28 таблиц, 70 рисунков и 3 приложения. Список литературы включает 244 источника, в том числе 149 отечественных и 95 зарубежных.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были проведены на базе кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы и радиобиологии и кафедры физиологии и зооигиены ФГОУ ВПО Ижевской ГСХА в рамках программы научных исследований факультета ветеринарной медицины.

Опыт на откормочном поголовье крупного рогатого скота поставлен в ООО «Родина» Можгинского района УР. Были сформированы четыре группы бычков по принципу аналогов в возрасте 10 месяцев по 5 голов в

каждой (табл. 1). Все животные содержались на основном хозяйственном рационе. Продолжительность опыта составила 90 суток.

Таблица 1. Распределение бычков по группам и условия проведения опыта

Количество голов	Контрольная группа	1-ая опытная группа	2-ая опытная группа	3-ья опытная группа
20 голов (по 5 в группе)	1. Стерильное масло п/к, через 30 дней	1. Премикс 2. Стерильное масло п/к, через 30 дней	1. Масляный раствор ДАФС-25 п/к 0,2 мг/кг, через 30 дней	1. Масляный раствор ДАФС-25 п/к 0,1 мг/кг, через 30 дней

В течение опыта проводились морфологические и биохимические исследования крови на 1, 14, 30, 45, 60, 75 и 90-е сутки. В конце опыта был проведен убой бычков в условиях убойного пункта и взят биологический материал печени, почек, селезёнки, лимфатических узлов, скелетной и сердечной мускулатуры для проведения гистологических и гистохимических исследований и определения уровня селена в тканях.

Для проведения опыта на норках в ООО «Зверохозяйство Можгинское» были сформированы по принципу аналогов четыре группы. В которые входили норки стандартного окраса в возрасте 6 месяцев по 15 голов в каждой (табл. 2). Опыт проводился с июля по ноябрь.

Таблица 2. Распределение норок по группам и условия проведения опыта

Количество голов	Контрольная группа	1-ая опытная группа	2-ая опытная группа	3-ья опытная группа
60 голов (по 15 в группе)	1. Хозяйственный рацион с селенитом натрия. 2. Стерильное масло п/к через 30 дней	1. ДАФС-25 2 г/т корма раз в неделю. 2. Стерильное масло п/к через 30 дней	1. Масляный раствор ДАФС-25 п/к 0,1 мг/кг через 30 дней	1. Масляный раствор ДАФС-25 п/к 0,05 мг/кг через 30 дней

Перед убоем у животных была взята кровь для исследования морфологических и биохимических показателей. После убоя был отобран биологический материал печени, почек, селезёнки, лимфатических узлов, скелетной и сердечной мускулатуры для проведения гистологических и гистохимических исследований.

Для исследования кровь у бычков брали из яремной вены, у норок из пальца. При проведении гематологического анализа использовались следующие методики: подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов в камере Горяева, дифференциальный подсчет лейкоцитов (определение лейкограммы) по общепринятой методике, определение гемоглобина крови гемиглобинцианидным методом с использованием прибора КФК-3, скорость оседания эритроцитов – микрометодом Панченкова, цветной показатель – расчетным методом. Исследовали следующие биохимические показатели крови: общий белок – рефрактометрическим методом; белковые фракции – методом электрофореза на бумаге с использованием денситометра Nospitex

diagnostics; щелочную фосфатазу (ЩФ), аланинаминотрансферазу (АЛТ) и аспаратаминотрансферазу (АСТ) – кинетическим методом на биохимическом полуавтоматическом анализаторе Биофот-311; мочевины – методом по конечной точке на анализаторе Биофот-311. Определение общего билирубина проводили по диазореакции, общего холестерина в модификации Илькина на спектрофотометре.

Количественное содержание селена в исследуемых образцах тканей проводили на кафедре физиологии, экологии животных и фармакологии Саратовского Государственного Аграрного Университета им. Н.И. Вавилова, в лаборатории «Биогеохимического анализа» методом флуорометрического определения элемента.

Фиксация материала для общего гистологического и гистохимического анализа на липиды проводилась в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Для гистохимического анализа на выявление активности неспецифических кислых фосфатаз (КФ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и аденозинтрифосфатаз (АТФ-аз) был взят материал печени, почек, сердечной и скелетной мускулатуры с последующей фиксацией в жидком азоте.

Заливку материала в парафин проводили по методике Волкова-Елецкой. Срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме с последующей окраской гематоксилином и эозином согласно общепринятой методике. Наличие липидов выявляли в реакции с суданом III. Определение АТФ-азной активности проводили с солями свинца по Гомори в модификации Бухвалова; неспецифические кислые фосфатазы выявляли по методу Гомори; активности СДГ по методу Нахласа (Саркисов Д.С., 1996.)

Полученные срезы изучали в пяти случайных полях зрения. С каждого поля зрения делали микрофотосъемку на цифровую фотокамеру Canon с постоянным источником равномерного освещения, на одном оптическом увеличении камеры, с использованием одного микроскопа «Микмед – 1» с набором окуляров.

Морфометрические измерения проводились с помощью универсальной программы для морфометрических измерений Scio Image с учетом рекомендаций Автандилова Г.Г. (1990). Распределение ферментов и липидов определяли по всей площади снимка.

Статистическую математическую обработку морфометрических данных проводили по общепринятым методам.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В печени бычков первой опытной группы (в рацион вводили премикс) было выявлено достоверное уменьшение апоптотической активности в 1,9 раза (табл. 3). При этом возрастало количество двуядерных форм гепатоцитов в 4,2 раза, наблюдалось смещение ядерно-плазматического соотношения в сторону ядра. Это сочеталось с уменьшением оптической плотности липидов на 17,73%. Однако, в печени сохранялась инфильтрация лейкоцитарными клетками междольковой соединительной ткани, сосудов, триад, что указывает на повреждение паренхиматозных элементов.

Активность СДГ в паренхиме печени животных первой опытной группы была выше контрольной на 24,63%. Параллельно в цитоплазме гепатоцитов изменялась АТФ-азная активность. Увеличение активности этих внутриклеточных ферментов свидетельствует об усилении синтетической функции печени. Локализация КФ определялась в отдельных зонах синусоидных капилляров, соответствующих местам нахождения тканевых макрофагов, что указывает на отсутствие активации лизосомальных ферментов в гепатоцитах.

Таблица 3. Морфометрические показатели печени бычков ($M \pm m$)

Группы	Ядерно-плазматическое соотношение	Двухядерные гепатоциты, %	Ядра с 2-мя и более ядрышками, %	Гепатоциты с признаками апоптоза, %
Контрольная	0,18±0,05	0,72±0,13	4,03±0,28	6,89±0,71
1-ая опытная	0,24±0,06	3,04±0,25*	20,64±0,76*	4,06±0,27*
2-ая опытная	0,20±0,04	1,84±0,17*	26,79±0,36*	3,51±0,14*
3-ья опытная	0,23±0,05	2,16±0,14*	27,51±1,20*	3,86±0,31*

* $p < 0,05$ здесь и в следующих таблицах

В периферической крови бычков достоверно снижалось содержание аланинаминотрансферазы по отношению к контрольным показателям на 19,15% (табл. 4). Это происходит вследствие снижения проницаемости клеточных мембран гепатоцитов, в результате цитозольные ферменты не попадают в общий кровоток. Усиление белковосинтетической активности печени подтверждается выявленной тенденцией к увеличению содержания общего белка крови на фоне поддержания уровня его фракций (табл. 4).

У бычков второй опытной группы, после парентерального введения ДАФС-25 в дозе 0,2 мг/кг живой массы, выявлялось значительное снижение вакуолизации цитоплазмы гепатоцитов, что сопровождалось уменьшением содержания в них липидов на 25,68%. Так же фиксировалось уменьшение количества гепатоцитов с пикнотизированными ядрами в 4,3 раза (табл. 3). Достоверно увеличивалось число двухядерных гепатоцитов, с хорошим развитием ядрышкового аппарата, происходило смещение ядерно-цитоплазматического соотношения в сторону ядра на фоне поддержания общих размеров клетки. Уровень СДГ и АТФ-аз в паренхиме печеночных долек повышается вследствие увеличения числа гепатоцитов с высокой ферментативной активностью и превышает контрольные значения на 24,63% и 4,24% соответственно.

Состояние гепатоцитов отразилось на биохимических показателях крови, зависящих от функции этих клеток. Поскольку повреждение гепатоцитов в перипортальных областях минимально на что указывает отсутствие лейкоцитарных инфильтраций, то содержание АЛТ в периферической крови животных достоверно снижалось, начиная с 14-ых суток опыта. Это объясняется тем, что наибольшая концентрация аланинаминотрансферазы в печени жвачных животных сосредоточена именно в перипортальных гепатоцитах. Уровень активности ЩФ в крови

бычков данной группы заметно снизился после инъекций ДАФС-25 (табл. 4). Содержание общего белка и альбуминов в крови, напротив, увеличилось. Одновременно регистрировалось снижение α - и β -глобулинов крови. Это указывает на положительные изменения в структуре паренхиматозных органов, т.к. увеличение содержания данных белковых фракций является ответной реакцией организма на повреждение их клеток. Все это доказывает значимую защитную роль ДАФС-25.

Таблица 4. Биохимические показатели крови бычков на 90-е сутки ($M \pm m$)

Группа	Показатель				
	АЛТ, ед/л	ЩФ, ед/л	Общий белок, г/л	Мочевина, ммоль/л	АСТ, ед/л
контрольная	37,02±0,64	292,15±8,35	86,95±1,02	8,16±0,07	73,54±1,16
1-ая опытная	31,07±0,09*	286,82±10,18	87,53±1,06	8,02±0,11	69,01±1,17*
2-ая опытная	27,61±0,05*	271,27±7,12*	88,18±0,84	7,78±0,13*	60,08±1,21*
3-ья опытная	28,81±1,05*	270,18±9,65*	87,31±0,90	7,75±0,12*	59,87±1,19*

У бычков третьей опытной группы, после инъекции ДАФС-25 в дозе 0,1 мг/кг, происходило уменьшение количества вакуолизованных гепатоцитов, а так же клеток с элементами кариопикноза. При этом размер клеток оставался неизменным, а ядерно-плазматическое соотношение смещалось в сторону ядра (табл. 3). Количество двуядерных гепатоцитов увеличилось в 2,1 раза, что косвенно указывало на активацию синтетической функции печени. Максимальная активность СДГ в гепатоцитах определялась именно в этой группе и превышала контрольные значения на 55,21%. Локализация АТФ-аз в печени определялась диффузно по всей площади классической доли. Локализация КФ в местах максимальной активности соответствовала синусоидным капиллярам.

В крови бычков данной группы уровень содержания общего белка, начиная с 14-х суток опыта, достоверно превышал контрольные значения, параллельно увеличивалось содержание альбуминовой фракции. Уровень АЛТ, в плазме крови этих животных к концу опыта был ниже контрольных значений на 22,18% (табл. 4). Как доказательство уменьшения повреждения клеток паренхиматозных органов происходило снижение уровня α - и β -глобулиновых фракций белка.

В результате гистологического и гистохимического исследования печени, с учетом ее роли в поддержании белкового обмена у бычков опытных групп, выявлено, что наибольший протекторный эффект оказывало введение ДАФС-25 в дозе 0,1 мг/кг живой массы.

При изучении морфофункциональных особенностей печени норк было выявлено, что введение в рацион ДАФС-25 в дозе 2 г/т кормосмеси привело к уменьшению степени вакуолизации гепатоцитов, особенно в центральных зонах. Параллельно, уменьшилось число печеночных клеток, с проявлениями кариопикноза в 2,1 раза (табл. 5). Эти данные подтверждаются гистохимической реакцией с суданом III, в которой наибольший уровень

накопления липидов определялся в периферических гепатоцитах. Таким образом, при зональной форме жировой дистрофии центральные гепатоциты, выполняющие основную роль в синтезе белка, восстанавливают свои функции. В локализации СДГ и АТФ-аз в печени норок этой группы существенных отличий от контрольной группы выявлено не было, а уровень активности этих внутриклеточных ферментов превышал контрольные показатели на 11,88% и 12,63% соответственно. Места локализации КФ соотносились с синусоидными капиллярами и были ниже контроля на 2,84%. Введения препарата в кормосмеси норок привело к уменьшению содержания АЛТ в плазме крови на 84,60% (табл. 6). Одновременно произошло снижение содержания ЩФ и общего билирубина. Уровень общего холестерина в крови достоверно повышался относительно контроля, что так же является крайне важным показателем улучшения липидного обмена и свидетельствует о готовности опытных животных к зимовке. Уровень общего белка в крови норок данной группы достоверно вырос на 15,93%, параллельно увеличилось содержание альбуминов на 4,14%, что сочеталось со снижением уровня α - и β -глобулинов.

Таблица 5. Морфометрические показатели печени норок ($M \pm m$)

Группы	Ядерно-плазматическое соотношение	Двуядерные гепатоциты, %	Ядра с 2-мя и более ядрышками, %	Гепатоциты с признаками апоптоза, %
Контрольная	0,16 \pm 0,04	0,21 \pm 0,11	6,02 \pm 0,44	7,87 \pm 0,26
1-я опытная	0,21 \pm 0,03	0,87 \pm 0,22*	5,89 \pm 0,26	3,71 \pm 0,24*
2-я опытная	0,20 \pm 0,06	1,37 \pm 0,47*	4,67 \pm 0,69*	1,83 \pm 0,15*
3-я опытная	0,19 \pm 0,02	1,29 \pm 0,31*	4,72 \pm 0,35*	2,36 \pm 0,48*

* $p \leq 0,05$

Таблица 6. Биохимические показатели крови норок ($M \pm m$)

Группа	Показатель					
	АСТ, ед/л	АЛТ, ед/л	ЩФ, ед/л	Мочевина, ммоль/л	Общий билирубин, ммоль/л	Общий холестерин, ммоль/л
контрольная	127,22 \pm 6,21	269,16 \pm 21,08	183,4 \pm 2,89	4,38 \pm 0,49	6,23 \pm 0,41	4,15 \pm 0,17
1-ая опытная	103,74 \pm 2,38*	145,8 \pm 5,10*	136,8 \pm 3,16*	4,51 \pm 0,36	6,05 \pm 0,37	4,29 \pm 0,07
2-ая опытная	97,78 \pm 1,17*	140,75 \pm 7,04*	128,03 \pm 2,74*	4,32 \pm 0,57	6,0,7 \pm 0,52	4,43 \pm 0,15
3-ья опытная	94,28 \pm 2,13*	134,57 \pm 8,89*	125,73 \pm 3,41*	4,17 \pm 0,64	5,91 \pm 0,28	4,48 \pm 0,09*

У норок второй опытной группы, после введения ДАФС-25 в дозе 0,1 мг/кг живой массы, в печени зафиксировано уменьшение количества клеток паренхимы с проявлениями апоптоза в 4,3 раза. Гепатоциты с липидными каплями в цитоплазме были распределены диффузно в пределах

классической дольки, группами по несколько клеток. Что позволяло поддерживать функции как периферических, так и центральных паренхиматозных клеток. Сукцинатдегидрогеназа проявляла высокую ферментативную активность по периферии классической дольки и в единичных клетках промежуточной и центральной областей, превышая контрольные значения на 17,56%, АТФ-азная активность была выше, чем в контрольной группе на 13,14%. В данном случае в крови животных происходило снижение показателей уровня АЛТ, ЩФ, билирубина, α - и β -глобулинов с параллельным увеличением содержания общего белка, альбуминов и холестерина.

У норки третьей опытной группы подкожное введение ДАФС-25 в дозе 0,05 мг/кг живой массы привело к аналогичному изменению морфологического состояния печени. Уровень активности СДГ и АТФ-аз был выше, чем в контроле на 16,90% и 12,75% соответственно. В крови животных этой группы был зафиксирован наименьший уровень АЛТ, ниже контрольных данных в 2 раза (табл. 6), что говорит о наилучшем действии данной дозы на гепатоциты, а так же достоверно снижались показатели уровня ЩФ, билирубина. Положительный эффект этих изменений подтверждается повышением содержания общего белка на 16,95%, и наименьшим уровнем α - и β -глобулиновых фракций.

Суммируя данные по морфофункциональным изменениям в печени и биохимическим показателям крови норки следует отметить, что наибольший эффект был получен при парентеральном введении ДАФС-25 в дозе 0,05 мг/кг живой массы.

В почечной паренхиме бычков первой опытной группы обнаруживается увеличение отношения площади клубочка к просвету капсулы до 2,8 против 1,2 в контроле, т.е. происходит увеличение объёма капиллярной сети, что в свою очередь свидетельствует об улучшении фильтрационной способности почек. Это так же подтверждает снижение содержания мочевины в крови. Однако в эпителиоцитах проксимальных и дистальных канальцев обнаруживались признаки полиморфизма, а в отдельных клетках карнопикноза. Ферментативная активность СДГ превышала контрольные показания на 48,66% и локализовалась в основном в зоне базальной исчерченности эпителиоцитов. В паренхиме почек животных фиксировалось снижение активности КФ на 3,43%. В совокупности это свидетельствует о протективном действии премикса.

У бычков второй опытной группы после инъекций ДАФС-25 в дозе 0,2 мг/кг живой массы одновременно с недостоверным увеличением площади почечных телец достоверно увеличивается площадь клубочка на 66,01%. Это указывает на активную фильтрацию. На усиление процессов реабсорбции указывает увеличение процентного содержания капилляров и относительной площади, занимаемой эпителиоцитами канальцевого аппарата нефронов, в сочетании с уменьшением представительства соединительнотканых элементов, и снижением уровня мочевины в крови. Эти изменения сопровождалось повышением активности СДГ, особенно в проксимальных

извитых канальцах нефронов.

В паренхиме почек бычков третьей опытной группы введение ДАФС-25 в дозе 0,1 мг/кг привело к значительному увеличению отношения площади клубочка к просвету капсулы до 3,4 против 1,2 в контроле. При этом было отмечено достоверное увеличение содержания капилляров на 5,71% и уменьшение соединительной ткани на 44,04%, что подтверждается устойчивой динамикой к понижению уровня мочевины в плазме крови и увеличением активности СДГ на 48,58%.

Таким образом, применение премикса увеличивает функциональную нагрузку на паренхиму почек с проявлениями умеренных реактивных изменений в ее структуре и функции. Использование ДАФС-25 оказывало положительный эффект на структурно-функциональное состояние нефронов, что наиболее явно проявлялось в третьей опытной группе.

У норок первой опытной группы в структуре почек было отмечено уменьшение проявления полиморфизма эпителиоцитов проксимальных канальцев с уменьшением вакуолизации клеток. В реакции с суданом III мелкие липидные включения выявлялись только в области базальных полюсов. Активность СДГ и АТФ-аз, превышала контрольные показатели на 15,01% и 43,65% соответственно.

Во второй опытной группе норок после парентерального введения ДАФС-25 в дозе 0,1 мг/кг живой массы, изменения носили очаговый характер. В результате эпителиоциты в отдельных нефронах проявляли признаки полиморфизма и вакуолярно-дистрофических изменений. Наряду с подобными проявлениями отмечались нефроны имеющие типичное строение. Аналогично изменялись участки локализации СДГ и АТФ-аз. Снижение содержания мочевины в крови этих животных указывало на проявление компенсаторных возможностей почек (табл. 5).

Морфо-функциональные изменения в данном органе норок третьей опытной группы носили стойкую положительную динамику. Лишь в некоторых эпителиоцитах определялись элементы карнопикноза и единичные мелкие вакуоли. Повышение активности СДГ и АТФ-аз в эпителиоцитах на 61,55% и 16,09% соответственно и уменьшение уровня мочевины в крови свидетельствует о положительном влиянии ДАФС-25 на адаптивные возможности почечной паренхимы.

При исследовании миокарда бычков первой опытной группы было обнаружено увеличение диаметра кардиомиоцитов на 14,15%. При этом площадь продольного сечения ядер уменьшалась на 15,04% относительно контроля. Большинство ядер проявляли полиморфизм и гиперхромность, что в сочетании с повышением оптической плотности содержания липидов в миокарде на 11,32% указывает на определённый токсический эффект, оказываемый премиксом. Подтверждением этого является наличие по ходу капиллярного русла лимфоцитов и единичных нейтрофильных гранулоцитов. Кроме того, было зафиксировано уменьшение активности СДГ на 3,49% и увеличение активности КФ на 4,20% по отношению к контролю.

У бычков второй опытной группы строение сердечной мышечной ткани типично. Диаметр кардиомиоцитов и площадь их ядер достоверно превышают контрольные значения. Миокард суданом III окрашивается равномерно, локализация СДГ соответствует расположению митохондрий. Содержание АСТ в крови животных, начиная с 45-х суток опыта, достоверно снижалось.

В третьей опытной группе миокард бычков сохраняет характерное строение. Размер кардиомиоцитов и их ядер имеет близкие к контрольным значениям. Гистохимические реакции не выявили существенных отличий от контрольной группы. Уровень АСТ в плазме крови бычков к концу опыта был ниже контрольных значений на 22,83% (табл. 4).

В опыте на норках было показано, что введение ДАФС-25 не оказывало существенного влияния на морфофункциональные особенности сердечной мышечной ткани, выявляемые общими гистологическими и гистохимическими методами. Однако было отмечено, что введение ДАФС-25 в дозе 0,05 мг/кг живой массы приводит к недостоверному увеличению диаметра кардиомиоцитов и площади их ядер. Минимальное содержание АСТ в плазме крови фиксировалось у норки третьей опытной группы – ниже контроля на 34,93%. В первой и второй опытных группах снижение так же было достоверным.

Структурная организация поперечнополосатой скелетной мышечной ткани бычков первой опытной группы типична. В отличие от контроля у животных данной группы в соединительной ткани между миосимпластами отсутствуют лейкоцитарные клетки. Диаметр мышечных волокон увеличился на 7,82%, а площадь продольного сечения ядер на 43,74% (рис.1). Что является основанием предполагать наличие функциональной гипертрофии. Окраска суданом III позволила выявить накопление липидов в липоцитах эндомизия и перемизия, а отложение липидов в самих миосимпластах отсутствует.

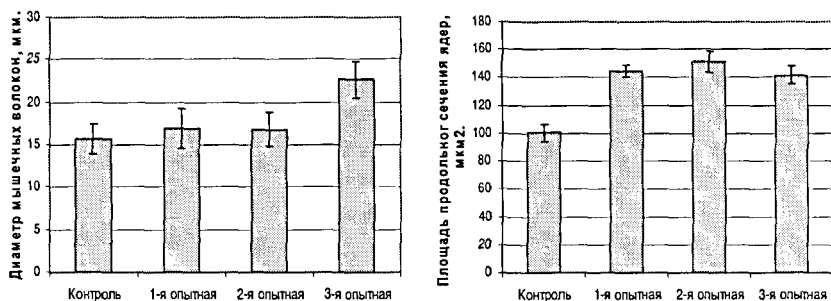


Рис. 1. Морфометрические данные скелетной мышечной ткани бычков.

У бычков второй опытной группы после введения ДАФС-25 в дозе 0,2 мг/кг массы тела была отмечена типичная структура поперечнополосатой

скелетной мышечной ткани. При этом происходило увеличение количества волокон окислительного типа, на что указывает реакция по выявлению СДГ. Диаметр волокон превышал контрольные показатели на 7,06%. Площадь продольного сечения ядер превышала контрольные значения на 50,45%. Данный эффект связан с анаболическим действием ДАФС-25.

Аналогичная картина присуща скелетной мышечной ткани бычков третьей опытной группы. У этих животных после инъекций препарата в дозе 0,1 мг/кг живой массы отмечается максимальное увеличение диаметра мышечных волокон на 44,21%. Это происходит за счет преобладания волокон гликолитического типа, что видно по реакции на СДГ, диаметр которых превышает диаметр окислительных волокон. Площадь продольного сечения ядер увеличилась на 40,93% (рис. 1).

Изменения в структуре скелетных мышечных волокон норок опытных групп ограничивались увеличением их диаметра и площади продольного сечения ядер. При этом максимальное увеличение диаметра миосимпластов на 11,24% регистрировалось у животных третьей опытной группы, что сопровождалось преобладанием волокон гликолитического типа, а максимальное увеличение площади продольного сечения ядер на 42,31% у животных второй группы. У норок, после дачи ДАФС-25 с кормом так же было зафиксировано увеличение диаметра волокна на 7,76%, а площади ядер на 20,31%.

Применение премиксов у бычков оказало влияние на динамику процессов иммунопоэза, которое выражалось в уменьшении митотической активности в лимфатических узлах на 9,31% при одновременном снижении содержания дегенеративных форм клеток. В селезенке значительных изменений в соотношении красной и белой пульпы выявлено не было. Динамика в органах периферического лимфопоэза соотносится с данными морфологических и биохимических показателей крови. Общее количество лейкоцитов в первой опытной группе достоверно снижается в пределах физиологических границ. При этом уменьшается относительное содержание лимфоцитов в периферической крови, что в сочетании с повышением γ -глобулинов на 0,92% указывает на функциональную нормализацию иммунных ответов. По нашему мнению, снижение содержания лимфоцитов происходит за счет Т-клеточной популяции, т.к. в периферической крови именно Т-лимфоциты занимают до 70% лимфоидных клеток. На фоне снижения повреждения паренхимы внутренних органов происходит снижение чрезмерной активности клеточного иммунитета. В подтверждение уменьшения фагоцитарной активности в тканях происходит снижения содержания моноцитов в периферической крови и некоторое подавление гранулоцитопоэза, в первую очередь за счет нейтрофильных гранулоцитов. Отсутствие эозинофильных и базофильных лейкоцитарных реакций косвенно указывает на низкое алергизирующее действие препарата.

У бычков второй опытной группы влияние ДАФС-25 в дозе 0,2 мг/кг живой массы на селезенку проявлялось в тенденции к уменьшению содержания белой пульпы на 16,2%, а в лимфатических узлах в снижении

общей митотической активности на 10,93%. При анализе белковых фракций крови было обнаружено увеличение содержания γ -глобулинов на 2,57%. Снижение активности в органах периферического лимфопозза вело к уменьшению относительного содержания лимфоцитов в периферической крови уже с 14-х суток опыта. Общее количество лейкоцитов в периферической крови при этом снижалось по отношению к контролю. Реакции гранулоцитов в основном ограничены нейтрофильными популяциями в виде повышения уровня зрелых гранулоцитов в пределах видовых границ.

Исследование реакций селезёнки бычков третьей опытной группы выявило уменьшение белой пульпы на 17,81% по отношению к контролю. В нижнечелюстных лимфатических узлах пролиферативно-клеточные реакции снижены на 8,14%. Количество лимфоцитов в общем объеме крови сохраняется в пределах средних физиологических показателей, что сочетается с повышением уровня γ -глобулинов на 2,18% по отношению к контрольной группе. В периферической крови бычков данной группы имеется тенденция к снижению содержания моноцитов.

В периферических органах лимфопозза норки первой группы после введения ДАФС-25 внутрь происходило увеличение относительного содержания белой пульпы селезёнки на 10,52%, что указывает на активизацию метаболизма в организме зверей. В лимфатических узлах регистрировалось повышение общей митотической активности на 2,20%, при этом содержание дегенеративных форм клеток несколько возрастало в мозговой зоне. Количество лейкоцитов в периферической крови норки находилось в пределах физиологических границ. Содержание γ -глобулинов недостоверно превышало контрольные значения на 1,10%.

При парэнтеральном введении ДАФС-25 норкам в дозе 0,1 мг/кг живой массы в селезёнке происходило увеличение относительного содержания белой пульпы на 18,74%. Этот факт указывает на стимулирующее влияние данного препарата на периферический лимфопозз. В подтверждение этого в нижнечелюстных лимфатических узлах фиксировалось увеличение общей митотической активности на 2,44%. Параллельно происходило незначительное увеличение содержания дегенеративных форм клеток в корковой и мозговой зонах. Количество лейкоцитов в периферической крови недостоверно превышало контрольные значения. Уровень γ -глобулинов в периферической крови вырос на 6,18% по отношению к контролю. В совокупности эти данные говорят об определенном иммуномодулирующем эффекте, оказываемым ДАФС-25 на организм норки.

Аналогичная динамика прослеживалась в органах иммунопозза норки третьей опытной группы. В селезёнке регистрировалось увеличение содержания белой пульпы на 17,58%. Во всех зонах нижнечелюстных лимфатических узлов выявлялось возрастание митотической активности в совокупности составившее 3,05%. Общее количество лейкоцитов в периферической крови к концу опыта имело тенденцию к повышению в физиологических границах. Уровень γ -глобулинов превышал контрольные

значения на 8,20%

Показатели, характеризующие «красную» кровь бычков первой опытной группы на протяжении опыта имели положительную динамику, которая выражалась в увеличении числа эритроцитов на 4,93% к концу опыта, с одновременным повышением содержания гемоглобина на 6,47%. При парэнтеральном введении ДАФС-25 в дозе 0,2 мг/кг, и 0,1 мг/кг живой массы в периферической крови бычков фиксировалось значительное увеличение количества эритроцитов уже после первой инъекции на 14,48% и 8,85% соответственно. Параллельно возрастало содержание гемоглобина. Цветной показатель во второй опытной группе в течение опыта был наибольшим. При этом СОЭ была либо равно контрольным значениям, либо недостоверно снижалась. Таким образом, ДАФС-25 оказывает заметное положительное влияние на кранный росток кроветворения в организме бычков.

В периферической крови норок опытных групп после введения ДАФС-25 как пероральным, так и парэнтеральным способом отмечалось увеличение содержания эритроцитов. Максимальное при подкожном введении в дозе 0,05 мг/кг живой массы на 28,45%. Минимальное при введении с кормом – на 16,91%, что достоверно выше контрольного значения. Увеличение содержания гемоглобина, так же было максимальным во второй опытной группе. Введение препарата в организме норок способствует восстановлению эритропоэза.

При анализе содержания селена во внутренних органах бычков, в рацион которых входил селенит натрия в составе премикса, было обнаружено неравномерное отложение данного микроэлемента в тканях. Так его максимальное увеличение на 69,23% по отношению к контролю фиксировалось в почечной паренхиме, а так же на 60,57% в селезёнке, что очевидно связано с особенностями метаболизма селенита натрия. В печени содержание селена увеличилось лишь на 2,39%, а в мышечной скелетной и сердечной тканях на 6,35% и 3,36% соответственно (табл. 7).

Таблица 7. Содержание селена во внутренних органах бычков, мкг/г ($M \pm m$)

Группа	Содержится элемента в органе				
	Мышцы	Сердце	Печень	Почки	Селезёнка
Контрольная n=5	0,173± 0,010	0,119± 0,014	0,167± 0,014	0,143± 0,009	0,104± 0,017
1-ая опытная n=5	0,184± 0,011	0,123± 0,011	0,171± 0,011	0,242± 0,017*	0,167± 0,013*
2-ая опытная n=5	0,211± 0,012*	0,171± 0,012*	0,227± 0,010*	0,238± 0,015*	0,138± 0,014*
3-ья опытная n=5	0,198± 0,008*	0,169± 0,010*	0,209± 0,007*	0,225± 0,012*	0,130± 0,009*

При парэнтеральном введении ДАФС-25 в дозе 0,2 мг/кг уровень селена в почках возрастает на 66,43% , а при дозировке 0,1 мг/кг живой массы – на 57,34%. Второе место по концентрации селена занимает миокард, где контрольное значение превышает на 43,69% и 42,01% в зависимости от дозировки. Следующим по уровню содержания селена среди исследованных тканей является печень. У бычков второй опытной группы её паренхима содержит на 35,92% селена больше, чем в контроле, а в третьей опытной группе данный показатель выше на 25,14%. Чуть ниже содержание селена в селезёнке – превышает контрольные значения на 32,69% и 25,0% соответственно. В длиннейшей мышце спины уровень селена достоверно превышал контрольные данные на 21,96% при введении ДАФС-25 в дозе 0,2 мг/кг живой массы и на 14,45% при дозе 0,1 мг/кг.

Введение селена в органической форме в виде ДАФС-25 и неорганической – в виде селенита натрия ведет к увеличению концентрации данного микроэлемента в тканях бычков. При этом после инъекций ДАФС-25 селена в органах и тканях бычков распределяется равномернее, чем при введении селенита натрия.

ВЫВОДЫ

1. Использование ДАФС-25 и селенита натрия при селеновой недостаточности у бычков и норок приводит к: уменьшению вакуолизации гепатоцитов; снижению апоптотических проявлений; усилению функциональной активности, проявляющейся в повышении в крови уровня общего белка, снижении уровня АЛТ, АСТ и ЩФ. Данный эффект при введении ДАФС-25 более выражен.

2. Введение нормам ДАФС-25 способствует уменьшению проявления жировой дистрофии при пероральном способе до зональной формы, при парэнтеральном способе до диссеминированной.

3. Применение селенсодержащих препаратов у бычков и норок влечёт за собой увеличение в почках площади клубочков, а так же относительного содержания эпителиоцитов канальцев и капилляров при одновременном уменьшении содержания соединительнотканых структур.

4. В почках норок введение ДАФС-25 приводит к снижению жировой дистрофии в виде уменьшения количества патологически измененных нефронов.

5. Влияние ДАФС-25 на поперечнополосатую скелетную мышечную ткань бычков и норок выражается в увеличении диаметра мышечных волокон и площади их ядер.

6. Введение бычкам препаратов селена вызывает усиление активности СДГ в паренхиме почек и печени. Причем ДАФС-25 оказывал более выраженный эффект. У норок усиление активности данного фермента происходило только в паренхиме почек.

7. ДАФС-25 при применяемых способах введения в организме бычков и норок оказывает умеренное иммуномодулирующее действие.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для уменьшения степени повреждения клеточных структур и их функционального напряжения рекомендуем использовать селеноорганический препарат ДАФС-25 (дифенилацетопенилселенид) бычкам подкожно в дозе 0,1 мг/кг живой массы через 30 дней; нормам целесообразно вводить в кормосмеси ДАФС-25 в дозе 2г/т 1 раз в неделю.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мерзлякова, Е.А. Влияние 1,5-дифенил-3-селенпентадион-1,5 на морфологию крови и печени. / Е.А. Мерзлякова. // Морфология – 2006. – Т.4. – С. 82.
2. Берестов, Д.С. Антиоксидантный эффект ДАФС-25 при откорме бычков и в профилактике последствий лучевого воздействия. / Д.С. Берестов, Е.А. Мерзлякова, Е.И. Трошин. // Ветеринарная патология – 2007, - №3 – С. 188-192.
3. Старков, М.В. Влияние парентерального введения селеноорганического препарата на гистологические, некоторые морфологические, биохимические показатели крови бычков. / М.В. Старков, Е.А. Мерзлякова, Т.А. Трошина. / Ветеринарный врач. – 2007. - №4 – С.45-47.
4. Мерзлякова, Е.А. Изменение микроархитектоники печени крупного рогатого скота при парентеральном введении ДАФС-25. / Е.А. Мерзлякова. // Морфологические ведомости. – 2008. – № 1-2. – С. 193-194.
5. Мерзлякова, Е.А. Влияние премиксов на морфологию некоторых внутренних органов. / Е.А. Мерзлякова, М.В. Старков. // Современные проблемы аграрной науки и пути их решения: Материалы Всероссийской науч. практ. конф. ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА. – Ижевск: РИО ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2005. – Т.1. – С. 182-184.
6. Старков, М.В. Изменение показателей АлАТ, АсАт и гистологической структуры печени на фоне применения премиксов при откорме крупного рогатого скота. / М.В. Старков, Е.А. Мерзлякова, Т.А. Трошина. // Научное обеспечение реализации национальных проектов в сельском хозяйстве: Материалы Всероссийской науч. практ. конф. ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА. – Ижевск: РИО ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2006. – Т.2. – С. 263-265.
7. Старков, М.В. Влияние парентерального введения селеноорганического препарата на изменение массы тела, некоторые гематологические и биохимические показатели крови при откорме бычков. / М.В. Старков, Е.А. Мерзлякова, Т.А. Трошина. // Инновационное развитие АПК, итоги и перспективы: Материалы Всероссийской науч. практ. конф. – Ижевск: РИО ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2007. – Т.2. – С. 47-49.

8. ДАФС-25 селенорганический препарат нового поколения для лечения и профилактики гипоселенозов животных и пушных зверей: методические рекомендации / Т.А. Трошина, Р.Ф. Вакилов, Д.С. Берестов, Е.А. Мерзлякова. – Ижевск: РИО ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2007. –39 с.
9. Мерзлякова, Е.А. Гистологические и гистохимические реакции некоторых внутренних органов откормочного поголовья КРС на парентеральное введение ДАФС-25. / Е.А. Мерзлякова, Т.А. Трошина. // Эффективность адаптивных технологий в растениеводстве и животноводстве: Материалы Всероссийской науч. практ. конф. – Ижевск: РИО ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2008. – Т.2. – С. 252-256.
10. Трошина, Т.А. Антиоксиданты – в рационе пушных зверей. / Т.А. Трошина, М.В. Старков, Е.А. Мерзлякова, Р.Ф. Вакилов. // Научный потенциал – современному АПК: Материалы Всероссийской науч. практ. конф. – Ижевск: РИО ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2009. – С. 147-149.

Подписано в печать 09.10.2009 г.
Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 1,1. Тираж 100 экз.
Заказ № 1315.

Отпечатано в ООО «Издательство "ЛЕМА"»
199004, Россия, Санкт-Петербург,
В.О., Средний пр., д.24, тел./факс: 323-67-74
e-mail: izd_lemma@mail.ru
<http://www.lemaprint.ru>