

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОМОДУЛЯТОРА НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

*Кисиль А.С. (ФГБОУ ВО СПбГАВМ), Дудолодова Т.С., Власенко В.С., Кособоков Е.А., Блошенко Е.А.
(ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»)*

Ключевые слова: микобактерия, туберкулез, специфический иммуномодулятор КИМ-М2, антиген-полимерный комплекс. **Key words:** mycobacterium, tuberculosis, specific immunomodulator KIM-M2, antigen-polymer complex.

РЕФЕРАТ

В работе представлены результаты анализа основных морфометрических параметров ткани печени морских свинок, инфицированных *Mycobacterium bovis*, на фоне предварительного введения специфического иммуномодулятора КИМ-М2. Для постановки опыта было отобрано 15 животных, из которых сформировали 3 группы. Пять интактных особей (1-я группа) служили контролем. Животным 2-й и 3-й опытных групп (n=5) – вводили вирулентную культуру *M. bovis*, штамм 14, подкожно в дозе 0,001 мг/мл, при этом животным 3-й группы (n=5) за 30 суток до инъекции подкожно вводили КИМ-М2 в дозе 500 мкг белка. По результатам морфометрических измерений с помощью калиброванной окулярной сетки рассчитывали показатели восстановительных процессов печени (паренхиматозную плотность, функциональную клеточную массу, ядерную массу, индекс массы двухядерных клеток, массмитотический индекс, функциональный кардиоциточный индекс, среднюю площадь среза гепатоцита). Установлено, что введение *Mycobacterium bovis* (штамм 14) по результатам морфометрического исследования печени вызывало развитие дегенеративных и деструктивных процессов, сопровождающихся полнокровием, застойными явлениями и холестаазом, а также снижение глубины репаративных резервов и интенсивности функционирования гепатоцитов. Введение специфического иммуномодулятора КИМ-М2 за 30 суток до инфицирования микобактериями животных способствовало значительному снижению выраженности дегенеративных и деструктивных процессов, уменьшению полнокровия, застойных явлений и задержки желчи в желчевыводящих путях, а также расширению объема репаративных резервов печени. Полученные данные морфологической оценки состояния печени свидетельствовали о повышении устойчивости лабораторных животных к инфицированию патогенными микобактериями.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время предложены разные концепции конструирования противотуберкулезных препаратов [9], однако, на наш взгляд, наиболее перспективной является конъюгация иммуногенной фракции, выделенной из вакцинных бактерий, со стимулирующим компонентом. Как показали результаты, необходимыми для этого свойствами обладают синтетические неприродные полиэлектролиты с контролируемой структурой [2, 6].

Известно, что при различных формах и стадиях туберкулеза происходит вовлечение в патологический процесс всех органов гистиоцитарной системы организма, в том числе печени, с последующим формированием гранулематозного воспаления [8]. Поэтому исследование ткани печени при инфицировании микобактериями на фоне воздействия сконструированного нами противотуберкулезного препарата КИМ-М2, представляющего собой комплекс растворимых термостабильных антигенов, извлеченных из микробных клеток вакцинного штамма БЦЖ, инкубированных с формалином и конъюгированных с полиэлектролитами, имеет теоретическое и практиче-

ское значение.

Ранее было показано, что антиген-полимерный комплекс снижает тинкториальные, дистрофические и деструктивные изменения гепатоцитов, уменьшает количество и объем гранул в печени и усиливает компенсаторно-восстановительные процессы в паренхиме органа [3]. Однако морфофункциональные изменения печени под воздействием этого специфического препарата не в полной мере изучены, что не позволяет более детально раскрыть его влияние на повышение устойчивости органа к действию патогенных факторов, в частности экспериментальному инфицированию *M. bovis*, и стимуляцию репаративно-регенераторных процессов.

В этой связи предметом нашего исследовательского интереса стала морфометрическая оценка восстановительных процессов печени морских свинок, инфицированных вирулентной культурой *M. bovis* на фоне предварительного введения противотуберкулезного препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 15-ти морских свинках массой 300-350 г, которых разделили на

3 равные группы. Животные первой группы (n=5) служили в качестве контроля (интактные). Животным второй группы (n=5) ввели вирулентную культуру *M. bovis* штамм 14 в дозе 0,001 мг/мл. Животным третьей группы (n=5) за 30 суток до введения вирулентной культуры *M. bovis* штамм 14 подкожно ввели КИМ-М2 в дозе 0,5 мл (500 мкг белка). Через 30 суток после инфицирования животные выводились из эксперимента путем декапитации (под эфирным наркозом).

Комплекс антигенов для конъюгации с поливинилпирролидоном и позтиленигликолем выделяли из культуры вакцинного штамма БЦЖ, которую выращивали на жидкой синтетической среде Сотона, затем подвергали ультразвуковой дезинтеграции на аппарате УЗДН-1 в течение 30 мин.

Исследования проводили с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [4], а также в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

Печень фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина на фосфатном буфере. Материал заливали в парафин по общепринятой методике [7]. Пробоподготовка исследуемого материала осуществлялась с использованием станции STR-120, станции заливки парафином ЕС-350.

На ротационном микротоме Microm HM 340 E (Carl Zeiss) готовили срезы толщиной 3-5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss) и Axio Star plus (Carl Zeiss) с применением окулярной сетки по методу наложения точечных морфометрических сеток (сетка 256 точек) [1].

Морфологическую оценку состояния печеноч-

ной ткани осуществляли на основе морфометрического исследования гистологических срезов [5]. При помощи окулярной сетки определяли следующие показатели: число целых ядросодержащих клеток (ЧК), число двухядерных клеток (ЧДК), число митозов (ЧМ) и число точек сетки, не попадающих на срезы гепатоцитов или их ядер (ЧСТ). Затем по результатам измерений рассчитывали следующие показатели: паренхиматозную плотность ($ПП=1-ЧСТ/Нузл$); функциональную клеточную массу ($ФКМ=(ЧК/Scet)*ПП*10^5$); ядерную массу ($ЯМ=(ЧК+ЧДК)/Scet*ПП*10^5$), индекс массы двухядерных клеток ($ИМДК=(ЧДК/ЧК)/Scet*ПП*10^5$), масс-митотический индекс ($ММИ=(ЧМ/ЧК)/Scet*ПП*10^5$), функциональный кариоклеточный индекс ($ФККИ=ЯМ/ФКМ$) и среднюю площадь среза гепатоцита ($СПСГ=(Scet/ЧК)*ПП$).

Цифровой материал обрабатывался методами вариационной статистики на компьютере с использованием приложения Excel. Значимость полученных результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ основных морфометрических параметров ткани печени, представленный в таблице 1, показал, что инфицирование морских свинок вирулентной культурой *M. bovis* способствовало существенному изменению морфологического состояния печени. Так, экспериментальное заражение вызвало увеличение функционального объема паренхимы по сравнению с контрольными животными, на что указывало достоверное повышение показателя паренхиматозной плотности. Также наблюдалось снижение функциональной клеточной массы до $58,20 \pm 3,49$ против $111,11 \pm 13,80$ в контрольной группе, что свидетельствовало о развитии полнокровия, застойных явлений и холестаза в ткани печени.

Таблица 1.

Основные морфометрические показатели ткани печени морских свинок контрольной и опытных групп, $M \pm m$

Показатели	1-я группа (контроль)	Опытные группы	
		2-я группа	3-я группа
Паренхиматозная плотность	0,47±0,04	0,75±0,02 <0,001	0,60±0,02* <0,001
Функциональная клеточная масса	111,11±13,80	58,20±3,49 <0,01	124,58±6,34* >0,05
Ядерная масса	112,37±13,92	62,10±4,04 <0,01	140,17±7,97* >0,05
Индекс массы двухядерных клеток	0,12±0,07	0,10±0,03 >0,05	0,33±0,04* <0,05
Масс-митотический индекс	0,09±0,006	0,01±0,002 <0,001	0,04±0,02 >0,05
Функциональный кариоклеточный индекс	1,01±0,004	1,06±0,009 <0,01	1,12±0,01* <0,01
Средняя площадь среза гепатоцита	208,97±11,85	1002,30±43,86 <0,001	295,32±5,20* <0,01

Примечание: * $P < 0,05 - 0,001$ по сравнению со 2-й группой

Инфицирование способствовало снижению показателя ядерной массы на 44,7 % ($P < 0,01$) и масс-митотического индекса на 88,9 % ($P < 0,001$), что отражало преобладание дегенеративных и деструктивных процессов, а также снижение глубины репаративных резервов при падении интенсивности функционирования гепатоцитов. В то же время, несмотря на некоторое уменьшение, достоверного различия в индексе массы двухядерных клеток не отмечалось.

Остальные показатели функциональный кардиоцелочный индекс и средняя площадь среза гепатоцитов у морских свинок, инфицированных *M. bovis*, достоверно увеличивались относительно контроля, однако их изменения не имели значения в морфологической оценке ткани печени, так как они не сопровождались одновременным увеличением индекса массы двухядерных клеток.

Введение морским свинкам специфического иммуномодулятора за 30 суток до инфицирования вирулентной культуры *M. bovis* также сопровождалось увеличением функционального объема паренхимы относительно показателя паренхиматозной плотности контрольной группы, но, если сравнивать с животными 2-й опытной группы, интенсивность этого повышения была ниже на 20 % ($P < 0,001$).

Если под действием вирулентного штамма микобактерий мы наблюдали достоверное уменьшение уровня функциональной клеточной массы, то предварительное введение КИМ-М2 хотя и не вызывало значимых изменений этого параметра, но все же способствовало его увеличению по сравнению с 1-й группой, что свидетельствовало о снижении полнокровия, застойных явлений и задержки желчи в желчевыводящих путях. Идентичная картина также была отмечена при анализе еще одного показателя – ядерной массы, увеличение которой у морских свинок 3-й группы выражало существенное, особенно если сравнивать с аналогичным показателем у особей 2-й опытной группы, снижение дегенеративных и деструктивных процессов в печени.

Также выявлены достоверные различия между уровнями индекса массы двухядерных клеток ($P < 0,05$), функционального кардиоцелочного индекса ($P < 0,01$) и средней площади среза гепатоцита ($P < 0,01$) у морских свинок, сенсибилизированных специфическим иммуномодулятором, относительно контрольной группы. Причем одновременное увеличение этих показателей отражало общее расширение объема репаративных резервов печени.

Достоверной разницы между уровнем масс-митотического индекса, показывающем пролиферативную активность единицы объема печеночной ткани, у животных 3-й группы по сравнению с контролем не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно

прийти к заключению о том, что экспериментальное инфицирование вирулентной культурой микобактерий (штамм 14) приводит к существенному изменению морфологического состояния печени, которые характеризовались преобладанием дегенеративных и деструктивных процессов, сопровождающихся полнокровием, застойными явлениями, а также снижением глубины репаративных резервов и интенсивности функционирования гепатоцитов.

Введение специфического иммуномодулятора КИМ-М2 за 30 суток до инфицирования микобактериями животных способствовало значительному снижению выраженности дегенеративных и деструктивных процессов, уменьшению полнокровия, застойных явлений и задержки желчи в желчевыводящих путях, а также расширению объема репаративных резервов печени.

Таким образом, данные морфометрического исследования печени морских свинок, подвергшихся введению специфического иммуномодулятора КИМ-М2, свидетельствуют о повышении устойчивости лабораторных животных к инфицированию патогенными микобактериями.

Morphological assessment of the liver under the action of a specific immunomodulator on the model of experimental tuberculosis. Kisil A.S., Dudoladova T.S., Vlasenko V.S., Kosobokov E.A., Bloshenko E.A.

SUMMARY

In this article there are present the results of analysis of the main morphometric parameters of tissue's liver of guinea pigs infected with *Mycobacterium bovis* against the background of the preliminary introduction of a specific immunomodulator KIM-M2. There were selected the 15 animals for the setting of the experiment, of which we were formed the 3 groups. Five intact individuals (1st group) served as control. We injected a virulent culture of *M. bovis*, strain 14, subcutaneously at a dose of 0.001 mg / ml the animals of the 2nd and 3rd test groups ($n = 5$), while we were injected subcutaneously with KIM-M2 at a dose of 500 μ g protein the animals of the 3rd group ($n = 5$) at 30 days before injections. We were calculated the parameters of the liver regeneration processes (parenchymal density, functional cell mass, nuclear mass, mass index of dinuclear cells, mass-mitotic index, functional karyo-cell index, average cut-off area of hepatocyte) based on the results of the morphometric measurements with calibrated ocular mesh. It was established that the introduction of *Mycobacterium bovis* (strain 14) by the results of morphometric examination of the liver caused the development of degenerative and destructive processes accompanied by plethora, stagnation and cholestasis, as well as a decrease in the depth of reparative reserves and the intensity of hepatocyte functioning. The introduction of a specific immunomodulator KIM-M2 at 30 days before

infection with mycobacteria of animals contributed to a significant decrease in the severity of degenerative and destructive processes, a decrease in plethora, stagnation and bile retention in the biliary tract, and an increase in the volume of reparative liver reserves. The obtained data of a morphological evaluation of the liver state indicated an increase in the resistance of laboratory animals to infection with pathogenic mycobacteria.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. – М.: «Медицина», 1990. – 384 с.
2. Бажин М.А. Получение специфических антиген-полимерных комплексов и оценка их протективных свойств / М.А. Бажин, В.С. Власенко, Г.П. Неворова // Вестник Омского ГАУ. – 2016. – № 4(24). – С. 124-133.
3. Гуляева Е.А. Иммунологическая и морфологическая оценка иммуномодулирующего действия КИМ-М2 у морских свинок инфицированных микобактериями / Е.А. Гуляева, В.С. Власенко, В.В. Семченко, М.А. Бажин, Н.В. Голенкова, Е.В. Сульдин, Т.С. Дудолодова, Н.Н. Кощев // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – № 4. – С. 72-74

4. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. – Страсбург, 18.03.1986.
5. Пат. 2308031 РФ, МПК G01N 33/48, A61B 10/00. Способ оценки восстановительных процессов печени / Е.В. Антопольская, И.А. Швейнов, А.И. Конопля, А.В. Ушкалов; Курск. гос. мед. универ. – № 2005141259; заявл. 28.12.2005; опубл. 10.10.2007. Бюл. № 28.
6. Петров Р.В. Успешные вакцинации реальны / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов // Наука в России. – 2014. – № 3(201). – С. 18-25.
7. Семченко В.В. Гистологическая техника / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.И. Ноздрин, В.Н. Артемьев. – Омск: Омская областная типография, 2006. – 289 с.
8. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. – М.: Изд-во РАМН, 2007. – 536 с.
9. Parlane N.A. Immunity and vaccination against tuberculosis in cattle / N.A. Parlane, B.M. Buddle // Current Clinical Microbiology Reports. – 2015. – Vol. 2 (1). – P. 44-53.

УДК: 619:636.5.579

ПРОБИОТИКИ НА СЛУЖБЕ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ПТИЦ

Новикова А.Ф., Проккоева Ж.А. (ВНИВИП ФНЦ "ВНИТИП" РАН)

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, молочнокислые бактерии, штаммы, бактериальные болезни, птицы, птицеводство, бройлеры. **Key words:** probiotic microorganisms, lactic acid bacteria, strains, bacterial diseases, poultry, poultry industry, broilers.

РЕФЕРАТ

Пробиотические молочнокислые бактерии (МКБ) уже давно представляют интерес для ученых. Накоплено много сведений, подтверждающих пользу и безопасность их применения. Использование МКБ в птицеводстве в настоящее время широко распространено. Многочисленные труды российских ученых, таких как Сопилов П.М., Панин А.Н., Малик Н.И., Бовкун, Г.Ф., Кузьмин В.А. и другие, определили положительную роль пробиотикотерапии для лечения и профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта птицы. Во всех странах мира пробиотики используют для стимуляции роста и развития птицы, повышения её продуктивности. Благодаря антагонистической активности МКБ пробиотики применяют в системе оздоровления птиц с целью сокращения их заболеваний. Пробиотики являются альтернативой антибиотикам в условиях современной глобальной антибиотикорезистентности. Учитывая важные преимущества МКБ, авторами разработана методология подбора пробиотических микроорганизмов для создания биокомплекса с целью профилактики и лечения бактериальных болезней птиц.

ВВЕДЕНИЕ

Издавна человек применяет для лечения ряда заболеваний продукты, содержащие молочнокислые бактерии. Указание на это имеется у врача XII века Абу Али Ибн Сина в его «Каноне врачебной науки» [6].

Великий русский учёный И.И.Мечников, открыв явление фагоцитоза в 1882 году, предсказал великое будущее использованию «благодетельных бактерий, оберегающих нас от болезнетворных».

Он писал: «По всему нужно думать, что во внешней природе и в человеческом организме распространены микробы, оказывающие нам большую пользу в борьбе против заразных болезней» [9]. Учёный рекомендовал использовать антагонистические взаимоотношения между молочнокислыми и протеолитическими бактериями для подавления роста последних. Выдвинув теорию, согласно которой гнилостная микрофлора толстого отдела кишечника оказывает токсическое