

Я. Шенгаут, В.В. Малашко

## МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА «БИЛАВЕТ-С»

В статье рассмотрены морфогистохимические, иммунологические и электронно-микроскопические изменения в пищеварительной системе и лимфатических узлах белых крыс-самцов при введении пробиотического препарата «Билавет-С». Установлено увеличение лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки тощей кишки, длины ворсинок, усложнение микроциркуляторного русла за счет увеличения протяженности и плотности сосудов. Под влиянием препарата наблюдается активизация в формировании лимфатических фолликулов с четко выраженными светлыми центрами, что свидетельствует об усилении лимфоцито- и иммунопозитивной функции в организме животных под воздействием пробиотика.

**Ключевые слова:** пробиотик, препарат «Билавет-С», пищеварительная система, лимфатический узел, крыса, плазмоцит, капилляр, лимфоцит, ворсинка, гликокаликс, микроворсинка, энтероцит.

**Введение.** Устойчивость многих микроорганизмов к антибиотикам – хорошо известная проблема во всем мире. В то же время необходимость борьбы с энтеропатогенами без использования антибиотиков является главной задачей всех развивающихся стран мира. Эта проблема диктуется тем, что устойчивость к антибиотикам подвергает опасности возможность лечить целый ряд инфекционных заболеваний животных, а также создание медицинских и ветеринарных методик, которые частично зависят от возможности контролировать инфекцию [1; 2]. Пробиотики – это источники молочнокислых бактерий, которые способны бороться с патогенами и физически или химически их уничтожать. В дальнейшем, после пробиотиков, предусматривается использование пребиотиков [3]. Пробиотики вполне успешно существуют в слепой кишке, так как они производят большое количество бактерий. Обычно пробиотиков существует сотни видов. Поддерживая микрофлору, толерантную к кислоте, некоторые из них сами вырабатывают органические кислоты, что дает возможность изменять pH в кишечнике и уничтожать патогены. Большинство бактерий, найденных в пробиотиках в здоровом кишечнике, являются грамположительными видами. Одна из самых важных групп бактерий в пищеварительном тракте – молочнокислые бактерии – пробиотики.

Эти бактерии вырабатывают большое количество молочной кислоты, которая способствует росту других видов, таких как *Bifidobacteria*, *Propionibacteria*, *Butyrivibrio* и *Roseburia*, поддерживающих ферментативное брожение и вырабатывающих органические кислоты. Они обычно колонизируются в кишечнике, но нуждаются в слабокислой среде и высоко буферизированных кормах, поддерживающих среду в кишечнике от нейтральной до щелочной среды. Снижение числа бактерий уменьшает угрозу заболевания, тем самым сокращая смертность животных и птицы. Патогенная микрофлора уничтожает в кишечнике ворсинки, участвующие во всасывании питательных веществ и воды, необходимых для роста животных. Снижение числа патогенов позволяет ворсинкам полноценно развиваться, что приводит к увеличению всасывающей поверхности кишечника, которая, в свою очередь, уменьшает потребность в использовании антибиотиков. Пробиотики могут работать эффективно только при низком уровне pH [4].

Создание биологических бактериальных препаратов для целей медицины и ветеринарии с использованием микроорганизмов представителей нормальной микрофлоры является

---

*Шенгаут Яков*, ветеринарный хирург ЗАО «Jakovo veterinarijos centras» (Вильнюс, Литва).

*Адрес для корреспонденции:* ул. Гяросёс Вильтес, 1, LT-03147, Вильнюс, Литва; e-mail: dr@vetmed.lt

*Малашко Виктор Викторович*, д-р ветеринар. наук, проф., декан факультета ветеринарной медицины ГГАУ (Гродно).

*Адрес для корреспонденции:* ул. Терешковой, 28, 230008, г. Гродно, Беларусь; e-mail: vet@ggau.by

одним из современных направлений научно-технического прогресса. Микроорганизмы-симбионты обеспечивают местный иммунитет и стимулируют иммунную реактивность, обладают способностью продуцировать перекись водорода и органические кислоты, синтезировать лизоцим и антибиотические факторы (лактомин, лизин, ацидофилин, лактоцид и др.), а также изменять концентрацию  $H^+$  и окислительно-восстановительный потенциал среды [4]. В настоящее время пробиотики нашли широкое применение в комплексной терапии дисбактериозов на фоне использования сильнодействующих антибиотиков нового поколения [6, с. 34–36; 7].

К тому же мировые тенденции максимального ограничения применения синтетических фармакологических препаратов, включая антибиотики, диктуют необходимость поиска абсолютно новых, альтернативных химиотерапевтическим препаратам, экологически безвредных средств [8; 9]. В этой связи востребованными являются препараты, отвечающие следующим требованиям: не оказывают побочного действия на организм; не накапливаются в органах и тканях животных (в мясе, яйцах) или имеют сокращенный период ожидания; не вызывают привыкания (развития резистентности) со стороны патогенной микрофлоры; не загрязняют окружающую среду [10; 11]. Важным научным направлением в ветеринарной морфологии и физиологии является исследование функционирования пищеварительной системы в условиях использования пробиотических препаратов на разных видах животных, что может способствовать пониманию механизмов развития компенсаторно-приспособительных реакций в организме [12; 13]. Знание механизмов и закономерностей функциональных и морфологических изменений в желудочно-кишечном тракте и в организме в целом на ранних этапах онтогенеза важно для скрининга лекарственных и биологически активных веществ [14; 15]. Новым перспективным направлением является применение активаторов метаболизма для коррекции роста, развития и метаболических процессов через воздействие на ряд ферментных и энергетических систем организма. Таким препаратом, который может корректировать обменные процессы в организме животных, может служить препарат «Билавет-С». Бифидобактерии, входящие в состав препарата, характеризуются высокой активностью роста и кислотообразования, желчеустойчивы, кислотоустойчивы, проявляют высокую антагонистическую активность по отношению к условно патогенным и патогенным микроорганизмам, активизируют окислительно-восстановительные и обменные процессы, стимулируют синтез клеточных и гуморальных факторов неспецифической и иммунной резистентности организма [16–18].

**Материалы и методы.** Для выяснения характера и динамики морфологических, гистохимических и ультраструктурных изменений в пищеварительной системе под влиянием препарата «Билавет-С» был проведен научный эксперимент на беспородных белых крысах-самцах массой  $253,6 \pm 2,7$  г в начале эксперимента. Все манипуляции проводили согласно международным правилам работы с животными (European Communities Council Directive; 86/609/ЕЕС). Животных содержали при естественном освещении; средней температуре в виварии  $22 \pm 1$  °С и свободном доступе к воде и пище (ad libitum). Для проведения морфологических исследований у крыс-самцов из контрольной и опытной групп на 15-й день и 45-й день был взят тонкий кишечник и брыжеечные лимфатические узлы. Всего было исследовано на 15-й день из контрольной и опытной групп по 18 животных, на 45-й день – по 15 крыс соответственно. В таблице 1 приведена схема опыта.

Исследовали сегменты тонкого кишечника, брыжеечные лимфатические узлы крыс-самцов. Биоптаты тонкого кишечника фиксировали в 10–12%-м нейтральном забуференном формалине, а для проведения гистохимических исследований биоматериал замораживали в жидком азоте ( $t-196$  °С). Для получения обзорной информации структурных компонентов тонкого кишечника и лимфатических узлов гистосрезы окрашивали гематоксилином эозином по П. Эрлиху, прочным зеленым по И. Ван Гизону, метиленовым синим по Лейшману, альциновым синим с докраской ядер гематоксилином.

Таблица 1 – Схема опыта на белых крысах-самцах

Группа	Количество животных	Схема применения препарата
Контроль	48	Перорально вводили изотонический раствор натрия хлорида в дозе 1 мл/гол. один раз в сутки на протяжении 45 дней
Опыт	48	Перорально вводили в изотоническом растворе препарат «Билавет-С» в дозе 1 мл/гол. один раз в сутки на протяжении 45 дней. Концентрация жизнеспособных клеток (КОЕ) в 1 мл составляла не менее 1 млрд микробных тел

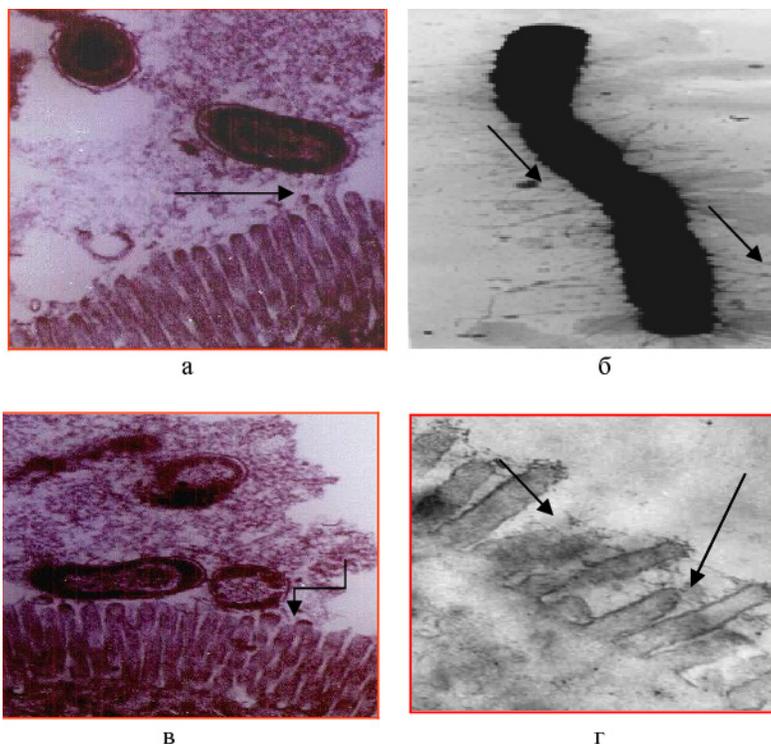
Определение плазмоцитов проводили по методу Ж. Браше. Для выявления тучных клеток срезы окрашивали по методу М.Г. Шубича (1961). Оценку белоксинтезирующего аппарата клеток проводили по методикам Ж. Браше, Ф. Нисслю и в модификации метода Ф. Ниссля по В.В. Малашко (1993) с использованием основного коричневого (бисмарка), что позволило выявить тучные клетки по наличию в них специфической зернистости, четко окрашивающейся в коричневый цвет. Подсчет межэпителиальных лимфоцитов проводили в 10 полях зрения микроскопа в расчете на 1000 поверхностных эпителиоцитов ворсинок. Подсчет плазмоцитов проводили в 10 полях зрения микроскопа. Количественную оценку капилляризации тонкого кишечника крыс проводили с использованием методики С.М. Блинкова и др. (1961) по формуле:  $L_0 = 2n_c$ ;  $n_c = N_c/2a$ , где  $N_c$  – число концов сосудов в пределах сетки;  $n_c$  – плотность концов капилляров на 1 мм<sup>2</sup>;  $a$  – площадь срезов, покрываемой сеткой;  $L_0$  – длина капилляров на 1 мм<sup>3</sup>. Микроциркуляторное русло тонкого кишечника выявляли по методу В.В. Куприянова (1965), а также гистохимическим методом по Г. Гомори, основанным на выявлении щелочной фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.1.1) в эндотелии кровеносных сосудов. Для электронно-микроскопического исследования брали соответствующие участки тонкого кишечника крыс около 3–5 см, которые были лигированы, и интравенно вводили методом диффузии 2%-й раствор глютарового альдегида. Срезы готовили на ультрамикротоме ЛКБ (Швеция), контрастировали цитратом свинца и просматривали под микроскопом JEM-100CX (Япония).

**Результаты исследований.** Колибактериальная инфекция чаще протекает как моноинфекция, а в более старшем возрасте как смешанная или вторичная инфекция с сочетанием рота- и короновиральной инфекции. Ротавирусная инфекция способствует заселению тонкого кишечника *E. coli*. Энтеротоксическую форму колибактериоза, по нашему мнению, можно отнести к болезням с фекально-оральным способом передачи. Возбудители от источника инфекции передаются здоровому животному контактным, водным или алиментарным путями. В период фиксации *E. coli* на микроворсинках тонкого кишечника (главным образом тощей и подвздошной кишок) и в дальнейшем выделение бактериями токсинов наблюдается интенсивная гиперсекреция жидкости в просвет кишечника. Это дает основание к использованию интенсивной регидрационной терапии и лекарственных препаратов. Адгезия колибактерий на микроворсинках слизистой оболочки тонкого кишечника приводит к нарушению перистальтики и защитных свойств слизистой оболочки, которое выражается в разрушении ворсинок, микроворсинок, гликокаликсного слоя (рисунок 1г), происходит усиленная коллагенизация слоев стенки кишки, развитие воспалительных и ишемических процессов.

Известно, что в норме *E. coli* (в 4–8 % случаях энтеротоксигенные, в остальных – неэнтеротоксигенные) находятся в основном в химусе кишечника и только 15–28 % от их общего числа – на его слизистой оболочке в адгезированном состоянии.

У животных, больных энтеротоксической формой колибактериоза, наоборот, 80–90 % энтеротоксигенных *E. coli* связаны со слизистой оболочкой, остальные свободно располагаются в химусе, что и продемонстрировано на рисунках. Заселение слизистой оболочки тонкого кишечника энтеротоксигенными *E. coli* происходит довольно быстро (рисунок 1а). Так, через 3 ч после инфицирования новорожденных крыс на слизистой оболочке кишечника уже имеются возбудители в адгезированном состоянии (рисунок 1в).

Затем микробы быстро распространяются в краниальном направлении и через 16 ч после заражения энтеротоксигенными *E. coli* на 65 % колонизируют слизистую оболочку тонкого кишечника. К энтероцитам крипт кишечника такие бактерии не адгезируют. С помощью адгезивных фимбрий бактерии прикрепляются к специальным рецепторам эпителиальных клеток (рисунок 1б). В отдельных случаях усиление адгезии обеспечивается гликокаликсом и капсульными антигенами *E. coli*, которые скрепляют микроколонии бактерий с эпителиальными клетками кишечника, делая их контакт более прочным. Прикрепившись к слизистой оболочке кишечника, энтеротоксигенные *E. coli* начинают быстро размножаться, образуя на слизистой оболочке несколько толстых слоев бактерий. Заболевшие животные теряют с фекалиями воду, натрий и бикарбонаты, что приводит к дегидратации организма, обменному ацидозу, гиперкалиемии, гипохлоремии и уремии.



Пояснения: а – приближение микробов к микроворсинкам энтероцитов (стрелка); в – адгезия микробов на микроворсинках энтероцитов (стрелка). Кишечная палочка (б) с ресничками (фимбриями, пили (лат. *fimbria* – бахрома). При помощи ресничек (стрелки) *E. coli* прикрепляются к энтероцитам кишечника, образуя микроколонии; г – разрушение микроворсинок энтероцитов (стрелки) и исчезновение гликокаликса. Электронограмма. Ув.: а, в – 20 000, б – 30 000, г – 25 000.

**Рисунок 1 – Процесс адгезии *E. coli* на микроворсинках тонкого кишечника**

При гистологическом исследовании слизистой оболочки тощей кишки было выявлено, что эпителиальные клетки кишечника (энтероциты) замещаются кубовидными, незрелыми клетками, неспособными к синтезу пищеварительных ферментов, секреции и всасыванию. Это вызывает расстройство переваривания и всасывания нутриентов в кишечнике больных животных, нарушает водный баланс, обуславливает накопление в пищеварительной системе лактозы и электролитов, что увеличивает осмотическое давление и прилив жидкости в просвет кишечника с последующим развитием диареи.

При сравнении строения тонкой кишки опытных и контрольных крыс выявлен ряд структурных особенностей. В контрольной группе животных содержание лимфоцитов

в собственной пластинке слизистой оболочки тощей кишки на 15-й день проведения анализов составляло  $1,95 \pm 0,17\%$ , в опытной группе –  $3,70 \pm 0,29\%$  ( $P < 0,01$ ). Существенное увеличение лимфоцитов отмечено на 45-й день, где их количество по отношению к контролю возросло в 1,8 раза ( $P < 0,01$ ). В динамике изменения содержания плазмоцитов достоверные различия констатированы на 45-й день проведения морфологического мониторинга, где концентрация плазмоцитов превышала контрольные данные в 1,5 раза ( $P < 0,05$ ).

Количественные изменения произошли с межэпителиальными лимфоцитами в расчете на 1000 клеток в поверхностном эпителии тощей кишки крыс, где их содержание на 45-й день применения препарата «Билавет-С» превышало контроль на 27,6 % ( $P < 0,05$ ). Происходит увеличение количества средних лимфоцитов (диаметр 9–12 мкм), больших лимфоцитов (13–16 мкм) и усиление в них биосинтетической активности, что свидетельствует об активации иммунокомпетентных клеток. Применение препарата «Билавет-С» крысам в течение 30 дней сопровождается увеличением в соединительнотканной строме тонкой кишки тучных клеток. Доля тучных клеток возрастет в опыте до  $8,23 \pm 1,16\%$ , в контроле – до  $4,78 \pm 0,47\%$  ( $P < 0,05$ ). Многие тучные клетки располагаются субэпителиально, единичные проникают в эпителий ворсинок или крипт и дегранулируют. При дегрануляции тучных клеток гранулы, вышедшие во внеклеточное пространство, приобретают различную оптическую плотность, теряют свое содержимое, просветляются, часть из них становится пустыми.

Под воздействием пробиотика происходят определенные изменения параметров ворсинок, что в итоге сказывается на пищеварительных процессах. Установлен достоверный факт увеличения длины ворсинок двенадцатиперстной кишки у крыс на 45-й день проведения исследований – на 24,2 % ( $P < 0,05$ ) по отношению к контролю. Аналогичные изменения характерны для тощей кишки, где длина ворсинок была выше по отношению к контролю на 17,9 % ( $P < 0,05$ ). Реакция капилляров на введение препарата выражалась в значительном увеличении их просвета на 39,2–49,7 % ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ) по отношению к контролю.

Отчетливо выявляется усложнение композиции микроциркуляторного русла и увеличение протяженности сосудов. Среднее расстояние между продольными капиллярами в опытной группе животных уменьшается до  $22,58 \pm 1,23$  мкм, в контроле –  $28,91 \pm 1,56$  мкм, что превышает контрольные данные на 28,0 % ( $P < 0,05$ ). Одновременно происходит увеличение плотности капилляров на  $1 \text{ мм}^2$ , где этот показатель в опыте составляет  $175,46 \pm 10,12$ , в контроле –  $108,02 \pm 8,33$  мкм.

Метаболические перестройки в сосудистом русле тонкого кишечника крыс индуцируют неоваскулогенез, о чем свидетельствует появление «почек роста» и изменение плотности расположения капилляров в органе. Изменение площади капиллярной поверхности и диффузионных расстояний роста кровотока приводит к более быстрому «вымыванию» из ворсинок адсорбирующих веществ. Количество микроворсинок в расчете на один энтероцит в контроле составляло  $103,41 \pm 3,13$  –  $107,20 \pm 3,18$ , в опыте –  $25,20 \pm 3,47$  –  $144,41 \pm 5,76$ . В контрольной группе животных расстояние между соседними микроворсинками достигало в среднем на 2,04–2,17 нм. У животных опытной группы гликокаликсный слой достигал толщины над апикальной частью микроворсинок 20–35 нм, в контроле – 10–25 нм. Под влиянием препарата наблюдается активизация в формировании лимфатических фолликулов с четко выраженными светлыми центрами. Содержание фолликулов со светлыми центрами в опыте увеличивается в среднем на 6,7–11,4 % ( $P < 0,05$ ). При анализе светлых центров мы обнаруживали плазмоциты на разных стадиях развития. Клетки локализовались главным образом в центральных отделах светлых центров. Активизация лимфо- и кровотока в лимфатическом узле сопровождается лучшим развитием трабекул и капсулы, расширением синусов и увеличением площади мозгового вещества. Об усилении лимфоцитопозитической и иммунопозитической функции свидетельствует увеличение площади коркового вещества, интенсивное развитие фолликулов, светлых центров, увеличение числа бластных форм и плазмоцитов.

### **Выводы**

1. Под влиянием препарата «Билавет-С» активизируются метаболические процессы,

постнатальны ангиогенез посредством появления почек роста, происходит изменение плотности расположения капилляров, увеличивается разветвленность артериол, что приводит к более интенсивному формированию капиллярного ложа в тонком кишечнике крыс.

2. При введении пробиотика отмечается умеренная локальная реактивность лимфоидной системы, что сопровождается увеличением содержания лимфоцитов и плазмочитов в брыжеечных лимфатических узлах.

3. Использование пробиотического препарата «Билавет-С» повышает компенсаторные и адаптационные возможности пищеварительной системы в постнатальном онтогенезе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ивановский, А.А.* Новый пробиотик бактоцеллолакт при различных патологиях у животных / А.А. Ивановский // Ветеринария. – 1996. – № 11. – С. 34–35.
2. *Исаева, Н.П.* Механизмы воздействия пробиотиков на функциональное состояние лимфоцитов при остром шигеллезе / Н.П. Исаева, М.З. Шахмарданов, Л.Н. Земскова // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1994. – № 6. – С. 107–108.
3. *Изачик, Ю.А.* Дисбактериоз кишечника / Ю.А. Изачик, А.А. Корсунский // Медицинская помощь. – 1993. – № 2. – С. 58–60.
4. *Bansal, S.* Probiotics in healthy and diseases / S. Bansal // J. Assoc. physicians. – 2001. – № 7. – P. 735–741.
5. *Abu-Taraboush, H.M.* Growth, viability, and proteolytic activity of bifidobacteria in whole camel milk / H.M. Abu-Taraboush, M.M. Al-Dagal // J. Dairy Sci. – 1998. – Vol. 81, № 2. – P. 354–361.
6. *Карпуть, И.М.* Иммуная реактивность и болезни телят / И.М. Карпуть, С.Л. Борознов. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 289 с.
7. *Красочко, П.А.* Этиотропная терапия респираторных заболеваний телят с использованием пробиотиков / П.А. Красочко, И.А. Красочко, Ю.В. Санжаровская // Животноводство и ветеринария. – 2011. – № 2. – С. 15–19.
8. *Платонов, А.В.* Производство препаратов для животноводства на основе микроорганизмов – симбионтов желудочно-кишечного тракта / А.В. Платонов. – М. : ВНИИСЭНТИ, 1985. – 44 с.
9. *Armuzzi, A.* Supplementation on antibiotic-associated gas trointestinal side effects during helicobacter pylori eradication therapy: a pilot study / A. Armuzzi // Digestion. – 2001. – Vol. 63. – P. 1–7.
10. *Каримов, М.М.* Пробиотики как компонент эрадикационной терапии язвенной болезни / М.М. Каримов, А.А. Якубов, З.З. Саатов // Гастроэнтерология. – 2011. – № 4. – С. 13–15.
11. *Карпуть, И.М.* Бактериальные препараты в профилактике желудочно-кишечных болезней и гиповитаминозов / И.М. Карпуть, И.З. Севрюк, М.П. Бабина // Проблемы микробиологии и биотехнологии : материалы Междунар. конф., Минск, 25–27 нояб. 1998 г. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии. – Минск, 1998. – С. 173–174.
12. *Королюк, А.М.* Конструирование новых препаратов и лечебных продуктов для направленной коррекции микробиологического статуса организма / А.М. Королюк // Инфектология, достижения и перспективы : сб. науч. тр. – СПб., 1996. – С. 125.
13. *Кругликов, В.Д.* Возможность приживления *Lactobacillus acidophilus* в кишечнике белых мышей на фоне бактериальной терапии / В.Д. Кругликов, Р.И. Цураева, И.В. Рыжков // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1997. – № 1. – С. 67–69.
14. *Кудрявцев, В.А.* Влияние живых культур *Bacillus subtilis* на неспецифическую резистентность организма / В.А. Кудрявцев, Л.А. Сафронова, А.И. Осадчая // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1996. – № 2. – С. 46–55.
15. *Лукьянов, Е.М.* Некоторые замечания относительно тактики использования пробиотиков в неонатологии и педиатрии / Е.М. Лукьянов // Современная педиатрия. – 2005. – № 5 (8). – С. 230–240.
16. *Мазанкова, Л.Н.* Перспективы применения споровых пробиотиков при заболеваниях желудочно-кишечного тракта у детей / Л.Н. Мазанкова, И.С. Курохтина // Педиатрия. – 2002. – № 4. – С. 56–61.
17. *Axelsson, L.* *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora / L. Axelsson // Microb. Ecol. Health and Disease. – 1989. – Vol. 2, № 2. – P. 466–468.
18. *Barrow, P.* Probiotics “The scientific basis” / P. Barrow // Ed. by R. Fuller. First edition 1992. Published by Chapman and Hall. 2–6 Boundary Row. – London, 1980. – P. 225–257.

Поступила в редакцию 28.02.14.

This article discusses morphohistochemical, immunological and submicroscopic changes in the digestive system and lymph nodes of white male rats when introduction the probiotic preparation “Bilavet-C”. The increase of lymphocytes in the lamina propria of mucous tunic of jejunum, the length of villi, and the complexity of microvasculature by increasing the length and density of blood vessels is established. Under the influence of the drug the activation in the formation of lymph follicles with distinct light centers, and that is evidence of an increase of lymphocytopoetic and immunopoetic functions in animals’ organism under the influence of probiotic.

**Keywords:** probiotic, “Bilavet-C”, digestive system, lymph node, rat, plazmotsit, capillary, lymphocyte, villus, glycolaxil, microvilli, enterocyte.