DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-10.20>

**ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА ПРИ ЛЕЧЕНИИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТАФИЛОКОККОЗА ФЛОРОНОМ В КОМПЛЕКСЕ
С ЭКСТРАКТОМ КОРНЯ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ**
HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THYMUS IN TREATMENT
OF EXPERIMENTAL STAFILOKOKKOSIS USING COMBINATION OF PHLORONE AND
ROOT EXTRACT OF ECHINACEA PURPUREA

Пименов Н.В.*, профессор РАН
Pimenov N.V., Professor of the Russian Academy of Sciences
**ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии – МВА имени К.И.Скрябина», Москва, Россия**
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State
Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin»,
Moscow, Russia

Павлова А.В., ассистент
Pavlova A.V., Assistant
Луганский национальный аграрный университет, Луганск
Lugansk National Agrarian University, Lugansk

Жигалова Е.Е., кандидат ветеринарных наук
Харьковская государственная зооветеринарная академия, Харьков, Украина
Zhigalova E.E., Candidate of Veterinary Sciences
Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkov, Ukraine

*E-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Применение препарата эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*) одновременно с флорфениколом показало на морфологическом уровне положительный результат с проявлением иммунопротекторного эффекта. Подтверждением положительной динамики является полноценный морфогенез тимусных телец в оба исследованных периода эксперимента, а также отсутствие признаков акцидентальной инволюции, имевших максимальное проявление в тимусе цыплят второй группы.

ABSTRACT

Application of Echinacea purpurea preparation both with Florfenicol resulted positively on the morphological level with immunoprotective effect. Positive dynamics is acknowledged by full morphogenesis of thymus bodies during both studied experiment periods and absence of accidental involution signs that manifest at maximum in chickens' thymuses of the second group.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Флорон, стафилококкоз, эхинацея, цыплята-бройлеры, тимус.

KEY WORDS

Phlorone, staphylococcus infection, echinacea, broiler-chickens, thymus.

Развитие бройлерного птицеводства по пути интенсификации скорости роста птицы привело к снижению общей резистентности популяции. На этом фоне, при высокой плотности посадки птицы, повышается риск возникновения инфекционных заболеваний, вызываемых ассоциациями условно-патогенных микроорганизмов, среди которых наиболее часто присутствуют стафилококки [2,4]. Проблемой является

высокая изменчивость этих микроорганизмов и развитие антибиотикорезистентности [5]. Для профилактики инфекционных заболеваний смешанной этиологии предпочтение отдают антибиотикам широкого спектра действия. Флорфеникол появился на рынке ветеринарных препаратов, как альтернатива хлорамфениколу, имеющему эффекты высокой токсичности и иммунодепрессии. Многочисленными исследованиями показано, что при более низкой токсичности, флорфеникол сохраняет иммунодепрессивные свойства [1]. При этом высокие бактериостатические свойства определяют приоритет в выборе флорфеникола в стационарно неблагополучных хозяйствах [11,12].

Турицина Е.Г. [9] и другие [6,8] показали, что высокая антигенная нагрузка, формирующаяся в условиях принятой в промышленном птицеводстве массовой системы вакцинаций, приводит к возникновению иммунодефицитных состояний у птицы с угнетением лимфопозза в центральных органах иммунной системы и снижением иммунореактивности организма цыплят в целом.

Для решения практических задач птицеводства, обусловленных сочетанием вакцинаций и антибиотикопрофилактики с первых дней жизни цыплят, актуальным является с одной стороны – выяснение влияния конкретных антибиотиков на органы иммуногенеза в полевых условиях, с другой – поиск способов снижения их иммунодепрессивного действия. При этом важно минимизировать химиотерапевтическую нагрузку на организм цыпленка, а также себестоимость препаратов. В этой связи представляют интерес иммуномодулирующие препараты растительного происхождения, среди которых рассматривается и эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea*). Несмотря на то, что молекулярные механизмы действия изучены недостаточно, эффективность применения иммуномодуляторов растительного происхождения показана многими авторами (Г.А. Бобылева, 2014; В.А Бакулин, 2006; В.Н. Самородов, 2007; В.С. Поспелов, 2009; В.С. Калашник, 2003) [3, 7, 8, 10].

В практическом аспекте оценка иммунной системы основывается на морфологии иммунокомпетентных органов [1]. Гистологические исследования тимуса в научной литературе приводятся наиболее часто в возрастном аспекте или как аргумент в оценке иммунотропного влияния определенных факторов на организм. В настоящей работе представлены результаты морфологических исследований тимуса цыплят-бройлеров в условиях экспериментального стафилококкоза с применением антибактериального препарата Флорон (действующее вещество – флорфеникол, производное тиамфеникола) и препарата корня эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*).

Целью настоящей работы явилось изучить морфологические изменения в тимусе цыплят-бройлеров при использовании препарата Флорон для лечения экспериментального стафилококкоза, а также определения эффективности применения иммуномодулирующего препарата на основе эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении исследований были отобраны 240 суточных здоровых цыплят-бройлеров кросса Ross 308, которых по принципу аналогов разделили на 3 группы: 1 группа – контрольная, 2 и 3 группы – опытные, по 80 голов в каждой. Всех цыплят в возрасте 4-х суток инфицировали патогенной коагулазоположительной культурой *S. aureus*, которая была изолирована от больной птицы во время вспышки стафилококкоза на одной из птицефабрик в Луганской области. Культуру вводили внутримышечно в дозе 750 тыс. мкр. кл.

Опыты проводили по следующей схеме. Цыплятам контрольной группы не проводили антибиотикотерапию, Цыплятам опытной группы 2 при появлении первых признаков заболевания (3 сутки эксперимента) выпаивали с питьевой водой препарат флорон, к которому была установлена высокая чувствительность возбудителя болезни, в дозе 1 мл/л воды 10 %-ного раствора в течение 5 суток. Цыплятам опытной

группы 3 одновременно с антибиотиком выпаивали экстракт корня эхинацеи пурпурной. Проводили клинические наблюдения и патологоанатомическое вскрытие павшей птицы. На 14-е и 21-е сутки эксперимента в каждой группе выводили из опыта по 3 головы для гистологических исследований. Материал (дольки тимуса, бурсу Фабрициуса и селезенку) фиксировали в 10 %-ном водном растворе формалина. Гистопрепараты изготавливали по общепринятой методике с заливкой материала в парафин. Гистосрезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также азур II-эозином.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При микроскопическом исследовании тимуса цыплят 1 группы установлено, что в структуре долек тимуса хорошо выражены корковое и мозговое вещество. В оба исследуемые периода (14 и 21 сутки) выявляли нарушения гемодинамики, проявляющиеся наличием полнокровных сосудов преимущественно венозной части внутриорганных русел в виде гемостаза и тромбоза, более выраженных на 21-е сутки опыта (рис. 1, 2). На 14-е сутки опыта в некоторых долях тимуса имеют место множественные петехиальные кровоизлияния с локализацией преимущественно в медуллярной и медуло-кортикальной зонах. В корковом веществе наблюдается только диапедез эритроцитов (рис. 1А).

Рисунок 1 – Тимус цыплят 1-й группы: А – 14 сутки и Б – 21 сутки эксперимента. Гистопрепарат (азур II и эозин, $\times 40$). Обозначения: 1 – корковое вещество; 2 – мозговое вещество. Диапедезные кровоизлияния показаны одинарной стрелкой, подкапсулярная зона коркового вещества – двойной стрелкой

На препаратах тимуса цыплят, полученных на 21-е сутки эксперимента, в тромбах обнаруживали кристаллы гематоидина (рис. 2). Артериальная часть сосудистого русла выглядит запустевшей. Иногда в артериях отмечается пристеночная агрегация форменных элементов крови. Периваскулярные пространства сосудов микроциркуляторного русла коркового вещества долек расширены, в них определяются лимфоциты и макрофаги.

На 21-е сутки после заражения цыплят культурой *Staphylococcus aureus* площадь долек тимуса увеличивается. При микроскопическом исследовании установлено, что в

корковом веществе пролиферативная зона не выражена, лимфоциты расположены неравномерно, образуя просветы, в которых просматриваются эпителио-ретикулярные клетки. Это придаёт корковому веществу «дырчатый» вид и указывает на количественное уменьшение популяции кортикальных тимоцитов (рис. 3).

В мозговом веществе долек тимусные тельца и крупные комплексы гипертрофированных эпителиоретикулярных клеток подвергаются деструктивным изменениям с участием эозинофильных лейкоцитов и образованием кистозных полостей, содержащих клеточный детрит. В составе детрита наряду с эозинофилами содержится большое количество фагоцитированных тимоцитов (рис. 4). Дегенеративным изменениям подвергаются не только молодые многоклеточные тимусные тельца, но и одноклеточные, окруженные эозинофилами. Большинство многоклеточных тимусных телец содержат кистозные полости с расположенными в них лимфоцитами и эозинофильными лейкоцитами (рис. 5).

При гистологическом исследовании тимуса цыплят 2-й группы на фоне клинического применения флорона для лечения стафилококкоза были получены следующие результаты.

Тимусы цыплят в оба исследуемых периода: на 14-е и 21-е сутки эксперимента характеризуются уменьшением размеров долек с признаками их фрагментации – появляются глубокие вырезки со стороны капсулы органа. К 21-м суткам отмечается замещение междольковой рыхлой соединительной ткани на жировую ткань, которая проникает в формирующиеся вырезки (рис. 6 А).

Рисунок 2 – Тимус цыплёнка 1-й группы, 21 сутки эксперимента. Гистопрепарат (азур II и эозин, $\times 40$). Обозначения: 1 – корковое вещество; 2 – мозговое вещество; 3 – тромбоз вены в кортико-медулярной зоне

В некоторых дольках имеет место замещение лимфоидной ткани на жировую (рис. 6 Б). Такая экспансия жировой ткани наряду с уменьшением площади долек тимуса является одним из ведущих признаков его акцидентальной трансформации.

Кровоизлияния на площади срезов долек отсутствуют. Кровенаполненность внутриорганных сосудов в тимусе цыплят на 14-е сутки опыта умеренная и уменьшается к 21-м суткам. В последнем периоде в тимусе обнаруживаются как запустевшие, так и закрытые мелкие артерии и артериолы (рис. 7), что может быть показателем повышенной вазоконстрикции.

Рисунок 3 – Тимус цыплёнка 1-й группы. 21 сутки эксперимента. Кортиковое вещество. Гистопрепарат (гематоксилин и еозин, $\times 100$). «Дырчатые» просветления в корковом веществе показаны стрелками

Рисунок 4 – Тимус цыплёнка 1-й группы. 21 сутки эксперимента. Мозговое вещество. Гистопрепарат (гематоксилин и еозин, $\times 350$). Обозначения: 1 – клеточный детрит, 2 – гипертрофированные эпителиоретикулярные клетки с формирующейся кистозной полостью, 3 – эозинофильные лейкоциты, 4 – гиалиноподобное вещество

Рисунок 5 – Тимус цыплёнка 1-й группы 21 сутки эксперимента. Мозговое вещество. Гистопрепарат (азур II и эозин, $\times 350$). Обозначения: 1 – тимусные тельца одно- и многоклеточные, 2 – эозинофилы

Рисунок 6 – Тимус цыплёнка 2-й группы, 21 сутки эксперимента. Гистопрепарат (гематоксилин и эозин). Обозначения: А ($\times 40$): 1 – корковое вещество; 2 – мозговое вещество; 3 – жировая ткань, Б ($\times 350$): замещение лимфоидной ткани долек жировыми клетками – показаны стрелками

Рисунок 7 – Тимус цыплёнка 2-й группы, 21 сутки эксперимента. Гистопрепарат (гематоксилин и эозин, *350). Обозначения: закрытая артериола в мозговом веществе долики – показана стрелкой

В венозной части микроциркуляторного русла отмечается развитие сладж-феномена и сепарации форменных элементов крови, что на гистопрепаратах выявляется наличием сосудов, заполненных только плазмой, или агрегированными форменными элементами крови. Характерной особенностью венозных сосудов, заполненных плазмой крови, является множество пристеночных везикул, а в артериях – увеличение складчатости интимы и преобладание вертикального расположения ядер эндотелиоцитов.

В мозговом веществе долек тимуса цыплят второй группы на 14 сутки эксперимента в расширенных периваскулярных пространствах выявляли увеличение количества коллагеновых волокон, благодаря чему архитектура сосудов хорошо визуализировалась. Проницаемость стенки сосудов уменьшалась, что подтверждается отсутствием, как геморрагий, так и плазморрагий. При этом в мозговом веществе долек тимуса обнаруживаются капли гиалиноподобного вещества, указывающие на уплотнение белков более раннего транссудата, образовавшегося до начала применения антибиотика. В тимусных тельцах на всех стадиях их развития отмечаются дегенеративные изменения (рис. 8).

В долях тимуса отмечается уменьшение плотности тимоцитов как в корковом, так и мозговом веществе. На препаратах тимуса на 21-е сутки эксперимента уменьшается ширина коркового вещества с признаками делимфотизации путем апоптоза. Наиболее выражен процесс обеднения лимфоцитами в мозговом веществе, где в большом количестве обнаруживаются большие лимфоциты и макрофаги. Характерной особенностью мозгового вещества тимуса является набухание эпителиоретикулярных клеток и почти полное отсутствие тимусных телец. Цитоплазма набухших эпителиоретикулярных клеток плохо прокрашивается эозином.

При гистологических исследованиях тимуса цыплят 3-й группы (стафилококкоз + антибиотик + экстракт эхинацеи пурпурной) было определено, что применение препарата эхинацеи пурпурной на фоне антибиотикотерапии показало положительное воздействие на иммунопозитивную функцию тимуса.

У цыплят 3-й группы в оба изучаемых периода практически не проявляются признаки акцидентальной инволюции, а к 21-м суткам эксперимента отмечено даже увеличение долек тимуса (рис. 10).

Рисунок 8 – Тимус цыплёнка 2-й группы, 14 сутки эксперимента.
Гистопрепарат (азур II и эозин, $\times 350$). Обозначения: 1 – кистозоподобные полости в дегенерирующих тимусных тельцах, 2 – эозинофилы, 3 – остаток кератинового ядра тимусного тельца

Рисунок 9 – Тимус цыплёнка. II группы, А – 14-сут. и Б – 21-сут. эксперимента.
Гистопрепарат (гематоксилин и еозин $\times 100$). Обозначения: 1 – корковое вещество; 2 – мозговое вещество; 3 – кистозноподобные полости, 4 – гипертрофированные эпителиоретикулярные клетки.

Рисунок 10 – Тимус цыплёнка. 3 группа. А – 14 сутки и Б – 21 сутки эксперимента. Гистопрепарат (гематоксилин и эозин $\times 100$). Обозначения: 1 – корковое вещество; 2 – мозговое вещество; 3 – пролиферативная зона коркового вещества долек; 4 – кистозноподобные полости

Рисунок 11 – Тимус цыплёнка 3 группа, 14 сутки эксперимента. Гистопрепарат (А – гематоксилин и эозин, $\times 100$; Б – азур II и эозин, $\times 40$). Обозначения: 1 – корковое вещество; 2 – мозговое вещество; 3 – капли гиалиноподобного вещества, 4 – диапедез эритроцитов

Рисунок 12 – Тимус цыплёнка. Мозговое вещество. 3-я группа, А – 14 сутки и Б – 21 сутки эксперимента. Гистопрепарат (гематоксилин и эозин, А – $\times 100$, Б – $\times 350$).
Обозначения: 1 – кистозноизменённое тимусное тельце; 2 – молодые тимусные тельца; 3 – зрелое тимусное тельце

Со стороны сосудистой системы имеют место гемодинамические расстройства, обусловленные воздействием как культуры *Staphylococcus aureus*, так и флорона, сходные с препаратами 2-й группы. При этом у цыплят 3-й группы проницаемость стенок капилляров снижена, что значительно уменьшает эффект трансудации. Кровоизлияния отсутствуют. Капли гиалиноподобного вещества, образовавшегося за счет трансудации в начальной стадии заболевания, присутствуют в мозговом веществе долек в значительно меньшем количестве по сравнению с аналогичными препаратами, полученными из второй группы. Диапедез эритроцитов в корковом веществе долек обнаруживается значительно реже (рис 1).

Насыщенность лимфоцитами коркового и мозгового вещества долек тимуса как на 14-е, так и на 21-е сутки опыта, заметно выше по сравнению с препаратами тимуса цыплят 2 группы. В корковом веществе отсутствуют дырчатые просветления и признаки массового апоптоза тимоцитов. Зона пролиферации Т-лимфобластов просматривается на периферии коркового вещества долек в оба исследуемых периода и даже более отчетливо на 21-е сутки опыта.

В мозговом веществе тимуса цыплят 3 группы на 14-е сутки количество кистозноизменённых телец меньше, наряду с ними обнаруживаются и молодые тельца. На 21-е сутки опыта на фоне применения экстракта эхинацеи пурпурной в мозговом веществе долек тимуса присутствуют тельца на всех стадиях генеза. Обращает внимание наличие большого количества вновь образующихся одноклеточных телец (см. рис.12).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение антибиотика Флорон (флорфеникол), обладающего бактериостатическим действием, уменьшает эффекты патогенного действия *Staphylococcus aureus* на организм цыплят. Долгие годы считалось, что бактериостатические препараты влияют только на биосинтез белков бактериальными

клетками многоклеточных организмов в силу значительной разницы молекулярной массы их р-РНК (рибосомальной РНК) и клеток многоклеточных организмов, и не влияют на иммунную систему макроорганизма. Однако, при этом не учитывали рибосомы митохондрий, обеспечивающие синтез ферментов дыхательной цепи. В последние годы появились научные работы, показывающие что именно это звено оказывается подверженным действию антибиотиков с бактериостатическим эффектом, обуславливая митохондриальную дисфункцию и, как следствие, нарушение всех энергозависимых внутриклеточных систем и клеток в целом. Эндотелий сосудов также является одной из мишеней токсического действия *Staphylococcus aureus* на организм. В этих условиях нарушение энергетического обмена способно вызвать эндотелиальную дисфункцию, сопровождающуюся увеличением размеров эндотелиоцитов, усилением их секреторной активности, стимуляцией синтеза коллагена и вазоконстрикцией (вплоть до полного закрытия мелких артерий и артериол). Именно такие изменения мы наблюдали в тимусе цыплят на фоне действия патогенного *Staphylococcus aureus* и применения флорфеникола, что и стало, на наш взгляд, причиной гемодинамических расстройств и гипоксии в организме.

Вторым отрицательным эффектом применения этого антибиотика является его иммунодепрессивное влияние на органы кроветворения и иммуногенеза. Появляются всё новые данные о непосредственном влиянии на лимфопоэз, а именно на клональную дифференцировку Т-клеток в тимусе, как на стадии положительной (в корковом веществе), так и на стадии отрицательной (в мозговом веществе долек тимуса) селекции, что приводит к активации апоптоза. Данный эффект «опустошения» тимуса мы наблюдали на 21-е сутки эксперимента на фоне применения флорона. Исследованиями последнего десятилетия показана роль тимусных телец как важных элементов презентации аутоантигенов при отрицательной селекции аутореактивных Т-лимфоцитов в мозговом веществе тимуса. В этой связи наблюдаемое нами практически полное исчезновение тимусных телец в мозговом веществе на 21-е сутки даёт основание для ещё одного аспекта интерпретации результата – как показатель нарушения иммунологической толерантности.

ВЫВОДЫ

Острое септическое воспаление, вызванное *Staphylococcus aureus*, в тимусе проявляется нарушением гемодинамики, сопровождающееся возникновением обширных геморрагий, тромбозом внутриорганных сосудов. Инфекционный процесс оказывает стимулирующее влияние на иммунопоэтическую функцию тимуса, как одного из центральных органов иммунной системы.

Результаты гистологических исследований подтверждают иммуносупрессорное действие антибиотиков группы амфениколов, в том числе флорфеникола, на тимус, проявляющееся усилением апоптоза лимфоцитов и дегенеративными изменениями в тимусных тельцах на всех стадиях их развития.

Препарат корня эхинацеи положительно влияет на процессы дифференцировки тимоцитов, что проявляется на гистопрепаратах отсутствием признаков делимфотизации долек тимуса и нормальным морфогенезом тимусных телец.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Агеев А.К. Акцидентальная инволюция тимуса и ее значение в развитии приобретенных (вторичных) иммунодефицитных состояний // Физиология, патология и морфология тимуса: сб. науч. Тр. 1-го Моск. Мед. Ин-та. 1986. С.44-48.
2. Бобылева Г.А. Состояние птицеводческого комплекса России и перспективы его развития // Птица и птицепродукты. №3. 2014. 18-22 с.
3. Бочкарев В.Н. Иммуномодуляторы в совершенствовании методов профилактики и лечения ассоциированных болезней животных. Тез.докл.4-й межгос.конференции по

- научным и прикладным проблемам паразитологии, 21-23 октября 1993 г. Киев-Харьков-Луганск, 1993.-С. 19-20.
4. Василевич Ф.И., Пименов Н.В., Давыдова О.Е. Клинико-гельминтологическая характеристика соколообразных птиц вольерного содержания. / *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. – 2016, №6 (54). – Р. 58-69
 5. Данилевская Н.В., Пименов Н.В. Проблема антибиотикорезистентности на примере лечения сальмонеллеза у домашних голубей / *Российский ветеринарный журнал*. – М.: КолосС, 2005. – №4. – С. 21-24
 6. Джавадов Э. Д. Современные взгляды на вакцинопрофилактику в промышленном птицеводстве. Тезисы докладов междунар. Н-п конгресса «Актуальные проблемы ветеринарной медицины». 28-29 августа 2006 г. Санкт-Петербург, выставочный комплекс «Ленэкспо».- 2006.- С. 94-97.
 7. Кушнирук, Т.Н. Интенсивность роста, сохранность и гематологические показатели у птиц, потреблявших добавки эхинацеи к корму. - Т.Н. Кушнирук / Автор. дис. на соиск. ст.б.н.- Белгород.- 2008.- С.21.
 8. Пименов Н.В. Специфическая борьба с сальмонеллой в условиях птицеводства./*Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences: ISSUE*. – 2013, №11(23). – Р. 16-23
 9. Турицына Е.Г. Некоторые аспекты этиологии и патогенеза поствакцинальных осложнений у птиц // *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2010а. № 3. С. 86-92.
 10. Федоров Ю.Н. Иммунокоррекция: применение и механизм действия иммуномодулирующих препаратов // *Ветеринария*. 2005. № 2. С. 3-6.
 11. Bobos Stanko, Vidic Branra. Relation between hroduction of entero toxins and creation of coagulasa in stafilococcous. *Вет.мед. Межвід.темат.наук.зб.* № 85, Том 1.- Харків.- 2005.- С. 19-22.
 12. Hudson, Jim, Characterization of antiviral activities in Echinacea root preparations / Vimalanthan Selvarani, Kang Linda, Amiguet Treyvaud, Levesey John, Amason J. Thor. // *Pharm. Biol.* - 2005. - Vol. 43.- № 9. - С. 790-796.