

## Лечение и профилактика

УДК 619:616.995

DOI:

Поступила 26.03.2015

Принята 14.01.2016

### Для цитирования:

Красникова Е. В., Сивкова Т. Н., Шураков С. А. Кариопатическое действие биопрепарата *Bacillus subtilis* 12В на состояние сперматогенного эпителия животных при воздействии гельминтов. // Российский паразитологический журнал. – М., 2016. – Т.35. – Вып. 1. – С.

### For citation:

Krasnikova E. V., Sivkova T. N., Shurakov S. A. Caryopathic effect of bio-preparation *Bacillus subtilis* 12B on the status of spermatogenic epithelium of animals infected with helminths. Russian Journal of Parasitology, 2016, V.35, Iss.1, pp.

## КАРИОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОПРЕПАРАТА *BACILLUS SUBTILIS* 12В НА СОСТОЯНИЕ СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕЛЬМИНТОВ

Красникова Е. В.<sup>1</sup>, Сивкова Т. Н.<sup>1</sup>, Шураков С. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Пермская государственная сельскохозяйственная академия

им. академика Д. Н. Прянишникова

614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 23,

e-mail: viki-eva1002@rambler.ru, tatiana-sivkova@yandex.ru

<sup>2</sup> Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет

614990, г. Пермь, ул. Сибирская, 24

### Реферат

Цель исследования – изучение кариопатического действия биопрепарата *Bacillus subtilis* 12В на состояние сперматогенного эпителия белых мышей после однократного внутрибрюшинного введения экстракта *Fasciola hepatica*.

Материалы и методы. Исследования проводили на белых мышках самцах, которым перорально задавали биопрепарат споровит на основе *B. subtilis* 12В, а затем внутрибрюшинно вводили экстракт *F. hepatica* в дозе 100 мкг/гол. Мышам второй группы вводили белковый экстракт *F. hepatica*, а животным третьей группы – только споровит. Животные четвертой группы препарат не получали и служили контролем. Через 48 ч мышей убивали и из семенников готовили мазки-отпечатки, которые окрашивали по Романовскому и микроскопировали с определением митотического индекса и числа патологических форм мейоза. Проведен опыт на баранчиках, семенники которых помещали в 10%-ный раствор формалина и подвергали гистологическому исследованию. Срезы толщиной 2-3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизон и исследовали при увеличении микроскопа в 50, 400 и 1000 раз.

Результаты и обсуждение. При патоморфологическом и кариомитотическом исследовании семенников белых мышей и баранчиков после введения споровита на фоне внутрибрюшинного введения соматического экстракта *F. hepatica* не установлено снижения негативного воздействия на состояние сперматогенного эпителия семенников животных. При этом снижается митотический индекс в 2-3 раза, число патологий остается на высоком уровне. Число метафаз с преждевременным расхождением хромосом при одновременном действии экстракта *F. hepatica* и *B. subtilis* снизилось наполовину.

**Ключевые слова:** биопрепарат, *Bacillus subtilis*, *Fasciola hepatica*, белые мыши, баранчики, семенники, метафаза, хромосома.

### **Введение**

В настоящее время в схему терапии паразитарных болезней рекомендовано включение различных пробиотиков, направленных на заселение организма антагонистической микрофлорой. К одним из таких биопрепаратов относится споровит из активного штамма *Bacillus subtilis* 12В. Подтверждена высокая эффективность и экономическая целесообразность применения штаммов этих бактерий при инфекционных и инвазионных болезнях животных [1-3].

Однако, сведения о взаимном действии продуктов жизнедеятельности гельминтов и *B. subtilis* на клеточном уровне в отечественной зарубежной литературе отсутствуют.

В связи с широким распространением гельминтозов сельскохозяйственных животных целью нашего исследования было изучение кариопатического действия препарата споровит на половые клетки животных. Так как одним из наиболее опасных гельминтозов является фасциоз, то в качестве лабораторной модели были выбраны самцы белых мышей после однократного внутрибрюшинного введения экстракта *Fasciola hepatica*.

### **Материалы и методы**

Группе самцов белых мышей выпаивали споровит в терапевтической дозе в течение 10 сут и после этого внутрибрюшинно вводили экстракт *F. hepatica* в дозе 100 мкг/гол. Мышам второй группы вводили только белковый экстракт фасциолы, третьей – выпаивали только споровит. Четвертая контрольная группа животных оставалась интактной. Условия содержания лабораторных мышей сохранялись на всем протяжении эксперимента и соответствовали зоогигиеническим требованиям. Спустя 48 ч после введения экстракта животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. Из семенников готовили мазки-отпечатки, которые окрашивали по Романовскому и микроскопировали. Определяли митотический индекс (%) и подсчитывали число патологических фигур мейоза.

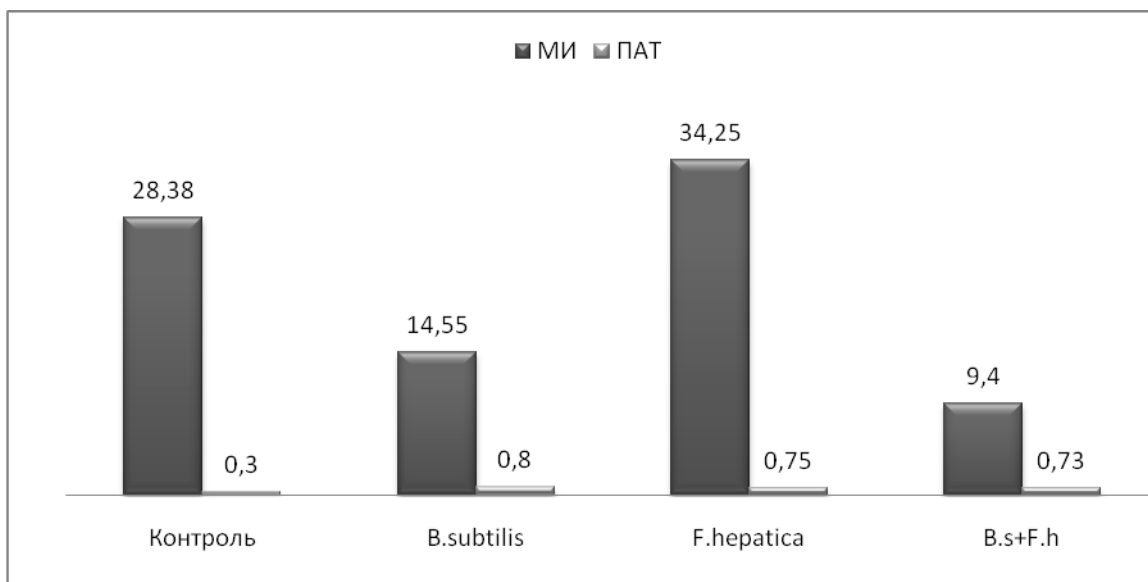
Исследования проводили также на баранчиках романовской породы в возрасте 4 мес., спонтанно инвазированных гельминтами. После десятидневного выпаивания споровита в терапевтической дозе баранчиков кастрировали открытым способом и собирали семенники для гистологического исследования.

Семенники баранчиков, а также лабораторных мышей, использовавшихся в предыдущих сериях опытов, помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина и подвергали стандартному гистологическому исследованию. Проводку тканей и органов по спиртам возрастающей крепости проводили на гистопроцессоре (Leica TP 1020) с автоматическим циклом проводки в течение 18 ч. После окончания проводки полученный материал заливали в парафиновую среду Гистомикс (особо чистый парафин с температурой плавления 56 °С) на заливочном аппарате (Thermo Scientific Histostar). С полученных парафиновых блоков готовили срезы толщиной 2-3 микрона на микротоме-полуавтомате с заданной толщиной среза.

Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизон. Окрашенные препараты исследовали на световом микроскопе с окуляром 10 при увеличении объектива 5, 40, 100. Наиболее интересные объекты фотографировали с использованием системы визуального анализа изображения при помощи цифровой видеокамеры.

### **Результаты и обсуждение**

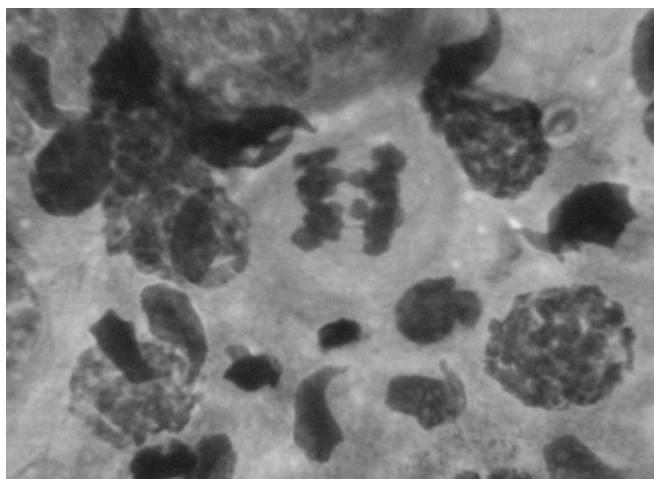
Общее состояние контрольных и опытных животных оставалось удовлетворительным в течение всего опыта. Результаты изменения активности деления клеток и числа патологий в семенниках мышей приведены на рисунке 1.



**Рис. 1.** Частота кариопатических последствий в семенниках мышей после введения экстракта *F. hepatica* и споровита

Под влиянием соматических белков *F. hepatica* происходит нарушение процесса деления сперматогенного эпителия с повышением митотического индекса через 48 ч по сравнению с контрольными данными. Число патологических фигур деления через 48 ч было в 2 раза выше контрольного значения. Среди патологий деления наиболее часто встречались преждевременное расхождение хромосом в метафазе и трехполусная анафаза.

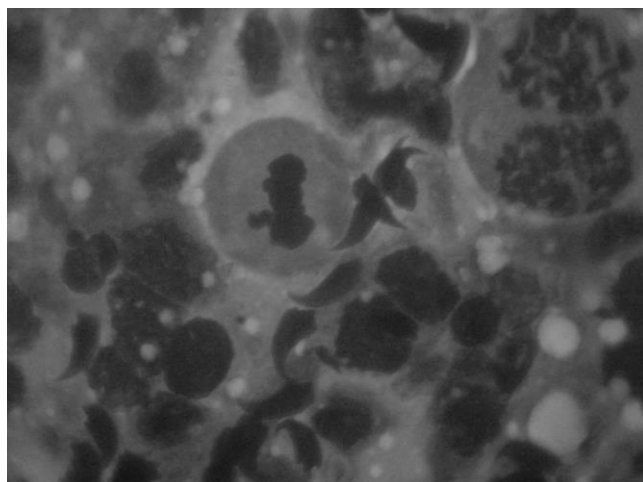
Десятидневное назначение биопрепарата несколько снизило митотический индекс в семенниках экспериментальных мышей, но число патологических форм деления оказалось примерно в два раза выше контрольного значения. Основная доля патологий проявилась в виде отставания отдельных хромосом в метафазе и анафазе, которые возникают при повреждении аппарата микротрубочек веретена деления. Число других патологий деления клеток не превышало обычного физиологического уровня.



**Рис. 2.** Семенник мыши. Анафаза с отставанием хромосом и хромосомным мостом (увел.10 ×100)

Особое внимание следует уделить обнаружению такого вида аномалий как агглютинация хромосом. При данной патологии происходят настолько выраженные повреждения хромосомной структуры, что хроматин теряет способность к нормальной спирализации, а вместо этого слипается в бесформенные массы, и дальнейшее деление клетки блокируется. Однако, число клеток с агглютинированными хромосомами было невелико.

Исходя из вышеуказанных наблюдений следует, что кариопатические свойства *B. subtilis* в отношении сперматогенного эпителия проявляются в незначительной степени. Сформировавшиеся вследствие патогенного воздействия неполноценные половые продукты не способны нормально функционировать и элиминируются из организма.



**Рис. 3.** Семенник мыши. Преждевременное расхождение хромосом (увел. 10 ×100)

Назначение споровита белым мышам в течение 10 сут перед введением экстракта в 3 раза снизило митотический индекс сперматогенного эпителия. Число патологий деления в опытной группе животных было в два раза выше, чем в контроле, и практически не отличалось от результатов, полученных от введения экстракта фасциол без выпаивания пробиотика. Число отдельных патологий, связанных с аномалиями аппарата деления, не выходило за рамки физиологических значений. Следовательно, возникшие изменения не носили строго определенного и направленного характера. Между тем, число метафаз с преждевременным расхождением хромосом при одновременном действии *F. hepatica* и *B. subtilis* снизилось наполовину по сравнению с моновоздействием экстракта трематоды, однако, оказалось выше, чем в случае влияния только биопрепарата споровит. Повреждения хромосом в виде агглютинации во всех случаях отсутствовали.

Отмечено появление клеток с наличием ядрышек, которые не регистрировали в мазках-отпечатках в предыдущих экспериментах. Появление ядрышек свидетельствует о том, что процесс деления клетки не блокировался, а цикл мейоза завершился с нарушением нуклеоморфологии.

Таким образом, можно предположить, что биологически активные вещества, выделяемые *B. subtilis* производственного пробиотического штамма, не обладая собственным высоким кариопатическим действием в отношении соматических и половых клеток лабораторных животных, не способны снижать уровень кариопатического влияния экстракта гельминта *F. hepatica*, т. е., не подтверждена целесообразность применения препарата споровит в комплексной терапии фасциолеза животных.

Сведений, касающихся патологий органов размножения у сельскохозяйственных животных при фасциолезе, практически нет. Так как кариопатическими исследованиями мы установили отрицательное действие экстракта фасциол на деление сперматогенного эпителия, возник вопрос об изменении морфологической структуры данного органа.

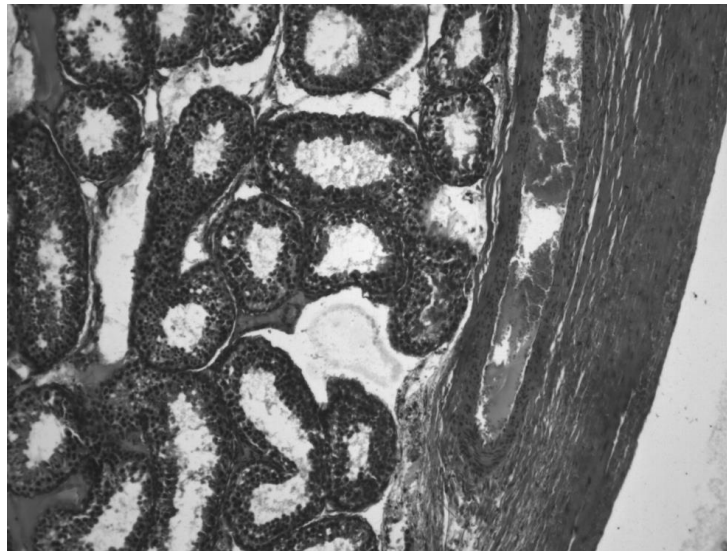
Гистологические исследования показали, что в семенниках лабораторных мышей после введения экстракта *F. hepatica* происходит отек стромы органа. Значительно снижается сперматогенез, в результате чего часть канальцев запустевает. В сохранивших активность канальцах спермии фрагментированы и находятся в состоянии агглютинации. Обнаруженные нами изменения свидетельствуют о значительном снижении репродуктивной функции экспериментальных животных.

Патоморфологические изменения наблюдали и в семенниках мышей после введения препарата *B. subtilis*. Нормальная ткань семенника прослеживалась на всем протяжении. Структура слоев сперматогенного эпителия была относительно сохранена, но не во всех канальцах. В клетках базального слоя различимы одиночные митозы. Сперматогенез прослеживался не во всех канальцах, был выражен неравномерно, местами ослаблен. Часто отмечали агглютинацию хвостовых частей сперматозоидов и наличие отдельно расположенных ядросодержащих и хвостовых частей. Одиночные канальцы были выстланы одним слоем уплощенных клеток, содержали в просветах группы сперматозоидов и одиночные дистрофированные клетки сперматогенного эпителия. В строме органа обнаруживали небольшие группы беспорядочно расположенных фибробластов.

Изменения в семенниках мышей регистрировали после одновременного воздействия экстракта *F. hepatica* и препарата *B. subtilis*. Наружная оболочка была утолщена, местами отслоена за счет отека. Несмотря на то, что нормальная ткань семенника прослеживалась во всех полях зрения, и структура слоев сперматогенного эпителия в части канальцев была относительно сохранена, часто отмечали агглютинацию хвостовых частей и фрагментацию сперматозоидов. В просветах некоторых канальцев из разрушенных половых продуктов формировались тонкие нити. Некоторые канальцы были выстланы одним слоем уплощенных клеток, содержали в просветах группы сперматозоидов и одиночные дистрофированные клетки сперматогенного эпителия. В строме были беспорядочно расположены небольшие группы фибробластов. Следовательно, воздействие биологически активных веществ *B. subtilis* и соматического экстракта *F. hepatica* приводит к развитию дистрофических и склеропластических процессов в органах репродуктивной системы, а также негативно сказывается на формировании половых продуктов.

Особый интерес вызвало изучение ткани семенников баранчиков после назначения споровита. Наружная оболочка значительно утолщена, представлена волокнистыми структурами с крупными полнокровными толстостенными артериальными кровеносными сосудами и тонкостенными полнокровными венами. Видны участки ангиоматоза. Структура слоев сперматогенного эпителия прослеживается четко. В клетках базального слоя различимы одиночные митозы. Клетки в состоянии дистрофии, очаговой десквамации (рис. 4).

Сперматогенез прослеживается не во всех канальцах, значительно ослаблен, местами отмечается агглютинация хвостовых частей сперматозоидов, наличие отдельно расположенных ядросодержащих и хвостовых частей в виде тонких эозинофильных нитевидных структур, эозинофильных масс сетчатого характера. Строма с выраженным отеком, частично склерозирована, содержит толстостенные одиночные сосуды слабого кровенаполнения. В придатке – распространенные склеропластические изменения, протоки расширены, местами значительно. В семявыводящих протоках содержимого нет. Выражены дистрофические изменения сперматогенного эпителия. Распространен периканаликулярный склероз на придатке с атрофическими изменениями эпителия семявыводящих протоков.



**Рис. 4.** Семенник баранчика. Дистрофия и очаговая десквамация эпителия. Кровеносный сосуд слабого наполнения (увел. 10 ×10)

### Заключение

Проведенные нами исследования подтверждают выраженное карипатическое действие экстракта фасциолы и культуры *B. subtilis* 12В на сперматогенный эпителий лабораторных и сельскохозяйственных животных, который проявляется в увеличении числа патологий деления клеток. На фоне экспериментального и спонтанного воздействия продуктов метаболизма гельминтов после перорального применения пробиотического препарата в семенниках происходят дистрофические и склеропластические процессы, что негативно сказывается на репродуктивной функции животных.

### Литература

1. Гаврильева Л. Ю. Коррекция энтеробиоценоза жеребят, зараженных кишечными нематодозами, пробиотиком «Сахабактисубтил» при дегельминтизации // *Вет. медицина*. - 2013. - № 2-3. - С. 65-68.
2. Непримерова Т. А., Сивкова Т. Н. Терапия гельминтозов экзотических животных // *Вет. клиника*. – 2012. - № 6 (121). – С. 15-16.
3. Тимошок Н. А., Чейпеш А. В., Агеев В. О. и др. Протективный эффект *Bacillus subtilis ssp. subtilis* 44-Р и *B. subtilis ssp. Subtilis* В3 при экспериментальной стафилококковой инфекции // *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*. – 2011. - №4. – С. 33-34.

### References

1. Gavril'eva L. Yu. Correction of enterobiasis of young horses with intestinal nematodiasis using the probiotic “Sakhabactisubtil” for dehelminthization. *Vet. medicina*. [Veterinary Medicine], 2013, no. 2-3, pp. 65-68. (in Russian)
2. Neprimerova T. A., Sivkova T. N. Treatment of helminthiasis in exotic animals. *Vet. klinika* [Veterinary Clinic], 2012, no. 6 (121), pp. 15-16. (in Russian)
3. Timoshok N. A., Cheypesh A. V., Ageev V. O. et al. Protective effect of *Bacillus subtilis ssp. subtilis* 44-P and *B. subtilis ssp. Subtilis* B3 against experimental staphylococcus infection. *Gastrojenterologiya Sankt-Peterburga* [Gastroenterology of Sankt-Petersburg], 2011, no 4, pp. 33-34. (in Russian)

**CARYOPATHIC EFFECT OF BIO-PREPARATION BACILLUS SUBTILIS 12B ON THE STATUS OF SPERMATOGENIC EPITHELIUM OF ANIMALS INFECTED WITH HELMINTHS**

**Krasnikova E. V.<sup>1</sup>, Sivkova T. N.<sup>1</sup>, Shurakov S. A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Perm State Agricultural Academy named after D.N. Pryanishnikov, 614990 Perm, 23

Petropavlovskaya St., e-mail: viki-eva1002@rambler.ru, tatiana-sivkova@yandex.ru

<sup>2</sup> Perm State Humanitarian Pedagogical University, 614990, Perm, 24 Sibiskaya St.

**Abstract**

**Objective of research:** to study the caryopathic effect of bio-preparation *Bacillus subtilis* 12B on the status of spermatogenic epithelium of white mice after a single intra-abdominal administration of the *Fasciola hepatica* extract.

**Materials and methods:** The investigations were conducted on white male mice after oral use of preparation Sporovite based on *B. subtilis* 12B; then the intra-abdominal injection of *F. hepatica* extracts at a dose of 100 mkg/head was applied. The protein extract from *F. hepatica* was administered to mice of the second group, and animals of the third group received only the probiotic Sporovite. Animals of the fourth group did not get the preparation and served as controls. 48 hours later the animals were killed; touch smears obtained from testis were stained by the Romanovsky method and examined under a microscope what enables to determine the mitotic index and the number of pathological meiosis forms. The experiments were conducted on lambs whose seminal vesicles were placed into a solution of 10% Formalin and examined histologically. 2-3 $\mu$ -thick slices were stained with Haematoxylin and Eosin by Van Gieson method and examined under a microscope at 50, 400 and 1000 x magnifications.

**Results and discussion:** During the pathomorphological and caryomitotic studies of testis of white mice and lambs after administration of Sporovite on the background of intra-abdominal injection of *F. hepatica* extract the reduction of negative effects on the status of spermatogenic epithelium of testis in animals wasn't observed. A decrease in mitotic index by 2-3 times and a high amount of pathological forms were registered. The number of metaphases with preterm chromosome disjunction under the joint effect of *F. hepatica* and *B. subtilis* extracts has decreased by half.

**Keywords:** bio-preparation, *Bacillus subtilis*, *Fasciola hepatica*, white mice, lambs, testis, metaphase, chromosome.

© 2015 The Author(s). Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI)[http://elibrary.ru/projects/citation/cit\\_index.asp](http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp)) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org / Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)