

ло повышение степени конверсии углеводов в лизин. Максимальный выход лизина был достигнут при использовании комплекса гидролитических ферментов.

### Литература

1. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И. Использование вторичных сырьевых ресурсов при получении кормового лизина: сб. материалов всеросс. конф. «Научно-практические аспекты экологизации продукции питания». - Углич, РАСХН. 2008. – С.226-228.

2. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И. Микробная конверсия растительного сырья и вторичных сырьевых ресурсов АПК в высокоэффективный лизино-белковый препарат// Хранение и переработка сельхозсырья. – 2008. - № 12. – С 48-51.

## ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ НА ВВЕДЕНИЕ ВАКЦИН С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ХИТОЗАНА

<sup>1</sup> П.А.Красочко, <sup>1</sup> И.А.Красочко, <sup>2</sup> О.В.Высокоморная,  
<sup>3</sup> В.И.Еремец, <sup>3</sup> А.И.Албулов, <sup>3</sup> Н.К.Еремец

<sup>1</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,  
Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, РБ;

<sup>3</sup>Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт  
биологической промышленности, Щелково, Московской обл.  
e-mail: krasochko@mail.ru

**Введение.** Специфическая профилактика инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных – одна из наиболее эффективных мер борьбы с ними. При конструировании противовирусных и антибактериальных вакцин вопрос использования эффективных адъювантов до настоящего времени остается открытым [3].

В последние годы исследователями различных стран проводятся исследования по использованию хитозана при конструировании вакцин. При этом хитозан используется как в качестве сорбента антигена, так и в качестве стимулятора поствакцинального иммунного ответа [3].

Известно, что хитозан обладает антибактериальными свойствами в отношении многих микроорганизмов – бактерий, вирусов, грибов (в том числе патогенных), а так же некоторых штаммов дрожжей [4,16,17], что в сочетании с высокой сорбционной емкостью и низкой токсичностью полимера для организма животных и человека служит основанием для его использования при разработке лечебно-профилактических и дезинфицирующих препаратов. Противомикробный эффект олигомеров хитозана связан со способностью влиять на механизм репродукции. Кроме собственно антибактериального действия, хитозан повышает чувствительность к антибиотикам некоторых устойчивых к ним микроорганизмов [1,4,18]. Показано, что наибольшей антимикробной активностью обладает низкомолекулярный хитозан, причем хитозан с высокой степенью деацетилирования (СД) наиболее эффективен [4,13].

Хитин - органическое вещество, полисахарид, состоящий из остатков 2-ацетамида-2-дезоксид-Д-глюкозы (N-ацетилглюкозамина), связанных  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-гликозидными связями. Причем каждый из остатков повернут на 180° по отношению к предыдущему.

Молекула хитина построена аналогично молекуле целлюлозы, но отличается от нее тем, что гидроксильные группы у вторых углеродных атомов замещены в молекуле хитина аминоацетильными группами.

Хитин - твердый продукт, под кварцевой лампой дает голубую флуоресценцию, нерастворим в воде, в разбавленных кислотах, концентрированных щелочах. Растворим в безводной муравьиной и 78,4-97,2%-фосфорной кислотах, концентрированных растворах солей (LiCNS, CaCl<sub>2</sub> и др.). При действии соляной, серной, и азотной кислот разрушается. При взаимодействии хитина с концентрированными щелочами при высокой температуре происходит его деацетилирование с превращением в хитозан.

Хитозан - желтоватая аморфная масса, нерастворим в воде, щелочах; растворим в разбавленных неорганических кислотах. Из этих растворов осаждается щелочью [12].

Одним из основных компонентов противовоспалительного и общеукрепляющего действия препаратов является его антиоксидантная активность. При исследовании процессов свободнорадикального повреждения гемоглобина было установлено, что хитозан способен улавливать активные формы кислорода, то есть выполнять роль антиоксиданта широкого спектра действия [15]

При исследовании влияния хитозана на фаговые инфекции установлено, что репродукцию колифагов эффективнее подавлял более высокомолекулярный хитозан. Короткие олигомеры оказались существенно активнее при подавлении размножения фага в культуре бацилл [2]. Хитозан, внесенный в суспензию фага, снижает его титр, нейтрализуя его инфекционность, причем уровень инактивации зависит от химической формы хитозана, его концентрации, вида бактериофага. С увеличением количества аминогрупп в молекуле хитозана инактивирующая способность его усиливается. Следовательно, для расширения спектра положительного действия необходимо использовать хитозан полифракционного состава с максимально возможной СД.

Эти выводы подтверждаются также данными исследования чувствительности микроорганизмов, выделенных из биопрепаратов слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки больных язвенной болезнью [14]. В этой работе показано, что за исключением *Candida tropicalis* все микроорганизмы, включая и *Helicobacter pylori*, оказались чувствительными к 1%-ному раствору хитозана в 0,25%-ной водной соляной кислоте, а чувствительность находилась в прямой зависимости от молекулярной массы (мм) и величины СД [5-12].

Целью исследования было изучение реакции тканей у лабораторных животных при введении вакцины, адьювантом в которой служили различные формы хитозана.

**Материалы и методы.** В качестве тест-объекта использовали инактивированные теотропином штаммы вируса ИРТ - КМИЭВ 7 (титр вируса 7,0 lg ТЦД 50/мл) и *Proteus mirabilis* - КМИЭВ 44 (концентрация 2,0 млрд. микробных тел в 1 мл). Для изучения влияния вакцины на ткань использовали следующие адьюванты: хитозан высокомолекулярный, хитозан низкомолекулярный.

Для изучения тканевой реакции после вакцинации использовали 32 белых крысы, которых разделили на 5 групп по 4 головы в группе и обработали вирусно-бактериальной вакциной (ИРТ + *Proteus Mirabilis*) с различными адьювантами. Крысам первой опытной группы вводили внутримышечно по 1,0 мл вирусно-бактериальной вакцины с адьювантом - хитозан высокомолекулярный 0,25%; второй группы – с хитозан высокомолекулярный 0,5%; третьей группы – хитозан низкомолекулярный 0,25%; животным четвертой - опытной группы – хитозан низкомолекулярный 0,5%; пятая группа – контрольная.

Отбор тканей для гистологического исследования осуществлялся на 3 и 7 день после введения вакцины. Для фиксации материала использовался 10% нейтральный формалин.

Обработка фиксированных тканей осуществлялась по следующей методике.

1. После фиксации тканей в формалине осуществляли промывку в проточной воде. Кусочки тканей (размер 1x1x0,5) оборачивали в марлю, которую крепили к краю сосуда. На водопроводный кран надевали резиновую трубку, конец которой опускали в сосуд с образцами тканей. Промывку осуществляли в течении 24 часов.

2. После промывки образцы тканей проходили обезвоживание с использованием ацетона и уайт-спирита.

3. Для получения тонких гистологических срезов фиксированный и промытый материал заливали в плотную среду, предварительно пропитав ею кусочки тканей. В данном случае использовался парафин.

Для изготовления срезов использовали микротом, затем полученные срезы снимали с ножа и переносили на обезжиренные предметные стекла и приклеивали белковым клеем. Окрашивание проводили с целью оптической дифференцировки структурных элементов тканей. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. При этом методе окраски ядра клеток - лиловые или синие; цитоплазма – красного цвета различного тона, соединительная ткань – светло-розового цвета.

Просмотр и оценку гистоизменений проводили под микроскопом «Олимпус» с теленасадкой.

**Результаты исследований.** В результате проведенных исследований при внутримышечном введении вакцины с различными адьювантами гибели животных не отмечено, на месте введения была небольшая припухлость и болезненность в первые дни после инъекции.

Гистоисследования показали, что у крыс контрольной группы мышечная ткань была без инфильтрации, мышечные волокна ровные, без признаков воспаления (рис.1).

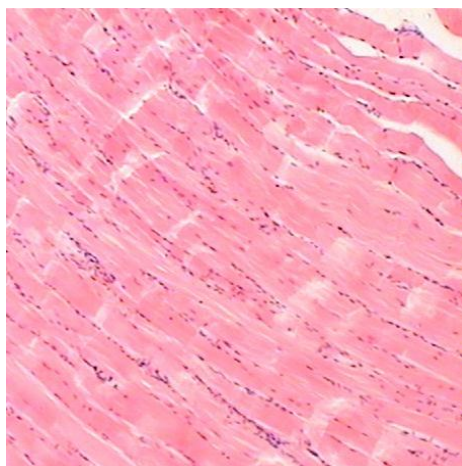
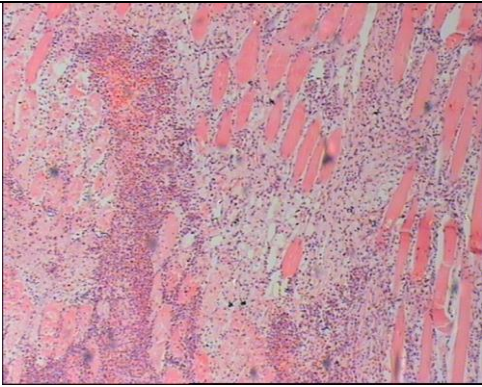
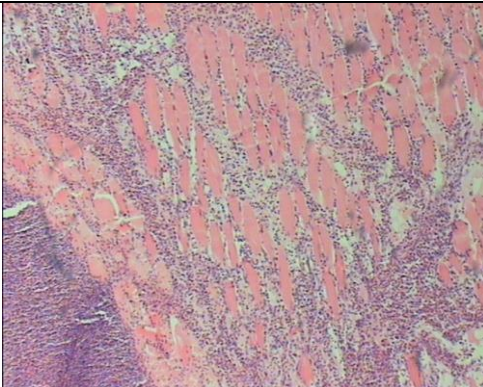
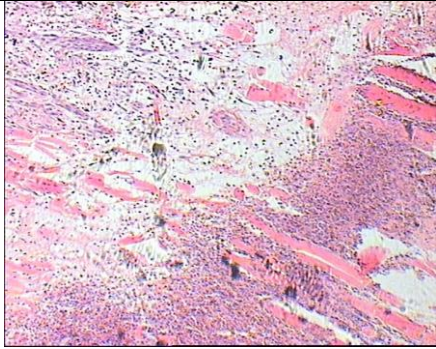
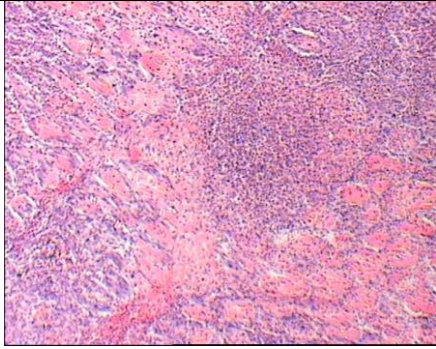


Рис. 1. Мышечная ткань у крыс контрольной группы.

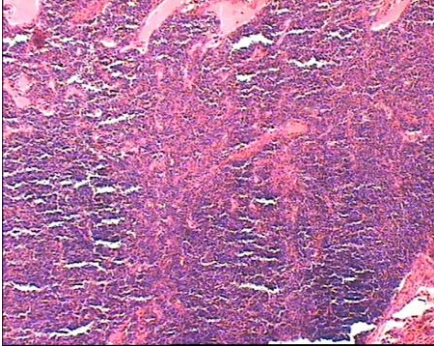
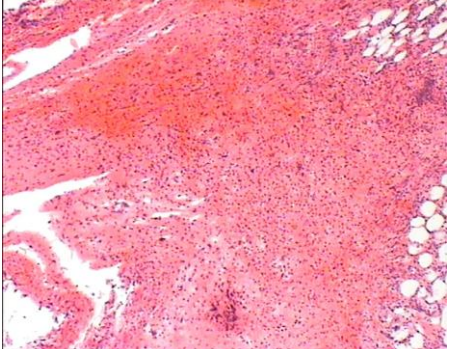
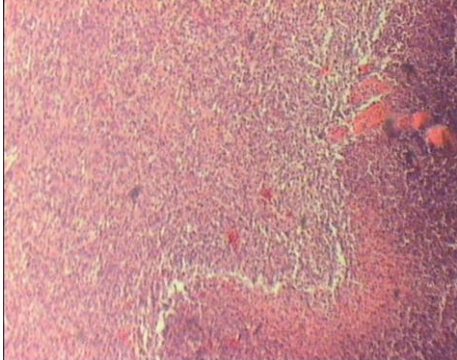
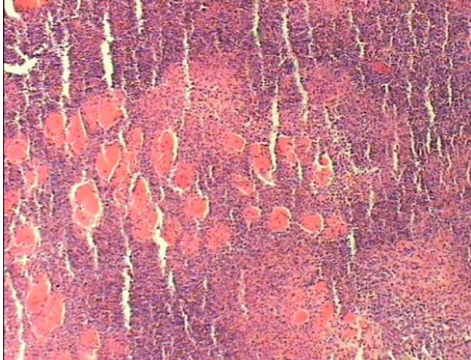
Результаты, полученные при изучении влияния вакцины с адьювантом - хитозан высокомолекулярный 0,25%, приведенные на рисунках 2-9.

3 дня	
	
<p>Рис. 2. Некроз мышечных волокон. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток</p>	<p>Рис.3. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.</p>
7 дней	
	
<p>Рис.4. Некротический детрит, умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток, разрастание соединительной ткани, замещающей дефект.</p>	<p>Рис. 5. Некротический детрит, интенсивная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток.</p>

У крыс, которым вводилась вакцина с адьювантами на основе хитозана, в мышечной ткани имелись изменения различной степени.

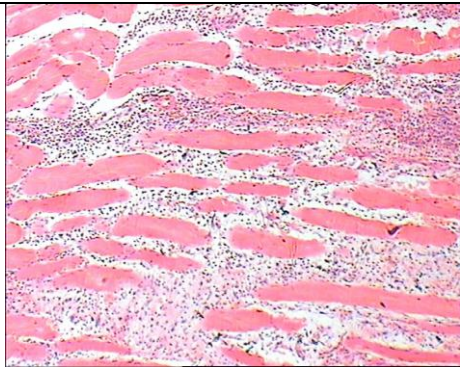
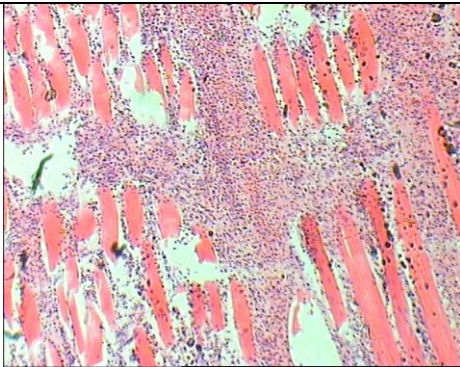
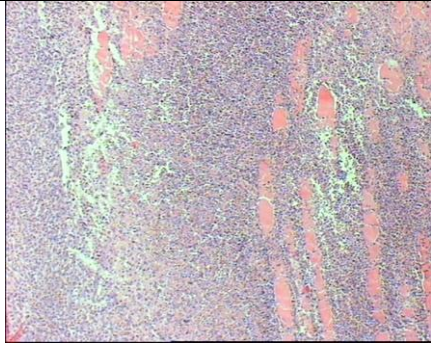
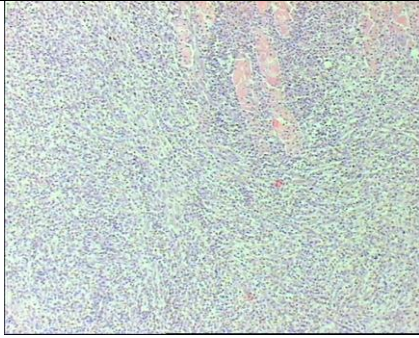
Из микрофотографий видно, что через 3 суток после введения вакцины с адьювантом - хитозан высокомолекулярный 0,25% в области введения отмечена интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита, некроз мышечных волокон. Через 7 суток на месте инъекции отмечен некротический детрит, интенсивная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток разрастание соединительной ткани, замещающей дефект.

При изучении влияния вакцины с адьювантом хитозан высокомолекулярный 0,5% получены следующие результаты, приведенные на рис. 6-9.

3 суток	
 <p>Рис. 6. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.</p>	 <p>Рис. 7. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.</p>
7 суток	
 <p>Рис. 8. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.</p>	 <p>Рис. 9. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.</p>

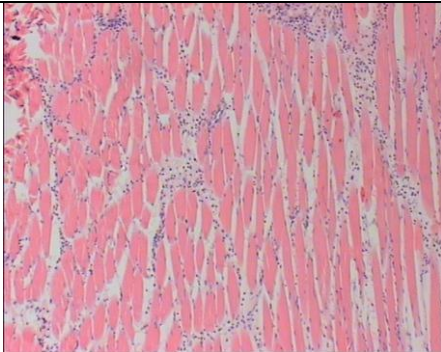
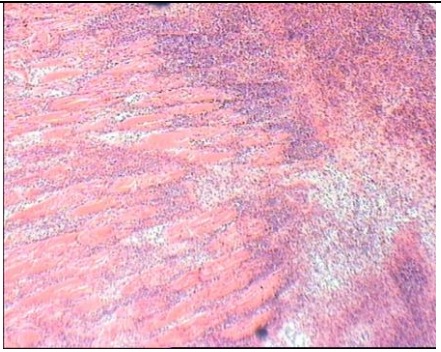
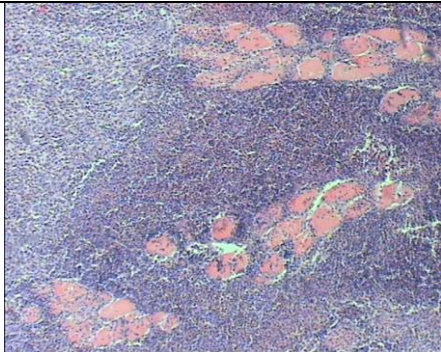
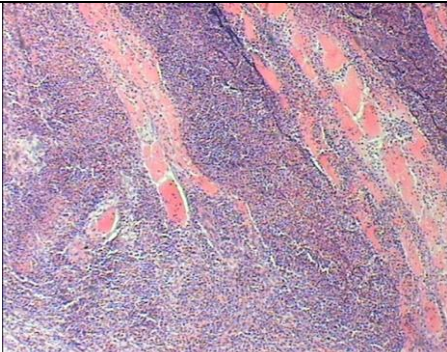
Из микрофотографий видно, что через 3 суток после введения вакцины с адьювантом хитозан высокомолекулярный 0,5% на месте введения отмечена интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита. Через 7 суток на гистосреззах отмечается интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.

При изучении влияния вакцины с адьювантом *Хитозан низкомолекулярный 0,25%* получены результаты, приведенные на рисунках 10-13.

3 суток	
	
<p>Рис. 10. Инфильтрация интерстициальной ткани скелетных мышц лимфоидными клетками.</p>	<p>Рис. 11. Инфильтрация интерстициальной ткани скелетных мышц лимфоидными клетками.</p>
7 суток	
	
<p>Рис. 12. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.</p>	<p>Рис. 13. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.</p>

Из микрофотографий видно, что через 3 суток после введения вакцины с адьювантом *Хитозан низкомолекулярный 0,25%* на месте введения отмечена инфильтрация интерстициальной ткани скелетных мышц лимфоидными клетками. Через 7 суток на гистосреззах отмечается интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.

При изучении влияния вакцины с адъювантом *Хитозан низкомолекулярный 0,5%* получены следующие результаты, приведенные на рис. 14-17.

3 суток	
	
Рис. 14. Лимфоидно-макрофагальные пролифераты в интерстиции.	Рис. 15. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического Детрита.
7 суток	
	
Рис. 16. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.	Рис. 17. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.

Из микрофотографий видно, что через 3 суток после введения вакцины с адъювантом хитозан низкомолекулярный 0,5% на месте введения отмечена интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита, некроз мышечных волокон. На отдельных гистосрезях - тотальная пролиферация лимфоидными клетками, фрагменты мышечных волокон. Через 7 суток на гистосрезях отмечается интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.

**Заключение.** Таким образом, на приведенных микрофото видно, что использование в вакцине против инфекционного ринотрахеита и протейной инфекции в качестве адъюванта хитозана высокомолекулярного и хитозана

низкомолекулярного на месте инъекции отмечают различные повреждения ткани. Так, наименьшую интенсивность отмечали в группах животных, которым вводили вакцину с хитозана сукцинатом 0,25-1% концентрации, а наиболее тяжелые поражения, вплоть до некроза тканей отмечали при использовании хитозана низкомолекулярного в 0,25-0,5% концентрации.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что в качестве адъюванта в вакцинах можно использовать хитозана сукцинат в 0,25-1% концентрациях, который на месте введения вызывает макрофагально-лимфоцитарную реакцию без некроза тканей.

### Литература

1. Гамзазаде А. И. Антибактериальная активность хитозанов./ Гамзазаде А. И., Насибов С. М. Лукин О. В.: мат. 8-й Междунар. конф. «Современные перспективы и исследования хитина и хитозана». Казань, 2006. – С. 183-186.
2. Кочкина З.М. Влияние хитозана на фаговые инфекции/ Кочкина З.М., Чирков С.Н. // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана: мат. V конф. -М:ВНИР, 1999.- С. 151.
3. Красочко П. А. Изучение адъювантных свойств различных форм хитозана/ Красочко П.А., Самуйленко А.Я., Фролова М.А. и др.: «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». - Щелково, 2009. -С.452-457.
4. Крыжановская Е.В. Антибактериальное действие форм хитозана на штаммы *Mycobacterium*/ Крыжановская Е.В., Варламов В.П., Самуйленко А.Я. и др.// С.-х.биология. Сер. Биология животных. – М., 2008. - №6. – С. 119-121.
5. Патент Англии №1252373. А61к97/00 С08в19/14. 03.02. 69.
6. Патент США №3632754. А61к17/00 04.01.72.
7. Патент США №4772591 от 16.04.86.
8. Патент Японии №59-27826. А61К31/715. А61к35/56. 14.02.84.
9. Патент Японии №62-61927. А61К39/39. А61 К31/73. 18.03.87.
10. Патент США №497956. А61К31/73. 20.11.90.
11. Патент США №5912000. А61К45/00. 15.06.99.
12. Фомичев Ю.П. Хитин и хитозан в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве, звероводстве, рыбоводстве, ветеринарии и при переработке продукции АПК, Методические рекомендации. –МСХ РФ, РАСХН; Всерос. гос. науч.-исслед. ин-т животноводства; Рос. учеб. центр по экологически безопасным технологиям в животноводстве. - Дубровицы, 2007. - 72 с.
13. Червинец В. М. Ацилакт и пищевой хитозан в лечении язвенной болезни/ Червинец В. М., Бондаренко В. М., Смоленская Л. П. и др.: мат. 8-го Всерос. Съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М., 2002. –С.273-274.
14. Червинец, В.М. Чувствительность микрофлоры желудка и двенадцатиперстной кишки к хитозану и низкоинтенсивному лазерному излучению/ Червинец В.М., Комаров Б.А., Москвин СВ., Курочкин А.А.: мат. научн. конф.»Фитотерапия и лазеротерапия в 21 веке». - Черногловка, 1999. - С.105.
15. Шугалей И.В., Некоторые аспекты действия крилевого хитозана при свободно-радикальных поражениях биообъектов/ Шугалей И.В., Львов С.Н., Целинский И.В., Ведерников Ю.Н.: тез. докл. 4-ой Всерос.конф. «Производство и применение хитина и хитозана». - М., ВНИРО, 1995.- С. 49.

16. Gil G., del Monaco S., Cerrutti P. e.a. Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacteria and brewing yeasts. // *Biotec. Let.*- 2004. – 26. –P. 569-574.
17. Smith J., Wood E., Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharmac // Res.*- 2004. - 21(1). –P. 43-49.
18. Uchida Y. Antibacterial activity by chitin and chitosan// *Food Chemical.* – 1998. – 2. –P. 22-29.

## **ПРИМЕНЕНИЕ ХИТОЗАНА В СОСТАВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

<sup>1</sup>*А.И. Албулов, <sup>1</sup>М.А. Фролова, <sup>1</sup>О.В. Буханцев, <sup>1</sup>А.В. Гринь,  
<sup>1</sup>М.В. Плотников, <sup>2</sup>П.А. Красочко, <sup>3</sup>Е.В. Крапивина*

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Щелково, Московской обл.

e-mail: [vnitibp@mail.ru](mailto:vnitibp@mail.ru);

<sup>2</sup>Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Республика Беларусь, Минск

e-mail: [krasochko@mail.ru](mailto:krasochko@mail.ru);

<sup>3</sup>Брянская ГСХА, Брянск

e-mail: [krapivina\\_E\\_v@mail.ru](mailto:krapivina_E_v@mail.ru)

**Введение.** Микробиоценоз кишечника - чрезвычайно важная система организма, выполняющая или регулирующая его функции по поддержанию гомеостаза (1). Широкое применение в ветеринарии антибиотиков привело к селекции и распространению в природе антибиотикорезистентных и атипичных штаммов микроорганизмов, в том числе и с повышенным патогенным потенциалом, нарушению колонизационной резистентности кишечника и росту числа условно-патогенных инфекций (2).