

Способ моделирования криптоспоридиоза для апробации терапевтических средств

П.А. Кулясов, к.в.н., В.А. Васильева, д.в.н., профессор, Мордовский ГУ

В настоящее время для проведения экспериментов используются десятки миллионов животных разных видов. Потребность в животных, используемых в научно-исследовательских, а также в учебно-демонстрационных целях, с каждым годом возрастает. По данным исследователей [1], питомники лабораторных животных АМН РФ ежегодно поставляют около 5 млн животных, из которых 50–70% мышей, 15–20% крыс, 10–15% морских свинок, 2–3% кроликов и 2–3% других позвоночных.

Известно, что впервые криптоспоридии были обнаружены в начале XX в. [5] в клетках эпителия желёз желудка лабораторных мышей ранее неизвестных одноклеточных паразитов, достигающих на самых крупных стадиях развития 6–7 мкм в диаметре. Свое родовое и видовое название — *Cryptosporidium muris* — эти кокцидии получили лишь через 3 года [6]. А ещё через 2 года в эпителии тонкого кишечника мышей был описан другой вид этого рода — *Cryptosporidium parvum*. Следовательно, белые лабораторные мыши могут быть использованы для воспроизведения этого заболевания.

Использование лабораторных грызунов в научных исследованиях особенно экономично, т.к. крупные животные часто недоступны из-за дороговизны.

Разработка экспериментальной модели криптоспоридиоза имеет большое теоретическое и практическое значение. В частности, это позволит при минимальных затратах в экспериментальных, а следовательно, воспроизводимых условиях изучать этиопатогенез заболевания, иммунитет и провести оценку лечебных и профилактических препаратов. В дальнейшем полученные данные можно целенаправленно использовать при лечении сельскохозяйственных животных и человека. Большинство исследователей в качестве такой модели использовали культуры клеток, что представляет определённые трудности [2, 3].

Материалы и методы. Все исследования осуществлены на 90 беспородных белых мышах обоего пола массой 10–16 г. До пятидневного возраста их выращивали в лаборатории в условиях, исключающих спонтанное заражение криптоспоридиозом.

Животных опытных групп заражали перорально взвесью криптоспоридий из расчёта 25000 на голову. С этой целью использовали суспензию ооцист *S.parvum*, полученную методом флотации из фекальных масс больных криптоспоридиозом поросят. Перед заражением подсчитывали количество криптоспоридий в 0,1 мл в камере Горяева, а затем отбирали нужную дозу.

Убой животных проводили в начале, середине и конце опыта (табл.).

После тщательного патологоанатомического исследования тушек мышей у них отделяли печень, почки, надпочечники, сердце, селезёнку, лёгкие, лимфатические узлы. Половинку каждого из этих органов помещали во флакон с 10-процентным нейтральным формалином. Затем вторую половинку погружали в раствор Карнуа для дальнейшей заливки в парафин. Готовили мазки-отпечатки и окрашивали с целью выявления ооцист *S. parvum* по Циль-Нильсену. Из парафиновых блоков на микротоме делали гистосрезы толщиной 6–7 мкм, которые затем окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике.

Результаты исследований. Копрологическое исследование животных опытных групп свидетельствует о том, что в течение всего опыта выделение ооцист *S. parvum* с фекалиями у экспериментальных мышат происходит на 4–7-е сутки после заражения.

Поэтому на 5-й день от момента выделения первых ооцист *S. parvum* мышам IV и VI гр. вводили перорально в виде эмульсий соответственно циплин (по 0,5 мг) и ампролиум (по 0,5 мг) ежедневно до конца опыта. Незаражённым животным III и V гр. давали с 5-дневного возраста с профилактической целью вместе с кормом соответственно циплин (по 0,5 мг) и

Схема опытов

| Группа | Кол-во животных | Доза заражения на животное, тыс. | Препарат | Дни убоя | | |
|-----------------|-----------------|----------------------------------|-----------|----------------|------------------|---------------|
| | | | | в начале опыта | в середине опыта | в конце опыта |
| I (контрольная) | 15 | – | – | 5 | 5 | 5 |
| II | 15 | 25 | – | 5 | 5 | 5 |
| III | 15 | – | циплин | 5 | 5 | 5 |
| IV | 15 | 25 | циплин | 5 | 5 | 5 |
| V | 15 | – | ампролиум | 5 | 5 | 5 |
| VI | 15 | 25 | ампролиум | 5 | 5 | 5 |

ампролиум (по 0,5 мг) в течение всего опыта и определяли, какое влияние оказывают эти препараты на организм мышей и на ооцисты *S. parvum*.

Наиболее характерные изменения были установлены у подопытных мышат, убитых на 8–9-е сутки после инвазирования, — более выраженная альтерация в подвздошной кишке по сравнению с особями контрольной гр. У мышей II гр. в просвете кишки обнаружена серозная жидкость с примесью слизи, которая имела вид нитчатой массы. Выявлено значительное изменение структуры слизистой оболочки. В одних участках эпителий сохранялся, а в других он был в значительной степени десквамирован. Ворсинки были деформированы, сильно утолщены. Отмечали заметное увеличение количества бокаловидных клеток по сравнению с контрольными показателями. Крипты сохранялись лучше, но имели узкий просвет или их полость отсутствовала. Установили, что изменения кишечника и в паренхиматозных органах во многом аналогичны процессам, описанным у поросят [4]. У животных IV гр., которые после заражения получали циплин, выделили ряд характерных особенностей в микроморфологии тонкого отдела кишечника. Прежде всего, криптоспоридии отсутствовали. В просвете кишечника отмечали наличие вещества с выраженными базофильными свойствами. Структура слизистой оболочки была сохранена, но выражена базофилия эпителиоцитов, особенно расположенных в основании крипт. Ворсинки имели неправильную форму, уменьшенную высоту при значительно большем диаметре по сравнению с показателями в контрольной гр. Эпителиальный покров сохранился, но на отдельных верхушках ворсинок энтероциты находились в состоянии вакуольной дистрофии.

Характерные особенности структуры стенки подвздошной кишки на фоне отсутствия криптоспоридий выявлены и у животных VI гр., которым после заражения давали ампролиум: поверхность слизистой подвздошной кишки неровная вследствие неодинаковой высоты и степени повреждения ворсинок, которые тесно прилегали друг к другу и были деформированы. Отмечали признаки гиперемии и отёка соединительно-тканной основы слизистой оболочки кишечника. В желудке существенных отличий у мышат опытных групп по сравнению с контрольной не обнаружили.

При малом увеличении печени у мышей II гр. вскрыты нарушение балочного строения, зернистая дистрофия, некроз единичных гепатоцитов со скоплением в этих участках макрофагов, лимфоцитов, пролиферация и гипертрофия звёздчатых ретикулоэндотелиоцитов, что свидетельствовало о наличии неспецифического реактивного гепатита.

У мышей IV гр. были выражены признаки венозной гиперемии, при этом на периферии долек — слабее. Балки в центре были несколько источены и раздвинуты друг от друга с явлениями их дискомплексации.

Слабовыраженные признаки венозной гиперемии установлены у мышей VI гр. У некоторых животных находили мелкие скопления клеток в различных отделах долек. В мазках-отпечатках, полученных с кусочков печени животных IV и VI гр., ооцист *S. parvum* не обнаружены.

В почках животных II гр. эпителий извитых канальцев находился в состоянии зернистой дистрофии, встречались участки кистообразно расширенных канальцев. Эндотелий капилляров клубочков — с явлениями пролиферации, клубочки были анемичны.

У животных VI гр. отмечали частичную десквамацию эпителия извитых канальцев и морфологические признаки гиперфункции нефронов, а у мышей VI гр. при использовании ампролиума зернистая дистрофия эпителия проксимального отдела извитых канальцев была выражена слабо.

В сердце животных II гр. отмечали неравномерное увеличение объёма кардиомиоцитов, сдавливающих капилляры. На этом фоне были выражены явления гемостаза. Границы клеток и очертания ядер различались с трудом. В цитоплазме — мелкая эозинофильная зернистость. У мышей IV и VI гр. признаки зернистой дистрофии и нарушения кровообращения сохранялись, но были выражены слабее.

В тканях лёгких животных II гр. межальвеолярные стенки местами были утолщены, бронхиолы сдавлены, стенки отдельных сосудов находились в состоянии мукоидного набухания. Перибронхиальная лимфоидная ткань была гиперплазирована. В мазках-отпечатках обнаружены единичные ооцисты.

Для животных IV гр. характерно, что их кровеносные сосуды были налиты кровью. Некоторые альвеолы заполнены транссудатом в виде мелкоячеистой зернистой массы, содержащей единичные эритроциты и слущенные эпителиальные клетки, частично заполняющей просвет.

В некоторых альвеолах транссудат имел вид узких полосок, располагающихся около альвеолярных перегородок. У животных VI гр. явления венозной гиперемии и отёка лёгких были выражены слабее.

В надпочечниках мышей II гр. капсула органа была представлена более толстыми волокнами и фиброцитами с тёмными удлинёнными волнистыми ядрами. В клубочковой зоне величина клубочков меньше и они разделены хорошо выраженными пучками волокон соединительной ткани. В сетчатой зоне выражены явления атрофии. В мозговом веществе, на фоне венозной гиперемии, также отмечали атрофические явления.

У животных IV гр. цитоморфология различных зон коркового и мозгового вещества приближалась к контролю, но наблюдалось расширение капилляров пучковой и сетчатой зон коркового вещества. При этом явления жировой дистрофии и атрофические изменения не были обнаружены, что свидетельствует о синтезе и выделении прежде всего альдостерона и стероидных гормонов, оптимизирующих воспалительные процессы.

Структура железы мышей VI гр. характеризовалась слабовыраженной гиперемией пучковой зоны коркового вещества, застойными явлениями и атрофией эндокриноцитов сетчатой зоны. В мозговом веществе выраженных изменений по сравнению с контролем не обнаруживали.

Брыжеечные лимфатические узлы мышей II гр. имели признаки острого серозного воспаления. Серозное воспаление брыжеечных лимфатических узлов у животных IV и VI опытных гр. не было обнаружено, но явления лимфостаза диагностировали.

В селезёнке мышей II гр. отмечали гиперплазированные фолликулы белой пульпы, содержащие значительное количество бластовидных клеток с выраженным митозом. В красной пульпе обнаружено опустошение фолликул, их своеобразное разрыхление.

Лимфатические фолликулы у мышей IV гр. представляли собой шарообразные скопления лимфоцитов. В разной степени в них просматривались светлые центры. Сеть венозных синусоидных капилляров красной пульпы была переполнена кровью, центральные и трабекулярные артерии сокращены. Нечёткие границы фолликул выявлены у животных VI гр. Не были

выражены реактивные центры. Отмечали запустевшие центральные артерии, расширенные, заполненные форменными элементами крови трабекулярные вены.

Выводы. Результаты исследований показали, что у экспериментально заражённых ооцистами *C. parvum* мышей отмечались не только местные изменения в кишечнике, но и выраженная общая реакция в виде дистрофических изменений не только в паренхиматозных органах, но и в иммунной системе организма. Использование лекарственных препаратов на фоне санации желудочно-кишечного тракта характеризовалось дифференциальной реакцией регулирующих систем.

При применении препаратов у животных III и V гр. (без заражения) наблюдали умеренно выраженные изменения, в частности в почках, которые в основном проходили на 6-е и особенно на 9-е сутки. Эти изменения имели временный характер.

Литература

1. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание и использование в эксперименте. Киев, 1974. 118 с.
2. Бочкарев И.И. Криптоспориоз: эпизоотология, симптомокомплекс болезни, ультраструктура *Cryptosporidium parvum*, особенности развития хозяин — паразит — клетка — эмбрион, принципы лечения и профилактика: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. СПб., 1996. 39 с.
3. Шибалова Т.А. Развитие криптоспоридий в клетках культуры тканей и эмбрионах птиц // Современные проблемы протозоологии. IV съезд ВОПР. Витебск, 1987. С. 238–240.
4. Васильева В.А. Криптоспориоз и эзофагостомоз свиней при моноинвазиях и паразитоценозе: автореф. дисс. ... докт. вет. наук. М., 1998. 42 с.
5. Tizzer E.A. An extracellular *coccidium Cryptosporidium* (gen. et sp. nov) of the gastritis glands of the common mouse // J. Med. Res. 1910. Vol. 23. P. 487–509.
6. Tyzzer E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc Soc Biol Med 1907–1908; 5:12.