

УДК 611.342:611:018:619:615.3

Лемішевський В. М., аспірант[©]*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.*

ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ В ШЛУНКОВО-КИШКОВОМУ ТРАКТІ СВИНЕЙ ЗА ЗГОДОВУВАННЯ ПРОБІОТИКІВ

У статті представлені гістохімічні показники шлунково-кишкового тракту свиней. Показано, що за згодовування поросяттам пробіотичних кормових добавок протягом 42 днів сприяє зростанню основних глікозаміногліканів над сульфатованими в структурах слизової оболонки фундальної ділянки шлунка та слизовій оболонці дванадцятипалої кишки. Локалізувалися основні глікозаміноглікани здебільшого в залозистих ентероцитах поверхневого епітелію шлунково-кишкового тракту, а сульфатовані глікозаміноглікани переважно локалізувались в ліберкюнових залозах дванадцятипалої кишки. Таким чином, зростання нейтральних глікозаміногліканів у структурах шлунково-кишкового тракту забезпечує нормальне функціонування процесів травлення.

За відгодівлі свиней продуктивність та резистентність організму залежить від функціонального стану всіх його систем і зокрема значною мірою від морфофункціонального стану шлунково-кишкового тракту. За інтенсивного ведення господарства, при незбалансованості кормів, відбуваються якісні зміни нормального видового складу мікробіоти кишечнику та порушення функцій імунітету тварин. У свою чергу, безконтрольне застосування антимікробних препаратів веде до порушення конкурентних взаємин нормальної мікрофлори органу і їх місце часто займають патогенні мікроорганізми, що призводить до шлунково-кишкових розладів.

Шлунково-кишковий тракт є тим місцем, де проходить стикання зовнішніх і внутрішніх середовищ організму, де відбувається перехід поживних речовин корму із зовнішнього у внутрішнє середовище організму. Тому формування середовища, схожого за складом до внутрішнього середовища організму у шлунково-кишковому тракті, є важливим механізмом підтримки сталості гомеостазу [1].

Сформовану ситуацію покликано виправити пробіотичні кормові добавки. Пробіотичні кормові добавки на основі бактерій роду *Bacillus* володіють високим рівнем антагоністичної активності. Такі препарати здатні замінити антибіотики, але, на відміну від антибіотиків, вони абсолютно нешкідливі і після застосування в продуктах тваринного походження відсутні їх залишки. Ці бактерії виробляють велику кількість антибіотичних речовин

[©] Науковий керівник – доктор вет. наук, професор Г.І. Коцюмбас
Лемішевський В. М., 2013

різних груп, а також лізоцим і літичні ферменти, які доповнюють їх антибактеріальну дію [2].

На слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту внаслідок взаємодії клітин епітелію і мікроорганізмів формується складна структура, так званий слизовий бар'єр [3]. Він являє собою біоплівку, яка сформована з глікозміногліканів, нормофлори та її метаболітів [4-6]. Ця біоплівка захищає слизову оболонку шлунково-кишкового тракту від негативного впливу різних фізичних і хімічних факторів, проникнення патогенних мікробів і різних токсинів. Утворення даного бар'єра сприяє прикріпленню нормальної мікрофлори на поверхні епітелію шлунково-кишкового тракту, синтезу спеціальних бактеріоцидів, які інгібують розмноження патогенних штамів мікроорганізмів.

Тому, якщо слизовий бар'єр кишечника пошкоджений, то і відновити баланс нормальної мікрофлори досить важко.

Мета роботи. Метою нашої роботи було дослідити вміст глікозаміногліканів у структурах слизової оболонки шлунково-кишкового тракту свиней при згодовуванні кормів з різним вмістом пробіотиків.

Матеріали і методи. Дослід проводили у виробничих умовах ННВЦ "Комарнівський" Городоцького району Львівської області на поросятах породи "Велика Біла", 28-добового віку. За принципом аналогів було сформовано три дослідні групи поросят по 30 голів у кожній. Поросят І - групи згодовували комбікорм з додаванням пробіотика "Probion-forte" в дозі 1 г/кг корму, ІІ – групі згодовували пробіотик "Biorplus 2B" в дозі 0,4 г/кг корму. Контрольній групі згодовували комбікорм згідно з нормами, рекомендованими для породи "Велика Біла" з врахуванням вікової категорії.

Тварин утримували в станках по 15 голів у кожній, з вільним доступом до корму та води. На 42 добу досліду по 5 голів з кожної групи виводили з експерименту.

За умов тіопенталового наркозу здійснювали евтаназію, проводили патологоанатомічний розтин з відбором біоматеріалу для досліджень. Вирізали шматочки фундальної ділянки шлунка та дванадцятипалої кишки, фіксували у рідині Карнуа з подальшою заливкою у парафін, згідно з загальноприйнятою методикою. Зрізи виготовлялись на санному мікроскопі МС-2, товщиною у 7 мікрон. Виявлення нейтральних і кислих глікозаміногліканів у стінці шлунка та дванадцятипалій кишці проводили за допомогою фарбування альціновим синім рН 2.5 (AB) за Steedman (1950) в поєднанні з ШІК-реакція (PAS) за McManus (1948) [7]. На гістопрепаратах, забарвлених альціновим синім у поєднанні з PAS-реакція нейтральні глікозаміноглікани зафарбовувалися в рожевий колір, а кислі – у синій; структури, які містили обидва компоненти, набували фіолетового кольору. Мікроскопію та мікрофотографування проводили за допомогою мікроскопа Micromed XS-2610.

Визначення кількісних змін глікозаміногліканів на мікрофотографіях гістопрепаратів проводили за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення Image-Pro Premier 9.0 (Media Cybernetics). Аналіз проводився в

декілька етапів: а) виділення досліджуваної області за допомогою ручного графічного планшету; б) сегментація – виділення досліджуваного об'єкта за кольоровою моделлю ділянки зображення; в) вимірювання виділених об'єктів в автоматичному режимі.

Вірогідність різниці між статистичними характеристиками двох експериментальних сукупностей даних визначали за коефіцієнтом Стьюдента, а вірогідними вважали зміни при рівні значущості $p < 0,05$ [8]. Цифрові дані статистично обробляли за допомогою програмного забезпечення “Microsoft Excel”.

Результати та обговорення. За світлооптичного вивчення мікропрепаратів слизової оболонки фундальної ділянки шлунка дослідних груп тварин відзначали різну інтенсивність забарвлення їх структур (табл. 1).

Таблиця 1

Гістохімічні показники слизової оболонки фундальної ділянки шлунка поросят на 42 добу досліді ($M \pm m$, $n=5$)

Показник	Група спостереження (пробіотик, концентрація в кормі)		
	Контрольна група	Probion-forte 1 г/кг	Bioplus 2В 0,4 г/кг
Епітеліальний шар слизової оболонки:			
Основні глікозаміноглікани, %	6,62±0,08	21,10± 0,10***	20,28±0,07 ***
Кислі глікозаміноглікани, %	10,94±0,09	8,06±0,03 ***	9,19±0,08 ***
Власне залози слизової оболонки шлунка:			
Основні глікозаміноглікани, %	16,60±0,09	17,23±0,08 **	17,02±0,04 **
Кислі глікозаміноглікани, %	-	-	-

Примітка: Вимірювання проводились на площі 250000 μm^2 ($\times 100$); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

У тварин контрольної групи, яким згодовували повнораціонні корми, гістохімічні показники слизової оболонки шлунка мали добре виражений акцент до зростання сульфатованих та зменшення нейтральних глікозаміногліканів слизової оболонки фундальної ділянки шлунка (рис. 1). Залозистий епітелій шлункових ямок містив лише 6,62 % основних, та здебільшого сульфатованих глікозаміногліканів (ГАГ), які становили 10,94 % (рис. 1-А, С), а основних ГАГ фундальні залози секретували 16,60 % (рис. 1-В). У тварин І групи спостерігали, що одношаровий призматичний залозистий епітелій слизової оболонки шлунка продукує більше 21,10 % основних ГАГ (рис. 2-А) та лише 8,06 % кислих ГАГ, які здебільшого локалізувалися в основі шлункових ямок (рис. 2-С), що порівняно з контрольною групою вірогідно було більшим на 14,48 % від основних ГАГ та на 2,88 % менше ніж кислих ГАГ. Фундальні залози шлунка І групи тварин містили основних ГАГ в кількості 17,23 % (рис. 2-В). У поросят ІІ дослідної групи вірогідно спостерігали подібну тенденцію продукування основних та кислих ГАГ фундальної ділянки шлунка

(рис. 3). Секрет залозистого епітелію шлунка містив 20,28 % нейтральних та 9,19 % сульфатованих ГАГ (рис. 3-А, С), а власне залози шлунка секретували 17,02 % основних ГАГ (рис. 3-В).

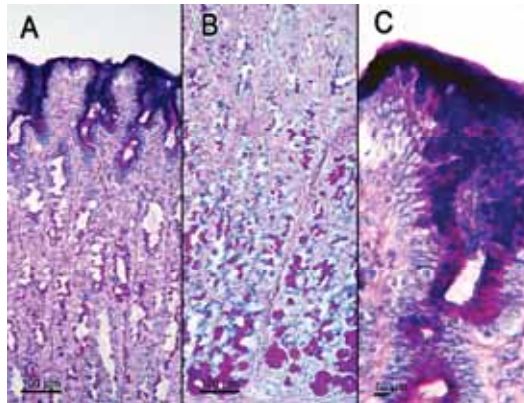


Рис. 1. Слизова оболонка фундальної ділянки шлунка свиней контрольної групи; А - епітеліальний шар; В - фундальні залози – x100; С - шлункова ямка – x400. АВ/PAS.

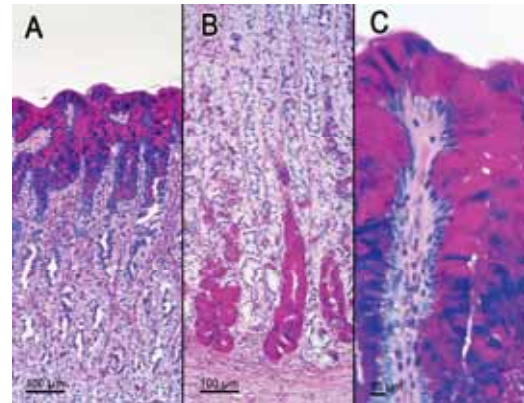


Рис. 2. Слизова оболонка фундальної ділянки шлунка свиней I групи; А - епітеліальний шар; В - фундальні залози – x100; С - шлункова ямка – x400. АВ/PAS.

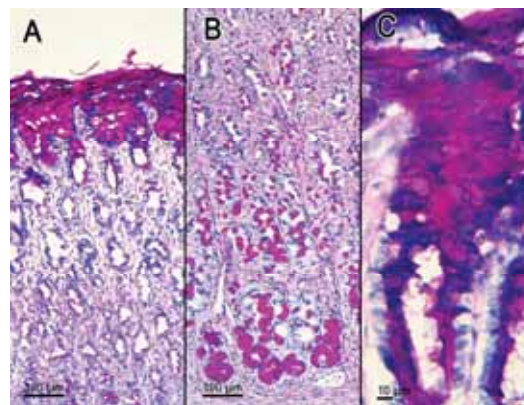


Рис. 3. Слизова оболонка фундальної ділянки шлунка свиней II групи; А - епітеліальний шар; В - фундальні залози – x100; С - шлункова ямка – x400. АВ/PAS.

Як бачимо із наведених даних, глікозаміноглікани залозистого епітелію фундальної ділянки шлунка поросят, яким згодовували пробіотики, вздебільшого нейтральні з незначним вмістом сульфатованих глікозаміногліканів, що свідчить про нормальні процеси травлення. Наш висновок збігається з результатами гістохімічних і радіографічних досліджень інших дослідників [10].

За гістохімічного дослідження стінки дванадцятипалої кишки спостерігали схожу тенденцію до варіабельності нейтральних та сульфатованих глікозаміногліканів у дослідних групах тварин (табл. 2).

Таблиця 2

Гістохімічні показники стінки дванадцятипалої кишки поросят на 42 добу досліду (M±m, n=5)

Показник	Група спостереження (пробіотик, концентрація в кормі)		
	Контрольна група	Probion-forte 1 г/кг	Biorplus 2В 0,4 г/кг
Ворсинки слизової оболонки: Основні глікозаміноглікани, %	5,17±0,10	6,28±0,07 ***	5,66±0,09 *
Кислі глікозаміноглікани, %	3,38±0,01	2,83±0,01 ***	2,45±0,01 ***
Ліберкюнові залози слизової оболонки: Основні глікозаміноглікани, %	2,37±0,02	3,85±0,03 ***	2,65±0,02 ***
Кислі глікозаміноглікани, %	7,08±0,08	8,62±0,08 ***	5,74±0,16 ***
Бруннерові залози: PAS-позитивні речовини, %	19,13±0,09	29,76±0,15***	29,61±0,18 ***

Примітка: Вимірювання проводились на площі 250000 мкм² (x100); * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

У дослідних групах тварин спостерігали чітко виражену PAS-позитивну облямівку на апікальній поверхні епітеліоцитів ворсинок та келихоподібні клітини з різною стадією секреції, слизової оболонки дванадцятипалої кишки (рис. 4-6-С).

У тварин контрольної групи ентероцити ворсинок та келихоподібні клітини слизової оболонки дванадцятипалої кишки містили 5,17 % нейтральних та 3,38 % сульфатованих ГАГ (рис. 4). А у поросят І групи містили 6,28 % нейтральних та 2,83 % сульфатованих ГАГ, що порівняно з контрольною групою містили більше на 1,11% нейтральних та на 0,55% менше сульфатованих ГАГ відповідно. Келихоподібні клітини знаходились на різних стадія секреторного циклу, характеризувалось це тим, що вони містили в собі два типи ГАГ, про що свідчить різна інтенсивність їх темно-фіолетового забарвлення. У І групи тварин келихоподібні клітини містили секрет з більшим вмістом нейтральних ГАГ (рис. 5-С), а в контрольній групі з переважанням сульфатованих ГАГ (рис. 4-С). Ліберкюнові залози слизової оболонки дванадцятипалої кишки тварин контрольної групи містили 2,37% нейтральних та 7,08% сульфатованих ГАГ. А у тварин І групи залози продукували 3,85% нейтральних та 8,62% сульфатованих ГАГ, що на 1,48 % більше нейтральних та на 1,54 % сульфатованих ГАГ відносно контрольної групи. Бруннерові залози дванадцятипалої кишки тварин І групи містили 29,76% PAS-позитивних речовин (рис. 5-В), що на 10,60% більше відносно контрольної групи. У тварин ІІ групи ворсинки та келихоподібні клітини слизової оболонки дванадцятипалої кишки містили 5,66 % основних та 2,45% сульфатованих ГАГ (рис. 6-В). Ліберкюнові

залози містили 2,65% основних та 5,74% сульфатованих ГАГ, а у відповідних структурах контрольної групи тварин містилося 2,37% основних та 7,08% сульфатованих глікозаміногліканів. Брунерові залози II групи тварин містили 29,61% Pas-позитивних структур та у контрольній групі 19,13% Pas-позитивні речовини.

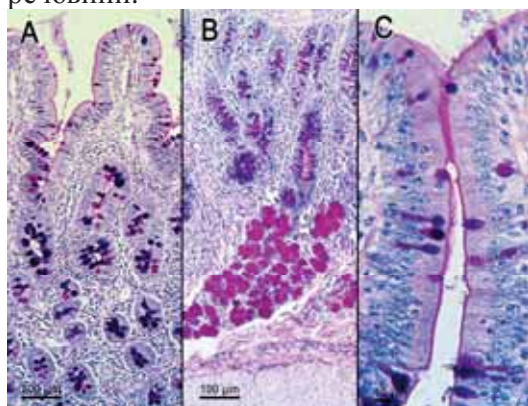


Рис. 4. Слизова оболонка дванадцятипалої кишки свиней контрольної групи; А – ворсинки слизової оболонки та ліберкюнові залози; В - брунерові залози – x100; С - одношаровий призматичний з облямівкою епітелій – x400. АВ/PAS.

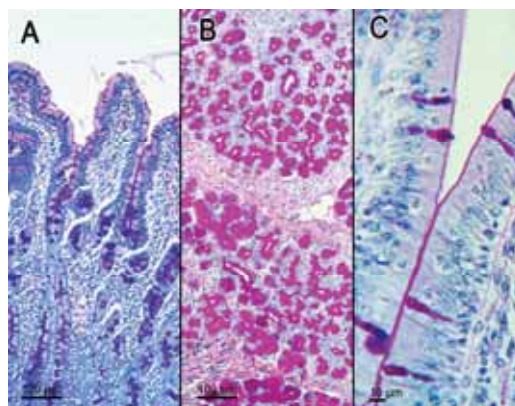


Рис. 5. Слизова оболонка дванадцятипалої кишки свиней I групи; А – ворсинки слизової оболонки та ліберкюнові залози; В - брунерові залози – x100; С - одношаровий призматичний з облямівкою епітелій – x400. АВ/PAS.

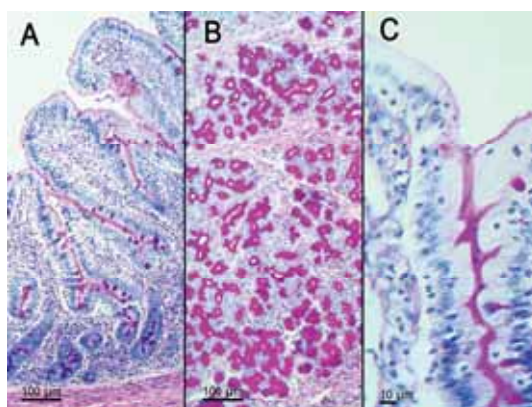


Рис. 6. Слизова оболонка дванадцятипалої кишки свиней II групи; А – ворсинки слизової оболонки та ліберкюнові залози; В - брунерові залози – x100; С - одношаровий призматичний з облямівкою епітелій – x400. АВ/PAS.

Переважно у всіх дослідних групах тварин у криптах слизової оболонки дванадцятипалої кишки спостерігали накопичення сульфатованих глікозаміногліканів.

Висновки. За згодовування пробіотиків дослідним групам тварин спостерігали вірогідне зростання основних глікозаміногліканів над сульфатованими, як у слизовій оболонці фундальної ділянки шлунка так і в слизовій оболонці дванадцятипалої кишки. Саме завдяки переважанню основних глікозаміногліканів в структурах слизової оболонки шлунково-кишкового тракту є необхідною умовою для його повноцінного функціонування.

Тонкий шар слизу, який вкриває слизові оболонки шлунково-кишкового тракту, є сприятливим середовищем для існування мікроорганізмів, які розподілені саме у пристінковому шарі, що складається із глікозаміногліканів.

Перспективи подальших досліджень. На наш погляд, подальші дослідження повинні бути зосереджені на електронно-мікроскопічному дослідженні шлунково-кишкового тракту свиней за згодовування кормів з різним вмістом пробіотиків.

Література

1. Гальперин Ю.М. Пищеварение и гомеостаз / Ю. М. Гальперин, П. И. Лазарев – М.: Наука, 1986. – С.16-18.
2. Лемішевський В. М. Антагоністична активність пробіотичних бактерій та механізм дії на резистентність організму / В.М. Лемішевський // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. – 2011. Т. 13, №4, Частина 1. – С.223–227.
3. Keli E. Diversion-related experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum* / E. Keli, M. Bouchoucha, G. Devroede, F. Carnot, T. Ohrant, P. Cugnenc. 1997;40. P. 222-8.
4. Deplancke B. Microbial modulation of innate defense: goblet-cells and the intestinal mucus layer. / B. Deplancke, H. Gaskins. *Am J Clin Nutr*. 2001;73. P. 41.
5. Finnie I. Colonic mucins synthesis is increased by sodium butyrate / I. Finnie, A. Dwarakanath, B. Taylor, J. Rhodes. *Gut*. 1995;36. P. 93-9.
6. Gaudier E. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon / E. Gaudier, M. Rival, M. Buisine, I. Robineau, C. Hoebler. *Physiol Res*. 2009;59:111 P. 9.
7. Mulisch M, Welsch U. *Romeis - Mikroskopische Technik* / M. Mulisch, U. Welsch et al. – German : Spektrum Akademischer Verlag. 18, 2010. – P. 227-230.
9. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях *Excell* / С. Н. Лапач, А. В. Губенко, П. Н. Бабич – К.: Морион, 2001. – 410 с.
10. Cornet A. *Bull. et mém. Soc. Méd. des hôpitaux de Paris* / A. Cornet, J. Bescol-Liversac, C. Guillam, C. Debussche. 1960;76. P. 293-300.

Summary

Lemishevs'kyi V. M.

*Lviv national university of veterinary sciences and biotechnologie
named after S. Z. Gzhytskyj.*

FEATURES HISTOCHEMICAL INDICATORS

GASTROINTESTINAL TRACT OF PIGS AT FEEDING PROBIOTICS

This article presents indicators the histochemical tract of pigs. It is shown that when fed to piglets of probiotic feed supplements for 42 days increases the major sulfated glycosaminoglycans in the structures of the mucous membrane of the stomach and fundic portion of the mucous membrane of the duodenum. Localized basic glycosaminoglycans in the majority in the glandular epithelium of the surface enterocytes of the gastrointestinal tract, and sulfated glycosaminoglycans liberkyunovyh predominantly localized in the glands of the duodenum. Thus, the growth in the structures of neutral glycosaminoglycans gastrointestinal tract ensures the normal functioning of the digestive processes.

Рецензент – д.вет.н., професор Гуфрій Д.Ф.