

**МИКРОСПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК  
ЖЕЛЕЗИСТОГО ЖЕЛУДКА ЦЫПЛЯТ ПРИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ****MICROSPECTRAL ANALYSIS OF GLANDULAR STOMACH CELLS  
IN CHICKENS WITH ENTERIC INFECTION**

**Ключевые слова:** нуклеиновые кислоты, белки, гистопрепараты стенки железистого желудка, *Stains all*, люминесцентный спектральный анализ, эшерихиоз, сальмонеллез, клебсиеллез, цыплята.

Цель исследований – оценить функциональное состояние клеток эпителия альвеолярных желез железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (эшерихиоз, сальмонеллез, клебсиеллез) с помощью метода микроспектрального анализа. Исследования проведены на 750 цыплятах породы Хайсекс коричневый. Цыплята были разделены на 4 группы: 3 опытные (по 200 цыплят) и 1 контрольная (150 цыплят). Заражение цыплят опытных групп проводили на вторые сутки их жизни пероральным путем. Цыплят I опытной группы инфицировали смывом культуры *Escherichia coli*, цыплят II опытной группы – *Salmonella enteritidis*, цыплят III опытной группы – *Klebsiella pneumoniae*. Цыплятам контрольной группы вводили физиологический раствор. Общую картину микроскопических изменений изучали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилин-эозином по общепринятой методике, люминесцентномикроскопические характеристики – на гистопрепаратах, окрашенных  $10^{-4}$ М спиртовым раствором *Stains all* по методике, разработанной применительно к гистологическим срезам. Спектры люминесценции получали с помощью универсального цветоанализатора микроскопа-спектрофотометра МСФУ-К. Объектом для исследования методом спектрального анализа служил эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят. Регистрировали величину интенсивности люминесценции в синей ( $I_{484}$ ) и красной ( $I_{620}$ ) областях ее спектра. По полученным данным определяли коэффициенты соотношений НК и белков в соответствии с разработанной методикой. Установлено, что метод люминесцентного спектрального анализа, разработанный автором, позволяет устанавливать коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы и зараженных бактериями *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* и *Klebsiella pneumoniae*. Динамика изменений этих коэффициентов отражает особенности функционального состояния клеток этой зоны. У цыплят контрольной группы она укладывается в

картину постепенного возрастания их функциональной активности соответственно увеличению их возраста. У инфицированных цыплят изменение функционального состояния этих клеток имеет сложный характер, отражающий особенности развития каждого вида инфекционного заболевания.

**Keywords:** nucleic acids, proteins, tissue specimen of glandular stomach wall, "Stains-All" stain, luminescence spectral analysis, colibacillosis, salmonellosis, klebsiellosis, chickens.

The research goal was to study the functional status of the epithelial cells of alveolar glands of glandular stomach in chicken with enteric infection (colibacillosis, salmonellosis, klebsiellosis) by means of microspectral analysis. The study involved 750 Highsex Brown chickens. The chickens were divided into 4 groups: 3 trial groups (200 chickens each) and 1 control group (150 chickens). Trial groups were infected orally at 2-days age. The 1st trial group was infected with washed *Escherichia coli* culture, the 2nd trial group with *Salmonella enteritidis*, and the 3rd trial group with *Klebsiella pneumoniae*. The control group received physiological salt solution. The general picture of microscopic changes was studied in histological sections stained with hematoxylin and eosin, and luminescence microscopic features were studied in tissue specimen stained with "Stains-All" stain. The luminescence spectra were created by a color analyzer of microscope-spectrophotometer MSFU-K. The alveolar epithelium of glandular stomach mucosa of chickens was studied by spectral analysis. The value of the luminescence intensity was recorded in blue ( $I_{484}$ ) and red ( $I_{620}$ ) areas of its spectrum, and using the obtained data the ratio of nucleic acid and proteins was determined. It was found that luminescent spectral analysis method enabled revealing the ratio of nucleic acids and proteins in the epithelium of alveolar glands in glandular stomach in chickens in the control and trial groups. The dynamic of those ratios shows the features of functional status of that area cells. That dynamics of the control group shows gradual increase of cells' functional activity according to the chickens' age. In the infected chickens the change of cells' functional status is of complex pattern corresponding to the development of each infectious disease.

Акчурин Сергей Владимирович, к.в.н., доцент, каф. «Морфология, патология животных и биология», Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Тел. 965-886-5423. E-mail: akchurin@sgau.ru.

Akchurin Sergey Vladimirovich, Cand. Vet. Sci., Assoc. Prof., Chair of Animal Morphology, Pathology and Biology, Saratov State Agricultural University named after N.I. Vavilov. Ph.: 965-886-5423. E-mail: akchurin@sgau.ru.

### Введение

Острые желудочно-кишечные инфекции бактериальной этиологии (эшерихиоз, сальмонеллез, клебсиеллез) до настоящего времени представляют серьезную угрозу промышленному птицеводству, поскольку сопровождаются массовым падежом птицы [1-3]. Гибель птицы наступает, как правило, в ранние сроки заболевания вследствие развития глубоких патологических метаболических изменений в клетках. В связи с этим диагностика данных инфекций во многом зависит от информативности и чувствительности используемого метода. Учитывая это обстоятельство, в ветеринарной медицине был разработан метод люминесцентного спектрального анализа клеток железистого желудка цыплят для изучения внутриклеточных изменений соотношений нуклеиновых кислот (НК) и белков, играющих ведущую роль в изменении морфофункционального состояния клеток [4]. В качестве люминесцентного красителя использовался Stains all, метакроматические свойства которого обусловили возможность одновременного выявления вышеуказанных органических соединений [5-7]. При этом особенности протекающих физико-химических реакций устанавливались с помощью регистрации спектральных характеристик, отражающих происходящие в клетках биохимические сдвиги. Динамика соотношения НК и белков определялась по изменению их спектральных характеристик, что обеспечивало объективную регистрацию и, соответственно, оценку полученных результатов. Поскольку первой мишенью на пути проникновения возбудителей кишечных инфекций (эшерихиоза, сальмонеллеза и клебсиеллеза) в организм птиц является слизистая оболочка железистого желудка, целью работы была оценка морфофункционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез с помощью разработанного метода микроспектрального анализа.

### Объекты и методы

Исследования проведены на 750 цыплятах породы Хайсекс коричневый, взятых из благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства. Цыплята были разделены на 4 группы: 3 опытные (по 200 цыплят) и 1 контрольная (150 цыплят). Заражение цыплят опытных групп проводили на вторые сутки их жизни пероральным путем с помощью одногограммового шприца и иглы с булавовидной напайкой. Цыплят I опытной группы инфицировали смывом культуры *Escherichia coli* с агара в разведении 200 млн бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,2 мл/гол. Цыплятам II опытной группы инокулировали смыв культуры *Salmonella enteritidis* в разведении 200 млн бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе

0,2 мл/гол. Цыплят III опытной группы заражали смывом культуры *Klebsiella pneumoniae* с агара в разведении 2,5 млрд бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,4 мл/гол. Цыплятам контрольной (IV) группы вводили физиологический раствор в объеме 0,4 мл/гол.

Гистологические срезы железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп исследовали на 1-4-, 6-8-, 10-, 15-, 21- и 30-е сут. их жизни. Гистопрепараты толщиной 4-7 мкм изготавливали на микротоме Mikrom HM450 (Германия) из парафиновых блоков кусочков железистого желудка, фиксированного в 10%-ном нейтральном забуференном водном растворе формалина.

Общую картину микроскопических изменений изучали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилин-эозином по общепринятой методике, люминесцентномикроскопические характеристики – на гистопрепаратах, окрашенных  $10^{-4}$ М спиртовым раствором Stains all по методике, разработанной применительно к гистологическим срезам. Спектры люминесценции получали с помощью универсального цветоанализатора микроскопа-спектрофотометра МСФУ-К. Объектом для исследования методом спектрального анализа служил эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят. Регистрировали величину интенсивности люминесценции в синей (1484) и красной (1620) областях ее спектра и по полученным данным определяли коэффициенты соотношений НК и белков в соответствии с разработанной методикой [1].

### Экспериментальная часть

При сравнительной визуальной оценке микроскопических изменений, обнаруженных в гистологических препаратах железистого желудка птиц с кишечной патологией, значимых идентификационных диагностических признаков не выявлено. В гистопрепаратах стенки железистого желудка цыплят контрольной группы патологические изменения отсутствовали.

В окрашенных Stains all гистологических срезах стенки железистого желудка наблюдали своеобразную люминесцентно-микроскопическую картину, которая отражала особенности распределения связанных с флуорохромом НК и белков. Она характеризовалась сочетанием синего, зеленоватого и малиново-красного цветов с разной степенью интенсивности на различных участках серозной, слизистой оболочек и мышечного слоя железистого желудка.

Методом микроспектрального анализа были получены коэффициенты соотношения НК и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка

цыплят. Динамика изменения коэффициентов соотношений, установленная у цыплят контрольной группы, укладывалась в картину умеренного постепенного увеличения их значений с 1-х по 30-е сут. (рис. 1, IV). Данное обстоятельство может быть объяснено постепенным и опережающим увеличением интенсивности люминесценции при длине волны 484 нм ( $I_n$ ) относительно возрастания ее величины при 620 нм ( $I_b$ ), которое наблюдалось в спектрах люминесценции клеток данной зоны. Эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода увеличения возраста цыплят (рис. 2 а).

При изучении динамики изменений коэффициентов соотношений НК и белков (1484/1620) в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытных групп выявлена определенная закономерность, которая затрагивала все группы кишечных инфекций, но являлась неидентичной при разных ее видах и сроках (рис. 1, I-III).

У цыплят I опытной группы на кривой коэффициентов соотношения органических веществ отмечались два пика, характеризующихся увеличением их значений на 4- и 7-е сут. жизни (рис. 1, I). Первый пик может быть следствием более быстрого роста величины  $I_n$  по сравнению с увеличением  $I_b$ , а второй пик – результатом более быстрого уменьшения величины  $I_b$  относительно снижения  $I_n$  (рис. 2 б). К 10-м сут. коэффициент соотношения 1484/1620 снизился и оставался в пределах этих значений вплоть до 21-х сут. (рис. 1, I), что может быть объяснено более быстрым ростом значений  $I_b$  по сравнению с увеличением  $I_n$  (рис. 2 б). К 30-м сут. наблюдалось более быстрое падение величины

$I_b$  по сравнению с уменьшением  $I_n$ , что привело к увеличению коэффициента соотношений 1484/1620. При этом коэффициенты соотношения органических веществ у цыплят, больных эшерихиозом, в эти сроки были намного меньше аналогичных цифр контрольной группы (рис. 1).

У цыплят II опытной группы на кривой коэффициентов соотношения НК и белков на 3-и сут. жизни отмечалось значительное увеличение данного коэффициента, что могло быть следствием роста  $I_n$  на фоне снижения  $I_b$  (рис. 3 а). В последующие сутки значение коэффициентов соотношения органических веществ уменьшалось, что могло быть результатом более быстрого роста  $I_b$  по сравнению с увеличением  $I_n$ , причем, начиная с 7-х сут., величина коэффициентов была значительно меньше аналогичных цифр контрольной группы.

У цыплят III опытной группы на кривой коэффициентов соотношений отмечалось четыре пика на 3-, 6-, 8- и 21-е сут. жизни (рис. 1, III). Появление пиков на 3- и 6-е сут. может быть результатом увеличения как  $I_n$ , так и  $I_b$ , а на 8-е сут. – следствием их одновременного уменьшения. Резкий скачок на 21-е сут. может быть связан со значительным ростом величины  $I_n$  по сравнению с увеличением  $I_b$  (рис. 3 б). К 30-м сут. наблюдалось некоторое уменьшение коэффициента соотношения 1484/1620, при этом его значение приближалось к аналогичным цифрам контрольной группы (рис. 1, III). Это может быть следствием некоторого снижения величины  $I_n$  на фоне незначительного увеличения  $I_b$  к этому сроку жизни больных клебсиеллезом цыплят (рис. 3 б).

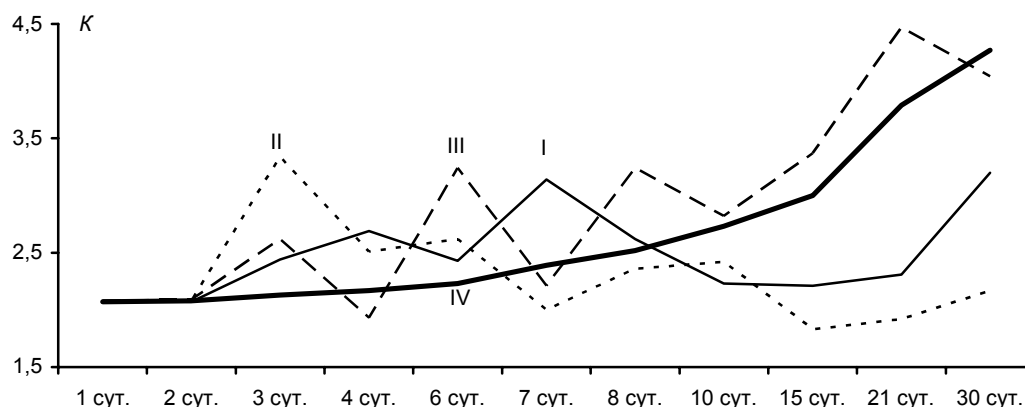


Рис. 1. Изменение показателей коэффициентов соотношений НК и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной (IV) и опытных групп (I – эшерихиоз, II – сальмонеллез, III – клебсиеллез). По оси ординат – значения коэффициентов соотношений НК и белков (K), по оси абсцисс – сутки жизни (сут.)

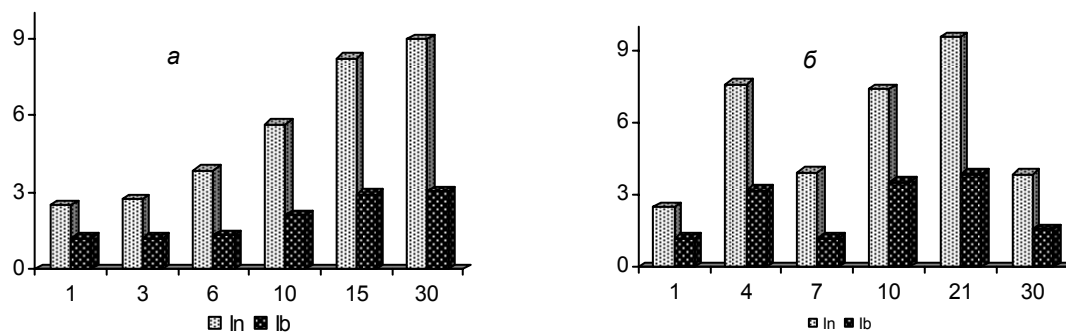


Рис. 2. Величина интенсивности люминесценции НК (In) белков (Ib) в спектре люминесценции клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной (а) и I опытной (б) групп.

По оси ординат – величина интенсивности люминесценции, по оси абсцисс – сутки жизни

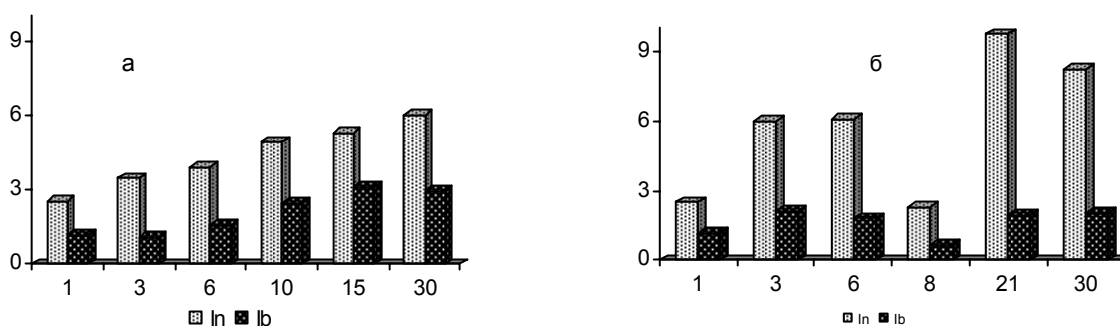


Рис. 3. Величина интенсивности люминесценции НК (In) белков (Ib) в спектре люминесценции клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II (а) и III (б) опытных групп. По оси ординат – величина интенсивности люминесценции, по оси абсцисс – сутки жизни

### Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что функциональное состояние эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка, которое развивается в организме цыплят в ответ на внедрение возбудителей кишечных инфекций (эшерихиоза, сальмонеллеза и клебсиеллеза), отражается на динамике коэффициентов соотношений НК и белков. При этом каждый вид инфекционного процесса имел свои характерные особенности изменения динамики этих коэффициентов. В отличие от цыплят контрольной группы, у которых изменение коэффициентов соотношений  $I_{484}/I_{620}$  укладывалось в картину умеренного и равномерного возрастания значений  $I_n$  и  $I_b$ , у инфицированных цыплят кривая, отражающая динамику этих коэффициентов, включала и повышение, и уменьшение их величин. Обнаруженные у цыплят контрольной группы изменения коэффициентов свидетельствовали о постепенном возрастании функциональной активности клеток данной зоны, соответственно, увеличении их возраста, а у цыплят опытных групп

они указывали на сложные изменения функционального состояния эпителия альвеолярных желез. Вместе с тем изменения функциональных механизмов клеток этой зоны имели свои особенности, присущие каждому отдельно взятому виду кишечной инфекции, что нашло отражение на кривой динамики коэффициентов соотношений органических веществ. Так, на рисунке 1 видно, что в 1-е сут. заболевания коэффициент  $I_{484}/I_{620}$  имел наибольшее значение у цыплят, больных сальмонеллезом. На 4-е сут. максимальное значение этого коэффициента было у цыплят, больных эшерихиозом. В то же время у цыплят, зараженных бактериями *Salmonella enteritidis* и *Klebsiella pneumoniae*, он заметно понижался. Иная картина наблюдалась на 19-е сут. развития инфекционного процесса. К этому времени коэффициент  $I_{484}/I_{620}$  у цыплят, больных клебсиеллезом, становился максимальным, намного превышая контрольные цифры. У цыплят же двух других групп этот коэффициент снижался, и его значения были значительно меньше, чем в контрольной группе.

**Заключение**

Динамика изменений коэффициентов соотношения НК и белков, установленная методом микроспектрального анализа (с использованием метакроматического флуоресцентного красителя «Stains all») в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка больных цыплят, отражала особенности их функционального состояния при различных видах кишечных инфекций – эшерихиозе, сальмонеллезе и клебсиеллезе. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о возможности устанавливать с помощью данного метода изменения функциональной активности этих клеток, развивающиеся на протяжении всего инфекционного процесса. Полученные результаты могут оказаться полезными при разработке принципиально нового подхода к вопросу создания современных технологий диагностики, профилактики и лечения этих широко распространенных желудочно-кишечных инфекций птиц.

**Библиографический список**

1. Ольховик О.П. Клиническое проявление и патологоанатомическая картина клебсиеллеза бройлеров в экспериментальных и производственных условиях // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2009. – № 49. – С. 166-172.
2. Мигаеш В.С. Фармако-токсикологическая характеристика диоксинора орального и его эффективность при колибактериозе птицы: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Воронеж, 2013. – С. 3.
3. Поломошнов Н., Малышева Л.А. Мониторинг эпизоотической ситуации при сальмонеллезе кур // Международный вестник ветеринарии. – 2011. – № 2. – С. 6-9.
4. Акчурина С.В., Ларионов С.В. Новый метод люминесцентного спектрального анализа клеток железистого желудка цыплят с использованием флуорохрома «Stains all» // Ученые записки КГАВМ. – 2013. – Т. 213. – С. 6-11.
5. Haag D., Tschahargane C., Goerttler K. Simultaneous differential staining of nucleic acids and proteins in histological tissues by means of J-band effect // Histochemie. – 1971. – V. 26. – P. 190-193.
6. Dahlberg A.E., Dingenon C.W., Peacock A.C. Electrophoretic characterization

of bacterial polyribosomes in agaroseacrylamide composite gels // J. Mol. Biol. – 1969. – V. 41. – P. 139-147.

7. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клеток [Электронный ресурс]: учебное пособие. – Пушкино: Электронное изд-во «Аналитическая микроскопия», 2002. – Режим доступа: <http://cam.psn.ru>: Р.В. Гуркин, свободный. – Загл. с экрана. – № гос. регистрации 6072 от 4 февраля 2002 г.

**References**

1. Ol'khovik O.P. Klinicheskoe proyavlenie i patologoanatomicheskaya kartina klebsielleza broilerov v eksperimental'nykh i proizvodstvennykh usloviyakh / Politematicheskii setevoi elektronnyi nauchnyi zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. - 2009. - № 49. - S. 166-172.
2. Migaesh V.S. Farmako-toksikologicheskaya kharakteristika dioksinora oral'nogo i ego effektivnost' pri kolibakterioze ptitsy. - Avtoref. dis. na soisk. uch. st. kand. veterin. nauk. - Voronezh, 2013. - S. 3.
3. Polomoshnov N., Malysheva L.A. Monitoring epizooticheskoi situatsii pri sal'monelleze kur // Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii. - 2011. - № 2. - S. 6-9.
4. Akchurin S.V., Larionov S.V. Novyi metod lyuminestsentnogo spektral'nogo analiza kletok zhelezistogo zheludka tsyplyat s ispol'zovaniem fluorokhroma «Stains all» // Uchenye zapiski KGAVM. - 2013. - T. 213. - S. 6-11.
5. Haag D., Tschahargane C., Goerttler K. Simultaneous differential staining of nucleic acids and proteins in histological tissues by means of J-band effect // Histochemie. - 1971. - V. 26. - P. 190-193.
6. Dahlberg A.E., Dingenon C.W., Peacock A.C. Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in agaroseacrylamide composite gels // J. Mol. Biol. - 1969. - V. 41. - P. 139-147.
7. Karnaukhov V.N. Lyuminestsentnyi analiz kletok [Elektronnyi resurs]: uchebnoe posobie - Pushchino. Elektronnoe iz-vo «Analiticheskaya mikroskopiya». - 2002. - Rezhim dostupa: <http://cam.psn.ru>: R.V. Gurkin, svobodnyi. - Zagl. s ekrana. - № gos. registratsii 6072 ot 4 fevralya 2002 g.

