

# Использование микроспектрального метода для оценки функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях

*С.В. Акчурин, к.в.н., Саратовский ГАУ*

В настоящее время в биологии и медицине для диагностики и дифференциальной диагностики различных патологических процессов широко применяется люминесцентно-микроскопический метод, обладающий высокой специфичностью, чувствительностью и информативностью. Уникаль-

ные возможности люминесцентной микроскопии были использованы в ветеринарной медицине для диагностики вирулентности поражающих кожу и волосы грибов *Microsporium canis* и бешенства животных [1, 2]. Однако визуально обнаруживаемую в этих случаях флуоресценцию авторы предлагали оценивать на основании субъективного восприятия цветового оттенка её светового потока, что в

значительной степени снижало диагностическую значимость предлагаемых методов исследования.

Для повышения достоверности интерпретации результатов в ветеринарной медицине был разработан метод микроспектрального люминесцентного анализа, который обеспечивает объективную регистрацию и соответственно оценку полученных данных. Данный метод позволяет выявлять внутриклеточные изменения соотношений нуклеиновых кислот (НК) и белков при изучении гистологических срезов железистого желудка цыплят, флуорохромированных люминесцентным метакроматическим красителем «Stains all» [3].

Возможность улавливать с помощью данного метода ранние биохимические сдвиги, которые развиваются в клетках до появления характерной клинической и патоморфологической картины воспалительного процесса, может играть решающую роль не только для диагностики, но и дифференциальной диагностики заболеваний в ранние сроки их развития.

До настоящего времени острые желудочно-кишечные инфекции (эшерихиоз, сальмонеллёз и клебсиеллёз) представляют серьёзную угрозу для птицеводческих хозяйств из-за массовой гибели птиц. Их причиной являются, как правило, трудно диагностируемые патологические метаболические изменения, развивающиеся в клетках внутренних органов на начальных этапах заболевания, что затрудняет своевременную постановку правильного диагноза. Поскольку первой мишенью на пути проникновения возбудителей кишечных инфекций в организм птицы является слизистая оболочка железистого желудка, целью настоящей работы стала оценка функционального состояния эпителия её альвеолярных желёз методом люминесцентного спектрального анализа при эшерихиозе, сальмонеллёзе и клебсиеллёзе птиц.

**Материал и методы исследования.** Исследования проведены на 750 цыплятах породы хайсек коричневый, взятых из благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства. Цыплята по принципу аналогов были разделены на четыре группы: три опытные (по 200 цыплят) и одна контрольная (150 цыплят). Заражение цыплят опытных групп проводили на вторые сутки их жизни пероральным путём с помощью однограммового шприца и иглы с булавовидной напайкой на конце. Цыплят I опытной гр. заражали бактериями *Salmonella enteritidis* в разведении 200 млн бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,2 мл/гол. Цыплят II опытной гр. инфицировали бактериями *Escherichia coli* в разведении 200 млн бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,2 мл/гол, цыплят III опытной гр. — бактериями *Klebsiella pneumoniae* 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 объёме 0,4 мл/гол.

Убой птиц контрольной и опытных групп проводили на 1, 2, 4, 5 и 6-е сутки после заражения. Гистопрепараты толщиной 4–7 мкм изготавливали на микротоме «Mikrom HM450» (Германия) из парафиновых блоков кусочков железистого желудка, фиксированного в 10-процентном нейтральном забуференном водном растворе формалина.

Общую картину микроскопических изменений изучали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилин-эозином, люминесцентно-микроскопические характеристики — на гистопрепаратах, окрашенных 10-4М 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 желёз слизистой оболочки железистого желудка цыплят. Величину интенсивности люминесценции регистрировали в синей ( $I_{484}$ ) и красной ( $I_{620}$ ) областях её спектра и по полученным данным определяли коэффициенты соотношений НК и белков в соответствии с разработанной методикой [3]. Статистический анализ результатов проводили по стандартным программам Microsoft Excel XP.

**Результаты исследования.** При сравнительной визуальной оценке микроскопических изменений, обнаруженных в гистологических препаратах железистого желудка птицы 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, характеризующуюся сочетанием синего, зеленоватого и малиново-красного цветов с разной степенью интенсивности на различных его участках, отражающую особенности распределения НК и белков. При изучении люминесцентных спектральных характеристик, полученных с флуорохромированных гистопрепаратов, выявлена определённая закономерность в динамике интенсивности люминесценции эпителия альвеолярных желёз (рис. 1–3). Так, у цыплят, больных сальмонеллёзом, в течение изучаемого периода интенсивность люминесценции данных клеток постепенно усиливалась как в синей ( $I_{484}$ ), так и в красной ( $I_{620}$ ) области её спектра (рис. 1). В 1-е сутки заболевания её величина была минимальной, а на 6-е сутки достигала своего максимального значения. Это, вероятнее всего, является следствием усиления функциональной активности эпителиальных клеток в ответ на развитие воспалительного процесса.

Иная картина наблюдалась в спектрах люминесценции клеток железистого желудка птиц, больных эшерихиозом (рис. 2). На 2-е сутки вели-

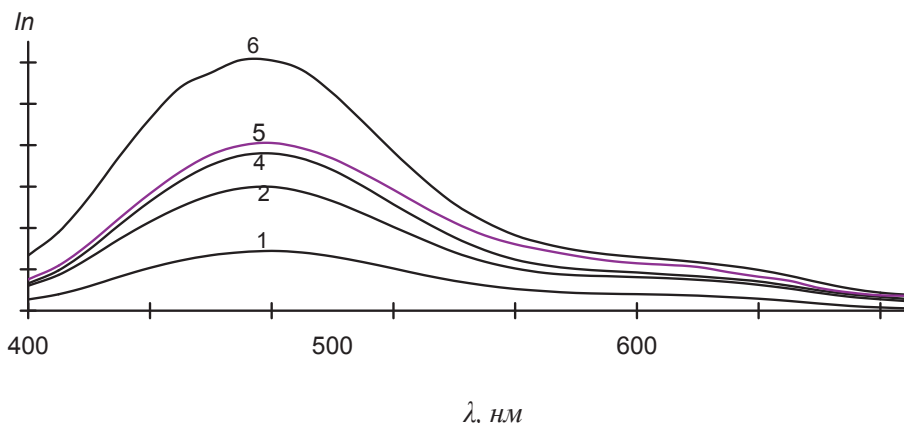


Рис. 1 – Спектры люминесценции клеток эпителия альвеолярных желёз слизистой оболочки железистого желудка цыплят I опытной группы в первые (1), вторые (2), четвёртые (4), пятые (5) и шестые (6) сутки после заражения. Гистологические срезы. Окраска «Stains all». По оси ординат – интенсивность люминесценции ( $I_n$ ), по оси абсцисс – длина волны ( $\lambda$ , нм)

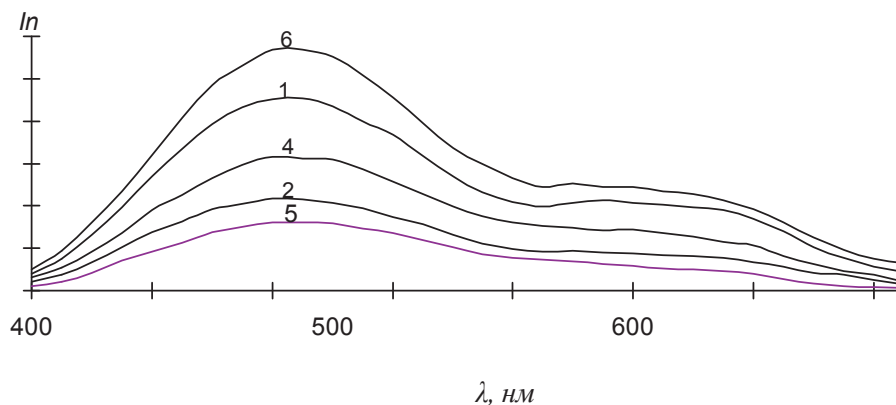


Рис. 2 – Спектры люминесценции клеток эпителия альвеолярных желёз слизистой оболочки железистого желудка цыплят II опытной группы в первые (1), вторые (2), четвёртые (4), пятые (5) и шестые (6) сутки после заражения. Гистологические срезы. Окраска «Stains all». По оси ординат – интенсивность люминесценции ( $I_n$ ), по оси абсцисс – длина волны ( $\lambda$ , нм)

чина  $I_{484}$  и  $I_{620}$  снижалась, на 4-е сутки – несколько возрастала, а на 5-е сутки вновь снижалась, достигая наименьших значений. На 6-е сутки интенсивность люминесценции резко возрастала и имела самое высокое значение. Указанные изменения свидетельствуют о различном функциональном состоянии эпителия альвеолярных желёз в разные сроки развития эшерихиоза.

У цыплят, больных клебсиеллёзом, с 1-х по 4-е сутки заболевания отмечали постепенное возрастание  $I_{484}$  и  $I_{620}$ . К 4-м суткам их значения становились максимальными, что являлось следствием наибольшей функциональной активности эпителиальных клеток (рис. 3). На 5-е сутки интенсивность люминесценции как в синей, так и в красной части спектра несколько снижалась, а к 6-м суткам уменьшалась настолько, что значения её были ниже, чем в 1-е сутки развития инфекционного процесса. Это свидетельствует о резком снижении функциональной активности эпителия альвеолярных желёз к 6-м суткам заболевания.

Увеличение/уменьшение  $I_{484}$  по сравнению с ростом/снижением  $I_{620}$  в эпителиальных клетках зависит не только от видов кишечных инфекций,

но и сроков их развития. Данное обстоятельство нашло отражение в динамике изменений показателей коэффициентов соотношений НК и белков у птиц контрольной и опытных групп (рис. 4). На рисунке 4 видно, что динамика коэффициентов  $I_{484}/I_{620}$  у цыплят контрольной группы укладывалась в картину умеренного постепенного увеличения значений коэффициентов в исследуемый период, что могло быть следствием постепенного и опережающего увеличения  $I_{484}$  относительно роста  $I_{620}$  (рис. 4, IV). На кривых коэффициентов соотношений НК и белков в группе птиц, больных эшерихиозом и сальмонеллёзом, отмечалось несколько пиков повышения их значений, причём их местоположение определялось видом кишечной инфекции. Так, у цыплят, больных эшерихиозом (рис. 4, II), высокое значение коэффициента  $I_{484}/I_{620}$  наблюдалось на 2-е и 5-е, у больных сальмонеллёзом (рис. 4, I), – на 1-е и 4-е, у больных клебсиеллёзом (рис. 4, III) – на 1, 4 и 6-е сутки заболевания.

После статистической обработки полученных данных были получены дифференциально-диагностические критерии оценки функционального состояния эпителия альвеолярных желёз

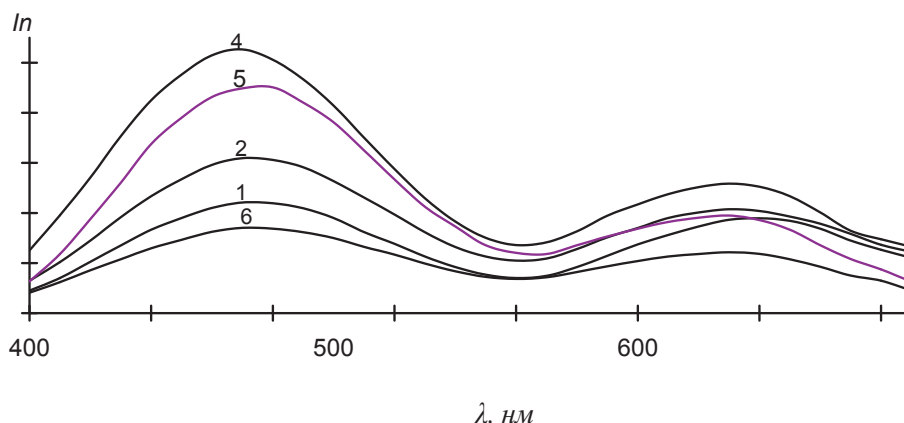


Рис. 3 – Спектры люминесценции клеток эпителия альвеолярных желёз слизистой оболочки железистого желудка цыплят III опытной группы в первые (1), вторые (2), четвёртые (4), пятые (5) и шестые (6) сутки после заражения. Гистологические срезы. Окраска «Stains all». По оси ординат – интенсивность люминесценции ( $I_n$ ), по оси абсцисс – длина волны ( $\lambda$ , нм)

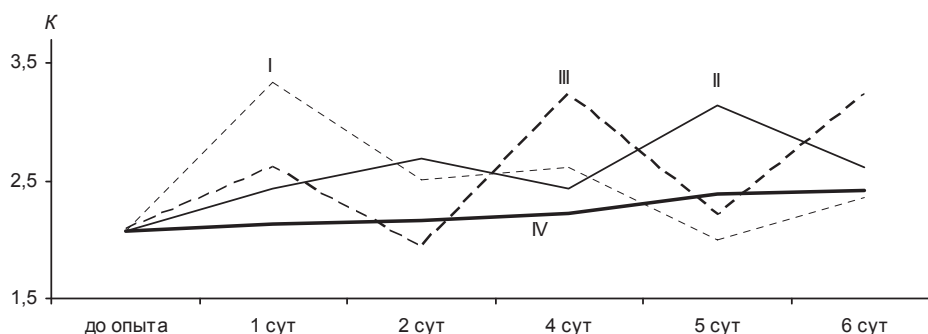


Рис. 4 – Изменение показателей коэффициентов соотношений НК и белков (K) в клетках эпителия альвеолярных желёз слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной (IV) и опытных групп (I – сальмонеллёз, II – эшерихиоз, III – клебсиеллёз). По оси ординат – коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков (K), по оси абсцисс – сутки после заражения (сут.)

Дифференциально-диагностические критерии оценки функционального состояния эпителия альвеолярных желёз слизистой оболочки железистого желудка цыплят при эшерихиозе, сальмонеллёзе и клебсиеллёзе

Группа	Коэффициенты соотношений НК и белков (K) в 1-6-е сутки после заражения				
	1	2	4	5	6
I (сальмонеллёз)	$\geq 3,34$	2,43–2,51	2,72–2,97	$\leq 2,0$	$\leq 2,26$
II (эшерихиоз)	2,21–2,47	$\geq 2,69$	2,47–2,53	$\geq 3,14$	2,82–3,04
III (клебсиеллёз)	2,72–3,01	$\leq 1,93$	$\geq 3,24$	2,19–2,32	$\geq 3,24$
IV (контроль)	$\leq 2,13$	2,03–2,12	$\leq 2,23$	2,51–2,78	2,45–2,61

слизистой оболочки железистого желудка цыплят при эшерихиозе, сальмонеллёзе и клебсиеллёзе на ранних стадиях их развития (табл.).

**Выводы.** Проведённые исследования показали, что с помощью метода люминесцентного спектрального анализа эпителия альвеолярных желёз слизистой оболочки железистого желудка цыплят можно оценить функциональное состояние этих клеток. Установлена зависимость степени функциональной активности эпителиальных клеток от вида и сроков развития кишечных инфекций у цыплят. Выявлено, что изменение функциональной активности клеток данной зоны отражается на динамике выявляемых с помощью использованного метода коэффициентов соотношений НК и белков.

Полученные дифференциально-диагностические критерии могут оказаться полезными при формировании принципиально нового подхода к вопросу создания современных технологий диагностики и профилактики указанных заболеваний, а также лечения птицы.

**Литература**

1. Метлин А.Е., Назаров Н.А., Рыбаков С.С. и др. Диагностика бешенства животных с использованием реакции иммунофлюоресценции // Ветеринария. 2006. № 2. С. 20–23.
2. Ханис А.Ю. Вирулентные и люминесцентные свойства разных штаммов *microsporium canis* // Ветеринария. 2003. № 2. С. 25–27.
3. Акчурин 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.