

На правах рукописи

АКЧУРИН СЕРГЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ДИАГНОСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
КЛЕТОК ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЦЫПЛЯТ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КЛЕБСИЕЛЛЕЗЕ, ЭШЕРИХИОЗЕ,
САЛЬМОНЕЛЛЁЗЕ И ПРОВЕДЕНИИ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ
КЛЕБСИЕЛЛЕЗА**

06.02.01 – Диагностика и терапия животных, патология,
онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Саратов - 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный консультант: Ларионов Сергей Васильевич

доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, заведующий кафедрой «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Официальные
оппоненты:**

Бушукина Ольга Сергеевна

доктор ветеринарных наук, доцент, ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева», профессор кафедры морфологии, физиологии и ветеринарной патологии

Сковородин Евгений Николаевич

доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, заведующий кафедрой морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней

Яковлева Елена Григорьевна

доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Белгородский ГАУ», заведующая кафедрой морфологии и физиологии

**Ведущая
организация**

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Защита состоится «__» _____ 2021 года в 9-00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.01 на базе Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, учебный комплекс № 3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ и на сайте www.sgau.ru

Отзывы направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1. e-mail: vetdust@mail.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Егунова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Птицеводство играет важнейшую роль в обеспечении населения доступным белком животного происхождения. Производство и потребление мяса бройлеров растет во всем мире быстрыми темпами (Cowieson A.J., Selle P.H., 2012). Ожидается, что спрос на мясо птицы и яйца будет продолжать расти вместе с ростом численности населения и увеличением индивидуального потребления. Прогнозируется, что рынок мяса птицы будет увеличиваться независимо от региона или уровня доходов, при этом его рост на душу населения в развивающихся странах будет несколько выше, чем в развитых (FAO, 2017).

Бактериальные инфекции птиц, вызываемые *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, по-прежнему являются серьезной проблемой современного птицеводства, нанося колоссальный экономический ущерб и играя ведущую роль в возникновении болезней человека, и, в первую очередь, пищевых отравлений (Eng S.K. et al., 2015; Wernicki A., Nowaczek A., Urban-Chmiel R., 2017).

Основным способом профилактики заболеваний бактериальной природы в птицеводстве является применение кормовых антибиотиков. Однако, их дальнейшее использование в ближайшей перспективе может быть ограничено под влиянием запретительных мер со стороны правительства или меняющихся запросов и предпочтений потребителей птицеводческой продукции.

Для разработки лекарственных и профилактических препаратов нового типа требуется использование принципиально новых подходов к оценке влияния инфекции и лекарственных средств на организм животного, в первую очередь, на процессы внутриклеточного обмена веществ. С этой целью необходимо расширить применение высокочувствительных биофизических методов, в том числе метода люминесцентного спектрального анализа, позволяющего изучать функциональное состояние клеток и тканей при полном сохранении их морфологической структуры. Следует отметить, что наиболее эффективными являются методы, основанные на применении люминесцирующих меток-красителей (флуорохромов), обладающих способностью связываться со структурными компонентами клеток (белки, нуклеиновые кислоты и т.д.) и в то же время не оказывать влияние на их функцию.

Поэтому возникает необходимость совершенствования методов люминесцентного спектрального анализа применительно к гистологическим срезам с использованием различных специфичных меток-красителей, обладающих флуоресцентными свойствами и взаимодействующих с различными функциональными группами молекул белков и нуклеиновых кислот, позволяющих изучать функциональное состояние клеток и тканей при полном сохранении их морфологической структуры. Это может оказать серьезную помощь как в решении ряда актуальных проблем, стоящих перед ветеринарной наукой, так и в повседневной практике ветеринарных врачей.

Степень разработанности темы. Фундаментальные исследования по применению люминесцентного спектрального анализа в клеточном мониторинге проведены, в том числе, отечественными учеными, и в значительной степени В.Н. Карнауховым (1978), являющимся основателем научной школы в данном направлении. Результаты научных исследований В.Н. Карнаухова позволили осуществлять оценку функционального состояния клеток по изменению содержания в них органических веществ (нуклеиновых кислот, белков).

Большая работа по систематизации биологических маркеров, применяемых для оценки здоровья желудочно-кишечного тракта домашней птицы, проведена коллективом авторов во главе с R. Ducatelle (2018).

Несмотря на многолетний опыт и многочисленные исследования в данном направлении, до сих пор так и не удалось создать комплексную систему, надежно защищающую отрасль птицеводства от инфекционных заболеваний, в том числе, вызываемых энтеробактериями (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез). Высокая степень распространения кишечных инфекций среди домашней птицы, обусловленная недостаточной эффективностью существующих диагностических и профилактических мероприятий, свидетельствует о необходимости создания новых микроспектральных методов диагностики и изучения данных заболеваний.

Цель исследования. Разработка новых методов обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и диагностики функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальных клебсиеллезе, эшерихиозе, сальмонеллезе и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза на основе люминесцентного спектрального анализа с применением флуоресцентных красителей.

Задачи исследования.

1. Провести теоретическое обоснование и разработать новые методы люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуоресцентных красителей.

2. Осуществить экспериментальную апробацию новых методов люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуоресцентных красителей.

3. Провести сравнительный анализ функционального состояния клеток печени и железистого желудка интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом, и подвергавшихся антибиотикотерапии клебсиеллеза.

4. Разработать с помощью новых микроспектральных методов люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального

состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза.

5. Получить новые данные о патогенезе кишечных инфекций (клебсиеллеза, эшерихиоза, сальмонеллеза) у цыплят.

6. Разработать рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят с использованием новых методов люминесцентного спектрального анализа.

Научная новизна. Впервые разработаны новые методы люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуоресцентных красителей.

Впервые разработаны и использованы новые методы оценки функционального состояния клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта птиц при кишечных инфекциях (Пат. № 2469296) и при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза кур (Пат. № 2537165).

Впервые проведен сравнительный анализ функционального состояния клеток печени и железистого желудка интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом, и подвергавшихся антибиотикотерапии клебсиеллеза.

Впервые разработаны люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (эшерихиоз, сальмонеллез, клебсиеллез) и при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза.

На основании разработанных методов и проведенных исследований подготовлены рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии, рекомендованные Научно-методическим советом при Федеральном учебно-методическом объединении по укрупненной группе специальностей и направлений подготовки высшего образования «Ветеринария и зоотехния» в качестве рекомендаций для студентов высших учебных заведений и специалистов хозяйств.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическая значимость работы состоит в том, что результаты исследований расширяют и дополняют сведения по закономерностям функционирования печени и железистого желудка цыплят. Полученные данные имеют значение для гистологии, физиологии, патоморфологии, патофизиологии, фармакологии в понимании биохимических аспектов функционирования печени и железистого желудка интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом и подвергавшихся антибиотикотерапии, а также позволяют сформулировать новые концепту-

альные направления и перспективные задачи в области создания новых средств лечения и профилактики заболеваний птиц.

Практическая значимость работы состоит в том, что были предложены новые методы люминесцентного спектрального анализа клеток в гистологических срезах, изучены и предложены новые критерии оценки функционального состояния клеток печени и железистого желудка интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом и подвергавшихся антибиотикотерапии клебсиеллеза.

Решена важная практическая задача по оценке влияния антибиотикотерапии на функциональное состояние клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта цыплят.

Разработанные с помощью люминесцентного спектрального анализа клеток критерии функционального состояния печени и железистого желудка интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом, могут быть использованы при совершенствовании методов лечения и профилактики кишечных инфекций птиц.

По результатам исследования зарегистрированы патенты Российской Федерации: № 2469296 «Люминесцентно-микроскопический способ оценки состояния внутриклеточного обмена органических веществ в стенке железистого желудка птиц при клебсиеллезе» от 10.12.2012; № 2537165 «Микроспектральный способ оценки эффективности фармакотерапии в ранние сроки лечения клебсиеллеза птиц антибактериальными препаратами» от 27.12.2014.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе на профильных кафедрах ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», ФГБОУ ВО «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева», ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» и в производственной деятельности ООО Нита-Фарм.

Разработаны рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии.

Методология и методы исследования.

Методологической основой выполненных научных исследований явились работы Э. Пирса (1962), Л.С. Агроскина, Г.В. Папаяна (1977), В.Н. Карнаухова (2002), В.В. Салаутина (2004), Н.А. Карнауховой, Л.А. Сергиевич, В.Н. Карнаухова (2010). Результаты исследований получены с использованием высокочувствительного метода люминесцентного спектрального анализа, клинического, патологоанатомического, гистологического, люминесцентно-микроскопического и статистического методов исследований, что позволило определить функциональное состояние клеток печени и железистого желудка интактных цыплят, цыплят экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом и подвергавшихся антибиотикотерапии клебсиеллеза.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новые методы люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуоресцентных красителей.

2. Сравнительный анализ функционального состояния клеток печени и железистого желудка интактных цыплят, цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом, и подвергавшихся антибиотикотерапии клебсиеллеза.

3. Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, сальмонеллез, эшерихиоз) и при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза.

Степень достоверности и апробация результатов.

Основные положения, заключение и практические предложения, сформулированные в диссертации, отвечают цели и задачам работы, а экспериментальные исследования проведены на сертифицированном современном оборудовании. Достоверность полученных результатов проанализирована и подтверждена статистической обработкой данных.

Материалы исследований, полученные в ходе выполнения диссертации, были представлены и обсуждались на научно-практических конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов: VII Всероссийской научно-практической конференции «Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития» (Саратов, 2007); Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения – 2010» (Саратов, 2010); Всероссийской научно-практической конференции «Современные научно-практические достижения в ветеринарии» (Киров, 2012); Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития» (Саратов, 2012); Национальной научно-практической конференции «Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития отечественного агропромышленного комплекса» (Рязань, 2019); Международной научной конференции, посвященной 125-летию со дня рождения В.С. Немчинова (Москва, 2020); Международной научно-практической конференции «От инерции к развитию: научно-инновационное обеспечение АПК» (Екатеринбург, 2020); Всероссийской (национальной) научно-практической конференции «Актуальные вопросы развития аграрного сектора экономики Байкальского региона» (Улан-Удэ, 2020); XV Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – сельскому хозяйству» (Барнаул, 2020); Международной конференции «АРИТЕСН-II - 2020: Прикладная физика, информационные технологии и инжиниринг» (Красноярск, 2020); Международной научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, посвященной 155-летию РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, 2020).

Личный вклад соискателя. В работе представлены данные исследований, проведенных в период с 2007 по 2020 гг. Автором определены научная проблема, цель, задачи и модель исследования. Лично проведены экспериментальные исследования с использованием клинических, анатомических, патологоанатомических, гистологических, люминесцентно-микроскопических и статистических методов. Осуществлен анализ, обобщение результатов и формулирование выводов.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликована 40 научных работ, которые отражают основное содержание диссертации. Из них 21 статья в рецензируемых научных журналах, включённых в Перечень ВАК Минобрнауки РФ, 3 в изданиях, включенных в базу данных Scopus. По материалам диссертации изданы 1 монография и 1 рекомендации. На основании результатов научных исследований выданы 2 патента РФ на изобретения. Общий объем публикаций составляет 27,24 п.л., из них 25,23 п.л. принадлежат лично соискателю.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 348 листах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследований и их анализ, обсуждение полученных результатов, заключение, список сокращений, список литературы, список иллюстративного материала, приложения. Список литературы содержит 579 источников, в том числе 430 иностранных. Работа содержит 24 таблицы, 87 рисунков, 10 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Работа выполнялась в период с 2007 по 2020 годы на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева». Научные эксперименты проводились на базе ФГБУ «Саратовская межобластная ветеринарная лаборатория».

Предметом исследования являлось функциональное состояние клеток печени и железистого желудка интактных цыплят, цыплят при патологическом состоянии, вызванном патогенными энтеробактериями (*Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella*), и при проведении антибактериальной терапии клембиеллеза.

Выполнение диссертационной работы включало в себя 4 этапа.

На **первом этапе** было проведено теоретическое обоснование возможности разработки и применения новых методов обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток органов желудочно-кишечного тракта цыплят на основе люминесцентного спектрального анализа с применением флуоресцентных красителей.

На **втором этапе** были разработаны новые методы люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки

функционального состояния клеток печени и желудочно-кишечного тракта птиц с применением флуоресцентных красителей.

На **третьем этапе** было осуществлена экспериментальная апробация новых методов обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток печени и желудочно-кишечного тракта интактных цыплят, цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза, осуществлен сравнительный анализ функционального состояния клеток печени и железистого желудка интактных цыплят, цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза, разработаны люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят.

На **четвертом этапе** были разработаны рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии.

Для экспериментальной апробации разработанных новых методов было проведено два эксперимента.

В ходе первого эксперимента цыплят породы Хайсекс коричневый (петушки) заражали полевыми штаммами культур *Escherichia coli* серотип 078, *Klebsiella pneumoniae* подвид *rhinoscleromatis*, *Salmonella enteritidis*. Культуры получали во ФГБУ «Саратовская межобластная ветеринарная лаборатория».

Цыплята по принципу аналогов были разделены на 4 группы: 3 опытные (по 250 цыплят) и 1 контрольная (200 цыплят). Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10 %. Животных взвешивали на весах OHAUS PA2102C. На клетке была размещена этикетка с указанием названия опыта, его продолжительности, номер группы, количество цыплят, ответственное лицо и т.д. Заражение цыплят опытных групп проводили смывом с агара односуточных культур пероральным путем на 2 сутки жизни при помощи шприца и иглы с булавовидной напайкой на конце. Концентрацию бактериальных клеток определяли при помощи набора оптических стандартов мутности по Тарасевичу Л.А. (содержание 850 млн бактериальных клеток в 1 мл).

Цыплят I опытной группы инфицировали бактериями *Klebsiella pneumoniae* в разведении 2,5 млрд бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,4 мл/голову, цыплят II опытной группы – бактериями *Escherichia coli* в разведении 200 млн бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,2 мл/голову, цыплят III опытной группы – бактериями *Salmonella enteritidis* в разведении 200 млн бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,2 мл/голову.

Цыплятам I контрольной группы пероральным путем вводили физиологический раствор в объеме 0,4 мл/голову.

В ходе второго эксперимента цыплята по принципу аналогов были разделены на 3 группы: 2 опытные (по 300 цыплят) и одну контрольную (300 цыплят). Подбор цыплят осуществляли таким же способом, как и при проведении первого эксперимента.

Заражение цыплят опытных групп (IV и V) проводили смывом с агара односуточных культур пероральным путем на 2 сутки жизни при помощи шприца и иглы с булавовидной напайкой на конце. Цыплят инфицировали бактериями *Klebsiella pneumoniae* подвид *rhinoscleromatis* в разведении 2,5 млрд бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,4 мл/голову. Цыплятам II контрольной группы пероральным путем вводили физиологический раствор в объеме 0,4 мл/голову.

Лечение цыплят V опытной группы проводили после появления клинических признаков заболевания и бактериологического подтверждения диагноза «Клебсиеллез» на 5 день после заражения (7-е сутки жизни) с помощью лекарственного средства «Энрофлон» (действующее вещество – энрофлоксацин, производитель ИП «ВИК – здоровье животных») в соответствии с инструкцией к препарату путем дачи с водой в разведении 1 мл препарата на 10 л воды в течение 5 суток.

Животных в ходе экспериментов содержали в виварии ФГБУ «Саратовская межобластная ветеринарная лаборатория» в соответствии с санитарными правилами и на стандартном рационе. Цыплят содержали в клетках по 20 голов в каждой. Цыплят, разделенных на группы, содержали в отдельных помещениях. Во всех опытах по мере роста и развития цыплят регулировали уровень поилок и кормушек. Показатели микроклимата помещений в ходе экспериментов поддерживались на уровне, установленном Рекомендациями по клеточному содержанию породы Хайсекс Браун. Перед заражением у цыплят отбирали корм и воду.

В первом опыте на 1–4, 6–8, 10, 11, 13, 15, 21, 30 сутки жизни цыплят проводили их эвтаназию путем транслокации шейных позвонков с использованием средств для наркоза (по 15 голов в каждой группе). Животные подвергались детальному вскрытию с подробным протоколированием и фотосъемкой патологических изменений. Во втором опыте эвтаназию цыплят путем транслокации шейных позвонков с использованием средств для наркоза проводили на 1–13, 15, 21, 27 и 30 сутки жизни цыплят (по 15 голов в каждой группе). Животные подвергались детальному вскрытию с подробным протоколированием и фотосъемкой патологических изменений.

У цыплят отбирали кусочки внутренних органов (желудка и мышечного желудка, тонкого и толстого кишечника, печени, поджелудочной железы и др.) и др. Взятые объекты фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина в течение 7-10 дней с последующей промывкой в течение 24 часов в проточной воде и обезвоживанием в спиртовой батарее (с концентрацией этилового спирта от 60 % до 100 %). Промежуточной средой являлась смесь, состоящая из равных объемов 100 % хлороформа и 100 % этилового спирта, две порции 100 % хлороформа по 10 минут в каждой, насыщенный

раствор парафина в 100 % хлороформе при температуре 37 °С с последующим пропитыванием в четырех порциях парафина при температуре 56 °С (по 30 минут в каждой из первых трех и 24 часа в последней порции парафина, в которую добавляли воск), затем заливали в парафин с воском.

Из парафиновых блоков на микротоммах «Reichert Wien» (Германия), «Mikrom HM450» (Германия) изготавливали гистологические срезы толщиной 4-7 мкм, которые располагали на химически чистых предметных стеклах, на одном предметном стекле – гистологические срезы контрольной и опытных групп. Их окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике – для получения общей картины микроскопических изменений. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе МБИ-15 с использованием окуляра 16× и объективов 9×, 40 и 90×. Обнаруженные изменения фиксировали с использованием фотоаппарата Canon Power Shot A 460 (Canon Ink, Japan).

Люминесцентно-микроскопическое исследование проводили в соответствии с разработанными новыми методами. Люминесцентный спектральный анализ клеток для обнаружения и определения количественного содержания (в условных единицах) органических веществ в гистологических срезах внутренних органов цыплят осуществляли на микроскопе-спектрофотометре МСФУ-К (ОАО «ЛОМО» г. Санкт-Петербург), дополнительно снабженного трехфазным ИБП «Eaton» («Powering Business Worldwide», США). Фотографирование окрашенных флуорохромами препаратов осуществлялось с помощью микроскопа Leica DM2500.

Показатели, учитываемые в опытах: живая масса – путем индивидуального взвешивания всего поголовья на электронных лабораторных весах ВК-3000 с точностью $\pm 0,1$ г в суточном возрасте и далее еженедельно; сохранность – путем учета падежа; среднесуточный прирост – отношение абсолютного прироста к продолжительности учетного периода.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартным процедурам с помощью приложения Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp. USA), с использованием t – критерия Стьюдента для оценки достоверности различий между выборками для опытной и контрольной групп. По результатам вычисления среднеарифметического (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$) для выборки определяли стандартную ошибку среднеарифметического ($\pm SEM$) и границы его доверительного интервала с учетом коэффициента Стьюдента $t(n, p)$ при уровне значимости 95 % ($p = 0,05$) и числе измерений n .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ АНАЛИЗ

Теоретическое обоснование возможности разработки новых методов обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят на основе люминесцентно-спектрального анализа с применением флуоресцентных красителей.

Для изучения внутриклеточной регуляции обмена веществ в настоящее время используются методы флуоресцентной диагностики и двухволновые микрофлуориметры, позволяющие изучать физико-химические процессы, протекающие непосредственно в живой клетке и ее органоидах (Карнаухов В.Н., 1978; Карнаухов В.Н. и др., 1987). Для изучения данных процессов используют как собственную люминесценцию внутриклеточных соединений, так и вторичное свечение, индуцируемое взаимодействием флуорохромов с компонентами клетки (Karnaukhova N., Sergievich L., Karnaukhov V., 2010).

Изменение функциональной и синтетической активности клетки предлагается оценивать по изменению содержания в них нуклеиновых кислот и белков. Для этого используются способы, предусматривающие регистрацию величины интенсивности люминесценции флуорохромов, связанных с компонентами нуклеиновых кислот и белков (Kaspersson T., 1950; Браше Ж., 1960; Karnaukhova N., Sergievich L., Karnaukhov V., 2010). Оценка функционального состояния при этом осуществляется с помощью определения количественного определения нуклеиновых кислот и белков, а также соотношения органических веществ «ДНК/РНК», «ДНК/Белок» и др. Слабой стороной применяемых способов является техническая сложность определения количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в клетках и тканях, так как величина интенсивности люминесценции зависит не только от количества содержащегося в исследуемом участке органического вещества, но и от толщины фотометрируемого участка гистологического среза. Однако толщина гистологического среза всегда является неравномерной, что обусловлено особенностями строения биологических объектов. Поэтому, несмотря на заведомо одинаковое количество вещества в какой-либо определенной структуре гистопрепарата, величина интенсивности люминесценции этой структуры при ее регистрации на разных участках будет иметь различное значение, поскольку будет зависеть не только от количества искомого вещества, но и от толщины гистологического среза в области его фотометрирования.

В связи с тем, что площадь фотометрируемых участков очень мала, так как ограничена размером измерительной фотометрической диафрагмы спектрофотометрической приставки, представлялось возможным учитывать толщину среза, условно принимая за нее величину оптической плотности данного участка. Известно, что между оптической плотностью и толщиной поглощающего слоя (в том числе концентрацией вещества в образце) существует прямая пропорциональность (Агроскин Л.С., Папаян Г.В., 1977). Поэтому при определении оптической плотности фотометрируемых участков, имеющих незначительную, но все же различную окраску, учитывали ее значение при такой длине волны, при которой проходящий через изучаемый участок поток света практически не поглощался имеющимися в срезе красителями. Поток света с такой длиной волны использовали для определения оптической плотности фотометрируемого участка гистологического среза, которая ус-

ловно принималась за его толщину. Учет толщины фотометрируемого участка позволил определять количество органических веществ в сопоставимых условных единицах. Величину оптической плотности рассчитывали по известной формуле (1):

$$D = \lg \frac{I_0}{I_1}, \quad (1)$$

где D – величина оптической плотности; I_0 – величина светового потока, прошедшего рядом со срезом; I_1 – величина светового потока, прошедшего через фотометрируемый участок гистологического среза.

Вместе с тем значительное влияние на величину интенсивности люминесценции оказывает и индивидуальная особенность строения определенных биологических структур, что обуславливает различную степень интенсивности при одинаковом количестве вещества в определенных структурах, что в свою очередь приводит к необходимости изменения параметров режима фотометрирования. В связи с этим для получения сопоставимых результатов, кроме учета толщины исследуемого участка, применяли эталон, имеющий постоянный спектр люминесценции. В качестве такого эталона использовали определенную величину интенсивности люминесценции промышленно изготавливаемого и имеющего постоянный спектр люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм (далее – урановое стекло). Таким образом, с целью получения сопоставимых результатов и повышения точности анализа количественного содержания органических веществ в гистологических срезах нормировали величину интенсивности люминесценции исследуемого участка к величине его оптической плотности и величине интенсивности эталона.

Так, количество органического вещества рассчитывали по формуле (2):

$$N = \frac{I_{max}}{D \cdot \mathcal{E}}, \quad (2)$$

где N – количество искомого органического вещества в условных единицах; I_{max} – максимальная величина интенсивности люминесценции исследуемого участка; D – величина оптической плотности фотометрируемого участка, используемая в качестве его толщины; \mathcal{E} – величина интенсивности люминесценции уранового стекла.

Выбор длин волн, при которых учитывали значения I_{max} , D и \mathcal{E} , зависел от вида внутреннего органа цыплят, изучаемых клеток и используемого флуорохрома и определялся в каждом конкретном случае. Для получения конечного результата во внимание принимали наибольшее из трех полученных значений количественного содержания (в условных единицах) органического вещества в клетках для исключения фактора влияния аутолитического процесса в посмертно измененной ткани и повышения точности анализа.

При выполнении данного раздела работы обязательным являлось условие, согласно которому гистологические срезы были получены при одинаковых условиях их изготовления, а спектры люминесценции и оптической

плотности фотометрируемых участков, а также уранового стекла – при одинаковых параметрах режима работы оборудования в каждом конкретном случае.

Повторное фотометрирование одного и того же участка окрашенного гистологического среза не проводили, так как оно сопровождалось снижением интенсивности люминесценции, обусловленного первичным воздействием на него светового потока (Карнаухов В.Н., 1978).

Новые методы люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуоресцентных красителей.

1. Одноволновый метод с этидиумом бромидом. Учитывая высокую чувствительность и избирательность при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами (РНК и ДНК) этидиума бромида (Le Pecq I.B., Paoletti C., 1966), он был выбран в качестве люминесцентной метки-красителя на нуклеиновые кислоты. Для исследований использовался этидиум бромида (95 %), фасовка 5 г., производства Acros Organics.

Для выявления нуклеиновых кислот в клетках железистого желудка цыплят был разработан следующий способ их окраски: помещенные на химически чистые предметные стекла гистологические срезы подвергали депарафинированию в двух порциях орто-ксилола, затем помещали их на 3 минуты в каждую из двух порций 100 % этилового спирта и на 5 минут в дистиллированную воду, после чего окрашивали в течение 4 минут водным раствором этидиума бромида в концентрации 10^{-4} М, промывали дистиллированной водой 1 минуту, высушивали препарат на воздухе при комнатной температуре в течение 10 минут, просветляли в ксилоле несколько секунд и заключали в синтетическую среду (дистрен-дибутилфталатксилола). Для исключения возможного влияния люминесценции, возникающей в тканях вследствие фиксации формалином белков, содержащих amino-, imino- и амидогруппы (Пирс Э., 1962), получали спектр люминесценции неокрашенных и окрашенных этидиумом бромида гистологических срезов железистого желудка. Визуальное исследование особенностей люминесценции неокрашенных гистопрепаратов показало, что гистологический срез обладает сине-зеленым свечением, в спектре люминесценции которого максимум интенсивности люминесценции соответствует длине волны, равной 480 нм.

В окрашенных флуорохромом гистопрепаратах на общем фоне сине-зеленого свечения ткани наблюдали люминесценцию ярко-красного цвета, наиболее выраженную в покровном эпителии слизистой оболочки, эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки и в клетках мышечного слоя (рисунок 1).

В спектре люминесценции окрашенного препарата имелось два максимума интенсивности люминесценции – при длине волны 480 нм, обязанного фиксированным формалином белкам и регистрируемого в сине-зеленой час-

ти спектра, и при длине волны 616 нм, регистрируемого в красной области спектра и обусловленного этидиумом бромидом, находящегося в комплексе с нуклеиновыми кислотами. Для определения длины волны, при которой вычисляли оптическую плотность фотометрируемого участка окрашенного гистологического среза железистого желудка, с него снимали спектр поглощения, а затем с участка, расположенного рядом со срезом, снимали спектр. С учетом полученных данных рассчитывали спектр оптической плотности. В спектре оптической плотности выявляли длину волны, при которой проходящий через фотометрируемый участок поток света практически не поглощался флуорохромом этидиумом бромидом и имел наименьшую величину.

Длина волны, отвечающая этим требованиям, соответствовала 540 нм. При данной длине волны учитывали величину оптической плотности при расчете количественного содержания нуклеиновых кислот.

При этих же параметрах режима работы получали спектр люминесценции уранового стекла, равной 540 нм, учитывали в качестве эталона при расчете количественного содержания нуклеиновых кислот.

С учетом полученных данных количество нуклеиновых кислот в условных единицах в исследуемом участке гистологического среза железистого желудка цыплят рассчитывали по следующей формуле (3):

$$I_{NK} = \frac{I_n}{D_n \cdot I_3}, \quad (3)$$

где I_{NK} – количество нуклеиновых кислот в исследуемом участке; I_n – величина интенсивности люминесценции в исследуемом участке при длине волны, равной 616 нм; D_n – величина оптической плотности данного участка при длине волны 540 нм, используемая в качестве его толщины; I_3 – величина интенсивности люминесценции уранового стекла.

2. Одноволновый метод с ДХТАФ. С целью определения белков, содержащих amino-, imino- и гидроксильные группы, был выбран активный проционовый краситель «ДХТАФ». Для выявления белков в клетках гистологических срезов печени цыплят был разработан следующий способ их окраски: помещенные на предметные химически чистые стекла гистологические срезы подвергали депарафинированию в двух порциях орто-ксилола, затем помещали их на 3 минуты в каждую из двух порций 100 % этилового, после чего окрашивали в течение 6 минут спиртовым раствором ДХТАФ в концентрации 10^{-4} М, промывали дистиллированной водой 2 минуты, высушивали препарат на воздухе при комнатной температуре в течение 10 минут, просветляли в ксилоле несколько секунд и заключали в синтетическую среду (дистрен-дибутилфталатксилола). Для окраски использовали флуоресцентный краситель ДХТАФ производства Sigma-Aldrich. С целью исключения возможного влияния люминесценции, возникающей в тканях вследствие фиксации формалином белков, содержащих amino-, imino- и амидогруппы (Пирс Э., 1962), получали спектр люминесценции неокрашенного и окрашенного ДХТАФ гистологических срезов печени. При визуальном исследовании особенностей люминесценции неокрашенных гистопрепаратов было

установлено, что гистологический срез обладает сине-зеленым свечением, в спектре люминесценции которого максимум интенсивности люминесценции соответствует длине волны, равной 480 нм. В окрашенных флуорохромом гистологических срезах печени люминесценция имела преимущественно ярко-зеленый цвет из-за выраженного свечения гепатоцитов, составляющих паренхиму печени (рисунок 3). В спектре люминесценции данного препарата имелся один максимум интенсивности люминесценции – при длине волны 540 нм, регистрируемый в зеленой области спектра и обязанного своим происхождением амино- и иминогруппам белков гепатоцитов, ковалентно связанных с используемым флуорохромом.

Количество белков в условных единицах в исследуемом участке гистологического среза печени цыплят определяли по следующей формуле (4):

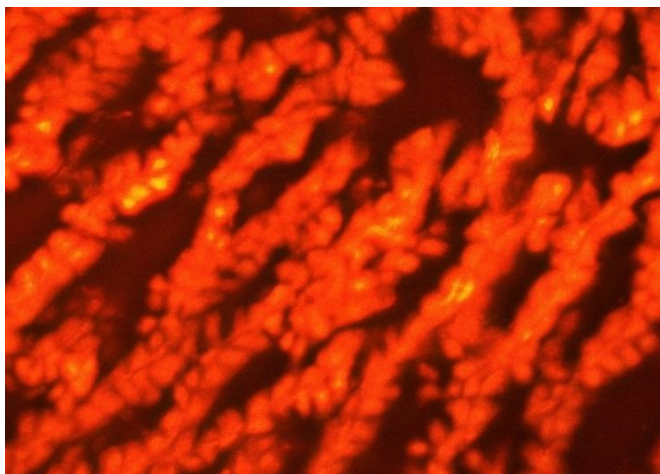
$$I_B = \frac{I_n}{D_n \cdot I_3}, \quad (4)$$

где I_B – количество белков в исследуемом участке; I_n – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка гепатоцитов при длине волны, равной 540 нм; D_n – величина оптической плотности данного участка; при длине волны 450 нм, используемая в качестве его толщины; I_3 – величина интенсивности люминесценции уранового стекла.

3. Двухволновый метод со «Stains all». Метахроматические свойства «Stains all» позволяют ему связываться одновременно с двумя органическими соединениями – нуклеиновыми кислотами и белками, образуя при этом комплексы с разным цветом люминесценции. Данный препарат был выбран для определения количественных соотношений вышеназванных органических веществ в клетках железистого желудка цыплят. Для окраски использовали флуоресцентный краситель «Stains all», 95 %, производства Sigma-Aldrich.

С целью выявления нуклеиновых кислот и белков в клетках был разработан следующий способ их окраски: помещенные на предметные химически чистые стекла гистологические срезы депарафинировали в двух порциях орто-ксилола, затем помещали их на 3 минуты в каждую из двух порций 100 % этилового спирта (на 3 мин.), после чего окрашивали спиртовым раствором «Stains all» в концентрации 10^{-4} М (7 мин.), промывали дистиллированной водой (2 мин.), высушивали на воздухе при комнатной температуре (10 мин.), просветляли в ксилоле (5 сек.) и заключали в синтетическую среду (дистрендибутилфталатксилол).

В окрашенных «Stains all» гистологических срезах железистого желудка наблюдали своеобразную люминесцентно-микроскопическую картину, характеризующуюся сочетанием малиново-красного (рисунок 5), синего (рисунок 6) с разной степенью выраженности на различных участках. Обнаруживаемая визуально в гистологических срезах люминесценция указывала на локализацию нуклеиновых кислот и белков, связанных с флуорохромом.



При расчете коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в покровном эпителии слизистой оболочки учитывали длины волн 484 нм и 628 нм, в клетках соединительной ткани подслизистой основы – 480 нм и 620 нм, в эпителии альвеолярных желез – 484 нм и 620 нм, а в клетках серозной оболочки – 480 нм и 630 нм соответственно.

Количество нуклеиновых кислот (в условных единицах) в исследуемом участке устанавливали по формуле (5):

$$X_p = \frac{I_n}{I_s}, \quad (5)$$

где X_p – количество нуклеиновых кислот в исследуемом участке; I_n – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка при длине волны 480 или 484 нм (в зависимости от вида клеток); I_s – величина интенсивности люминесценции уранового стекла.

Количество белков (в условных единицах) в зоне интереса рассчитывали по формуле (6):

$$Y_p = \frac{I_B}{I_s}, \quad (6)$$

где Y_p – количество белков в исследуемом участке; I_B – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка покровного эпителия слизистой оболочки при длине волны 620, 628 и 630 нм (в зависимости от вида клеток); I_s – величина интенсивности люминесценции уранового стекла.

Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в зоне интереса рассчитывали, принимая во внимание наибольшее из трех полученных значений X_p и Y_p по формуле (7):

$$K_p = \frac{X_{pmax}}{Y_{pmax}}, \quad (7)$$

где K_p – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в зоне интереса в условных единицах; X_{pmax} – наибольшее количество нуклеиновых кислот в условных единицах из трех исследуемых участков; Y_{pmax} – наибольшее количество белков в условных единицах из трех исследуемых участков.

4. Модификация двухволнового метода со Stains all. В основе данного метода лежит определение коэффициентов соотношений органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в эпителии альвеолярных желез слизи-

стой оболочки в окрашенных люминесцентным метакроматическим красителем «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят контрольной и опытной групп по методу, изложенному в предыдущем разделе, с последующим установлением степени изменения функционального состояния клеток и тканей.

По полученным коэффициентам соотношения нуклеиновых кислот и белков проводили сравнение функционального состояния эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной и опытной групп по формуле (8):

$$C = \lambda_1 - \lambda_2, \quad (8)$$

где C – показатель функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка птиц опытной группы; λ_1 – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы; λ_2 – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы.

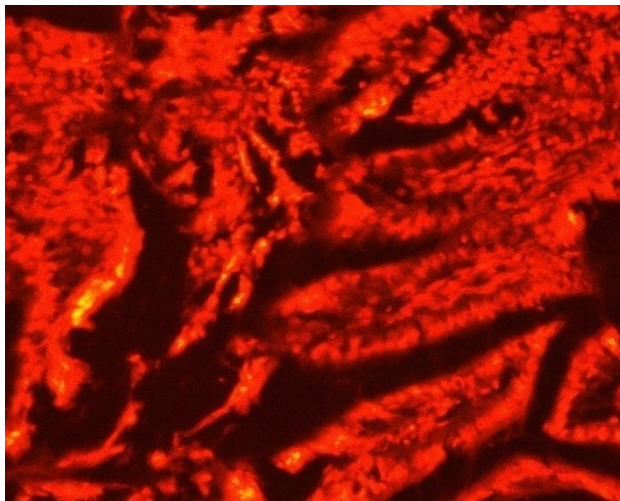
Значения показателя функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка птиц опытной группы (C) интерпретируются следующим образом: чем больше значение показателя, тем больше отклонение функционального состояния исследуемых клеток от контроля. При этом необходимым условием при установлении показателей функционального состояния клеток обследуемой птицы является получение λ_1 и λ_2 при исследовании птиц одной породы и одинакового возраста.

5. Двухволновый метод с этидиумом бромидом и ДХТАФ. В качестве люминесцентной метки-красителя на нуклеиновые кислоты был выбран этидиум бромид, а в качестве маркера белков – ДХТАФ. Для исследований использовали флуоресцентные красители: этидиум бромид (95 %, производство Acros Organics) и ДХТАФ (производство Sigma-Aldrich).

Для одновременного выявления белков и нуклеиновых кислот в клетках железистого желудка цыплят был разработан следующий метод их окраски: помещенные на предметные химически чистые стекла гистологические срезы подвергали депарафинированию в двух порциях орто-ксилола, затем помещали их на 3 минуты в каждую из двух порций 100 % этилового спирта, после чего окрашивали в течение 6 минут спиртовым раствором ДХТАФ в концентрации 10^{-4} М, промывали дистиллированной водой 2 минуты, после чего окрашивали в течение 4 минут водным раствором этидиума бромидом в концентрации 10^{-4} М, промывали дистиллированной водой 1 минуту, высушивали препарат на воздухе при комнатной температуре в течение 10 минут, просветляли в ксилоле несколько секунд и заключали в синтетическую среду (дистрен-дибутилфталатксилола).

При визуальном исследовании гистопрепаратов наблюдали на общем сине-зеленом свечении участки малиново-красного цвета, наиболее выраженные в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железисто-

го желудка. Обнаруживаемая в гистологических срезах малиново-красная люминесценция указывала на локализацию нуклеиновых кислот, связанных с этидиумом бромида (рисунок 7), а зеленая – на локализацию белков, связанных с ДХТАФ (рисунок 8).



Концентрация (количество) каждого из двух органических веществ, изучаемых с помощью двухволнового метода люминесцентного спектрального анализа, определяется величинами интенсивности люминесценции (I) каждой полосы излучения в спектре люминесценции гистологического среза, окрашенного двумя специфическими люминесцентными метками-красителями, при длинах волн, соответствующих максимальным величинам интенсивности люминесценции примененных красителей. Поэтому количество белков и нуклеиновых кислот определяли по величине интенсивности люминесценции полос излучения при указанных длинах волн. Данные спектральные особенности люминесценции ткани железистого желудка птиц установлены при исследовании спектров люминесценции зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят контрольной и опытной групп. Для получения сопоставимых результатов количественного содержания белков и нуклеиновых кислот оно должно быть выражено в условных единицах, что достигается с помощью учета толщины фотометрируемого участка и эталона. В качестве толщины фотометрируемого участка используют величину оптической плотности, которая находится в прямой пропорциональной зависимости от толщины поглощающего слоя, при длине волны, равной 648 нм. Данная длина волны установлена при исследовании спектров оптической плотности фотометрируемых участков зоны эпителия альвеолярных желез. В качестве эталона использовали величину интенсивности люминесценции при длине волны 540 нм промышленно изготавливаемого и имеющего постоянный спектр люминесценции уранового стекла.

Количество белков в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки рассчитывали по формуле (9):

$$B = \frac{I_b}{D \cdot \mathcal{E}}, \quad (9)$$

где B – количество белков в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят; I_b – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят при длине волны 528 нм; D – величина оптической плотности фотометрируемого участка при длине волны 648 нм, используемая в качестве его толщины; \mathcal{E} – величина интенсивности люминесценции уранового стекла.

Количество нуклеиновых кислот в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят рассчитывали по формуле (10):

$$N = \frac{I_n}{D \cdot \mathcal{E}}, \quad (10)$$

где N – количество нуклеиновых кислот в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка; I_n – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка при длине волны 624 нм; D – величина оптической плотности фотометрируемого участка при длине волны 648 нм, используемая в качестве его толщины; \mathcal{E} – величина интенсивности люминесценции уранового стекла.

Среднее значение количества белков в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят рассчитывали по формуле (11):

$$B_c = \frac{1}{5} \sum_{n=1}^5 B_n, \quad (11)$$

где B_c – среднее значение количества белков в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят; B_n – общее количество белков в условных единицах всех фотометрируемых участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят; n – количество фотометрируемых участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят.

Среднее значение количества нуклеиновых кислот в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят рассчитывали по формуле (12):

$$N_c = \frac{1}{5} \sum_{n=1}^5 N_n, \quad (12)$$

где N_c – среднее значение количества нуклеиновых кислот в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят.

стого желудка цыплят; N_n – общее количество нуклеиновых кислот в условных единицах всех фотометрируемых участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят; n – количество фотометрируемых участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят.

Аналогичным способом с гистологического среза железистого желудка цыплят опытной группы, окрашенного специфическими люминесцентными метками-красителями ДХТАФ и этидиумом бромида, получали спектр люминесценции и спектр оптической плотности в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки и проводили их цифровую обработку.

Оценку функционального состояния клеток железистого желудка цыплят опытной группы по количественному содержанию белков (в условных единицах) определяли по формуле $K_b = V_c - V_z$ при помощи следующих величин:

K_b – показатель функционального состояния эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы;

V_c – среднее значение количества белков в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы;

V_{zc} – среднее значение количества белков в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы.

Оценку функционального состояния клеток железистого желудка цыплят опытной группы по количественному содержанию нуклеиновых кислот (в условных единицах) определяли по формуле (13):

$$K_n = N_c - N_z, \quad (13)$$

где K_n – показатель функционального состояния эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы;

N_c – среднее значение количества нуклеиновых кислот в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы;

N_{zc} – среднее значение количества нуклеиновых кислот в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы.

По полученным показателям функционального состояния эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной и опытной групп (K_b , K_n) оценивали степень влияния фармакотерапии на клетки и ткани железистого желудка. При этом чем меньше значение показателя (K_b , K_n), тем большее влияние фармакотерапия оказывает на восстановление функционального состояния исследуемых клеток железистого желудка птиц опытной группы.

Сведения о функциональном состоянии клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальном заражении клебси-

еллезом, эшерихиозом, сальмонеллёзом, полученные при экспериментальной апробации разработанных методов.

Клиническая картина и основные патоморфологические изменения у цыплят при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза. При клебсиеллезе у цыплят на 3 день после заражения отмечали ухудшение общего состояния, потерю аппетита. С 4 по 6 день у 50 % цыплят наблюдали угнетение, потерю аппетита, затруднённое дыхание, крылья опущены, шаткая походка. Цыплята сбиваются в группы по 10-12 голов. С 7 по 10 день цыплята вялые, мало двигаются, у них одышка, кашель, риниты, слезотечение. Цыплята сбиваются в углу клетки, аппетит отсутствует. С 11 по 15 день цыплята вялые, подвижность снижена, дыхание затруднено, аппетит отсутствует. С 16 по 20 день у цыплят перьевого покров матовый, взъерошен. 50 % цыплят опытной группы вялые, мало подвижные. У остальных аппетит удовлетворительный. С 20 по 30 день цыплята заметно отставали в росте, аппетит удовлетворительный, перьевого покров матовый.

Патологоанатомическая картина характеризовалась острым катаральным воспалением железистого и мышечного желудков, тонкого и толстого кишечника, зернистой дистрофией печени и почек, гиперплазией селезенки; миокардитом, катаральной пневмонией.

У цыплят экспериментально зараженных **эшерихиозом** на второй, третий дни после заражения у цыплят каловые массы жидкие, желтовато-коричневого цвета. Аппетит сохранен у всех цыплят. С 4 по 6 день отмечали снижение аппетита и ухудшение общего состояния. Перьевого покров в области клоаки испачкан пометом. Каловые массы светло коричневого цвета. С 7 по 10 день общее состояние цыплят угнетенное, они сбиваются в группы в углу клетки. Фекалии жидкие, коричневого цвета. С 11 по 15 день у цыплят дыхание затруднено, они сидят нахохлившись с открытым клювом и слабо реагируют на внешние раздражители. С 16 по 20 день цыплята вялые, у 40 % цыплят удовлетворительный аппетит. С 21 по 30 день цыплята заметно отставали в росте, аппетит удовлетворительный, перьевого покров матовый. Патологоанатомическая картина характеризовалась фибринозным перикардитом, перигепатитом, аэросаккулитами, серозно-катаральной пневмонией, острым катаральным воспалением железистого и мышечного желудков, тонкого и толстого кишечника, зернистая дистрофия печени с участками некроза, зернистая дистрофия почек. В железистом желудке поверхность слизистой оболочки была покрыта сероватой, не прозрачной, трудно снимаемой слизью, слизистая оболочка набухшая, сосочки выводных протоков желез розового цвета.

При **сальмонеллезе** клинические признаки заболевания у цыплят наблюдали на второй, третий дни после их заражения, каловые массы жидкие, желтовато-коричневого цвета, аппетит удовлетворительный. С 4 по 6 день отмечали ухудшение общего состояния у 50 % цыплят, а также снижение аппетита, каловые массы жидкие, светло коричневого цвета. Перьевого покров в области клоаки испачкан пометом. У некоторых цыплят наблюдали склеива-

ние пушка вокруг клоаки и ее закупорку. С 7 по 10 день общее состояние цыплят угнетенное, они сбиваются в группы в углу клетки. Крылья опущены, дыхание поверхностное, частое. Фекалии жидкие, коричневого цвета. С 11 по 20 день клинические признаки заболевания постепенно исчезали, аппетит у цыплят удовлетворительный. С 21 по 30 день цыплята заметно отставали в росте, аппетит удовлетворительный, перьевой покров матовый. Патологоанатомическая картина при сальмонеллезе характеризовалась зернистой дистрофией печени с единичными очагами некроза, гиперплазией селезенки, миокардитом и серозным перикардитом, некротическо-эрозивным гастритом, острым катаральным энтеритом, катарально-фибринозным и дифтеритическим тифлитом, катаральной пневмонией, зернистой дистрофией почек, нефрозом, гломеруло-нефритом.

Сведения о функциональном состоянии клеток и тканей железистого желудка цыплят, полученные Методом с этидиумом бромида. Апробацию метода проводили на гистологических срезах железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза. Объектом исследования служили клетки покровного эпителия слизистой оболочки, эпителий альвеолярных желез, миоциты мышечного слоя. В качестве примера представлены сведения о функциональном состоянии клеток покровного эпителия слизистой оболочки.

Таблица 1 – Количественное содержание нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп по данным метода с этидиумом бромида, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	Контрольная	Опытные		
		I (клебсиеллез)	II (эшерихиоз)	III (сальмонеллез)
1	10,12±0,36	10,10±0,31	10,31±0,32	10,40±0,33
2	10,29±0,42	10,17±0,42	10,11±0,32	10,09±0,32
3	10,20±0,38	9,58±0,38*	10,40±0,36	8,63±0,26***
4	10,41±0,37	8,34±0,31***	7,38±0,25***	6,71±0,22***
6	10,30±0,36	6,31±0,20***	4,70±0,15***	5,34±0,18***
7	10,60±0,41	3,56±0,11***	3,12±0,12***	4,18±0,16***
8	11,27±0,36	6,18±0,22***	6,81±0,24***	5,42±0,18***
10	11,89±0,38	5,90±0,24***	7,97±0,25***	5,26±0,17***
15	12,00±0,39	5,49±0,20***	5,81±0,19***	4,95±0,18***
21	12,81±0,43	4,28±0,16***	5,89±0,21***	4,32±0,14***
30	13,63±0,45	7,20±0,26***	9,73±0,3***	5,14±0,16***

Примечание: * различие по данному показателю статистически достоверно между опытными группами относительно контрольной (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$)

С возрастом (1 по 30 сутки жизни) у интактных цыплят количественное содержание нуклеиновых кислот (в условных единицах) и функциональная активность клеток покровного эпителия увеличивается. Клетки цыплят опытных групп реагируют снижением функционального состояния. В целом схожую картину изменения функционального состояния клеток железистого желудка цыплят наблюдали при исследовании эпителия альвеолярных желез и миоцитов мышечного слоя. Различия заключались в количестве нуклеиновых кислот в различных видах клеток и в разные сроки экспериментальных заболеваний. Основные сведения представлены в разделе «Заключение».

На основании полученных с помощью метода с этидиумом бромида данных разработаны люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) (таблица 2).

Таблица 2 – Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях по результатам метода с этидиумом бромида, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	Контрольная	Опытные		
		I (клебсиеллез)	II (эшерихиоз)	III (сальмонеллез)
1	9,76-10,48	9,79-10,41	9,99-10,63	10,07-10,73
2	9,87-10,71	9,75-10,59	9,79-10,43	9,77-10,41
3	9,82-10,58	9,20-9,96	10,04-10,76	8,37-8,89
4	10,04-10,78	8,03-8,65	7,13-7,63	6,49-6,93
6	9,94-10,66	6,11-6,51	4,55-4,85	5,16-5,52
7	10,19-11,01	3,45-3,67	3,00-3,24	4,02-4,34

Сведения о функциональном состоянии клеток и тканей железистого желудка цыплят, полученные методом с ДХТАФ. Апробацию метода проводили на гистологических срезах печени цыплят контрольной и опытных групп при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза. Объектом исследования служили гепатоциты (таблица 3).

Таблица 3 – Содержание белков I_B в гепатоцитах цыплят контрольной и опытных групп по данным метода с ДХТАФ, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	Контрольная	Опытные		
		I (клебсиеллез)	II (эшерихиоз)	III (сальмонеллез)
1	1,27±0,01	1,28±0,01	1,27±0,01	1,28±0,01
2	1,47±0,02	1,46±0,02	1,47±0,01	1,46±0,02
3	2,18±0,03	1,93±0,01***	1,94±0,04***	1,95±0,04***
4	2,46±0,02	1,84±0,02***	2,15±0,01***	1,91±0,04***
6	2,74±0,04	1,72±0,02***	2,15±0,02***	1,82±0,04***
7	2,87±0,03	1,92±0,02***	2,27±0,05***	1,80±0,03***
8	2,88±0,04	2,17±0,01***	2,53±0,03***	1,87±0,04***

10	2,89±0,04	2,38±0,02***	2,72±0,02***	1,99±0,05***
15	3,18±0,12	2,53±0,01***	2,86±0,03***	2,46±0,07***
21	3,48±0,16	2,65±0,01***	2,99±0,05***	2,74±0,05***
30	4,19±0,09	2,84±0,01***	3,15±0,01***	2,83±0,05***

Примечание: * различие по данному показателю статистически достоверно между опытными группами относительно контрольной (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$)

С возрастом (1 по 30 сутки жизни) у интактных цыплят количественное содержание белков (в условных единицах) и функциональная активность гепатоцитов увеличивается. Клетки цыплят опытных групп реагируют снижением функционального состояния относительно показателей контрольной группы.

На основании полученных с помощью метода с ДХТАФ данных разработаны люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния гепатоцитов печени цыплят при кишечных инфекциях (таблица 4).

Таблица 4 – Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния гепатоцитов печени цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) по результатам метода с ДХТАФ, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	Контрольная	Опытные		
		I (клебсиеллез)	II (эшерихиоз)	III (сальмонеллез)
1	1,26-1,28	1,27-1,29	1,26-1,28	1,27-1,29
2	1,45-1,49	1,44-1,48	1,46-1,48	1,44-1,48
3	2,15-2,21	1,92-1,94	1,90-1,98	1,91-1,99
4	2,44-2,48	1,82-1,86	2,14-2,16	1,87-1,95
6	2,70-2,78	1,70-1,74	2,13-2,17	1,78-1,86
7	2,84-2,90	1,70-1,74	2,22-2,32	1,77-1,83

Сведения о функциональном состоянии клеток железистого желудка цыплят, полученные Методом со Stains all. Апробацию метода проводили на гистологических срезах железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза. Объектом исследования служили клетки покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клеток соединительной ткани подслизистой основы и серозной оболочки. В качестве примера представлены сведения по клеткам покровного эпителия слизистой оболочки (таблица 5).

С возрастом (1 по 30 сутки жизни) у интактных цыплят коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) постепенно увеличивается за счет повышения содержания нуклеиновых кислот. Клетки цыплят опытных групп реагируют резким увеличением указанного коэффициента за счет снижения выработки белка в них.

Изменения функционального состояния клеток железистого желудка цыплят наблюдали при исследовании покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клеток соединительной ткани подслизистой

основы и серозной оболочки. Различия заключались в характерной динамике коэффициентов нуклеиновых кислот и белков в различных видах клеток и в разные сроки экспериментальных заболеваний. Основные сведения представлены в разделе «Заключение».

Таблица 5 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков (K_p) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	Контрольная	Опытные		
		I (клебсиеллез)	II (эшерихиоз)	III (сальмонеллез)
1	1,41±0,02	1,41±0,02	1,41±0,02	1,40±0,02
2	1,40±0,02	1,43±0,02*	1,37±0,04	1,41±0,04
3	1,53±0,07	2,03±0,09***	2,62±0,08***	3,05±0,08***
4	1,52±0,04	1,75±0,06***	2,24±0,09***	2,79±0,11***
6	1,79±0,06	3,38±0,24***	2,77±0,11***	2,19±0,08***
7	1,75±0,04	2,23±0,09***	2,82±0,11***	1,92±0,04***
8	1,98±0,06	2,18±0,06***	2,56±0,09***	3,03±0,23***
10	2,10±0,02	1,91±0,02***	2,69±0,13***	2,00±0,07**
15	2,30±0,02	4,09±0,05***	2,52±0,05***	2,00±0,07***
21	2,37±0,05	5,17±0,03***	2,52±0,07**	1,44±0,04***
30	2,59±0,02	2,96±0,07***	2,77±0,07***	2,24±0,05***

Примечание: * различие по данному показателю статистически достоверно между опытными группами относительно контрольной (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$)

На основании установленных статистически достоверных показателей величины коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков разработаны люминесцентно-микроскопические критерии для оценки функционального состояния клеток в ранние сроки развития этих инфекций. Пример представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток покровного эпителия железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях по результатам метода со Stains all, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	Контрольная	Опытные		
		I (клебсиеллез)	II (эшерихиоз)	III (сальмонеллез)
1	1,39-1,43	1,39-1,43	1,39-1,43	1,38-1,42
2*	1,38-1,42	1,41-1,45	1,33-1,41	1,37-1,45
3	1,46-1,60	1,94-2,12	2,54-2,70	2,97-3,13
4	1,48-1,56	1,69-1,81	2,15-2,33	2,68-2,9
6	1,73-1,85	3,14-3,62	2,66-2,88	2,11-2,27
7	1,71-1,79	2,14-2,32	2,71-2,93	1,88-1,96

Сведения о функциональном состоянии клеток желудочного-

кишечного тракта цыплят при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза, полученные при экспериментальной апробации разработанных методов

Клиническая картина и основные патоморфологические изменения у интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных эшерихиозом и подвергавшихся антибиотикотерапии

При клебсиеллезе у цыплят наблюдали схожую клиническую и патоморфологическую картину, как и при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза в первом опыте. В результате проведенного эксперимента от клебсиеллеза пало 12 % цыплят.

В группе цыплят, зараженных клебсиеллезом и подвергавшихся антибиотикотерапии, у цыплят на 3 день после заражения наблюдали угнетенное состояние и отказ от корма. С 4 по 7 день у большинства цыплят наблюдали ухудшение состояния. Цыплята вялые, малоподвижные, аппетит отсутствует, дыхание затруднено. У некоторых особей отмечали одышку, кашель, риниты и слезотечение. Цыплята сбиваются в группы. Начиная с 8 суток жизни фиксировали улучшение общего состояния цыплят. Гибель цыплят прекратилась. Постепенно восстанавливался аппетит. С 20 по 30 день цыплята отставали в росте в сравнении с контрольной группой, аппетит удовлетворительный. Патологоанатомическая картина и гистологические изменения при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза и проведении антибиотикотерапии в стадии манифестации болезни характеризовалась острым катаральным воспалением железистого и мышечного желудков, точного и толстого кишечника, зернистой дистрофией печени и почек, гиперплазией селезенки, миокардитом и катаральной пневмонией. В стадии исхода болезни, характеризовавшейся выздоровлением цыплят, наблюдали сглаженную картину патологоанатомических признаков с сохранением признаков катарального воспаления железистого и мышечного желудков, точного и толстого кишечника, зернистой дистрофией печени и почек, гиперплазией селезенки, миокардита. В результате проведенного эксперимента от клебсиеллеза пало 4 % цыплят.

У цыплят контрольной группы отсутствовали клинические и патологоанатомические признаки заболевания.

Оценка функционального состояния клеток железистого желудка цыплят, полученные Методом со Stains all. Апробацию метода проводили на гистологических срезах железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза. Объектом исследования служили клетки покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клетки соединительной ткани подслизистой основы и серозной оболочки. В качестве примера представлены сведения по клеткам покровного эпителия слизистой оболочки (таблица 7).

Таблица 7 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков (K_p) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп		
	Контрольная	Опытные	
		IV (клебсиеллез)	V (антибиотикотерапия)
1	1,41±0,02	1,40±0,02	1,41±0,02
2	1,53±0,04	1,52±0,04	1,52±0,03
3	1,54±0,05	2,11±0,05***	1,98±0,04***
4	1,61±0,04	1,64±0,06	1,71±0,03***
5	1,83±0,04	2,27±0,07***	2,34±0,07***
6	1,81±0,07	3,08±0,09***	2,98±0,07***
7	1,85±0,05	2,34±0,06***	2,29±0,06***
8	2,05±0,06	2,29±0,06***	2,15±0,08*
10	1,88±0,06	2,06±0,04***	1,92±0,04
15	2,40±0,07	5,50±0,11***	2,37±0,07
21	2,58±0,06	7,25±0,25***	8,2±0,22***
27	2,68±0,08	3,97±0,15***	6,96±0,17***
30	2,72±0,05	3,26±0,11***	4,7±0,08***

Примечание: * различие по данному показателю статистически достоверно между опытными группами относительно контрольной (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$)

Функциональное состояние клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят соответствовало показателям интактных цыплят на 3 сутки с начала лечения.

На основании метода со Stains all были разработаны люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при антибиотикотерапии клебсиеллеза (таблица 8).

Таблица 8 – Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток покровного эпителия железистого желудка цыплят при антибиотикотерапии клебсиеллеза по результатам Метода со Stains all, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп		
	Контрольная	Опытные	
		IV (клебсиеллез)	V (антибиотикотерапия)
7	1,80-1,90	2,28-2,40	2,23-2,35
8	1,99-2,11	2,23-2,35	2,07-2,23
10	1,82-1,94	2,02-2,10	1,88-1,96
15	2,33-2,47	5,39-5,61	2,30-2,44
21	2,52-2,64	7,00-7,50	7,98-8,42
27	2,60-2,76	3,82-4,12	6,79-7,13
30	2,67-2,77	3,15-3,37	4,62-4,78

Сведения о функциональном состоянии клеток железистого желудка цыплят, полученные Модификацией метода со Stains all. Апробацию метода проводили на гистологических срезах железистого желудка цыплят

контрольной и опытной групп при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза. Объектом исследования служил эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки (таблица 9).

Таблица 9 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной (λ_1) и опытной (λ_2) групп, показатель функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка опытной группы (С)

Сутки жизни	Сутки с начала лечения	Наименование групп		
		λ_1	λ_2	С
1		2,16±0,04	2,07±0,07	0,09±0,11
2		2,10±0,06	2,08±0,06	0,02±0,12
3		2,23±0,04	2,68±0,06	-0,45±0,1
4		2,25±0,05	1,84±0,06	0,41±0,11
5		2,27±0,05	3,81±0,12	-1,54±0,17
6		2,32±0,05	3,25±0,11	-0,78±0,16
7*		2,43±0,07	2,19±0,06	0,24±0,13
8	1	2,63±0,06	3,28±0,07	-0,65±0,13
9	2	2,66±0,07	1,86±0,06	0,80±0,13
10	3	2,83±0,08	1,81±0,06	1,02±0,14
11	4	2,87±0,07	2,04±0,08	0,83±0,13
12	5	2,90±0,09	2,17±0,08	0,73±0,17
13	6	2,95±0,08	2,11±0,09	0,64±0,17
15	8	3,01±0,10	2,84±0,08	0,17±0,18
21	14	3,83±0,13	3,74±0,08	0,09±0,21
27	20	4,16±0,09	3,87±0,13	0,29±0,22
30	23	4,38±0,15	4,32±0,1	0,06±0,25

Примечание: * - сутки начала антибиотикотерапии.

При изучении динамики коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом и леченых антибактериальным препаратом «Энрофлон», отмечается, что в первые и вторые сутки показатель С находится в диапазоне значений контрольной группы. На третьи сутки жизни (первые сутки после заражения) отмечали отклонение показателя функционального состояния от значений контрольной группы. Проведение антибиотикотерапии клебсиеллеза начиная с четвертых суток с начала антибиотикотерапии привело к положительной динамике восстановления функционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы. Начиная с восьмых суток с начала антибиотикотерапии функциональное состояние исследуемых клеток соответствовало показателям контрольной группы. По изменениям показателя функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка опытной группы

(С) возможно проведение оценки степени влияния антибиотикотерапии на процесс восстановления функционального состояния клеток железистого желудка цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом.

Сведения о функциональном состоянии клеток железистого желудка цыплят, полученные Методом с этидиумом бромидом и ДХТАФ. Апробацию метода проводили на гистологических срезах железистого желудка цыплят контрольной и опытной групп при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза. Объектом исследования служил эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки (таблица 10).

Таблица 10 - Показатели функционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы, определяемый по количественному содержанию нуклеиновых кислот (*Kn*) и белков (*Kb*)

Сутки жизни	Сутки с начала лечения	Наименование показателя	
		<i>Kb</i>	<i>Kn</i>
7	-	1,10±0,12	1,1±0,12
8	1	1,07±0,14	1,07±0,14
9	2	0,81±0,10	0,81±0,10
10	3	0,61±0,13	0,61±0,13
11	4	0,55±0,24	0,55±0,24
12	5	0,17±0,20	0,17±0,20
13	6	0,17±0,12	0,17±0,12
15	8	0,08±0,13	0,08±0,13

Проведение антибиотикотерапии приводило к постепенному восстановлению функционального состояния исследуемых клеток, начиная с третьих до восьмых суток перорального введения антибиотика «Энрофлон» как по показателю количественного содержания (в условных единицах) белков (*Kb*), так и нуклеиновых кислот (*Kn*).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные нами исследования позволили разработать пять новых методов люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуоресцентных красителей.

Апробация разработанных новых методов показала их надежность в диагностике функционального состояния клеток железистого желудка и печени интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом, и подвергавшихся антибиотикотерапии клебсиеллеза.

Установленное увеличение количественного содержания органических веществ (нуклеиновые кислоты, белки) в клетках желудочно-кишечного тракта цыплят может быть объяснено влиянием соматотропина на ряд мета-

болических процессов организма. В частности, он стимулирует рост молодых животных (Buysel J., Desuyperre E., 1999; Jia J. et al., 2018), повышает синтез белков во всех клетках и увеличивает содержание рибонуклеиновой кислоты в клетках (Сорвачев К.Ф., 1971).

В процессе сравнительного анализа функционального состояния клеток были получены новые данные о патогенезе изучаемых кишечных инфекций. Результаты подтвердили известные научные исследования, указывающие на вовлечение в инфекционный процесс при клебсиеллезе, эшерихиозе и сальмонеллезе внутренних органов цыплят, в том числе печени и железистого желудка (Barrow P.A., Huggins M.B., Lovell M.A., 1994; Терентьев А.А., 2000; Салаутин В.В., 2004; Бессарабов Б.Ф., 2007; Ольховик В.П., 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны и апробированы новые методы:

- Одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания нуклеиновых кислот в клетках желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуорохрома «Этидиум бромида» и оценки их функционального состояния;

- Одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания белков в клетках печени цыплят с применением флуорохрома «ДХТАФ» и оценки их функционального состояния;

- Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа для обнаружения, определения соотношения органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в клетках желудочно-кишечного тракта цыплят с использованием метахроматического флуорохрома «Stains all» и оценки их функционального состояния;

- Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа для оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при антибиотикотерапии клебсиеллеза по соотношению нуклеиновых кислот и белков с применением метахроматического флуорохрома «Stains all»);

- Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа для обнаружения, определения количественного содержания нуклеиновых кислот и белков и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта птиц по их количественному содержанию с применением флуорохромов «Этидиум бромида» и «ДХТАФ» при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза.

2. Разработанные новые методы люминесцентного спектрального анализа клеток могут быть рассмотрены в качестве биологических маркеров функционального состояния желудочно-кишечного тракта птиц.

3. Проведен сравнительный анализ функционального состояния клеток железистого желудка:

3.1. У интактных цыплят:

3.1.1. По данным, полученным Методом с этидиумом бромидом:

- разные виды клеток имеют различное количественное содержание нуклеиновых кислот (в условных единицах): клетки покровного эпителия слизистой оболочки (1 сутки – $10,12 \pm 0,36$; 30 сутки – $13,63 \pm 0,45$), эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки ($8,09 \pm 0,24$; $10,55 \pm 0,35$), миоцитов мышечного слоя ($6,23 \pm 0,22$; $8,28 \pm 0,35$);

- с возрастом количественное содержание нуклеиновых кислот (в условных единицах) и функциональная активность клеток увеличивается (с 1 по 30 сутки жизни): клетки покровного эпителия слизистой оболочки – на 34,7 %, миоциты мышечного слоя – на 32,9 %, эпителий альвеолярных желез – на 30,4 %;

3.1.2. По данным, полученным Методом со Stains all:

- разные виды клеток имеют различное соотношение нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах), значения которых увеличиваются к 30 суткам жизни: в клетках покровного эпителия слизистой оболочки (1 сутки – $1,41 \pm 0,02$; 30 сутки – $2,59 \pm 0,02$), эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки ($1,91 \pm 0,03$; $4,20 \pm 0,02$), клетках соединительной ткани подслизистой основы ($2,63 \pm 0,03$; $5,76 \pm 0,24$), мезотелии серозной оболочки ($1,00 \pm 0,01$; $4,71 \pm 0,05$). Увеличение значений коэффициентов обусловлено преобладанием нуклеиновых кислот над белками;

- динамика роста коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) с 1 по 30 сутки жизни составила в клетках покровного эпителия слизистой оболочки (83,7 %), эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки (120,0 %), клетках соединительной ткани подслизистой основы (119,0 %), мезотелия серозной оболочки (371,0 %).

3.2. У цыплят, зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом:

3.2.1. По данным, полученным Методом с этидиумом бромидом:

- заболевание клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом сопровождается уменьшением количественного содержания нуклеиновых кислот (в условных единицах) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, миоцитов мышечного слоя;

- уменьшение количественного содержания нуклеиновых кислот (в условных единицах) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки фиксируется спустя сутки после заражения клебсиеллезом и сальмонеллезом, спустя двое суток после заражения эшерихиозом;

- разные виды клеток имеют различную степень снижения количественного содержания нуклеиновых кислот (в условных единицах) и функциональной активности в ответ на введение инфекционного агента (клебсиелл, эшерихий, сальмонелл): наибольшее – в клетках покровного эпителия (59,8–69,7 % относительно первых суток жизни), эпителия альвеолярных желез (49,2–57,8 %), наименьшее – в миоцитах мышечного слоя (29,6–37,8 %);

- количественное содержание нуклеиновых кислот (в условных единицах) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, миоцитов мышечного слоя в период 1-28 сутки после заражения достоверно меньше аналогичных показателей интактных цыплят.

3.2.2. По данным, полученным Методом со Stains all:

- заболевание клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом сопровождается, преимущественно, увеличением значений показателя «Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков», которое фиксируется в клетках покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клетках соединительной ткани подслизистой основы, мезотелии серозной оболочки. Исключение составляют клетки соединительной ткани подслизистой основы и клетки мезотелия серозной оболочки при клебсиеллезе, в которых отмечается снижение указанного показателя;

- изменение (увеличение/уменьшение) коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клетках соединительной ткани подслизистой основы, мезотелии серозной оболочки фиксируется спустя сутки после заражения кишечной инфекцией;

- к 30-ым суткам жизни значения коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клетках соединительной ткани подслизистой основы, мезотелия серозной оболочки не соответствовали аналогичным показателям интактных цыплят.

3.3. У цыплят, зараженных клебсиеллезом и подвергавшихся антибиотикотерапии препаратом «Энрофлон»:

3.3.1. По данным, полученным Методом со Stains all функциональное состояние клеток покровного эпителия соответствовало показателям интактных цыплят – на 3 сутки с начала лечения, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки – на 8 сутки, клеток соединительной ткани подслизистой основы – на 14 сутки, мезотелия серозной оболочки – не соответствовало на 23 сутки (день окончания эксперимента);

3.3.2. По данным, полученным модификацией метода со Stains all, функциональное состояние клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки постепенно восстанавливалось и соответствовало аналогичным показателям интактных цыплят на 8 сутки с начала лечения.

3.3.3. По данным, полученным методом с этидиумом бромидом и ДХТАФ, функциональное состояние клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, выраженное показателями «Количественное содержание нуклеиновых кислот (в условных единицах)», «Количественное содержание белков (в условных единицах)», постепенно восстанавливалось и соответствовало аналогичным показателям интактных цыплят на 8 сутки с начала лечения.

4. При проведении сравнительного анализа функционального состояния клеток печени:

4.1. У интактных цыплят:

4.1.1. По данным, полученным Методом с ДХТАФ:

- динамика количественного содержания белков (в условных единицах) в гепатоцитах характеризуется постепенным возрастанием их количества в соответствии с увеличением возраста цыплят: первые сутки – $1,27 \pm 0,01$, 30-е сутки – $4,19 \pm 0,09$;

- функциональная активность клеток за период 1-30 сутки жизни возрасла на 229,9 %;

4.1.2. У цыплят, зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом:

- заболевание клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом сопровождается уменьшением количественного содержания белков (в условных единицах) относительно аналогичных показателей интактных цыплят;

- уменьшение количественного содержания белков (в условных единицах) в гепатоцитах фиксируется спустя сутки после заражения клебсиеллезом, сальмонеллезом и эшерихиозом;

- количественное содержание белков (в условных единицах) в гепатоцитах достоверно меньше его величины, чем у интактных цыплят в период с 1 по 28 сутки после заражения;

5. Ультраструктурные изменения при клебсиеллезе цыплят характеризуются снижением функциональной активности клеток: в первые сутки после заражения в покровном эпителии слизистой оболочки железистого желудка на 9,4 % и клетках мышечного слоя на 16,5 %, на вторые сутки – в клетках эпителия альвеолярных желез на 17,4 %. Наименьший показатель количественного содержания нуклеиновых кислот был отмечен на 5 сутки после заражения в клетках покровного эпителия, в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки, на вторые сутки – в миоцитах мышечного слоя. Значения данных показателей были ниже значений интактных цыплят в эти же сутки на 66,4 %, 57,3 % и 34,2 % соответственно. К 30 суткам жизни показатель $I_{НК}$ (в условных единицах) во всех исследуемых видах клеток был ниже показателей интактных цыплят на 47,2 %, 40,8 % и 34,3 % соответственно.

В первые сутки после заражения зарегистрировано изменение функциональной активности всех видов исследуемых клеток железистого желудка, характеризующееся:

- увеличением значений коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков относительно показателей контрольной группы в клетках покровного эпителия слизистой оболочки на 32,7 %, эпителия альвеолярных желез – на 25,8 %;

- уменьшением значений коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков относительно показателей контрольной группы в соединительной ткани подслизистой основы – на 11,6 %, мезотелия серозной оболочки – на 18,8 %.

В первые сутки после заражения происходит снижение функциональной активности гепатоцитов относительно показателей контрольной группы на 11,5 %. На 4 сутки гепатоциты содержали минимальное количество белков, составляющее 62,8 % от значений интактных цыплят в указанные сутки. К 30 суткам жизни показатель I_e (в условных единицах) в гепатоцитах был достоверно ниже показателей контрольной группы на 32,2 %.

6. Ультраструктурные изменения при эшерихиозе цыплят характеризуются снижением функциональной активности клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка на 29 %, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки на 13,2 %, миоцитов мышечного слоя на 31,2 % на вторые сутки после заражения. Период снижения функциональной активности длился в клетках покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки – со 2 по 5 сутки после заражения, мышечного слоя – вторые сутки. Наименьший показатель количественного содержания нуклеиновых кислот был отмечен на 5 сутки после заражения в клетках покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, на вторые сутки – в миоцитах мышечного слоя. Значения данных показателей были ниже значений интактных цыплят в эти же сутки на 70,6 %, 51,4 % и 34,7 % соответственно. К 30 суткам жизни показатель I_{NK} (в условных единицах) во всех исследуемых видах клеток был ниже показателей интактных цыплят на 62,3 %, 38,6 % и 33,6 % соответственно.

В первые сутки после заражения происходит изменение функциональной активности всех видов исследуемых клеток железистого желудка, характеризующейся увеличением значений коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков относительно показателей контрольной группы в клетках покровного эпителия слизистой оболочки на 71,2 %, эпителия альвеолярных желез - на 16,4 %, клетках соединительной ткани подслизистой основы – на 14,1 %, мезотелия серозной оболочки – на 20,1 %.

В первые сутки после заражения наблюдали снижение функциональной активности гепатоцитов в сравнении с показателями контрольной группы на 12,6 %. При этом количественный показатель I_e (в условных единицах) увеличивался на протяжении всего эксперимента. К 30 суткам жизни показатель I_e (в условных единицах) в гепатоцитах был достоверно меньше показателей контрольной группы на 24,8 %.

7. Ультраструктурные изменения при сальмонеллезе цыплят характеризовались снижением функциональной активности клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка и клеток мышечного слоя в первые сутки после заражения, на вторые сутки – клеток эпителия альвеолярных желез. Наименьший показатель количественного содержания нуклеиновых кислот был отмечен на 5 сутки после заражения в клетках покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, на вторые сутки – в миоцитах мышечного слоя. Значения данных показателей были ниже значений интактных цыплят в эти же сутки на 60,6 %, 59,9 % и 40,0 % соответственно. К 30 суткам жизни показатель I_{NK} (в условных единицах) во

всех исследуемых видах клеток был ниже показателей интактных цыплят на 62,3 %, 49,1 % и 34,3 % соответственно.

В первые сутки после заражения наблюдали изменение функциональной активности всех видов исследуемых клеток железистого желудка, характеризующейся увеличением значений коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков относительно показателей контрольной группы: в клетках покровного эпителия слизистой оболочки на 99,3 %, эпителия альвеолярных желез – на 55,9 %, клетках соединительной ткани подслизистой основы – на 36,2 %, мезотелия серозной оболочки – на 128,6 %.

В первые сутки после заражения отмечали снижение функциональной активности гепатоцитов в сравнении с показателями контрольной группы на 21,1 %. На 5 сутки фиксировали минимальное количественное содержание белков в гепатоцитах, составляющее 62,7 % от значений интактных цыплят в указанные сутки. К 30 суткам жизни показатель I_g (в условных единицах) в гепатоцитах был достоверно ниже показателей контрольной группы на 32,5 %.

8. Предложены люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка и печени цыплят при клебсиеллезе, эшерихиозе, сальмонеллезе и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза.

9. Разработаны рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

Специалистам фармакологических компаний, специалистам по созданию кормов и кормовых добавок нового типа рекомендуем:

1. Применять разработанные новые методы люминесцентного спектрального анализа для определения количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в клетках желудочно-кишечного тракта цыплят и оценки их функционального состояния.

2. Учитывать следующие закономерности количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в клетках печени и железистого желудка цыплят и изменения их функционального состояния:

2.1. В норме с 1 по 30 сутки жизни количество нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах), а также функциональная активность клеток увеличивается. Количественное содержание нуклеиновых кислот в клетках железистого желудка возрастает: в клетках покровного эпителия слизистой оболочки – на 34,7 %, миоцитах мышечного слоя – на 32,9 %, эпителии альвеолярных желез – на 30,4 %. Количественное содержание белков (в условных единицах) в гепатоцитах характеризуется постепенным возрастанием их количества в соответствии с увеличением возраста цыплят: в первые сутки – $1,27 \pm 0,01$, на 30-е сутки – $4,19 \pm 0,09$. Функциональная активность клеток печени за период 1-30 сутки жизни возрастает на 229,9 %.

2.2. Заболевание клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом сопровождается уменьшением количественного содержания нуклеиновых кислот (в условных единицах) в клетках железистого желудка (покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, миоцитов мышечного слоя) и белков (в условных единицах) в печени (гепатоцитах) относительно аналогичных показателей контрольной группы.

2.3. При проведении антибиотикотерапии препаратом «Энрофлон» функциональное состояние клеток покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка восстанавливается на 8 сутки с начала лечения, клеток соединительной ткани подслизистой основы – на 14 сутки.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В результате проведенных исследований разработаны новые методы люминесцентного спектрального анализа клеток применительно к гистологическим срезам, изучено функциональное состояние клеток печени и железистого желудка интактных цыплят, цыплят при патологии (эшерихиозе, сальмонеллезе, клебсиеллезе) и при проведении антибактериальной терапии с помощью разработанных методов. Установлены люминесцентно-микроскопические критерии оценки функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят в ранние сроки развития заболеваний.

Основываясь на полученных данных можно целенаправленно разрабатывать методы диагностики и коррекции патологических процессов в организме птиц, в первую очередь, в желудочно-кишечном тракте. Использование полученных сведений может быть полезно при диагностике кишечных инфекций, разработке новых средств профилактики, терапии заболеваний, а также при создании новых кормов и кормовых добавок.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Акчури, С.В. Некоторые аспекты применения флуоресцентных красителей для анализа нуклеиновых кислот в ветеринарной медицине // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2008. – № 2. – С. 9-12.
2. Акчури, С.В. Использование флуоресцентных методов для изучения динамики белков и липидов в аспекте современной биотехнологии ветеринарных препаратов // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2008. – № 7. – С. 5-8.
3. Акчури, С.В. Новый метод люминесцентного анализа нуклеиновых кислот с использованием бромида этидия // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2010. – № 8. – С. 3-6.

4. Акчурин, С.В. Новый метод люминесцентного анализа белков печени и железистого желудка цыплят // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2011. – № 1. – С. 4-10.
5. Акчурин, С.В. Анализ соотношений нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка цыплят методом люминесцентного спектрального анализа с использованием флуорохрома «Stains all» / С.В. Акчурин, С.В. Ларионов // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2012. – № 2. – С. 3-8.
6. Акчурин, С.В. Новый метод люминесцентного анализа соотношения нуклеиновых кислот и белков в серозной оболочке железистого желудка цыплят с использованием флуорохрома «Stains all» // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2012. – № 1-1 (22). – С. 72-78.
7. Акчурин, С.В. Изучение соотношений нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка цыплят при экспериментальном сальмонеллезе / С.В. Акчурин, Г.П. Демкин, В.В. Салаутин, // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2012. – № 3. – С. 3-7.
8. Акчурин, С.В. Идентификация клебсиеллеза цыплят методом микроспектрального анализа // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2012. – № 3. – С. 21-24.
9. Ларионов, С.В. Использование метода люминесцентного спектрального анализа клеток железистого желудка цыплят для идентификации кишечных инфекций / С.В. Ларионов, С.В. Акчурин // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2012. – № 3. – С. 27-29.
10. Акчурин, С.В. Идентификация колибактериоза цыплят методом микроспектрального анализа / С.В. Акчурин, С.В. Ларионов // Ветеринарный врач. – 2012. – № 4. – С. 9-12.
11. Акчурин, С.В. Функциональное состояние клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях. // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2012. – № 11. – С. 3-6.
12. Акчурин, С.В. Использование микроспектрального метода для оценки функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2013. – № 6. – С. 214-217.
13. Акчурин, С.В. Новый метод люминесцентного анализа клеток железистого желудка цыплят с использованием флуорохрома «Stains all» / С.В. Акчурин, С.В. Ларионов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т. 213. – С. 6-11.
14. Акчурин, С.В. Оценка функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2013. – № 2 (18). – С. 13-16.
15. Акчурин, С.В. Микроспектральный анализ клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – № 3 (113). – С. 74-78.

16. Ларионов, С.В. Люминесцентный анализ клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях / С.В. Ларионов, С.В. Акчурин // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2014. – № 2. – С. 53-55.

17. Акчурин, С.В. Влияние сальмонеллезной инфекции на функциональное состояние клеток железистого желудка цыплят / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // Аграрный научный журнал. – 2015. – № 8. – С. 7-10.

18. Акчурин, С.В. Люминесцентномикроскопический способ оценки функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при антибактериальной терапии / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 7. – С. 3-6.

19. Акчурин, С.В. Микроспектральный анализ клеток железистого желудка цыплят при антибактериальной терапии / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // Аграрный научный журнал. – 2017. – № 11. – С. 3-6.

20. Акчурин, С.В. Оценка эффективности антибактериальной терапии методом микроспектрального анализа // Аграрный научный журнал. – 2020. – № 1. – С. 28-31.

21. Акчурин, С.В. Анализ соотношения нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка цыплят при экспериментальном эшерихиозе / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // Аграрный научный журнал. – 2020. – № 4. – С. 44-50.

Статьи, индексируемые в Scopus:

22. Akchurin, S.V. Application of luminescence spectral assay for assessment of the functional state of birds' gastrointestinal tract by nucleic acids content in cells / S.V. Akchurin, S.V. Larionov, E.S. Krasnikova [et al.] // J. Phys.: Conf. Ser. – 2020. – № 1679. – P. 022007.

23. Akchurin, S.V. Application of luminescence spectral assay for monitoring of intracellular metabolism in hepatocytes / S.V. Akchurin, S.V. Larionov, E.S. Krasnikova [et al.] // J. Phys.: Conf. Ser. – 2020. – № 1679. – P. 022004.

24. Akchurin, S.V. Application of luminescence spectral assay to evaluate the results of a scientific experiment / S.V. Akchurin, S.V. Larionov, E.S. Krasnikova [et al.] // J. Phys.: Conf. Ser. – 2020. – № 1679. – P. 022019.

Патенты:

25. Пат. RU 2469296 С1. Люминесцентно-микроскопический способ оценки состояния внутриклеточного обмена органических веществ в стенке железистого желудка птиц при клебсиеллезе / Ларионов С.В., Акчурин С.В.; заявители и патентообладатели ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». - 2011127028/10; заявл. 30.06.2011; опубл. 10.12.2012, Бюл. № 36. – 14 с.

26. Пат. RU 2537165 С1. Микроспектральный способ оценки эффективности фармакотерапии в ранние сроки лечения клебсиеллеза птиц антибактериальными препаратами / Акчурин С.В.; заявители и патентообладатели ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени

Н.И. Вавилова». - 2013109359/15; заявл. 30.05.2013; опубл. 27.12.2014, Бюл. № 36. – 18 с.

Монография:

27. Акчурин, С.В. Использование биологических маркеров для оценки состояния клеток желудочно-кишечного тракта домашней птицы. Саратов: ИЦ «Наука», 2020. – 209 с.

Рекомендации:

28. Акчурин С.В. Рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии. Саратов: ИЦ «Наука», 2020. – 42 с.

Статьи в других изданиях:

29. Акчурин, С.В. Перспективные направления использования в ветеринарной медицине люминесцентного метода для изучения иммуноморфогенеза / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // Вавиловские чтения – 2010: Материалы Межд. науч. - практ. конф. в 3 томах. – Саратов: Изд-во КУБИК, 2010. Т. 2. С. 112-114.

30. Акчурин, С.В. Изучение соотношений нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка цыплят при экспериментальных желудочно-кишечных инфекциях / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития. Материалы Международной научно-практической конференции. – 2012. – С. 5-10.

31. Акчурин, С.В. Изучение соотношений нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка цыплят люминесцентномикроскопическим методом при экспериментальном колибактериозе. Современные научно-практические достижения в ветеринарии: Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции. Выпуск 3. – Киров: ФГБОУ ВПО Вятская ГСХА, 2012. – С. 5-10.

32. Акчурин, С.В. Люминесцентный анализ белков печени цыплят с использованием дихлор-симм-триазиниламинофлуоресцеина-1 / Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития отечественного агропромышленного комплекса. Материалы Национальной научно-практической конференции. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева». – 2019. – С. 6-11.

33. Акчурин, С.В. Люминесцентный анализ клеток железистого желудка цыплят при экспериментальном сальмонеллезе / Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития отечественного агропромышленного комплекса. Материалы Национальной научно-практической конференции. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева». – 2019. – С. 15-18.

34. Акчурин, С.В. Функциональное состояние клеток покровного эпителия железистого желудка цыплят при экспериментальном эшерихиозе / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития отечественного агропромышленного комплекса. Материалы Национальной научно-практической конференции. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева». – 2019. – С. 11-15.

35. Акчурин, С.В. Перспективные направления использования в ветеринарной медицине люминесцентного спектрального анализа // Доклады ТСХА: Сборник статей. Выпуск 292. Ч. IV. – 2020. – С. 573-576.

36. Акчурин, С.В. Модификация метода люминесцентного спектрального анализа для оценки функционального состояния клеток внутренних органов цыплят при антибиотикотерапии / Сборник материалов международной научно-практической конференции «От инерции к развитию: научно-инновационное обеспечение АПК». – 2020. – С. 10-14.

37. Акчурин, С.В. Изменение содержания органических веществ в клетках междольковой соединительной ткани железистого желудка цыплят при экспериментальном эшерихиозе / Актуальные вопросы развития аграрного сектора экономики Байкальского региона. Материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции, посвященной Дню российской науки. – 2020. – С. 254-256.

38. Акчурин, С.В. Способ повышения оценки эффективности результатов фармакотерапии / Аграрная наука - сельскому хозяйству. Сборник материалов XV Международной научно-практической конференции в 2 кн. Барнаул. – 2020. – С. 274-276.

39. Акчурин, С.В. Соотношение нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка цыплят при экспериментальном эшерихиозе / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // Аграрная наука - сельскому хозяйству. Сборник материалов XV Международной научно-практической конференции в 2 кн. Барнаул. – 2020. – С. 276-278.

40. Акчурин, С.В. Функциональное состояние клеток железистого желудка цыплят при антибактериальной терапии / Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Сборник научных трудов Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора биологических наук, профессора Е. П. Ващекина. – 2020. – С. 28-32.