

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ МЕТОДОМ МИКРОСПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

АКЧУРИН Сергей Владимирович, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева

*Разработанный метод люминесцентного спектрального анализа с использованием метакроматического флуоресцентного красителя Stains all позволяет выявлять нуклеиновые кислоты, белки, определять коэффициенты соотношений этих веществ в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы и зараженных *Klebsiella pneumoniae*. Изменение коэффициентов соотношения этих веществ отражало особенности функционального состояния клеток этой зоны в норме, при заболевании клебсиеллезом и при проведении антибактериальной терапии. В контрольной группе она укладывалась в картину постепенного возрастания их функциональной активности соответственно увеличению возраста цыплят. У инфицированных цыплят изменение функционального состояния этих клеток имело сложный и неоднозначный характер, зависящий как от воздействия возбудителя, так и от действия лекарственного препарата «Энрофлон». Полученные данные могут быть приняты во внимание при разработке новых средств профилактики и лечения клебсиеллеза.*

Введение. К 2050 г., по оценкам Всемирного банка, с высокой вероятностью антибиотики и другие противомикробные препараты уже не будут эффективно лечить инфекции. Страны с низким уровнем доходов при этом могут потерять более 5 % своего валового внутреннего продукта, а не менее 28 млн человек в основном в развивающихся странах могут оказаться за чертой крайней бедности [13]. В последние годы появилось достаточно доказательств, подчеркивающих связь между чрезмерным использованием антибиотиков в животноводстве и повышением уровня устойчивости микроорганизмов к антибиотикам [3, 9]. Основными причинами использования антибиотиков в этой отрасли являются профилактика и лечение инфекций, стимулирование роста и улучшение продуктивности сельскохозяйственных животных [5, 10].

Птицеводство занимает ведущие позиции в мировом сельском хозяйстве. Куры являются наиболее выращиваемым видом: в год производится более 90 млрд т куриного мяса [7]. Беспорядочное использование противомикробных препаратов в животноводстве может ускорить развитие антибиотикорезистентности и привести к неудачам в лечении и экономическим потерям, а также к проблемам со здоровьем человека в связи с наличием следов антибиотиков в продуктах животного происхождения [4, 6, 8, 11, 12]. Поэтому ведется работа по разработке лекарственных препаратов и средств профилактики нового типа. Все это требует более глубокого понимания процессов, происходящих в животном

организме под воздействием микроорганизмов и антимикробных препаратов.

В настоящее время остаются недостаточно изученными вопросы определения функционального состояния клеток и тканей организма птиц при проведении антибактериальной терапии. Для изучения внутриклеточных изменений соотношений нуклеиновых кислот (НК) и белков, играющих ведущую роль в изменении функционального состояния клеток и ее органоидов, был разработан метод люминесцентного спектрального анализа клеток железистого желудка цыплят с использованием люминесцентного метакроматического красителя Stains all [2]. Благодаря этому методу стало возможным улавливать тончайшие биохимические сдвиги, развивающиеся в клетках железистого желудка цыплят при острых желудочно-кишечных инфекциях бактериальной этиологии, в том числе и при клебсиеллезе.

Целью настоящей работы была оценка функционального состояния клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят, являющегося первой мишенью на пути проникновения возбудителей клебсиеллеза в организм птиц, при лечении антибактериальным препаратом «Энрофлон».

Методика исследований. Исследования проводили на кафедре «Морфология, патология животных и биология» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. Цыплята породы хайсекс коричневый, взятые из благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства, были разделены на три группы: одна контрольная (100 цыплят) и две опытные (по





200 цыплят). Цыплятам контрольной (I) группы вводили физиологический раствор – 0,4 мл/гол. Цыплят опытных групп (II и III) инфицировали бактериями *Klebsiella pneumoniae* в разведении 2,5 млрд бактериальных клеток в 1 мл в заражающей дозе 0,4 мл/голову на 2-е сутки их жизни пероральным путем с помощью однограммового шприца и иглы с булавовидным концом. Лечение цыплят III группы проводили 5%-м препаратом «Энрофлон» (производитель ИП «ВИК-здоровье животных»). Препарат начинали давать на 5-е сутки заболевания (7-е сутки жизни) в соответствии с прилагаемой инструкцией (1 мл препарата на 10 л воды в течение 5 дней).

Гистологические срезы железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп исследовали на 1–8, 10, 15, 21, 27, 30 и 37-е сутки их жизни. Гистопрепараты толщиной 4–7 мкм изготавливали из парафиновых блоков кусочков железистого желудка, фиксированного в 10%-м нейтральном забуференном водном растворе формалина. Общую картину микроскопических изменений изучали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином-эозином по общепринятой методике, люминесцентно микроскопические характеристики – на гистопрепаратах, окрашенных 10-4М спиртовым раствором Stains all по методике, разработанной применительно к гистологическим срезам.

Спектры люминесценции получали с помощью универсального цветоанализатора микроскопа-спектрофотометра МСФУ-К. Объектом для исследования методом спектрального анализа служили клетки покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят. Величину интенсивности люминесценции регистрировали в синей (I480) и красной (I620) областях ее спектра, по полученным данным определяли коэффициенты соотношений НК и белков в соответствии с разработанной методикой [2].

Результаты исследований. В окрашенных гематоксилином-эозином гистопрепаратах стенки железистого желудка цыплят контрольной группы патологические изменения отсутствовали. У цыплят опытных групп на 3-и сутки жизни выявляли отек тканей слизистой оболочки. К 7–8-м суткам их жизни в слизистой оболочке наблюдали отек, а также множественные кровоизлияния, дилатацию сосудов и явление стаза эритроцитов в просвете некоторых артериол. Описанную гистологическую картину с разной степенью выраженности наблюдали у цыплят II группы до 14 суток жизни, а у цыплят III группы до 10.

К 21-м суткам жизни у цыплят III группы отмечали отек соединительной ткани подслизистой основы слизистой оболочки, а у цыплят II группы обнаруживался отек тканей слизистой и серозной оболочек, единичные мелкоочаговые кровоизлияния в подслизистой основе слизистой оболочки. К 37-м суткам жизни нарушение кровообращения в виде умеренно выраженного отека и мелких периваскулярных кровоизлияний в слизистой оболочке отмечали у цыплят II группы.

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

С помощью метода микроспектрального анализа клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп были получены коэффициенты соотношения НК и белков (рис 1).

Результаты исследований особенностей изменений коэффициентов соотношений In/Ib

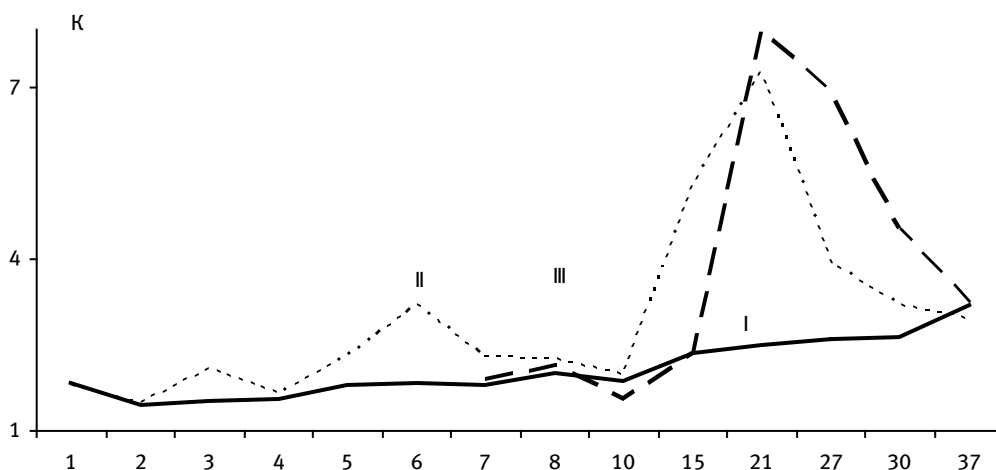


Рис. 1. Изменение показателей коэффициентов соотношений НК и белков в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной (I) и опытных групп (II – клебсиеллез, III – клебсиеллез + лечение). По оси ординат – значения коэффициентов соотношений НК и белков (K), по оси абсцисс – сутки жизни

цыплят контрольной группы и инфицированных *Klebsiella pneumoniae* с 1-х по 6-е сутки их жизни приведены в ранее опубликованной работе [1]. С 7-х по 37-е сутки жизни у цыплят контрольной группы отмечалось умеренное постепенное увеличение значений коэффициентов In/Ib . На рис. 2.1 видно, что это могло быть следствием постепенного и опережающего увеличения интенсивности люминесценции при длине волны 484 нм (In) относительно возрастания ее величины при длине волны 628 нм (Ib). Данная тенденция наблюдалась в спектрах люминесценции клеток этой зоны на протяжении всего периода увеличения возраста цыплят.

При изучении динамики изменений коэффициентов соотношений НК и белков в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка больных клебсиеллезом цыплят выявлена определенная закономерность, которая имела отличительные особенности, характерные для каждой опытной группы (рис. 1, II, III). У цыплят II группы на кривой коэффициентов соотношений отмечалось два пика на 8-е и 21-е сутки жизни (см. рис. 1, II). Появление слабовыраженного пика на 8-е сутки могло быть результатом некоторого снижения Ib на фоне практически неизменной величины In . Резкий скачок на 21-е сутки предположительно связан с быстрым уменьшением Ib при незначительном увеличении In (рис. 2, II). К 37-м суткам наблюдалось уменьшение коэффициента соотношения In/Ib , при этом его значение было несколько ниже аналогичных значений контрольной группы (см. рис. 1), что могло быть следствием более быстрого роста величины Ib по сравнению с In к этому сроку жизни больных цыплят (см. рис. 2, II).

У цыплят III группы кривая коэффициентов соотношений до 21-х суток жизни имела тот же характер, что и у цыплят II группы. Однако значения коэффициентов были несколько ниже, что могло быть результатом более высоких показателей In и Ib , что свидетельствовало о повыше-

нии функциональной активности клеток покровного эпителия, которое регистрировалось уже на начальном этапе лечения клебсиеллеза. С 21-х по 37-е сутки значения коэффициентов соотношений были выше, чем у цыплят II группы, что также могло быть следствием усиления функционального состояния клеток этой зоны, сопровождавшегося повышением как In , так и Ib . При этом к 37-м суткам значение коэффициентов соотношений органических веществ приблизилось к аналогичным показателям цыплят контрольной группы. Это могло быть связано с некоторым снижением значений In на фоне более быстрого роста величины Ib (см. рис. 2, III).

Анализ изменений величин In и Ib в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят II группы свидетельствовал о значительном их снижении по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (см. рис. 2, I, II), что могло указывать на изменение функционального состояния этих клеток, характеризующегося уменьшением в них НК и белков. В то же время в III группе эти значения превышали величину аналогичных показателей, регистрируемых во II группе, и приближались к значениям контрольной группы. Это могло быть результатом увеличения в клетках этой зоны НК и белков вследствие усиления их функциональной активности, связанного с действием лекарственного препарата (см. рис. 2).

Заключение. Динамика изменений коэффициентов соотношения НК и белков в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят, установленная методом микроспектрального анализа с использованием метакроматического флуоресцентного красителя Stains all, отражала особенности их функционального состояния в норме, при заболевании клебсиеллезом и его терапии. Применение для лечения лекарственного средства «Энрофлон» приводило к усилению функциональной активности этих клеток, что нашло отражение на кри-

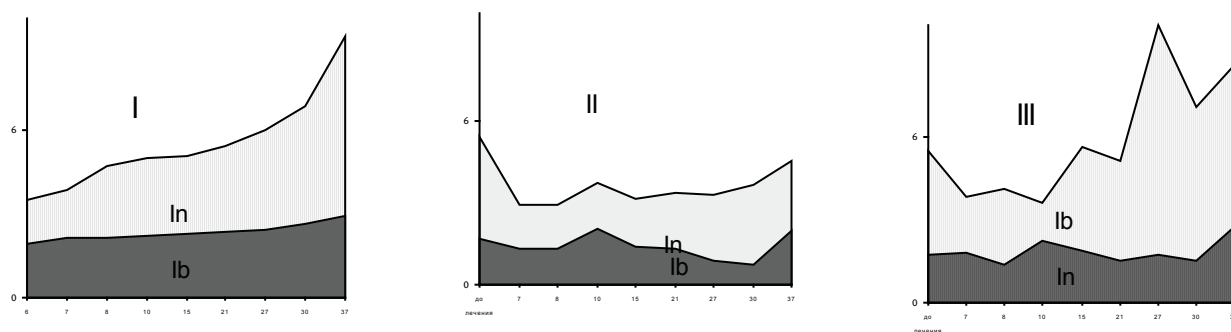


Рис. 2. Величина интенсивности люминесценции НК (In) и белков (Ib) в спектре люминесценции клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной (а) и опытных групп (б – клебсиеллез, в – клебсиеллез + лечение). По оси ординат – величина интенсивности люминесценции, по оси абсцисс – сутки жизни



вой коэффициентов соотношения НК и белков. Результаты проведенного исследования показали, что с помощью данного метода можно регистрировать изменения функционального состояния клеток этой зоны в процессе проводимого лечения.

Полученные результаты могут оказаться полезными при разработке принципиально нового подхода к вопросу создания современных технологий профилактики и лечения этой широко распространенной желудочно-кишечной инфекции птиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акчурун С.В. Идентификация клебсиеллез цыплят методом микроспектрального анализа // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2012. – № 3. – С. 21–24.

2. Акчурун С.В., Ларионов С.В. Анализ соотношений нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка цыплят методом люминесцентного спектрального анализа с использованием флуорохрома Steins all // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2012. – № 02. – С. 3–7.

3. Шульга Н.Н., Шульга И.С., Плавшак Л.П. К проблеме антибиотиков в продуктах животноводства // Дальневосточный аграрный вестник. – 2017. – № 4 (44). – С. 150–156.

4. Addo K.K., Mensah G.I., Aning K.G., Nartey N., Nipah G.K., Bonsu C., Akyeh M.L., Smits H.L. Microbiological quality and antibiotic residues in informally marketed raw cow milk within the coastal savannah zone of Ghana // Tropical Medicine and International Health., 2011, 16:227–232.

5. Castanon J.I.R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds // Poultry Science, 2007, 86:2466–2471.

6. Darwish W.S., Eldaly E.A., El-Abbasy M.T., Ikenaka Y., Nakayama S., Ishizuka M. Antibiotic residues in

food: The African scenario // Japanese Journal of Veterinary Research, 2013, 61:S.13–22.

7. Food and Agricultural Organization. FAO Publications Catalogue 2017. United Nations: Food and Agricultural Organization; 2017. Retrieved from <http://www.fao.org/3/b-i6407e.pdf>.

8. Goetting V., Lee K.A., Tell L.A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: A review of the literature // Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy, 2011, 34:521–556.

9. Marshall B.M., Levy S.B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health // Clinical Microbiology Reviews, 2011, 24:718–733.

10. Mathew A.G., Liamthong S., Lin J. Evidence of Int 1 transfer between Escherichia coli and Salmonella typhi // Food Biology, 2009, 6(8):959–964.

11. Mehdizadeh S., Kazerani H.R., Jamshidi A. Screening of chloramphenicol residues in broiler chickens slaughtered in an industrial poultry abattoir in Mashhad, Ira // Iranian Journal of Veterinary Science and Technology, 2010, 2:25–32.

12. Mirlohi M., Aalipour F., Jalali M. Prevalence of antibiotic residues in commercial milk and its variation by season and thermal processing methods // International Journal of Environmental Health Engineering, 2013, 2:41.

13. World Bank. Drug-resistant infections: a threat to our economic future. 2016. (см. <http://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-oureconomic-future>).

Акчурун Сергей Владимирович, канд. вет. наук, доцент, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева. Россия. 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. Тел.: 89629833927.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты и белки; Stains all; люминесцентный спектральный анализ; клебсиеллез цыплят; «Энрофлон».

STUDY OF EFFECTIVENESS OF ANTIBACTERIAL THERAPY BY THE MICRO-SPECTRAL ANALYSIS METHOD

Akchurin Sergey Vladimirovich, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the chair “Veterinary medicine”, Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Russia.

Keywords: nucleonic acids and proteins; Stains all; spectral analysis; Klebsielliosis; chickens; “Enroflon”.

The method of fluorescent spectral analysis using the metachromatic fluorescent «Stains all» allows finding out the ratio of nucleic acid and proteins in the epithelium of the mucous membrane ferruterous stomach in the control group and infected with Klebsiella pneumoniae. The dynamics of

changes in these ratios reflects the special aspects of the functional state of the cells in this zone normally, with Klebsielliosis disease and in its treatment. In the control group, it stayed within the gradual increase in their functional activity respectively to the increase in the age of the chickens. The changes of functional status of these cells in the infected chickens were complicated, depending on both the impact of the agent and from the action of the “Enroflon” preparation. These findings can be taken into account in the formation of a fundamentally new approach to the question of the creation of modern technologies of prevention and treatment of Klebsielliosis.

