

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ -  
МСХА ИМЕНИ К.А. ТИМИРЯЗЕВА»**

На правах рукописи

**АКЧУРИН СЕРГЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ**

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

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

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора ветеринарных наук

Научный консультант:  
доктор ветеринарных наук,  
профессор, член-корреспондент  
РАН Ларионов Сергей Васильевич

Москва - 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	18
1.1 Болезни кур, вызываемые патогенными энтеробактериями: этиология, эпизоотология, патогенез .....	18
1.1.1 Клебсиеллез .....	18
1.1.2 Эшерихиоз .....	22
1.1.3 Сальмонеллез .....	27
1.2 Антибиотики и их альтернативы в птицеводстве .....	32
1.2.1 Исторический аспект использования антибиотиков в животноводстве .....	32
1.2.2 Применение антибиотиков в птицеводстве .....	35
1.2.3 Влияние антибиотиков на организм кур .....	36
1.2.4 Влияние антибиотиков в рационе кур на здоровье потребителей и окружающую среду .....	37
1.2.5 Устойчивость бактерий к антибиотикам .....	38
1.2.6 Разработка альтернатив антибиотикам .....	39
1.3 Биологические маркеры для мониторинга здоровья органов желудочно-кишечного тракта домашней птицы .....	51
1.3.1 Общие понятия .....	51
1.3.2 Биомаркеры в стенке кишечника .....	54
1.3.3 Биомаркеры в крови и печени .....	57
1.3.4 Фекальные биомаркеры .....	60
1.4 Люминесцентный спектральный анализ .....	66

1.4.1 Применение люминесцентного спектрального анализа для мониторинга функционального состояния клеток .....	66
1.4.2 Методы люминесцентного спектрального анализа для оценки функционального состояния клеток .....	67
1.4.3 Люминесцентные красители, применяемые для изучения внутриклеточного метаболизма .....	73
1.5 Влияние антибиотиков на органы желудочно-кишечного тракта ...	77
1.6 Заключение по обзору литературы .....	80
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	83
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ АНАЛИЗ .....	95
3.1 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 .....	95
3.2 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 .....	100
3.2.1 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 (Метод с этидиумом бромида) .....	100

3.2.2 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 (Метод с ДХТАФ) .....	107
3.2.3 Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа для обнаружения, определения соотношения органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в клетках желудочно-кишечного тракта цыплят с использованием метакроматического флуорохрома «Stains all» и оценки их функционального состояния (Метод со Stains all).....	112
3.2.4 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 метакроматического флуорохрома «Stains all» (Модификация метода со Stains all) .....	125
3.2.5 Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа для обнаружения, определения количественного содержания нуклеиновых кислот и белков и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят по их количественному содержанию с применением флуорохромов «Этидиум бромид» и «ДХТАФ» при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза (Метод с этидиумом бромидом и ДХТАФ) .....	130
3.3 Сведения о функциональном состоянии клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальном заражении клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллёзом, полученные при экспериментальной апробации разработанных методов...	141

3.3.1 Клиническая картина и основные патоморфологические изменения у цыплят при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза .....	141
3.3.2 Продуктивные показатели интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом и сальмонеллезом .....	145
3.3.3 Сведения о функциональном состоянии клеток железистого желудка цыплят, полученные Методом с этидиумом бромидом .....	147
3.3.4 Сведения о функциональном состоянии клеток печени цыплят, полученные Методом с ДХТАФ .....	162
3.3.5 Сведения о функциональном состоянии клеток железистого желудка цыплят, полученные Методом со Stains all .....	168
3.4 Сведения о функциональном состоянии клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза, полученные при экспериментальной апробации разработанных методов .....	190
3.4.1 Клиническая картина и основные патоморфологические изменения у цыплят при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза и проведении антибиотикотерапии .....	190
3.4.2 Продуктивные показатели цыплят при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза .....	192
3.4.3 Сведения о функциональном состоянии клеток и тканей железистого желудка цыплят, полученные Методом со Stains all ...	193
3.4.4 Сведения о функциональном состоянии клеток и тканей железистого желудка цыплят, полученные Модификацией метода со Stains all .....	213

3.4.5 Сведения о функциональном состоянии клеток и тканей железистого желудка цыплят, полученные Методом с этидиумом бромида и ДХТАФ.....	217
3.5 Обсуждение полученных результатов .....	223
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	238
РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ .....	245
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	246
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	248
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА .....	309
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	321

## ВВЕДЕНИЕ

### **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 (Schouler C. et al., 2012; Mellata M., 2013; Mohammed Aly M., Khalil S., Metwaly A., 2014; 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.

По оценкам Всемирного банка, к 2050 году с высокой вероятностью антибиотики и другие противомикробные препараты уже не позволят эффективно лечить инфекции, и страны с низким уровнем доходов при этом могут потерять более 5 процентов своего валового внутреннего продукта (ВВП), а не менее 28 миллионов человек, в основном в развивающихся странах, могут оказаться за чертой бедности (World Bank, 2016).

Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО) предполагает, что в результате изменения климата новые зоонозные заболевания достигнут Европы, а лекарственные препараты, призванные защитить продовольственные системы от этих заболеваний, будут становиться менее эффективными ввиду усиления устойчивости к противомикробным препаратам (УПП). Изменения моделей распределения носителей, патогенов и хозяев с большой степенью вероятности приведут к повышению спроса на лекарственные препараты и создадут угрозу усиления УПП (ЕКСХ, 2017).

В ответ на изменяющиеся внешние условия многими авторитетными организациями (ФАО, 2016; МСХ России, 2016; ЕКСХ, 2017) указывается на необходимость развития научных изысканий, в том числе в следующих направлениях:

- повышение качества профилактической работы и диагностики всех заболеваний, в том числе разработка недорогих эффективных и быстродействующих инструментов диагностики, позволяющих назначать лечение на основе объективных данных;
- разработка новых противомикробных препаратов, вакцин и альтернативных вариантов действий, в том числе изыскание путей сокращения применения противомикробных препаратов в животноводстве;
- создание эффективных методов работы для увеличения срока действия и повышения эффективности противомикробных препаратов.

В настоящее время в ветеринарной науке ведется активный поиск новых лекарственных форм, при этом в качестве контроля морфологических изменений, развивающихся в тканях под воздействием того или иного препарата, в отечественной практике широко используются различные методы, в том числе гистологические и гистохимические. Однако характер изменений, обнаруживаемых в гистологических срезах тканей с помощью предлагаемых методов, устанавливается в основном на основании субъективной визуальной оценки, что делает невозможным определение количественного содержания

выявляемых веществ и тем самым затрудняет физиологическую трактовку и оценку изучаемых явлений.

Для разработки лекарственных 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 (Акчурин С.В., 2011).

Известно, что молекулы химических соединений клетки (белки, нуклеиновые кислоты и т.д.) обладают характерными спектрами поглощения и люминесценции, а развитие разнообразных патологических состояний сопровождается соответствующими физико-химическими изменениями, происходящими в структуре таких молекул. Это находит отражение на спектральных характеристиках, регистрация которых позволяет проследить тонкие биохимические изменения в состоянии различных клеток и тканей. При этом контроль постоянства концентрации люминесцентной метки осуществляется посредством измерения концентрации красителя по поглощению света в максимуме полосы его поглощения, что обеспечивает стандартизацию полученных результатов (Акчурин С.В., 2011).

В настоящее время в ветеринарной практике используются люминесцентно-микроскопические методы с применением флуорохромов. Однако, данные методы базируются лишь на констатации вторичной люминесценции исследуемых объектов без регистрации характерных для данного красителя спектральных характеристик, в связи с чем данные методы имеют слабые

стороны. В частности, они не позволяют определять количественное содержание органических веществ в клетках, особенности их распределения в разнообразных структурах, динамики при воздействии различных патологических факторов и лекарственных средств.

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 (Акчурин С.В., 2008; Акчурин С.В., 2011).

Таким образом, разработка новых методов обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и совершенствование на их основе методов оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят необходимо считать научной стороной разрешения большой актуальной задачи ветеринарной медицины, которая может оказать содействие в создании высокоэффективных отечественных технологий производства антибиотиков, антиинвазивных, противовирусных, иммуномодулирующих препаратов для птицеводства.

### **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-микроскопических критериев 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 обнаружения, определения количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в гистологических срезах внутренних органов (печени и железистого желудка) цыплят методами люминесцентного спектрального анализа клеток с использованием флуорохромов.

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 фундаментальные сведения по закономерностям функционирования печени и железистого желудка цыплят. Полученные данные имеют общебиологическое 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 концептуальные 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 (приложение 1); № 2537165 «Микроспектральный способ оценки эффективности фармакотерапии в ранние сроки лечения клебсиеллеза птиц антибактериальными препаратами» от 27.12.2014 (приложение 2).

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе на профильных кафедрах ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» (приложение 3), ФГБОУ ВО «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева» (приложение 4), ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И.Вавилова» (приложение 5) и в производственной деятельности фармакологической компании ООО Нита-Фарм (приложение 6).

Разработаны рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии (приложение 7).

#### **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).

В ходе работы использовались современные методы, что позволило определить функциональное состояние клеток печени и железистого желудка интактных цыплят, цыплят экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом и подвергавшихся антибиотикотерапии клебсиеллеза. Для решения поставленных задач был использован комплекс высокотехнологичного оборудования научных подразделений ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», ФГБУ «Саратовская межобластная ветеринарная лаборатория», ФГБУИН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук», ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева».

#### **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 «APITECH- 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.

### **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 литературы, список иллюстративного материала, приложения. Список литературы содержит 579 источников, в том числе 430 иностранных. Работа содержит 24 таблицы, 87 рисунков, 10 приложений.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Болезни кур, вызываемые патогенными энтеробактериями: этиология, эпизоотология, патогенез

#### 1.1.1 Клебсиеллез

Клебсиеллез – инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая капсульными бактериями рода *Klebsiella* семейства *Enterobacteriaceae*.

По данным Г.Р. Садртдиновой (2017) чаще всего негативное проявление в виде болезней человека и животных присуще видам: *Klebsiella pneumoniae* подвид *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* подвид *rhinoscleromatis* и *Klebsiella oxytoca*.

В.П. Ольховик (2009) сообщает, что основным этиологическим агентом при клебсиеллезе бройлеров является *K. rhinoscleromatis*. При этом *K. ozaenae* и *K. oxytoca* играют второстепенную роль. М.И. Dessouky, А. Moursy, Z.M. Niari (1982) считают, что главная роль в развитии патологического процесса принадлежит *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*.

Вместе с тем бактерии рода *Klebsiella* являются одними из ведущих агентов бактериальных ассоциаций (Ковалева Е.П., Рейзис А.Р., 1993).

Патогенность клебсиелл объясняется несколькими факторами вирулентности, которые позволяют возбудителю избежать врожденных иммунных механизмов хозяина. Среди всех факторов вирулентности важно выделить капсулу, экзополисахарид, связанный с муковискозностью, липополисахариды, адгезины и системы поглощения железа (Broberg S.A. et al., 2014).

Заболевание получило широкое распространение в птицеводческих хозяйствах и в настоящее время регистрируется во многих регионах мира: Европе (Valentin A., Willsch K., 1987), Африке (Abd-el-Motelib T.Y., el-Zanaty K., 1993), Азии (Sarakbi T.M.B., 1986). Заболевание регистрируется и в Российской Федерации (Ольховик В.П., 2009).

Широкое распространение клебсиелл в природе обусловлено их

устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, воздействию дезинфектантов и антимикробных препаратов, а также высокой степенью их адаптации (Casewell M.W., Phillips J., 1981; Kaur K., Kaul M., Chhibber S., 1988; Мойсеенко Н.Н., 1990; Журавлёв П.В., 1991; Шарга Б.М., Туряница А.И., 1993). Бактерии рода *Klebsiella* выделяли из морской и питьевой воды, молочных продуктов, почвы, растений, семян, овощей (Ольховик В.П., 2009).

Во внешней среде клебсиеллы высокоустойчивы. В почве, воде, сточных водах они могут существовать многие месяцы (Мойсеенко Н.Н., 1985; Журавлёв П.В., 1991), в пыли при различной степени влажности клебсиеллы выжили до 2,5 лет (Montgomerie J.Z., Ota J.K., 1980).

При этом к наибольшим экономическим потерям приводит заражение птиц *Klebsiella pneumoniae* (Mohammed Aly M., Khalil S., Metwaly A., 2014).

Клебсиеллы могут поражать эмбрионы, молодняк и взрослую птицу (Orajaka L.J., Mohan K., 1985; Sarakbi T., 1989; Ольховик В.П., 2009; El-Hafez A., Shaker M., 2011; Mohammed Aly M., Khalil S., Metwaly A., 2014). В естественных условиях к клебсиелллёзу восприимчивы коровы, телята, свиноматки, поросята, лошади, голуби, канарейки, обезьяны, лабораторные животные (Красноголовец В.Н., Киселева Б.С., 1996; Nevarez Garza A.M. et al., 1997; Красиков А.П., Конин Д.В., 1998; Черников А.А., Васильев Д.А., 1998; Терехов В.И., Тельнов С.Н., 1999; Razmyar J., Zamani A.H. 2016).

Многими авторами указывается, что передача клебсиелл от домашней птицы людям представляет опасность для человека (Fielding B.C., 2012; Kowalczyk J. et al., 2017).

У людей клебсиеллы могут вызвать различные инфекционные заболевания: инфекции дыхательной системы и мочевыводящих путей, острые кишечные инфекции, септицемии, инфекции кожи и мягких тканей, мозговых оболочек и т.д. (Савельев В.Н., 1978; Kasprzyk S.S., 1983; Фесенко О.В., Швайко С.Н., 2019).

В настоящее время штаммы *K. pneumoniae*, устойчивые к антибиотикам, представляют серьезную угрозу для практического здравоохранения и

отнесены Всемирной организацией здравоохранения в группу возбудителей с «критически высоким уровнем приоритетности» (Анганова Е.В., 2012; Анганова Е.В., Крюкова Н.Ф., Савилов Е.Д., 2016; Покудина И.О., Коваленко К.А., 2016; WHO, 2017).

Основным резервуаром возбудителя клебсиеллеза на птицефабриках, неблагополучных по данному заболеванию, служат поверхность клеток и питьевая вода, инфицированные выделениями больных цыплят, а также пыль птичников (Ольховик О.П., 2009; Садртдинова Г.Р., 2016).

Наиболее подробно воздействие антибиотиков на клебсиелл изучено в медицинской практике. По данным Киселевой Б.С. с соавт. (1983) клебсиеллы обладают высокой и средней чувствительностью к некоторым аминогликозидным препаратам (гентамицину, неомицину, тромбомицину, сизомицину) и цефалоспорином (цефатоксим, цефтизоксим). Высокую устойчивость к пенициллину, левомецетину, тетрациклину, эритромицину, карбенициллину и др. препаратам установил Г.Ф. Бовкун (1986). Клебсиеллы проявляли высокую устойчивость к азитромицину, эритромицину (Mohammed Aly M., Khalil S., Metwaly A., 2014), пенициллину, хлоргексидину, тетрациклину (Родионова А.В., Садртдинова Г.Р., 2016).

В.П. Ольховик (2009) проведено тестирование 24 антимикробных препарата в отношении *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* и *K. oxytoca*. Установлена высокая чувствительность культур клебсиелл к комплексным препаратам: квинокол, польдодоксин и диоксиген.

Б.М. Шарга, А.И. Туряница (1993) объясняли устойчивость клебсиелл к некоторым антибиотикам наличием R-плазмид, передающих генетический материал другим штаммам.

Клебсиеллы могут распространяться от больных птиц горизонтальным и вертикальным (через инфицированные яйца) путями (Ольховик В.П., 2009).

В.П. Ольховик (2009) считает, что инкубационный период при клебсиеллезе цыплят может составлять 5-8 дней.

В доступной нам литературе не описан механизм патогенеза клебсиеллеза

у птиц. В.И. Семенцов и др. (2009) при рассмотрении вопроса патогенеза у поросят предположили, что клебсиеллы, как и все энтеробактерии, обладают экзо- и эндотоксином, оказывающими воздействие на слизистую кишечника, снижающими местную резистентность, приводящими к дисбактериозу. Проникая в кровь, клебсиеллы вызывают септикопиемию. Выделяемые токсины обуславливают развитие угнетения и другие клинические признаки болезни».

Бактерии рода *Klebsiella* являются одними из ведущих агентов бактериальных ассоциаций (Ковалева Е.П., Рейзис А.Р., 1993). К.-Н. Hinz et al. (1992) зафиксировали ассоциативное течение болезни органов дыхания молодняка индеек, вызванное *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella avium* и *Chlamydia psittaci*.

По данным В.П. Ольховик (2009) процент выделения монокультур клебсиелл от бройлеров, из инкубационного яйца и замерших эмбрионов составлял в среднем 12,4 %. В 33,7 % проб клебсиеллы выделялись в ассоциации со стрептококками, в 43,1 % – вместе со стрептококками и бактериями кишечной группы (эшерихии, протей, энтеробактеры, кливера, шигелла), в 10,8 % – в ассоциации с энтеробактериями. При трансвариальном заражении эмбрионов клебсиеллой вывод цыплят на птицефабрике снижается до 54–60 %. Количество нежизнеспособных цыплят, выведенных из инфицированных клебсиеллой яиц (погибающих в первые 4–5 дня жизни) составляет 7–8 %.

В.П. Ольховик (2009) установлено, что клебсиеллез у бройлеров протекает в респираторной и кишечной формах. Респираторная форма ассоциируется с *K. rhinoscleromatis* и характеризуется угнетением птицы, потерей аппетита, поражением органов дыхательной системы (затрудненное дыхание, одышка, кашель, риниты), слезо- и слюнотечением, снижением прироста живой массы тела. Кишечная форма клебсиеллеза регистрировалась у цыплят старше 20-ти дневного возраста. При этой форме отмечалось усиление жажды, потеря аппетита и понос.

Патологическая картина клебсиеллеза цыплят по данным В.П. Ольховик (2009) характеризовалась при респираторной форме серозно-геморрагическим ринитом, серозно-фибринозными аэросаккулитами, фибринозной

пневмонией; при кишечной форме – геморрагическим воспалением железистого желудка, серозно-геморрагический отёком подслизистой оболочки мышечного желудка, катаральным воспалением слизистой оболочки тонкого кишечника, паренхиматозным воспалением печени, нефрозом.

S.G. Liu, M.H. Gan, Z.M. Zhao (1988) сообщили о болезни глаз у молодняка кур 4-недельного возраста, вызванной *Klebsiella*.

Для профилактики клебсиеллеза рекомендовано строгое соблюдение норм гигиены в работе с инкубационными яйцами и санитарные условия в инкубаторном цехе (Liu S.G, Gan M.H., Zhao Z.M., 1988).

В качестве средств профилактики заболевания необходимо использовать дезинфицирующие средства. В.П. Ольховик (2009) было установлено, что наиболее эффективными в отношении возбудителей клебсиеллеза были роксацин и катомин, бактерицидная концентрация которых находилась в пределах 0,008 % – 0,02 %, а бактериостатическая – 0,004–0,006 %. Раствор хлорной извести и формалина, наиболее часто используемые на птицефабриках, ингибировали рост клебсиеллы в концентрации 0,125 %, а их бактерицидная активность была в пределах 0,6 %. Исследования продемонстрировали, что изоляты клебсиелл устойчивы к дезинфицирующим средствам, часто используемым на птицефабриках.

### **1.1.2 Эшерихиоз**

Эшерихиоз (колибактериоз, колисептицемия, колибациллез) – бактериальная септическая болезнь птиц, характеризующаяся дистрофическими и некротическими изменениями во внутренних органах, снижением продуктивности, иммунологической реактивности, и высокой смертностью. Возбудитель болезни – *Escherichia coli* (кишечная палочка) – грамотрицательная палочка, не образующая спор и капсул, относится к роду *Escherichia* семейству *Enterobacteriaceae* (Дмитриева М.Е., Алхлаев И.М., 2014). Эшерихиоз у домашней птицы обычно рассматривается как вторичное заболевание (Barnes H.J., Gross W.B., 1997), хотя некоторые изоляты способны вызывать

заболевания самостоятельно (Cheville N.F., Arp L.H., 1978; Dhillon A.S., Jack O.K., 1996; Zanella A. et al., 2000).

В структуре падежа птицы от бактериальных болезней 50–70 % приходится на эшерихиоз (Азаев Г.Х., Мусиев Д.Г., Магомедов М.З., 2015; Поломошнова И.А., 2015; Шестаков В.А., 2016; Портянко А.В. и др., 2017).

*E. coli* считается представителем нормальной микрофлоры кишечника птицы, но некоторые патогенные штаммы, распространяясь по различным внутренним органам, вызывают системное заболевание с летальным исходом (Barnes H.J., Gross W.B., 1997; La Ragione R.M., Woodward M.J., 2002).

Изоляты кишечной палочки, патогенные для домашней птицы, обычно относятся к определенным серогруппам, в частности к серогруппам O78, O1 и O2 и в некоторой степени к O15 и O55 (Gross W.B., 1994; Chart H., 2000).

При исследовании бактериологическим методом биологического материала от 198 птиц В.Ю. Вионкуровым (2010) были выделены следующие серотипы *E. coli*: 01 – 9,09 %, 08 – 11,1 %, 015 – 25,75 %, 023 – 9,09 %, 045 – 10,1 %, 078 – 34,8 %.

Птичий эшерихиоз широко распространен у кур всех возрастов, но наиболее часто болезнь регистрируется среди взрослых птиц (Rahman M.A., 2004). Многие авторы отмечают, что традиционно заболевание регистрировалось у бройлеров, однако во многих европейских странах значительно возросла заболеваемость кур-несушек (Zanella A. et al., 2000; Vanderkerchove D. et al., 2004; Jordan F.T. et al., 2005). Заболевание является наиболее распространенной причиной смертности промышленных и племенных цыплят (Nolan L.K., 2013).

Эшерихиоз кур зарегистрирован во многих странах мира (White D.G. et al., 2000; Saenz Y. et al., 2003; Vandekerchove D. et al., 2004; Yang H. et al., 2004; Omer M.M. et al., 2008; Chansiripornchai N., 2009), в том числе в России (Поломошнова И.А., 2015).

Эшерихиоз является одной из основных причин значительных экономических убытков в птицеводстве, которые складываются из смертности

эмбрионов, цыплят, снижения прироста живой массы и яйценоскости, затрат на проведение лечебных мероприятий (Yogarathnam V., 1995; Ewers C., Janssen T., Wieler L.H., 2003; Schouler C. et al., 2012; Николаенко В.П. и др., 2018).

Т.А. Russo, J.R. Johnson (2003), М. Mellata (2013) приводят сведения о том, что в США затраты, связанные с вызываемыми *E. coli* у людей и домашней птицы инфекциями, превышают 4 миллиарда долларов в год.

Наиболее важным резервуаром для кишечной палочки служит желудочно-кишечный тракт домашней птицы (Lutful Kabir S. M., 2010). *E. coli* также выделяется из верхних дыхательных путей (Lutful Kabir S. M., 2010). Кроме того, бактерии присутствуют на коже птицы и перьях. Эти штаммы относятся как к патогенным, так и непатогенным типам (Harry E.G., Hemsley L.A., 1965).

В яйцах, поступивших на инкубацию, *E. coli* остаётся жизнеспособной в течение всего периода инкубации, в высушенных фекальных массах больной птицы она сохраняется 25–30 дней (Николаенко В.П. и др., 2018).

У одной птицы, как правило, присутствует большое количество различных типов кишечной палочки, получаемых из окружающей среды, в частности от других птиц, фекалий, воды и корма (Dho-Moulin M., Fairbrother J.M., 1999; Бессарабов Б.Ф. и др., 2007; Барышников П.И. и др., 2012; Мартин Д.В., 2014). Грызуны также могут быть носителями патогенной кишечной палочки и источником заражения для птиц (Barnes H.J., Gross W.B., 1997).

D. Greenwood et al. (2002), К.Е. Rodriguez-Siek et al. (2005), Z.R. Stromberg (2017) отмечают, что патогенные штаммы, выделенные от птиц, служат частой причиной заболеваний человека. В качестве мер профилактики заражения людей эшерихиозом предлагается сокращение патогенных штаммов *E. coli* в кишечнике кур, а также на тушах и в мясных продуктах.

К основным факторам риска относятся: состояние помещения, плотность посадки птицы, длительность воздействия возбудителя, вирулентность штамма, порода и иммунный статус птицы (Gross W.B. et al., 1980; Rosenberger

J.K. et al., 1985; Gross W.B., 1992; Pourbakhsh S.A. et al., 1997; McGruder E.D., Moore G.M., 1998; Винокуров В.Ю., 2010). Повреждение органов дыхательной системы способствует заражению эшерихиозом. Этому также может способствовать неблагоприятный микроклимат помещения, в том числе избыток аммиака или пыли (Barnes H.J., Gross W.B., 1997).

При изучении годовой динамики заболеваемости цыплят эшерихиозом В.Ю. Винокуров (2010) установил сезонность ее проявления: с апреля по сентябрь с пиком в августе.

Неонатальное заражение птенцов может происходить горизонтально, из окружающей среды, или вертикально, от курицы. Вертикальный путь передачи происходит при заражении эмбриона до момента образования скорлупы курицей-несушкой, являющейся носителем патогенного штамма *E. coli*, в результате развившегося оофорита или сальпингита. Возможно фекальное заражение яичной скорлупы во время прохождения яйца через клоаку и после кладки. Последняя возможность рассматривается как основной путь заражения для яйца (Barnes H.J., Gross W.B., 1997).

Бактерии до вылупления цыплят вызывают инфекцию желточного мешка и гибель эмбрионов. Цыпленок также может заразиться во время или вскоре после вылупления. У бройлеров может развиваться некротический дерматит, характеризующийся хроническим воспалением подкожной жировой клетчатки в области живота и бедер (Barnes H.J., Gross W.B., 1997).

Энтеротоксигенная кишечная палочка вызывает энтерит и диарею у домашней птицы (Dho-Moulin M., Fairbrother J.M., 1999; Zanella et al., 2000). У бройлеров нередко регистрируется острый или хронический сальпингит, который может быть результатом восходящей инфекции от клоаки (Bisgaard M., Dam A., 1981). Сальпингит может стать причиной потери яйцекладки (Dho-Moulin M., Fair brother J.M., 1999), а также желточного перитонита (Barnes H.J., Gross W.B., 1997). Аэросаккулит наблюдается у птиц всех возрастов. Птица заражается после вдыхания пыли, загрязненной фекальными массами. Аэрогенный путь заражения считается основным источником

эшерихиоза. Сепсис может возникнуть у кур всех возрастов. Наиболее распространенная форма заболевания характеризуется полисерозитом (Goren E., 1991).

По данным ряда авторов гибель бройлеров от эшерихиоза бройлеров составляет 1,4–12,7 % (Тугаринов О.А., 1987; Gryan B., 1990; Yadav R., 2018).

Инкубационный период составляет от 15 часов до 10 суток, в том числе при алиментарном заражении – 2–3 суток (Терентьев А.А., 2000; Вершняк Т.В., 2003).

А.А. Терентьев (2000) приводит следующие данные о клинической картине колисептицемии. На первом этапе – расстройство пищеварения (снижение аппетита и диарея). В дальнейшем – тяжелое дыхание, угнетение, отказ от корма, судорожные подергивания и парезы конечностей.

По данным А.А. Терентьева (2000) при экспериментальном воспроизведении колисептицемии на цыплятах была выявлена следующая патологоанатомическая картина: фибринозный перикардит, перигепатит, аэросаккулит, реже поражение серозного покрова селезенки и кишечника, набухание и покраснение сосочков выводных протоков желез железистого желудка. Гистологическая картина: микробная тромбоземболия сосудов сердца, печени, селезенки, головного мозга; некротические фокусы в паренхиматозных органах, окруженные гигантоклеточным поясом; серозный менингоэнцефалит, острое катаральное воспаление желудка и кишечника, снижение количества лимфоцитов в селезенке, тимусе, фабрициевой бурсе, слизистая дистрофия и десквамация покровного и железистого эпителия, деструкция трубчатых желез, отек и лимфоидная инфильтрация подслизистого слоя.

Патогенные штаммы *E.coli* устойчивы к антибиотикам, применяемым в птицеводстве, в том числе к цефрадину (Rahman M.A., 2004), тетрациклину (Cloud S.S. et al., 1985; Irwin R.J. et al., 1989; Blanco J.E. et al., 1997; Bass L. et al., 1999; Rahman M.A. et al., 2004), хлорамфениколу (Cloud S.S. et al., 1985), сульфаниламидам (Cloud S.S. et al., 1985; Blanco J.E. et al., 1997; Li X.S. et al., 2007), аминогликозидам (Allan B.J., 1973; Irwin R.J. et al., 1989; Blanco J.E. et

al., 1997; Bass L. et al., 1999), Бета-лактамым антибиотикам (Cloud S.S. et al., 1985; Irwin R.J. et al., 1989; Rahman M.A. et al., 2004), фторхинолонам (Blanco J.E. et al., 1997; White D.G. et al., 2000; van den Bogaard A.E. et al., 2001).

Исследователями разрабатываются и предлагаются для использования в промышленном птицеводстве альтернативы антибиотикам для профилактики данного заболевания. Так, В.Ю. Винокуров (2010) отметил положительный эффект от применения пробиотического препарата «Биокорм» для профилактики эшерихиоза у цыплят.

Исследования на цыплятах, проведённые А.Ф. Новиковой и др. (2016), продемонстрировали высокую эффективность профилактического препарата на основе выделенных белковых фракций из термолабильного и термостабильного штаммов эшерихий в отношении возбудителя заболевания птиц.

По результатам исследования антисептического средства «Брокарсепт» В.П. Николаенко, М.С. Климов (2010) рекомендовали данный препарат для профилактики эшерихиоза птиц.

В.Н. Ласкавый и др. (2010) разработали и предлагают к использованию вакцину против эшерихиоза кур.

W.V. Gross et al. (1988) предложили использовать для лечения заболевания аскорбиновую кислоту, которая повышает эффективность фагоцитов в дозе 300 мг/кг корма.

### **1.1.3 Сальмонеллез**

Сальмонеллез – бактериальная болезнь сельскохозяйственных и диких птиц, протекающая в виде септицемии, поражения желудочно-кишечного тракта молодняка и скрытого бактерионосительства взрослых птиц. Причиной сальмонеллеза птиц являются бактерии рода *Salmonella* семейства *Enterobacteriaceae*.

*Salmonella* – это факультативный патоген, вызывающий локальные или системные инфекции, а также хроническое бессимптомное состояние носителя инфекции (Shivaprashad H.L., 1997). Этиологическим агентом

заболевания тифом и пуллорозом является *Salmonella enterica* подвида *Enterica* серовар *Gallinarum*, который под серогруппой D1 подразделяется на *Gallinarum* и *Pullorum* (Minor L., 1984; Shivaprashad H.L., 1997). В дополнение к

*S. gallinarum-pullorum*, другие сальмонеллы, такие как *S. enteritidis*, *S. panama* и *S. dublin*, также относятся к серогруппе D1 (Minor L., 1984). Серотипы *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium* обычно называют паратифозными сальмонеллами (Gast R.K., 1997).

Брюшной тиф и пуллороз распространены во многих странах мира и имеют серьезные экономические последствия (Barrow P.A., Berchieri A., Al-Haddad O., 1992). Заболевания регистрируются в Европе (Mouttotou N. et al., 2017), Латинской Америке, на Ближнем Востоке, на Индийском субконтиненте, в Африке, Юго-Восточной Азии (Bhattacharjee P.S. et al., 1996; Ghosh S.S., 1988) и в других частях света (Bouzoubaa K., Lemainguer K., Bell J.G., 1992). Сальмонеллез кур регистрируется и в России (Поломошнов Н.А., Малышева Л.А., 2011).

Заболевание наносит значительный экономический ущерб птицеводству. Например, по данным A. Wernicki, A. Nowaczek, R. Urban-Chmiel (2017) в США ежегодные экономические потери в птицеводстве из-за заражений птиц сальмонеллами и кишечной палочкой составляют от 1,2 млрд. долл. до 11,6 млрд. долл.

Экономические потери при сальмонеллезе кур складываются в основном из отхода цыплят раннего возраста, отставания в росте и развитии заболевшего молодняка кур, снижения яичной и мясной продуктивности взрослого поголовья, выбраковки положительно и сомнительно реагирующих в кровезащитной реакции непрямой гемагглютинации с эритроцитарным пуллорным антигеном, ограничений сбыта продукции хозяйств, неблагополучных по сальмонеллезу кур и затрат на оздоровление хозяйств (Шуляк Б.Ф., 2009).

Болеют птицы всех возрастов, но наибольшая частота заражения во взрослом возрасте (Rahman M.A. et al., 2004).

Пероральный путь представляет собой наиболее распространенный путь заражения (Brito J.R. et al., 1995). Хотя заражение птенцов носовым и клоакальным путями также считаются важными путями передачи. Цыплята могут быть инфицированы на ранней стадии путем вертикальной передачи либо из зараженного яичника, яйцевода или из зараженных яиц во время прохождения через клоакальные фекалии от зараженных кур-несушек. Птицы могут выжить после клинически проявляющегося заболевания, но остаться при этом носителями инфекции (Berchieri A., 2001). У взрослых кур репродуктивные органы являются местом скопления инфекции, что часто приводит к инфекции яичниковых фолликулов и способствует трансвариальной передаче заболевания. Бактерии выводятся через фекалии, а латеральное распространение происходит через загрязненные фекалиями корма, воду и подстилку (Shivaprashad H.L., 1997).

По данным С. Порре (2000) и ССФН (2007) косвенно способствовать распространению инфекции могут фермеры, домашние животные и грызуны, пух, пыль, стружка и солома, насекомые и оборудование.

Брюшной тиф – это острая, подострая или хроническая форма заболевания, поражающая в основном взрослых кур, в то время как пуллороз поражает цыплят, в основном, в возрасте 2–3 недель. У взрослых он имеет хроническое течение (Christensen J.P., 1996; Shivaprashad H.L., 1997). Брюшной тиф часто называют болезнью взрослых птиц, тем не менее, есть также сообщения о высокой заболеваемости и смертности молодых цыплят (Hall W.J., Legenhausen D.H., Macdonald A.D., 1949).

*S. gallinarum* может вызывать патологические изменения у цыплят, неотличимые от изменений, связанных с пуллорозом (Shivaprashad H.L., 1997). Определенный процент цыплят, выживающих после первоначальной инфекции, становятся носителем с наличием или отсутствием клинических признаков и патологических поражений (Shivaprasad H.L., 2000). Стресс-факторы, в том числе дефицит корма, антисанитарная обстановка могут усугубить

смертность и снизить производительность из-за сальмонеллеза, особенно у молодых птиц (Waltman W.D., Gast R.K., Mallinson E.T., 2008).

Патогенность сальмонелл зависит от инвазивных свойств и способности бактерий выживать и размножаться в клетках, особенно в макрофагах (Humbert F., Salvat G., 1997). Основным местом размножения бактерий является пищеварительный тракт. После проникновения через слизистую оболочку кишечника сальмонеллы поглощаются макрофагами и через кровоток и/или лимфатическую систему попадают в печень и селезенку (Barrow P.A., Huggins M.B., Lovell M.A., 1994). При недостатке защитного механизма организма они могут распространяться в другие органы, в частности в яичник, яйцевод, миокард, перикард, желудок, желточный мешок и легкие (Barrow P.A., 1993).

Инкубационный период при алиментарном заражении составляет 2-7 суток, при аэрогенном – 24-36 час. (Салаутин В.В., 2004; Бессарабов Б.Ф. с соавт., 2007).

По данным В.В. Салаутина (2004) клиническая картина при сальмонеллезе цыплят: коматозное состояние, сменяющееся возбуждением, диарея. К пятому дню болезни к указанным признакам могут добавляться судороги. На седьмой день отмечается отставание в росте по сравнению с контрольной группой. На девятый день – диарея отсутствует, фекалии коричневатого цвета с примесью уратов. К двадцатому дню наблюдается нормализация процесса. Отмечается резкое отставание цыплят в росте. Патоморфологическая картина при заражении цыплят *S. enteritidis*: 2-6 день заболевания – гиперемия, отек, кровоизлияния в органах; зернистая дистрофия печени, сердца, почек; некробиоз и некроз – в печени, оболочках желточного мешка, кишечнике, сердце, селезенке и др.; 7–18 день болезни – серозный менингоэнцефалит, альтернативно продуктивный гепатит и миокардит, острый серозный перикардит, некротическо-эрозивный гастрит, острый катаральный энтерит, катарально-фибринозный и дифтеритический тифлит, катаральная пневмония, нефроз, гломерулонефрит.

По данным Б.Ф. Бессарабова с соавт. (2007) летальность при сальмонеллезе кур в России составляет 13–25 %. Падеж цыплят в зависимости от сероварианта возбудителя составляет: *S. enteritidis* – 28 %, *S. typhimurium* – 12 %, *S. pullorum–gallinarum* – 16 % (Салаутин В.В., 2004).

Сальмонеллез является одним из наиболее распространенных заболеваний человека в мире, связанных с пищевым отравлением, на его долю ежегодно приходится около 93,8 млн. болезней и 155 тыс. случаев смерти во всем мире (Eng S.K. et al., 2015). Отчеты в США насчитывают более 1 млн. чел. с пищевым отравлением сальмонеллами каждый год и примерно в 20 % этих случаев птица была источником патогенных штаммов бактерий (Hoffmann S. et al., 2015). При этом данные за период с 2000 по 2008 год показывают, что в США средняя стоимость медицинских услуг, связанных с этой болезнью, оценивается в 55,5–93,2 млрд. долларов США (Scharff R.L., 2015). Отчеты из ЕС в 2015 году показали 94625 подтвержденных случаев сальмонеллеза у людей и 126 случаев летального исхода от данного заболевания (EFSA-ECDC, 2016).

Передача сальмонеллезной инфекции людям может происходить в результате приема пищи или воды, загрязненной отходами зараженных животных, прямого контакта с зараженными животными или употребления продуктов питания от зараженных животных (Eng S.K. et al., 2015). Традиционно домашняя птица, мясные продукты и яйца являются источниками пищи, наиболее часто определяемыми как ответственные за вспышки сальмонеллеза (Sanchez S. et al., 2002), хотя сальмонеллы также были обнаружены и в других продуктах.

Сальмонелла приобретает устойчивость к антибиотикам (Okolo M.I., 1986). Возникновение и размножение устойчивых к антибиотикам сальмонелл в окружающей среде, домашней птице, других животных может быть связано с использованием лекарственных кормов (Holmberg S.D., 1984; Gast R.K., Stephens J.F., 1988).

По данным К.А. Liljebjelke et al. (2017) большинство (51,3 %) изолятов *Salmonella*, выделенных от цыплят, были восприимчивы к антибиотикам, 26,7 % имели резистентность к тетрациклину, 23,7 % – стрептомицину, 9,1 % – сульфадиметоксину, 6,3 % – гентамицину и 15,1 % к ампициллину.

А.О. Ahmed et al. (2019) сообщили о высокой резистентности изолятов *Salmonella*, выделенных от цыплят, к ампициллину, цефотаксиму и цефтазидиму.

## **1.2 Антибиотики и их альтернативы в птицеводстве**

### **1.2.1 Исторический аспект использования антибиотиков в животноводстве**

История применения антибиотиков в сельском хозяйстве начинается с синтетических сульфонамидов, когда в 1935 году немецкий фармацевтический производитель Bayer выпустил на рынок препарат «Пронтозил». «Пронтозил» был первым эффективным препаратом против грамположительных инфекций и имел коммерческий успех (Lesch J.E., 2007).

К концу десятилетия «Пронтозил» и другие близкородственные сульфонамиды открыли новую эру химиотерапии (Kirchhelle С., 2019). Лекарственные препараты получили применение и в сельском хозяйстве. Начиная с 1938 года «Пронтозил» и другие сульфонамиды продавались в Великобритании для использования у животных (Kirchhelle С., 2017).

В 40-е годы американские компании Merck, Pfizer и American Cyanamid стали ведущими производителями синтетических и биологических антибиотиков. Благодаря тесным связям фармакологических компаний и производителей кормов исследователями было опробовано массовое лечение животных (Landecker Н., 2017).

В 1948 году сульфаквиноксалин компании Merck был первым антибиотиком против кокцидиоза, официально лицензированным для регулярного включения в корм домашней птицы. Использование антибиотиков также

увеличилось в других областях: пчеловодстве, рыбоводстве и животноводстве (Jones S.D., 2003; Lesch J.E., 2007; Campbell W.C., 2008; Smith-Howard K., 2017; Kirchhelle C., 2019).

В лаборатории Lederle фармацевтической компании American Cyanamid (США) обнаружили, что неэкстрагированные остатки антибиотиков способны увеличивать прирост веса животных. При этом считалось, что кормление малыми дозами антибиотиков-стимуляторов роста, профилактически защищает от бактериальных заболеваний (Finlay M.R., 2004; Bud R., 2009; Finlay M.R., Marcus A.I., 2016). После объявления об эффекте прироста живой массы животных в конце 1949 года продажи антибиотиков резко возросли.

В 1951 году новый корм с добавлением витамина B<sub>12</sub> и антибиотиков-стимуляторов роста был официально лицензирован в США (Kirchhelle C., 2019). По мнению С. Kirchhelle (2017), вероятнее всего, именно в это время началось стирание границ между стимулированием роста, терапией и профилактикой с применением антибиотиков.

После США антибиотики-стимуляторы роста (АСР) начали свое распространение по Западной Европе. АСР были лицензированы для использования без ветеринарного рецепта в Западной Германии в 1951 году, в Великобритании в 1953 году, в Нидерландах в 1954 году и во Франции в 1955 году (Thoms U., 2012; Kirchhelle C., 2018). Большинство стран первоначально лицензировали стимуляторы роста на основе пенициллина, окситетрациклина и хлортетрациклина (Kirchhelle C., 2019). В отличие от США, в Западной Европе фермеры, как правило, могли покупать только предварительно приготовленные растворы антибиотиков и корма. Таким образом, западноевропейские ветеринары сохранили гораздо больший контроль над антибиотиками, чем их американские коллеги (Jones S.D., 2003; Smith-Howard K., 2017).

СССР и Китай в течение 1940-х годов также работали над созданием антибиотиков (Bud R., 2009).

К 1960-м годам антибиотики быстро распространялись по всему миру. И, несмотря на то, что в период 1949-1970 гг. начали высказываться опасения по

поводу обнаружения остатков антибиотиков в продуктах животного происхождения, глобальное использование антибиотиков продолжало расти (Kirchhelle C., 2017).

Изменения в государственном подходе по ограничению использования антибиотиков обозначились в основном в 1980-х годах. В Швеции ограничения АСР были введены в 1977 году (Kirchhelle C., 2017).

В 2006 году вышел запрет на антимикробные стимуляторы роста (АСР) в кормах для животных в Европейском союзе (Регламент ЕС № 1831/2003). Это политическое решение было принято с учетом принципа предосторожности: «в тех случаях, когда существуют угрозы серьезного или необратимого ущерба, отсутствие полной научной определенности не должно использоваться в качестве причины для отсрочки принятия экономически эффективных мер по предотвращению деградации окружающей среды» (Принцип 15 Рио-де-Жанейрской декларации 1992 года).

В США терапевтическое и профилактическое применение антибиотиков в животноводстве и растениеводстве остается законным (Kirchhelle C., 2017).

В 2019 году распоряжением Правительства РФ утвержден план мероприятий на 2019 - 2024 гг. по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г. (Распоряжение Правительства РФ от 30 марта 2019 г. № 604-р). Планом, в частности, предусматривается введение в ближайшей перспективе запрета на использование противомикробных препаратов для ветеринарного применения не в лечебных целях, а также административной ответственности за их использование. Отдельно будет регулироваться использование противомикробных препаратов при изготовлении кормов.

### **1.2.2 Применение антибиотиков в птицеводстве**

За последние 50 лет использование антибиотиков в сочетании со строгими мерами биологической безопасности и гигиены помогло росту

промышленного птицеводства благодаря предотвращению негативного воздействия многих болезней птиц (Bermudez A.J., 2003).

В интенсивном птицеводстве, особенно в Северной Америке, часто используются антибиотики, такие как тетрациклин, бацитрацин, тилозин, салиномицин, вирджиниамицин и бамбермицин (Diarra M.S., Malouin F., 2014). В Соединенных Штатах тетрациклины представляют более двух третей противомикробных препаратов, вводимых животным (Gonzalez Ronquillo M., Angeles Hernandez J.C., 2017), тогда как в Европейском союзе (ЕС) они составляют только 37 % (Carvalho I.T., Santos L., 2016). Использование антибиотиков в качестве факторов роста не разрешено в странах-участницах Европейского надзора за ветеринарным антимикробным потреблением (ESVAC) (ESVAC, 2017).

В Российской Федерации в животноводстве и ветеринарии наиболее часто используются кормовые и лечебные антибиотики, такие, как гризин, бацитрацин, группы тетрациклинов, пенициллинов, стрептомицина и левомицетина (хлорамфеникола) (Борисова Т., 2018).

На большинстве птицеводческих предприятий России применяют по 2-4 курса антибиотиков за цикл выращивания цыпленка–бройлера, что вызывает мультирезистентность микроорганизмов и отсутствие эффекта от применения антибиотиков, процветание оппортунистических инфекций типа колибактериоза, сальмонеллеза, а также орнитобактериоза, гемофилеза и других, большей частью завезенных к нам с генетическим материалом из-за рубежа (Щепеткина С.В., 2018). К систематически выявляемым в продукции животноводства антибактериальным препаратам относятся нитрофураны, метронидазол, хлорамфеникол, сульфаниламиды, антибиотики тетрациклинового, пенициллинового и хиноксалинового ряда, макролиды, линкозамиды и аминогликозиды (Комаров А.А., 2018).

### 1.2.3 Влияние антибиотиков на организм кур

Антибиотики могут успешно использоваться в субтерапевтических дозах в птицеводстве для стимулирования роста (Harms R.H., Ruiz N., Miles R.D., 1986; Rosen G.D., 1996; Engberg R.M. et al., 2000; Barceló D., 2007; Khodambashi Emami et al., 2012; Chattopadhyay M.K., 2014) и для защиты здоровья птиц путем изменения иммунного статуса цыплят-бройлеров (Lee K.W. et al., 2012). Антибиотики позволяют контролировать желудочно-кишечные инфекции и состав микробиоты кишечника птиц (Dibner J.J., Richards J.D., 2005; Torok V.A et al., 2011; Singh P. et al., 2013).

Антибиотики, вероятно, обеспечивают оптимальную микробиоту для роста птиц (Dibner J.J., Richards J.D., 2005). Например, питание с салиномицином (60 частей на миллион) оказывает влияние на динамику микробиома слепой кишки цыплят (Fung S. et al., 2013). Сходным образом, использование виргиниамицина в качестве стимулятора роста было связано с увеличением количества видов лактобактерий в двенадцатиперстной кишке бройлеров (Dumonceaux T.J. et al., 2006).

J. Lin et al. (2013) обнаружили, что популяции *Lactobacillus* spp. в подвздошной кишке цыплят, получающих корм, содержащий бактериостатик тилозин, значительно меньше, чем у цыплят, не получающих тилозин. Это уменьшение видов лактобактерий после применения антибиотиков было продемонстрировано и в других исследованиях (Zhou H. et al., 2007; Danzeisen J.L. et al., 2011; Lee K.W. et al., 2012). Уменьшение популяции лактобактерий у животных, получавших антибиотики, вероятно, снижает кишечную активность солей гидролазы желчных кислот, что увеличивает относительное содержание конъюгированных солей желчи, тем самым способствует липидному обмену, сохранению энергии и увеличивает прирост массы животного (Lin J. et al., 2013).

#### **1.2.4 Влияние антибиотиков в рационе кур на здоровье потребителей и окружающую среду**

Помимо биологической резистентности, злоупотребление антибиотиками привело к образованию остатков лекарственных средств в продуктах животного происхождения (Gonzalez Ronquillo M., Angeles Hernandez J.C., 2017). Отдельные антибиотики (пенициллин, тетрациклин, макролид, аминогликозид, амфеникол) были обнаружены в пищевых продуктах (Diarra M.S., Malouin F., 2014).

Остатки антибиотиков в продуктах животноводства могут оказать неблагоприятное воздействие на здоровье человека. В первую очередь, это касается тетрациклинов, которые препятствуют развитию зубов у детей младшего возраста (Kummerer K., 2009). Бета-агонисты, в том числе кленбутерол, иногда приводят к пищевому отравлению и тремору мышц, учащенному сердцебиению и тахикардии (Chan T.Y., 1999).

B. Gassner, A. Wuethrich (1994) продемонстрировали присутствие метаболитов хлорамфеникола в мясных продуктах и пришли к выводу о возможной связи между наличием этих остатков антибиотиков в мясе и возникновением апластической анемии у людей.

По данным S. Manzetti, R. Ghisi (2014) глобальное потребление антибиотиков оценивается в диапазоне от  $1 \times 10^5$  до  $2 \times 10^5$  т. Большое количество антибиотиков, поступающее в окружающую среду, организует цикл биотрансформации и биоаккумуляции антибиотиков. Авторы отмечают, что наиболее уязвимыми экосистемами для загрязнения антибиотиками являются пруды, озера и почвы вблизи городских участков. При этом вода и отложения могут играть важную роль в переносе, развитии генов устойчивости к антибиотикам (Caplin J.L., Hanlon G.W., Taylor H.D., 2008; Laroche E. et al., 2009; Marti E. et al., 2014; Devarajan N. et al., 2017).

Большое количество антибиотиков, вводимых животным, выделяется в окружающую среду с мочой и фекалиями. Количество исходных соединений

и/или соединений метаболитов антибиотиков, выводимых с мочой и калом, составляет 30–90 % от потребляемой дозы (Carvalho I.T., Santos L., 2016).

Антибиотики попадают в почву и с пометом домашних животных. Остатки бацитрацина, салиномицина, пенициллина и виргиниамицина были обнаружены в курином помете в концентрациях от 0,07 до 66 мг / л (Furtula V. et al., 2010).

Противомикробные препараты оказывают воздействие на качественный и количественный микробный состав, обитающий в отложениях водоемов, что может влиять на деградацию органического вещества (Kummerer K., 2009).

Поведение антибиотиков в почве зависит от ее физико-химических свойств, характеристик, а также климатических условий. Так, по данным M. Pan, L.M. Chu (2017) кислотный дождь ускоряет накопление антибиотиков в навозе животных и на поверхности почвы, в то время как продолжительные дожди способствуют миграции антибиотиков в более глубокие части почвы. Авторы отмечают, что вымывание антибиотиков выше в песчаных почвах, чем в глинистых и илистых.

Различные антибиотики имеют различное место залегания в почве. Так, норфлоксацин и тетрациклин сохраняются на поверхности почвы, а сульфаметазин и эритромицин - в более глубоких слоях почвы и подземных водах.

M. De Liguoro et al. (2003) отмечали, что биотрансформация и биодеградация антибиотиков на сельскохозяйственных площадках может занимать до 150 дней. Побочные продукты антибиотиков в окружающей среде остаются биологически активными и могут быть потенциально более токсичными, стабильными и мобильными, чем их исходные соединения (Carvalho I.T., Santos L., 2016).

### **1.2.5 Устойчивость бактерий к антибиотикам**

Устойчивость бактерий к антибиотикам определяется как способность микроорганизмов размножаться в присутствии антибиотика, который обычно ингибирует или убивает микроорганизмы тех же видов (RUMA, 2016).

Устойчивость заключается в мутации или приобретении генов, переносимых мобильными генетическими элементами, такими как транспозоны, интегроны, плазмиды или фаги (Kempf I., Zeitouni S., 2012).

Резистентность бактерий к антибиотикам в своих исследованиях описывали многие авторы. Так, M.S. Diarra, F. Malouin (2014) показали, что более 43 % изолятов *Salmonella enterica*, выделенных на птицефабриках, были одновременно устойчивы к ампициллину, амоксициллин-клавулановой кислоте, цефтиофуру, цефокситиму и цефтриаксону. Устойчивость к антибиотикам была выявлена у энтерококков (Silbergeld E.K., Graham J., Price L.B., 2008), *Mycoplasma gallisepticum* (Pakpinyo S., Sasipreeyajan J., 2007) и *Salmonella* spp. (Manning J., Gole V., Chousalkar K., 2015), выделенных у бройлеров.

Куры содержат большое количество энтеробактерий, устойчивых к аминозидам в пищеварительном тракте и тетрациклину в мясе (Guillot J.F. et al., 1977; Yulistiani R. et al., 2017).

Сведения об антибиотикоустойчивости патогенных энтеробактерий представлены в главе 1.1.

### **1.2.6 Разработка альтернатив антибиотикам**

Влияние потребителей, обеспокоенных вредными последствиями применения антибиотиков, и запрет на антибиотики, принятый в ряде стран, побудили исследователей искать альтернативы антибиотикам. Альтернативные препараты должны поддерживать низкий уровень смертности поголовья, хороший уровень продуктивности, сохранять окружающую среду и здоровье потребителей.

В настоящее время существует целый ряд альтернатив, которые могут со временем заменить антибиотики. Среди них наиболее популярными являются пробиотики, пребиотики, ферменты, органические кислоты, иммуностимуляторы, бактериоцины, бактериофаги, фитогенные кормовые добавки, фитоциды, наночастицы и эфирные масла.

**Фитогенные кормовые добавки.** Многими исследователями отмечено положительное влияние фитогенных кормовых добавок на рост, продуктивность животных, улучшение состояния иммунной системы, повышение стрессоустойчивости (Windisch W. et al., 2008; Frankic T. et al., 2009; Toghyani M. et al., 2011; Huyghebaert G. et al., 2011; Ghasemi H.A. et al., 2014).

Растительные экстракты, также известные как фитобиотики, используются в кормлении животных, в качестве противомикробных, противовоспалительных, антиоксидантных и противопаразитарных средств (Труфанов О., 2016).

В.С. Буяров с соавт. (2020) сообщают о применении в качестве кормовых добавок для сельскохозяйственной птицы различных комбинаций лекарственных растений, например, мать-и-мачехи, подорожника, пижмы, чистотела, донника, полыни горькой, тысячелистника, ромашки аптечной, крапивы двудомной или душицы, зверобоя, подорожника, пижмы. Их сочетание позволяет повысить иммунитет, тонус организма птицы, способствовать выведению токсичных веществ.

Кормовая добавка, содержащая экстракты растений горчицы белой, аира болотного, перца черного, мыльнянки лекарственной, способствовала повышению живой массы цыплят и среднесуточного прироста живой массы на 5 %, увеличению сохранности поголовья на 7 %, снижению затрат корма на 1 кг прироста живой массы на 16 %, получению более высокого значения индекса продуктивности бройлеров (Беломожнов Т.Д., Журавлев М.С., 2019).

Исследования Н.Н. Ланцевой с соавт. (2015) показали положительное использование фитобиотика «Флорабис». Данный фитобиотик представляет собой комплекс тритерпеновых кислот пихты сибирской с ионами кобальта. Данные кислоты обладают ярко выраженными противовирусными, бактерицидными и иммуномодулирующими свойствами. В результате исследований установлено, что фитобиотик способствовал увеличению живой массы, среднесуточному приросту, сохранности поголовья, снижению затрат корма на кг прироста живой массы, повышению усвояемости питательных веществ

комбикорма. Установлено, что фитобиотик обладает пребиотическими свойствами, способствующими развитию собственной нормофлоры птицы, вырабатывающей необходимые ферменты, активизирующие симбионтное пищеварение.

З.Н. Алексеева с соавт. (2016) в опытах на молодках показали эффективность применения кедровой живицы и фитобиотика «Флорабис».

Эффективность фитогенных кормовых добавок при кормлении цыплят-бройлеров зависит от доли дополнительных компонентов, включенных в состав корма, а также физиологического периода развития цыплят (Mountzouris K.C. et al., 2011).

Включение *Lippia javanica* в дозе 5 г/кг корма для бройлеров оказало благотворное влияние на среднесуточный прирост в период выращивания, массу при убойе и профили жирных кислот мяса цыплят-бройлеров (Mrofu D.A. et al., 2016).

Установлено, что смесь порошка чеснока (5 г/кг) и черного перца (1 г/кг) оказала положительное влияние на прирост массы тела цыплят-бройлеров (Kirubakaran A. et al., 2016).

Исследование W. Jarriyawattanachaikul et al. (2016) показали, что растение *Cratogeomys formosum* может обладать противомикробной активностью в отношении *E. coli*, *S. jejuni* и *S. aureus*.

Фитогенная кормовая добавка, содержащая экстракты фенхеля (*Foeniculum vulgare* var. *Dulcemil*), мелиссы (*Melissa officinalis* L.), мяты перечной (*Mentha arvensis* L.), аниса (*Pimpinella anisum* L.), дуба (*Quercus Cortex*), гвоздики (*Syzygium aromaticum* L.) и тимьяна (*Thymus vulgaris* L.), в дозе 150 мг / кг в течение 39 дней, была столь же эффективна, как и антибиотик «Бацитрацин метилен дисалицилат» в борьбе с клостридиями, сальмонеллами и кишечной палочкой у цыплят-бройлеров (Wati T. et al., 2015).

Исследователями отмечается позитивное влияние фитогенных кормовых добавок на иммунную систему. Такое действие оказывало добавление в корм

нима (*Azadirachta indica*) (Landy N. et al., 2011) и черного тмина (*Nigella sativa* L.) (Ghasemi H.A. et al., 2014).

М.Р. Franciosini и соавт. (2016) установили, что водные экстракты орегано и розмарина повышали иммунитет бройлеров, балансировали микрофлору кишечника, необходимую для процессов пищеварения и защиты от энтеропатогенных микроорганизмов, а также улучшали продуктивные качества птицы.

Скармливание цыплятам-бройлерам эхинацеи пурпурной, в том числе в комплексе с пробиотиком способствовало повышению прироста их живой массы, сохранности, а также снижению затрат корма (Хмыров А. и др., 2012; Чернышова А.Д., 2017).

С.Ф. Суханова (2017) сообщает о положительном опыте применения растительного препарата Лив 52 Вет, содержащего в своем составе Каперс колючий, цикорий обыкновенный, паслен черный, терминалию анжура, кассию западную, тысячелистник обыкновенный, тамариск гальский, оксид железа. Активные ингредиенты обработаны над паром экстракта из смеси следующего растительного сырья: эклипты белой, филантус нирури, берхавии раскидистой, тиноспории сердцелистной, редьки посевной, эмблики лекарственной, свинчатки цейлонской, эмбелии смородиновой, терминалии хебула, дымянки лекарственной.

Включение в рацион перепелов породы Фараон растительной кормовой добавки Сангровит, состоящей из алкалоидов, полученных при помощи экстракции из маклеи сердцевидной; коричневого сока и зеленой пасты люцерны, оказало положительное влияние на сохранность перепелов, динамику их роста, конверсию корма (Петенко Н.И. и др., 2019).

Соцветия одуванчика лекарственного, добавленного в рацион японских перепелокнесушек, стимулируют основной и ионный обмен, способствуют увеличению массы яиц и каротиноидов в желтке, а также кумуляции в яйцах Cu, Mn, Ni, Pb, Cd, Co и Fe (Пономарев В.А. и др., 2019).

Экстракт солодки (*Glycyrrhiza glabra*) в питьевой воде цыплят-бройлеров снижал уровень жира в брюшной полости и в сыворотке крови, уровень

холестерина липопротеинов низкой плотности и общего холестерина без каких-либо неблагоприятных последствий для производительности бройлеров и их иммунного статуса (Khamisabadi H. et al., 2015).

Экстракт чабреца оказывает позитивное влияние на физиологические свойства организма птицы, такие как нормализация метаболизма, повышение использования питательных веществ корма, увеличение продуктивности и интенсивности роста (Кишняякина Е.А., Жучаев К.В., 2018). Отмечено благоприятное воздействие экстракта чабреца на показатели анатомической разделки тушек цыплят-бройлеров и отсутствие неблагоприятного влияния на развитие внутренних органов бройлеров (Кишняякина Е.А., 2019).

В ходе экспериментов было показано, что использование специй при кормлении цыплят-бройлеров может оказывать липотропное действие. Эффект достигается благодаря воздействию на липидный обмен (Cross D.A. et al., 2007).

Ряд авторов указывает на возможность применения коры дуба в качестве фитобиотика, в том числе в сочетании с ферментами (Казачкова Н.М. и др., 2017; Дускаев Г.К. и др., 2019).

По данным А.В. Носенко, Ю.А. Лысенко (2016) концентрат хлореллы проявляет высокое антимикробное действие с одновременным повышением живой массы и сохранности поголовья птиц, а также снижением затрат комбикормов на 1 кг прироста.

Использование фитогенных кормовых добавок способствует поддержанию нормальной функции пищеварения и микрофлоры кур (Mountzouris K.C. et al., 2011), улучшению удержания азота и усвояемости сырых волокон (Wati T. et al., 2015).

По данным N. Khodambashi Emami et al. (2012) мята перечная (*Mentha piperita*) была хорошей альтернативой антибиотiku виргиниамцину у цыплят-бройлеров.

Включение в корм цыплят-бройлеров финтоцидов, извлеченных из корейской сосны, позволило снизить объем выделяемого цыплятами-бройлерами газа (Li H.L. et al., 2015).

При этом использование фитогенных кормовых добавок не меняет качество мяса или туши. Так, использование чеснока и корицы в корме для бройлеров не влияло на запах мяса (Toghyani M. et al., 2011).

T. Wati et al. (2015) отмечают, что отдельные аспекты воздействия фитогенных кормовых добавок остаются не выясненными. Очевидно, что основной причиной использования различных растений в качестве добавок является наличие в них химических компонентов, обладающих антибактериальной, антиоксидантной активностью и консервирующим действием (Mabona U. et al., 2013). Например, эфирные масла стимулируют функции кишечника, секрецию желчи, выделение пищеварительных ферментов и слизи (Platel K., Srinivasan K., 2004).

Скармливать фитобиотики птице можно в виде растений в естественном или сухом состоянии (Буяров В.С. с соавт., 2020). Так, включение в рацион свежей крапивы и приготовленной из нее муки способствует экономии комбикорма почти на 30 %, а также обеспечивает возмещение потребности в белке на 19-21 %, в витаминах – на 55-75%, а в микроэлементах – на 100 %. При этом добавка существенно улучшает вкусовые качества мяса птицы и яиц, одновременно повышая их биологическую ценность (Егоров И.А., 2020).

Применение в рационе птицы пихтовой муки, богатой витаминами и минеральными веществами, положительно влияет на сохранность птицы, ростовые показатели, нормализует метаболизм (Терентьев В.И., Аникиенко Т.И., 2011).

**Эфирные масла.** Среди эфирных масел наиболее используемыми являются тимол, транс-циннамальдгид, карвакрол и эвгенол (Mehdi Y. et al., 2018). Способы их действия заключаются во вмешательстве в ферментативную систему бактерий, модуляцию иммунных реакций и в процесс воспаления.

Отдельными исследователями было показано улучшение выращивания кур при использовании эфирных масел (Самков М., 2004; Peng Q. Y. et al., 2016; Pirgozliev V. et al., 2015). Отмечен положительный результат при их использовании в качестве средства профилактики и лечения некротического энтерита у бройлеров (Jerzsele A. et al., 2012). Эфирные масла пробуждают у животных аппетит, благодаря своим ароматическим свойствам, и стимулируют выработку ферментов, улучшая пищеварение (Дмитриева М.Е. и др., 2014; Гунчак А.В. и др., 2016; Юняева Н.В. и др., 2016).

Н.В. Юняевой с соавт. (2016) подтверждены иммуностимулирующие, антибактериальные и антидепрессантные свойства натурального эфирного масла душицы, которое добавляли в рацион цыплятбройлеров в течение первых пяти дней жизни. Доказан положительный эффект от применения эфирных масел душицы, тимьяна, корицы и перца чили в качестве стимуляторов роста в птицеводстве (Леткин А.И. и др., 2015).

Производство кормовой добавки, на основе эфирных масел хвои, основано на извлечении биологически активных веществ из древесной зелени с помощью селективного экстрагента, представляющего композицию многоатомных спиртов. Включение данной добавки в рацион бройлеров способствует стимуляции их роста, повышая в конечном итоге биологическую ценность их тушек (Леткин А.И. и др., 2015).

По мнению В.С. Буярова с соавт. (2020) время сбора растений или регион их произрастания оказывает существенное влияние на количество биологически активных веществ в них. Например, более высокую антимикробную активность показывают эфирные масла, которые получили сразу после цветения растения летом (Radaelli et al., 2016; Castillo-Lopez R.I. et al., 2017; Латышева Д.А., Ульрих Е.В., 2018).

**Пробиотики.** Пробиотики определяются как «живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина» (WHO, 2001).

Существует ряд убедительных доказательств того, что добавки с пробиотическими кормами улучшают рост, эффективность усвоения корма и здоровье кишечника (Кошаев А.Г., 2006; Samli H.E. et al., 2007; Giannenas I. et al., 2012; Степанова А.М. и др., 2011; Волкова И., 2014; Ghasemi H.A. et al., 2014; Поломошнова И.А., 2015).

Улучшение достигается благодаря снижению рН кишечника, состава кишечных бактерий и пищеварительной активности. Механизмы действия пробиотиков включают в себя стимуляцию эндогенных ферментов, снижение метаболических реакций, вырабатывающих токсичные вещества, и выработку витаминов или антимикробных веществ (Hassanein S.M., Soliman N.K., 2010).

Пробиотические бактерии продуцируют молекулы с антимикробной активностью, например бактериоцины, которые ингибируют выработку токсинов и адгезию патогенов (Pan M., Chu L.M., 2014).

Пробиотики стимулируют иммунный ответ и повышают устойчивость к колонизации бактерий (Hassanein S.M., Soliman N.K., 2010).

Антибактериальное действие на бактериальную микрофлору кишечника было отмечено при введении в рацион кур *Enterococcus faecium* (Levkut M. et al., 2012), *Streptomyces* sp. (Latha S. et al., 2016) и *Bacillus subtilis* (Zhang A.W. et al., 2013; Сверчкова Н., Коломиец Э., 2014).

Противококцидиальную роль пробиотиков отметили I. Giannenas et al. (2012) указав, что их применение оказывало кокцидиостатическое действие против *Eimeria tenella*.

Пробиотики оказывают положительное влияние на качество мяса птицы, улучшая рН, цвет, профиль жирных кислот, химический состав, способность удерживать воду и устойчивость к окислению (Hassanein S.M., Soliman N.K., 2010; Попова Т., 2017).

**Пребиотики.** Пребиотики представляют собой неперевариваемые кормовые компоненты, которые потенциально полезны для здоровья организма хозяина из-за их ферментативных свойств, они стимулируют рост бактерий и/или активность в подвздошной и слепой кишках (Gibson G.R.,

Roberfroid M.B., 1995). Обычно пребиотики состоят из короткоцепочечных полисахаридов и олигосахаридов. Пребиотики не усваиваются хозяином, но кишечные бактерии могут метаболизировать их с образованием короткоцепочечных жирных кислот, таких как пропионат, ацетат и бутират (Józefiak D. et al., 2008).

По мнению исследователей A.W. Zhang et al. (2005), R. Morales-Lopez et al. (2009) пребиотические компоненты оказывают положительное влияние на продуктивность птицы, способствуют нормализации работы желудочно-кишечного тракта и могут стать хорошей альтернативой антибиотикам.

В поддержку данного мнения могут быть приведены результаты исследований S.H. Park et al. (2016), которые продемонстрировали, что при приеме внутрь пребиотики изменяют микробный состав слепой кишки цыплят. Это приводит к улучшению показателей роста цыплят.

Добавление продукта, богатого маннозой и маннопротеинами, в корм для кур значительно увеличило количество эпителиальных клеток ворсинок кишечника (Vaurhoo B. et al., 2007).

**Синбиотики.** Синбиотики представляют собой рациональные комбинации пробиотиков и пребиотиков. Это комбинированные препараты, содержащие живые микроорганизмы и вещества, обеспечивающие рост и функциональную активность нормальной микрофлоры кишечника (Айджигатканова С.К., 2007).

Применение синбиотиков в рационах цыплят-бройлеров оказало положительное влияние на продуктивные качества птиц, способствовало увеличению их средней живой массы и сокращению затрат корма на кг прироста, обеспечивало сохранность поголовья (Капитонова Е.А., 2010; Кузьменко П.М., 2014; Буяров В.С., Метасова С.Ю., Алдобаева Н.А., 2018).

Синбиотические комплексы доказали свою эффективность при профилактике колибактериоза (Неминующая Л.А. и др., 2012).

Отечественный синбиотик «ПроСтор» содержит живые спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis*, молочнокислые микроорганизмы, продукты их

метаболизма, автолизат дрожжей, минеральные соли, углеводы, фитодобавки (трава эхинацеи пурпурной и плоды расторопши пятнистой). Отмечено, положительное влияние синбиотика на интенсивность роста и жизнеспособность молодняка кур (Буяров В.С., Метасова С.Ю., 2019).

**Органические кислоты.** Органические кислоты являются консервантами, используемыми для защиты корма от размножения микроорганизмов и грибков (Kum S. et al., 2010). Антимикробное действие органических кислот связано с их свойством проникать через мембрану липофильных бактерий и нарушать ферментативные реакции и транспортную систему (Cherrington C.A. et al., 1991).

По данным исследователей (Nava G.M. et al., 2009; Hassan H.M.A. et al., 2010) добавление органических кислот в корм для бройлеров способствует их росту, скорости конверсии и усвоения корма.

Добавление органических кислот в питьевую воду цыплят позволило повысить защитную реакцию против кампилобактерий (Chaveerach P. et al., 2004), кишечной палочки (Izat A.L. et al., 1990).

Совместное применение муравьиной кислоты и эфирных масел снижает риск заражения птицы возбудителями *Salmonella* и *E. coli* (Сигалл Р., Плохова А., 2011).

N. Mohammadagheri et al. (2016) приводят сведения, что добавление лимонной кислоты (2 %) может улучшить клеточную пролиферацию эпителия и высоту ворсинок слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта.

Смесь органических кислот (муравьиной и пропионовой) в питьевой воде приводит к образованию более однородных и отчетливых популяций в кишечной микробиоте и увеличивает колонизацию *Lactobacillus spp.* в подвздошной кишке кур (Nava G.M. et al., 2009). По мнению авторов, указанные органические кислоты могут использоваться в качестве альтернативы антибиотикам (в частности, бацитрацину) для уменьшения количества патогенных бактерий в желудочно-кишечном тракте кур.

Органические кислоты, такие как масляная кислота, добавленные в качестве кормовой добавки, могут быть использованы для улучшения перевариваемости белков из плохо перевариваемых источников белка (Adil S. et al., 2010). Эти сведения подтверждают S. Qaisrani et al. (2015), сообщившие, что рацион, дополненный масляной кислотой, улучшил показатели роста цыплят, получавших белки с низким уровнем усвояемости.

По данным Z. Hu, Y. Guo (2007) добавление бутирата в корм улучшило конверсию корма у цыплят в течение периода 0-42 день.

**Аминокислоты и ферменты.** Ферменты для кормовых добавок производятся путем брожения грибов и бактерий и применяются для максимизации конверсии корма за счет деградации компонентов корма (белки, фитаты и глюканы), увеличения ширины ворсинок, уменьшения глубины крипт кишечника (Cowieson A.J. et al., 2006; Mohammadagheri N. et al., 2016).

Лизины - это эндолизины бактериофага, представляющие инновационный альтернативный терапевтический антибактериальный вариант (Mehdi Y. et al., 2018). Лизины представляют собой фаг-кодируемые пептидогликангидролазы, которые вызывают лизис бактериальных клеток при экзогенном применении (Fenton M. et al., 2010; Rios A.C. et al., 2016).

Введение комбинации группы лизинов, содержащих пептидазы, амидазы и лизоцимы, дает противомикробный эффект против *C. perfringens* у домашней птицы (Volozhantsev N.V., 2011).

Лизин Ply3626 является ферментом, который проявляет литическую активность в отношении нескольких штаммов *C. perfringens*, которые являются важной причиной пищевого отравления, и приводит к экономическим потерям при производстве птицы (Zimmer M. et al., 2002; Fenton M. et al., 2010).

**Другие альтернативы антибиотикам.** В литературе имеются сведения о выявлении соединений, способных заменить антибиотики и оказывающих положительное влияние на здоровье и рост цыплят.

Так, был установлен иммуномодулирующий эффект у бройлеров, которых кормили кормом, содержащим прополис (Daneshmand A. et al., 2015).

Включение молочного кефира (2 %) в питьевую воду для кур оказало существенное влияние на массу тела и индекс конверсии корма у кур (Toghyani M. et al., 2015).

Некоторые наночастицы, такие как серебро (Ag) и медь (Cu), а также некоторые окисленные металлы ( $Al_2O_3$ ,  $Fe_3O_4$ ,  $CeO_2$ ,  $ZrO_2$ ) также могут оказывать антимикробное действие и могут быть полезны при использовании в кормах (Егоров И.А. и др., 2013; Тарабанова Е.В., 2013; Gangadoo S. et al., 2016).

Ряд авторов предлагает кормовые добавки, содержащие сочетание нескольких компонентов. Так, Н. Мухина (2010) указывает на возможность применения в птицеводстве кормовой добавки, включающей в себя: монтмориллонит, инфузорную землю, прослойку дрожжей, экстракты морских водорослей и эфирные масла.

По данным В.И. Трухачева, Н.З. Злыднева, Н.В. Самокиш (2015) применение кислой и щелочной фракций электроактивированной воды при выращивании перепелов яичного направления продуктивности увеличивает их живую массу, улучшает однородность стада, изменяет рН организма и ускоряет развитие репродуктивной системы.

Т.К.А. Пинто, А. Банержи, П.А. Назаров (2018) представили данные о том, что митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 на основе трифенилфосфония эффективен в отношении грамположительных лабораторных штаммов, включая *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium sp.*, и грамотрицательных штаммов за исключением *E. coli*. Механизм бактерицидного действия трифенилфосфониевых соединений объясняется их способностью вызывать нарушения энергетического обмена у бактерий за счет резкого снижения мембранного потенциала путем стимуляции протонофорного разобщения.

По данным Е.Н. Андриановой с соавт. (2016) биологически активная добавка на основе продуктов пчеловодства «Винивет» оказывает ростостимулирующее действие, обладает антисептическими свойствами, положительно

влияет на состояние желудочно-кишечного тракта птицы, повышение всасывательной поверхности слизистой оболочки тонкого отдела кишечника.

### **1.3 Биологические маркеры для мониторинга здоровья органов желудочно-кишечного тракта домашней птицы**

#### **1.3.1 Общие понятия**

Здоровье кишечника имеет решающее значение для общего здоровья и благополучия животных и людей. У сельскохозяйственных животных потребление корма и эффективное усвоение питательных веществ во многом определяются состоянием здоровья желудочно-кишечного тракта. В частности, у домашней птицы после 50 лет интенсивного отбора для увеличения суточного прироста веса и снижения коэффициента конверсии корма были выведены новые породы, характеризующиеся чрезвычайно высоким потреблением корма (Ducatelle R. et al., 2018).

Чрезмерное количество корма, а также некоторые кормовые ингредиенты могут оказывать существенное влияние на пищеварительную систему (Collett S.R., 2012). Пройдя определенный порог, даже при отсутствии каких-либо специфических патогенов, эти факторы могут нарушить работу желудочно-кишечного тракта и привести к частичной потере его функции. По мнению R. Ducatelle et al. (2018) в этом задействованы три различных, но взаимосвязанных механизма, каждый из которых находится в центре текущих научных исследований: дисбактериоз, снижение барьерной функции слизистой оболочки и воспаление кишечника.

Дисбактериоз - нарушение состава микробиоты кишечника, сопровождающееся воспалением кишечника (Hughes E.R., 2017).

Проницаемость кишечного барьера определяется как способ, с помощью которого кишечный эпителий позволяет молекулам проходить посредством пассивной диффузии (Travis S., Menzies I., 1992). Пассивной диффузии потенциально вредных молекул из просвета кишечника в эпителиальные клетки

противодействует комплекс связанных с плазматической мембраной эффлюксных насосов, называемых АТФ-связывающими кассетными транспортерами или насосами с множественной лекарственной устойчивостью (Sorensen J.S., Dearing M.D., 2006). Эти насосы, по мнению Haritova A.M., Schrickx J., Fink-Gremmels J. (2010), экспрессируются в кишечном тракте всех видов животных, включая птицу. Дефект в насосах приводит к воспалению кишечника (Banner K.H., 2004). И наоборот, воспаление связано со снижением экспрессии насосов в эпителии кишечника человека (Blokzijl H. et al., 2007).

Проницаемость кишечного барьера также зависит от стабильности межклеточных соединений, которые контролируют путь межклеточного транспорта, проходящего между соседними клетками кишечного эпителия. Проницаемость кишечного барьера может быть изменена широким спектром соединений, получаемых из рациона (De Santis S., 2015), и многими токсинами, выделенными из кишечных патогенов (Awad W.A., Hess C., Hess M., 2017). Изменения в молекулярной структуре соединительных комплексов или снижение экспрессии соединительных структурных белков ведут к снижению поглощения питательных веществ, усилению секреторного прохождения ионов и воды, что, в свою очередь, приводит к диарее и увеличению оттока макромолекул из просвета, который может вызвать воспаление (Barmeyer C., Schulzke J.D., Fromm M., 2015). R. López-Posadas et al. (2017), V. Garcia-Hernandez, M. Quiros, A. Nusrat (2017) отмечали прямую связь между воспалением кишечника и потерей целостности межклеточных соединений эпителиальных клеток. В соответствии с этими наблюдениями присутствие провоспалительных цитокинов как таковых может увеличить проницаемость эпителия *in vitro* (López-Posadas R. et al., 2017).

Как считают N.A. Nagalingam, S.V. Lynch (2012), по-видимому, существует тесная связь между дисбактериозом, нарушением кишечного барьера и воспалением. Дисбактериоз и связанные с ним проблемы со здоровьем желудочно-кишечного тракта усиливаются как у животных, так и у человека, и

считается, что это стало основной пандемией неинфекционных воспалительных заболеваний человека в 21 веке (Logan A.C., Jaska F.N., Prescott S.L., 2016).

До введения запрета на использование антибиотиков-стимуляторов роста (АСР) считалось, что проблемы со здоровьем кишечника в значительной степени находятся под контролем благодаря широкому применению АСР. Хотя механизм действия этих субтерапевтических уровней антибиотиков не полностью объяснен (Niewold T.A., 2007). Один из основных механизмов для некоторых АСР, по-видимому, заключается в подавлении микробной деконъюгации желчных кислот (Knarreborg A. et al., 2002), что приводит к усилению абсорбции липидов в подвздошной кишке и доступности  $\alpha$ -токоферола (Knarreborg A. et al., 2004).

Сообщалось, что запрет на АСР в кормах для домашней птицы может привести к увеличению терапевтического использования антибиотиков обычно через питьевую воду (Hughes L., Hermans P., Morgan K., 2008). Однако введение антибиотиков в терапевтической дозировке может спровоцировать дисбактериоз.

Все это способствовало активному поиску биологических маркеров, позволяющих обеспечить раннее выявление проблем со здоровьем кишечника, связанных с дисбактериозом.

Понятие «биологический маркер» («биомаркер») было предложено в 2001 году Национальным институтом здоровья США. Оно формулировалось как характеристика, которую можно объективно измерить, и которая может служить в качестве индикатора физиологических и патологических биологических процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

Существует необходимость в надежных, специфических и чувствительных биомаркерах для отслеживания состояния здоровья желудочно-кишечного тракта у домашней птицы (Ducatelle R. et al., 2018). Они не только облегчили бы исследования патогенеза, но и помогли бы контролировать ситуацию

на местах и, таким образом, выстроить стратегии профилактики и снизить потребность в терапевтических антибиотиках.

### **1.3.2 Биомаркеры в стенке кишечника**

**Измерение высоты ворсинок, глубины крипт и соотношения этих показателей.** Повышенная потеря ворсинчатых эпителиальных клеток, приводящая к уменьшению длины ворсинки, часто встречается при серьезных проблемах кишечника (Zhang K., Hornef M.W., Dupont A., 2015). Ряд исследователей указывает на данный признак при заражении птиц клостридиями (Cooper K.K., Songer J.G., Uzal F.A., 2013), *Salmonella enterica* (Fasina Y.O. et al., 2010), *Eimeria tenella* (Silva M.A. et al., 2009).

Потеря эпителиальных клеток частично компенсируется увеличением пролиферации, приводящей к увеличению глубины крипты. Поэтому простые измерения высоты ворсинок, глубины крипт и соотношения ворсинок и крипт стали золотым стандартом в оценке состояния здоровья кишечника животных (Ducatelle R. et al., 2018). Данный показатель, измеренный на уровне двенадцатиперстной, тощей или подвздошной кишок, широко используются для оценки состояния кишечника у домашней птицы в исследованиях, посвященных изучению влияния ингредиентов корма и кормовых добавок (Teirlinck E. et al., 2009).

**Оксигенация эпителия кишечника.** Работы J. Jennewein et al. (2015) указывают на то, что воспаление может привести к гипоксии слизистой оболочки после заражения мышей сальмонеллой. Исследования *in vitro* с использованием линий кишечных эпителиальных клеток свидетельствуют о том, что митохондриальное дыхание играет существенную роль в поддержании стабильности плотного соединения клеток (Janssen Duijghuijsen L.M. et al., 2017). Связанный с воспалением окислительный стресс может изменить фенотип кишечных эпителиальных клеток, приводя к изменениям в экспрессии генов, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров, как это было показано на бройлерах (Chen J. et al., 2015).

**Плотность энтероэндокринных клеток.** Исследованиями показано, что на плотность энтероэндокринных клеток может влиять рацион питания в случае воспаления кишечника у человека (El-Salhy M. et al., 2016). Аналогичным образом, у кур в исследовании с использованием ферментативно обработанного экстракта пшеницы в качестве пребиотика повышенная плотность энтероэндокринных L-клеток в слизистой оболочке подвздошной кишки наблюдалась параллельно с другими показателями здоровья кишечника (Yacoubi N., 2018).

**Количество Т-лимфоцитов.** Здоровая слизистая оболочка будет содержать большое количество Treg - клеток, тогда как при воспалительных заболеваниях кишечника у людей выявляется их дефицит (Sarrabayrouse G. et al., 2014). Определение количества Treg в биопсиях слизистой оболочки кишечника может представлять собой ценный критерий здоровья кишечника. Однако, было показано, что приток нейтрофильных гранулоцитов в собственную пластинку слизистой оболочки увеличивается на моделях мышей, но не на моделях цыплят с дефектами кишечной проницаемости (Fischer J.C. et al., 2017).

**Секреторный иммуноглобулин IgA.** Слизистая оболочка кишечника выделяет антимикробные белки и иммуноглобулин IgA. IgA является изотипом антител, специализирующимся на защите слизистой оболочки кишечника, а также на ингибировании воспалительных процессов, нейтрализации бактериальных токсинов и усилении неспецифических защитных механизмов (например, лактопероксидазы и лактоферрина) (Yu B., Chiou P.W.S., 1996; Iizuka M., Konno S., 2011). Секреторный IgA обеспечивает первую линию защиты, предотвращая проникновение патогена в слизистую оболочку (Zulkifli I., 2009; Siddiqui I., Karaffová V. et al., 2015; Majid H., Abid S., 2017).

M. Baxter et al. (2019) экспериментальным путем на цыплятах установили, что уровень клоакального IgA может быть использован в качестве биомаркера.

У цыплят инфекция *Salmonella enterica* и лечение пробиотиком *Enterococci faecium* приводили к увеличению SIgA по сравнению с контролем (Crenn P., Messing B., Cynober L., 2008).

У человека этим биомаркером пользуются для оценки кишечных инфекций, целиакии и пищевой аллергии (Chalkias A., 2011; Faria A.M., 2013).

**Уровень белка в энтероцитах.** Портально-дренированные внутренние органы, состоящие в основном из органов желудочно-кишечного тракта, составляют всего 3-6 % от массы тела животного, но на них приходится от 20 до 35 % оборота белков и затрат энергии (Burrin D. G. et al., 1989; Yen J.T. et al., 1989; Nieto R., Lobley G.E., 1999; Stoll B. et al., 1999.).

Кишечная ткань имеет высокую скорость белкового обмена, что напрямую связано с высокими показателями роста, секреции белка, гибели клеток и десквамации эпителиальных клеток слизистой оболочки (Burrin D.G., 2002).

Исследования на сельскохозяйственных животных демонстрируют, что фракционная скорость синтеза белка в тканях кишечника в несколько раз выше, чем в периферических тканях, таких как мышцы (Lobley G.E. et al., 1980, 1992; Attaix D. et al., 1986; Burrin D. G. et al., 1992; Davis T.A. et al., 1996). При этом скорость синтеза белка выше в тонкой кишке, чем в желудке и толстой кишке (Attaix D., Arnal M., 1987; Attaix D. et al., 1992; Burrin D.G. et al., 1999). В тонкой кишке скорость синтеза белка самая высокая в двенадцатиперстной кишке (Attaix D. et al., 1992; Stoll B. et al., 2000a).

Исследования *in vitro* показывают, что эпителиальные (Higashiguchi T. et al., 1993; Wu G., 1998) и лимфоидные (Szondy Z., Newsholme E.A., 1990; Dugan M.E.R. et al., 1994) клетки демонстрируют высокие темпы синтеза белка и метаболизма глутамина. Белковая секреторная способность бокаловидных клеток также существенна и заключается в выработке муцина (Lien K.A. et al., 1997; Montagne L. et al., 2000).

Воздействие патогенных и непатогенных организмов влияет на белковый метаболизм, связанный с воспалительной реакцией (Von Allmen D. et al., 1992; MacRae J.C., 1993; Higashiguchi T. et al., 1994; Johnson R.W., 1997; Breuille D. et al., 1998, 1999; Wang Q. et al., 1998; 1999; Mack D.R. et al., 1999).

Таким образом, показатели белкового метаболизма, фиксируемые в энтероцитах, могут служить в качестве биомаркеров состояния здоровья кишечника.

### **1.3.3 Биомаркеры в крови и печени**

По данным Y. Pan et al. (2012) увеличение количества бактерий, проходящих через поврежденные плотные соединения кишечного эпителия, может привести к воспалению печени. В ответ изменяется секреция белков гепатоцитами. Изменения белков могут быть измерены в сыворотке крови. У человека клиническая форма хронического непатогенного кишечного воспаления характеризуется значительным увеличением белков острой фазы (особенно С-реактивный белок и липополисахарид-связывающий белок) в сыворотке крови (Desai D., Faubion W.A., Sandborn W.J., 2007; Umoh F.I. et al., 2016).

В ходе экспериментов на цыплятах S. Gilani et al. (2016), S. Gilani et al. (2017) по увеличению проницаемости кишечного барьера слизистой оболочки, не было обнаружено изменения сывороточных белках острой фазы (Gilani S. et al., 2016; Gilani S. et al., 2017). В тоже время необходимо учитывать, что острая фазовая реакция в печени также может наблюдаться в ответ на любой воспалительный процесс, в том числе происходящий в других частях тела, за пределами кишечного тракта, поэтому можно усомниться в специфичности сывороточных белков острой фазы как маркеров патологии кишечника (Sonawane M., Nimse S.B., 2017).

Увеличенная кишечная проницаемость связана с большим количеством бактерий в кишечнике, а, возможно, и печени. Поэтому количество бактерий в печени было использовано в качестве биомаркера для повышения проницаемости кишечника у бройлеров (Tellez G. et al., 2014) и индеек (Tellez G. et al., 2015).

Проницаемость эпителиальных соединительных комплексов позволяет проходить липополисахаридам, продуцируемым грамотрицательными бактериями (Chen J. et al., 2015). Это несвойственно для кишечника в норме.

Липополисахариды не способны проникать данным путем, так как они интернализируются в эпителиальных клетках и детоксифицируются щелочной фосфатазой эпителиальных клеток (Guerville M., Boudry G., 2016). Таким образом, обнаружение и количественное определение липополисахаридов в сыворотке может быть индикатором повышенной проницаемости. Однако, в настоящее время большинство методов их измерения не очень надежны (Ducatelle R. et al., 2018).

D-лактат является одним из многочисленных метаболитов, продуцируемых кишечными бактериями. У животных и людей с повышенной проницаемостью кишечного барьера в сыворотке крови может быть измерено повышение концентрации D-лактата (Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Zello G.A., 2005). Он использовался у цыплят в качестве сывороточного биомаркера кишечной проницаемости (Lei K. et al., 2013).

Повреждение эпителиальных клеток может привести к высвобождению некоторых специфических для эпителиальных клеток кишечника белков в кровотоки. Например, фермента диаминооксидаза у кур (Lei K. et al., 2013) и белка, связывающего кишечные жирные кислоты, у бройлеров (Chen J. et al., 2015). Хотя последнее не было подтверждено в других экспериментальных исследованиях бройлеров (Gilani S. et al., 2016; Gilani S. et al., 2017).

Цитруллин вырабатывается исключительно энтероцитами тонкой кишки. По этой причине концентрация цитруллина в плазме или сыворотке крови была предложена в качестве биомаркера остаточной массы и функции энтероцитов (Lin H., Decuypere E., Buyse J., 2004). У человека снижение уровня цитруллина в плазме крови коррелирует со снижением массы энтероцитов (Altan Ö. et al., 2003; Crenn P, Messing B, Synober L., 2008). Выработка цитруллина происходит главным образом в проксимальном отделе тонкой кишки и, вероятно, в средней и верхней частях кишечных ворсинок. Первичным предшественником цитруллина являются циркулирующие или экзогенные глютамин и производные аминокислоты (Crenn P. et al., 2008). Глутамин, аргинин и,

возможно, другие аминокислоты, такие как пролин или орнитин, также способствуют выработке в кишечнике цитруллина (Korpe P.S., Petri W.A., 2012).

Птицы и млекопитающие не способны синтезировать каротиноиды, они поступают в организм с пищей (Celi P. et al., 2019). Определенный процент каротиноидов может превращаться в витамин А в кишечнике, однако, если нарушена функциональность желудочно-кишечного тракта, это может затруднить преобразование каротиноидов в витамин А и привести к кишечным заболеваниям (Weiss W.P., 1998). Каротиноиды играют важную роль в поддержании эффективной кишечной барьерной функции и, следовательно, в уменьшении транслокации бактерий и токсинов (Vieira M.M. et al., 2008).

Действительно, общий уровень каротиноидов в крови считается отличным показателем физической целостности кишечника (Conway D.P. et al., 1993), а их уровни снижаются у птиц, инфицированных кокцидиями (Ruff M.D. et al., 1974). Учитывая, что как общее количество каротиноидов, так и витамин А можно легко измерить с помощью быстрого теста (Raila J. et al., 2012; Raila J. et al., 2017), оценка этих двух питательных веществ позволяет осуществлять оценку функциональности желудочно-кишечного тракта, что, в свою очередь, дает возможность оптимизировать состав пищевых добавок.

По мнению J. McGrath et al. (2018) поддержание окислительно-восстановительного баланса представляет собой краеугольный камень эффективного иммунитета и здоровья, а биомаркеры окислительного стресса связаны с функциональностью желудочно-кишечного тракта (Celi P., Gabai G., 2015). Например, у молочного скота окислительно-восстановительный баланс может быть нарушен, если его кормить концентратами в течение длительного периода времени (Wullerit N. et al., 2009), когда в рационе присутствует высокий уровень крахмала (Gabai G. et al., 2004) или когда кормят кукурузным силосом (Celi P., Raadsma H.W., 2010).

Оценка окислительно-восстановительного баланса была успешно выполнена для большинства сельскохозяйственных животных, включая домашнюю птицу, используя показатели крови лошадей (Crowley J. et al., 2013; Po E. et al.,

2013), свиньи (Liu F. et al., 2018), телят (Ranade R. et al., 2014) и коров (Golder H.M. et al., 2013). Таким образом, показатели окислительно-восстановительного баланса могут оказаться полезной для мониторинга функциональности желудочно-кишечного тракта.

### **1.3.4 Фекальные биомаркеры**

Появление технологии секвенирования нового поколения позволило изучить состав кишечной микробиоты у разных видов животных, в том числе у домашней птицы. Наиболее широко используемым филогенетическим маркером является ген рибосомальной РНК бактериальной малой субъединицы 16S, который имеет как консервативные, так и переменные области и который повсеместно присутствует у прокариот (Ducatelle R. et al., 2018).

Эти технологии позволяют собирать большие наборы данных, однако их интерпретация вызывает сложности. Действительно, даже если предпринимаются значительные усилия для стандартизации аналитических процедур (Ritari J. et al., 2015), стандартизация все еще остается проблемой, и технические ошибки все еще имеют место. Кроме того, глубина анализа последовательности ампликонов может быть улучшена, и таксономическое распределение видов оперативных таксономических единиц является далеко не точным (Ducatelle R. et al., 2018). Тем не менее, паттерны микробиоты, достоверно связанные с плохим кишечным здоровьем, в настоящее время выявляются у человека и животных, включая кур.

У цыплят микробиота количественно и функционально наиболее развита в слепой кишке. Фекальные микробиоты часто используются в качестве маркера для определения кишечной микробиоты. Так на цыплятах было показано, что микробиота кала и слепой кишки качественно схожи, но при этом отмечаются количественные различия в разных бактериальных группах (Stanley D. et al., 2015). Поэтому анализ микробиоты кала следует интерпретировать с осторожностью не только у цыплят, но и у других животных, и у людей. Тем не менее, много усилий было сделано для выявления у человека паттернов

фекальной микробиоты, связанных с воспалительным заболеванием кишечника (Berry D., Reinisch W., 2013). Одной из характерных особенностей микробиоты кишечника, которая, по-видимому, постоянно связана со многими формами плохого состояния кишечника как у животных, так и у людей, является потеря видового состава (Manichanh C. et al., 2006).

Однако, этот параметр сложно измерить, так как существуют различные данные в отношении нормального видового состава микробиоты кишечника. Например, состав микробиоты здорового человека варьируется от 100 до 1000 видов (Avershina E., Rudi K., 2015).

Одним из специфических признаков является потеря бактериальных групп, принадлежащих к типу Firmicutes, как было показано при болезни Крона человека (Kaakoush N.O. et al., 2012). Однако, по мнению R. Ducatelle et al. (2018) Firmicutes они представляют собой гетерогенный тип бактерий, содержащих бактериальные группы с различной метаболической активностью, что делает изменение на уровне типов менее надежным индикатором.

Специфические маркеры были обнаружены у людей с язвенным колитом в виде уменьшения количества производящих бутират видов *Roseburia hominis* и *Fecalibacterium prauznitzii* (Machiels K. et al., 2014). Ассоциированный со слизистой оболочкой род *Butyrivibrio* не только уменьшается у людей с язвенным колитом (Devriese S. et al., 2017), но и предлагается в качестве биомаркера для здоровой микробиоты, ассоциированной со слизистой оболочкой у человека (Xu K., Jiang B., 2017). Было показано, что этот же *Butyrivibrio* поддерживает здоровье кишечника после введения в качестве пробиотика у бройлеров (Eeckhaut V. et al., 2016).

Воспаление кишечника способствует размножению факультативных анаэробных бактерий (Faber F., Väumler A.J., 2014). В связи с этим расширение типа протеобактерий было предложено в качестве диагностического признака дисбактериоза у человека (Shin N.R., Whon T.W., Bae J.W., 2015).

На модели с мышами рост числа бактерий семейства Enterobacteriaceae был обозначен как признак дисбактериоза, связанного с воспалением

(Hughes E.R. et al., 2017). У цыплят сообщалось об отрицательной корреляции между параметрами производительности (как показано для здоровья кишечника) и увеличением Enterobacteriaceae (Eeckhaut V. et al., 2016). Следовательно, количественная оценка энтеробактерий может быть использована для измерения дисбактериоза у домашней птицы.

Вместе с увеличением числа энтеробактерий также отмечается увеличение числа сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio* как признак воспалительного заболевания кишечника у людей (Berry D., Reinisch W., 2013). Бактерии Enterobacteriaceae и *Desulfovibrio* являются потенциальными сульфатредукторами. Их расширение может привести к чрезмерному производству токсичных концентраций сероводорода.

В здоровой кишке специфичные к флагеллину IgA вместе с врожденными иммунными механизмами, вероятно, подавляют экспрессию белка флагеллина в экспериментальных исследованиях на лабораторных животных (Cullender T.C. et al., 2013). Как следствие, уровни белка флагеллина в здоровой кишке у человека низкие (VerBerkmoes N.C. et al., 2009), тогда как разрушение слизистого барьера и воспаление в кишечнике человека были связаны с высокими уровнями флагеллина в просвете кишечника (McCole D.F., Barrett K.E., 2003).

По мнению R. Ducatelle et al. (2018) флагеллин мог бы представлять ценный потенциальный биомаркер дисбактериоза у кур.

Микробиота превращает сложные (некрахмальные) углеводы и волокна, а также белки в ряд конечных метаболитов, которые могут оказывать различное влияние на здоровье организма хозяина (Keku T.O. et al., 2015). Рацион влияет не только на состав микробиоты, но также и на метаболизм микробиоты (Goldsmith J.R., Sartor R.B., 2014).

Конечные метаболиты, образующиеся из некрахмальных полисахаридов, представляют собой преимущественно пропионат и бутират короткоцепочечных жирных кислот. Многочисленные полезные эффекты бутирата были тщательно исследованы (Guilloteau P. et al., 2010).

Таким образом, концентрации бутирата и пропионата в кале или в кишечнике могут быть ценными косвенными показателями здоровья кишечника (Louis P., Flint H.J., 2007).

В экспериментальном исследовании С. De Maesschalck et al. (2015) на бройлерах было показано, что этот биомаркер связан с улучшением здоровья кишечника.

Рационы с высоким содержанием белка и низким содержанием углеводов изменяют микробиоту толстой кишки человека, способствуя развитию потенциально патогенной и провоспалительной микробиоты (Yao S.K., Muir J.G., Gibson P.R., 2016). Конечные метаболиты, образующиеся из белков и пептидов, включают в себя ряд аминов, тиолов, индолов, фенолов и жирных кислот с разветвленной цепью, а также ряд летучих соединений, таких как сероводород и аммиак (Keku T.O. et al., 2015).

Большинство этих метаболитов, по мнению S.N. Qaisrani et al. (2015), оказывают благотворное влияние на кишечный барьер, когда вырабатываются в небольших количествах, но приводят к отрицательному эффекту при больших количествах. Например, было показано, что низкая концентрация сероводорода защищает от колита на экспериментальной модели на мышах (Motta J.P. et al., 2015). И наоборот, снижение производства сероводорода в толстой кишке за счет ограничения потребления пищи, богатой серными аминокислотами, оказывается полезным у пациентов с язвенным колитом (Roediger W.E., Moore J., Babidge W., 1997).

В модели на мышах было показано, что кислородные радикалы, образующиеся во время воспаления, реагируют с соединениями серы, присутствующими в просвете кишечника, и образуют тетратионат, что, в свою очередь, способствует распространению сальмонелл (Winter S.E. et al., 2010) и кампилобактерий (Liu Y.W. et al., 2013). По данным R. Ducatelle et al. (2018) указанный показатель может быть использован в качестве биомаркера, но не был оценен у домашней птицы.

У человека изменения в объеме или составе летучих соединений, полученных из фекальных или других белков (сероводород, аммиак) (водород, углекислый газ, метан), были предложены в качестве полезных биомаркеров здоровья кишечника (Carbonero F., Benefiel A.C., Gaskins H.R., 2012; Chan D.K., Leggett C.L., Wang K.K., 2016). Изменения объемов этих соединений указывают на сдвиг в составе микробиоты. Исследование биогазов является перспективным в качестве новых маркеров здоровья кишечника птицы. Для этого могут быть использованы простые устройства - анализаторы биогаза в пробах воздуха или колориметрические анализы (Ducatelle R. et al., 2018).

Все высшие организмы развили сложные взаимодействия с их кишечным микробиомом и разработали механизмы для поддержания гомеостаза в кишечнике, в основном за счет секретирующихся факторов, которые регулируют микробиоту, а также с помощью адаптации состава внешнего слоя слизи (Van den Abbeele P. et al., 2011). Когда условия в просвете кишечника изменяются из-за дисбактериоза или кишечного воспаления, целый ряд белков-хозяина будут секретироваться и высвобождаться в просвет кишечника. Эти белки стабильны, они противостоят ферментативной деградации и могут быть полезными биомаркерами воспаления кишечника. Ряд этих белков был использован в качестве биомаркеров для раннего выявления обострений и для последующего ответа на терапию у людей с воспалительным заболеванием кишечника. Кальпротектин, другие защитные молекулы, такие как лактоферрин, кателицидины и дефензины, могут выделяться в повышенных количествах в случае повреждения эпителиального барьера кишечника (Pang T. et al., 2014). Многие другие факторы хозяина были предложены для использования у пациентов, как описано J.D. Lewis (2011). Но ни один из них не используется для домашней птицы (Ducatelle R. et al., 2018).

В условиях повреждения эпителия кишечника будет снижаться концентрация пептидазы и ряда других ферментов, секретируемых преимущественно высокодифференцированными эпителиальными клетками. Таким образом,

они также могут быть ценными биомаркерами здоровья кишечника (Ducatelle R. et al., 2018).

Когда клетки кишечного эпителия повреждаются и лизируются, внутриклеточные соединения могут высвободиться и попадать в кал. Одним из таких параметров может быть  $Zn^{2+}$ , высвобождаемый из внутриклеточного запаса цинка (Sunuwar L., Gilad D., Hershinkel M., 2017).

Измерения фекального жира могут выявить нарушение пищеварения или нарушение всасывания жира (Siddiqui I. et al., 2017), поскольку в связи с тем, что в физиологических условиях большая часть жира в рационе переваривается и всасывается в тонкой кишке, и лишь небольшое количество достигает дистальных сегментов желудочно-кишечного тракта и фекального потока. Общий фекальный жир включает длинноцепочечные жирные кислоты, холестерин, триглицериды и фосфолипиды (Lee M.J. et al., 1994).

Увеличение жира в кале может наблюдаться в случаях неправильного пищеварения и/или мальабсорбции, таких как экзокринная недостаточность поджелудочной железы и желчных солей, что приводит к снижению пищеварения растворимости жиров, повреждению печени и сокращению секреции соляной кислоты (Siddiqui I. et al., 2017).

Дисбактериоз кишечника и, как следствие, кислотный pH тонкого кишечника, могут нарушать действие пищеварительных ферментов в тонком кишечнике, что в конечном итоге приводит к увеличению количества фекального жира (Macfarlane G.T., Macfarlane S., 2012). Увеличение фекального жира может быть также связано с дефицитом жирорастворимых питательных веществ, что указывает на необходимость учитывать незаменимые жирные кислоты, жирорастворимые витамины и минералы (Basu T.K., Donaldson D., 2003; Kiela P.R., Ghishan F.K., 2016).

Оценка фекального жира проводилась у свиней и домашней птицы (Wiseman J., Powles J., Salvador F., 1998; Kerr B.J., Kellner T.A., Shurson G.C., 2015).

Поглощение жирорастворимых витаминов уменьшается во время стрессов, например, таких как прекращение питания поросят свиноматкой. Так, пониженные концентрации витамина Е наблюдались у поросят с плохими показателями суточного прироста живой массы. При этом исследователи также отмечали увеличение концентрации гидропероксидов и нарушение окислительно-восстановительного баланса (Buchet A. et al., 2017).

## **1.4 Люминесцентный спектральный анализ**

### **1.4.1 Применение люминесцентного спектрального анализа для мониторинга функционального состояния клеток**

Все клетки имеют общую физико-химическую основу, несмотря на различную морфологическую структуру и функции (синтез нуклеиновых кислот и белков, энергии и т.д.) (Karnaukhova N., Sergievich L., Karnaukhov V., 2010). Поскольку первичные процессы, вызывающие патологические изменения органов и тканей, развиваются в клетке, то именно на клеточном уровне можно обнаружить неблагоприятные для организма изменения на самой ранней стадии, когда существует возможность определения причины этих процессов и их ликвидации до того, как они вызовут необратимые изменения организма (Карнаухов В.Н., 1988).

В настоящее время для изучения внутриклеточной регуляции обмена веществ были разработаны методы флуоресцентной диагностики и двухволновые микрофлуориметры, представляющие собой комбинацию флуоресцентного микроскопа со спектроанализирующим устройством, снабженным электронными блоками регистрации и управления (Карнаухов В.Н. и др., 1983; Карнаухов В.Н. и др., 1987). Указанные методы позволяют изучать физико-химические процессы, протекающие непосредственно в живой клетке и ее органоидах (Карнаухов В.Н., 1978).

Для изучения клеток растений, животных и микроорганизмов используют как собственную люминесценцию некоторых внутриклеточных соединений,

так и вторичное свечение, индуцируемое взаимодействием флуорохромов с компонентами клетки (Karnaukhova N., Sergievich L., Karnaukhov V., 2010).

Особый интерес представляют методы микроспектрального люминесцентного анализа, которые позволяют объективно оценить функциональное состояние клеток.

#### **1.4.2 Методы люминесцентного спектрального анализа для оценки функционального состояния клеток**

Для исследования функциональной активности клеток с помощью люминесцентного спектрального анализа в исследовательской работе используется несколько методов.

**Метод определения соотношения «РНК/ДНК» в клетках.** Метод предложен коллективом авторов N. Karnaukhova, L. Sergievich, V. Karnaukhov (2010) для исследования синтетической активности клеток. Оценка данного показателя осуществляется с помощью параметра  $\alpha$ , для получения которого использовался флуорохром акридиновый оранжевый, широко применяющийся для исследования нуклеиновых кислот в живых и фиксированных клетках.

Спектры люминесценции состояли из двух полос излучения: ДНК флуоресцировали зеленым цветом (530 Нм), РНК – красным цветом (640 Нм).

Параметр  $\alpha$  определяли по формуле (1):

$$\alpha = \frac{I_{640}}{I_{530}} = A_1 \frac{\text{РНК}}{\text{ДНК}} \quad (1)$$

где  $A_1$  – коэффициент соотношения концентрации РНК и ДНК, позволяющий количественно анализировать процессы в клетках.

В случае зрелых дифференцированных клеток изменение параметра  $\alpha$ , показывающего содержание РНК на единицу ДНК, отражает изменение функциональной и синтетической активности данной клетки, сопровождающееся изменением содержания в ней РНК (Kaspersson T., 1950; Браше Ж., 1960; Бродский В.Я., 1966).

По мнению В.Н. Карнаухова (2002) двухспиральные молекулы нуклеиновых кислот (ДНК) неактивны в синтетическом отношении. Процесс реализации информации в виде синтеза тех или иных внутриклеточных соединений всегда сопряжен с появлением активных в синтетическом отношении односпиральных нуклеиновых кислот, которые могут быть представлены как «расплетенными» односпиральными участками молекул ДНК, так и молекулами РНК. Таким образом, в полностью неактивной в синтетическом отношении клетке нуклеиновые кислоты представлены, в основном, двухспиральными нуклеиновыми кислотами и характеризуются низким значением параметра  $\alpha$ .

Методика была апробирована на лимфоцитах крови кролика на разных стадиях иммунного ответа на экзогенный белок овальбумин. Спектры флуоресценции были получены с помощью спектрофотометра МСФ-1 (Karnaukhova N.A., 1984).

В ходе экспериментов установлено, что при определенных условиях окрашивания клеток акридиновым оранжевым параметр  $\alpha$  отражает количество РНК на единицу ДНК и, следовательно, характеризует синтетическую активность клеток (Karnaukhova N.A., 1984; Карнаухов В.Н., 1978; Karnaukhov V.N., 2001).

Исследования, проведенные на лимфоцитах крови, показали, что параметр  $\alpha$  чувствителен к действию стимулирующих и повреждающих воздействий факторов внешней среды, в том числе электромагнитных полей и солнечной активности (Karnaukhova N.A. et al., 2000; Karnaukhova N.A. et al., 2004).

В.Н. Карнаухов, П.М. Шварцбурд (1979) изучали динамику синтетической активности субпопуляции лимфоцитов на разных стадиях развития опухоли. Авторы приводят данные, что параметр  $\alpha$  позволяет обнаруживать изменения уже на 5-6 день развития опухоли не только по увеличению среднего значения параметра, но и по появлению клеток с повышенным значением параметра  $\alpha$ . Это позволило зафиксировать изменения за 4-5 дней до изменения лейкоцитарной формулы. Так же было отмечено, что в терминальной стадии

развития опухоли наблюдалось уменьшение значения параметра  $\alpha$ , а, следовательно, и синтетической активности лимфоцитов.

Определение параметра  $\alpha$  в ядерных клетках крови позволяет улавливать изменения при некоторых формах аллергии на ранних стадиях развития заболевания (Гордон Р.Я., Карнаухов В.Н., 1981).

Н.А. Карнаухова, О.И. Бриндак и Б.В. Алешин (1986) выявили корреляцию между параметром  $\alpha$  инкреторных клеток семенников и уровнем тестостерона, синтезируемого этими клетками.

J.R. Plemel et al. (2017), используя акридиновый оранжевый в серии экспериментов, пришли к выводу, что к ранним признакам некроза/некроптоза клеток относится потеря клеточной РНК. Некротические/некроптотические клетки характеризуются авторами исследования как клетки, полностью лишенные клеточной РНК, но имеющие круглое, яркое ядро. Эти данные согласуются с результатами исследований других ученых (Cidlowski J.A, 1982; King K.L. et al., 2000; Del Prete M.J. et al., 2002).

Существует объяснение возможных причин сокращения РНК в клетках, подвергшихся патологическому воздействию. РНКазы повсеместно распространены во всех клетках, в том числе в клетках центральной нервной системы (Zhang Y. et al., 2014), а распад РНК - это непрерывный процесс клеточной функции (Schoenberg D.R., Maquat L.E., 2012). Поскольку для производства РНК требуется энергия (Wagner A., 2005) и в клетке происходит постоянный распад РНК, общий уровень РНК может таким образом быть показателем клеточного метаболизма. J.R. Plemeletal (2017) обнаружил, что клетки, обработанные вызывающем некроз клеток  $H_2O_2$ , теряли клеточную энергию до деградации РНК. Таким образом, некротическая гибель клеток может привести к потере РНК, вызванной общей недостаточностью клеточного метаболизма. Эта потеря РНК в сочетании с плохой фрагментацией ДНК - характерным маркером некроза (Krysko D.V. et al., 2008) - является одним из возможных объяснений того, почему некротические/некроптотические клетки теряют клеточную РНК, но поддерживают нефрагментированное ядро.

Метод исследования синтетической активности клеток по соотношению «ДНК/РНК» имеет высокий потенциал для использования в медицине и биологии (Karnaukhova N.A., 1991; Gordon, R.Y. et al., 1997; Karnaukhova N.A. et al., 1999; Karnaukhova N.A. et al., 2003).

**Метод определения соотношения «РНК/ДНК» в тканях.** Для определения соотношения «РНК/ДНК» в тканях В.Н. Карнауховым (2002) предлагается формула (2):

$$\alpha = \frac{I_{640}}{I_{530}} = \varphi \frac{\varepsilon_2 k_2}{\varepsilon_1 k_1} \frac{c_{\text{РНК}}}{c_{\text{ДНК}}} = \varphi A_2 \frac{\varepsilon_2 k_2}{\varepsilon_1 k_1} \frac{c_{\text{РНК}}}{c_{\text{ДНК}}} = B \frac{c_{\text{РНК}}}{c_{\text{ДНК}}}, \quad (2)$$

где  $I_{640}$  - интенсивность люминесценции при длине волны 640 нм (димеры);

$I_{530}$  - интенсивность люминесценции в длине волны 530 нм (мономер);

$k_1, k_2$  - квантовые выходы связанных с субстратом мономеров и димеров соответственно;

$\varepsilon_1, \varepsilon_2$  - коэффициенты экстинкции связанных с субстратом мономеров и димеров соответственно;

$\varphi$  - коэффициент распределения, характерный для данной ткани;

$A_2$  - коэффициент, зависящий от физических параметров, связанных с субстратом мономеров и димеров, красителя.

В отличие от уравнения для определения параметра  $\alpha$  для одиночной клетки, в уравнении для ткани вводится коэффициент распределения  $\varphi$ , который отражает тот факт, что в состав изучаемой ткани могут входить клетки разного типа и размера. В результате изменения соотношения количества клеток разного типа может меняться соотношение интенсивностей зеленой и красной люминесценции (Карнаухов В.Н., 2002).

Результаты применения данной методики рассмотрены на примере ткани мозга крысы (Mandel P., Harth S., Borkowski T., 1961; Gaito J., 1969). Показано, что резкое повышение количества ДНК в мозжечке в течение 0-15 сут. может быть связано с тем, что мозжечок в этот период очень быстро растет,

увеличивая свои размеры. Это обстоятельство в сопоставлении с тем, что количество ДНК служит показателем числа клеток в данном объеме ткани (Zamenhoff S. et al., 1964), позволяет предполагать быстрое увеличение числа клеток в мозжечке после рождения животного (Gaito J., 1969). В течение 15-50 сут. наблюдается уменьшение содержания как РНК, так и ДНК в мозжечке, не означающее, однако, снижения содержания этих веществ в пересчете на одну клетку. По мнению В.Н. Карнаухова (2002), количество ДНК в клетке остается постоянным, а количество РНК несколько возрастает. Причины снижения состоят, вероятно, в том, что величины содержания ДНК и РНК приведены в пересчете на 1 г ткани. Поэтому быстрый рост клеток, сопровождающийся увеличением количества белка в них, приводит к тому, что относительная доля РНК и ДНК в ткани становится меньше. Кроме того, уменьшение содержания РНК и ДНК может быть связано и с уменьшением количества клеток в фиксированном объеме ткани.

**Метод определения соотношения «Белок/ДНК».** Функциональную активность клеток N. Karnaukhova, L. Sergievich, V. Karnaukhov (2010) предложили определять по соотношению «Белок/ДНК» с определением параметра  $\beta$  применяя сочетание флуорохромов акридинового оранжевого и 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС).

Параметр  $\beta$  в данной методике авторы предлагают вычислять по формуле (3):

$$\beta = A \frac{\text{Белок}}{\text{ДНК}} = \frac{I_{470}}{I_{530} - 0.4 * I_{470}} \quad (3)$$

**Метод определения соотношения «Белок/Нуклеиновые кислоты».** По данным В.Н. Карнаухова (2002) оценку синтетической активности клеток можно осуществлять по отношению интенсивности люминесценции, связанной с белками (527 нм), к интенсивности люминесценции, отражающей содержание нуклеиновых кислот (610 нм). В качестве флуорохрома были использованы ДХТАФ (окраска белков) и этидиум бромид (окраска нуклеиновых кислот).

По своему физиологическому смыслу данный параметр представляет собой содержание белка в ткани или клетке на единицу нуклеиновых кислот, а увеличение параметра свидетельствует об усилении синтетических процессов в клетке.

Взаимосвязь между функциональной и синтетической активностью была изучена в нервных клетках Н. Нудэн (1959) и Н. Нудэн (1964) методами количественной ультрамикрoхимии. Было показано, что синтез РНК и белков в нейронах находится в прямой зависимости от функциональной активности этих клеток.

**Метод определения соотношения «Белок/ДНК/РНК».** Е.В. Мельниковой, В.Н. Карнауховым (1973) был предложен метод одновременной регистрации соотношения концентрации белок:ДНК:РНК в клетке. Метод был опробован на гигантских нейронах моллюска *Lymnaea stagnalis*. В качестве люминесцентных красителей были использованы флуорохоромы акридиновый оранжевый и печатающий зеленый В. Соотношение интенсивности полос люминесценции (7:10:8) отражало соотношение концентрации белок:ДНК:РНК в условных единицах.

**Энергетика клетки.** N. Karnaukhova, L. Sergievich, V. Karnaukhov (2010) предложили использовать собственную люминесценцию клеток и тканей для цитодиагностики.

В работах (Карнаухов В.Н., Лебедев О.Е., Павленко В.К., 1976; Карнаухов В.Н., 1978; Руденко Я.Н., Бигдай Е.В., Самойлов В.О., 2007) было показано, что состояние митохондриального энергетического аппарата клетки может быть количественно охарактеризовано соотношением интенсивности люминесценции окисленных флавопротеинов (530 нм) и восстановленных пиридиннуклеотидов (470 нм).

Параметр  $\xi$  в данной методике N. Karnaukhova, L. Sergievich, V. Karnaukhov (2010) предлагают определять по формуле (4):

$$\xi = \frac{I_{530} - 0.5 * I_{470}}{I_{470}} \quad (4)$$

Полученный таким образом параметр  $\zeta$  характеризует степень активности митохондрий и не зависит ни от изменения рассеивающих свойств микрообъекта, ни от изменения таких аппаратурных факторов, как чувствительность регистрирующей системы, интенсивность возбуждающего излучения и т.п. (Карнаухов В.Н., 1978).

При проведении микроспектрофлуориметрических исследований В.Н. Карнаухов, О.Е. Лебедев, В.К. Павленко (1976) установили, что митохондрии, расположенные в различных участках приядерной области, обладают почти идентичными спектрами люминесценции, но значительно отличаются по форме спектра от митохондрий, локализованных в примембранных областях цитоплазмы.

### **1.4.3 Люминесцентные красители, применяемые для изучения внутриклеточного метаболизма**

В результате избирательного связывания флуорохрома с тем или иным веществом возникает яркое флуоресцентное свечение препарата. Выбор флуорохрома и способ окрашивания зависят от характера стоящих перед исследователями задач.

**Этидиум бромид.** Одним из флуорохромов, используемым в исследовательской практике, является этидиум бромид (Rigler R., Ehrenberg M., 1973; Vallee B.L. et al., 1972; Brandt L., Gohlke J.R., 1972).

Учитывая высокую чувствительность и избирательность взаимодействия этидиума бромид (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенан-тридиум бромид) с нуклеиновыми кислотами (РНК и ДНК), его применяют в качестве люминесцентной метки-красителя на нуклеиновые кислоты (Le Pecq J. V., Paoletti C., 1966). Основанием для использования этидиума бромид в качестве метки-флуорохрома послужила не только высокая специфичность красителя, количественно связывающегося с нуклеиновыми кислотами, но и пропорциональная зависимость изменения интенсивности люминесценции флуорохрома от

концентрации нуклеиновых кислот в препарате (Карнаухов В.Н., 1978).

Этидиум бромид относится к нуклеотид-связывающимся флуорохромам, представляющих класс так называемых интеркаляторов, молекулы которых содержат в своем составе как минимум один гетероатом. Широкое использование данного гетероциклического соединения обязано резкому увеличению квантового выхода люминесценции при его связывании с нуклеиновыми кислотами (Le Pecq J.V., 1967), вследствие чего структуры клетки, содержащие нуклеиновые кислоты, интенсивно люминесцируют в красной области спектра с максимумом излучения 590–610 нм. Кроме этого, было установлено, что большая часть люминесценции красителя (около 80%) обязана своим происхождением комплексам этидиум бромид-РНК (Burns V.W.F., 1972).

Этидиум бромид связывается с одно-, двух- и трехцепочечной ДНК (Scaria P.V., Shafer R.H., 1991; Mergny J.L. et al., 1991; Waring M.J., 1965), а также используется для обнаружения образования комплексов «Белок-ДНК» (Cook J., Holtom G., Lu P., 1990) и отдельных молекул ДНК (Chu B., Wang Z.-L., Wu C., 1989; Smith S.B., Aldridge P.K., Callas J. B., 1989).

В практической работе этидиум бромид применялся для определения уровня апоптоза клеток при заболеваниях (Варга О.Ю., 2006) и при исследовании действия лекарственных препаратов (Thirugnanasamprandan R., Ramya G., Gogulramnath M., 2016; Sneha P., Sasikumar S., Dakshinamoorthi M., 2018).

**Дихлор-симм-триазиниламинофлуоресцеин-1 (ДХТАФ).** ДХТАФ – это мелкокристаллический порошок светло-жёлтого цвета, растворимый в этиловом спирте и водных растворах бикарбоната натрия, двузамещенного фосфата натрия.

ДХТАФ используется в качестве метки на белок (Иванов В.В., 1961; Вирник А.Д., Чекалин М.А., 1962; Барский В.Е., Иванов В.Б., 1964; Иванов В.Б., 1976). При рН 5,6 проционы реагируют с амино- и иминогруппами белков,

присоединяясь к ним посредством ковалентной связи, а при pH 8,0 они реагируют еще и с гидроксильными группами белков и углеводов (Вирник А.Д., Чекалин М.А., 1962). Связанный краситель не извлекается не только спиртом, но и другими, более сильными органическими растворителями, обесцвечивающими обычно препараты, окрашенные кислотными и основными красителями (Барский В.Е., Иванов В.Б., 1964).

Спектр поглощения ДХТАФ в водном растворе бикарбоната натрия имеет максимум поглощения 500 нм и максимум люминесценции 527 нм (Карнаухов В.Н., 1978).

В качестве флуоресцентной маркировки внеклеточного матрикса ДХТАФ используется для визуализации микромасштабных деформаций в мягких коллагеновых тканях с помощью конфокальной микроскопии (Buckley M.R. et al., 2010; Bruehlmann S.B., Matyas J.R., Duncan N.A., 2004; Upton M.L. et al., 2008).

В основном ДХТАФ связывается с белками во внеклеточном матриксе посредством реакций между группами хлора в триазиновом кольце и свободными аминными группами, обнаруженными на боковых цепях лизина и N-концами белка (Smolin E.M., Rapoport L., 1959; Blakeslee D., Baines M.G., 1976).

**Stains all.** Stains all – это карбоцианиновый краситель, который окрашивает анионные белки, нуклеиновые кислоты, анионные полисахариды и другие анионные молекулы (Green M.R., Pastewka J.V., Peacock A.C., 1973; Myers J.M. et al., 1996; Saso L. et al., 1999; Dominguez D.C., Adams H., Hageman J.H., 1999).

Stains all используется для метахроматической окраски. Флуорохром меняет свой цвет в зависимости от контакта с другими молекулами (Sharma Y. et al., 1989). Белки окрашиваются в красный цвет, ДНК – в синий, РНК – в розовый. Кислые мукополисахариды приобретают голубую окраску (Dahlberg A.E., Dingenon C.W., Peacock A.C., 1969). Stains all позволяет визуализировать и идентифицировать белки благодаря их дифференциальному окрашиванию: высококислотные белки окрашиваются в синий цвет, а

неповрежденные протеогликаны – в пурпурный цвет, а менее кислые белки – в розовый цвет (Goldberg H.A., Warner K.J., 1997).

В качестве селективного красителя это соединение применялось в гистохимии с использованием классической микроскопии в проходящем свете (Haag D., Tschahargane C., Goerttler K., 1971). Проведенные исследования показали, что Stains all обладает достаточно яркой метахроматической люминесценцией, но не дает, по-видимому, четкого спектрального разделения ДНК, РНК и белков и имеет только две характерные полосы в спектре люминесценции (490 и 615 нм) (Карнаухов В.Н., 1971).

**Акридиновый оранжевый.** Акридиновый оранжевый (хлоргидрат 3,6-бидиметиламиноакридина) – люминесцентный краситель, характерной особенностью которого является способность связываться с двухспиральной нуклеиновой кислотой (ДНК, двухспиральная РНК некоторых вирусов и двухспиральные участки клеточной РНК) с характерной зеленой люминесценцией, и с односпиральными нуклеиновыми кислотами (РНК, односпиральные ДНК некоторых вирусов и бактериофагов, деполимеризованная ДНК) – с красной люминесценцией (Rigler R., 1966; Борисова О.Ф., Туммерман Л.А., 1964; Nash D., Plaut W., 1964).

На основании уникальных спектральных различий и дифференциального окрашивания молекул РНК и ДНК, краситель используется для различения стадий апоптоза и некроптоза (Plemel J.R. et al., 2017).

Злокачественные клетки также содержат повышенное количество РНК и ДНК по сравнению с нормальными клетками, что приводит к увеличению накопления и отсроченной элиминации акридинового оранжевого в опухолевых клетках (Kusuzaki K. et al., 2012).

Акридиновый оранжевый использовался в диагностике тестикулярных неоплазий у кобелей (Седегов С.В., 2015), при анализе фрагментации ДНК в сперматозоидах (Шейна Ю.И. с соавт., 2012).

**1-анилино-8-нафталинсульфонат (АНС).** АНС представляет собой органическое соединение, содержащее как сульфокислоту, так и аминогруппу.

Его проницаемость для митохондриальных мембран делает его особенно полезным. Это соединение применяется в качестве флуоресцентного молекулярного зонда (Schönbrunn E. et al., 2000). АНС может быть использован для изучения конформационных изменений в белках и в исследованиях биологических мембран (Slavik J., 1982). Он имеет низкий выход флуоресценции в полярных средах, что значительно усиливается при взаимодействии со многими белками. АНС нековалентно связывается с белками и его флуоресценция изменяется в зависимости от изменений в среде зонда. АНС также используется для оценки процессов сворачивания/разворачивания в белках (Semisotnov G. et al., 1991). Хотя взаимодействие АНС с белками было признано почти 50 лет назад (Weber G., 1952), детальные структурные данные для белка, связанного с АНС, отсутствуют (Schönbrunn E. et al., 2000).

### **1.5 Влияние антибиотиков на органы желудочно-кишечного тракта**

Микробиоту кишечника можно рассматривать как систему организмов, необходимых для усвоения питательных веществ, метаболизма неперевариваемых соединений, защиты от колонизации патогенами, а также развития архитектуры кишечника и иммунной системы (Pedron T., Sansonetti P., 2008; Round J.L., Mazmanian S.K., 2009).

Изменение состава кишечной микробиоты может привести к серьезному нарушению регуляции физиологического и иммунологического гомеостаза кишечника с серьезными неблагоприятными последствиями для организма хозяина (Round J.L., Mazmanian S.K., 2009). Известным примером этого является лечение антибиотиками, которое может предрасполагать организм хозяина к кишечным инфекциям (Sekirov I. et al., 2008). Так различные дозы лечения антибиотиками предрасполагают мышей к усилению колонизации *Salmonella enterica* серовар Typhimurium и кишечной патологии (Sekirov I. et al., 2008), а введение комбинации широкого спектра действия метронидазола, неомицина

и ванкомицина способствует инфицированию устойчивыми к ванкомицину энтерококками (Brandl K. et al., 2008).

По мнению В. Stecher, W.D. Hardt (2008) микробиота, вероятно, представляет собой физический барьер, который предотвращает взаимодействие патогенов со слизистой оболочкой кишечника и проникновение через нее, при этом другие исследования предполагают гораздо более высокую степень сложности, которая включает прямую роль микробиоты в определении иммунологического тонуса кишечника (Cash H.L. et al., 2006; Ivanov I. I. et al., 2008; Salzman N.H. et al., 2007).

Кишечный эпителий и его защитный муциновый покров являются первичной защитой от проникновения патогенов и проникновения микробов в подлежащую собственную пластинку. Антимикробные белки, секретируемые эпителиальными клетками кишечника, включают дефенсины, кателицидины и лектины С-типа (Reg3 $\beta$  и Reg3 $\gamma$ ) (Hooper L.V., 2009). Они действуют, разрушая поверхностные структуры бактерий и способствуя поддержанию состава микробиоты. Было доказано, что их экспрессия зависит от стимуляции антимикробных белков микробами и их продуктами (Cash H.L. et al., 2006). Кроме того, было показано, что распознавание комменсалов играет важную роль в регулировании воспалительного состояния кишечника посредством регуляции оси интерлейкин-25 (IL-25) -IL-23-IL-17 и клеток Th17 (Zaph C. et al., 2008).

Бокаловидные клетки играют защитную роль в кишечнике за счет выработки биологически активных соединений (Van Klinken B.J. et al., 1995; Thim, L., 1997). Молекулы этих соединений обеспечивают защиту от патогенов, предотвращая проникновение бактерий в эпителий кишечника, и играют ключевую роль в поддержании здорового гомеостаза кишечника (Makkink M.K. et al., 2002). Исследования с использованием мышей показали, что слой кишечной слизи является основным медиатором взаимодействий микробов с антимикробными белками, секретируемыми эпителиальными клетками кишечника, и что целостность слизи в значительной степени зависит от микробиоты (Mack D.R. et al., 1999; Johansson M.E. et al. 2008;

M. Van der Sluis et al., 2006). Слой слизи в толстой кишке состоит из двух стратифицированных слоев, в основном состоящих из секретируемого муцина Muc2 (Johansson M.E. et al. 2008). Состав внутреннего слоя слизи плотный и лишен микробиоты, в то время как внешний слой представляет собой рыхлый матрикс, в котором находится микробиота (Johansson M.E. et al., 2008). Внутренний плотный слой слизи действует как барьер, который служит для минимизации транслокации микробов и предотвращения чрезмерной активации иммунной системы (Hollingsworth M.A., Swanson B.J., 2004). Мыши с дефицитом продукции Muc2 имеют измененный слой кишечной слизи и у них спонтанно развивается колит, что позволяет предположить, что дефекты продукции муцина приводят к измененным взаимодействиям микробов с антимикробными белками, секретируемыми эпителиальными клетками кишечника (Van der Sluis M. et al., 2006). Микробы могут взаимодействовать с антимикробными белками, секретируемыми эпителиальными клетками кишечника, путем диффузии молекулярных структур, связанных с микробами, через слой слизи, что приводит к стимуляции нижележащих антимикробных белков клеток кишечника (Hooper L.V., 2009). В гомеостатических условиях эта бактериальная стимуляция исходит от микробиоты и, по-видимому, важна для здорового слоя слизи (Johansson M.E. et al., 2008).

Исследование M. Wlodarska et al. (2011) показало, что некоторые виды лечения антибиотиками могут не только вызывать изменения состава комменсальной популяции, но также влиять на воспалительный тонус кишечника, нарушая защитную функцию бокаловидных клеток. Так, лечение метронидазолом снижает выработку Muc2 и вызывает истончение защитного слоя слизи, что позволяет предположить, что изменения гомеостаза кишечника и истощение слоя слизи некоторыми антибиотиками могут предрасполагать хозяина к кишечной инфекции и, потенциально, к другим воспалительным заболеваниям кишечника.

По данным С.У. Chen et al. (2019) лечение антибиотиками привело к увеличению толщины внутреннего слоя слизи толстого отдела кишечника и уменьшению разнообразия бактериального сообщества.

Исследования A.L. Krinke, D. Jamroz (1996) показали, что добавление к корму цыплят антибиотика цыплят вызвало снижение митотической активности эпителиальных клеток двенадцатиперстной кишки и гепатоцитов печени, а у контрольных цыплят небольшую гипертрофию гепатоцитов, которая указывает на то, что их активность выше, чем у животных, получавших антибиотик.

В некоторых экспериментах, проведенных с антимикробными агентами, оценивали относительный вес (в процентах от живого веса) и вес тонкой кишки на линейный сантиметр, которые являются хорошими индикаторами изменений морфологии тонкой кишки. Стимуляторы роста показаны в качестве агентов, изменяющих толщину кишечной стенки за счет уничтожения вредных бактерий (Coates M. et al., 1955; Eisser H., Somer P., 1966; Rosen G.D., 1995), так что у стерильных птиц кишечные тракты могут быть легче, чем у птиц коммерческого использования (Coates et al., 1981).

E.U. Jong et al. (1985b) изучали действие антибиотиков на организм бройлеров и сообщили о физических изменениях в структуре кишечника. Уменьшение массы кишечника может привести к меньшему использованию питательных веществ слизистой оболочкой, что привело к экономии питательных веществ птицами (Henry P. et al., 1987), тем не менее, когда характеристика оценивалась у птиц, которых кормили противомикробными препаратами (Loddi M.M. et al., 2000) и с микробными добавками (Pedroso A.A., 1999), не было обнаружено значительных различий.

## **1.6 Заключение по обзору литературы**

Одной из важнейших проблем современного птицеводства являются бактериальные инфекции. В большинстве случаев инфекции вызваны

бактериями, принадлежащими к семейству Enterobacteriaceae, особенно E. Coli, Salmonella, Klebsiella (Mattes B.R. et al., 2005; Kowalczyk J. et al., 2017). Заболевания, вызываемые вышеназванными бактериями, наносят колоссальный экономический ущерб. Также доказана ведущая эпидемиологическая роль кишечной палочки, сальмонеллы, клебсиеллы в возникновении болезней человека, в первую очередь, пищевых отравлений.

Меры борьбы и профилактики заболеваний, предпринимаемые в птицеводстве и в практическом здравоохранении, приводят к значительным экономическими затратам.

Более 50 лет основным способом профилактики заболеваний бактериальной природы в птицеводстве является применение кормовых антибиотиков.

Дальнейшее их использование в ближайшей перспективе может быть ограничено по нескольким причинам.

Во-первых, правительства разных стран вводят запрет на использование антимикробных препаратов при производстве птицы.

Во-вторых, формируется общественное мнение, направленное на потребление органически чистых продуктов питания, в том числе не содержащих антибиотиков.

В-третьих, нарастающий процесс приобретения микроорганизмами устойчивости ко многим современным антибиотикам.

В ответ на меняющиеся внешние факторы отдельные птицеводческие компании в разных странах переходят на использование в своей работе альтернатив антибиотикам.

Под влиянием возрастающего спроса на заменители антибиотиков исследовательскими группами создаются, апробируются и выводятся на рынок ветеринарных препаратов новые средства лечения и профилактики, в том числе пробиотики, пребиотики, бактериофаги и пр.

Очевидно, что в ближайшее время количество новых препаратов-заменителей антибиотиков, предлагаемых для птицеводства, будет возрастать. При

этом будет продолжена работа по созданию антибиотиков нового типа для преодоления возросшей устойчивости микроорганизмов.

Работа по созданию следующего поколения средств профилактики и лечения заболеваний птиц требует принципиально новых подходов к оценке биохимических процессов, происходящих в организме птицы, и, в первую очередь, в стенке желудочно-кишечного тракта. Это объясняется тем, что желудочно-кишечный тракт во многих случаях, является местом накопления и проникновения возбудителей инфекции. Он играет важную роль в обеспечении продуктивности сельскохозяйственной птицы. Кроме этого, в промышленном птицеводстве поступление лекарственных средств в организм птицы осуществляется, преимущественно, через желудочно-кишечный тракт.

В настоящее время в научной литературе для мониторинга состояния здоровья желудочно-кишечного тракта предлагаются различные виды показателей, которые могли бы служить в качестве биологических маркеров.

Однако, предлагаемые биомаркеры имеют как достоинства, так и отдельные недостатки. Так, не все биомаркеры были опробованы на птице. Многие предлагаемые биомаркеры не позволяют зафиксировать биохимические сдвиги в функциональном состоянии органов желудочно-кишечного тракта, являющиеся предвестниками патологических состояний, в ранние сроки до появления клинических признаков. Кроме этого, мало научных исследований посвящено изучению влияния антибиотиков на организм хозяина, в том числе на клетки и ткани желудочно-кишечного тракта.

В качестве метода, способного выявлять изменения в биохимических процессах на клеточном уровне, может быть использован метод люминесцентного спектрального анализа. Метод продемонстрировал свою эффективность в оценке функционального состояния разного типа клеток путем определения количества органических веществ: белков и нуклеиновых кислот.

Однако, в доступной нам литературе отсутствовали сведения об использовании метода люминесцентного спектрального анализа для оценки функционального состояния органов желудочно-кишечного тракта.

## ГЛАВА 2. 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 клембсиеллезом.

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** была 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 (клембсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и при проведении антибиотикотерапии клембсиеллезом, осуществлен сравнительный анализ функционального состояния клеток печени и железистого желудка интактных цыплят, цыплят при кишечных инфекциях (клембсиеллез, 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.

Структурно-логическая схема научно-исследовательской работы в рамках диссертационной работы представлена на рисунке 1.

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).

**ПЕРВЫЙ ЭТАП**

**Теоретическое обоснование возможности разработки и применения новых методов обнаружения, определения количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта птиц на основе люминесцентного спектрального анализа с применением флуоресцентных красителей**

**ВТОРОЙ ЭТАП**

**Разработка новых методов люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта птиц с применением флуоресцентных красителей**

1. Одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания нуклеиновых кислот в клетках желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуорохрома «Этидиум бромид» и оценки их функционального состояния	2. 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	3. 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	4. 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»	5. Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа для обнаружения, определения количественного содержания нуклеиновых кислот и белков и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят по их количественному содержанию с применением флуорохромов «Этидиум бромид» и «ДХТАФ» при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза
--	---	--	--	---

**ТРЕТИЙ ЭТАП**

**Экспериментальная апробация новых методов, сравнительный анализ функционального состояния клеток печени и железистого желудка интактных цыплят, цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза, разработка люминесцентно-микроскопические критериев ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят**

Опыт 1. Интактные цыплята (n-200), цыплята при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза (n-250), эшерихиоза (n-250), сальмонеллеза (n-250)	Опыт 2. Интактные цыплята (n-300), цыплята при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза (n-300), при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза (n= 300)
--	--

**ЧЕТВЕРТЫЙ ЭТАП**

**Разработка рекомендаций по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии**

Рисунок 1 – Структурно-логическая схема научно-исследовательской работы

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. Действующее вещество «Энрофлоксацин» относится к группе лекарственных веществ «Фторхинолоны», обладает широким спектром антибактериального действия. Энрофлоксацин блокируя синтез бактериальной ДНК прекращает размножение микробов делением. Препарат приводит

к гибели бактерий и микоплазм, вызывающих респираторные, желудочно-кишечные, урогенитальные заболевания.

Животных в ходе экспериментов содержали в виварии ФГБУ «Саратовская межобластная ветеринарная лаборатория» в соответствии с санитарными правилами и на стандартном рационе в соответствии с Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г. № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально биологических клиник (вивариев)».

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, и приведены в таблице 1.

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.

Таблица 1 – Показатели микроклимата помещений в ходе первого и второго экспериментов

Возраст, дн.	Температура, °С	Влажность, %	Световой день, час	Интенсивность освещенности, лк
0 – 3	33 – 31	55 – 60	23	40
4 – 7	32 – 31	55 – 60	22	40
8 – 14	30 – 28	55 – 60	20	40
15 – 21	28 – 26	55 – 60	19	40
22 – 24	25 – 23	55 – 65	18	40
25 – 28	23 – 21	55 – 65	18	40
29 – 30	21 – 19	60 – 70	17	40

У цыплят отбирали кусочки внутренних органов (железистого и мышечного желудка, тонкого и толстого кишечника, печени, поджелудочной железы, сердца, легкого, почек, тимуса и селезенки), головного мозга и фабрициевой бursы. 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) с последующей обработкой изображений в программе Microsoft office picture manager.

Люминесцентно-микроскопическое исследование проводили в соответствии с разработанными новыми методами (раздел 3.2.).

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).

В качестве источников света применяли галогенную лампу КГМ9-70 с источником питания ИПЛ-Н9 для освещения объекта снизу через конденсор, и ртутную лампу MTRCURY SHORT ARC HBO 100 и 103 W/2 («OSRAM», Германия) с источником питания HSW120LM24 для возбуждения люминесценции объекта. С помощью голубой светоделительной пластинки выделяли поток излучения с длиной волны 300-380 нм, который и возбуждал люминесценцию. В качестве запирающего фильтра применяли склеенные фильтры ЖС-3 и БС-8. Свет, отразившийся от исследуемого объекта или прошедший через него, с определенной зоны изображения выделяли измерительной фотометрической диафрагмой спектрофотометрической приставки диаметром 0,1 мм, определяющей в плоскости изображения фотометрируемый участок. Прошедший через систему монохроматора МСФУ-К свет попадал на приемник излучения, в качестве которого использовали фотоэлектронный умножитель ФЭУ R928 фирмы «НАМАМАТСУ» (Япония). Напряжение на ФЭУ в каждом отдельном случае изменяли в соответствии с интенсивностью люминесценции

фотометрируемого участка. Спектральный интервал света, воздействующий на ФЭУ, помимо размера фотометрической диафрагмы, устанавливали размером выходной щели монохроматора – 0,2 мм. Возникающий при этом сигнал, пропорциональный интенсивности потока излучения, подавался на вход блока управления БУСМ-10, имеющий аналого-цифровой преобразователь, преобразующий сигнал с ФЭУ в цифровой код, и обеспечивающий управление работой микроскопа-спектрофотометра и обработкой полученной фотометрической информации по «жесткой» программе с помощью процессорного модуля. Используя данную программу, функционирующую в ОС «WINDOWS '98, SE, XP», выбирали нужный режим работы, управляли работой механизма сканирования по спектру, производили сбор, обработку и запоминание спектрофотометрической информации, а также ее отображение в графическом и (или) цифровом виде на экране монитора и (или) на печатающем устройстве. Кроме процессорного модуля блок управления БУСМ-10 включал в себя высоковольтный стабилизатор напряжения для питания ФЭУ и блок управления электродвигателем монохроматора микроскопа-спектрофотометра. При работе использовали объективы с увеличением  $\times 10$  и  $\times 20$ , окуляры бинокулярной насадки –  $\times 10$ . В работе использовали два режима: режим наблюдения объекта в бинокулярный тубус и режим фотометрирования.

Исследованию подвергались неокрашенные гистологические препараты железистого желудка и печени, окрашенные люминесцентными метками-красителями в соответствии с разработанными новыми методами (раздел 3.2.).

Соответственно выбранному красителю осуществляли поиск оптимальной концентрации красителя, времени окраски препарата и длительности его промывки в воде, последовательности окраски гистопрепарата при условии использования двух красителей, а также особенностей его заключения.

С помощью микроскопа-спектрофотометра МСФУ-К в режиме наблюдения объекта в бинокулярный тубус проводили визуальное исследование особенностей люминесценции неокрашенных и окрашенных гистопрепаратов, отмечали цвет люминесценции и участки с наиболее выраженной степенью ее

интенсивности. В режиме фотометрирования получали спектры люминесценции интерес-зависимой зоны гистологического среза, по которым изучали изменения концентрации (количества) определенных органических веществ, выявляемых с помощью количественно связывающимися с ними специфическими люминесцентными метками-красителями. При этом концентрацию (количество) искомого органического вещества определяли по величине интенсивности люминесценции полосы излучения в спектре люминесценции фотометрируемого участка, окрашенного флуорохромом гистологического среза при длине волны, соответствующей максимальной величине интенсивности люминесценции примененного красителя.

При работе в режиме фотометрирования спектральный интервал света, отразившийся от исследуемого объекта или прошедший через него и воздействующий на ФЭУ, определяли размерами измерительной фотометрической диафрагмы и выходной щели монохроматора. При условии, что их значения в каждом конкретном случае имели постоянную величину, при фотометрировании из препарата выделяли участок, площадь которого соответствовала его оптическому отображению, а объем определялся толщиной среза. В результате измеряемая интенсивность люминесценции фотометрируемого участка всегда оказывалась отнесенной к определенному объему ткани.

Для проведения люминесцентно-микроскопического исследования окрашенных и неокрашенных гистологических срезов с последующим люминесцентным спектральным анализом разработали следующий порядок изучения гистопрепаратов на микроскопе-спектрофотометре МСФУ-К.

Для получения спектра люминесценции исследуемый объект помещали на предметный столик микроскопа-фотометра и в режиме «Параметры работы монохроматора» задавали диапазон сканирования 400-700 нм, устанавливали предварительное напряжение на ФЭУ, равное 400 В, выбирали шаг дискретизации 1 (или 2) нм и соответствующую ему скорость сканирования 10000 (или 3000) нм/сек. Затем задавали режим «Сканирование» и производили пробную запись спектра люминесценции объекта, изменяя напряжение питания ФЭУ и

величину выходной щели монохроматора до получения достаточной для регистрации спектра интенсивности сигнала люминесценции. Отображение полученной фотометрической информации в графическом и цифровом виде осуществляли в режиме «Обработка», при котором на рабочем экране монитора отображали график спектра люминесценции и таблицу его значений. После предварительного изучения полученных результатов устанавливали необходимое значение параметра «ОРДИНАТА МАХ», исходя из реальных значений интенсивности, и выводили их на печатающее устройство.

Для получения спектров пропускания и поглощения, корректных со спектром люминесценции, настраивали нижнее освещение: перекрывали световой поток от ртутной лампы и, регулируя раскрытие полевой диафрагмы и апертурной диафрагмы ветви нижнего освещения, устанавливали интенсивность фототока в средней части спектра, превышающую интенсивность фототока в средней части спектра люминесценции в разумных пределах. Затем устанавливали значение параметра «ОРДИНАТА МАХ», равное 1,0, что соответствовало 100 % измеряемой величины, производили калибровку, выбрав в качестве образца сравнения лампу КГМ9-70, записывали спектр лампы и проверяли правильность калибровки в режиме «Регистрация».

При условии правильной калибровки данный режим работы использовали для последующей фотометрии, которую осуществляли в следующей последовательности: после возбуждения люминесценции находили в гистологическом срезе нужный участок фотометрии, прикрывали полевую диафрагму и в режиме «Сканирование» снимали с него спектр люминесценции. Затем шторкой фонаря перекрывали световой поток от ртутной лампы и через этот же участок пропускали световой поток ветви нижнего освещения и снимали спектр поглощения, при тех же условиях получали спектр пропускания при сканировании участка, расположенного рядом со срезом. На заключительном этапе на предметный столик помещали урановое стекло ЖС-19 толщиной ~1,5 мм, перекрывали световой поток ветви нижнего освещения, открывали шторку фонаря ртутной лампы, возбуждали люминесценцию уранового стекла, фокусировали

микроскоп на его резкое изображение и в режиме «Сканирование» снимали спектр люминесценции. В некоторых случаях после определения в спектре оптической плотности длины волны, величину оптической плотности при которой использовали в качестве толщины фотометрируемого участка, измерение  $I_1$  (величины светового потока, прошедшего через фотометрируемый участок гистологического среза) и  $I_0$  (величины светового потока, прошедшего рядом со срезом) проводили в режиме «ТЕСТ».

Графики полученных спектров и таблицы их значений выводили на печатающее устройство. Полученные результаты использовали для определения оптической плотности и количества искомого органического вещества в условных единицах.

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  $n$ .

Оценку достоверности различий между средними значениями в опытных и контрольных экспериментах проводили по величине  $p$  – value в варианте

двухвыборочного непарного t-теста (two-sample unpaired t-test) с неравными дисперсиями. Различия принимали достоверными при выполнении неравенства  $p \geq 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ АНАЛИЗ

### **3.1 Теоретическое обоснование возможности разработки и применения новых методов обнаружения, определения количественного содержания органических веществ в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят на основе люминесцентного 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; Бродский В.Я., 1966; 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 (Акчурин С.В., 2011).

Данную закономерность мы наблюдали при изучении влияния на величину интенсивности люминесценции неокрашенных и окрашенных флуорохромом толщины гистологических срезов печени и железистого желудка цыплят, изготовленных из одного парафинового блока (рисунки 2, 3).

Для получения сопоставимых величин, отражающих количественное содержание органического вещества в той или иной зоне гистологического среза с учетом толщины фотометрируемого участка, был разработан следующий способ.

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).

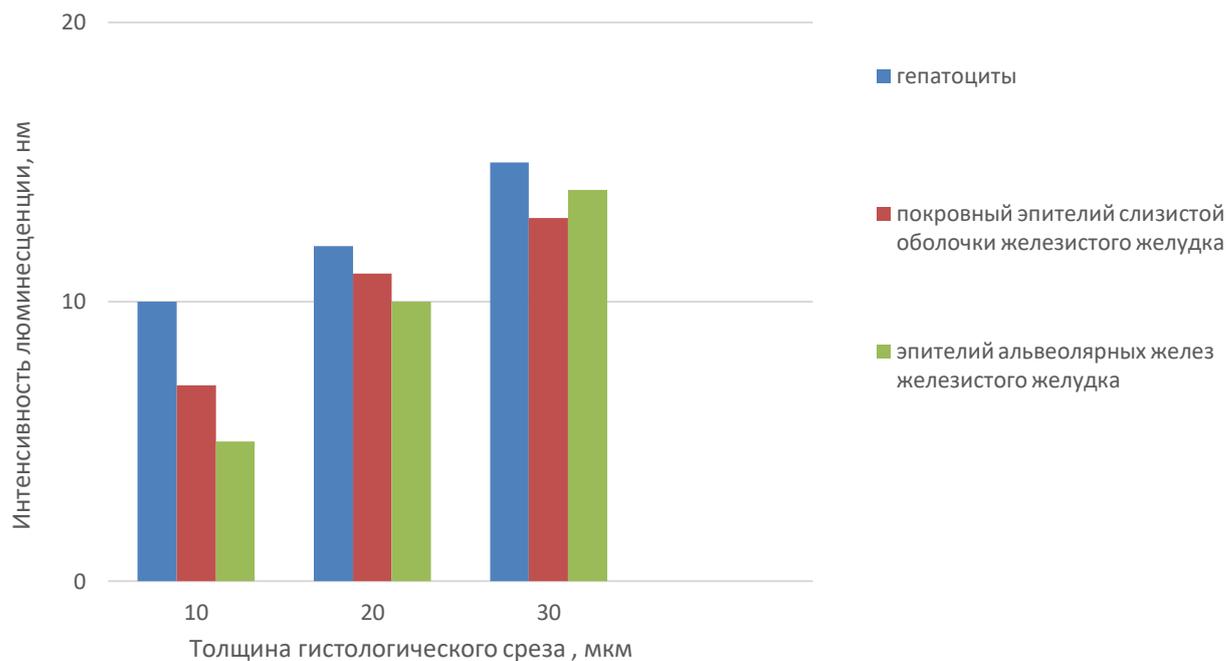


Рисунок 2 – Гистограмма зависимости максимума величины интенсивности люминесценции (нм) неокрашенных гистологических срезов печени и железистого желудка цыплят от толщины гистологического среза (мкм)

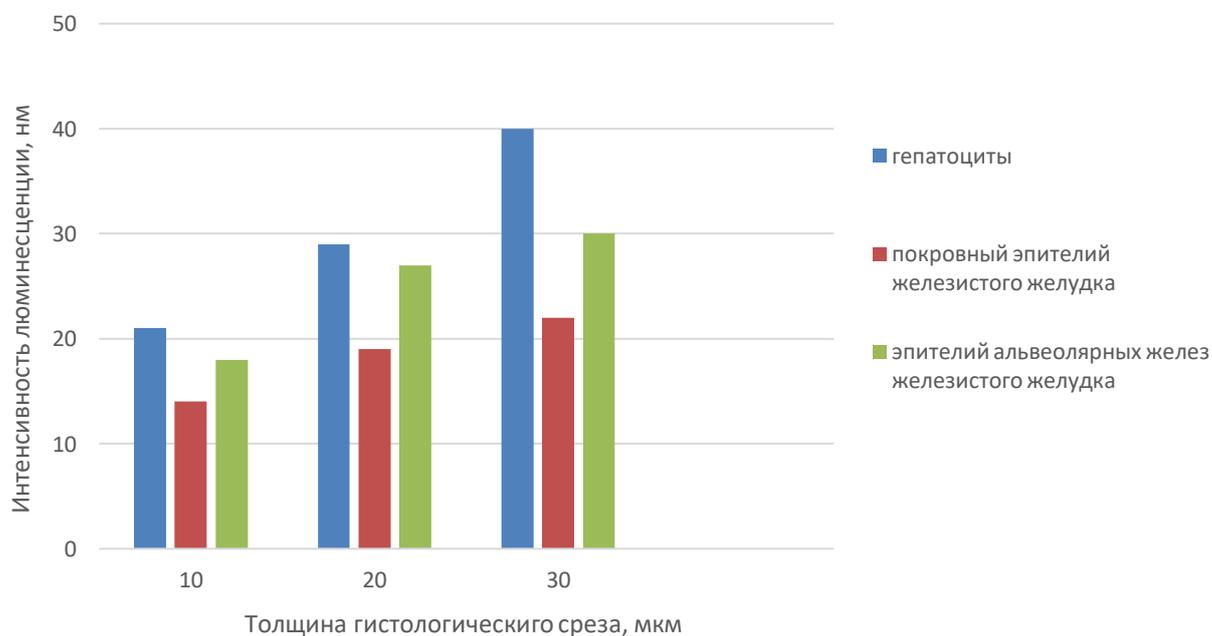


Рисунок 3 – Гистограмма зависимости максимума величины интенсивности люминесценции (нм) окрашенных ДХТАФ гистологических срезов печени и железистого желудка цыплят от толщины гистологического среза (мкм)

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 условно принималась за его толщину. Учет толщины фотометрируемого участка позволил определять количество органических веществ в сопоставимых условных единицах. Величину оптической плотности рассчитывали по известной формуле (5):

$$D = \lg \frac{I_0}{I_1}, \quad (5)$$

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 (Акчурин С.В., 2011). В качестве такого эталона использовали определенную величину интенсивности люминесценции промышленно изготавливаемого и имеющего постоянный спектр люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм.

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 (в условных единицах) рассчитывали по формуле (6):

$$N = \frac{I_{max}}{D \cdot \mathcal{E}}, \quad (6)$$

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 ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм, используемая в качестве эталона.

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 аутолического процесса в посмертно измененной ткани и повышения точности анализа (Акчурин С.В., 2011).

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 ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм – при одинаковых параметрах режима работы оборудования в каждом конкретном случае (Акчурин С.В., 2014).

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).

### **3.2 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**

#### **3.2.1 Одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания нуклеиновых кислот в клетках желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуорохрома «Этидиум бромид» и оценки их функционального состояния (Метод с этидиумом бромида)**

Учитывая высокую чувствительность и избирательность при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами (РНК и ДНК) этидиума бромида (Le Pecq I.V., Paoletti C., 1966), он был выбран в качестве люминесцентной метки-красителя на нуклеиновые кислоты. Основанием для использования этидиума бромида в качестве метки-флуорохрома послужила не только высокая специфичность красителя, количественно связывающегося с нуклеиновыми кислотами, но и пропорциональная зависимость изменения интенсивности люминесценции флуорохрома от концентрации нуклеиновых кислот в препарате (Карнаухов В.Н., 2002). Этидиум бромид относится к нуклеотид-связывающимся флуорохромам, представляющих класс так называемых интеркаляторов, молекулы которых содержат в своем составе как минимум один гетероатом. Широкое использование данного гетероциклического соединения обязано резкому увеличению квантового выхода люминесценции при его связывании с нуклеиновыми кислотами (Le Pecq J.V., 1967), вследствие чего структуры клетки, содержащие нуклеиновые кислоты, интенсивно

люминесцируют в красной области спектра с максимумом излучения 590–610 нм. Кроме этого, было установлено, что большая часть люминесценции красителя (около 80 %) обязана своим происхождением комплексам этидиум бромида–РНК (Burns V.W.F., 1972).

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) (Акчурин С.В., 2010; Акчурин С.В., 2020).

Для исключения возможного влияния люминесценции, возникающей в тканях вследствие фиксации формалином белков, содержащих амино-, имино- 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 (рисунок 4), в спектре люминесценции которого максимум интенсивности люминесценции соответствует длине волны, равной 480 нм (рисунок 5).

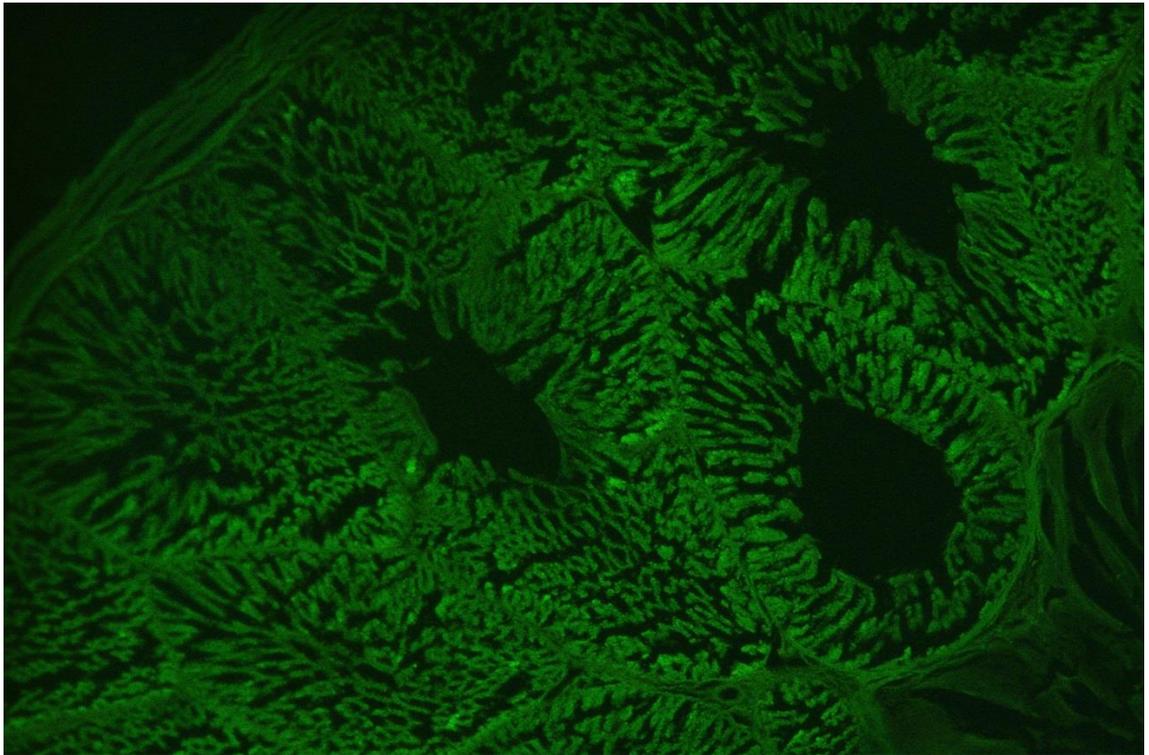


Рисунок 4 – Железистый желудок цыплят контрольной группы. Люминесценция неокрашенного флуорохромом гистологического препарата железистого желудка цыплят. Ув. X 100

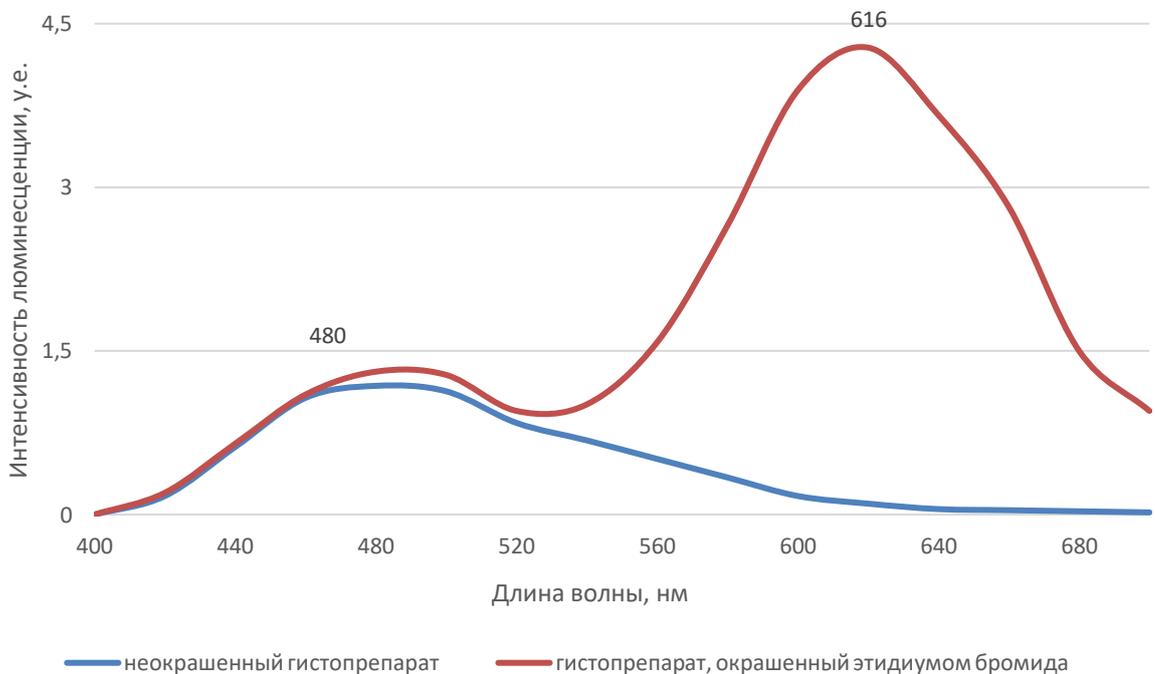


Рисунок 5 – Спектры люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы на неокрашенном и окрашенном этидием бромидом гистологических препаратах,

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 6).

В спектре люминесценции окрашенного препарата имелось два максимума интенсивности люминесценции – при длине волны 480 нм, обусловленного фиксированным формалином белкам и регистрируемого в сине-зеленой части спектра, и при длине волны 616 нм, регистрируемого в красной области спектра и обусловленного этидиумом бромидом, находящегося в комплексе с нуклеиновыми кислотами (Акчурин С.В., 2013).

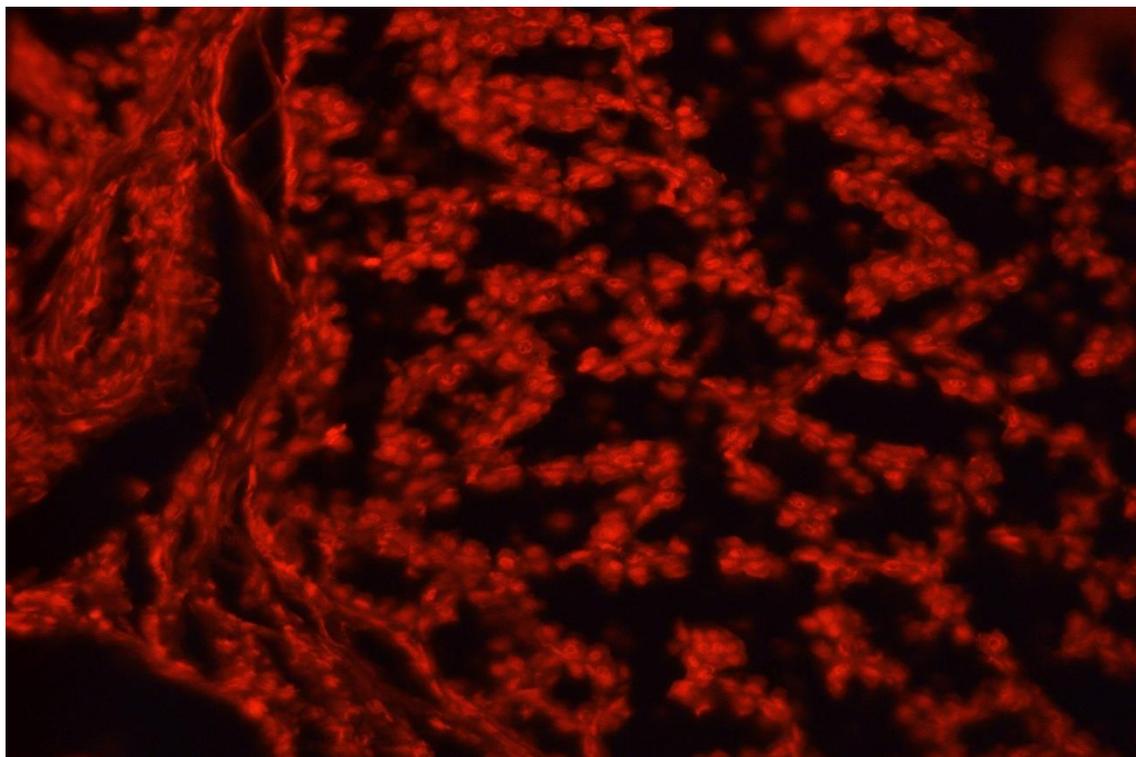


Рисунок 6 – Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция окрашенного этидиумом бромидом гистологического среза.

Ув. X 200.

Сравнение максимумов в спектрах люминесценции эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят на неокрашенных (480 нм) и окрашенных (616 нм) гистопрепаратах показало, что они отстоят друг от друга более

чем на 100 нм. Полученный результат соответствует условию, согласно которому для проведения отдельной регистрации интенсивностей люминесценции максимумы интенсивности люминесценции должны отстоять друг от друга довольно далеко (60–100 нм) (Карнаухов В.Н., 2002). Поэтому при расчете количественного содержания нуклеиновых кислот (в условных единицах) учитывали величину интенсивности люминесценции фотометрируемого участка при длине волны, равной 616 нм (Акчурин С.В., 2020).

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 пропускания (рисунок 7) (Акчурин С.В., 2020). С учетом полученных данных рассчитывали спектр оптической плотности (рисунок 8).

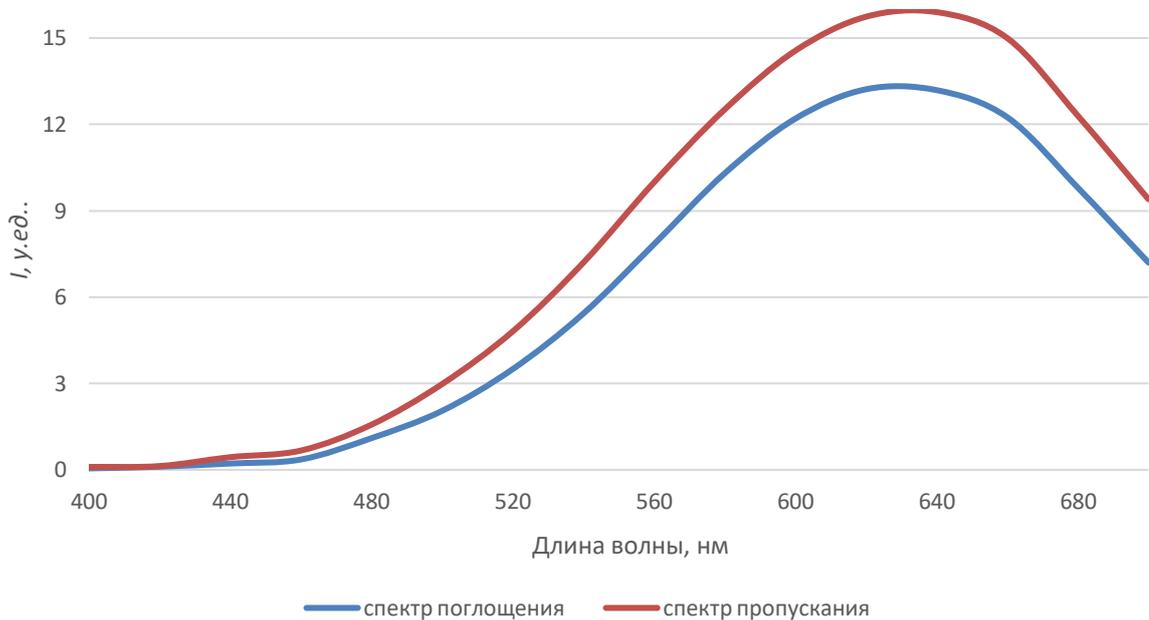


Рисунок 7 – Спектры пропускания и поглощения гистологического препарата стенки железистого желудка цыплят, окрашенного этидиумом бромидом

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 (рисунок 8). При данной длине волны учитывали величину оптической плотности при расчете количественного содержания нуклеиновых кислот (в условных единицах).

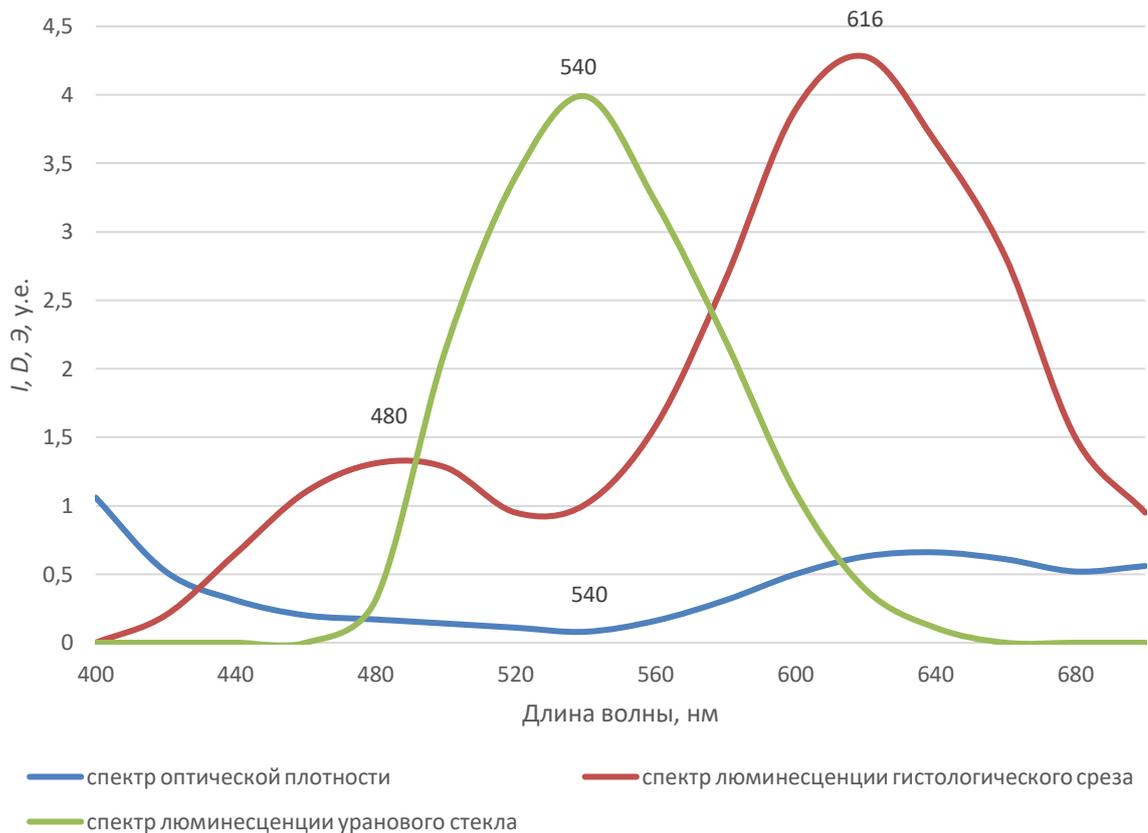


Рисунок 8 – Спектры оптической плотности и люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки, окрашенного этидиумом бромидом гистологического среза железистого желудка цыплят и спектр люминесценции уранового стекла

При этих же параметрах режима работы получали спектр люминесценции уранового стекла ЖС–19 толщиной ~1,5 мм и его величину при длине волны, равной 540 нм, учитывали в качестве эталона при расчете количественного содержания нуклеиновых кислот (в условных единицах).

С учетом полученных данных количество нуклеиновых кислот в условных единицах в исследуемом участке гистологического среза железистого желудка цыплят рассчитывали по следующей формуле (7):

$$I_{NK} = \frac{I_n}{D_n \cdot I_э}, \quad (7)$$

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;

$I_э$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Для исключения фактора влияния аутолиза на интенсивность люминесценции исследуемого объекта проводили фотометрирование трех участков, обладающих наибольшей интенсивностью люминесценции при визуальной микроскопии гистологического среза, в каждом из которых рассчитывали количество нуклеиновых кислот (в условных единицах) и для проведения анализа принимали во внимание наибольшее из трех полученных результатов.

Разработанный одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа с применением флуорохрома этидиума бромид использовали при изучении клеток покровного эпителия, эпителия альвеолярных глубоких желез слизистой оболочки и мышечного слоя в окрашенных гистологических срезах железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп.

### **3.2.2 Одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания беков в клетках печени цыплят с применением флуорохрома «ДХТАФ» и оценки их функционального состояния (Метод с ДХТАФ)**

Применение данного люминесцентно-микроскопического метода исследования гистологических срезов направлено на выявление белков в клетках печени, определения их количественного содержания в условных единицах.

С целью определения белков, содержащих амино-, имино- и гидроксильные группы, был выбран активный проционовый краситель «ДХТАФ». Известно, проционы количественно связываются с белком (Иванов В.В., 1961). Проционы состоят из реакционной группы и хромофора, определяющего спектральные характеристики проциона. Было установлено, что при рН=5,6 проционы реагируют с амино- и имино-группами белков посредством присоединения к ним ковалентной связью, а при рН=8,0 – еще и с их гидроксильными группами (Иванов В.В., 1961). Определяющим при выборе данного флуорохрома в качестве люминесцентной метки на белки наряду с прочими достоинствами являлось его свойство не извлекаться из тканей не только спиртом, но и более сильными растворителями. Вместе с тем при разработке метода выявления белков с помощью данного красителя учитывали, что определение оптимальной концентрации ДХТАФ и времени окраски гистологического препарата требует особого внимания, поскольку интенсивность люминесценции препарата быстро достигает плато насыщения и затем резко падает (Карнаухов В.Н., 2002; Акчурин С.В., 2013).

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) (Акчурин С.В., 2011; Акчурин С.В., 2020).

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 (рисунок 9).

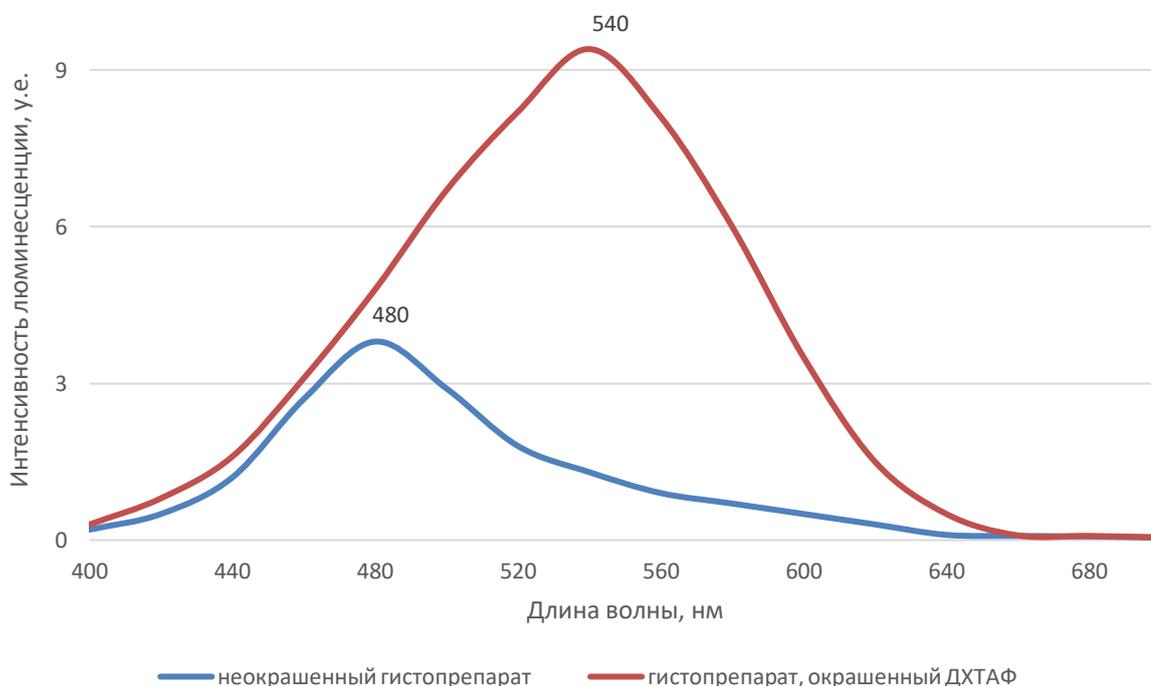


Рисунок 9 – Спектры люминесценции гепатоцитов в гистологическом срезе печени цыплят, неокрашенном и окрашенном ДХТАФ

В окрашенных флуорохромом гистологических срезах печени люминесценция имела преимущественно ярко-зеленый цвет из-за выраженного свечения гепатоцитов, составляющих паренхиму печени (рисунок 10).

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 имино-группам белков гепатоцитов, ковалентно связанных с используемым флуорохромом. Сопоставление спектров люминесценции неокрашенных и окрашенных гистопрепаратов указывает на возникновение эффекта перекрытия спектра люминесценции неокрашенных препаратов, который совершенно исчезает в спектре люминесценции окрашенных срезов, что объясняется более выраженной величиной интенсивности люминесценции окрашенных ДХТАФ гистологических срезов (рисунок 11) (Акчурин С.В., 2013).

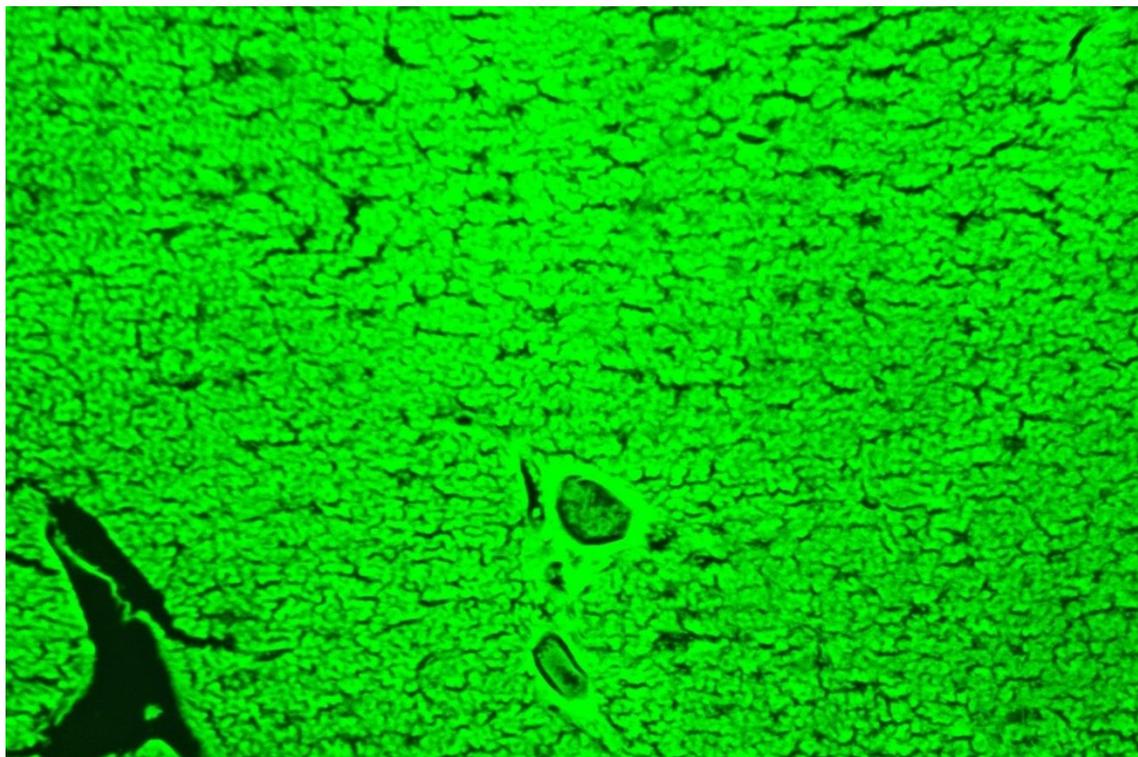


Рисунок 10 – Печень цыплят II опытной группы. Люминесценция окрашенного ДХТАФ гистологического среза. Ув. X 100.

Сравнение максимумов в спектрах люминесценции неокрашенных (480 нм) и окрашенных (540 нм) гистопрепаратов печени показало, что они отстоят в пределах, допускающих отдельную регистрацию интенсивностей люминесценции (Карнаухов В.Н., 2002). Поэтому при расчете количественного содержания белков (в условных единицах) учитывали величину интенсивности люминесценции фотометрируемого участка при длине волны, равной 540 нм (рисунок 11).

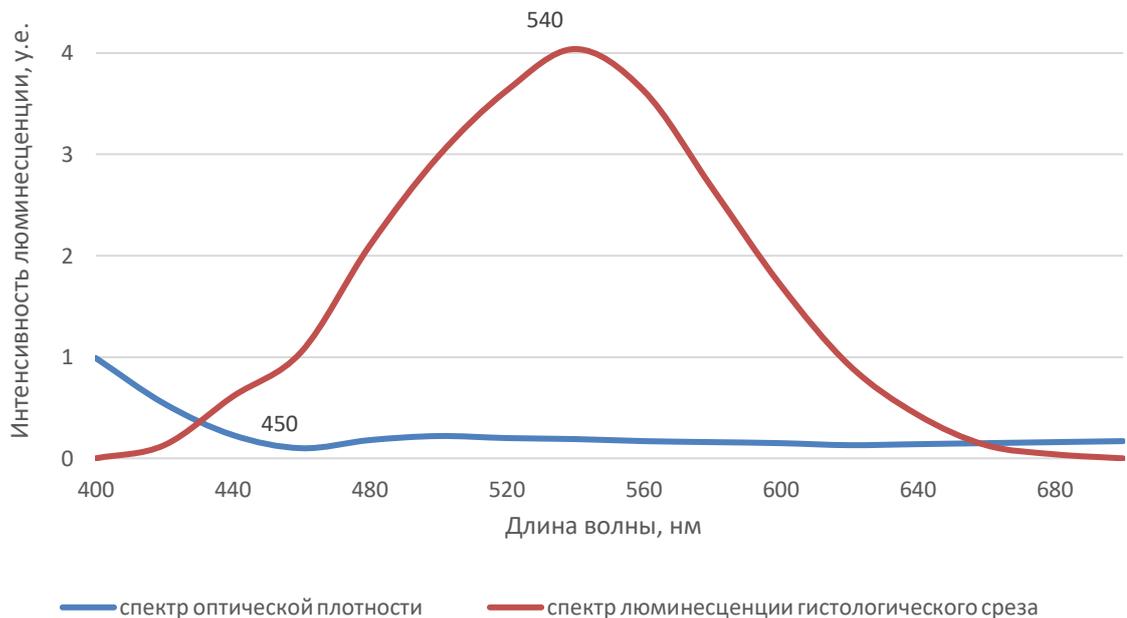


Рисунок 11 – Спектры оптической плотности и люминесценции гепатоцитов окрашенного ДХТАФ гистологического среза печени цыплят

Для определения длины волны, при которой вычисляли оптическую плотность фотометрируемого участка окрашенного гистологического среза печени, с него снимали спектр поглощения, а затем с участка, расположенного рядом со срезом, снимали спектр пропускания. С учетом полученных данных по формуле рассчитывали величину оптической плотности.

В спектре оптической плотности выявляли длину волны, при которой проходящий через фотометрируемый участок поток света практически не поглощался флуорохромом ДХТАФ и имел наименьшую величину. Длина волны, отвечающая этим требованиям, соответствовала 450 нм (рисунок 11),

поэтому величину оптической плотности при данной длине волны учитывали при расчете количественного содержания белков в условных единицах.

При этих же параметрах режима работы получали спектр люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм (рисунок 12) и его величину при длине волны, равной 540 нм, учитывали в качестве эталона при расчете количественного содержания белков в условных единицах.

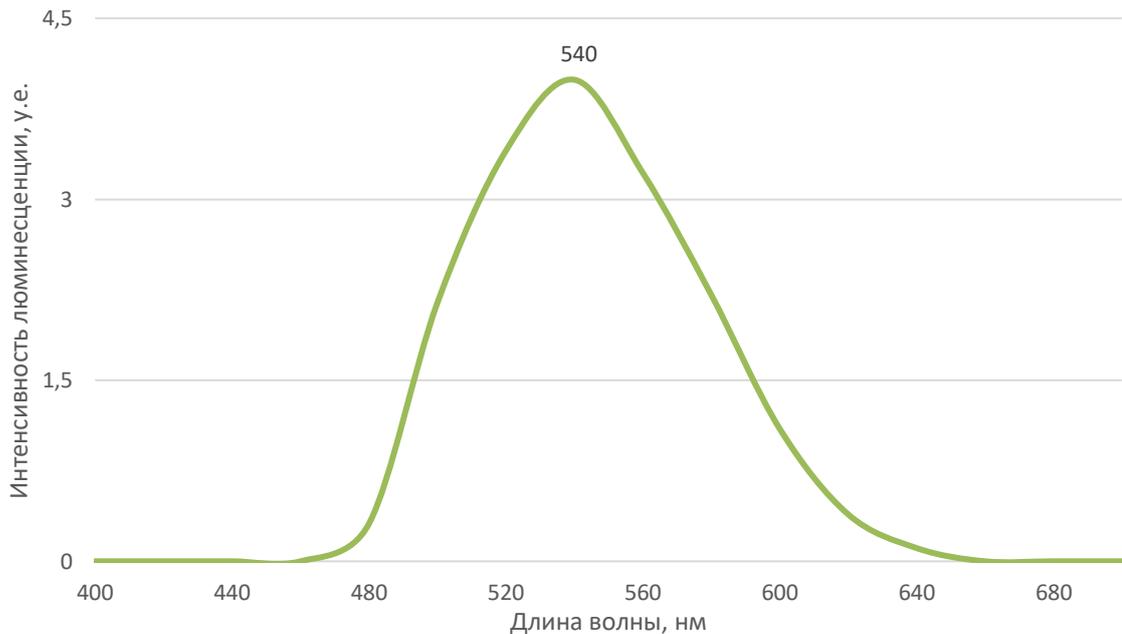


Рисунок 12 – Спектр люминесценции уранового стекла

С учетом полученных данных рассчитывали количество белков в условных единицах в исследуемом участке гистологического среза печени цыплят по следующей формуле (8):

$$I_B = \frac{I_n}{D_n \cdot I_3}, \quad (8)$$

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 ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

При сравнении результатов фотометрирования определенных структурных элементов одного и того же гистологического препарата было установлено, что при прочих равных условиях величина интенсивности люминесценции участков, имевших признаки аутолитического процесса, была ниже аналогичных показателей неизменной ткани (Акчурин С.В., 2013).

Для исключения фактора влияния аутолитического процесса на точность анализа при получении конечного результата во внимание принимали наибольшее из трех полученных значений фотометрирования трех участков, обладающих наибольшей интенсивностью люминесценции при визуальной микроскопии гистологического среза (Акчурин С.В., 2013). В каждом случае рассчитывали количество белков (в условных единицах) и наибольшее из трех полученных результатов принимали во внимание для решения поставленной задачи.

Разработанный одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа с применением флуорохрома дихлор-симм-триазиниламинофлуоросцеина-1 (ДХТАФ) использовали при изучении гепатоцитов в окрашенных гистологических срезах печени цыплят контрольной и опытных групп.

### **3.2.3 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 (Метод со Stains all)**

Одноволновые методы люминесцентного спектрального анализа, рассмотренные в разделах 3.2.1, 3.2.2, основаны на применении люминесцирующих меток-красителей (флуорохромов), обладающих способностью связываться с тем или иным определенным веществом и в то же время не оказывать влияние на

его функцию. При необходимости одновременного изучения соотношения различных компонентов клетки проводится подбор пары меток-красителей, обладающих способностью специфически связываться с каждым из выявляемых компонентов. Вместе с тем данную задачу можно решить с помощью одного люминесцентного красителя, метахроматические свойства которого позволяют связываться одновременно с различными органическими соединениями, образуя при этом комплексы с разным цветом люминесценции.

Метахромазия, выявляемая с помощью тиазиновых красителей, изменяющих окраску определенных структур от синего до красного цвета, уже с конца XIX века нашла широкое применение (Пирс Э., 1962). Позднее в гистохимии и молекулярной биологии стало использоваться соединение 4,5,4',5'-дибензо-3,3'-диэтил-9-метилтиакарбоцианинбромид (фирменное название «Stains all»), обладающее метахроматическими свойствами (Haag D., Tschahargane C., Goertler K., 1971). С помощью данного красителя изучались особенности строения акриламидных гелевых столбиков, белки которых имели красный, ДНК – синий, РНК – розовый, а кислые мукополисахариды – голубой цвет (Dahlberg A.E., Dingenon C.W., Peacock A.C., 1969).

Возможность использования «Stains all» в качестве люминесцентного метахроматического красителя была показана В.Н. Карнауховым, который изучал окрашенные данным красителем гистологические срезы ткани головного мозга крысы и установил, что «Stains all» обладает достаточно яркой метахроматической люминесценцией (Карнаухов В.Н., 2002).

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 ортоксилола, 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 (дистрендидбутилфталатксилол).

Для исключения возможного влияния люминесценции, возникающей в тканях вследствие фиксации формалином белков, содержащих амино-, имино- и амидогруппы (Пирс Э., 1962), изучали спектр люминесценции неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка. Визуальное исследование особенностей люминесценции неокрашенных гистопрепаратов показало, что гистологический срез обладает сине-зеленым свечением. При этом в спектре люминесценции покровного эпителия и эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки максимум интенсивности люминесценции соответствовал длине волны, равной 484 нм (рисунки 13, 15). А в спектре люминесценции клеток соединительной ткани подслизистой основы и серозной оболочки – 480 нм (рисунки 14, 16).

В окрашенных «Stains all» гистологических срезах железистого желудка наблюдали своеобразную люминесцентно-микроскопическую картину, характеризующуюся сочетанием синего, зеленоватого и малиново-красного цветов, с разной степенью выраженности на различных участках (рисунки 17, 18). Обнаруживаемая визуально в гистологических срезах люминесценция указывала на локализацию нуклеиновых кислот и белков, связанных с флуорохромом (Ларионов С.В., Акчурин С.В., 2012).

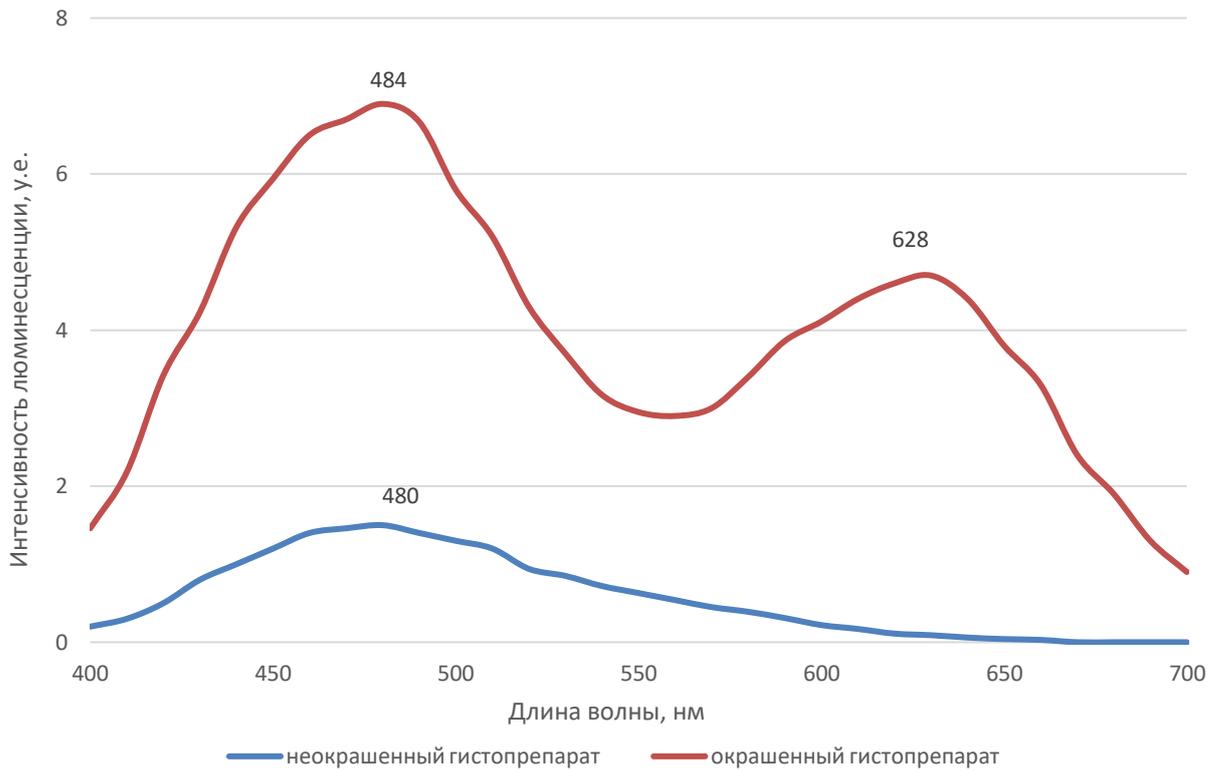


Рисунок 13 – Спектры люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят

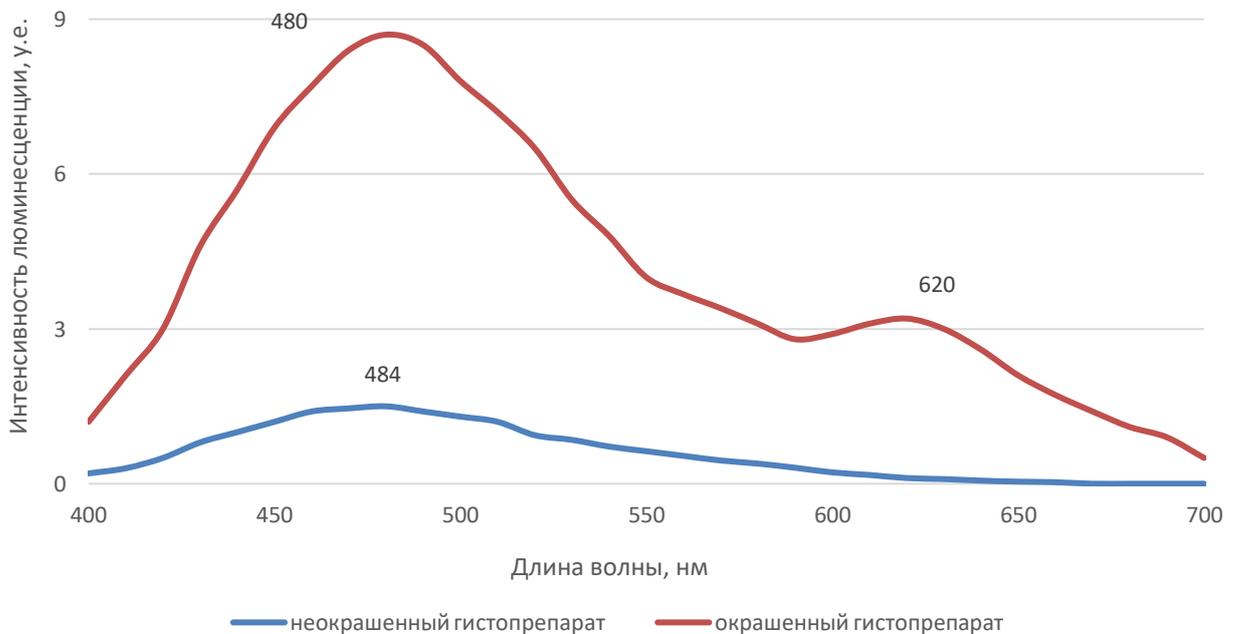


Рисунок 14 – Спектры люминесценции клеток соединительной ткани подслизистой основы неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят

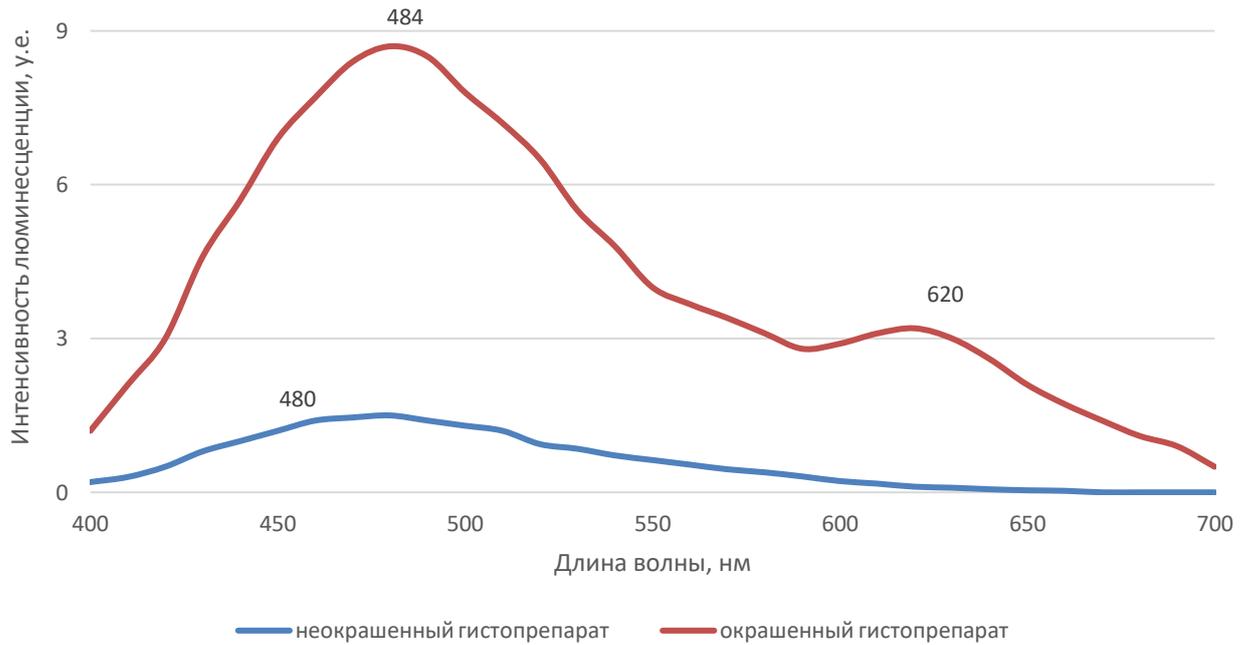


Рисунок 15 – Спектры люминесценции эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят

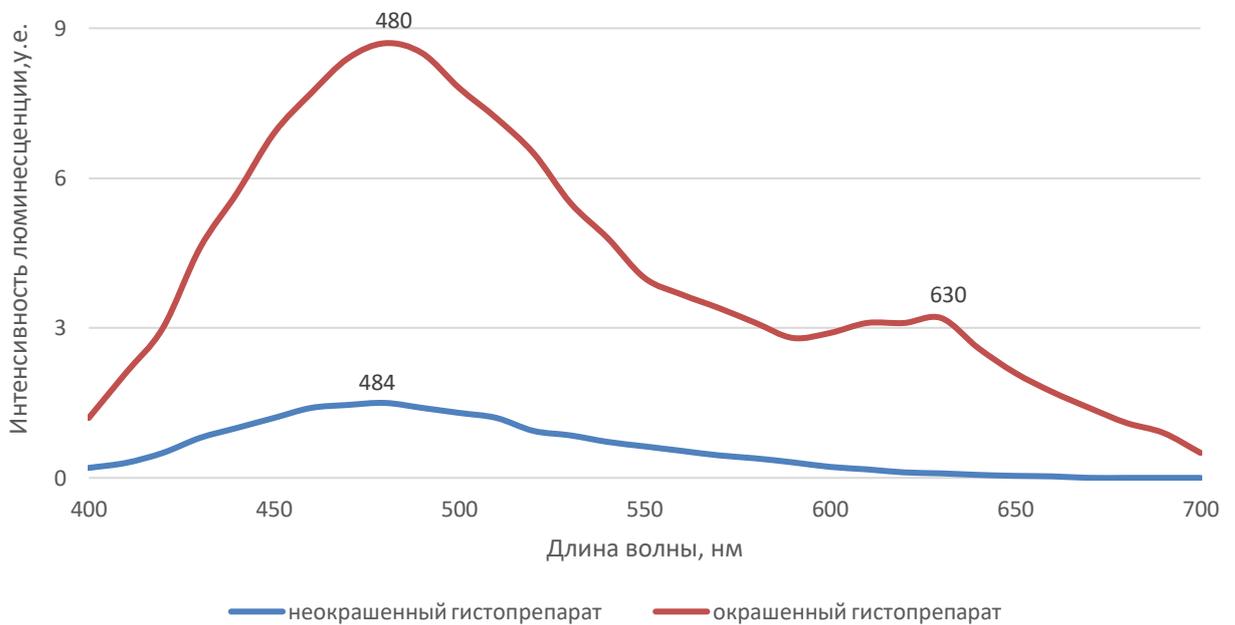


Рисунок 16 – Спектры люминесценции клеток серозной оболочки неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят

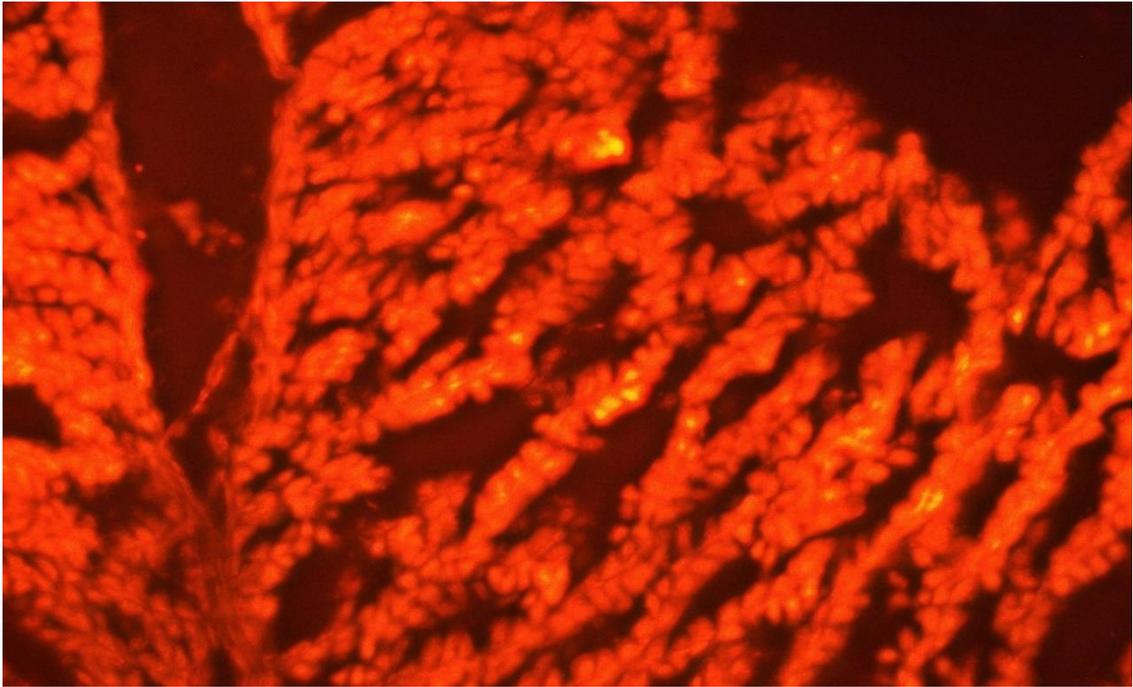


Рисунок 17 – Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция при длине волны 620 нм окрашенного Stains all гистологического среза. Ув. X 200

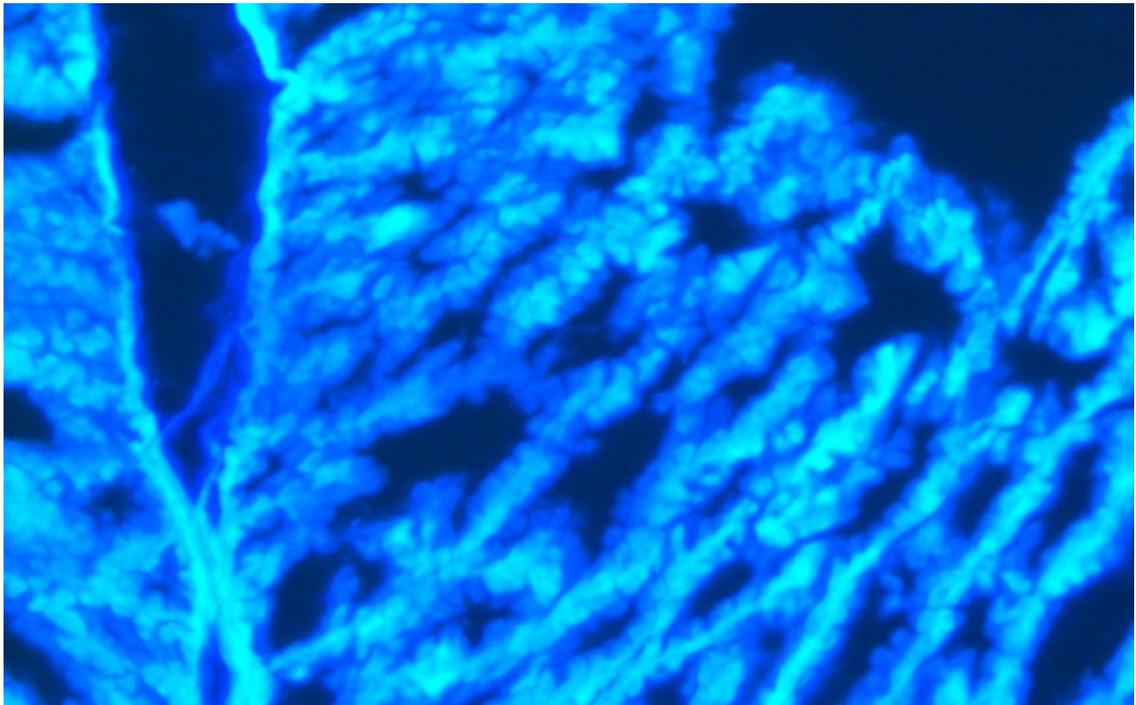


Рисунок 18 – Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция при длине волны 480 нм окрашенного Stains all гистологического среза. Ув. X 200

В спектре люминесценции окрашенных гистопрепаратов всех фотометрируемых участков регистрировали по две полосы максимума излучения. В спектре люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки – при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) (рисунок 13). В спектре люминесценции клеток соединительной ткани подслизистой основы – 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) (рисунок 14). В спектре люминесценции клеток эпителия альвеолярных желез – 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) (рисунок 15). В спектре люминесценции клеток серозной оболочки – 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) (рисунок 16).

Сравнение максимумов в спектрах люминесценции неокрашенных (480 и 484 нм) и окрашенных (620, 628 и 630 нм) гистопрепаратов железистого желудка показало, что они отстоят в пределах, допускающих отдельную регистрацию интенсивностей люминесценции ( $> 60-100$  нм) (Карнаухов В.Н., 2002). Кроме того, было отмечено совпадение максимумов люминесценции неокрашенных и окрашенных «Stains all» гистологических срезов при длинах волн 480 нм и 484 нм. Учитывая, что интенсивность люминесценции неокрашенного гистопрепарата при данных длинах волн является величиной постоянной и в значительной мере меньшей интенсивности люминесценции окрашенного среза, сочли возможным использовать эти длины волн при определении соотношения органических веществ.

Таким образом, при расчете коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в покровном эпителии слизистой оболочки учитывали длины волн 484 нм и 628 нм (рисунок 13), в клетках соединительной ткани подслизистой основы – 480 нм и 620 нм (рисунок 14), в эпителии альвеолярных желез – 484 нм и 620 нм (рисунок 15), а в клетках серозной оболочки – 480 нм и 630 нм соответственно (рисунок 16).

Поскольку величина интенсивности люминесценции гистопрепаратов в процессе проведения исследования колебалась в очень больших пределах и требовала изменения параметров режима работы, для получения сопоставимых результатов был применен эталон, что позволило рассчитывать количество

органических веществ в условных единицах. В качестве эталона была использована максимальная величина интенсивности люминесценции промышленно изготовленного уранового стекла ЖС-19 толщиной 1,5 мм, спектр люминесценции которого получали при этих же параметрах режима (рисунок 9). Его величину при длине волны, равной 540 нм, учитывали в качестве эталона при расчете коэффициентов соотношений органических веществ (Акчурин С.В., 2020).

Для исключения фактора влияния аутолического процесса на интенсивность люминесценции проводили фотометрирование трех участков в каждом исследуемом объекте (покровном эпителии слизистой оболочки, эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки, клетках соединительной ткани подслизистой основы и мезотелии серозной оболочки), обладающих наибольшей интенсивностью люминесценции при визуальной микроскопии гистологического среза. Рассчитывали количество нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) с учетом эталона и для определения коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков принимали во внимание наибольшее из трех полученных результатов по каждому органическому веществу.

Определение коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков в покровном эпителии слизистой оболочки железистого желудка устанавливали в следующем порядке.

Проводили фотометрирование трех участков покровного эпителия слизистой оболочки, в каждом из которых рассчитывали количество нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах).

Количество нуклеиновых кислот (в условных единицах) в покровном эпителии слизистой оболочки устанавливали по формуле (9):

$$X_p = \frac{I_n}{I_s}, \quad (9)$$

где  $X_p$  – количество нуклеиновых кислот в исследуемом участке покровного эпителия слизистой оболочки;

$I_n$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка покровного эпителия слизистой оболочки при длине волны 484 нм;

$I_{\text{Э}}$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Количество белков (в условных единицах) в покровном эпителии слизистой оболочки рассчитывали по формуле (10):

$$Y_p = \frac{I_B}{I_{\text{Э}}}, \quad (10)$$

где  $Y_p$  – количество белков в исследуемом участке покровного эпителия слизистой оболочки в условных единицах;

$I_B$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка покровного эпителия слизистой оболочки при длине волны 628 нм;

$I_{\text{Э}}$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в покровном эпителии слизистой оболочки рассчитывали, принимая во внимание наибольшее из трех полученных значений  $X_p$  и  $Y_p$  по формуле (11):

$$K_p = \frac{X_{pmax}}{Y_{pmax}}, \quad (11)$$

где  $K_p$  – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в покровном эпителии слизистой оболочки в условных единицах;

$X_{pmax}$  – наибольшее количество нуклеиновых кислот в условных единицах из трех исследуемых участков покровного эпителия слизистой оболочки;

$Y_{pmax}$  – наибольшее количество белков в условных единицах из трех исследуемых участков покровного эпителия слизистой оболочки.

Определение коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка устанавливали в следующем порядке.

Проводили фотометрирование трех участков соединительной ткани подслизистой основы, в каждом из которых рассчитывали количество нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах).

Количество нуклеиновых кислот (в условных единицах) в клетках соединительной ткани подслизистой основы устанавливали по формуле (12):

$$X_m = \frac{I_n}{I_9}, \quad (12)$$

где  $X_m$  – количество нуклеиновых кислот в исследуемом участке формулы соединительной ткани подслизистой основы в условных единицах;

$I_n$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка соединительной ткани подслизистой основы при длине волны 480 нм;

$I_9$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Количество белков (в условных единицах) в клетках соединительной ткани подслизистой основы рассчитывали по формуле (13):

$$Y_m = \frac{I_B}{I_9}, \quad (13)$$

где  $Y_m$  – количество белков в исследуемом участке соединительной ткани подслизистой основы в условных единицах;

$I_B$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка соединительной ткани подслизистой основы при длине волны 620 нм;

$I_9$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках соединительной ткани подслизистой основы рассчитывали, принимая во внимание наибольшее из трех полученных значений  $X_m$  и  $Y_m$ , по следующей формуле (14):

$$K_m = \frac{X_{mmax}}{Y_{mmax}}, \quad (14)$$

где  $K_m$  – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках соединительной ткани подслизистой основы в условных единицах;

$X_{m\ max}$  – наибольшее количество нуклеиновых кислот в условных единицах из трех исследуемых участков соединительной ткани подслизистой основы;

$Y_{m\ max}$  – наибольшее количество белков в условных единицах из трех исследуемых участков соединительной ткани подслизистой основы.

Определение коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка устанавливали в следующем порядке.

Проводили фотометрирование трех участков эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, в каждом из которых рассчитывали количество нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах).

Количество нуклеиновых кислот (в условных единицах) в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки устанавливали по формуле (15):

$$X_a = \frac{I_n}{I_s}, \quad (15)$$

где  $X_a$  – количество нуклеиновых кислот в исследуемом участке эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки в условных единицах;

$I_n$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки при длине волны 484 нм;

$I_s$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Количество белков (в условных единицах) в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки рассчитывали по формуле (16):

$$Y_a = \frac{I_B}{I_s}, \quad (16)$$

где  $Y_a$  – количество белков в исследуемом участке эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки в условных единицах;

$I_B$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки при длине волны 620 нм;

$I_s$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки рассчитывали, принимая во внимание наибольшее из трех полученных значений  $X_a$  и  $Y_a$ , по следующей формуле (17):

$$K_a = \frac{X_{amax}}{Y_{amax}}, \quad (17)$$

где  $K_a$  – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки в условных единицах;

$X_{amax}$  – наибольшее количество нуклеиновых кислот в условных единицах из трех исследуемых участков эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки;

$Y_{amax}$  – наибольшее количество белков в условных единицах из трех исследуемых участков эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки.

Определение коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках серозной оболочки железистого желудка устанавливали в следующем порядке.

Проводили фотометрирование трех участков серозной оболочки, в каждом из которых рассчитывали количество нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах).

Количество нуклеиновых кислот (в условных единицах) в клетках серозной оболочки устанавливали по формуле (18):

$$X_s = \frac{I_n}{I_0}, \quad (18)$$

где  $X_s$  – количество нуклеиновых кислот в исследуемом участке серозной оболочки в условных единицах;

$I_n$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка серозной оболочки при длине волны 480 нм;

$I_0$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Количество белков (в условных единицах) в клетках серозной оболочки рассчитывали по формуле (19):

$$Y_s = \frac{I_B}{I_s}, \quad (19)$$

где  $Y_s$  – количество белков в исследуемом участке серозной оболочки в условных единицах;

$I_B$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка серозной оболочки при длине волны 630 нм;

$I_s$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках серозной оболочки рассчитывали, принимая во внимание наибольшее из трех полученных значений  $X_s$  и  $Y_s$  по следующей формуле (20):

$$K_s = \frac{X_{smax}}{Y_{smax}}, \quad (20)$$

где  $K_s$  – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках серозной оболочки в условных единицах;

$X_{smax}$  – наибольшее количество нуклеиновых кислот в условных единицах из трех исследуемых участков серозной оболочки;

$Y_{smax}$  – наибольшее количество белков в условных единицах из трех исследуемых участков серозной оболочки.

Разработанный метод люминесцентного спектрального анализа с использованием люминесцентного метахроматического красителя «Stains all» использовали при изучении клеток (покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клеток соединительной ткани подслизистой основы и мезотелия серозной оболочки) в окрашенных гистологических срезах железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп.

### **3.2.4 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» (Модификация метода со Stains all)**

В основе данного метода лежит определение коэффициентов соотношений органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки в окрашенных люминесцентным метахроматическим красителем «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят по методу, изложенному в разделе 3.2.3, с последующим установлением степени изменения функционального состояния клеток и тканей.

Оценку функционального состояния клеток железистого желудка цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, проводили по изменениям показателей коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках эпителиа альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной и опытной групп.

Первоначально определяли коэффициенты соотношения нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка цыплят интактной группы. Для этого при помощи визуальной микроскопии находили в окрашенном гистопрепарате зону эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки и проводили фотометрию трех участков с наибольшей степенью интенсивности люминесценции. В полученных спектрах люминесценции исследуемых участков отмечали две полосы излучения метахроматического красителя «Stains all», которые имели максимальную величину интенсивности люминесценции. Данные величины регистрировали при длинах волн, равных 484 и 620 нм, и использовали их для выявления нуклеиновых кислот и белков соответственно.

Для получения сопоставимых результатов количественного содержания нуклеиновых кислот и белков выражали их в условных единицах с помощью эталона. Для этого снимали при аналогичных параметрах режима работы

спектр люминесценции с промышленно изготавливаемого уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм, имеющего постоянный спектр люминесценции. В спектре его люминесценции определяли величину интенсивности люминесценции при длине волны 540 нм, которую и использовали качестве эталона.

Таким образом, количество нуклеиновых кислот в условных единицах в каждом участке зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки рассчитывали по формуле (21):

$$X = \frac{I_n}{I_s}, \quad (21)$$

где  $X$  – количество нуклеиновых кислот в исследуемом участке зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки в условных единицах;

$I_n$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки при длине волны 484 нм;

$I_s$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Количество белков в условных единицах в каждом участке зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки рассчитывали по формуле (22):

$$Y = \frac{I_B}{I_s}, \quad (22)$$

где  $Y$  – количество белков в условных единицах в исследуемом участке зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки в условных единицах;

$I_B$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки при длине волны 620 нм;

$I_s$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Развитие аутолитического процесса уменьшает интенсивность люминесценции и, соответственно, снижает показатель количественного содержания органических веществ при прочих равных условиях. Для исключения влияния аутолиза на изменение количественного содержания нуклеиновых кислот и белков при расчете коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков принимали во внимание наибольшее значение из трех полученных по каждому из них результатов.

Поэтому коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в зоне эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка птиц контрольной группы рассчитывали по формуле (23):

$$\lambda_1 = \frac{X_{max}}{Y_{max}}, \quad (23)$$

где  $\lambda_1$  – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в зоне эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка птиц контрольной группы;

$X_{max}$  – наибольшее количество нуклеиновых кислот в условных единицах из трех исследуемых участков зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки;

$Y_{max}$  – наибольшее количество белков в условных единицах из трех исследуемых участков зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2016; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2017; Акчурин С.В., 2020).

Коэффициенты соотношения нуклеиновых кислот и белков в зоне эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки устанавливали в контрольной группе.

Аналогичным способом получали спектр люминесценции уранового стекла и окрашенного специфической метакроматической люминесцентной меткой-красителем «Stains all» гистологического среза стенки железистого желудка цыплят опытной группы.

Рассчитывали количество нуклеиновых кислот (в условных единицах) в трех исследуемых участках зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки, каждое из которых устанавливали по формуле (21) при помощи следующих величин (где  $X_o$ » подставляли в формулу вместо « $X$ », « $I_{no}$ » – вместо « $I_n$ »):

$X_o$  – количество нуклеиновых кислот в условных единицах в исследуемом участке зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки;

$I_{no}$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки при длине волны 484 нм;

$I_9$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона (Акчурин С.В., 2020).

Устанавливали наибольшее количество нуклеиновых кислот в условных единицах из трех участков зоны интереса  $X_{o\max}$ .

Затем рассчитывали количество белков в условных единицах в трех исследуемых участках зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки, каждое из которых определяли по формуле (22) при помощи следующих величин (где « $Y_o$ » подставляли в формулу вместо « $Y$ », « $I_{vo}$ » – вместо « $I_v$ »):

где  $Y_o$  – количество белков в условных единицах в исследуемом участке зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки;

$I_{vo}$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки при длине волны 620 нм;

$I_9$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона (Акчурин С.В., 2020).

Устанавливали наибольшее количество белков в условных единицах из трех участков зоны эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки  $Y_{\text{max}}$ .

После чего рассчитывали коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в зоне эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки по формуле (23) (где « $\lambda_2$ » подставляли вместо « $\lambda_1$ », « $X_{\text{max}}$ » вместо « $X_{\text{max}}$ », « $Y_{\text{max}}$ » вместо « $Y_{\text{max}}$ ») при помощи следующих величин:

где  $\lambda_2$  – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в зоне эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка обследуемой птицы;

$X_{\text{max}}$  – наибольшее количество нуклеиновых кислот в условных единицах в зоне эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки;

$Y_{\text{max}}$  – наибольшее количество белков в условных единицах в зоне эпителиальных клеток альвеолярных желез слизистой оболочки.

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 (24):

$$C = \lambda_1 - \lambda_2, \quad (24)$$

где  $C$  – показатель функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка птиц опытной группы;

$\lambda_1$  – коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы;

$\lambda_2$  – 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  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  при исследовании птиц одной породы и одинакового возраста.

С помощью разработанного метода выявляли изменения функционального состояния клеток железистого желудка цыплят в ранние сроки заболевания клебсиеллезом и проведения антибиотикотерапии.

### **3.2.5 Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа для оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта птиц по количественному содержанию нуклеиновых кислот и белков с применением флуорохромов «Этидиум бромид» и «ДХТАФ» при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза (Метод с этидиумом бромида и ДХТАФ)**

В качестве люминесцентной метки-красителя на нуклеиновые кислоты был выбран этидиум бромида, а в качестве маркера белков – ДХТАФ.

Для исследований использовали флуоресцентные красители: этидиум бромида (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 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) (Акчурин С.В., 2020).

При визуальном исследовании гистопрепаратов наблюдали на общем сине-зеленом свечении участки малиново-красного цвета, наиболее выраженные в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка. Обнаруживаемая в гистологических срезах малиново-красная люминесценция указывала на локализацию нуклеиновых кислот, связанных с этидиумом бромида (рисунок 19), а сине-зеленая – на локализацию белков, связанных с ДХТАФ (рисунок 20).

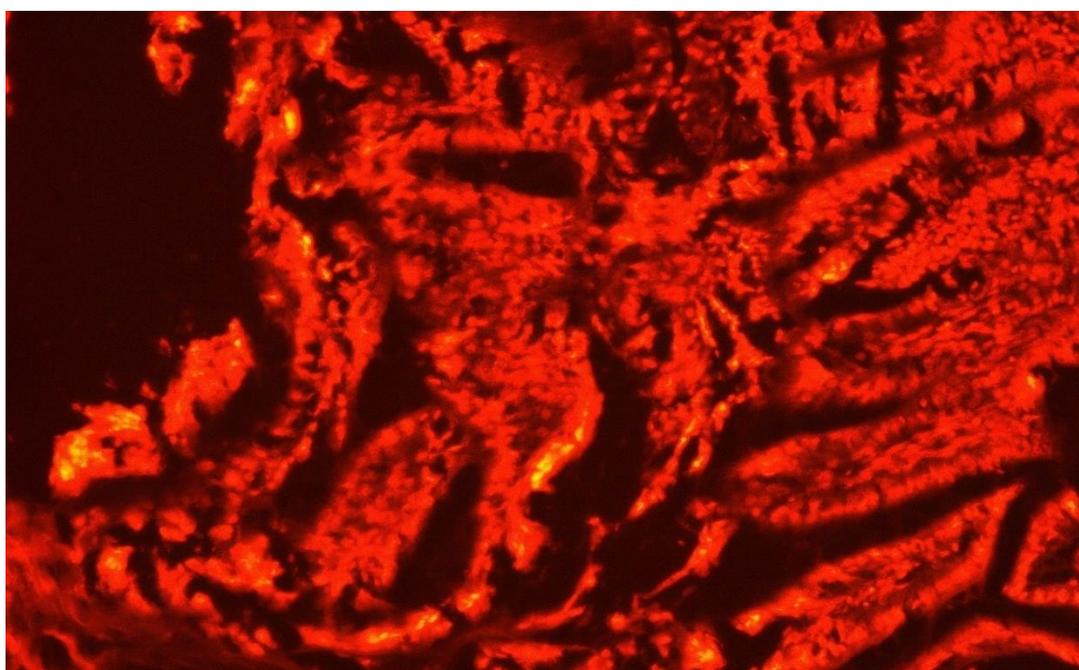


Рисунок 19 – Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция при длине волны 624 нм окрашенного этидиумом бромида и ДХТАФ гистологического среза. Ув. X 200

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 (Акчурин С.В., 2014).

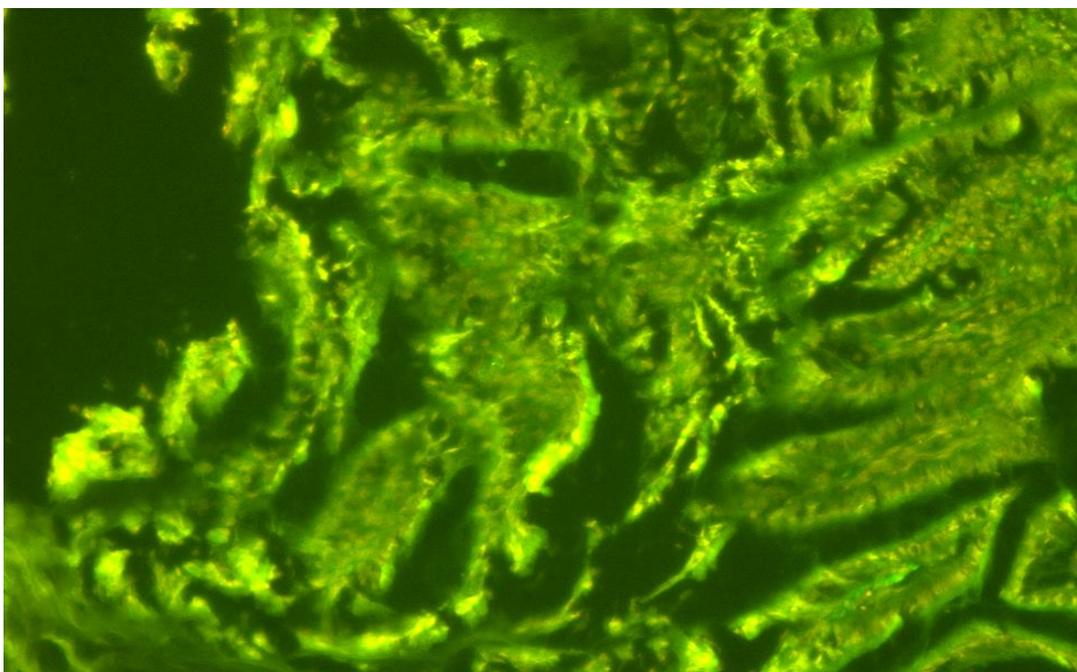


Рисунок 20 – Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция при длине волны 528 нм окрашенного этидиумом бромаида и ДХТАФ гистологического среза. Ув. X 200

При использовании в качестве меток-красителей ДХТАФ, количественно связывающегося с белком, и этидиума бромаида, количественно связывающегося с нуклеиновыми кислотами, в спектре люминесценции определяют две полосы излучения, которые соответствуют концентрации (количеству) белков и нуклеиновых кислот в исследуемом объекте. При окрашивании гистологических срезов железистого желудка птиц метками-красителями ДХТАФ и этидиумом бромаида в спектре люминесценции зоны эпителия альвеолярных желез его слизистой оболочки максимальные величины интенсивности люминесценции регистрируются при длинах волн – 528 нм, которая соответствует концентрации белков, и 624 нм, которая соответствует концентрации нуклеиновых кислот (Акчурин С.В., 2014). 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 (рисунок 21) и опытной (рисунок 22) групп (Акчурин С.В., 2014).

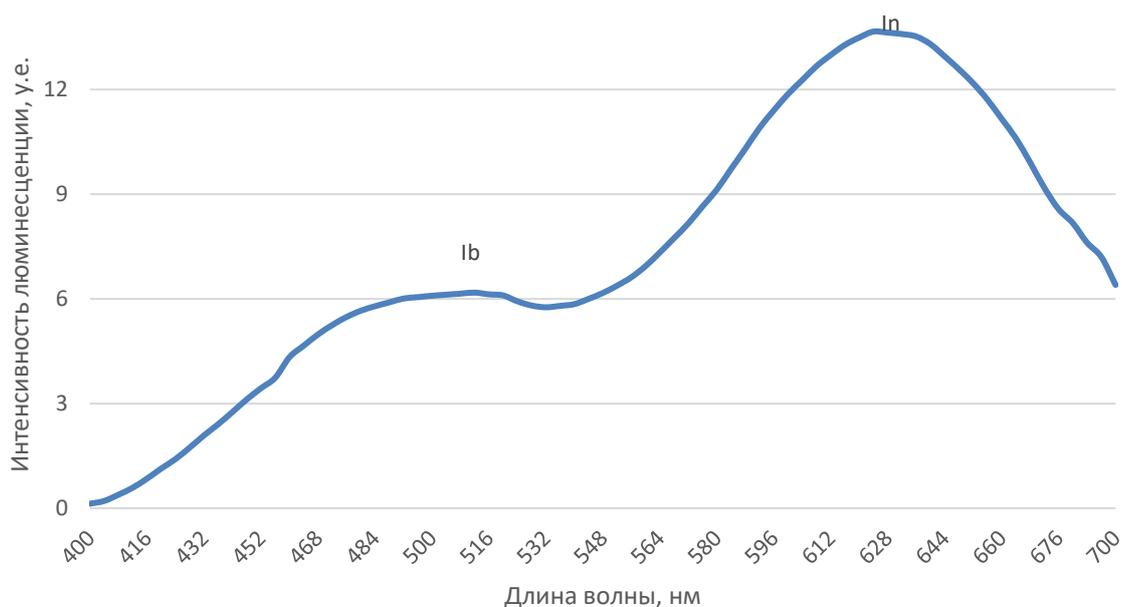


Рисунок 21 – Спектр люминесценции зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы

Вместе с тем величина интенсивности люминесценции зависит не только от количества содержащихся в исследуемом участке органических веществ, но и от толщины фотометрируемого участка гистологического среза, которая является неравномерной, и от параметров режима работы, при котором регистрируют спектры люминесценции.

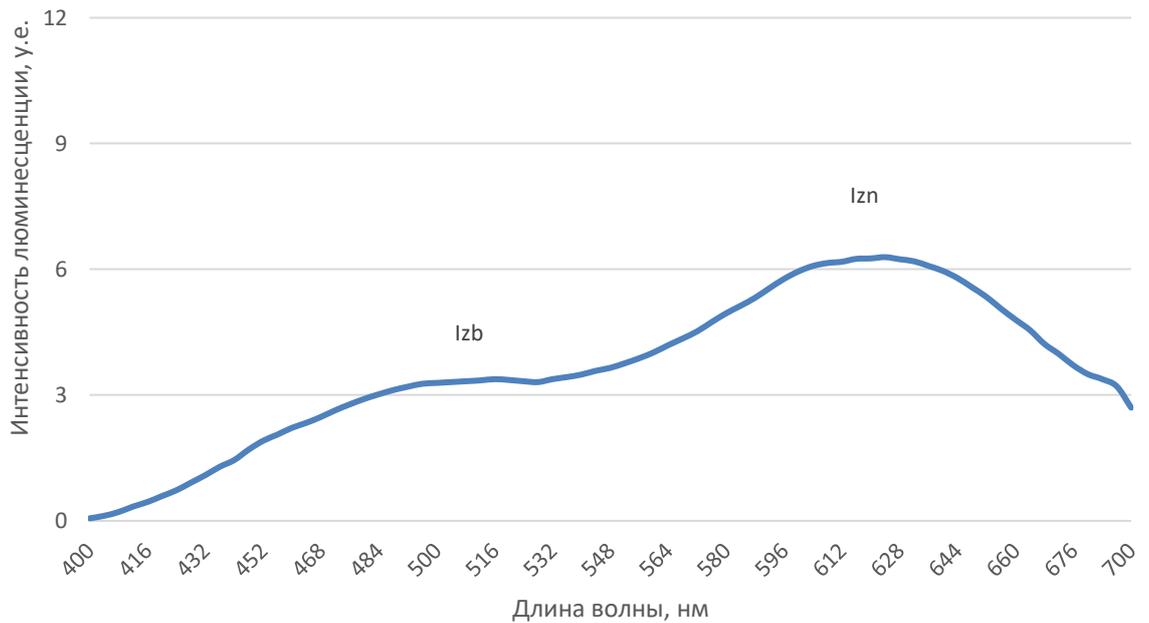


Рисунок 22 – Спектр люминесценции зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы

Поэтому 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 (Акчурин С.В., 2014). В качестве эталона использовали величину интенсивности люминесценции при длине волны 540 нм промышленно изготавливаемого и имеющего постоянный спектр люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм.

Количество белков в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки рассчитывали по формуле (25):

$$B = \frac{I_b}{D \cdot \mathcal{E}}, \quad (25)$$

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 ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Количество нуклеиновых кислот в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят рассчитывали по формуле (26):

$$N = \frac{I_n}{D \cdot \mathcal{E}}, \quad (26)$$

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 ЖС-19 толщиной ~1,5 мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона.

Учитывая, что биологические объекты имеют индивидуальные особенности функционального состояния клеток, расположенных на разных участках определенных структурных зон, обусловленного неравнозначным количеством содержанием в них органических веществ, для получения

объективной картины необходимо определение среднего значения нескольких показателей содержания органических веществ, полученных с различных участков зоны определенной структуры при прочих равных условиях (Акчурин С.В., 2014). Поэтому для исключения влияния индивидуальных особенностей функционального состояния клеток на объективное отражение количественного содержания белков и нуклеиновых кислот в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки принимали во внимание среднее значение от общего количества данных органических веществ из пяти полученных результатов. В связи с этим среднее значение количества белков в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят рассчитывали по формуле (27):

$$B_c = \frac{1}{5} \sum_{n=1}^5 B_n, \quad (27)$$

где  $B_c$  – среднее значение количества белков в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят, у.е.;

$B_n$  – 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 (Акчурин С.В., 2014).

Среднее значение количества нуклеиновых кислот в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят рассчитывали по формуле (28):

$$N_c = \frac{1}{5} \sum_{n=1}^5 N_n, \quad (28)$$

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

$N_n$  – 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.

Полученные средние значения количества белков и нуклеиновых кислот в условных единицах зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы использовали для оценки функционального состояния клеток при проведении фармакотерапии.

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 следующим образом (Акчурин С.В., 2020).

На спектре оптической плотности устанавливали величину  $D_z$  при длине волны 648 нм (« $D_z$ » подставляли в формулу вместо « $D$ »). Рассчитывали количество белков в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, каждое из которых устанавливали по формуле (25) (где « $B_z$ » подставляли в формулу вместо « $B$ », « $I_{zb}$ » – вместо « $I_b$ », « $D_z$ » – вместо « $D$ », « $\mathcal{E}_z$ » – вместо « $\mathcal{E}$ ») при помощи следующих величин:

$B_z$  – количество белков в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят;

$I_{zb}$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки при длине волны 528 нм железистого желудка цыплят;

$D_z$  – величина оптической плотности фотометрируемого участка при длине волны 648 нм, используемая в качестве его толщины;

$\mathcal{E}_z$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона (Акчурин С.В., 2020).

Для исключения влияния индивидуальных особенностей функционального состояния клеток на объективное отражение количественного содержания белков в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки принимали во внимание среднее значение от общего количества данных органических веществ из пяти полученных результатов.

Устанавливали среднее значение количества белков в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, по формуле (27) (где « $B_{zc}$ » подставляли в формулу вместо « $B_c$ », « $B_{zn}$ » – вместо « $B_n$ ») при помощи следующих величин:

$B_{zc}$  – среднее значение количества белков в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят;

$B_{zn}$  – 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 (Акчурин С.В., 2020).

Рассчитывали количество нуклеиновых кислот в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят, каждое из которых устанавливают по формуле (26) при помощи следующих величин (где « $N_z$ » подставляют в формулу вместо « $N$ », « $I_{zn}$ » – вместо « $I_n$ », « $D_z$ » – вместо « $D$ », « $\mathcal{E}_z$ » – вместо « $\mathcal{E}$ »):

$N_z$  – количество нуклеиновых кислот в условных единицах в каждом из трех участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят;

$I_n$  – величина интенсивности люминесценции исследуемого участка зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят при длине волны 624 нм;

$D_z$  – величина оптической плотности фотометрируемого участка при длине волны 648 нм, используемая в качестве его толщины;

$\mathcal{E}_z$  – величина интенсивности люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм при длине волны 540 нм, используемая в качестве эталона (Акчурин С.В., 2020).

Для исключения влияния индивидуальных особенностей функционального состояния клеток на объективное отражение количественного содержания нуклеиновых кислот в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки принимали во внимание среднее значение от общего количества данных органических веществ из пяти полученных результатов.

Устанавливали среднее значение количества нуклеиновых кислот в условных единицах в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят по формуле (28) при помощи следующих величин (где « $N_{zc}$ » подставляют в формулу вместо « $N_c$ », « $N_{zn}$ » – вместо « $N_n$ »):

где  $N_{zc}$  – среднее значение количества нуклеиновых кислот в зоне эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят, у.е.;

$N_{zn}$  – 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 (Акчурин С.В., 2014).

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

$Kb$  – 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;

$B_{zc}$  – 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 (29):

$$K_n = N_c - N_z, \quad (29)$$

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;

$N_z$  – 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.

Обязательными условиями данного метода являются одинаковые условия изготовления гистологических препаратов, обеспечение одинаковых параметров режима работы при получении спектров люминесценции и оптической плотности фотометрируемых участков зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, а также уранового стекла ЖС-19 толщиной  $\sim 1,5$  мм.

### **3.3 Сведения о функциональном состоянии клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальном заражении клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллёзом, полученные при экспериментальной апробации разработанных методов**

#### **3.3.1 Клиническая картина и основные патоморфологические изменения у цыплят при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза**

Гистологическая картина патоморфологических изменений представлена в приложении 8 (рисунки 50-59).

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 покрова 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 покрова матовый.

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

При гистологическом исследовании на пятые-шестые сутки после

заражения у цыплят обнаруживали отек собственной пластинки и подслизистой основы слизистой оболочки железистого желудка, соединительной ткани, окружающей ее глубокие железы, серозной оболочки, воспалительную инфильтрацию слизистой оболочки (рисунок 50). В некоторых гистопрепаратах выявляли единичные мелкие периваскулярные кровоизлияния в слизистой оболочке. В печени наблюдали дисконкомплексацию балочной структуры, гиперемию кровеносных сосудов (рисунок 51). К 7 суткам отек приобретал выраженный характер, множественные, различной формы и величины кровоизлияния выявляли во всех слоях слизистой оболочки железистого желудка, наблюдали дилатацию сосудов и явление стаза эритроцитов в их просвете. Описанная гистологическая картина с разной степенью выраженности сохранялась до 21 суток. В печени и почках фиксировали зернистую дистрофию клеток паренхимы. К 27 суткам после заражения в серозной оболочке выявляли отек. К 30 суткам признаки отека встречали лишь в единичных гистопрепаратах.

В результате проведенного эксперимента от клебсиеллеза пало 8 % цыплят.

У цыплят экспериментально зараженных **эшерихиозом** наблюдали следующую клиническую картину заболевания.

Во 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. Перьевой 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, перьевой покров матовый.

Паталогоанатомическая картина при экспериментальном воспроизведении эшерихиоза характеризовалась фибринозным перикардитом, перигепатитом, аэросаккулитами, серозно-катаральной пневмонией, острым катаральным воспалением железистого и мышечного желудков, токтоного 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. Гистологическая картина характеризовалась слизистой дистрофией покровного эпителия слизистой оболочки, десквамацией клеток эпителия, деструкцией глубоких альвеолярных желез, отеком и лимфоидной инфильтрацией подслизистого слоя слизистой оболочки. Сединительнотканые структуры собственной пластинки, подслизистой основы слизистой оболочки, а также ткани, окружающие альвеолярные железы, отечны и разволокнены (рисунок 52). При этом наиболее выраженные явления отека наблюдали на 4 и 6 сутки с момента заражения. В тонком кишечнике лимфоидная инфильтрация слизистой оболочки, отек собственной пластинки (рисунок 53). На 21 сутки жизни отек фиксировали в области подслизистой основы слизистой оболочки. К 30 суткам жизни признаки отека отсутствовали практически во всех исследуемых гистопрепаратах.

В гепатоцитах выявлялась зернистая дистрофия на 4 сутки после заражения, на 5 сутки в отдельных клетках отмечалось появление мелких вакуолей. К 8-10 суткам значительная часть гепатоцитов содержала вакуоли различной величины. Наблюдали дисконплексаию балочной структуры, гиперемию кровеносных сосудов, диффузная лимфоидная инфильтрация (рисунки 54, 55). Данная картина дистрофических изменений разной степени выраженности прослеживались вплоть до 15 суток жизни. Начиная с 21 суток картина дистрофических изменений сглаживалась.

Гибель цыплят от эшерихиоза составила 18 %.

При **сальмонеллезе** клинические признаки у цыплят наблюдали на

второй, третий дни после заражения у цыплят 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. Перьевой покров в области клоаки испачкан пометом. У некоторых цыплят наблюдали склеивание 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 цыпленка 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, гломерулонефритом.

При гистологическом исследовании в стенке железистого желудка цыплят на 3 сутки жизни отмечали отек в виде разволокнения и разрыхления соединительнотканых структур серозной оболочки, собственной пластинки и подслизистой основы слизистой оболочки, а также соединительной ткани, окружающей ее глубокие железы (Акчурин С.В., 2013). Наиболее выраженные явления отека наблюдали на 7 и 8 сутки жизни. На слизистой оболочке железистого желудка и тонкого отдела кишечника фиксировали лимфоидную инфильтрацию (рисунки 56, 57), отек подслизистого слоя толстого отдела кишечника. В тонком отделе кишечника отмечали отек подслизистой основы слизистой оболочки (рисунок 58). К 21 суткам отек выявлялся в основном в области подслизистой основы слизистой оболочки железистого желудка, а к 30 суткам

он отсутствовал практически во всех гистопрепаратах.

В гепатоцитах на 4 сутки жизни отмечали зернистую дистрофию, в последующем в отдельных клетках выявляли мелкие вакуоли, заполненные светло-красноватой жидкостью. К 8 суткам уже значительная часть клеток печени содержала вакуоли различной величины. При гистологическом исследовании в печени отмечали дисконкомплексацию балочной структуры, диффузную лимфоидную инфильтрацию (рисунок 59). Дистрофические изменения различной степени выраженности отмечали до 15 суток жизни цыплят. Начиная с 21 суток картина дистрофических изменений сглаживалась, структура органа при этом была сохранена.

Гибель цыплят при экспериментальном воспроизведении сальмонеллеза составила 24 %.

У цыплят контрольной группы отсутствовали клинические и патолого-анатомические признаки заболевания.

### **3.3.2 Продуктивные показатели интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом и сальмонеллезом**

Средняя масса тела цыплят, измеряемая на протяжении первого опыта, и среднесуточный прирост представлены в таблице 2 и на рисунке 23.

Масса тела цыплят контрольной группы на 30 сутки жизни составила  $300,4 \pm 9,51$  г. Значение показателя находится в пределах диапазона, установленного производителем племенного яйца данной породы птицы для возраста 30 дней (292 – 308 г.).

Масса тела цыплят опытных групп начала снижаться на вторую неделю эксперимента. К 30 дню данный показатель был ниже значений I контрольной группы на: I опытная группа – 25,0 %; II опытная группа – 31,6 %; III опытная группа – 27,1 %.

Таблица 2 – Масса тела цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, г.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
1	39,6±0,11	39,6±0,34	39,7±0,11	39,6±0,11
7	65,4±0,2	63,7±0,6	63,8±0,16	63,3±0,58
14	117,9±0,6	103,9±0,57***	100,5±0,8***	105±1,97***
21	191,4±1,28	158,8±2,61***	150,9±1,63***	155,9±1,59***
28	275,7±2,43	224,5±1,93***	209,6±2,12***	211±4,94***
30	300,4±9,51	240,3±3,42***	228,3±3,58***	236,4±4,54***
Среднесуточный прирост, г	8,6±0,31	6,6±0,11	6,2±0,12	6,5±0,15

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

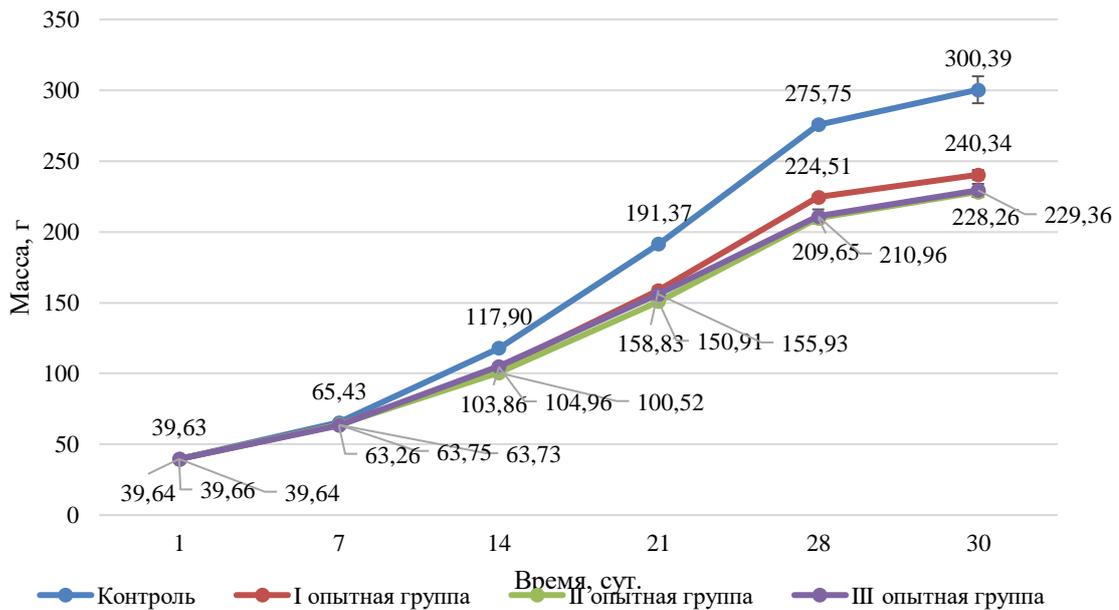


Рисунок 23 – Масса тела цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, г.

Среднесуточный прирост массы тела цыплят I контрольной группы с 1 по 30 сутки жизни составил  $8,6 \pm 0,31$  г., I опытной группы –  $6,6 \pm 0,11$  г., II опытной группы –  $6,2 \pm 0,12$  г., III опытной группы –  $6,5 \pm 0,15$  г. Вышеуказанный показатель был ниже у цыплят опытных групп в сравнении с I контрольной группой

на: I опытная группа – 23,3 %; II опытная группа – 27,9 %; III опытная группа 24,4 %.

### **3.3.3 Сведения о функциональном состоянии клеток и тканей железистого желудка цыплят, полученные Методом с этидиумом бромида**

Исследовали гистологические срезы железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп на 1-4, 6-8, 10, 15, 21 и 30 сутки их жизни.

При люминесцентно-микроскопическом исследовании окрашенных этидиумом бромида гистологических срезов железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп наблюдали на общем фоне сине-зеленого свечения ткани люминесценцию ярко-красного цвета с разной степенью интенсивности на различных участках слизистой, серозной оболочек и мышечного слоя. Наиболее выраженную – в эпителии слизистой оболочки и эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки, и наименее выраженную – в мышечном слое. Однако выявить какую-либо зависимость между колебаниями интенсивности люминесценции, отражающими динамику количественного содержания нуклеиновых кислот, с помощью визуальной микроскопии не удалось из-за отсутствия четких отличительных люминесцентно-микроскопических признаков.

С помощью разработанного микроспектрального метода с применением флуорохрома «Этидиум бромида» определяли количественное содержание нуклеиновых кислот в условных единицах в клетках покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки и мышечного слоя железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, и проводили оценку функционального состояния клеток органов желудочно-кишечного тракта цыплят по количественному содержанию нуклеиновых кислот.

Исследуемый материал брали от 15 цыплят каждой группы в указанные выше сроки. Для исключения фактора влияния аутолиза на интенсивность

люминесценции исследуемого объекта проводили фотометрирование трех участков, обладающих наибольшей интенсивностью люминесценции при визуальной микроскопии гистологического среза, в каждом из которых рассчитывали количество нуклеиновых кислот (в условных единицах) и для проведения анализа принимали во внимание наибольшее из трех полученных результатов. Всего произвели около 3000 измерений в исследуемых объектах.

Полученные результаты подвергали статистической обработке. Сведения о количестве нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  (в условных единицах) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп представлено в таблице 3, на рисунке 24.

Таблица 3 – Количественное содержание нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромидом, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
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 (\* -  $P \leq 0,05$ , \*\* -  $P \leq 0,01$ , \*\*\* -  $P \leq 0,001$ )

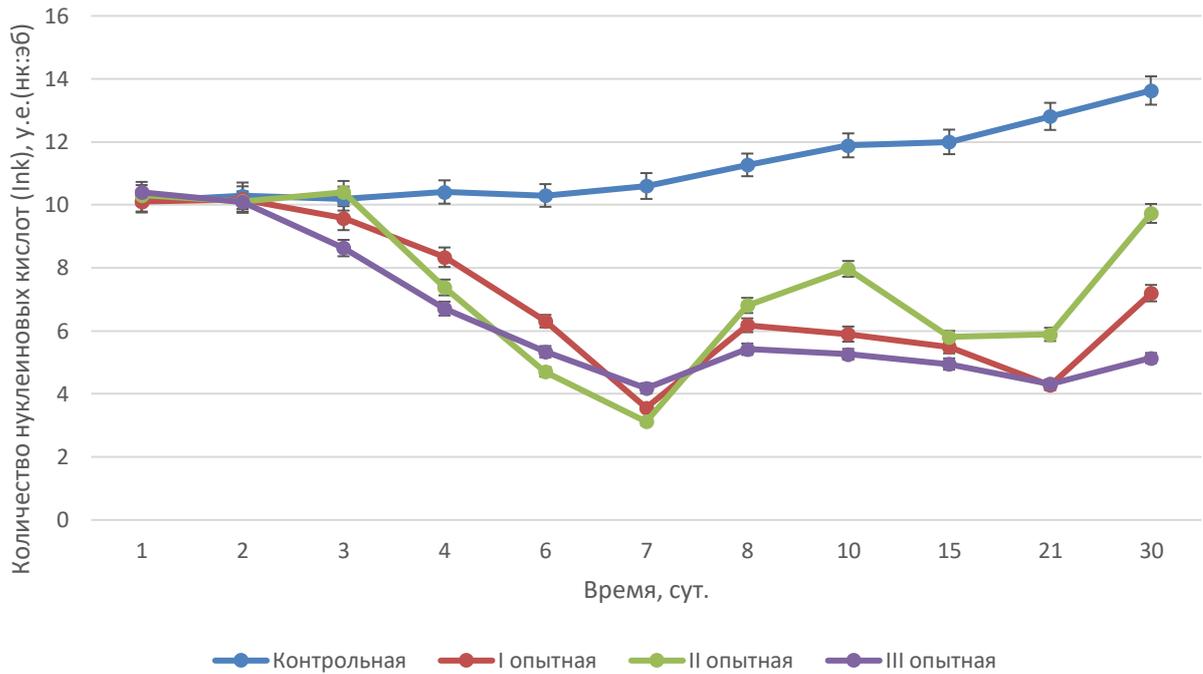


Рисунок 24 – Динамика количества нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромидом, у.е.

У цыплят I контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки количество нуклеиновых кислот в эпителии слизистой оболочки железистого желудка постепенно увеличивалось с  $10,12 \pm 0,36$  у.е. в первые сутки, до  $13,63 \pm 0,45$  у.е. на 30 сутки жизни. Функциональная активность клеток за указанный период возросла на 34,7 %.

Для цыплят опытных (I, II и III) групп было характерно снижение количества нуклеиновых кислот в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка, начиная с третьих (I, III группы) и четвертых (II группа) суток жизни. Минимальные значения показателя  $I_{НК}$  зафиксированы на 7 сутки жизни. С 8 по 30 сутки жизни отмечены периоды увеличения/уменьшения значений показателя  $I_{НК}$  в исследуемых клетках. К 30 суткам жизни количественное содержание нуклеиновых кислот в условных единицах в клетках эпителия железистого желудка цыплят опытных групп оставалось меньше

значений контрольной группы: в I опытной группе – на 47,2 %, во II опытной группе – на 28,6 %, в III опытной группе – на 62,3 %.

Количество нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  (в условных единицах) в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II и III) групп по данным метода с этидиумом бромида представлено в таблице 4, на рисунке 25.

Таблица 4 – Количественное содержание нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  (в условных единицах) в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромида, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
1	8,09±0,24	7,89±0,28	8,09±0,26	8,03±0,29
2	8,01±0,27	7,87±0,28	7,91±0,28	7,98±0,28
3	8,15±0,25	8,14±0,29	8,32±0,29	8,20±0,28
4	8,02±0,30	6,72±0,25***	7,22±0,28***	6,23±0,23***
6	8,33±0,29	4,04±0,17***	4,67±0,16***	3,57±0,12***
7	8,46±0,32	3,61±0,13***	4,11±0,15***	3,39±0,13***
8	8,83±0,31	4,11±0,13***	6,54±0,27***	3,96±0,12***
10	9,02±0,33	5,63±0,19***	7,35±0,26***	4,79±0,18***
15	9,34±0,35	5,27±0,19***	5,69±0,19***	4,49±0,16***
21	10,09±0,36	4,96±0,15***	5,21±0,18***	4,28±0,16***
30	10,55±0,35	6,25±0,20***	6,48±0,23***	5,37±0,17***

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

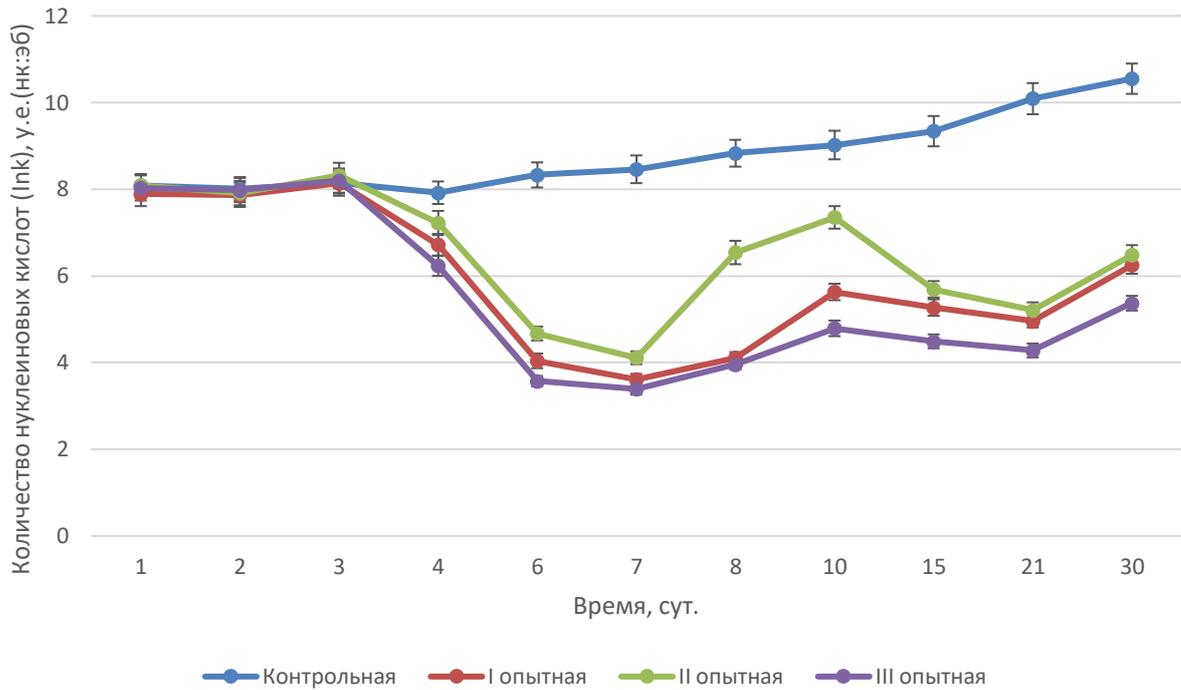


Рисунок 25 – Динамика нуклеиновых кислот  $I_{NK}$  в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромидом, у.е.

Как видно из таблицы 4, на рисунке 25 у цыплят I контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки количество нуклеиновых кислот в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка постепенно увеличивалось с  $8,09 \pm 0,24$  у.е. в первые сутки жизни до  $10,55 \pm 0,35$  у.е. в 30 сутки. Функциональная активность клеток за указанный период возросла на 30,4 %.

У цыплят опытных (I, II и III) групп была выявлена следующая общая картина изменения количества нуклеиновых кислот в исследуемых клетках: уменьшение значения показателя  $I_{NK}$  на 4, 6, 7, 15, 21 сутки жизни и его увеличение на 8, 10 и 30 сутки жизни. Минимальные значения показателя  $I_{NK}$  зафиксированы на 7 сутки жизни. К 30 суткам количественное содержание нуклеиновых кислот в условных единицах в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытных групп

оставалось меньше значений контрольной группы: в I опытной группе – на 40,8 %, во II опытной группе – на 38,6 %, в III опытной группе – на 49,1 %.

Сведения о содержании нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  (в условных единицах) в клетках мышечного слоя железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II и III) групп по данным метода с этидиумом бромидом представлены в таблице 5, на рисунке 26.

Таблица 5 – Количественное содержание нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  в клетках мышечного слоя железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромидом, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
1	6,23±0,22	6,30±0,24	6,12±0,25	6,35±0,22
2	6,39±0,23	6,35±0,19	6,09±0,19	6,37±0,21
3	6,46±0,20	5,30±0,18***	6,26±0,18***	5,31±0,20***
4	6,60±0,23	4,34±0,16***	4,31±0,13***	3,96±0,13***
6	7,17±0,22	5,40±0,19***	5,43±0,17***	4,90±0,17***
7	7,68±0,27	5,25±0,17***	5,24±0,19***	5,39±0,17***
8	7,77±0,29	5,31±0,17***	5,25±0,19***	4,67±0,17***
10	8,14±0,28	5,64±0,18***	5,73±0,18***	5,41±0,19***
15	8,21±0,34	5,24±0,18***	5,21±0,17***	4,50±0,12***
21	8,22±0,21	5,12±0,22***	5,13±0,18***	4,18±0,11***
30	8,28±0,35	5,66±0,19***	5,50±0,19***	5,44±0,17***

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

Как видно из таблицы 5, на рисунке 26 у цыплят контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки количество

нуклеиновых кислот в клетках мышечного слоя железистого желудка постепенно увеличивается с  $6,23 \pm 0,22$  у.е. в первые сутки жизни до  $8,28 \pm 0,35$  у.е. в 30 сутки. Функциональная активность клеток за указанный период возросла на 32,9 %.

У цыплят опытных (I, II и III) групп было выявлено снижение количества нуклеиновых кислот в исследуемых клетках на 3, 4 сутки жизни.

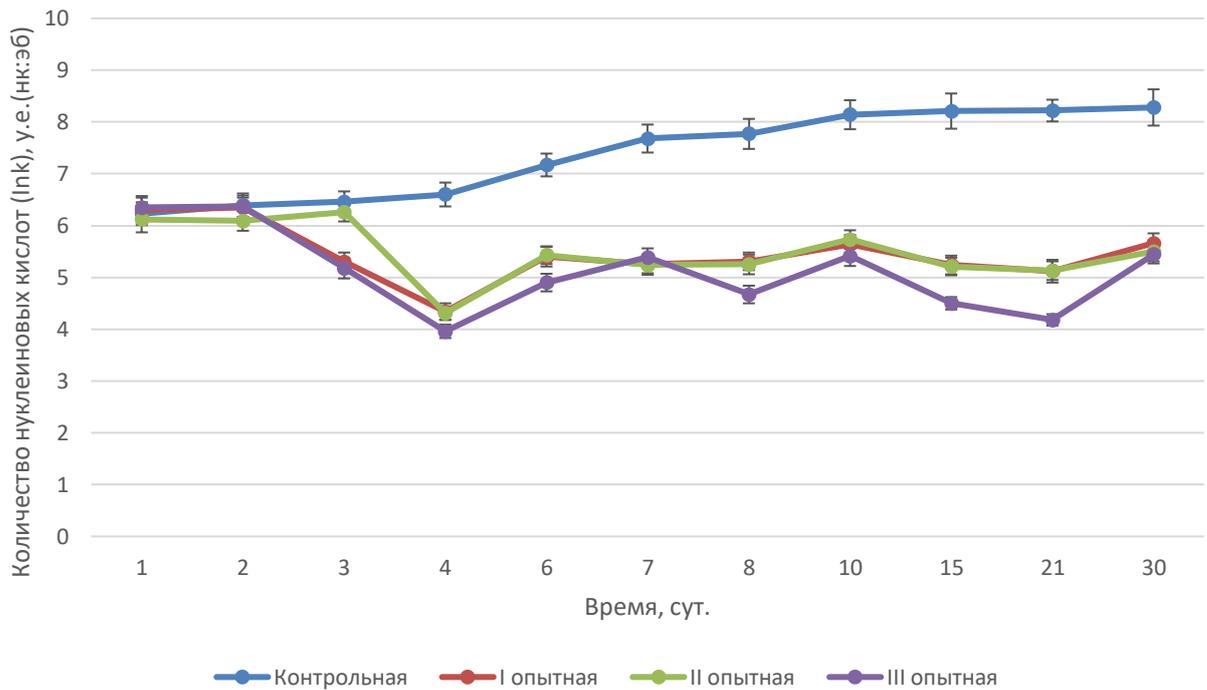


Рисунок 26 – Содержание нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  клетках мышечного слоя железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромидом, у.е.

В период измерений с 6 по 30 сутки у цыплят I и II опытных групп выявлены незначительные изменения значения показателя  $I_{НК}$  (в пределах 1-5 %) в сравнении с 6 сутками, а у цыплят III опытной группы фиксировали уменьшение/увеличение значения показателя  $I_{НК}$  с отклонением до 15 % (таблица 5, рисунок 26). К 30 суткам количественное содержание нуклеиновых кислот в условных единицах в миоцитах мышечного слоя железистого желудка цыплят опытных (I, II и III) групп были меньше значений контрольной

группы: в I опытной группе – на 10,2 %, во II опытной группе – на 10,1 %, в III опытной группе – на 11,1 %.

Поскольку количество нуклеиновых кислот в клетке служит критерием интенсивности синтетических процессов, происходящих в ней, сравнительному анализу были подвергнуты значения показателя  $I_{НК}$  в клетках разных видов: покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки и мышечного слоя железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II и III) групп.

Как видно на рисунке 27 разные виды клеток (покровный эпителий, железистый эпителий, миоциты) цыплят I контрольной группы содержат различное количество нуклеиновых кислот в условных единицах в 1-30 сутки жизни. Наименьшее их количество выявлено в клетках мышечного слоя, а наибольшее в клетках покровного эпителия слизистой оболочки, что говорит о характере и интенсивности внутриклеточных процессов в указанных видах клеток.

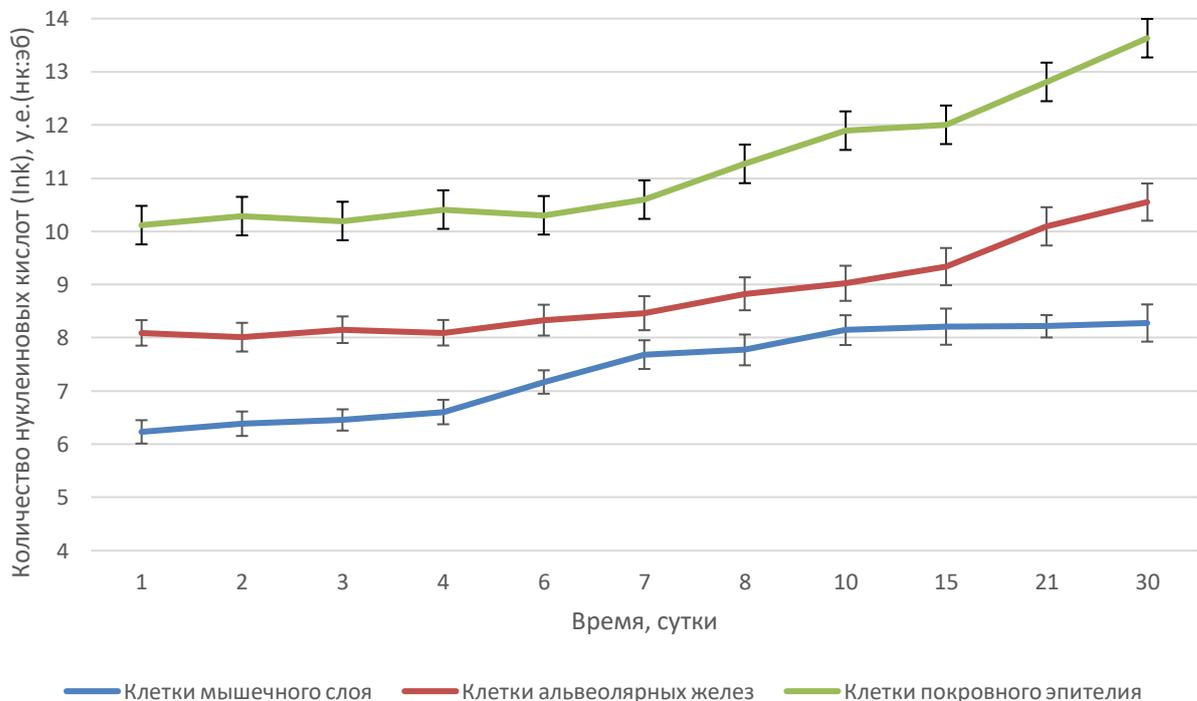


Рисунок 27 – Динамика нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  в клетках железистого желудка цыплят I контрольной группы по данным метода с этидиумом бромида, у.е.

Количество нуклеиновых кислот увеличивается в соответствии с увеличением возраста цыплят, при этом рост количества нуклеиновых кислот в покровном эпителии, железистом эпителии продолжается до 30 суток жизни, а в миоцитах интенсивный рост завершается к 15 суткам (рисунок 27).

Изменения содержания нуклеиновых кислот в исследуемых клетках железистого желудка цыплят I опытной группы по данным метода с этидиумом бромида представлены на рисунке 28.

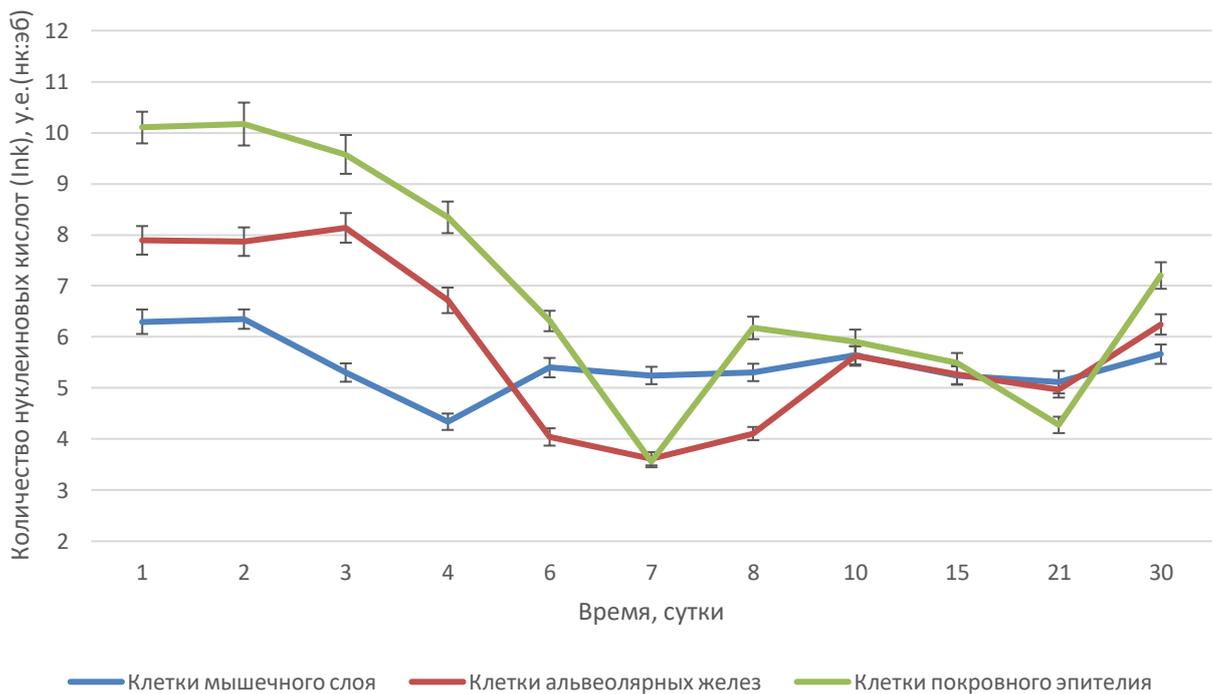


Рисунок 28 – Динамика нуклеиновых кислот  $I_{NK}$  в клетках железистого желудка цыплят I опытной группы по данным метода с этидиумом бромида, у.е.

Разные виды клеток (покровный эпителий, железистый эпителий, миоциты) железистого желудка цыплят I опытной группы по-разному реагируют на воздействие патологического агента, что отражается на изменении количества нуклеиновых кислот в клетках (рисунок 28).

Наибольшее уменьшение показателя  $I_{NK}$  зафиксировано в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка и эпителия альвеолярных желез на 7 сутки жизни относительно 1 суток жизни на 64,8 % и 54,2 % соответственно, а наименьшее – в клетках мышечного слоя на 4 сутки жизни

– на 31,1 %. К 30 суткам жизни значения показателя  $I_{NK}$  всех исследуемых видов клеток ниже значений на 1 сутки жизни.

Сведения об изменении содержания нуклеиновых кислот в исследуемых клетках железистого желудка цыплят II опытной группы по данным метода с этидиумом бромидом представлены на рисунке 29.

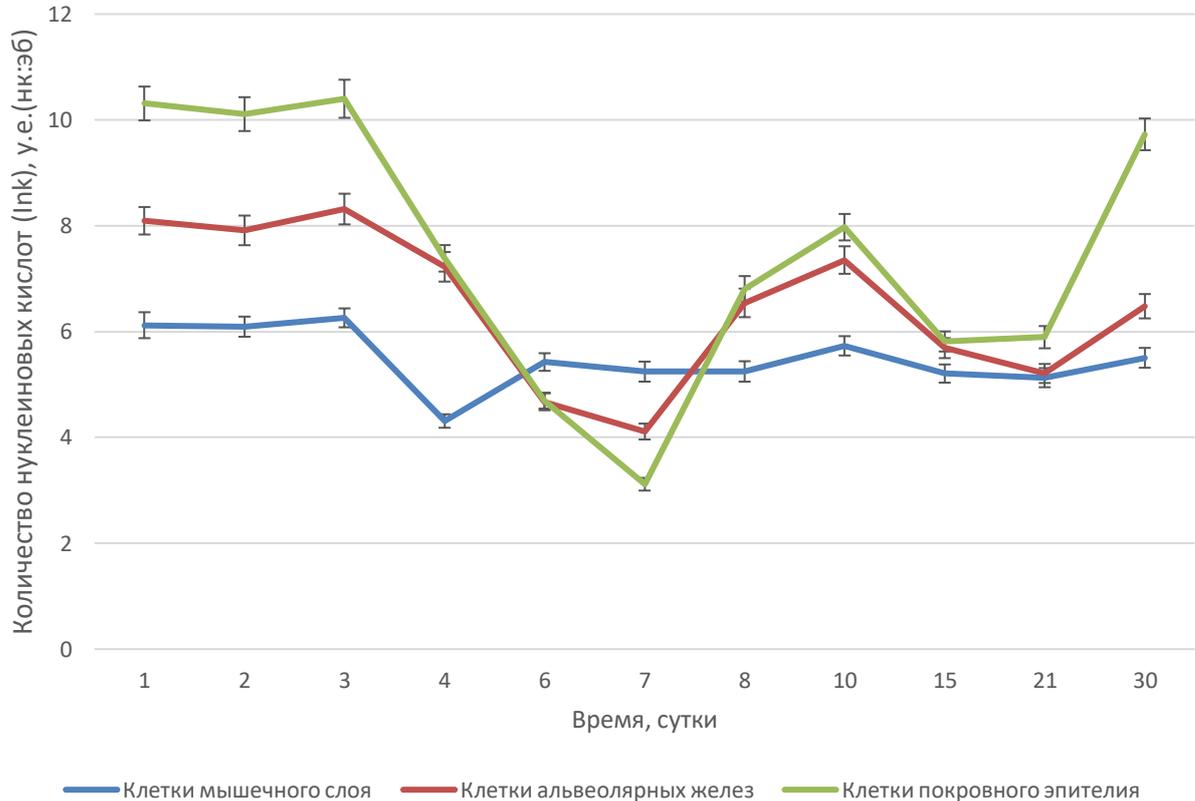


Рисунок 29 – Динамика нуклеиновых кислот  $I_{NK}$  в клетках железистого желудка цыплят II опытной группы по данным метода с этидиумом бромидом, у.е.

Как и в I опытной группе, наибольшее уменьшение показателя  $I_{NK}$  зафиксировано в клетках покровного эпителия слизистой оболочки и эпителия альвеолярных желез железистого желудка цыплят II опытной группы на 7 сутки жизни относительно первых суток жизни на 69,7 % и 49,2 % соответственно, а наименьшее – в клетках мышечного слоя на 4 сутки жизни – на 29,6 %. К 30 суткам жизни значения показателя  $I_{NK}$  всех исследуемых видов клеток ниже значений на 1 сутки жизни.

Изменения содержания нуклеиновых кислот в исследуемых клетках железистого желудка цыплят III опытной группы по данным метода с этидиумом бромидом представлены на рисунке 30.

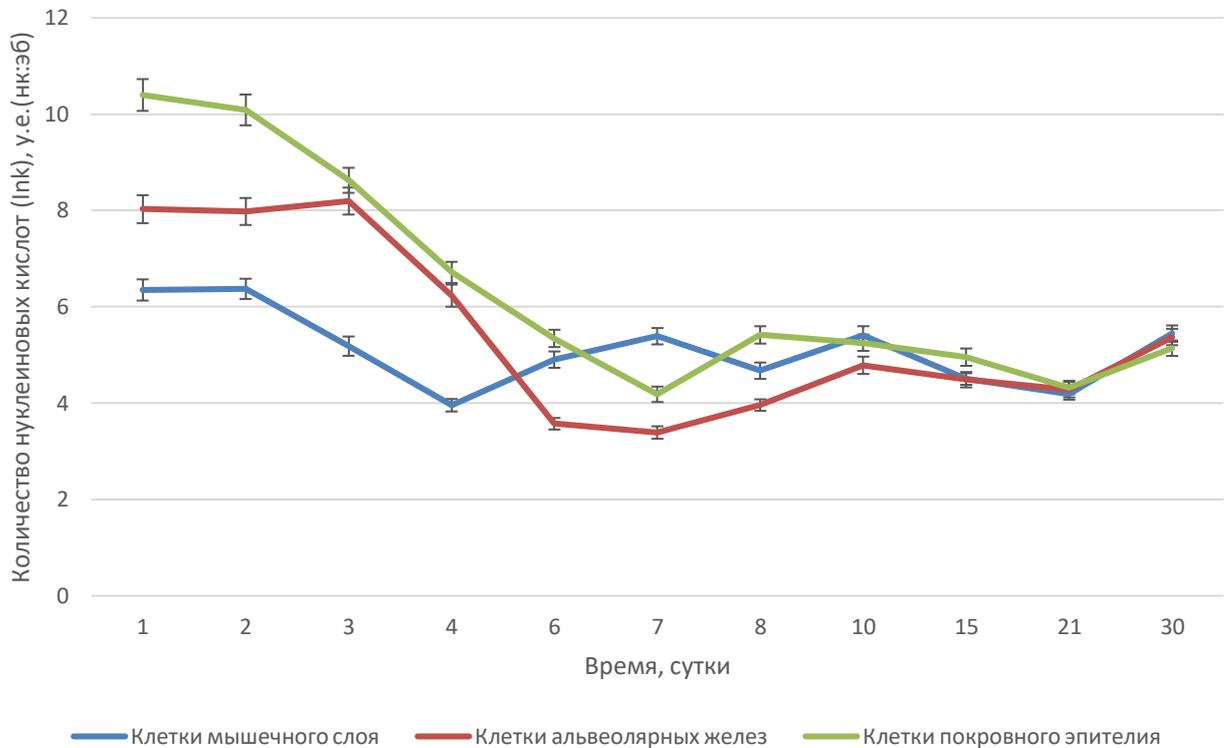


Рисунок 30 – Динамика нуклеиновых кислот  $I_{NK}$  в железистого желудка цыплят III опытной группы по данным метода с этидиумом бромидом, у.е.

Наибольшее уменьшение количества нуклеиновых кислот зафиксировано в клетках покровного эпителия слизистой оболочки и эпителия альвеолярных желез на 7 сутки жизни относительно 1 суток жизни на 59,8 % и 57,8% соответственно, а наименьшее – в клетках мышечного слоя на 4 сутки жизни – на 37,8 %. К 30 суткам жизни значения показателя  $I_{NK}$  всех исследуемых видов клеток ниже значений на 1 сутки жизни.

На основании полученных с помощью метода с этидиумом бромидом данных разработаны люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) (таблица 6).

Таблица 6 – Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) по результатам метода с этидиумом бромида, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
	Покровный эпителий слизистой оболочки			
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
	Эпителий альвеолярных желез			
1	7,85-8,33	7,61-8,17	7,83-8,35	7,74-8,32
2*	7,74-8,28	7,59-8,15	7,63-8,19	7,70-8,26
3	7,90-8,4	7,85-8,43	8,03-8,61	7,92-8,48
4	7,72-8,32	6,47-6,97	6,94-7,5	6,64-6
6	8,04-8,62	3,87-4,21	4,51-4,83	3,45-3,69
7	8,14-8,78	3,48-3,74	3,96-4,26	3,26-3,52
	Миоциты мышечного слоя			
1	6,01-6,45	6,06-6,54	5,87-6,37	6,13-6,57
2*	6,16-6,62	6,16-6,54	5,90-6,28	6,16-6,58
3	6,26-6,66	5,12-5,48	5,08-5,44	4,98-5,38
4	6,37-6,83	4,18-4,5	4,18-4,44	3,83-4,09
6	6,95-7,39	5,21-5,59	5,26-5,60	4,73-5,07
7	7,41-7,95	5,08-5,42	5,05-5,43	5,22-5,56

Примечание: \* - сутки экспериментального заражения.

Результаты апробации метода с этидиумом бромида на клетках разных видов (покровный эпителий слизистой оболочки, железистый эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки, клетки мышечного слоя) железистого желудка интактных цыплят и цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом и сальмонеллезом, свидетельствуют о том, что:

1. Разработанный одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания нуклеиновых кислот в гистологических срезах желудочно-кишечного тракта цыплят с применением флуорохрома «Этидиум бромид» и оценки их функционального состояния позволяет фиксировать изменение функционального состояния клеток благодаря количественному измерению содержащихся в них нуклеиновых кислот.

2. Проведенный сравнительный анализ функционального состояния клеток железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II и III) групп позволил установить:

2.1. У цыплят I контрольной группы:

- 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 %;

2.2. У цыплят опытных (I, II, III) групп:

- 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 показателей интактных цыплят.

3. Данные о количественном содержании нуклеиновых кислот  $I_{НК}$  в клетках покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез, клеток мышечного слоя железистого желудка цыплят контрольной и опытных групп могут быть использованы в качестве люминесцентно-микроскопических критериев ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) (таблица 6).

4. Получены новые данные о патогенезе экспериментальных кишечных заболеваний, вызванных *K. Pneumoniae*, *E. Coli*, *S. Enteritidis*:

4.1. При клебсиеллезе на первые сутки после заражения происходит снижение функциональной активности клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка на 9,4 %, клеток мышечного слоя на 16,5 %, на вторые сутки - клеток эпителия альвеолярных желез на 17,4 %. Наименьший показатель количественного содержания нуклеиновых кислот был отмечен на 5 сутки после заражения в клетках покровного эпителия и 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 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 аналогичных показателей интактных цыплят на 47,2 %, 40,8 % и 34,3 %.

4.2. При эшерихиозе на вторые сутки после заражения наблюдали снижение функциональной активности клеток покровного эпителия на 29 %, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки на 13,2 %, миоцитов мышечного слоя на 31,2 %. Период снижения функциональной активности длился в клетках покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки – со 2 по 5 сутки после заражения, мышечного слоя – во 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  $I_{НК}$  (в условных единицах) во всех исследуемых видах клеток был ниже показателей интактных цыплят на 28,6 %, 38,6 % и 33,6 %.

4.3. При сальмонеллезе в первые сутки после заражения отмечали снижение функциональной активности клеток эпителия слизистой оболочки железистого желудка и клеток мышечного слоя, во 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  $I_{НК}$  (в условных единицах) во всех исследуемых видах клеток был ниже показателей интактных цыплят на 62,3 %, 49,1 % и 34,3 %.

### 3.3.4 Сведения о функциональном состоянии клеток печени цыплят, полученные методом с ДХТАФ

При люминесцентно-микроскопическом исследовании окрашенных ДХТАФ гистологических срезов печени цыплят I контрольной и опытных (I, II и III) групп на фоне слабого сине-зеленого свечения ткани наблюдали участки с люминесценцией насыщенного ярко-зеленого цвета, имеющего разную степень интенсивности.

Наиболее выраженную интенсивность отмечали в гистологических срезах печени цыплят I контрольной группы, а наименее выраженную – у цыплят I опытной группы (клебсиеллез). Методом визуальной микроскопии исследовали гистопрепараты печени цыплят I контрольной и опытных (I, II и III) групп на 1–4, 6–8, 10, 15, 21 и 30 сутки их жизни. Используя данный метод выявить какую-либо зависимость между колебаниями интенсивности люминесценции, отражающими динамику количественного содержания белков в гепатоцитах, которое в свою очередь зависит от возраста и особенностей патоморфогенеза клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза (I, II и III опытных групп соответственно), не представилось возможным из-за отсутствия четких отличительных люминесцентно-микроскопических признаков (Akchurin S.V. et al., 2020b).

Устанавливать количественное содержание белков в гистологических срезах печени возможно с помощью разработанного одноволнового метода люминесцентного спектрального анализа с использованием флуорохрома ДХТАФ. Метод позволяет определять в гепатоцитах количественное содержание белков в условных единицах и проследить его динамику в печени цыплят всех групп в указанные выше сутки жизни (таблица 7, рисунок 31).

Таблица 7 – Содержание белков  $I_B$  в гепатоцитах цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с ДХТАФ, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
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 (\* -  $P \leq 0,05$ , \*\* -  $P \leq 0,01$ , \*\*\* -  $P \leq 0,001$ )

У цыплят I контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста (с 1 по 30 сутки жизни) количество белков в гепатоцитах постепенно увеличивалось с  $1,27 \pm 0,01$  у.е. до  $4,19 \pm 0,09$  у.е. (таблица 7, рисунок 31).

Функциональная активность гепатоцитов за указанный период возросла на 229,9 %.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (I опытная группа) по сравнению с I контрольной группой количество белков в клетках печени уменьшилось с  $1,93 \pm 0,01$  у.е. (на третьи сутки жизни, первые сутки после заражения) до  $1,72 \pm 0,02$  у.е. (на шестые сутки жизни).

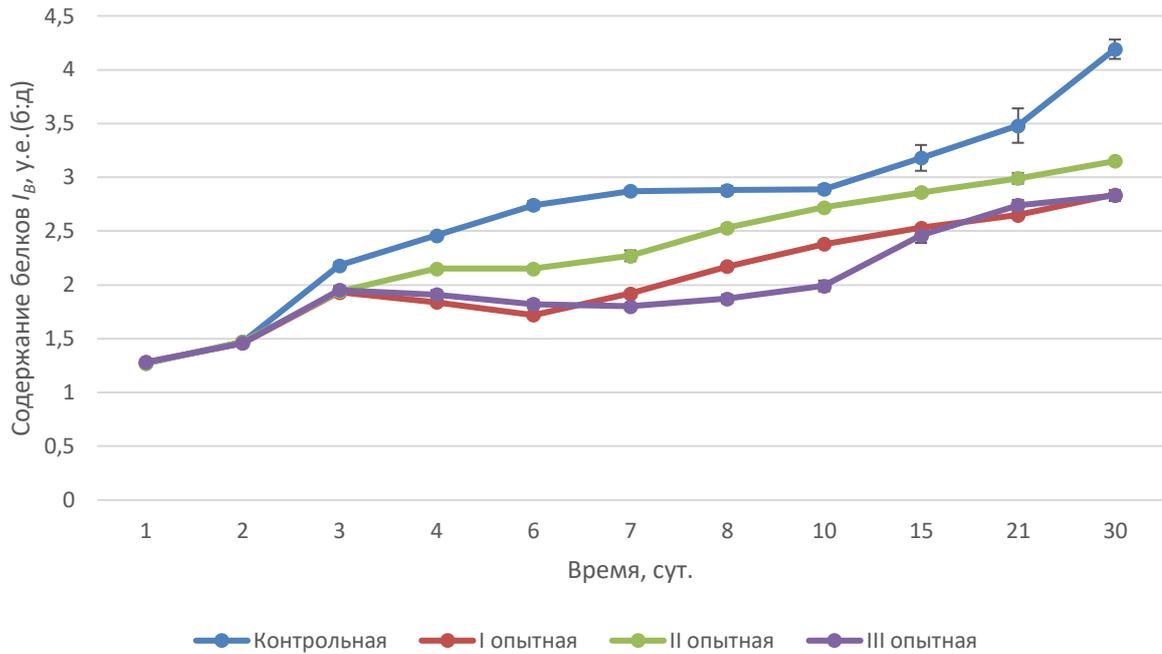


Рисунок 31 – Содержание белков  $I_B$  в гепатоцитах цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с ДХТАФ, у.е.

В данный период функциональная активность клеток печени снизилась на 10,9 %. Начиная с 7 суток жизни, значения показателя  $I_B$  постепенно увеличивались и к концу проведения эксперимента достигли уровня  $2,84 \pm 0,01$  условных единиц. За период с 1 по 30 сутки функциональная активность гепатоцитов возросла на 121,9 %. На 30 сутки жизни значение показателя  $I_B$  I опытной группы было меньше аналогичного показателя I контрольной группы на 47,5 %.

У цыплят с экспериментальным эшерихиозом (II опытная группа) количество белков в гепатоцитах постепенно увеличивалось на протяжении всего времени проведения эксперимента за исключением шестых суток жизни, в которые было зафиксировано сохранение показателя на уровне 4 суток (4 сутки –  $2,15 \pm 0,01$  у.е.; 6 сутки –  $2,15 \pm 0,02$  у.е.). При этом значения показателя  $I_B$  у цыплят II опытной группы были меньше аналогичных показателей I контрольной группой на всем протяжении эксперимента (таблица 7, рисунок 31). К 30 суткам жизни значения данного показателя были меньше значений

контрольной группы на 33,0 %. За период с 1 по 30 сутки функциональная активность гепатоцитов возросла на 148,0 %.

У цыплят с экспериментальным сальмонеллезом (III опытная группа) в сравнении с цыплятами I контрольной группы количество белков в клетках печени снижалось с 3 по 7 сутки жизни (3 сутки –  $1,95 \pm 0,04$  у.е.), 7 сутки –  $1,80 \pm 0,03$  у.е.). Начиная с 8 суток жизни, отмечалось постепенное увеличение значений показателя  $I_B$  в гепатоцитах. При этом значения показателя  $I_B$  у цыплят III опытной группы были меньше аналогичных показателей I контрольной группы на всем протяжении эксперимента (таблица 7, рисунок 31). К 30 суткам значения данного показателя были меньше значений I контрольной группы на 48,1 %. За период с 1 по 30 сутки функциональная активность гепатоцитов возросла на 121,1 %.

На основании полученных с помощью метода с ДХТАФ данных разработаны люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния гепатоцитов печени цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) (таблица 8).

Таблица 8 – 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			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
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

Примечание: \* - сутки экспериментального заражения.

Результаты апробации метода с ДХТАФ на клетках печени интактных цыплят и цыплят при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза свидетельствуют о том, что:

1. Разработанный одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток для обнаружения, определения количественного содержания белков в гистологических срезах печени цыплят с применением флуорохрома ДХТАФ и оценки их функционального состояния позволяет фиксировать изменение функционального состояния гепатоцитов благодаря количественному измерению содержащихся в них белков.

2. Проведенный сравнительный анализ функционального состояния гепатоцитов интактных цыплят и цыплят при экспериментальной кишечной инфекции (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) позволил установить:

2.1. У цыплят I контрольной группы:

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

- количественное содержание белков (в условных единицах) с 1 по 30 сутки жизни возросло на 229,9 %.

2.2. У цыплят опытных (I, II, III) групп:

- изменения в функциональном состоянии гепатоцитов, выраженные в снижении количества белков относительно показателей I контрольной группы, зафиксированы в первые сутки после заражения. Функциональная активность гепатоцитов цыплят I опытной группы снизилась на 13,0 %, II опытной группы – на 12,4 %, III опытной группы – на 11,8 %;

- количественное содержание белков в гепатоцитах достоверно меньше его величины, чем у цыплят I контрольной группы в период с 3 по 30 сутки жизни;

3. Данные о количественном содержании белков  $I_6$  (таблица 8) в гепатоцитах цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп могут быть

использованы в качестве люминесцентно-микроскопических критериев ранней диагностики функционального состояния клеток печени цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз и сальмонеллез).

4. Получены новые данные о патогенезе экспериментальных кишечных заболеваний, вызванных *E. Coli*, *S. Enteritidis* и *K. Pneumoniae*:

4.1. При клебсиеллезе в первые сутки после заражения наблюдали снижение функциональной активности гепатоцитов относительно показателей I контрольной группы на 11,5 %. На 4 сутки фиксировали минимальное количественное содержание белков в гепатоцитах, 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 аналогичных показателей контрольной группы на 32,2 %.

4.2. При эшерихиозе в первые сутки после заражения наблюдали снижение функциональной активности гепатоцитов в сравнении с аналогичными показателями I 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 аналогичных показателей I контрольной группы на 24,8 %.

4.3. При сальмонеллезе в первые сутки после заражения отмечали снижение функциональной активности гепатоцитов в сравнении с аналогичными показателями I 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  $I_e$  (в условных единицах) в гепатоцитах был достоверно ниже аналогичных показателей контрольной группы на 32,5 %.

### **3.3.5 Сведения о функциональном состоянии клеток железистого желудка цыплят, полученные Методом со Stains all**

При люминесцентно-микроскопическом исследовании окрашенных метакроматическим красителем «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп наблюдали своеобразную люминесцентно-микроскопическую картину, характеризующуюся сочетанием синего, зеленоватого и малиново-красного цветов с разной степенью интенсивности на различных участках.

Методом визуальной микроскопии исследовали гистопрепараты железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп на 1-4, 6-8, 10, 15, 21 и 30 сутки их жизни. Визуально обнаруживаемая в гистологических срезах люминесценция указывала на особенности распределения в стенке железистого желудка связанных с используемым флуорохромом нуклеиновых кислот и белков. В то же время каких-либо отличительных люминесцентно-микроскопических признаков, позволяющих судить о динамике содержания нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка, отражающей колебания интенсивности люминесценции и зависящей от возраста и особенностей патоморфогенеза инфекционных заболеваний, с помощью данного метода выявить не удалось.

Для объективной оценки функционального состояния клеток железистого желудка применяли разработанный метод люминесцентного спектрального анализа с использованием люминесцентного метакроматического красителя «Stains all», с помощью которого устанавливали коэффициенты соотношения нуклеиновых кислот и белков в покровном эпителии слизистой оболочки и клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, соединительной ткани подслизистой основы и серозной оболочки железистого желудка.

Полученные результаты подвергали статистической обработке. Дополнительные сведения по данному разделу представлены в приложении 9 (рисунки 60-75).

Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках эпителия слизистой оболочки цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным двухволнового метода люминесцентного спектрального анализа представлены в таблице 9, на рисунке 32.

Таблица 9 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
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 (\* -  $P \leq 0,05$ , \*\* -  $P \leq 0,01$ , \*\*\* -  $P \leq 0,001$ )

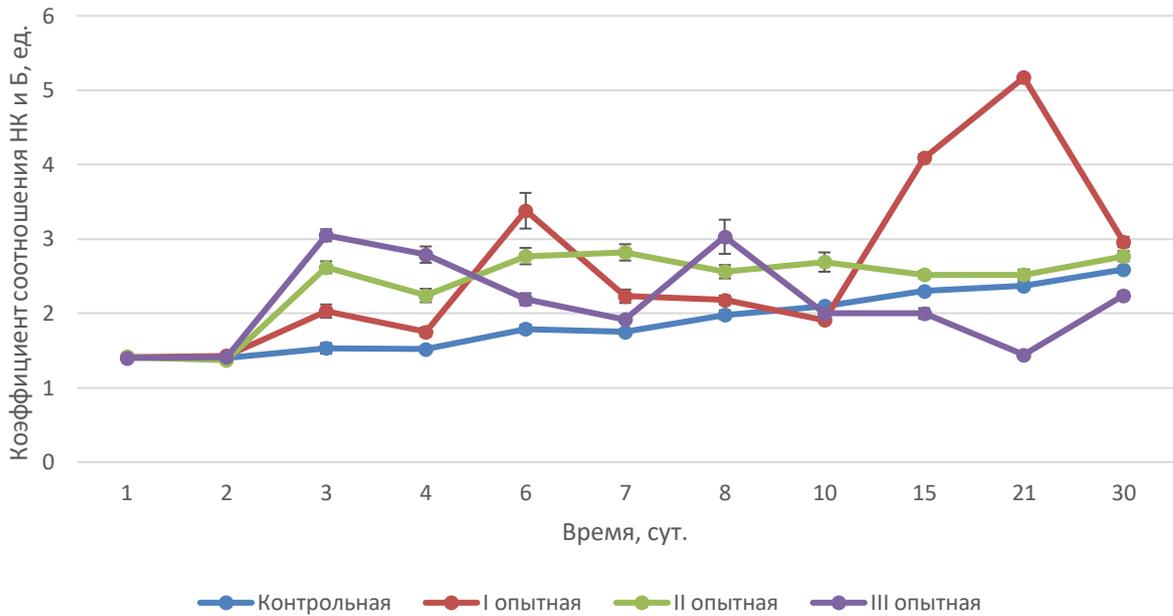


Рисунок 32 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.

У цыплят I контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки жизни коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков возрос с  $1,41 \pm 0,02$  у.е. до  $2,37 \pm 0,05$  у.е. (таблица 9, рисунок 32).

Данное обстоятельство может быть объяснено постепенным и опережающим ростом величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста величины ее интенсивности при длине волны 628 нм (белки), который наблюдался на спектрах люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки (рисунок 60) (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2019).

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (I опытная группа) по сравнению с I контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался увеличением показателя  $K_p$  на третьи сутки жизни до  $2,03 \pm 0,09$  у.е. В последующие сутки было зафиксировано два пика на 6 и 21 сутки (рисунок 32). Изменения коэффициентов связано со значительным увеличением интенсивности люминесценции при длине волны 484 нм

(нуклеиновые кислоты) относительно величины ее интенсивности при длине волны 628 нм (белки) (рисунок 61). К 30 суткам жизни показатель приблизился к значениям I контрольной группы, но был выше:  $2,96 \pm 0,07$  у.е. – I опытная группа,  $2,59 \pm 0,02$  у.е. – I контрольная группа.

У цыплят с экспериментальным эшерихиозом (II опытная группа) по сравнению с I контрольной группой коэффициент  $K_p$  характеризовался увеличением показателя на третьи сутки жизни до  $2,62 \pm 0,08$  у.е. Это может быть связано со значительным уменьшением интенсивности люминесценции при длине волны 628 нм (белки) по отношению к величине ее интенсивности при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2019). В последующие сутки значения коэффициента находились в диапазоне  $2,24 \pm 0,09$  –  $2,82 \pm 0,11$  у.е. К 30 суткам жизни показатель приблизился к значениям I контрольной группы, но был выше:  $2,77 \pm 0,07$  у.е. – II опытная группа,  $2,59 \pm 0,02$  у.е. – I контрольная группа. Показатели интенсивности люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка II опытной группы при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) относительно величины ее интенсивности при длине волны 628 нм (белки) представлены на рисунке 62.

У цыплят с экспериментальным сальмонеллезом (III опытная группа) по сравнению с I контрольной группой динамика коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался наличием двух пиков: на 3 и 8 сутки. Данное обстоятельство может быть связано с более быстрым ростом величины интенсивности люминесценции при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) относительно возрастания величины ее интенсивности при длине волны 628 нм (белки) (рисунок 63) (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2019). В отличие от изменения показателей коэффициентов при клебсиеллезе и эшерихиозе для сальмонеллеза было характерно снижение показателя  $K_p$  ниже значений I контрольной группы на 15, 21 и 30 сутки.

Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят I контрольной и

опытных (I, II, III) групп по данным двухволнового метода люминесцентного спектрального анализа со Stains all представлены в таблице 10, на рисунках 33, 64-67.

Таблица 10 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_a$ ) в клетках альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
1	1,91±0,03	1,92±0,03	1,92±0,03	1,93±0,03
2	1,92±0,02	1,98±0,03*	1,93±0,03	1,92±0,03
3	2,13±0,06	2,68±0,06***	2,43±0,04***	3,32±0,12***
4	2,17±0,05	1,91±0,05***	2,77±0,05***	2,50±0,05***
6	2,22±0,05	3,20±0,08***	2,44±0,03***	2,68±0,07***
7	2,47±0,06	2,25±0,03***	3,10±0,1***	2,01±0,05***
8	2,53±0,03	3,22±0,08***	2,75±0,05***	2,23±0,06***
10	2,68±0,01	2,78±0,01***	2,13±0,02***	2,35±0,01***
15	2,94±0,01	3,29±0,02***	2,14±0,01***	1,72±0,02***
21	3,70±0,02	4,40±0,01***	2,25±0,01***	1,81±0,03***
30	4,20±0,02	3,90±0,02***	3,06±0,03***	2,02±0,05***

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

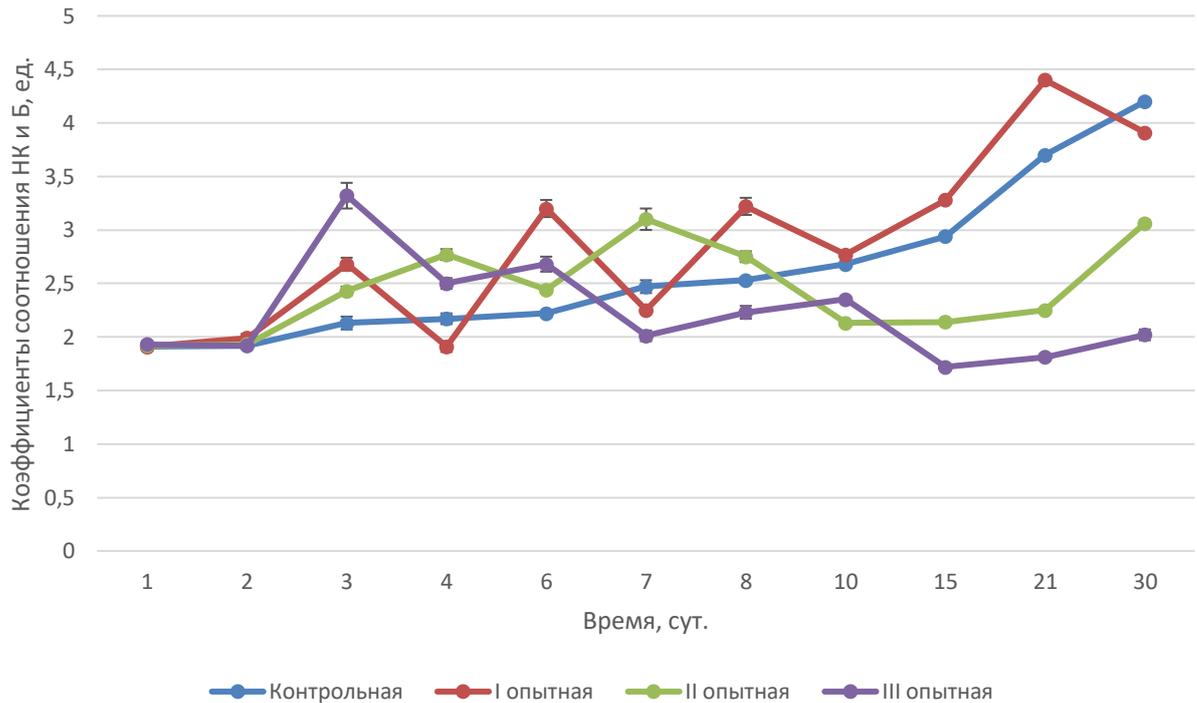


Рисунок 33 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_a$ ) в клетках альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.

Как видно из таблицы 10, на рисунке 33 у цыплят I контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков  $K_m$  возрос с  $1,91 \pm 0,03$  у.е. до  $4,20 \pm 0,02$  у.е. Увеличение показателей коэффициента в эпителии альвеолярных желез также может быть объяснено опережающим ростом величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста величины ее интенсивности при длине волны 620 нм (белки) (рисунок 64).

В сравнении с I контрольной группой у цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (I опытная группа) коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался увеличением показателя на третьи сутки до  $2,03 \pm 0,09$  у.е. В последующие дни эксперимента было зафиксировано четыре пика на 3, 6, 8 и 21 сутки (рисунок 33). Появление пиков на 3 и 6 сутки может быть результатом большего увеличения значений  $I_n$ , чем  $I_b$ , а на 8 сутки –

следствием значительного уменьшения  $Ib$  по сравнению со значениями  $In$ . Резкий скачок на 21 сутки может быть связан со значительным ростом величины  $In$  по сравнению с  $Ib$ . К 30 суткам показатель  $K_a$  приблизился к значениям I контрольной группы, но был меньше:  $3,90 \pm 0,02$  у.е. – I опытная группа,  $4,20 \pm 0,02$  у.е. – I контрольная группа. Вероятно, это происходит из-за снижения величины  $In$  на фоне увеличения  $Ib$  (рисунок 55).

У цыплят с экспериментальным эшерихиозом (II опытная группа) по сравнению с I контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался увеличением показателя на 3 сутки до  $2,43 \pm 0,04$  у.е. В период с 1 по 30 сутки было зафиксировано 3 пика в показателях коэффициента (4, 7 и 30 сутки). Объяснением данного обстоятельства может быть в первом случае – более быстрый рост величины  $In$  по сравнению с  $Ib$ , во втором случае – быстрое уменьшение величины  $Ib$  относительно снижения  $In$ . К 30 суткам жизни отмечали быстрое снижение величины  $Ib$  по сравнению с уменьшением  $In$ , приводящее к увеличению коэффициента соотношений  $I484/I620$  (рисунок 66). К 30 суткам показатель был значительно ниже значений I контрольной группы:  $3,06 \pm 0,03$  у.е. – II опытная группа,  $4,2 \pm 0,02$  у.е. – I контрольная группа.

У цыплят с экспериментальным сальмонеллезом (III опытная группа) по сравнению с I контрольной группой динамика коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовалась увеличением данного показателя на 3 сутки до  $3,32 \pm 0,12$  у.е. Увеличение значений коэффициентов обусловлено увеличением интенсивности люминесценции при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) на фоне снижения величины ее интенсивности при длине волны 620 нм (белки) (рисунок 67). В последующем отмечалось снижение значения показателя. К 30 суткам показатель составил  $2,02 \pm 0,05$  у.е., при значении показателя I контрольной группы –  $4,2 \pm 0,02$  у.е.

Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках соединительной ткани подслизистой основы слизистой оболочки цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным двухволнового метода

люминесцентного спектрального анализа представлены в таблице 11, на рисунках 34, 68-71.

Таблица 11 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_m$ ) в клетках соединительной ткани подслизистой основы слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
1	2,63±0,03	2,60±0,02	2,62±0,03	2,62±0,03
2	2,81±0,02	2,77±0,01**	2,66±0,09**	2,68±0,07***
3	2,76±0,06	2,44±0,06***	3,15±0,1***	3,76±0,1***
4	2,67±0,17	1,70±0,11***	3,64±0,05***	3,04±0,3*
6	2,68±0,07	2,25±0,06***	3,06±0,06***	3,44±0,05***
7	3,07±0,08	3,40±0,07***	4,55±0,06***	4,07±0,12***
8	3,27±0,04	4,08±0,11***	3,56±0,07***	5,27±0,28***
10	2,97±0,14	3,46±0,12***	4,36±0,05***	4,75±0,03***
15	3,59±0,14	4,44±0,08***	2,41±0,02***	2,62±0,02***
21	5,22±0,21	13,73±0,54***	2,99±0,04***	2,78±0,05***
30	5,76±0,24	11,93±0,36***	5,85±0,03	3,45±0,03***

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

У цыплят I контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков возрос с 2,63±0,03 у.е. в первые сутки до 5,76±0,24 у.е. Данное обстоятельство может быть объяснено постепенным и опережающим ростом величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста величины ее интенсивности при

длине волны 620 нм (белки), который наблюдался на спектрах люминесценции клеток соединительной ткани (рисунок 68).

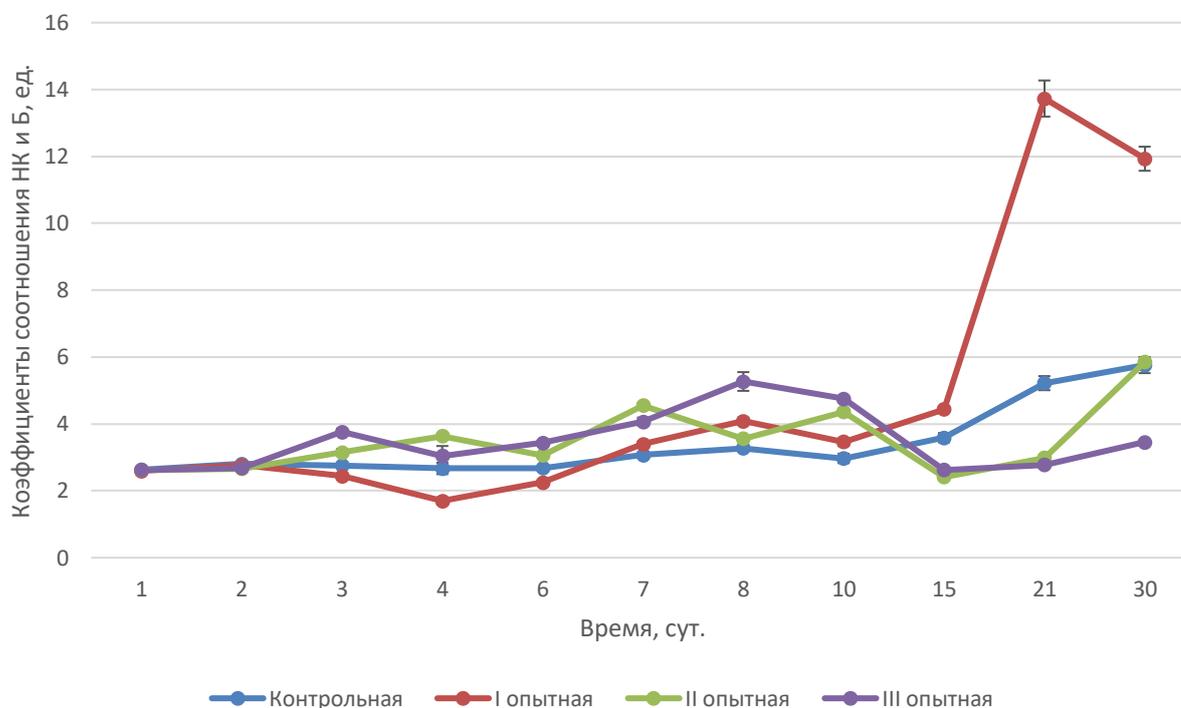


Рисунок 34 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_m$ ) в клетках соединительной ткани подслизистой основы слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.

Данную тенденцию наблюдали на протяжении всего периода увеличения возраста цыплят.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (I опытная группа) по сравнению с I контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался снижением значения показателя  $K_m$  на третьи и четвертые сутки до  $2,44 \pm 0,06$  и  $1,7 \pm 0,11$  у.е. соответственно. В данный период отмечаются два пика, характеризующихся резким увеличением коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков на 8 и 21 сутки, что может быть связано со значительным увеличением интенсивности люминесценции при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и одновременным

снижением ее величины при длине волны 620 нм (белки) (рисунок 69). К 30 суткам показатель был значительно больше значения I контрольной группы:  $11,93 \pm 0,36$  у.е. – I опытная группа,  $5,76 \pm 0,24$  у.е. – I контрольная группа.

У цыплят с экспериментальным эшерихиозом (II опытная группа) по сравнению с I контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался увеличением показателя на 3 сутки до  $3,15 \pm 0,1$  у.е. В период с 1 по 30 сутки было зафиксировано 4 пика в показателях коэффициента (4, 7, 10 и 30 сутки). Наличие пиков обусловлено опережающим ростом величины интенсивности люминесценции при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) относительно ее величины при длине волны 620 нм (белки) (рисунок 70). К 30 суткам показатель  $K_m$  был на уровне значений I контрольной группы:  $5,85 \pm 0,03$  у.е. – II опытная группа,  $5,76 \pm 0,24$  у.е. – I контрольная группа, что можно связать со значительным уменьшением величины интенсивности люминесценции, соответствующей и белкам и нуклеиновым кислотам.

У цыплят с экспериментальным сальмонеллезом (III опытная группа) по сравнению с I контрольной группой динамика коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовалась наличием трех пиков (на 3, 8 и 30 сутки), что может быть следствием с опережающего роста величины интенсивности люминесценции при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста ее величины при длине волны 620 нм (белки). На 15, 21 и 30 сутки значения коэффициента были ниже значений I контрольной группы. К 30 суткам показатель  $K_m$  составил  $3,45 \pm 0,03$  у.е. при значении показателя I контрольной группы –  $5,76 \pm 0,24$  у.е. Сведения об изменении величины интенсивности люминесценции при длинах волн 480 нм и 620 нм представлены на рисунке 71 и характеризуются значительным уменьшением в основном величины интенсивности люминесценции при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты).

Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II,

III) групп по данным двухволнового метода люминесцентного спектрального анализа со Stains all представлены в таблице 12, на рисунках 35, 72-75.

Таблица 12 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_s$ ) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
1	1,00±0,01	0,97±0,04	0,98±0,03	0,99±0,04
2	0,99±0,02	0,97±0,03	0,99±0,03	0,98±0,02
3	1,54±0,06	1,25±0,04***	1,85±0,04***	3,52±0,13***
4	1,81±0,08	1,36±0,05***	3,19±0,08***	2,18±0,06***
6	2,50±0,09	1,94±0,04***	3,43±0,13***	2,16±0,05***
7	2,83±0,04	2,24±0,05***	2,63±0,05***	3,05±0,04***
8	2,86±0,17	1,72±0,07***	2,06±0,05***	3,26±0,05***
10	3,37±0,05	2,21±0,02***	2,21±0,02***	2,54±0,03***
15	3,75±0,04	5,88±0,05***	2,45±0,02***	1,74±0,04***
21	4,02±0,04	7,79±0,05***	2,34±0,03***	1,92±0,04***
30	4,71±0,05	3,63±0,03***	2,72±0,04***	2,79±0,02***

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

Как видно из таблицы 12, на рисунке 35 у цыплят I контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков возрос с 1,00±0,01 у.е. в первые сутки до 4,71±0,05 у.е.

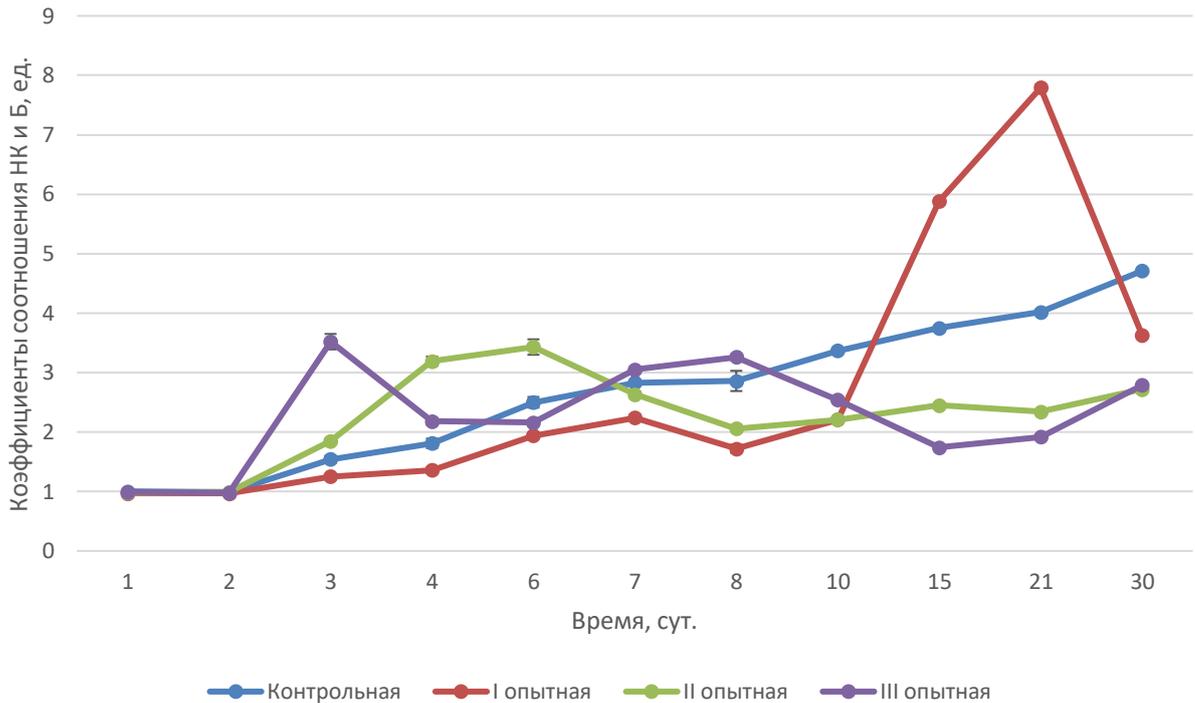


Рисунок 35 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков  $K_s$  в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.

Данное обстоятельство может быть объяснено постепенным и опережающим ростом величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста величины ее интенсивности при длине волны 630 нм (белки), который наблюдался на спектрах люминесценции в клетках мезотелия серозной оболочки (рисунок 72). Эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода увеличения возраста цыплят.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (I опытная группа) в период 1–30 сутки значения показателя  $K_s$  были ниже коэффициентов I контрольной группы, за исключением 15 и 21 суток. На кривой коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков отмечалось два пика на 7 и 21 сутки жизни. Появление пика на 7 сутки может быть результатом более быстрого роста величины  $In$  по сравнению с увеличением  $Ib$ , а резкий скачок на 21 сутки может быть связан с продолжающимся ростом величины  $In$  на фоне

значительного снижения величины  $Ib$  (рисунок 63) (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2014). К 30 суткам показатель  $K_s$  был меньше значения I контрольной группы:  $3,63 \pm 0,03$  у.е. – I опытная группа,  $4,71 \pm 0,05$  у.е. – I контрольная группа. Данное обстоятельство может быть обусловлено уменьшением величины  $In$  с одновременным увеличением  $Ib$  к этому сроку жизни экспериментально зараженных клебсиеллезом цыплят (рисунок 73).

У цыплят с экспериментальным эшерихиозом (II опытная группа) по сравнению с I контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался увеличением показателя на 3–6 сутки до  $3,43 \pm 0,13$  у.е. к 6 суткам. На кривой коэффициентов соотношения органических веществ, отмечалось два пика, характеризующихся увеличением их значений на 6 и 10 сутки. Увеличение на 6 сутки жизни может быть вследствие возрастания  $In$  на фоне уменьшения  $Ib$ , а на 10 сутки – результатом более быстрого снижения величины  $Ib$  относительно уменьшения  $In$  (рисунок 64). В дальнейшем значения снизились и к 30 суткам показатель был на уровне  $2,72 \pm 0,04$  у.е., что меньше аналогичного показателя I контрольной группы на указанную дату ( $4,71 \pm 0,05$  у.е.), что может быть объяснено более быстрым снижением величины  $In$ , нежели  $Ib$  (рисунок 74).

У цыплят с экспериментальным сальмонеллезом (III опытная группа) по сравнению с I контрольной группой динамика коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовалась наличием трех пиков (на 3, 8 и 30 сутки). Наличие пиков вероятно связано с опережающим увеличением интенсивности люминесценции при длине волны 480 нм (НК) относительно роста величины ее интенсивности при 630 нм (белки) (рисунок 75). На 10, 15, 21 и 30 сутки значения коэффициента  $K_s$  были ниже значений I контрольной группы. К 15 суткам жизни коэффициент соотношения  $I_{480}/I_{630}$  значительно уменьшился в результате значительного снижения величины  $In$  в сравнении с уменьшением  $Ib$ . К 30 суткам этот коэффициент несколько повысился, что может быть объяснено более быстрым возрастанием  $In$ , по сравнению с ростом

*Ib* (рисунок 75). К 30 суткам показатель  $K_s$  составил  $2,79 \pm 0,02$  у.е., при значении показателя  $I$  контрольной группы –  $4,71 \pm 0,05$  у.е.

Поскольку коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков служит критерием интенсивности синтетических процессов, происходящих в клетках и тканях, сравнительному анализу были подвергнуты показатели, выявленные в клетках и тканях разных видов и экспериментальных групп: покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клеток соединительной ткани и мезотелия серозной оболочки железистого желудка цыплят (рисунок 36).

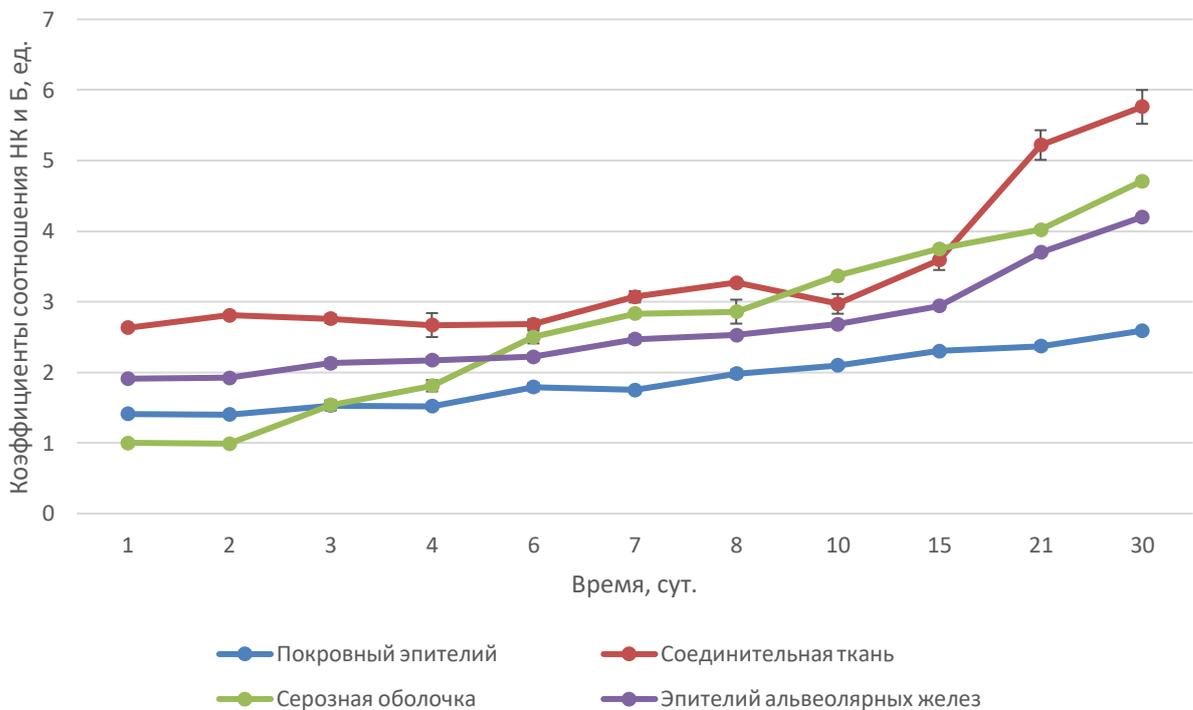


Рисунок 36 – Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят I контрольной группы, у.е.

Как видно на рисунке 36 разные виды клеток (покровный эпителий слизистой оболочки, железистый эпителий, клетки соединительной ткани, мезотелий) цыплят I контрольной группы имеют разные коэффициенты соотношения нуклеиновых кислот и белков в период 1-30 сутки жизни. Наименьшее значение показателя выявлено на 1 сутки в клетках мезотелия, а наибольшее – в клетках соединительной ткани, что говорит о характере и интенсивности

внутриклеточных процессов. Для всех представленных видов клеток было характерно увеличение значения показателей с возрастом. При этом коэффициент покровного эпителия увеличился на 83,7 %, клеток соединительной ткани на 117,9 %, эпителия альвеолярных желез – на 120 %, серозной оболочки – на 371 %.

Изменения значений коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в исследуемых клетках железистого желудка цыплят I опытной группы представлены на рисунке 37.

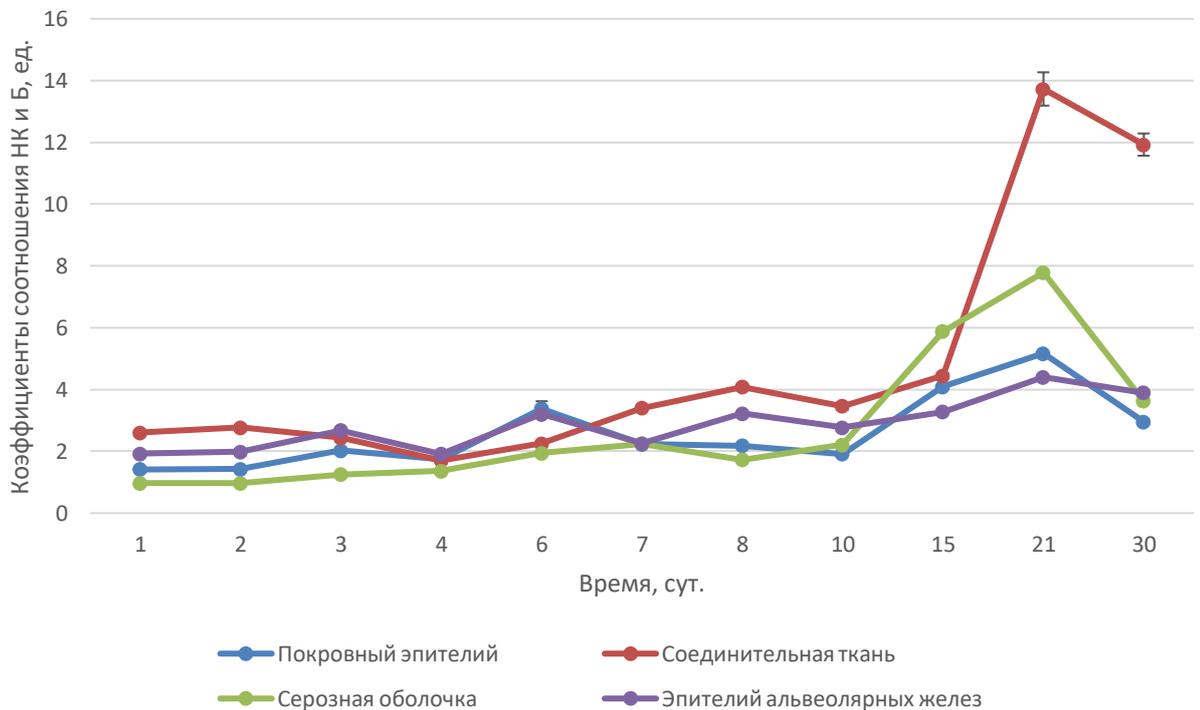


Рисунок 37 – Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят I опытной группы, у.е.

Как видно на рисунке 37 разные виды клеток железистого желудка цыплят I опытной группы по-разному реагируют на воздействие патологического агента, что отражается на изменении значений коэффициента. На 4 сутки зафиксировано снижение значений коэффициентов в эпителии слизистой оболочки, клетках соединительной ткани и эпителии альвеолярных желез. В дальнейшем динамика изменений показателей была характерна для каждого типа клеток.

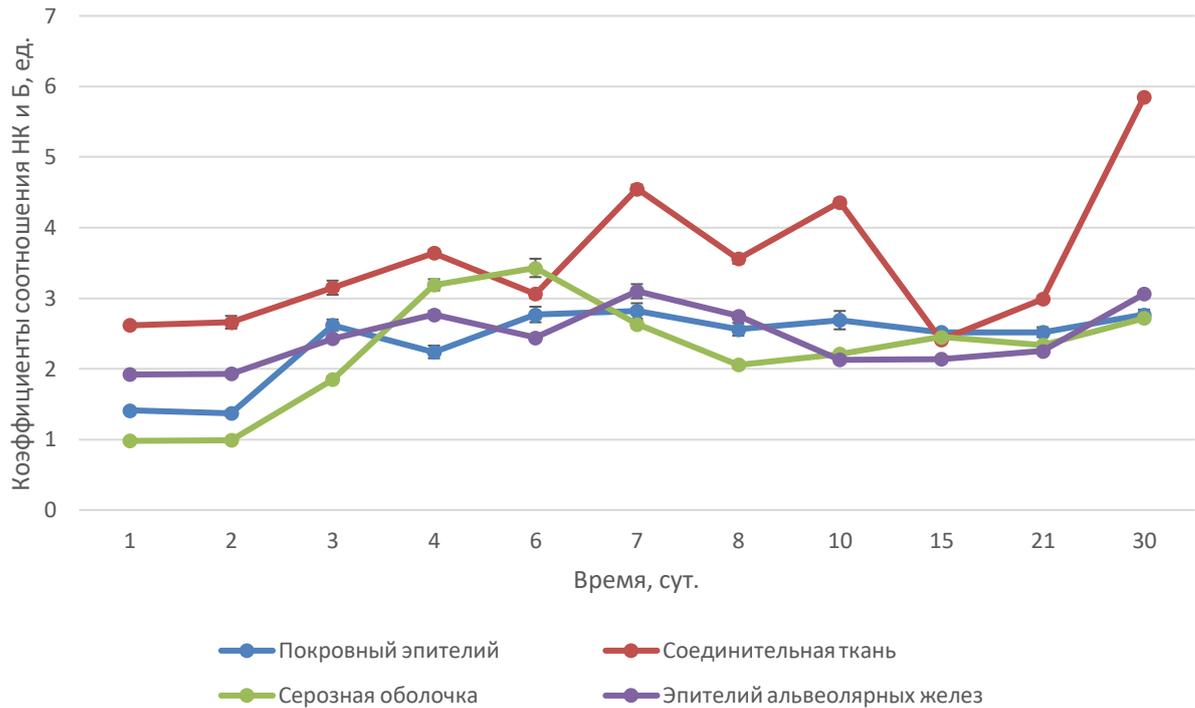


Рисунок 38 – Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят II опытной группы, у.е.

Как видно на рисунке 38 первыми на воздействие патогенного агента реагируют клетки покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят II опытной группы. Это отражается на снижении показателя коэффициента на 4 сутки. На 6 сутки снижается значение показателя в эпителии альвеолярных желез и клетках соединительной ткани, на 8 сутки – в клетках серозной оболочки. В дальнейшем динамика изменений показателей была характерна для каждого типа клеток и тканей при этом к 30 суткам во всех видах исследуемых клеток отмечается увеличение значения показателя.

Как видно на рисунке 39 воздействие патогенного агента приводит к снижению значения коэффициентов всех исследуемых видов клеток железистого желудка цыплят III опытной группы на 4 сутки. При этом снижение значений показателя для покровного эпителия и эпителия альвеолярных желез продолжается до 7 суток. В дальнейшем динамика изменений показателей была характерна для каждого типа клеток, при этом к 30 суткам во всех видах исследуемых клеток и тканей отмечается тенденция к увеличению показателей.

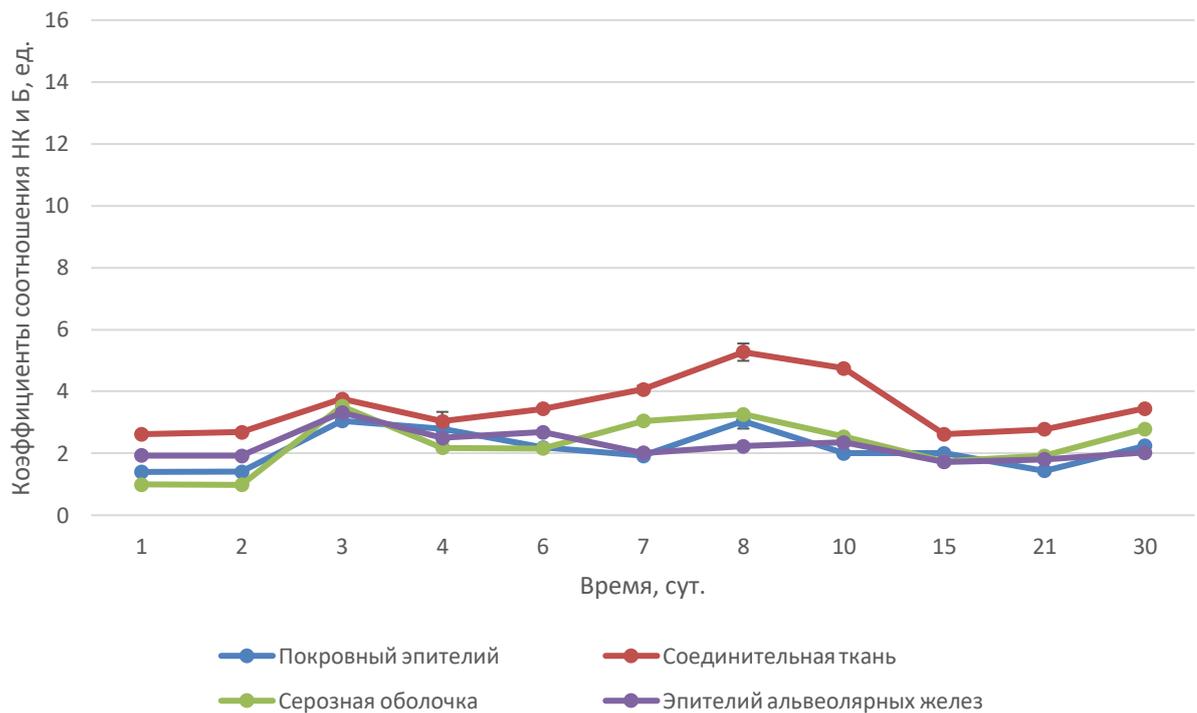


Рисунок 39 – Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят III опытной группы, у.е.

С помощью метода люминесцентного спектрального анализа с использованием метакроматического флуорохрома Steins all клеток железистого желудка цыплят можно оценить функциональное состояние этих клеток при инфекционных заболеваниях (клебсиеллезе, эшерхиозе и сальмонеллезе). Отмечается определенная зависимость степени изменения функциональной активности исследуемых клеток покровного эпителия, клеток соединительной ткани, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки и мезотелия серозной оболочки под влиянием развития инфекционного процесса у цыплят. При этом изменение функциональной активности этих клеток отражается на динамике выявляемых с помощью данного метода коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков.

На основании установленных статистически достоверных показателей величины коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков

разработаны люминесцентно-микроскопические критерии для оценки функционального состояния клеток при клебсиеллезе, эшерихиоза и сальмонеллеза в ранние сроки развития этих инфекций (таблица 13).

Таблица 13 – Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) по результатам Метода со Stains all, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп			
	I контрольная	Опытные		
		I	II	III
1	2	3	4	5
Покровный эпителий слизистой оболочки				
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
Эпителий альвеолярных желез				
1	1,88-1,94	1,89-1,95	1,89-1,95	1,90-1,96
2*	1,90-1,94	1,95-2,01	1,90-1,96	1,89-1,95
3	2,07-2,19	2,62-2,74	2,39-2,47	3,20-3,44
4	2,12-2,22	1,86-1,96	2,72-2,82	2,45-2,55
6	2,17-2,27	3,12-3,28	2,41-2,47	2,61-2,75
7	2,41-2,53	2,22-2,28	3,00-3,20	1,96-2,06

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5
Клетки соединительной ткани подслизистой основы				
1	2,60-2,66	2,58-2,62	2,59-2,65	2,59-2,65
2*	2,79-2,83	2,76-2,78	2,57-2,75	2,61-2,75
3	2,70-2,82	2,38-2,50	3,05-3,25	3,66-3,86
4	2,50-2,84	1,59-1,81	3,59-3,69	2,74-3,34
6	2,61-2,75	2,19-2,31	3,00-3,12	3,39-3,49
7	2,99-3,15	3,33-3,47	4,49-4,61	3,95-4,19
Мезотелий серозной оболочки				
1	0,99-1,01	0,93-1,01	0,95-1,01	0,95-1,03
2*	0,97-1,01	0,94-1,00	0,96-1,02	0,96-1,00
3	1,48-1,60	1,21-1,29	1,81-1,89	3,39-3,65
4	1,73-1,89	1,31-1,41	3,11-3,27	2,12-2,24
6	2,41-2,59	1,90-1,98	3,30-3,56	2,11-2,21
7	2,79-2,87	2,19-2,29	2,58-2,68	3,01-3,09

Примечание: \* - сутки экспериментального заражения.

Результаты апробации метода со Stains all на клетках железистого желудка цыплят в норме и при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза свидетельствуют о том, что:

1. Разработанный двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток с использованием метахроматического флуорохрома «Stains all» позволяет обнаруживать органические вещества (нуклеиновые кислоты и белки) в гистологических срезах, определять их соотношения в клетках, а также оценивать функциональное состояние клеток желудочно-кишечного тракта птиц благодаря количественному измерению соотношения находящихся в них нуклеиновых кислот и белков.

2. Проведенный сравнительный анализ функционального состояния разных видов клеток железистого интактных цыплят и цыплят при экспериментальной кишечной инфекции (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) позволил установить:

2.1. У цыплят I контрольной группы:

- разные виды клеток имеют различное соотношение нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах), значения которых увеличивается к 30 суткам жизни: клетки покровного эпителия слизистой оболочки (1 сутки –  $1,41 \pm 0,02$ ; 30 сутки –  $2,59 \pm 0,02$ ), эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки ( $1,91 \pm 0,03$ ;  $4,20 \pm 0,02$ ), клетки соединительной ткани подслизистой основы ( $2,63 \pm 0,03$ ;  $5,76 \pm 0,24$ ), мезотелия 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 %).

2.2. У цыплят опытных (I, II, III) групп:

- 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 коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клетках соединительной ткани подслизистой основы, мезотелия серозной оболочки не соответствовал показателям интактных цыплят.

3. Данные о коэффициентах соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез, клетках соединительной ткани подслизистой основы, мезотелия серозной оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп могут быть использованы в качестве люминесцентно-микроскопических критериев диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (эшерихиоз, сальмонеллез, клебсиеллез) (таблица 13).

4. Получены новые данные о патогенезе экспериментальных кишечных заболеваний, вызванных *E. Coli*, *S. Enteritidis* и *K. Pneumoniae*:

4.1. При клебсиеллезе в первые сутки после заражения наблюдали изменения функциональной активности всех видов исследуемых клеток железистого желудка, характеризующиеся:

- 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 клетках соединительной ткани подслизистой основы – на 11,6 %, мезотелия серозной оболочки – на 18,8 %.

В период 1-28 сутки с момента заражения изменение функциональной активности клеток покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез

слизистой оболочки, клеток соединительной ткани подслизистой основы, мезотелия серозной оболочки железистого желудка имело специфику, характерную для каждого из указанных видов клеток, значения показателей не соответствовали аналогичным значениям интактных цыплят.

4.2. При эшерихиозе 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 71,2 %, эпителия альвеолярных желез – на 16,4 %, клетках соединительной ткани подслизистой основы – на 14,1 %, мезотелия серозной оболочки – на 20,1 %.

В период 1-28 сутки с момента заражения изменение функциональной активности клеток покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клеток соединительной ткани подслизистой основы, мезотелия серозной оболочки железистого желудка имело специфику, характерную для каждого из указанных видов клеток, значения показателей не соответствовали аналогичным значениям интактных цыплят.

4.3. При сальмонеллезе 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 период 1-28 сутки с момента заражения изменение функциональной активности клеток покровного эпителия, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, клеток соединительной ткани подслизистой основы, мезотелия серозной оболочки железистого желудка имело специфику, характерную для каждого из указанных видов клеток, значения показателей не соответствовали значениям интактных цыплят.

5. Особенности функциональной активности клеток желудочно-кишечного тракта цыплят, установленные с помощью разработанного метода, позволяют использовать его для выявления ранних метаболических изменений в железистом желудке инфицированных цыплят до возникновения характерной патоморфологической и клинической картины инфекционных заболеваний и проводить диагностику функционального состояния клеток ранние сроки болезни.

### **3.4 Сведения о функциональном состоянии клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза, полученные при экспериментальной апробации разработанных методов**

#### **3.4.1 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 стадию манифестации болезни характеризовалась острым катаральным воспалением железистого и мышечного желудков, тонкого 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, тонкого 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.

#### **3.4.2 Продуктивные показатели цыплят в норме и при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза цыплят**

Средняя масса тела цыплят, измеряемая на протяжении второго опыта, и среднесуточный прирост представлены в таблице 14 и на рисунке 40.

Масса тела цыплят контрольной группы на 30 сутки жизни составила  $304,6 \pm 8,06$  г. Значение показателя находится в пределах диапазона, установленного производителем племенного яйца данной породы птицы для возраста 30 дней (292-308 г.).

Таблица 14 – Масса тела цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, г.

Сутки жизни	Наименование групп		
	II контрольная	Опытные	
		IV	V
1	39,6±0,34	39,6±0,31	39,4±0,31
7	65,2±0,8	63,6±0,57	64±0,61
14	117,6±1,95	106,6±2,55***	108,2±1,64***
21	192,9±4,26	162,4±2,44***	176,8±3,07***
28	276,3±8,27	230,3±3,65***	252±2,79***
30	304,6±8,06	246,1±5,69***	267,5±4,3***
Среднесуточный прирост, г	8,8±0,27	6,8±0,19	7,6±0,14

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

Масса тела цыплят опытных групп начала снижаться на вторую неделю эксперимента. С 14 по 21 день цыплята V опытной группы, подвергавшиеся лечению антибактериальным препаратом «Энрофлон», демонстрировали прирост живой массы относительно цыплят IV опытной группы.

К 30 суткам жизни показатели живой массы цыплят IV, V опытных групп были ниже значений II контрольной группы на: IV опытная группа – 19,21 %; V опытная группа – 12,18 %.

Среднесуточный прирост массы тела цыплят контрольной группы с 1 по 30 сутки жизни составил 8,8±0,27 г., IV опытной группы – 6,8±0,19 г., V опытной группы – 7,6±0,14 г. Вышеуказанный показатель был ниже у цыплят

опытных групп в сравнении с II контрольной группой на: IV опытная группа – 29,4 %; V опытная группа – 15,8 %.

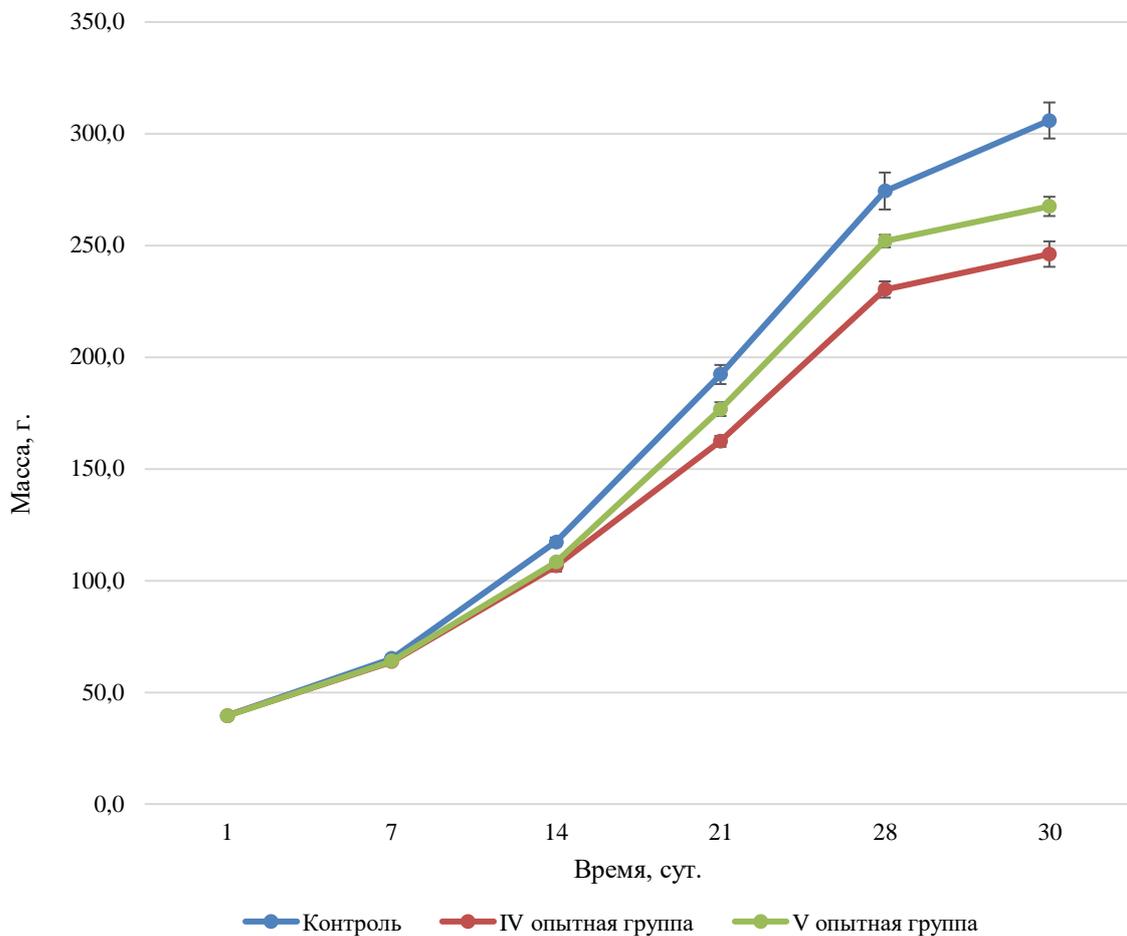


Рисунок 40 – Масса тела цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, г.

### 3.4.3 Оценка функционального состояния клеток железистого желудка цыплят, полученные Методом со Stains all

При люминесцентно-микроскопическом исследовании окрашенных метакроматическим красителем «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп наблюдали своеобразную люминесцентно-микроскопическую картину, характеризующуюся сочетанием синего, зеленоватого и малиново-красного цветов с разной степенью интенсивности на различных участках.

Методом визуальной микроскопии исследовали гистопрепараты железистого желудка цыплят на 1-8, 10, 15, 21, 27 и 30 сутки их жизни. Люминесценция, обнаруживаемая визуально в гистологических срезах, указывала на особенности распределения в его стенке нуклеиновых кислот и белков, связанных с используемым флуорохромом. В то же время каких-либо отличительных люминесцентно-микроскопических признаков, позволяющих судить о динамике содержания нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка, отражающей колебания интенсивности люминесценции и зависящей от возраста и особенностей патоморфогенеза инфекционного заболевания, с помощью данного метода выявить не удалось.

Для объективной оценки функционального состояния клеток железистого желудка с помощью метода со Stains all устанавливали коэффициенты соотношения нуклеиновых кислот и белков в покровном эпителии слизистой оболочки, эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки, клетках соединительной ткани подслизистой основы и клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп.

Полученные результаты подвергали статистической обработке. Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп представлены в таблице 15, на рисунках 41, приложении 10 (рисунках 76-87).

Как видно из таблицы 15, на рисунке 41 у цыплят II контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки жизни коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков возрос с  $1,41 \pm 0,02$  у.е. в первые сутки до  $2,72 \pm 0,05$  у.е. на 30 сутки жизни.

Данное обстоятельство может быть объяснено постепенным и опережающим ростом величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста величины ее интенсивности при длине волны 628 нм (белки), который наблюдался на спектрах люминесценции эпителия слизистой оболочки.

Таблица 15 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят (II) контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп		
	II контрольная	Опытные	
		IV	V
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 (\* -  $P \leq 0,05$ , \*\* -  $P \leq 0,01$ , \*\*\* -  $P \leq 0,001$ )

Эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода увеличения возраста цыплят (рисунок 66) (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2019).

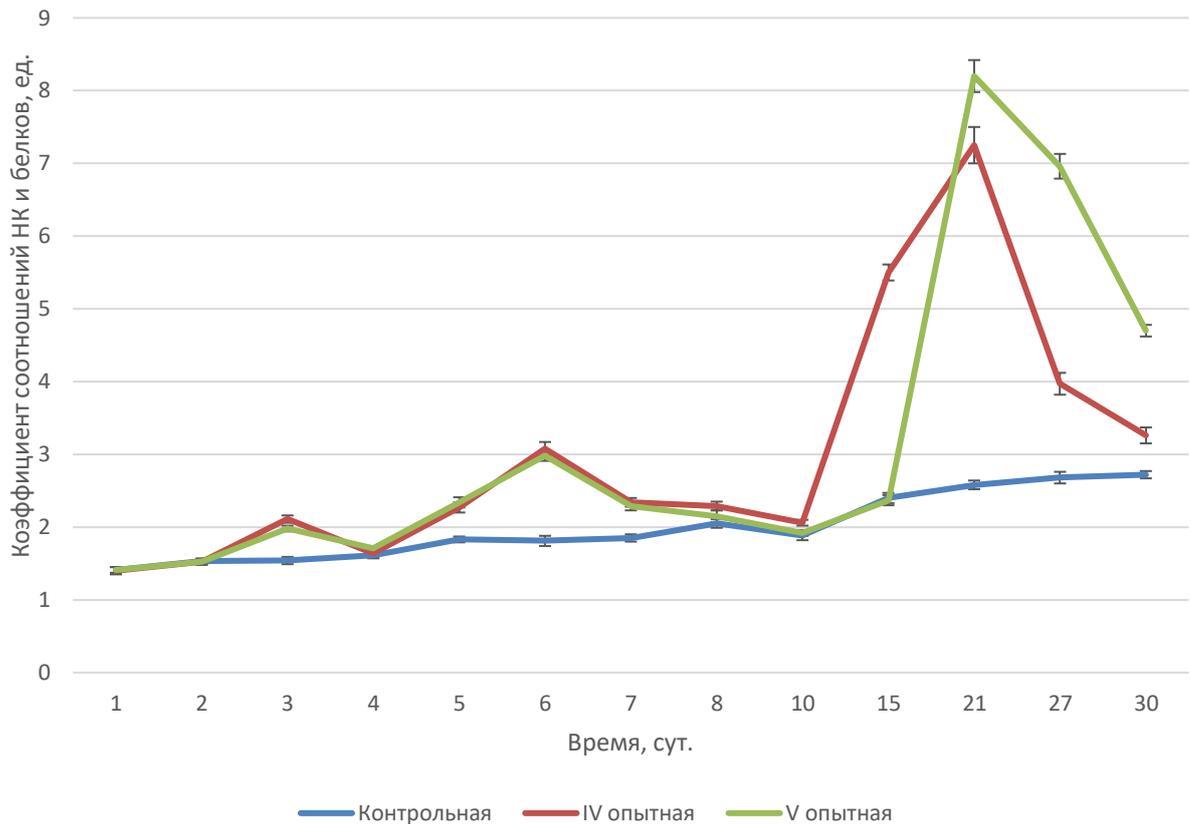


Рисунок 41 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (IV опытная группа) по сравнению со II контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) характеризовался наличием трех пиков увеличения показателя на 3, 6 и 21 сутки. Появление слабо выраженного пика на 8 сутки могло быть результатом некоторого снижения  $Ib$  на фоне практически неизменной величины  $In$ . Значительное увеличение  $K_p$  на 21 сутки предположительно связан с быстрым уменьшением  $Ib$  при незначительном увеличении  $In$  (рисунок 67). К 30 суткам жизни показатель  $K_p$  приблизился к значениям контрольной группы, но был выше:  $3,26 \pm 0,11$  у.е. – IV опытная группа,  $2,72 \pm 0,05$  у.е. – II контрольная группа.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом и антибиотикотерапией (V опытная группа) динамика показателей соотношения нуклеиновых кислот и белков в целом была схожей с динамикой IV опытной группы. Однако в отличие от показателей IV опытной группы у цыплят V опытной группы под влиянием антибиотикотерапии на 15 сутки жизни (8 сутки после начала лечения) показатель  $K_p$  был в пределах показателей II контрольной группы. Это может быть результатом более высоких показателей  $In$  и  $Ib$ , и свидетельствует о повышении функциональной активности клеток покровного эпителия, регистрируемой уже на начальном этапе лечения клебсиеллеза (рисунок 68). К 30-ым суткам значение коэффициента было самым большим среди исследуемых групп второго эксперимента. Данное обстоятельство может быть объяснено значительным ростом величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста величины ее интенсивности при длине волны 628 нм (белки) (рисунок 68) (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2019).

Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках эпителия альвеолярных желез железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп по данным двухволнового метода люминесцентного спектрального анализа представлены в таблице 16, на рисунках 42, 69-71.

Как видно из таблицы 17, на рисунке 42 у цыплят II контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков возрос с  $2,16 \pm 0,04$  у.е. в первые сутки до  $4,38 \pm 0,15$  у.е. на 30 сутки жизни.

Данное обстоятельство может быть объяснено постепенным и опережающим ростом величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста величины ее интенсивности при длине волны 620 нм (белки), который наблюдался на спектрах люминесценции эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки (рисунок 69) (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2019). Эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода увеличения возраста цыплят.

Таблица 16 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков  $K_a$  в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп		
	II контрольная	Опытные	
		IV	V
1	2,16±0,04	2,09±0,07	2,07±0,07
2	2,1±0,06	2,16±0,04	2,08±0,06
3	2,23±0,04	2,74±0,05***	2,68±0,06***
4	2,25±0,05	2,01±0,04***	1,84±0,06***
5	2,27±0,05	3,96±0,11***	3,81±0,12***
6	2,32±0,05	3,36±0,06***	3,25±0,11***
7	2,43±0,07	2,23±0,05***	2,19±0,06***
8	2,63±0,06	3,31±0,09***	3,28±0,07***
10	2,83±0,08	2,96±0,06*	1,81±0,06***
15	3,01±0,10	3,52±0,08***	2,84±0,08*
21	3,83±0,13	4,66±0,09***	3,74±0,08
27	4,16±0,09	4,1±0,1	3,97±0,13***
30	4,38±0,15	4,07±0,16*	4,32±0,1

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



Рисунок 42 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_a$ ) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят (II) контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (IV опытная группа) по сравнению с II контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался наличием четырех пиков увеличения показателя на 3, 5, 8 и 21 сутки жизни. Появление пиков увеличения значений коэффициентов на 3, 5, 8 сутки могло быть результатом более резкого снижения  $I_n$  по сравнению с уменьшением величины  $I_b$ , а резкий скачок на 21 сутки может быть связан с более быстрым ростом величины  $I_n$  по сравнению с увеличением  $I_b$  (рисунок 70). К 30 суткам показатель приблизился к значениям контрольной группы, но был меньше:  $4,07 \pm 0,16$  у.е. – IV опытная группа,  $4,38 \pm 0,15$  у.е. – II контрольная группа.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом и антибиотикотерапией (V опытная группа) кривая коэффициентов соотношений до восьмидесяти суток жизни имела тот же характер, что и у цыплят IV опытной группы. В дальнейшем кривая коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков была

ниже показателей цыплят II контрольной группы, приближаясь к значениям только к 30 суткам жизни. На 30-е сутки жизни показатель  $4,32 \pm 0,1$  у.е. соответствовал показателю II контрольной группы. Это могло быть связано с более быстрым увеличением значений  $Ib$  по сравнению с ростом  $In$ , происходящим на фоне общего увеличения указанных показателей (рисунок 71).

Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп по данным двухволнового метода люминесцентного спектрального анализа представлены в таблице 17, на рисунках 43, 72-74.

Как видно из таблицы 17, на рисунке 43 у цыплят II контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возраста с 1 по 30 сутки коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков возрос с  $2,82 \pm 0,06$  у.е. в первые сутки до  $6,34 \pm 0,19$  у.е. Данное обстоятельство может быть объяснено постепенным и опережающим ростом величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) относительно роста величины ее интенсивности при длине волны 620 нм (белки), который наблюдался на спектрах люминесценции в клетках соединительной ткани. (рисунок 72) Эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода увеличения возраста цыплят.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (IV опытная группа) по сравнению с II контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался снижением значения показателя на третьи и четвертые сутки до  $2,48 \pm 0,07$  и  $1,66 \pm 0,03$  у.е. соответственно. Причиной снижения показателя является опережающий рост величины интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 620 нм (белки) относительно роста величины ее интенсивности при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты). На кривой коэффициентов соотношений отмечалось три пика на 8, 21 и 30 сутки жизни.

Таблица 17 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_m$ ) в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп		
	II контрольная	Опытные	
		IV	V
1	2,82±0,06	2,74±0,10	2,85±0,06
2	2,97±0,08	2,9±0,08	2,79±0,08*
3	2,8±0,09	2,48±0,07***	2,54±0,06***
4	2,73±0,07	1,66±0,03***	1,75±0,05***
5	2,77±0,07	1,96±0,07***	1,93±0,05***
6	2,76±0,10	2,32±0,05***	2,43±0,09***
7	3,20±0,10	3,37±0,12*	3,43±0,09**
8	3,32±0,09	4,13±0,10***	3,84±0,08***
10	3,42±0,09	3,89±0,14***	3,65±0,11*
15	4,1±0,09	4,9±0,12***	4,35±0,10**
21	5,86±0,12	15,61±0,29***	5,84±0,17
27	6,32±0,12	11,78±0,30***	10,36±0,27***
30	6,34±0,19	13,29±0,25***	9,26±0,34***

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

Появление пика на 8 сутки жизни вероятно связано с быстрым снижением  $I_n$  в сравнении с уменьшением величины  $I_b$ . Резкий скачок на 21 сутки связан с более быстрым ростом величины  $I_n$  по сравнению с увеличением  $I_b$ , а на 30 сутки – с более быстрым снижением  $I_b$  по сравнению с уменьшением  $I_n$  (рисунк 73). К 30 суткам показатель был значительно больше значения II контрольной группы: 13,29±0,25 у.е. – IV опытная группа, 6,34±0,19 у.е. – II контрольная группа.

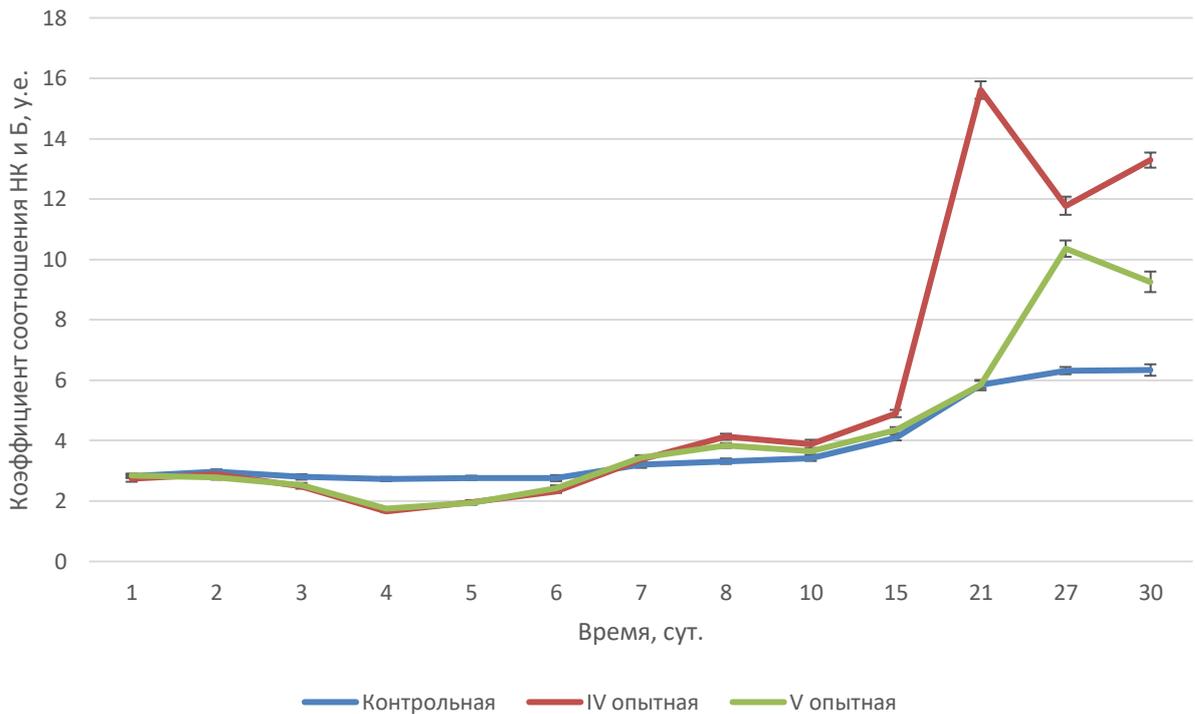


Рисунок 43 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_m$ ) в клетках соединительной ткани слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.

У цыплят с экспериментальным эшерихиозом и антибиотикотерапией (V опытная группа) картина изменения показателей имела схожий характер с IV опытной группы и характеризовалась снижением коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков. Причиной снижения показателя является результатом более высоких показателей  $I_n$  по отношению к  $I_b$ , что свидетельствует о повышении функциональной активности клеток соединительной ткани подслизистой основы, регистрируемой уже на начальном этапе лечения клебсиеллеза. (рисунок 74). В период 8-21 сутки жизни показатели V опытной группы показатели постепенно пришли в соответствие с показателями II контрольной группы. При этом на 27 и 30 сутки жизни наблюдали отклонение показателей V опытной группы от значений II контрольной группы (рисунок 43).

Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп представлены в таблицах 18, на рисунках 44, 75-77.

Таблица 18 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_s$ ) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп

Сутки жизни	Наименование групп		
	II контрольная	Опытные	
		IV	V
1	1,03±0,04	1,02±0,03	1,03±0,03
2	1,02±0,03	1,02±0,02	1,03±0,02
3	1,52±0,05	1,23±0,03***	1,17±0,04***
4	1,88±0,05	1,35±0,04***	1,36±0,04***
5	2,46±0,05	2,24±0,07***	2,23±0,07***
6	2,54±0,07	1,94±0,07***	2,02±0,05***
7	2,90±0,06	2,83±0,06***	2,85±0,07
8	3,12±0,07	1,70±0,06***	2,13±0,04***
10	3,65±0,07	2,32±0,06***	2,76±0,1***
15	3,77±0,15	6,02±0,19***	6,98±0,17***
21	4,21±0,1	14,26±0,42***	8,33±0,2***
27	4,65±0,14	3,27±0,1***	6,48±0,25***
30	4,93±0,13	3,70±0,13***	4,18±0,16***

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

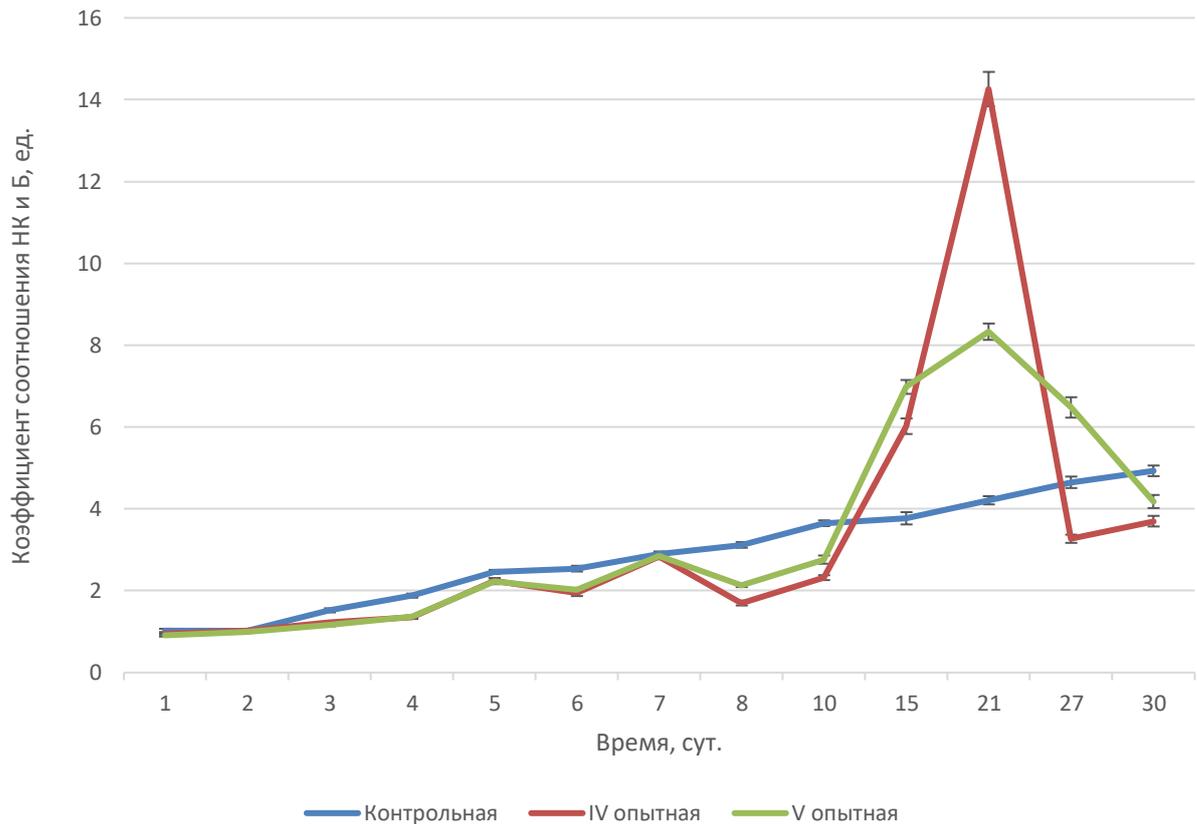


Рисунок 44 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_s$ ) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.

Как видно из таблицы 18, на рисунке 44 у цыплят II контрольной группы на протяжении всего периода увеличения их возрастает с 1 по 30 сутки коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков возрос с  $1,03 \pm 0,04$  у.е. в первые сутки до  $4,93 \pm 0,13$  у.е. в 30 сутки жизни. Данный результат может быть связан с увеличением интенсивности люминесценции при длине волны 480 нм (НК) относительно роста значений интенсивности при длине волны 630 нм (белки) (рисунок 75). Эту тенденцию наблюдали на протяжении всего периода увеличения возраста цыплят.

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом (IV опытная группа) по сравнению с II контрольной группой коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков характеризовался снижением значения показателя, начиная с третьих суток жизни. Это может быть связано с увеличением интенсивности люминесценции при длине волны 630 нм (белки) на фоне снижения величины

ее интенсивности при длине волны 480 нм (НК). На 21 сутки жизни отмечалось значительное увеличение коэффициенты соотношений в результате значительного увеличения *In* на фоне умеренного повышения величины *Ib* в клетках серозной оболочки (рисунок 76). К 30 суткам жизни показатель был меньше значения II контрольной группы:  $3,7 \pm 0,13$  у.е. – IV опытная группа,  $4,93 \pm 0,13$  у.е. – II контрольная группа, что является следствием уменьшением величины *In* на фоне роста *Ib* (рисунок 76).

У цыплят с экспериментальным клебсиеллезом и антибиотикотерапией (V опытная группа) динамика показателей имела схожую с IV опытной группой картину изменения значений показателей. Однако значения коэффициентов, исключая 21 сутки, были несколько ниже, что могло быть результатом более высоких показателей *In* и *Ib*. Это обстоятельство можно рассматривать как следствие усиления функциональной активности клеток серозной оболочки, которое отмечалось уже на начальном этапе лечения клебсиеллеза. При этом следует указать, что рост показателей *In* значительно опережал увеличение значений *Ib*. Резкий скачок на 21 сутки мог быть связан с опережающим снижением величины *Ib* по сравнению с *In*. (рисунок 77). К 30 суткам показатель был меньше значения II контрольной группы:  $4,18 \pm 0,16$  у.е. – V опытная группа,  $4,93 \pm 0,13$  у.е. – II контрольная группа. Это связано с некоторым увеличением величины *Ib* н фоне снижения *In*, (рисунок 78).

Поскольку коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков служит критерием интенсивности синтетических процессов, происходящих в клетках, сравнительному анализу были подвергнуты данные показатели в клетках разных видов: в покровном эпителии слизистой оболочки, эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки, в клетках соединительной ткани и серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп (рисунки 45-47).

Изменения значений коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в исследуемых клетках железистого желудка цыплят II контрольной группы представлены на рисунке 45.

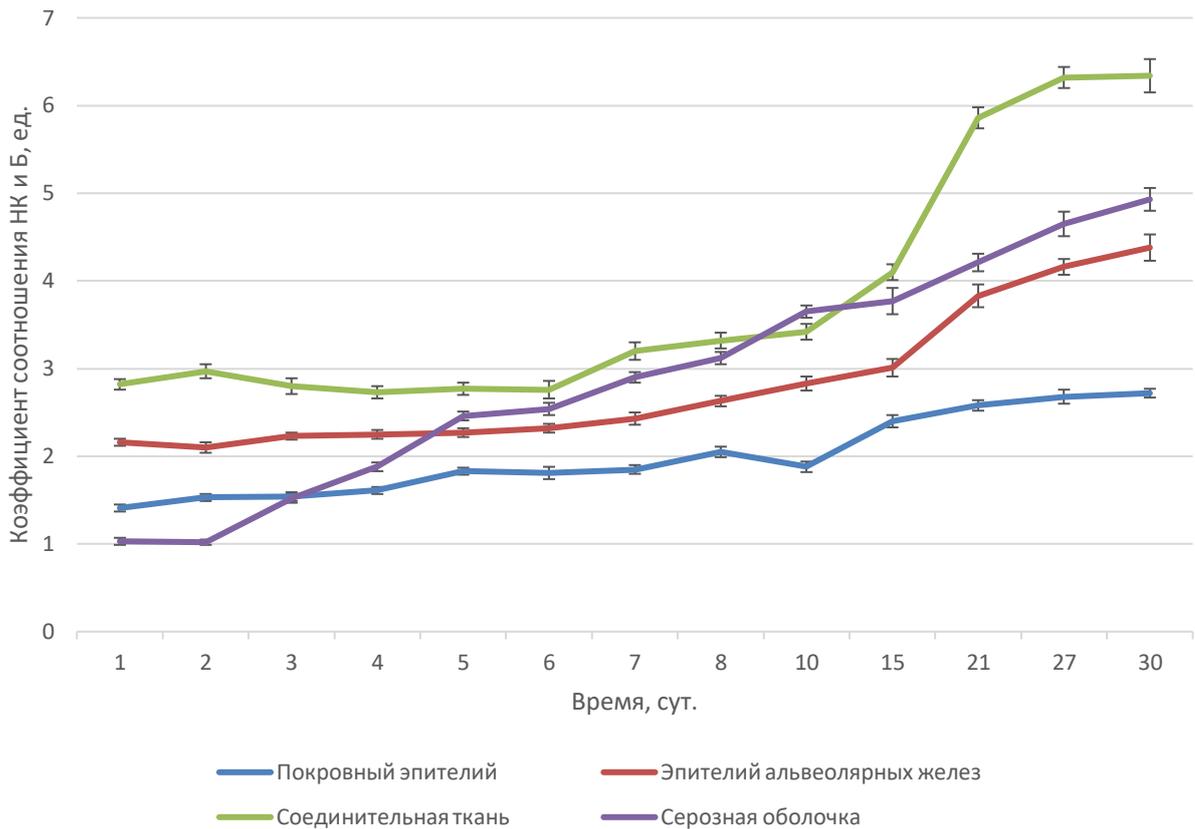


Рисунок 45 – Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках железистого желудка цыплят II контрольной группы, у.е.

Как видно на рисунке 45 разные виды клеток (покровный эпителий, железистый эпителий, клетки соединительная ткань, мезотелий) цыплят II контрольной группы имеют разные коэффициенты соотношения нуклеиновых кислот и белков в период 1-30 сутки жизни. Наименьшее значение показателя выявлено в 1 сутки в клетках мезотелия, а наибольшее – в клетках соединительной ткани, что говорит о характере и интенсивности внутриклеточных процессов. Для всех представленных видов клеток было характерно увеличение значения показателей с возрастом.

Изменения значений коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в исследуемых клетках железистого желудка цыплят IV опытной группы представлены на рисунке 46.

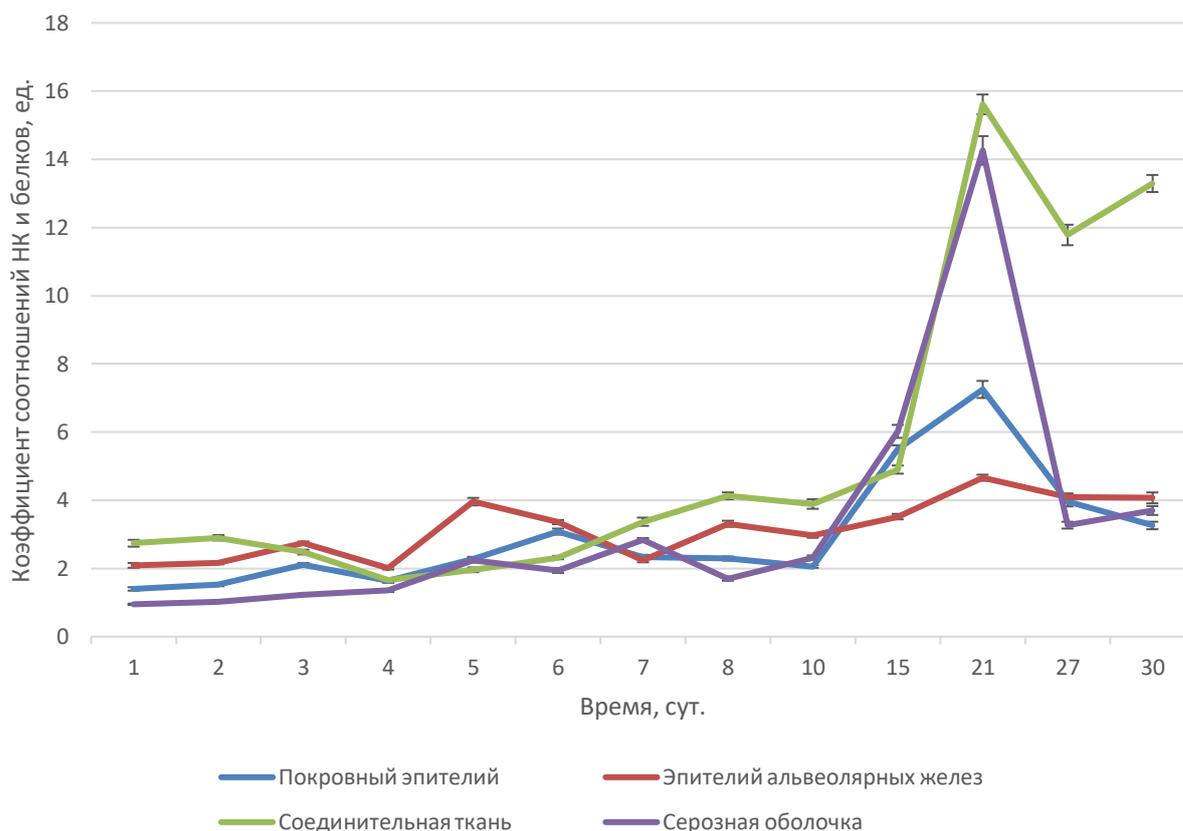


Рисунок 46 – Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках железистого желудка цыплят IV опытной группы, у.е.

Как видно на рисунке 46 воздействие патогенного агента приводит к снижению значений коэффициентов во всех исследуемых участках, за исключением клеток соединительной ткани, железистого желудка цыплят IV опытной группы на 4-ые сутки жизни. В дальнейшем динамика изменений показателей была характерна для каждого вида клеток, тканей и возраста цыплят.

Изменения значений коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в исследуемых клетках железистого желудка цыплят V опытной группы представлены на рисунке 47.

Как видно на рисунке 47 динамика изменения значений коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и Б имеет особенности, характерные для каждого типа клеток и тканей, а также возраста цыплят.

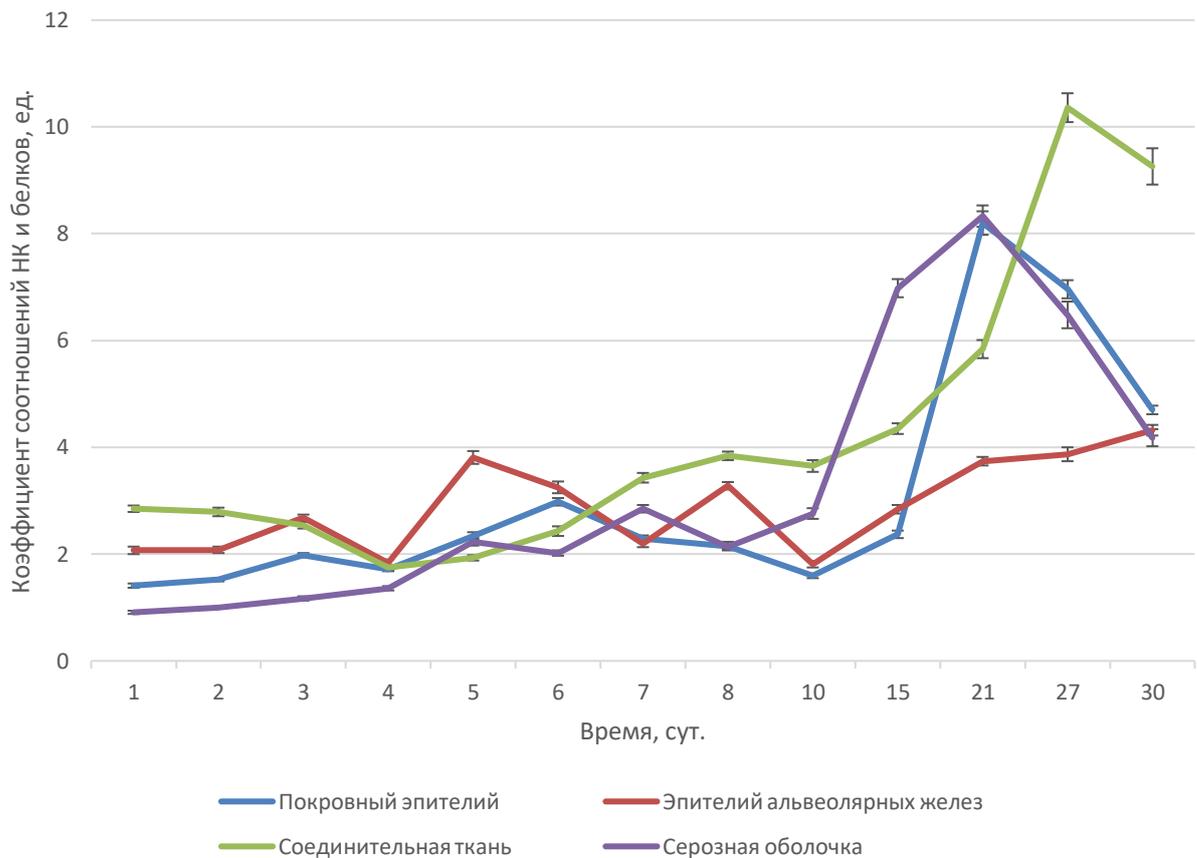


Рисунок 47 – Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках железистого желудка цыплят V опытной группы, у.е.

На основании Метода со Stains all были разработаны люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при антибиотикотерапии клебсиеллеза (таблица 19).

Таблица 19 – Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при антибиотикотерапии клембиселлеза по результатам Метода со Stains all, у.е.

Сутки жизни	Наименование групп		
	II контрольная	Опытные	
		IV	V
1	2	3	4
Покровный эпителий слизистой оболочки			
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
Эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки			
7*	2,36-2,50	2,18-2,28	2,13-2,25
8	2,57-2,69	3,22-3,40	3,21-3,35
10	2,75-2,91	2,9-3,02	1,75-1,87
15	2,91-3,11	3,44-3,60	2,76-2,92
21	3,7-3,96	4,57-4,75	2,66-2,82
27	4,07-4,25	4-4,20	3,74-4,00
30	4,23-4,53	3,91-4,23	4,22-4,42
Клетки соединительной ткани подслизистой основы			
7*	3,1-3,3	3,25-3,49	3,34-3,52
8	3,23-3,41	4,03-4,23	3,76-3,92
10	3,33-3,51	3,75-4,03	3,54-3,76

1	2	3	4
15	4,01-4,19	4,78-5,02	4,25-4,45
21	5,74-5,98	15,32-15,9	5,67-6,01
27	6,2-6,44	11,48-12,08	10,09-10,63
30	6,15-6,53	13,04-13,54	8,92-9,60
Мезотелий серозной оболочки			
7*	2,84-2,96	2,77-2,89	2,78-2,92
8	3,05-3,19	1,64-1,76	2,09-2,17
10	3,58-3,72	2,26-2,38	2,66-2,86
15	3,62-3,92	5,83-6,21	6,81-7,15
21	4,11-4,31	13,84-14,68	8,13-8,53
27	4,51-4,79	3,17-3,37	6,23-6,73
30	4,8-5,06	3,57-3,83	4,02-4,34

Примечание: \* - сутки начала антибиотикотерапии.

Результаты апробации Метода со Stains all с исследованием гистологических срезов железистого желудка цыплят контрольной группы и опытных групп, подвергавшихся экспериментальному воспроизведению клебсиеллеза и антибиотикотерапии клебсиеллеза, свидетельствуют о том, что:

1. Разработанный двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток с использованием метакроматического флуорохрома «Stains all» для обнаружения, определения соотношения органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в гистологических срезах желудочно-кишечного тракта птиц и оценки их функционального состояния позволяет фиксировать изменение функционального состояния клеток благодаря количественному измерению соотношения содержащимся в них нуклеиновых кислот и белков.

2. Проведенный сравнительный анализ функционального состояния разных видов клеток железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (IV,V) групп позволил установить:

2.1. У цыплят II контрольной группы:

- динамика коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки, соединительной ткани подслизистой основы, мезотелия серозной оболочки характеризуется постепенным возрастанием его показателей в соответствии с увеличением возраста птицы, что обусловлено опережающим ростом количества нуклеиновых кислот относительно белков;

- в первые сутки жизни цыплят наибольшее значение показателя коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) зафиксировано в клетках соединительной ткани ( $2,82 \pm 0,06$  у.е.), эпителии альвеолярных желез ( $2,16 \pm 0,04$  у.е.). В покровном эпителии слизистой оболочки и мезотелии показатели были ниже,  $1,41 \pm 0,02$  у.е. и  $1,03 \pm 0,04$  у.е. соответственно;

- наибольшую динамику роста коэффициента отмечали у мезотелия (378,6 %), эпителия альвеолярных желез (102,8 %) и клеток соединительной ткани (124,8 %). Динамика роста значения коэффициента в покровном эпителии слизистой оболочки составила 92,9 %.

2.2. У цыплят IV опытной группы, зараженных клебсиеллезом и не подвергавшихся антибиотикотерапии:

- изменения в функциональном состоянии клеток железистого желудка, выраженные показателем «Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков», зафиксированы начиная с первых суток после заражения;

- изменения функционального состояния клеток железистого желудка были характерны для разных видов исследуемых клеток. На следующие сутки после заражения в покровном эпителии слизистой оболочки, эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки было зафиксировано увеличение значения

показателя «Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков», в клетках соединительной ткани подслизистой основы и мезотелии серозной оболочки – снижение.

- к 30-м суткам жизни значения коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в исследуемых клетках не соответствовал показателям II контрольной группы.

2.3. У цыплят V опытной группы, зараженных клебсиеллезом и подвергавшихся антибиотикотерапии, функциональное состояние клеток железистого желудка характеризовалось:

- в период 1-7 сутки схожей с IV опытной группой динамикой изменения показателя «Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и белков»;
- в период 8-30 сутки (1-23 сутки с начала антибиотикотерапии):
  - в покровном эпителии слизистой оболочки:
    - восстановлением функционального состояния клеток на 8 сутки с начала лечения;
    - не соответствием показателей функционального состояния клеток значениями II контрольной группы на 14, 20 и 23 сутки с начала лечения;
  - в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки:
    - восстановлением функционального состояния клеток к 8 суткам с начала лечения;
  - в клетках соединительной ткани подслизистой основы:
    - восстановлением функционального состояния ткани к 14 суткам с начала лечения;
    - не соответствием показателей функционального состояния клеток в сравнении со значениями контрольной группы на 20 и 23 сутки с начала лечения.
  - в мезотелии серозной оболочки:

– не соответствием показателей функционального состояния клеток в сравнении со значениями контрольной группы в период 1-23 сутки с начала антибиотикотерапии.

3. Данные о коэффициентах соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки, эпителия альвеолярных желез, клетках соединительной ткани подслизистой основы, мезотелия серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп могут быть использованы в качестве люминесцентно-микроскопических критериев диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при клебсиеллезе и при проведении антибиотикотерапии (таблица 19).

4. Динамика изменений коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят, установленная методом люминесцентного спектрального анализа с использованием метахроматического флуоресцентного красителя «Stains all», отражала особенности их функционального состояния у цыплят контрольной группы, а также при заболевании клебсиеллезом и его антибиотикотерапии. Применение для лечения лекарственного средства «Энрофлон» приводило к восстановлению функциональной активности этих клеток, что нашло отражение на кривой коэффициентов соотношения нуклеиновых кислот и белков. Результаты проведенного исследования показали, что с помощью данного метода можно регистрировать изменения функционального состояния клеток этой зоны в процессе проводимого лечения.

#### **3.4.4 Сведения о функциональном состоянии клеток железистого желудка цыплят, полученные Модификацией метода со Stains all**

При люминесцентно-микроскопическом исследовании окрашенных метахроматическим красителем «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной группы наблюдали своеобразную

люминесцентно-микроскопическую картину, характеризующуюся сочетанием синего, зеленоватого и малиново-красного цветов с разной степенью интенсивности на различных участках.

Методом визуальной микроскопии исследовали гистопрепараты железистого желудка цыплят контрольной и опытной группы на 1-30 сутки их жизни. Люминесценция, обнаруживаемая визуально в гистологических срезах, позволяла проследить особенности распределения в его стенке нуклеиновых кислот и белков, связанных с используемым флуорохромом. Однако каких-либо отличительных люминесцентно-микроскопических признаков, позволяющих судить о динамике содержания нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка, отражающей колебания интенсивности люминесценции и зависящей от возраста и особенностей патоморфогенеза инфекционного заболевания, с помощью данного метода выявить не удалось.

Для объективной оценки функционального состояния клеток железистого желудка применяли модификацию метода люминесцентного спектрального анализа с использованием люминесцентного метахроматического красителя «Stains all», с помощью которого рассчитывали коэффициенты соотношения нуклеиновых кислот и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной ( $\lambda_1$ ) и V опытной ( $\lambda_2$ ) групп, а также показатель функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка обследуемой птицы (С).

Полученные результаты подвергали статистической обработке. Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп по данным модификации метода с Stains all представлены в таблицы 20.

Таблица 20 – Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной ( $\lambda_1$ ) и V опытной ( $\lambda_2$ ) групп, показатель функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка V опытной группы (C)

Сутки жизни	Сутки с начала лечения	Наименование групп		
		$\lambda_1$ (n-210)	$\lambda_2$ (n-210)	C
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 *S* 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 лечения привело к положительной динамике восстановления функционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы. Начиная с восьмых суток с начала антибиотикотерапии функциональное состояние исследуемых клеток соответствовало показателям контрольной группы.

Результаты апробации модификации метода с Stains all на клетках железистого желудка цыплят контрольной группы и цыплят при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза и проведении антибиотикотерапии свидетельствуют о том, что:

1. Разработанная модификация метода оценки функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят по соотношению нуклеиновых кислот и белков с применением флуорохрома «Stains all» позволяет фиксировать изменение функционального состояния клеток благодаря количественному измерению соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетках, а также осуществлять количественную оценку и сравнивать функциональное состояние клеток железистого желудка контрольной и опытной групп.

2. Проведенный сравнительный анализ функционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка интактных цыплят, цыплят при экспериментальной кишечной инфекции и проведении антибиотикотерапии позволил установить:

2.1. У цыплят V опытной группы:

- изменения в функциональном состоянии клеток железистого желудка, выраженные показателем «Коэффициент соотношения нуклеиновых кислот и

белков», относительно показателей II контрольной группы зафиксированы начиная с первых суток после заражения;

• проведение антибиотикотерапии приводило к постепенному восстановлению функционального состояния исследуемых клеток на 3-23 сутки с начала лечения. Начиная с 8 суток с начала лечения показатели функционального состояния исследуемых клеток соответствовали показателям контрольной группы.

3. Данные о коэффициентах соотношения нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп могут быть использованы в качестве люминесцентно-микроскопических критериев диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при антибиотикотерапии клебсиеллеза.

4. По изменениям показателя функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка V опытной группы (С) возможно проведение оценки степени влияния антибиотикотерапии на процесс восстановления функционального состояния клеток обследуемой (больной) птицы (таблица 20).

### **3.4.5 Сведения о функциональном состоянии клеток железистого желудка цыплят, полученные Методом с этидиумом бромидом и ДХТАФ**

Объектом для проведения апробации метода люминесцентного спектрального анализа служили клетки эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка. Величину интенсивности люминесценции регистрировали в синей-зеленой (528 нм) и красной (648 нм) областях ее спектра, и по полученным данным определяли количество белков и нуклеиновых кислот (в условных единицах) в стенке железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп в соответствии с разработанным методом (Akchurin, S.V. et al., 2020b).

Рассчитывали количество нуклеиновых кислот и белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп, а также показатель функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка обследуемой птицы по количественному содержанию нуклеиновых кислот (*Kn*) и белков (*Kb*). Полученные результаты подвергали статистической обработке.

Количество нуклеиновых кислот в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп представлены в таблице 21, на рисунке 48.

Таблица 21 – Количество нуклеиновых кислот в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп, у.е.

Сутки жизни	Сутки с начала лечения	Наименование групп	
		II контрольная	V опытная
7	-	8,25±0,06	7,25±0,04***
8	1	8,27±0,11	7,23±0,07***
9	2	8,47±0,07	7,71±0,07***
10	3	9,16±0,07	8,24±0,08***
11	4	9,64±0,04	9,28±0,05***
12	5	10,35±0,05	10,11±0,05***
13	6	10,65±0,06	10,44±0,06***
15	8	11,22±0,05	11,18±0,05

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

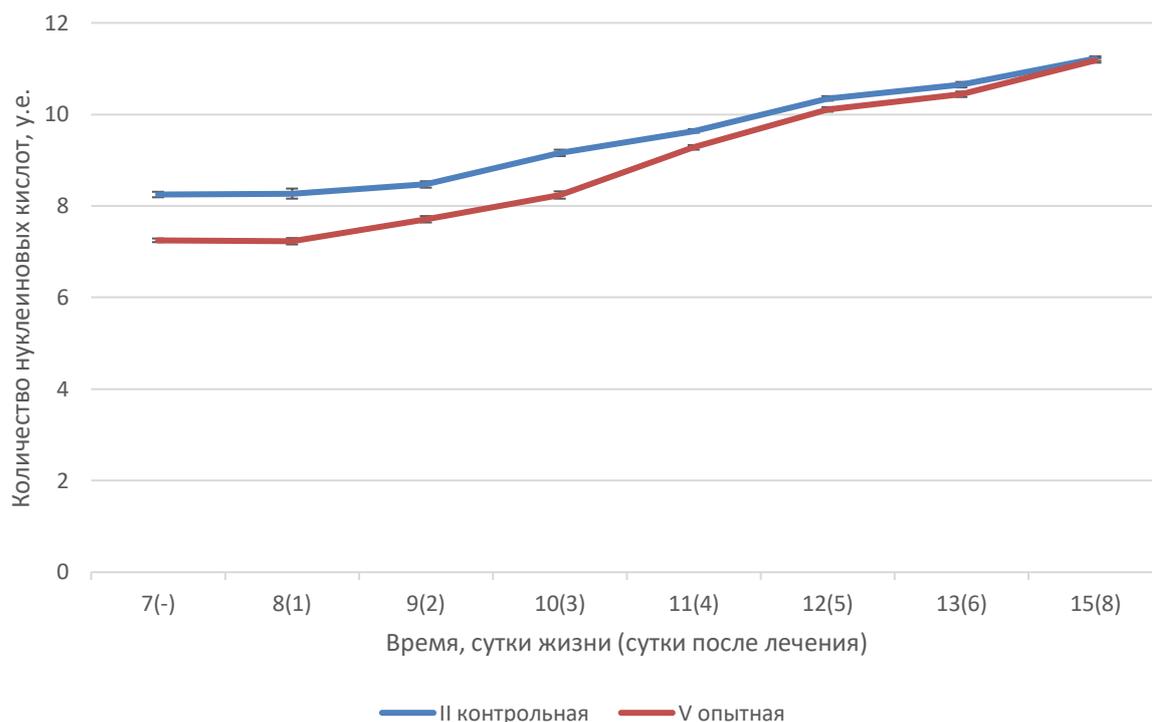


Рисунок 48 – Количество нуклеиновых кислот в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп

Как видно из таблицы 21, на рисунке 48 антибиотикотерапия способствовала восстановлению количественного содержания нуклеиновых кислот в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы, начиная с первых суток перорального введения антибиотиков. Положительная динамика продолжилась вплоть до 8-х суток лечения цыплят препаратом «Энрофлон». Причем количественное содержание нуклеиновых кислот к этим суткам было в пределах аналогичных показателей контрольной группы.

Количество белков в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп представлены в таблице 22, на рисунке 49.

Таблица 22 – Количество белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп, у.е.

Сутки жизни	Сутки с начала лечения	Наименование групп	
		II контрольная	V опытная
7	-	4,93±0,06	3,83±0,06***
8	1	4,99±0,08	3,92±0,06***
9	2	5,23±0,05	4,42±0,05***
10	3	5,48±0,06	4,87±0,07***
11	4	6,04±0,17	5,49±0,07***
12	5	6,47±0,08	6,30±0,12*
13	6	6,95±0,08	6,78±0,04***
15	8	7,23±0,07	7,15±0,06

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

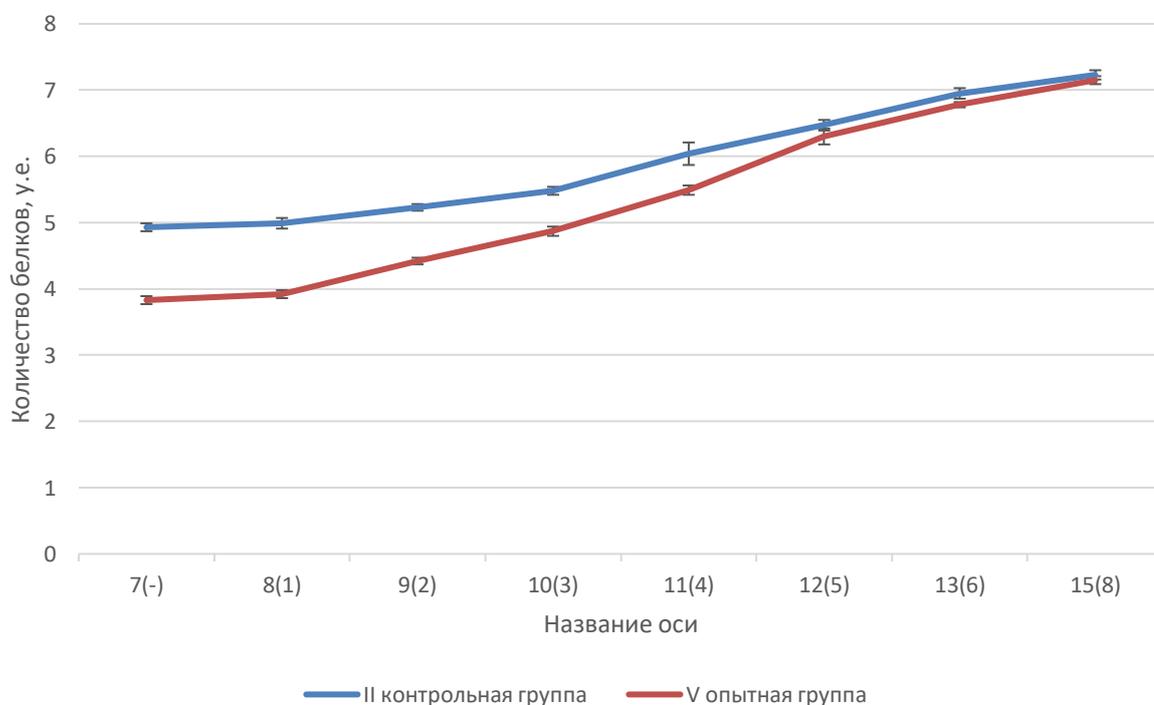


Рисунок 49 – Количество белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп

Как видно из таблицы 22, на рисунке 49 антибиотикотерапия способствовала восстановлению количественного содержания белков в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы, начиная с первых суток перорального введения антибиотиков.

Положительная динамика продолжилась вплоть до 8-х суток лечения цыплят препаратом «Энрофлон». Причем количественное содержание белков к этим суткам было в пределах аналогичных показателей контрольной группы.

По полученному количественному содержанию нуклеиновых кислот (*Kn*) и белков (*Kb*) в зоне интереса железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп определяли показатель функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка птицы, экспериментально зараженной клебсиеллезом и подвергавшейся антибиотикотерапии.

Показатели функционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Показатели функционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят V 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

Результаты апробации Метода с этидиумом бромидом и ДХТАФ с исследованием клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы и цыплят при экспериментальном воспроизведении клебсиеллеза и проведении антибиотикотерапии свидетельствуют о том, что:

1. Разработанный двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток с этидиумом бромидом и ДХТАФ позволяет выявлять органические вещества (нуклеиновые кислоты и белки) в клетках, определять их количественное содержание и оценивать изменение функционального состояния клеток железистого желудка цыплят благодаря измерению количественного содержания в них нуклеиновых кислот и белков.

2. Проведенный сравнительный анализ функционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят позволил установить, что у цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом и подвергавшихся антибиотикотерапии:

- количественное содержание нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) было достоверно ниже аналогичных показателей II контрольной группы на 6 сутки жизни цыплят, то есть до начала антибиотикотерапии;

- проведение антибиотикотерапии приводило к постепенному восстановлению функционального состояния исследуемых клеток, начиная с третьих суток перорального введения антибиотика «Энрофлон».

3. Данные о количественном содержании нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках эпителия альвеолярных желез цыплят II контрольной и V опытных групп, а также показатели функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка V опытной группы, определяемые по разработанной методике, могут быть использованы в качестве люминесцентно-микроскопических критериев диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при клебсиеллезе и при проведении антибиотикотерапии (таблица 23).

4. Разработанный метод позволяет оценивать функциональное состояние клеток железистого желудка цыплят в ранние сроки лечения клебсиеллеза, что позволяет изучать влияние лекарственного средства и отслеживать эффективность лечения данным препаратом, начиная с первых суток его применения.

### **3.5 Обсуждение полученных результатов**

Промышленное птицеводство играет важнейшую роль в обеспечении населения доступным белком животного происхождения. Производство и потребление мяса бройлеров растет во всем мире быстрыми темпами и продолжит свой рост (Cowieson A.J., Selle P.H., 2012; FAO, 2017).

Современное птицеводство сталкивается с рядом проблем. Одна из них – бактериальные инфекции. Среди них, наибольшую долю занимают заболевания, вызываемые *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*. Данные кишечные инфекции кур не только наносят колоссальный экономический ущерб, но и играют ведущую роль в возникновении болезней человека, в первую очередь, пищевых отравлений (Schouler C. Et al., 2012; Mellata M., 2013; Mohammed Aly M., Khalil S., Metwaly A., 2014; Eng S.K. et al., 2015; Wernicki A., Nowaczek A., Urban-Chmiel R., 2017).

Важнейшую проблему представляет также сокращение использования антибиотиков-стимуляторов роста под влиянием запретительных мер со стороны государства или меняющегося спроса рынка птицеводческой продукции. В связи с этим наиболее актуальным становится совершенствование мер профилактики болезней, а также применение заменителей антибиотиков. В настоящее время для птицеводства разработаны и предлагаются пробиотики, пребиотики, синбиотики, ферменты, органические кислоты, иммуностимуляторы, бактериоцины, бактериофаги, фитогенные кормовые добавки, фитоциды, наночастицы, эфирные масла и др. (Kum S. et al., 2010; Ghasemi H.A. et al., 2014; Кузьменко П.М., 2014; Поломошнова И.А., 2015; Daneshmand A. et al., 2015; Park S.H. et al., 2016; Mohammadagheri N. et al., 2016; Mehdi Y. et al., 2018).

Однако, альтернативы антибиотикам пока не получили широкого применения на практике.

Очевидно, что существует высокая потребность промышленного птицеводства в научных решениях и разработках, позволяющих создавать новые высокоэффективные средства профилактики и лечения инфекционных заболеваний, учитывать запросы потребителей продукции, а также требования государства по сокращению применения антибиотиков в нетерапевтических дозах.

Системный подход к разработке новых профилактических и лечебных средств требует использования биомаркеров, способных улавливать тонкие биохимические изменения в клетках и в функциональном состоянии организма птиц, в том числе его отдельных систем. При этом предпочтение отдается комбинации биомаркеров, которая по мнению R. Ducatelle et al. (2018) наиболее эффективна для отслеживания всех аспектов здоровья желудочно-кишечного тракта.

В настоящее время в научной литературе для мониторинга состояния здоровья ЖКТ предлагаются различные виды показателей, которые могут служить в качестве биологических маркеров («Высота ворсинок», «Глубина крипт» и др.). Следует признать, что для апробации на птицах было использовано ограниченное количество видов биомаркеров. Вместе с тем предлагаемые биомаркеры не позволяют зафиксировать изменения функционального состояния органов на клеточном уровне.

В качестве метода, способного выявлять изменения биохимических процессов в отдельных клетках или тканях, служит метод люминесцентного спектрального анализа. Микроспектральные методы продемонстрировали свою эффективность в оценке функционального состояния разного типа клеток (лимфоциты, нейроны и др.) из-за возможности определять количественное содержание в них органических веществ.

В рамках проведенного исследования на **первом этапе** было осуществлено теоретическое обоснование возможности разработки и применения новых микроспектральных методов обнаружения и определения

количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в гистологических срезах и оценки функционального состояния клеток органов желудочно-кишечного тракта птиц на основе люминесцентного спектрального анализа с применением флуоресцентных красителей.

Анализ научной литературы показал, что некоторыми авторами была предложена оценка функциональной активности клеток по изменению содержания в них органических веществ, в первую очередь, нуклеиновых кислот и белков. Для этого были рекомендованы способы, позволяющие регистрировать величину интенсивности люминесценции флуорохромов, связанных с компонентами данных органических соединений (Kaspersson T., 1950; Браше Ж., 1960; Бродский В.Я., 1966; Karnaukhova N., Sergievich L., Karnaukhov V., 2010).

Однако предлагаемые методы имеют технические ограничения при определении количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков), касающиеся толщины гистологического среза, величина которой в зоне фотометрии условно принимается за 5 мкм. В то же время известно, что толщина гистологического среза неравномерна из-за особенностей строения биологических объектов и техники их изготовления. 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. Кроме того, интенсивность люминесценции в значительной степени обусловлена и изменениями параметров режима фотометрии, вызванных особенностями интенсивности люминесценции различных биологических объектов.

Для получения сопоставимых результатов и повышения точности анализа количественного содержания органических веществ в гистологических срезах было предложено нормировать величину интенсивности люминесценции исследуемого участка к величине его оптической плотности, принимаемой за

толщину среза, и величине интенсивности эталона. В качестве такого эталона была использована величина интенсивности люминесценции промышленно изготавливаемого и имеющего постоянный спектр люминесценции уранового стекла ЖС-19 толщиной ~1,5 мм.

Для исключения фактора влияния аутолического процесса в посмертно измененной ткани и повышения точности анализа при получении конечного результата было предложено принимать во внимание наибольшее из трех полученных значений количественного содержания органического вещества (в условных единицах) в клетках и тканях.

В качестве флуорохромов были использованы люминесцентные красители: этидиум бромида, ДХТАФ и Stains all. Выбор в пользу указанных красителей обусловлен наличием данных о высокой специфичности и информативности этих красителей:

- при проведении люминесцентного спектрального анализа;
- при выявлении нуклеиновых кислот и белков в клетках.

Данные о возможности использования люминесцентных методов исследования для обнаружения органических веществ в клетках и их анализа в интересах ветеринарной медицины опубликованы в научных изданиях (Акчурин С.В., 2008а; Акчурин С.В., 2008б; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2010; Акчурин С.В., 2020а).

На **втором этапе** на основании теоретического обоснования были разработаны новые микроспектральные методы выявления и определения количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в гистологических срезах, а также оценки функционального состояния клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта птиц на основе количественного измерения органических веществ:

1. Одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток с применением флуорохрома «Этидиум бромида» для обнаружения, определения количественного содержания нуклеиновых кислот в клетках и тканях

органов желудочно-кишечного тракта птиц и оценки их функционального состояния (Акчурин С.В., 2010);

2. Одноволновый метод люминесцентного спектрального анализа клеток с применением флуорохрома «ДХТАФ» для обнаружения, определения количественного содержания беков в клетках печени птиц и оценки их функционального состояния (Акчурин С.В., 2011);

3. Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа с использованием метахроматического флуорохрома «Stains all» для обнаружения, определения соотношения органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в клетках и тканях органов желудочно-кишечного тракта птиц, оценки их функционального состояния (Акчурин С.В., Ларионов С.В., 2013а);

4. Модификация двухволнового метода люминесцентного спектрального анализа с применением метахроматического флуорохрома «Stains all» для оценки функционального состояния клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта птиц при фармакотерапии по соотношению нуклеиновых кислот и белков (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2016);

5. Двухволновый метод люминесцентного спектрального анализа с применением флуорохромов «Этидиум бромид» и «ДХТАФ» для оценки функционального состояния клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта птиц и эффективности фармакотерапии кишечной инфекции по количественному содержанию нуклеиновых кислот и белков (Акчурин С.В., 2014).

Методы с применением флуорохромов этидиум бромид и ДХТАФ включали в себя расчетные данные количественного содержания органических веществ в клетках с учетом толщины гистологического среза.

Отличительной особенностью метода с применением флуорохрома Stains all стало использование коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в клетке без определения толщины гистологического среза. Данное обстоятельство позволило упростить техническую процедуру расчета величины коэффициента и сократить время на их определение.

Разработанные методы включали в себя этапы подготовки и окраски биологического материала флуорохромами, установление режимов работы люминесцентно-микроскопического оборудования, а также обработки и оценки полученных результатов.

Новые методы оценки функционального состояния клеток обладают преимуществами, присущими разработанным методам люминесцентного спектрального анализа и техническим решениям, предложенным в рамках диссертационного исследования:

1. Высокая чувствительность, многократно превышающая чувствительность абсорбционных методов исследования, и позволяющая устанавливать свечение веществ с минимальной концентрацией с проведением количественного анализа, что недоступно ни фотометрическим ни биохимическим методам, и позволяет выявлять начальные изменения внутриклеточного метаболизма, развивающиеся в клетках на ранних этапах заболевания, задолго до его клинической манифестации.

2. Высокая специфичность, обусловленная способностью флуорохромов связываться с определенными структурами органических веществ и позволяющая использовать их в качестве флуоресцентных зондов.

3. Возможность изучения функционального состояния клеток фиксированных объектов с получением детальной микроскопической картины при полном сохранении всех морфологических структур клеток и тканей.

4. Возможность оценки количественного содержания органических веществ (нуклеиновых кислот и белков) в клетках в условных единицах с получением сопоставимых результатов и учетом влияния возможных аутолитических процессов в изучаемых тканях.

Вместе с тем, как и любой метод, разработанные методы имеют свои ограничения:

1. Исследование спектральных характеристик с соблюдением разработанных технических и методических условий.

2. Одновременное изучение внутренних органов птиц опытной и контрольной групп, имеющих одинаковый возраст, породу и условия содержания.

На **третьем этапе** была осуществлена экспериментальная апробация разработанных методов оценки функционального состояния клеток органов желудочно-кишечного тракта интактных цыплят, цыплят при кишечных инфекциях (эшерихиоз, сальмонеллез, клебсиеллез) и при проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза, осуществлен сравнительный анализ функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез), а также тканей железистого желудка при проведении антибиотикотерапии кишечной инфекции, разработаны люминесцентно-микроскопические критерии диагностики функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят и эффективности фармакотерапии.

Сводные сведения об апробации новых методов оценки функционального состояния клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта цыплят представлены в таблице 24.

В результате апробации разработанных микроспектральных методов с применением флуорохромов было установлено, что данные методы позволяют обнаруживать органические вещества (нуклеиновые кислоты и белки) в гистологических срезах, определять их количественное содержание в условных единицах в клетках печени и железистого желудка цыплят и оценивать функциональное состояние исследуемых клеток и тканей.

Результаты апробации новых методов опубликованы в следующих работах:

- Метод с этидиумом бромида (Акчурин С.В., 2010; Akchurin S.V. et al., 2020a);
- Метод с ДХТАФ (Акчурин С.В., 2011; Акчурин С.В., 2019a; Akchurin S.V. et al., 2020b);

Таблица 24 – Сводные сведения об апробации методов оценки функционального состояния клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта цыплят

№ п/п	Наименование метода	Исследуемые группы, количество особей в эксперименте	Орган ЖКТ	Исследуемые клетки и ткани
1.	Метод с этидиумом бромида	1. I контрольная (n - 200). 2. I опытная, клебсиеллез (n - 250). 3. II опытная, эшерихиоз (n - 250). 4. III опытная, сальмонеллез (n - 250).	Железистый желудок	1. Эпителий слизистой оболочки. 2. Эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки. 3. Миоциты мышечного слоя.
2.	Метод с ДХТАФ	1. I контрольная (n - 200). 2. I опытная, клебсиеллез (n - 250). 3. II опытная, эшерихиоз (n - 250). 4. III опытная, сальмонеллез (n - 250).	Печень	Гепатоциты
3.	Метод со Stains all	Эксперимент № 1. 1. I контрольная (n - 200). 2. I опытная, клебсиеллез (n - 250). 3. II опытная, эшерихиоз (n - 250). 4. III опытная, сальмонеллез (n - 250). Эксперимент № 2. 1. II контрольная (n - 300). 2. IV опытная, клебсиеллез (n - 30). 3. V опытная, клебсиеллез и антибиотикотерапия (n - 300).	Железистый желудок	1. Эпителий слизистой оболочки. 2. Эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки. 3. Клетки соединительной ткани подслизистой основы. 4. Мезотелий серозной оболочки.
4.	Модификация метода со Stains all	1. II контрольная (n - 300). 2. V опытная, клебсиеллез и антибиотикотерапия (n - 300).	Железистый желудок	1. Эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки.
5.	Метод с этидиумом бромида и ДХТАФ	1. II контрольная (n - 300). 2. V опытная, клебсиеллез и антибиотикотерапия (n - 300).	Железистый желудок	1. Эпителий альвеолярных желез слизистой оболочки.

- Метод со Stains all (Акчурин С.В., 2012а; Акчурин С.В., 2012б; Акчурин С.В., 2012в; Акчурин С.В., 2012г; Акчурин С.В., Ларионов С.В., 2012а; Акчурин С.В., Ларионов С.В., 2012б; Ларионов С.В., Акчурин С.В., 2012; Акчурин С.В. и др., 2012; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2012; Акчурин С.В., 2013б; Акчурин С.В., 2014а; Ларионов С.В., Акчурин С.В., 2014; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2015; Акчурин, С.В., 2019б; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2019; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2020а; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2020б; Акчурин, С.В., 2020а);
- Модификация метода со Stains all (Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2016; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2017; Акчурин С.В., Акчурина И.В., 2020в; Акчурин С.В., 2020ж);
- Метод с этидиумом бромида и ДХТАФ (Акчурин С.В., 2014; Акчурин С.В., 2020б; Akchurin S.V. et al., 2020с).

Проведенный сравнительный анализ функционального состояния клеток и тканей печени и железистого желудка интактных цыплят, при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и при проведении антибиотикотерапии кишечной инфекции позволил установить ряд характерных особенностей в каждой группе цыплят.

В группе интактных цыплят было установлено следующие особенности.

Во-первых, различные типы клеток железистого желудка содержат разное количество нуклеиновых кислот. Так, в первые сутки жизни в клетках эпителия слизистой оболочки содержалось  $10,12 \pm 0,36$  у.е. нуклеиновых кислот, в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки –  $8,09 \pm 0,24$  у.е., в клетках мышечной ткани –  $6,23 \pm 0,22$  у.е. Это объясняется уровнем метаболических процессов, происходящих в клетках разного типа. Например, по мнению К.Ф. Сорвачева (1971) в тех клетках, где происходит активный синтез белков, например в железах (пищеварительные железы), в быстрорастущих клетках эмбриональных тканей и т.д., всегда содержится большее количество нуклеопротеидов;

Во-вторых, количество органических веществ в клетках железистого желудка и печени увеличивается по мере роста цыплят, что свидетельствует о повышении функциональной активности клеток. Функциональная активность клеток, определяемая по количеству нуклеиновых кислот в клетке, увеличилась с 1 по 30 сутки в: эпителии слизистой оболочки – на 34,7 %, миоцитах мышечного слоя – на 32,9 %, эпителии альвеолярных желез – на 30,4 %. Функциональная активность гепатоцитов, установленная по количеству белков в клетке, в указанные сроки увеличилась на 229,9 %;

В-третьих, в первые сутки жизни цыплят наибольшее значение коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков (у.е.), указывающее на синтетическую активность клеток, зафиксировано в клетках соединительной ткани ( $2,63 \pm 0,03$  у.е.), эпителии альвеолярных желез ( $1,91 \pm 0,03$  у.е.), эпителии слизистой оболочки ( $1,41 \pm 0,02$  у.е.) и мезотелии ( $1,00 \pm 0,01$  у.е.). Наибольшую динамику роста коэффициента отмечали у мезотелия (371 %), эпителии альвеолярных желез (120 %) и клеток соединительной ткани (117,9 %). Динамика роста значения коэффициента в эпителии слизистой оболочки составила 83,7 %, клетках соединительной ткани подслизистой основы – 119,0 %. Установленное увеличение количественного содержания указанных органических веществ в клетках желудочно-кишечного тракта цыплят может быть объяснено влиянием соматотропина на ряд метаболических процессов организма. В частности, он стимулирует рост молодых животных (Buuse J., Descuypere E., 1999; Jiaetal J., 2018), повышает синтез белков во всех клетках и увеличивает содержание рибонуклеиновой кислоты в клетках (Сорвачев К.Ф., 1971). В исследованиях на цыплятах было показано, что гипофизэктомия приводила к снижению массы их тела (Scanes C.G. et al., 1986). Полученные данные согласуются также с результатами исследований нервной ткани крыс, проведенных S. Zamenhoffetal. (1964) с помощью люминесцентного спектрального анализа и указывающих на увеличение количества нуклеиновых кислот и белков в клетках в процессе роста организма.

Обнаруженное увеличение количественного содержания белков в гепатоцитах может быть объяснено усилением функциональной активности клеток печени растущих цыплят. Аналогичная динамика была выявлена в ходе эксперимента на цыплятах породы «Хайсекс коричневый» Б. Бессарабовым и др. (2010). Ученые установили, что благодаря увеличению синтеза белка в печени количество белка в крови увеличивается с возрастом птицы. При этом наибольший рост зафиксирован исследователями в период 1–28 сутки жизни цыплят.

Сравнительный анализ функционального состояния клеток и тканей печени и железистого желудка цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом и сальмонеллезом позволил обнаружить следующую картину изменений.

Во-первых, достоверное изменение функционального состояния клеток железистого желудка и печени было зафиксировано с помощью разработанных методов до развития выраженной клинической, макро-и микроскопической картины клебсиеллеза, эшерихиоза и сальмонеллеза. Так, с помощью миктоспектрального метода с этидиумом бромидабыло зафиксировано статистически достоверное снижение функциональной активности клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят спустя одни сутки после перорального введения цыплятам опытных групп клебсиелл, сальмонелл, и на вторые сутки - после инокуляции *E. Coli*. Тогда как начальные клинические признаки и патологоанатомические изменения, указывающие на развитие заболеваний у цыплят опытных групп, наблюдали лишь на второй-третий день после заражения.

При изучении функционального состояния клеток печени цыплят с помощью миктоспектрального метода с ДХТАФ было установлено, что в отличие от цыплят контрольной группы в печени цыплят всех опытных групп отмечается снижение функционального состояния гепатоцитов на первые сутки после заражения, выраженное в уменьшении количественного содержания белков в клетках. При этом у цыплят, зараженных клебсиеллезом и

сальмонеллезом, на 2-4 сутки после заражения наблюдается снижение показателей количественного содержания белков, а у цыплят, зараженных эшерихиозом, изменения функционального состояния гепатоцитов выражаются замедлением роста количества белка в клетках относительно контрольной группы.

Изменения в функциональном состоянии клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка были выявлены и с помощью микроспектрального метода со Stains all. Так, у цыплят опытных групп было установлено изменение функционального состояния указанных клеток на первые сутки после заражения, что отразилось на значении коэффициента соотношения нуклеиновых кислот и белков в исследуемых клетках.

Достоверные изменения в показателях функционального состояния исследуемых клеток цыплят контрольной и опытных групп позволили разработать люминесцентно-микроскопические критерии функционального состояния клеток и тканей железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях в ранние сроки заболеваний (эшерихиоз, сальмонеллез, клебсиеллез)

Во-вторых, с помощью разработанных методов люминесцентного спектрального анализа установлено, что разные типы клеток по-разному реагируют на введение одного и того же инфекционного агента. Например, определенная микроспектральным методом с этидиумом бромида функциональная активность клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка экспериментально зараженных клебсиеллезом цыплят, в период 1-5 сутки после заражения снизилась на 65,0 %, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки – на 55,7 %, клеток мышечного слоя – на 0,9 %. Существенная разница в изменении функциональной активности разного типа клеток может быть объяснена прямым и/или опосредованным воздействием инфекционного агента на клетки.

В-третьих, функциональная активность клеток железистого желудка и печени цыплят опытных групп, переболевших клебсиеллезом, эшерихиозом и сальмонеллезом была ниже аналогичных показателей цыплят контрольной группы к 30 суткам жизни. Например, установленная микроспектральным

методом с этидиумом бромида функциональная активность клеток покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка экспериментально зараженных клебсиеллезом цыплят, была на 47,2 % ниже показателей контрольной группы.

В результате апробации новых методов люминесцентного спектрального анализа были получены результаты о функциональном состоянии клеток железистого желудка, подвергавшихся воздействию инфекционного агента и антимикробного препарата.

Установленное с помощью модифицированного микроспектрального метода с Stains all функциональное состояние клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка, свидетельствовало о восстановлении синтетической активности этих клеток на восьмые сутки с начала перорального введения антибиотика «Энрофлон». Так, показатель *S*, определяемый по разнице значений коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках альвеолярных желез контрольной и опытной группы, и характеризующий функциональную активность клеток опытной группы, составил  $0,17 \pm 0,18$  у.е.

Функциональное состояние клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка, выявленное методом микроспектрального анализа с помощью флуорохромов ДХТАФ и этидиума бромида, также подтвердило восстановление синтетической активности клеток, выраженное количественным содержанием нуклеиновых кислот и белков в клетках. К седьмым суткам с начала лечения показатели опытной группы были в пределах значений аналогичных показателей контрольной группы: количество нуклеиновых кислот составляло –  $11,22 \pm 0,05$  у.е. и  $11,08 \pm 0,06$  у.е. соответственно; а количество белков –  $6,95 \pm 0,08$  у.е. и  $6,78 \pm 0,04$  у.е. соответственно.

В процессе сравнительного анализа функционального состояния клеток и тканей железистого желудка и печени цыплят, экспериментально зараженных клебсиеллезом, эшерихиозом и сальмонеллезом, были получены новые данные о патогенезе указанных заболеваний.

Во-первых, полученные результаты подтвердили известные научные исследования, указывающие на вовлечение в инфекционный процесс при клебсиеллезе, эшерихиозе и сальмонеллезе внутренних органов кур, 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; Waltman W.D., Gast R.K., Mallinson E.T., 2008; Ольховик В.П., 2009).

Во-вторых, впервые было установлено, что спустя сутки после заражения бактерии семейства Enterobacteriaceae приводили к статистически достоверному снижению функциональной активности покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка и гепатоцитов печени. В последующие сутки снижение функциональной активности было зафиксировано во всех оболочках железистого желудка, в том числе в клетках мышечной и серозной оболочек.

В-третьих, также впервые было выявлено, что статистически достоверное наибольшее снижение функциональной активности наблюдалось в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка. Вероятный механизм снижения функциональной активности клеток обусловлен влиянием токсинов бактериальных клеток на клеточную мембрану покровного эпителия. По данным Й. Дуделя и др. (2007) нарушение процессов синтеза в клетке может происходить на различных его этапах: транскрипция РНК в ядре, трансляция полипептидов в рибосомах, посттрансляционная модификация, гиперметилование и гликозилирование белковой молекулы, транспорт и распределение белков в клетке и выведение их наружу. При этом можно наблюдать увеличение или уменьшение количества рибосом, распад полирибосом, расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети, потерю ею рибосом, образование везикул и вакуолей. Причиной нарушения синтеза некоторых специфических белковых молекул могут служить инфекционные агенты.

Снижение функциональной активности остальных изучаемых клеток железистого желудка и печени, предположительно, связано с распространением токсинов с кровью.

На **четвертом этапе** были подготовлены рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии (Акчурин С.В., Ларионов С.В., Акчурина И.В., 2020; Акчурин С.В., 2020д).

Таким образом, новые методы люминесцентного спектрального анализа клетки позволяют обнаруживать органические вещества (нуклеиновые кислоты и белки) в гистологических срезах, определять их количественное содержание в условных единицах, оценивать функциональное состояние клеток желудочного-кишечного тракта и печени цыплят, проводить диагностику инфекционных процессов в ранние сроки заболеваний и оценивать эффективность фармакотерапии на разных сроках ее проведения.

## 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 бромида:

- 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 суток 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, эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки соответствовало показателям интактных цыплят на 8 сутки с начала лечения, 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 бромида 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:

#### 4.3. У интактных цыплят:

##### 4.3.1. 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 %;

##### 4.3.2. 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  $I_g$  (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  $I_g$  (в условных единицах) увеличивался на протяжении всего эксперимента. К 30 суткам жизни показатель  $I_g$  (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  $I_6$  (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 (таблицы 6, 8, 14, 21, 22-24).

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 разработке новых кормов и кормовых добавок.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Агроскин, Л.С. Цитофотометрия. Аппаратура и методы анализа клеток по светопоглощению / Л.С. Агроскин, Г.В. Папаян // Л. Наука. – 1977. – 296 с
2. Азаев, Г.Х. Эпизоотическая ситуация по колибактериозу птиц в Дагестане / Г.Х. Азаев, Д.Г. Мусиев, М.З. Магомедов // Ветеринарный врач. – 2015. – № 2. – С. 29-31.
3. Айджигатканова, С.К. Подходы к медикаментозному лечению дисбактериоза кишечника / С.К. Айджигатканова // РМЖ. Болезни органов пищеварения. – 2007. – Т. 9. – № 2. – С. 86-92.
4. 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. – 2012а. – № 2. – С. 3-8.
5. 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. – 2020а. – № 4. – С. 44-50.
6. 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.
7. Акчурин, С.В. Идентификация клебсиеллеза цыплят методом микроспектрального анализа / С.В. Акчурин // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2012а. – № 3. – С. 21-24.
8. Акчурин, С.В. Идентификация колибактериоза цыплят методом микроспектрального анализа / С.В. Акчурин, С.В. Ларионов // Ветеринарный врач. – 2012б. – № 4. – С. 9-12.
9. Акчурин, С.В. Изменение содержания органических веществ в клетках междольковой соединительной ткани железистого желудка цыплят при

экспериментальном эшерихиозе / С.В. Акчурин // Актуальные вопросы развития аграрного сектора экономики Байкальского региона. Материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции, посвященной Дню российской науки. – 2020а. – С. 254-256.

10. 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 [и др.] // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2012. – № 3. – С. 3-7.

11. 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.

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

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

14. Акчурин, С.В. Использование микроспектрального метода для оценки функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях / С.В. Акчурин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2013а. – № 6. – С. 214-217.

15. Акчурин, С.В. Использование флуоресцентных методов для изучения динамики белков и липидов в аспекте современной биотехнологии ветеринарных препаратов / С.В. Акчурин // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2008а. – № 7. – С. 5-8.

16. 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.

17. Акчурин, С.В. Люминесцентный анализ белков печени цыплят с использованием дихлор-симм-триазиниламинофлуоресцеина-1 / С.В. Акчурин // В сборнике: 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». – 2019а. – С. 6-11.

18. Акчурин, С.В. Люминесцентный анализ клеток железистого желудка цыплят при экспериментальном сальмонеллезе / С.В. Акчурин // В сборнике: 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». – 2019б. – С. 15-18.

19. Акчурин, С.В. Микроспектральный анализ клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях / С.В. Акчурин // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014а. – № 3 (113). – С. 74-78.

20. 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.

21. Акчурин, С.В. Модификация метода люминесцентного спектрального анализа для оценки функционального состояния клеток внутренних органов цыплят при антибиотикотерапии / С.В. Акчурин // В сборнике: От инерции к развитию: научно-инновационное обеспечение и актуальные проблемы ветеринарной медицины. Сборник материалов международной научно-

практической конференции «От инерции к развитию: научно-инновационное обеспечение АПК». – 2020б. – С. 10-14.

22. Акчурин, С.В. Некоторые аспекты применения флуоресцентных красителей для анализа нуклеиновых кислот в ветеринарной медицине / Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2008б. – № 2. – С. 9-12.

23. Акчурин, С.В. Новый метод люминесцентного анализа белков печени и железистого желудка цыплят / С.В. Акчурин // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2011. – № 1. – С. 4-10.

24. 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. – 2013а. – Т. 213. – С. 6-11.

25. Акчурин, С.В. Новый метод люминесцентного анализа нуклеиновых кислот с использованием бромида этидия / С.В. Акчурин // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2010. – № 8. – С. 3-6.

26. Акчурин, С.В. Новый метод люминесцентного анализа соотношения нуклеиновых кислот и белков в серозной оболочке железистого желудка цыплят с использованием флуорохрома «Stains all» / С.В. Акчурин // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2012в. – № 1-1 (22). – С. 72-78.

27. Акчурин, С.В. Оценка функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях / С.В. Акчурин // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2013б. – № 2 (18). – С. 13-16.

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

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

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

32. 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. – 2020б. – С. 276-278.

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

34. Акчурин, С.В. Функциональное состояние клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях / С.В. Акчурин // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2012г. – № 11. – С. 3-6.

35. Акчурин, С.В. Функциональное состояние клеток железистого желудка цыплят при антибактериальной терапии / С.В. Акчурин // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Сборник научных трудов Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора биологических наук, профессора Е. П. Ващекина, Заслуженного работника Высшей школы РФ, Почетного работника высшего профессионального образования РФ, Почетного гражданина Брянской области. – 2020ж. – С. 28-32.

36. Акчурин, С.В. Функциональное состояние клеток покровного эпителия железистого желудка цыплят при экспериментальном эшерихиозе / С.В. Акчурин, И.В. Акчурина // В сборнике: 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.

37. Алексеева, З.Н. Фитобиотики при выращивании молодки кур / З.Н. Алексеева, И.Ю. Клемешова, В.А. Реймер [и др.] // Актуальные проблемы агропромышленного комплекса: сб. трудов научно-практической конференции преподавателей, студентов, магистрантов и аспирантов, посвященный 80-летию Новосибирского государственного аграрного университета, том Сельскохозяйственные науки. Биологические науки. Ветеринарные науки. Новосиб. гос. аграр. ун-т. Новосибирск: ИЦ «Золотой колос». –2016. – С. 98-101.

38. Анганова, Е.В. Антибиотикорезистентность микроорганизмов, выделенных от больных хирургического стационара / Е.В. Анганова, Н.Ф. Крюкова, Е.Д. Савилов // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2016. – Т. 1, № 3 (109). – С. 55-59.

39. Анганова, Е.В. Антибиотикорезистентность условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от больных острыми кишечными инфекциями Е.В. Анганова // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 7. – С. 98-99.

40. Андрианова, Е.Н. Добавка Винивет на основе продуктов пчеловодства как альтернатива кормовым антибиотикам в комбикормах для цыплят-бройлеров: бактерицидный и биостимулирующий эффект применения / Е.Н. Андрианова, И.А. Егоров, Л.М. Присяжная [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – № 2. – С. 213-222.

41. Барский, В.Е. Люминесцентно-цитохимический метод определения концентрации белка / В.Е. Барский, В.Б. Иванов // В кн.: «Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки». М.–Л., «Наука». 1964. – С. 157-163.

42. Барышников, П.И. Смешанные инфекции у диких птиц лесостепной области Алтайского края / П.И. Барышников, А.Ю. Бондарев, Б.В. Новиков [и др.] // Ветеринария. – 2012. – № 4. – С. 27-30.
43. Беломожнов, Т.Д. Продуктивность цыплят-бройлеров при включении в выпойку фитогенной кормовой добавки в промышленных условиях / Т.Д. Беломожнов, М.С. Журавлев // Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных: материалы международной научно-практической конференции. – 2019. – С. 202-208.
44. Бессарабов, Б. Белковый и углеводный обмен веществ у несушек / Б. Бессарабов, Л. Клетикова, О. Копоть [и др.] // Птицеводство. – 2010. – №1. – С.55-56.
45. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов с соавт. // М.: – КолосС. – 2007. – 671 с.
46. Бовкун, Г.Ф. Роль клебсиелл в патологии животных // Журн. Ветеринария. – 1986. – № 1. – С. 70-73.
47. Борисова, О.Ф. Люминесценция комплексов акридинового оранжевого с нуклеиновыми кислотами / О.Ф. Борисова, Л.А. Туммерман // Биофизика. – 1964. – Т. 9. – № 5.
48. Борисова, Т. Определение остаточного количества антибиотиков в мясе с помощью приборов Shimadzu // Контроль качества продукции. – 2018. – № 10. – С. 45-49.
49. Браше, Ж. Биохимическая цитология. М., ИЛ. 1960.
50. Бродский, В.Я. Трофика клетки. М., «Наука». 1966.
51. Буяров, В.С. Эффективность применения пробиотиков и синбиотиков в мясном птицеводстве / В.С. Буяров, С.Ю. Метасова, Н.А. Алдобаева // БИО. 2018. – № 11. – № 218. – С. 12–13.
52. Буяров, В.С. Эффективность применения синбиотика «ПроСтор» в птицеводстве / В.С. Буяров, С.Ю. Метасова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2019. – Т. 161, кн. 3. – С. 408-421.

53. Буяров, В.С. Эффективность применения фитобиотиков в птицеводстве (обзор) / В.С. Буяров, И.В. Червонова, В.В. Меднова [и др.] // Вестник ОрелГАУ. – 2020. – №3 (84). – С. 44-59.
54. Вакцина против колибактериоза кур / В.Н. Ласкавый, Э.Д. Джавадов, М.Л. Малинин [и др.]; заявитель и правообладатель ГНУ «Саратовская научно-исследовательская ветеринарная станция Российской академии сельскохозяйственных наук», ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009128311/15; заявл. 21.07.2009; опубл. 27.11.2010, Бюл. № 33. – 8 с.
55. Варга, О.Ю. Активность апоптоза лимфоцитов при хроническом гломерулонефрите / О.Ю. Варга [и др.] // Нефрология и диализ. – 2006. – Т. 8. – № 2. – С. 151-157.
56. Вершняк, Т.В. Условно-патогенная микрофлора в птицеводствах и диагностика эшерихиоза птиц на основе тест-системы иммуноферментного анализа: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23: Щелково. – 2003. – 150 с.
57. Винокуров, В.Ю. Колибактериоз (эшерихиоз) кур: (эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы): дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 – ФГОУ ВПО «Донской государственный аграрный университет», Персиановский. – 2010. – 138 с.
58. Вирник, А.Д. О взаимодействии активных красителей с аминокислотами / А.Д. Вирник, М.А. Чекалин // Журн. прикл. Химии. – 1962. – Т. 35, № 3. – С. 588-593.
59. Волкова, И. Пробиотики как альтернатива кормовым антибиотикам / И. Волкова // Комбикорма. – 2014. – № 2. – С. 63-64.
60. Гордон, Р.Я. Люминесцентный анализ периферической крови при некоторых видах аллергии / Р.Я. Гордон, В.Н. Карнаухов // Архив патол. – 1981. – Т. 43, № 9. – С. 21-25.

61. Гунчак, А.В. Вплив рослинних екстрактів на процеси травлення в організмі птиці, продуктивність та якість продукції / А.В. Гунчак, Я.М. Сірко, Б.Я. Кирилів [та інші] // Біологія тварин. – 2016. – Т. 18. № 2. – С. 25-35.
62. Дмитриева, М.Е. Поставили диагноз колибактериоз? Вы не ошиблись? / М.Е. Дмитриева, И.М. Алхлаев // Farm Animals. – 2014. – № 3 (7). – Р. 62–64.
63. Дубровин, А.В. Влияние кормовой добавки на основе эфирных масел на здоровье и продуктивность цыплят кур / А.В. Дубровин, Г.Ю. Лаптев, Л.А. Ильина [и др.] // Ветеринария. – 2018. – № 12. – С. 12-16.
64. Дудель, Й. Физиология человека: в 3-х томах. Пер. с англ. / под ред Р. Шмидта и Г. Тевса. - 3. - М.: Мир. – 2007. – Т. 1. – 323 с.
65. Дускаев, Г.К. Использование *Quercus cortex* в сочетании с ферментами в рационе цыплят бройлеров / Г.К. Дускаев, Н.М. Казачкова, Ш.Г. Рахматуллин [и др.] // Вестник Курганской ГСХА. – 2019. – № 3. – С. 38-41.
66. Егоров, И.А. Коллоидное серебро при выращивании цыплят-бройлеров / И.А. Егоров [и др.] // Птицеводство. – 2013. – № 4. – С. 17–20.
67. Егоров, И.А. Ценный корм для птицы / И.А. Егоров // Птицеводство. – 2014. – № 6. – С. 22-24.
68. Журавлёв, П.В. Динамика выживаемости *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* в водной среде в экспериментальных условиях / П.В. Журавлёв // Гиг. и сан. – 1991. – № 7. – С. 27-28.
69. Иванов, В.Б. Доказательство образования ковалентных связей при окраске гистологических препаратов проционовыми красителями / В.Б. Иванов // Цитология. – 1976. – Т. 18, № 2. – С. 227-229.
70. Иванов, В.В. О возможности применения проционовых красителей в гистохимии / В.В. Иванов // ДАН СССР. – 1961. – Т. 137, № 2. – С. 419-421.
71. Казачкова, Н.М. Влияние экстракта *Quercus cortex* на биохимические показатели крови цыплят бройлеров / Н.М. Казачкова, С.В. Нотова, Г.К. Дускаев [и др.] // Вестник мясного скотоводства. – 2017. – № 4(100). – С. 213-218.

72. Капитонова, Е.А. Применение синбиотиков в бройлерном птицеводстве // В сборнике: Сельское хозяйство – проблемы и перспективы сборник научных трудов в 2 томах. Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет». Гродно. – 2010. – С. 251-258.
73. Карнаухов, В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. М., 1978.
74. Карнаухов, В.Н. Двухволновый микрофлуориметр-фотометр на базе стандартных блоков и узлов / В.Н. Карнаухов, В.А. Яшин, А.П. Казанцев [и др.] // Цитология. – 1987. – Т.29. – №1. – С. 50-53.
75. Карнаухов, В.Н. Исследование информативности показателя синтетической активности субпопуляций клеток крови / В.Н. Карнаухов, П.М. Шварцбург // Деи. ВИНТИ. – 1979. – № 1479. – С. 1-19.
76. Карнаухов, В.Н. Методы и техника флуоресцентной диагностики / В.Н. Карнаухов, Н.А. Карнаухова, В.А. Яшин // ОНТИ НЦБИ, Пущино. – 1983. – 32 с.
77. Карнаухов, В.Н. О двух пулах митохондрий в одиночном механорецепторном нейроне / В.Н. Карнаухов, О.Е. Лебедев, В.К. Павленко // Цитология. – 1976. – Т.18, № 10. – С. 1189-1193.
78. Карнаухов, В.Н. Спектральный анализ клеток в экологии и охране окружающей среды (Клеточный мониторинг). Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР. – 1988. – 123 с.
79. Карнаухова, Н.А. Применение люминесцентного микроспектрального анализа для оценки синтетической активности инкреторных клеток семенников / Н.А. Карнаухова, О.И. Бриндак, Б.В. Алешин // Проблемы эндокринологии. – 1986. – Т. 32, №5. – С. 76-78.
80. Киселева, Б.С. Роль *Klebsiella pneumoniae* в этиологии бактериального сепсиса / Б.С. Киселева, В.Н. Красноголовец // Журнал микробиол. – 1983. – № 2. – С. 20-25.
81. Кишняйкина, Е.А. Влияние экстракта чабреца на качественные показатели мяса цыплят-бройлеров / Е.А. Кишняйкина, К.В. Жучаев, О.А. Багно [и

др.] // Инновации и продовольственная безопасность. – 2019. – № 2 (24). – С. 25-31.

82. Кишняйкина, Е.А. Влияние экстракта чабреца на продуктивные качества и сохранность цыплят-бройлеров кросса ISA F-15 / Е.А. Кишняйкина, К.В. Жучаев // «Вестник НГАУ». – 2018. – № 4 (49). – С. 74-80.

83. Ковалева, Е.П. Инфекции, вызванные условно-патогенными микроорганизмами / Профилактика внутрибольничных инфекций / Под ред. Е.П. Ковалевой, Н.А. Семиной // Руководство для врачей. – М., ТОО «Рароч», 1993. – С. 59-69.

84. Комаров, А.А. Служба на страже здоровья в борьбе с антибиотикорезистентностью / А.А. Комаров // Ветеринария и Жизнь. – 2018. – № 3(10). – С. 2-3.

85. Кощаев, А.Г. Экологизация продукции птицеводства путем использования пробиотиков как альтернативы антибиотикам / А.Г. Кощаев // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2006. – № 10. – С. 53-59.

86. Красиков, А.П. Клебсиеллы и патогенность для животных / А.П. Красиков, Д.В. Конин // Материалы учебн.-метод. и науч.-произв. конф. ин-та вет. медицины ОмГАУ. / ОмГАУ. – Омск, 1998. – С. 70-71.

87. Красноголовец, В.Н. Клебсиеллезные инфекции / В.Н. Красноголовец, Б.С. Киселева. – М.: Медицина. – 1996. – 255 с.

88. Кузменко, П.М. Синбиотик «Синвет» – препарат нового поколения для повышения продуктивности цыплят-бройлеров / П.М. Кузменко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2014. – № 17 (1). – С. 62–69.

89. Ланцева, Н.Н. Влияние функциональных свойств пробиотиков и фитобиотиков на показатели продуктивности цыплят-бройлеров / Н.Н. Ланцева, А.Е. Мартыщенко, А.Н. Швыдков [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2. – С. 1417-1423.

90. 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.

91. 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.

92. Латышева, Д.А. История и современное состояние производства фитобиотических кормовых добавок в мире / Д.А. Латышева, Е.В. Ульрих // Климат, экология, сельское хозяйство Евразии: материалы VII международной научно-практической конференции. Иркутск. – 2018. – С. 125-136.

93. Леткин, А.И. Влияние препаратов ЦСП РМ и ХЭД на клинико-гематологический статус цыплят-бройлеров кросса Сооб-500 / А.И. Леткин, А.С. Зенкин, С.В. Лабинов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1-1. – С. 1963.

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

95. Мартин, Д.В. Бактериальные респираторные болезни птицы: диагностика и контроль. Колибактериоз птиц / Д.В. Мартин // Материалы Международного Ветеринарного конгресса: «Актуальные ветеринарные проблемы в промышленном птицеводстве». Казань. – 2014.

96. Мельникова, Е.В. Люминесцентный метод определения соотношения ДНК: РНК: белок в клетке / Е.В. Мельникова, В.Н. Карнаухов // Биофизика живой клетки. Пущино. – 1973. – Т. 4. – С. 153-157.

97. Микроспектральный способ оценки эффективности фармакотерапии в ранние сроки лечения клебсиеллеза птиц антибактериальными препаратами

/ Акчурин С.В.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». – 2013109359/15; заявл. 30.05.2013; опубл. 27.12. 2014б. – 18. с.

98. Мойсеенко, Н.И. Динамика выживаемости клебсиелл и *Pseudomonas aeruginosa* в имитатах морской воды / Н.И. Мойсеенко // Методы индикации биоценоза патогенных и потенциально патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды. – М., 1985. – С. 79-81.

99. Мухина, Н.В. Натуральный стимулятор роста «MFЕЕD» – альтернатива кормовым антибиотикам / Н.В. Мухина // Птицеводство. – 2010. – № 6. – С. 6-7.

100. Неминущая, Л.А. Новые синбиотики для птицеводства и их использование в целях повышения эффективности вакцинопрофилактики / Л.А. Неминущая [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2012.– № 5. – С. 41-44.

101. Николаенко, В.П. Изучение биоцидного действия антисептика брокарсепт / В.П. Николаенко, М.С. Климов // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. – 2010. – Т. 3, № 1. – С. 121-123.

102. Николаенко, В.П. Эшерихиоз птицы и меры его профилактики / В.П. Николаенко [и др.] // Птицеводство. – 2018. – № 9. – С. 49-52.

103. Новикова, А.Ф. Профилактическое средство против колибактериоза на основе выделенных белковых фракций термолабильного и термостабильного штаммов эшерихий / А.Ф. Новикова [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2016. – № 4. – С. 84-86.

104. Носенко, А.В. Концентрированная микроводоросль – альтернатива кормовым антибиотикам в птицеводстве / А.В. Носенко, Ю.А. Лысенко // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2016. – № 11. – С. 951-955.

105. Ольховик, О.П. Клебсиеллез бройлеров: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 – ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет». Краснодар. – 2009. – 135 с.

106. Петенко, Н.И. Влияние фитобиотиков на зоотехнические показатели перепелов / Н.И. Петенко, Д.А. Буцковский, А.Н. Гнеуш // Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции: сборник статей по материалам V Международной научно-практической конференции, посвященной 15-летию кафедры технологии хранения и переработки животноводческой продукции Кубанского ГАУ. – 2019. – С. 247-251.

107. Пинто, Т.К.А. Производные трифенилфосфония как альтернатива обычным антибиотикам / Т.К.А. Пинто, А. Банержи, П.А. Назаров // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2018. – № 1. – С. 16-21.

108. Пирс, Э. Гистохимия, теоретическая и прикладная. М., ИЛ. 1962.

109. Покудина, И.О. Распространённость и вклад в антибиотикоустойчивость (3-лактамаз у амбулаторных изолятов *Klebsiella pneumoniae* / И.О. Покудина, К.А. Коваленко // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 12 (2). – С. 295-298.

110. Поломошнов, Н.А. Мониторинг эпизоотической ситуации при сальмонеллезе кур / Н.А. Поломошнов, Л.А. Малышева // Международный вестник ветеринарии. – 2011. – № 2. – С. 6-9.

111. Поломошнова, И.А. Альтернатива антибиотикам в профилактике бактериальных заболеваний при выращивании цыплят-бройлеров / И.А. Поломошнова // В сборнике: Актуальные проблемы и методические подходы к лечению и профилактике болезней животных материалы международной научно-практической конференции. – 2015. – С. 133-136.

112. Поломошнова, И.А. Эпизоотическая ситуация по бактериальным заболеваниям кур в Ростовской области / И.А. Поломошнова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1-1. – С. 1972.

113. Пономарев, В.А. Опыт применения одуванчика лекарственного в качестве биологически активной добавки перепелкам-несушкам / В.А. Пономарев, Н.Н. Якименко, Л.В. Клетикова // Актуальные вопросы современной

науки и образования: сборник статей Международной научно-практической конференции. – 2019. – С. 115-121.

114. Портянко, А.В. Мониторинг заразных болезней птицы в Омской области / А.В. Портянко [и др.] // Птицеводство. – 2017. – № 9. – С. 34-38.

115. Прогноз научно-технологического развития агропромышленного комплекса Российской Федерации на период до 2030 года / Минсельхоз России; Нац. исслед. ун-т «Высшая школа экономики». – М.: НИУ ВШЭ, 2017. – 140 с.

116. Родионова, А.В. Антибиотикотерапия клебсиеллезной инфекции кур / А.В. Родионова, Г.Р. Садртдинова // В сборнике: Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию факультета ветеринарной медицины и технологии животноводства, проводимой на базе ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени Императора Петра I». – 2016. – С. 208-210.

117. Рождественская, Т.Н. Создание комплексной системы профилактики бактериальных болезней птиц в хозяйствах промышленного типа: дис. .... д-ра вет. наук. – СПб., 2011. – 310 с.

118. Руденко, Я.Н. Кинетика  $Ca^{2+}$ , НАДН и окисленных флавопротеидов в обонятельной выстилке лягушки под действием одорантов / Я.Н. Руденко, Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов // Биофизика. 2007. – Т. 52. №. 1. – С. 88-94.

119. Савельев, В.Н. Изучение клебсиелл, выделенных от больных и здоровых людей. Сообщение 3. Биохимические типы клебсиелл / В.Н. Савельев // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 1978. – № 8. – С. 103-106.

120. Садртдинова, Г.Р. Создание селективной среды для выделения, дифференцирования и идентификации бактерий рода *Klebsiella* / Г.Р. Садртдинова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / – Ульяновск: УГСХА. – 2016. – Т. III. – С. 266-269.

121. Садртдинова, Г.Р. Усовершенствование схемы индикации и идентификации бактерий вида *klebsiella oxytoca* с помощью фагового биопрепарата: дис. ... канд. биол. наук: 06.02.02 – ФГБОУ БО «Башкирский государственный аграрный университет». Уфа. – 2017. – 165 с.

122. Салаутин, В.В. Патоморфология и дифференциальная диагностика сальмонеллеза птиц, вызванного различными серовариантами возбудителя: автореф. ... докт. ветер. наук: 16.00.02. – ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». Саратов. – 2004. – 56 с.

123. Самков, М. Ропадияр – альтернатива кормовым антибиотикам / М. Самков // Птицеводство. – 2004. – № 3. – С. 13.

124. Сверчкова, Н. В поисках альтернативы ветеринарным и кормовым антибиоткам / Н. Сверчкова, Э. Коломиец // Наука и инновации. – 2014. – № 8 (138). – С. 21-24.

125. Седегов, С.В. Люминесцентная микроскопия в диагностике тестикулярных неоплазий у кобелей / С.В. Седегов // Пермский аграрный вестник. – 2015. № 9. С. 70-74.

126. Семенцов, В.И. Клебсиеллез поросят / В.И. Семенцов [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2009. – № 6. – С. 15-17.

127. Сигалл, Р. Синергизм эфирных масел и органических кислот как альтернатива антибиотикам / Р. Сигалл, А. Плохова // Комбикорма. – 2011. – № 3. – С. 91-92.

128. Сорвачев, К.Ф. Биологическая химия / К.Ф. Сорвачев. – М.: Просвещение, 1971. – 432 с.

129. Степанова, А.М. Прибиотик «Нордбакт» как альтернатива применения антибиотиков в промышленном птицеводстве / А.М. Степанова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 5. – С. 65-66.

130. Суханова, С.Ф. Морфобиохимические показатели неспецифического иммунитета гусынь и гусят-бройлеров, потреблявших Лив 52 Вет / Суханова, С.Ф. // Вестник АПК Ставрополя. – 2017. – № 2 (26). – С. 109-119.

131. Тарабанова, Е.В. Физиологический статус сельскохозяйственной птицы в раннем онтогенезе при выращивании с использованием серебряного нанокompозита: автореф. .... канд. с.-х. наук: 03.03.01 – Новосибирский государственный аграрный университет. – Новосибирск. – 2013. – 29 с.

132. Терентьев, А.А. Патоморфология и дифференциальная диагностика колисептицемии у кур: автореф. ... канд. ветер. наук: 16.00.02. – ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». Саратов. – 2000. – 20 с.

133. Терентьев, В.И. Питательная ценность и химический состав пихтовой хвойной муки, производимой ООО «Эковит» / В.И. Терентьев, Т.И. Аникиенко // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 5. – С. 163-166.

134. Терехов, В.И. Биологическая характеристика клебсиелл, выделенных от новорожденных телят при острых кишечных заболеваниях / В.И. Терехов, Тельнов С.Н. // Актуальные вопросы диагностики и борьбы с болезнями с.-х. животных. – Ставрополь, 1999. – С. 133-134.

135. Труфанов, О. Фитобиотики в рационах бройлеров / О. Труфанов // Животноводство России. – 2016. – Октябрь. – С. 5-7.

136. Трухачев, В.И. Альтернатива антибиотикам в птицеводстве / В.И. Трухачев, Н.З. Злыднев, Н.В. Самокиш // Вестник АПК Ставрополя. – 2015. – № 2 (18). – С. 149–153.

137. Тугаринов, О.А. Колисептицемия птиц // Инфекционные болезни животных / под ред. Д.Ф. Осидзе. – М.: Агропромиздат. – 1987. – С. 210-211.

138. Фесенко, О.В. Пневмонии, вызванные *Klebsiella pneumoniae* (фридлендеровские пневмонии) / О.В. Фесенко, С.Н. Швайко // Практическая пульмонология. – 2019. – № 1. – С. 22-31.

139. Хайсекс Браун. Руководство по клеточному содержанию // Институт селекции животных БВ. – С.20.

140. Хмыров, А. Эхинацея и Лактобифадол для роста цыплят / А. Хмыров, А. Фатьянов, Г. Горшков // Животноводство России. – 2012. – Сентябрь. – С. 16-17.

141. Черников, А.А. Роль бактерий рода *Klebsiella* в патологии сельскохозяйственных животных / А.А. Черников, Д.А. Васильев // Вопросы микробиологии, эпизоотологии и вет.-санитар. экспертизы. – Ульяновск, 1998. – С. 144-148.
142. Чернышова, А.Д. Влияние эхинацеи пурпурной на рост цыплят-бройлеров / А.Д. Чернышова // Инновационные идеи молодых исследователей для агропромышленного комплекса России: сборник статей Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых. – 2017. – С. 68-70.
143. Шарга, Б.М. Исследование антимикробного спектра действия бактериоцинов и бактериофагов некоторых штаммов *Klebsiella* / Б.М. Шарга, А.И. Туряница // Микробиологический журнал. – 1993. – Т. 55. – № 5. – С. 59-68.
144. Шеина, Ю.И. Анализ фрагментации ДНК в сперматозоидах с помощью окраски акридиновым оранжевым у пациентов с бесплодием / Ю.И. Шеина [и др.] // Проблемы репродукции. – 2012. – № 5. – С. 74-79.
145. Шестаков, В.А. Гистоструктурные изменения в печени и почках бройлеров при эшерихиозе / В.А. Шестаков // Ветеринария и кормление. – 2016. – № 1. – С. 17-19.
146. Шуляк, Б.Ф. Традиционные и новые подходы к лабораторной диагностике сальмонеллеза / Б.Ф. Шуляк // Справочник заведующего КДЛ. – 2009. – № 12. – С. 21-26.
147. Щепеткина, С.В. Организация системы контроля инфекционных болезней птиц, применения антимикробных препаратов и выпуска безопасной продукции птицеводства / С.В. Щепеткина // Сост. СПб.: ФГБОУ ВО СПбГАВМ. – 2018. – 535 с.
148. Юняева, Н.В. Масло орегано заменяет антибиотики в птицеводстве / Н.В. Юняева, К.В. Саландаев, А.В. Слюсарь // Птицеводство. – 2016. – № 8. – С. 43-45.
149. Abd-el-Motelib T.Y. Staphylococcus and Klebsiella infection in broiler chickens / T.Y. Abd-el-Motelib, K. el-Zanaty // Assiut veter. med. J. – 1993. – Vol. 29., № 58. – P. 270-278.

150. Abend M. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy / M. Abend // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2003. – № 79. – P. 927-941.
151. Adil S. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken / S. Adil [et al.] // *Vet Med Int.* – 2010:479485.
152. Ahmed A.O. Salmonellosis: Serotypes, prevalence and multi-drug resistant profiles of *Salmonella enterica* in selected poultry farms Kwara State, North Central Nigeria / A.O. Ahmed [et al.] // *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* – 2019. – № 86(1). – a1667.
153. 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.* – 2020a. – № 1679. – P. 022007.
154. 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.* – 2020b. – № 1679. – P. 022004.
155. 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.* – 2020c. – № 1679. – P. 022019.
156. Allan B.J. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis / B.J. Allan, J.V. van den Hurk, A.A. Potter // *Can. J. Vet. Res.* – 1993. – № 57. – P. 146-151.
157. Altan Ö. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers / Ö. Altan [et al.] // *Br Poult Sci.* – 2003. – № 44. – P. 545-550.
158. Attaix D. In vivo longitudinal variations in protein synthesis in developing ovine intestines / D. Attaix [et al.] // *Amer. J. Physiol.* – 1992. – № 263. – P. 1318-1323.
159. Avershina E. Confusion about the species richness of human gut microbiota / E. Avershina, K. Rudi // *Benef Microbes.* – 2015. – № 6(5). – P. 657-659.

160. Awad W.A. Enteric Pathogens and Their Toxin-Induced Disruption of the Intestinal Barrier through Alteration of Tight Junctions in Chickens / W.A. Awad, C. Hess, M. Hess // *Toxins (Basel)*. – 2017. – Feb 10. 9(2).

161. Barceló D. Pharmaceutical-residue analysis / D. Barceló // *Trends Anal Chem.* – 2007. – № 26. – P. 454-455.

162. Barmeyer C. Claudin-related intestinal diseases / C. Barmeyer, J.D. Schulzke, M. Fromm // *Semin Cell Dev Biol.* – 2015. – Jun 4. 30–8.

163. Barnes H.J. Colibacillosis / Barnes H.J., Gross W.B. // *Diseases of Poultry*. 10th ed. Iowa State University Press; Ames, IA, USA. – 1997. – P. 131-141.

164. Barrow P.A. Host specificity of Salmonella infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system / P.A. Barrow, M.B. Huggins, M.A. Lovell // *Infect. Immun.* – 1994. – № 62. – P. 4602-4610.

165. Barrow P.A. Serological response of chickens to infection with Salmonella gallinarum–Salmonella pullorum detected by enzyme linked immunosorbent assay / P.A. Barrow, A. Berchieri, O. Al-Haddad // *Avian Dis.* – 1992. – № 36. – P. 227-236.

166. Barrow P.A. Salmonella control past, present and future // *Avian Pathol.* – 1993. – № 22. – P. 651-669.

167. Bass L. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian Escherichia coli / L. Bass [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – № 43. – P. 2925-2929.

168. Basu T.K. Intestinal absorption in health and disease: micronutrients / T.K. Basu, D. Donaldson // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2003. – № 17. – P. 957-979.

169. Baurhoo B. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens / B. Baurhoo, L. Phillip, C.A. Ruiz-Feria // *Poult Sci.* – 2007. – № 86. P. 1070-1078.

170. Baxter M. Identification of Serum Biomarkers for Intestinal Integrity in a Broiler Chicken Malabsorption Model / M. Baxter [et al.] // *Frontiers in veterinary science*. – 2019. – № 6. – P. 144.

171. Baxter M.F. Assessment of a nutritional rehabilitation model in two modern broilers and their jungle fowl ancestor: a model for better understanding childhood undernutrition / M.F. Baxter [et al.] // *Front Nutr*. – 2018. – № 5. – P. 18.

172. Bederska-Lojewska D. Rye non-starch polysaccharides: their impact on poultry intestinal physiology, nutrients digestibility and performance indices-a review / D. Bederska-Lojewska [et al.] // *Ann Anim Sci*. – 2017. – № 17. – C. 351–69.

173. Berchieri A. Observation on the persistence and vertical transmission *Salmonella enterica* serovars pullorum and gallinarum in chickens: Effect of bacterial and host genetic background / A. Berchieri [et al.] // *Avian Pathol*. – 2001. – № 30. – P. 221–231.

174. Bermudez A.J. Principles of disease prevention: diagnosis and control / A.J. Bermudez // *Diseases of poultry*. Iowas State University Press; Ames, Ia, USA. – 2003. P. 3–60.

175. Berry D. Intestinal microbiota: a source of novel biomarkers in inflammatory bowel diseases? / D. Berry, W. Reinisch // *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. – 2013. – № 27(1). – P. 47-58.

176. Bhattacharjee P.S. A retrospective analysis of chicken diseases diagnosed at the Central Disease Investigation Laboratory, Dhaka, Bangladesh / P.S. Bhattacharjee [et al.] // *Bangladesh Vet. Jr*. – 1996. – № 30. P. 105-113.

177. Biomarkers Definitions Working Group. «Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework» // *Clin. Pharmacol. Ther.(Review)*. – 2001. – № 69 (3). – P. 89-95.

178. Bisgaard M. Salpingitis in poultry / M. Bisgaard, A. Dam // I. Prevalence, bacteriology and possible pathogenesis in egg-laying chickens. *Nordisk Veterinärmedicin*. – 1981. – № 33. – P. 81-89.

179. Blakeslee D. Immunofluorescence using dichlorotriazinylamino-fluorescein (DTAF) I. Preparation and fractionation of labelled IgG / D. Blakeslee, M.G. Baines // *J Immunol Methods*. – 1976. – № 13. – P. 305-320.
180. Blanco J.E. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain / J.E. Blanco [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – № 35. – P. 2184-2185.
181. Blanco J.E. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity / J.E. Blanco [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – № 35. – P. 2953-2957.
182. Blokzijl H. Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels / H. Blokzijl [et al.] // *Inflamm Bowel Dis*. – 2007. – № 13(6). – P. 710-20.
183. Bouzoubaa K. Village chickens as a reservoir of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* in Morocco / K. Bouzoubaa, K. Lemainguer, J.G. Bell // *Prev. Vet. Med.* – 1992. – № 12. P. 95-100.
184. Brandl K. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits / K. Brandl et al. // *Nature*. – 2008. – № 455. – P. 804-807.
185. Brandt L. Fluorescent probes for structure / L. Brandt, J.R. Gohlke // *Annual Rev. Biochem.* – 1972. – № 41. – P. 808.
186. Breuille D. Sustained modifications of protein metabolism in various tissues in a rat model of long-lasting sepsis / D. Breuille [et al.] // *Clin. Sci.* – 1998. – № 94. – P. 413-423.
187. Brito J.R. Pathological findings in the intestinal tract and liver of chicks after exposure to *Salmonella* serotypes Typhimurium or Kedougou / J.R. Brito [et al.] // *Br. Vet. J.* – 1995. – № 151. – P. 311-323.
188. Broberg C.A. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter / C.A. Broberg, M. Palacios, VL. Miller // *F1000Prime Reports*. – 2014. – № 1. – P. 6-64.

189. Bruehlmann S.B. ISSLS prize winner: Collagen fibril sliding governs cell mechanics in the annulus fibrosus: an in situ confocal microscopy study of bovine discs / S.B. Bruehlmann, J.R. Matyas, N.A. Duncan // *Spine*. – 2004. – № 29. – P. 2612-2620.
190. Buchet A. Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs / A. Buchet // *PLoS One*. – 2017. – № 12.
191. Buckley M.R. High-resolution spatial mapping of shear properties in cartilage / M.R. Buckley [et al.] // *J Biomech*. – 2010. – № 43. P. 796-800.
192. Bud R. Penicillin: Triumph and tragedy. Oxford University Press. Oxford. 2009.
193. Budd G.R. The effect of polymeric formula on enterocyte differentiation / G.R. Budd [et al.] // *Innate Immun*. – 2017. – № 23(3). – P. 240-248.
194. Burns V.W.F. Location and molecular characteristics of fluorescent complexes of ethidium bromide in the cell / V.W.F. Burns // *Exp. Cell. Res.* – 1972. – Vol. 75. № 1. – P. 200-206.
195. Burrin D.G. Chapter 24 Gastrointestinal protein and amino acid metabolism in growing animals. – 2002. – № 10.
196. Burrin D.G. Effect of level of nutrition on splanchnic blood flow and oxygen consumption in sheep / D.G. Burrin [et al.] // *Brit. J. Nutr.* – 1989. – № 62. P. 23-34.
197. Burrin D.G. Transgenic hypersecretion of des (1-3) human insulin-like growth factor I in mouse milk has limited effects on the gastrointestinal tract in suckling pups / D.G. Burrin, M.L. Fiorotto, D.L. Hadsell // *J. Nutr.* – 1999. – № 129. – P. 51-56.
198. Buyse J. The role of the somatotrophic axis in the metabolism of the chicken / J. Buyse, E. Decuypere // *Domest Anim Endocrinol.* – 1999. – № 17(2-3). – P. 245-255.
199. Campbell W.C. History of the discovery of sulfaquinoxaline as a coccidiostat / W.C. Campbell // *J Parasitol.* – 2008. – № 94. – P. 934-945.

200. Caplin J.L. Presence of vancomycin and ampicillin-resistant enterococcus faecium of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England / J.L. Caplin, G.W. Hanlon, H.D. Taylor // *Environ Microbiol.* – 2008. – № 10. – P. 885-892.

201. Carbonero F. Contributions of the microbial hydrogen economy to colonic homeostasis / F. Carbonero, A.C. Benefiel, H.R. Gaskins // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2012. – № 9(9). – P. 504-18.

202. Carvalho I.T. Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario / I.T. Carvalho, L. Santos // *Environ Int.* – 2016. – № 94. – P. 736-757.

203. Casewell M.W. Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species / M.W. Casewell, J. Phillips // *Amer. J. Med.* – 1981. – Vol. 70, № 2. – P. 459-462.

204. Cash H.L. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin / H. L. Cash et al. // *Science.* – 2006. – № 313. – P. 1126-1130.

205. Castillo-Lypez R.I. Natural alternatives to growth-promoting antibiotics (GPA) in animal production / R.I. Castillo-Lypez, E.P. Gutiérrez-Grijalva, N. Leyva-López [et al.] // *J. Anim. Plant Sci.* – 2017. – Vol. 27(2). – P. 349-359.

206. CCFH. Food safety risk profile for *Salmonella* species in broiler (young) chickens. Codex Committee on Food Hygiene Working Group on guidelines for control of *Campylobacter* and *Salmonella* species in broiler (young bird) chicken meat. 2007. Available from: [http:// www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Food\\_Safety\\_Risk-Compiled\\_Ccfh.pdf](http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Food_Safety_Risk-Compiled_Ccfh.pdf)

207. Celi P. Effects of organic selenium supplementation on growth performance, nutrient utilisation, oxidative stress and selenium tissue concentrations in broiler chickens / P. Celi, P.H. Selle, A.J. Cowieson // *Anim. Prod. Sci.* – 2014. – № 54. – P. 966-971.

208. Celi P. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the productive performance of dairy cows during mid-lactation / P. Celi, H.W. Raadsma // *Anim. Prod. Sci.* – 2010. – № 50. – P. 339-344.

209. Celi P. Oxidant/Antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation / P. Celi, G. Gabai // *Front. Vet. Sci.* – 2015. – № 2. – P. 48.

210. Chalkias A. Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA / A. Chalkias [et al.] // *Am J Clin Oncol.* – 2011. – № 34. – C. 561-566.

211. Chan D.K. Diagnosing gastrointestinal illnesses using fecal headspace volatile organic compounds / D.K. Chan, C.L. Leggett, K.K. Wang // *World J Gastroenterol.* – 2016. – № 22(4). – P. 1639-1649.

212. Chan T.Y. Health hazards due to clenbuterol residues in food / T.Y. Chan // *J Toxicol Clin Toxicol.* – 1999. – № 37. – P. 517-519.

213. Chansiripornchai N. Comparative efficacy of enrofloxacin and oxytetracycline by different administration methods in broilers after experimental infection with avian pathogenic *Escherichia coli* / N. Chansiripornchai // *Thai. J. Vet. Med.* – 2009. – № 39. – P. 231-236.

214. Chart H. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 $\alpha$ , and EQ1 / H. Chart [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 2000. – № 89. – P. 1048-1058.

215. Chattopadhyay M.K. Use of antibiotics as feed additives: a burning question / M.K. Chattopadhyay // *Front Microbiol.* – 2014. – № 5. – P. 334.

216. Chaveerach P. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on campylobacter infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes / P. Chaveerach [et al.] // *Poult Sci.* – 2004. – № 83. – P. 330-334.

217. Che ville N.F. Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds / N.F. Che ville, L.H. Arp // *Journal of the American Veterinary Medical Association.* – 1978. – № 173. – P. 584-587.

218. Chen C.Y. Visualizing the effects of antibiotics on the mouse colonic mucus layer / C.Y. Chen et al. // *Ci Ji Yi Xue Za Zhi.* – 2019. – № 32(2). – P. 145-153.

219. Chen J. Identification of Potential Biomarkers for Gut Barrier Failure in Broiler Chickens / J. Chen [et al.] // *Front Vet Sci.* – 2015. – № 2. – P. 14.

220. Cherrington C.A. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications / C.A. Cherrington [et al.] // *Adv Microb Physiol.* – 1991. – № 32. – P. 87-108.

221. Christensen J.P. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars gallinarum and pullorum in relation to typing and virulence Ph.D / J.P. Christensen // Thesis, Department of Veterinary Microbiology, The Royal Veterinary and Agricultural University; Copenhagen, Denmark. – 1996.

222. Chu B. Biopolymers / B. Chu, Z.-L. Wang, C. Wu // 1989. – № 28. – P. 1491-1494.

223. Cidlowski J.A. Glucocorticoids stimulate ribonucleic acid degradation in isolated rat thymic lymphocytes in vitro / J.A. Cidlowski // *Endocrinology.* – 1982. – № 111. – P. 184-190.

224. Cloud S.S. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity / S.S. Cloud [et al.] // *Avian Dis.* – 1985. – № 29. – P. 1084-1093.

225. Coates M. The Effect of Antibiotics on the Intestine of the Chick / M. Coates, M. Davies, S. Kon // *British Journal of Nutrition.* – 1955. – 9(1). – P. 110-119.

226. Coates M.E. The gut microflora and the uptake of glucose from the small intestine of the chick / M.E. Coates et al. // *British Poultry Science.* – 1981. – № 22. – P. 289-94.

227. Collet S.R. Nutrition and wet litter problems in poultry / S.R. Collet // *Animal Feed Science and Technology.* – 2012. – Vol. 173. – pp. 65-75.

228. Conway D.P. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella* and *E. Maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens / D.P. Conway [et al.] // *Avian Dis.* – 1993. – № 37. – P. 118-123.

229. Cook J. Detection of protein-DNA complex formation by time-resolved fluorescence depolarization of bound ethidium bromide / J. Cook, G. Holtom, P. Lu // *Anal Biochem.* – 1990. – № 190(2). – P. 331-339.

230. Cooper K.K. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry / K.K. Cooper, J.G. Songer, F.A. Uzal // *J Vet Diagn Invest.* – 2013. – 25(3). P. 314-327.

231. Cowieson A.J. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition / A.J. Cowieson, M. Hruby, E.E. Pierson // *Nutr Res Rev.* – 2006. – № 19. – P. 90-103.

232. Cowieson A.J. The environmental impact of low feed conversion ratios in poultry / A.J. Cowieson, P.H. Selle // 2012. <https://en.engormix.com/poultry-industry/articles/impact-of-low-feed-conversion-ratios-in-poultry-t34854.htm>. (accessed 15.01.2019).

233. Crenn P. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans / P. Crenn [et al.] // *Gastroenterology.* – 2008. – № 119. – P. 1496-1505.

234. Crenn P. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction / P. Crenn, B. Messing, L. Cynober // *Clin Nutr.* – 2008. – № 27. – C. 328-39.

235. Crowley J. Systemic and respiratory oxidative stress in the pathogenesis and diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia / J. Crowley [et al.] // *Equine Vet. J.* – 2013. – № 45. – P. 20-25.

236. Cullender T.C. Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut / T.C. Cullender [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2013. – № 14(5). – P. 571-581.

237. Dahlberg A.E. Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in agaroseacrylamide composite gels / A.E. Dahlberg, C.W. Dingenon, A.C. Peacock // *J. Mol. Biol.* – 1969. – V. 41. – P. 139-147.

238. Daneshmand A. Evaluating complementary effects of ethanol extract of propolis with the probiotic on growth performance, immune response and serum

metabolites in male broiler chickens / A. Daneshmand [et al.] // *Livest Sci.* – 2015. – № 178. – P. 195-201.

239. Danzeisen J.L. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment / J.L. Danzeisen [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – № 6.

240. De Liguoro M. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil / M. De Liguoro [et al.] // *Chemosphere.* – 2003. – № 52. – P. 203-212.

241. De Maesschalck C. Effects of Xylo-Oligosaccharides on Broiler Chicken Performance and Microbiota / De C. Maesschalck [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2015. – № 81(17). – P. 5880-5888.

242. De Santis S. Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation / S. De Santis [et al.] // *Front Immunol.* – 2015. – № 6. – P. 612.

243. Del Prete M.J. Degradation of cellular mRNA is a general early apoptosis-induced event / M.J. Del Prete [et al.] // *FASEB J.* – 2002. – № 16. – P. 2003-2005.

244. Desai D. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel diseases / D. Desai, W.A. Faubion, W.J. Sandborn // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2007. – № 25(3). – P. 247-255.

245. Dessouky M.I. *Arch. Geflügelk.* – 1982. – V.46, № 4. – C. 145-150.

246. Devarajan N. Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. In the aquatic environment: a prevalence study under tropical and temperate climate conditions / N. Devarajan [et al.] // *Water Res.* – 2017. – № 115. – P. 256-265.

247. Devriese S. Reduced Mucosa-associated *Butyrivibrio* Activity in Patients with Ulcerative Colitis Correlates with Aberrant Claudin-1 Expression / S. Devriese [et al.] // *J Crohns Colitis.* – 2017. – №. 11(2). – P. 229-236.

248. Dhillon A.S. Two outbreaks of colibacillosis in commercial caged layers / A.S. Dhillon, O.K. Jack // *Avian Diseases.* – 1996. – №. 40. – P. 742-746.

249. Dho-Moulin M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) / M. Dho-Moulin, J.M. Fairbrother // *Vet. Res.* – 1999. – № 30. – P. 299-316.

250. Diarra M.S. Antibiotics in canadian poultry productions and anticipated alternatives / M.S Diarra, F. Malouin // Front Microbiol. – 2014. – № 5. – P. 282.

251. Dibner J.J. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action / J.J. Dibner, J.D. Richards // Poult Sci. – 2005. – № 84. – № 634–643.

252. Dominguez D.C. HJ. Bacteriol / D.C. Dominguez, H. Adams, J. Hageman // 1999. – № 181. – P. 4605-4610.

253. Ducatelle R. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives / R. Ducatelle [et al.] // Veterinary research. – 2018. – № 49(1). – P. 43.

254. Dugan M.E.R. Glutamine and glucose metabolism in intraepithelial lymphocytes from pre- and post-weaning pigs / M.E.R. Dugan, D.A. Knabe, G. Wu // Comp. Biochem. Physiol. – 1994. – № 109B. P. 675-681.

255. Dumonceaux T.J. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. / T.J. Dumonceaux [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2006. – № 72. – P. 2815-2823.

256. Eeckhaut V. The Probiotic *Butyricicoccus pullicaecorum* Reduces Feed Conversion and Protects from Potentially Harmful Intestinal Microorganisms and Necrotic Enteritis in Broilers / V. Eeckhaut [et al.] // Front Microbiol. – 2016. – № 7. – P. 1416.

257. EFSA-ECDC European food safety authority and European Centre for disease prevention and control. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 // EFSA J. – 2016. – № 14.

258. Eisser H. Effect of *Streptococcus faecalis* and a filterable agent on growth and nutrient absorption in gnotobiotic chicks / H. Eisser, P. Somer // Poultry Science. – 1966. – № 42. – P.1373-1379.

259. El-Hafez A. Studies on *Klebsiella* infections in Poultry / A. El-Hafez, M. Shaker // Poultry- Diseases. Poultry- Microbiology. – 2011. – 158 p.

260. El-Salhy M. Interaction between diet and gastrointestinal endocrine cells / M. El-Salhy [et al.] // Biomed Rep. – 2016. – № 4(6). – P. 651-656.

261. Eng S.K. Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance / S.K. Eng [et al.] // *Front Life Sci.* – 2015. – № 8. – P. 284-293.

262. Engberg R.M. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers / R.M. Engberg [et al.] // *Poult Sci.* – 2000. – № 79. – P. 1311-1319.

263. ESVAC. Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 european countries in 2015. Trends from 2010 to 2015. Seventh Esvac Report. Ema/184855/2017.

264. Ewaschuk J.B. D-lactate in human and ruminant metabolism / J.B. Ewaschuk, J.M. Naylor, G.A. Zello // *J Nutr.* – 2005. – № 135(7). – P. 1619-1625.

265. Ewers C. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC) / C. Ewers, T. Janssen, L.H. Wieler // *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* – 2003. – № 116. – P. 381-395.

266. Faber F. The impact of intestinal inflammation on the nutritional environment of the gut microbiota / F. Faber, A.J. Bäumlér // *Immunol Lett.* – 2014. – № 162(2 Pt A). – P. 48-53.

267. FAO. Gateway to poultry production and products. <http://www.fao.org/poultry-production-products/products-processing/en/> (accessed 20.01.2020).

268. Faria A.M. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens / A.M. Faria [et al.] // *Front Immunol.* – 2013. – № 4. – P. 102.

269. Fasina Y.O. Influence of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection on Intestinal Goblet Cells and Villous Morphology in Broiler Chicks / Y.O. Fasina [et al.] // *Avian Diseases.* – Vol. 54, № 2. – P. 841-847.

270. Fenton M. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials / M. Fenton [et al.] // *Bioeng Bugs.* – 2010. – № 1. – P. 9-16.

271. Fielding B.C. Antimicrobial-resistant Klebsiella species isolated from free-range chicken samples in an informal settlement / B.C. Fielding [et al.] // *Arch Med Sci.* – 2012. – № 8(1). – P. 39-42.

272. Finlay M.R. «Consumerist Terrorists»: Battles over agricultural antibiotics in the United States and Western Europe / M.R. Finlay, A.I. Marcus // *Agric Hist.* – 2016. – № 90. – P. 146-172.

273. Finlay M.R. Hogs, antibiotics and the industrial environments of postwar agriculture. In: Scranton P, Schrepfer SR (eds) *Industrializing organisms. Introducing evolutionary history*. Routledge, London. – 2004. – P. 237-260.

274. Fischer J.C. Assessment of mucosal integrity by quantifying neutrophil granulocyte influx in murine models of acute intestinal injury / J.C. Fischer [et al.] // *Cell Immunol.* – 2017. – № 316. – P. 70-76.

275. Franciosini M.P. Effects of oregano (*Origanum vulgare* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) aqueous extracts on broiler performance, immune function and intestinal microbial population / M.P. Franciosini, P. Casagrande-Proietti, C. Forte [et al.] // *J. Appl. Anim. Res.* – 2016. – Vol. 44(1). – P. 474-479.

276. Frankic T. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition / T. Frankic [et al.] // *Acta Agric Slov.* – 2009. – № 94. – P. 95-102.

277. Fung S. Ceca microbiome of mature broiler chickens fed with or without salinomycin in the gut microbiome: the effector/regulatory immune network conference (B3). *Keystone symposia onmolecular and cellular biology (Taos)*. – 2013.

278. Furtula V. Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia Coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials / V. Furtula [et al.] // *Poult Sci.* – 2010. – № 89. – P. 180-188.

279. Gabai G. Oxidative stress in primiparous cows in relation to dietary starch and the progress of lactation / G. Gabai [et al.] // *Anim. Sci.* – 2004. – № 79. – P. 99-108.

280. Gaito J. *Molecular psychobiology*. Illinois. Charles C.Thomas Publ. 1966.

281. Gangadoo S. Nanoparticles in feed: progress and prospects in poultry research / S. Gangadoo [et al.] // *Trends Food Sci Technol.* – 2016. – № 58. – P. 115-126.

282. Garcia-Hernandez V. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation / V. Garcia-Hernandez, M. Quiros, A. Nusrat // *Ann N Y Acad Sci.* – 2017. – № 1397(1). – P. 66-79.

283. Gassner B. Pharmacokinetic and toxicological aspects of the medication of beef-type calves with an Oral formulation of chloramphenicol palmitate / B. Gassner, A. Wuethrich // *J Vet Pharmacol Therapeut.* – 1994. – № 17. – P. 279-283.

284. Gast R.K. Effects of kanamycin administration to poultry on the interspecies transmission of drug-resistant Salmonella / R.K. Gast, J.F. Stephens, D.N. Foster // *Poult. Sci.* – 1988. – № 67. – P. 699-706.

285. Ghasemi H.A. Effects of black cumin seed (*nigella sativa* L.), a probiotic, a prebiotic and a synbiotic on growth performance, immune response and blood characteristics of male broilers / H.A. Ghasemi, N. Kasani, K. Taherpour // *Livest Sci.* – 2014. – № 164. – P. 128-134.

286. Ghosh S.S. Incidence of pullorum disease in Nagaland // *Indian Vet. J.* – 1988. – № 65. – P. 949-951.

287. Giannenas I. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella* / I. Giannenas [et al.] // *Vet Parasitol.* – 2012. – № 188. – P. 31-40.

288. Gibson G.R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics / G.R. Gibson, M.B. Roberfroid // *J Nutr.* – 1995. – № 125. – P. 1401.

289. Gilani S. Intestinal permeability induced by lipopolysaccharide and measured by lactulose, rhamnose and mannitol sugars in chickens / S. Gilani [et al.] // *Animal.* – 2017. – № 11(7). – P. 1174-1179.

290. Gilani S. New biomarkers for intestinal permeability induced by lipopolysaccharide in chickens / S. Gilani [et al.] // *Anim Prod Sci.* – 2016. – № 56. – P. 1984-1997.

291. Goldberg H.A. The staining of acidic proteins on polyacrylamide gels: enhanced sensitivity and stability of «Stains-all» staining in combination with silver

nitrate / H.A. Goldberg, K.J. Warner // analytical biochemistry. – 1997. – № 251(2). – P. 227-233.

292. Golder H.M. Effects of grain, fructose, and histidine feeding on endotoxin and oxidative stress measures in dairy heifers / H.M. Golder [et al.] // J. Dairy Sci. – 2013. – № 96. – P. 7881-7891.

293. Goldsmith J.R. The role of diet on intestinal microbiota metabolism: downstream impacts on host immune function and health, and therapeutic implications / J.R. Goldsmith, R.B. Sartor // J Gastroenterol. – 2014. – № 49(5). – P. 85-98.

294. Gonzalez Ronquillo M. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods / M. Gonzalez Ronquillo, J.C. Angeles Hernandez // Food Contr. – 2017. – № 72. – P. 255-267.

295. Gordon R.Y. (1997) Acridine orange as an indicator of ribosome state in cell / R.Y. Gordon [et al.] // Cytometry. – № 29(3) – P. 215-221.

296. Goren E. Colibacillose bijpluimvee: etiologie, pathologie en therapie // Tijdschrift voor Diergeneeskunde. – 1991. – № 116. – P. 1122-1129.

297. Green M.R. Differential staining of phosphoproteins on polyacrylamide gels with a cationic carbocyanine dye / M.R. Green, J.V. Pastewka, A.C. Peacock // Analytical Biochemistry. – 1973. – № 56 (1). – P. 43-51.

298. Greenwood D. Medical Microbiology / D. Greenwood, R.C.B. Slack, J.F. Peutherer // 16th Edn., Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York-Philadelphia-St. Louis-Sydney-Toronto. – 2002. – P. 168-173.

299. Gross W.B. Diseases due to Escherichia coli in poultry. In: Gyles CL, editor. Escherichia coli in Domestic Animals and Humans // CAB International Library; Wallingford, UK. – 1994. – P. 237-260.

300. Gross W.B. Effect of ascorbic acid on the disease caused by Escherichia coli challenge infection / W.B. Gross, D. Jones, J. Cherry // Avian Diseases. – 1988. – № 32. – P. 407-409.

301. Gross W.B. Effect of short-term exposure of chickens to corticosterone on resistance to challenge exposure with Escherichia coli and antibody response to sheep erythrocytes // Am. J. Vet. Res. – 1992. – № 53. – P. 291-293.

302. Gross W.B. Production and persistence of antibodies in chickens to sheep erythrocytes. 2. Resistance to infectious diseases / W.B. Gross [et al.] // *Poult. Sci.* – 1980. – № 59. – P. 205-210.
303. Gryan B. *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* of *Sacharomycesboulardii*.// *Scand. J. infect. Dis.* – 1990. – V.22. – P. 1-4.
304. Guerville M. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation / M. Guerville, G. Boudry // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2016. – № 311(1). – P. 1-15.
305. Guillot J.F. Phénotypes D'*escherichia Coli* D'origine aviaire vis-À-vis des ominosides / J.F. Guillot [et al.] // *Med Maladies Infect.* – 1977. – № 7. – P. 449-455.
306. Guilloteau P. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate / P. Guilloteau [et al.] // *Nutr Res Rev.* – 2010. – № 23(2). – P. 366-84.
307. Haag D. Simultaneous differential staining of nucleic acids and proteins in histological tissues by means of j-band effect / D. Haag, C. Tschahargane, K. Goerttler // *Histochemie.* – 1971. – № 26. – P. 190-193.
308. Hall W.J. Studies on fowl typhoid / W.J. Hall, D.H. Legenhausen, A.D. Macdonald // 1. Nature and dissemination. *Poult. Sci.* – 1949. – № 28. – P. 344-362.
309. Haritova A.M. Expression of drug efflux transporters in poultry tissues / A.M. Haritova, J. Schrickx, J. Fink-Gremmels // *Res Vet Sci.* – 2010. – № 89(1). – P. 104-107.
310. Harms R.H. Influence of virginiamycin on broilers fed four levels of energy / R.H. Harms, N. Ruiz, R.D. Miles // *Poult Sci.* – 1986. – № 65. – P. 1984-1986.
311. Harry E.G. The association between the presence of septicemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicemia / E.G. Harry, L.A. Hemsley // *Vet. Rec.* – 1965. – № 77. – P. 35-40.

312. Hassan H.M.A. Effect of using organic acids to substitute antibiotic growth promoters on performance and intestinal microflora of broilers / H.M.A. Hassan [et al.] // *Asian-Australas J Anim Sci.* – 2010. – № 23. – P. 1348-1353.
313. Hassanein S.M. Effect of probiotic (*Saccharomyces Cerevisiae*) adding to diets on intestinal microflora and performance of hy-line layers hens / S.M. Hassanein, N.K. Soliman // *J Am Sci.* – 2010. – № 6.
314. Henderson S.C. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis / S.C. Henderson, D.I. Bounous, M.D. Lee // *Infect. Immun.* – 1999. – № 67. – P. 3580-3586.
315. Henry P. Effect of antibiotics on tissue trace mineral concentration and intestinal tract weight of broiler chicks / P. Henry et al. // *Poultry Science.* – 1987. – № 66. – P. 1014-1018.
316. Higashiguchi T. Effect of glutamine on protein synthesis in isolated intestinal epithelial cells / T. Higashiguchi [et al.] // *J. Parent. Enter. Nutr.* – 1993. – № 17. – P. 307-314.
317. Higashiguchi T. Effect of sepsis on mucosal protein synthesis in different parts of the gastrointestinal tract in rats / T. Higashiguchi [et al.] // *Clin. Sci.* – 1994. – № 87. – P. 207-211.
318. Hinz K.-H. Multikausal bedingte infektiöse atemwegserkrankung junger mastputen / K.-H. Hinz [et al.] // *Dtsch Tieraerztl Wochenschr.* – 1992. – № 99. – C. 75-78.
319. Hoffmann S. Current Politics and economics of the United States / S. Hoffmann, B. Maculloch, M. Batz // *Canada and Mexico.* – 2015. – P. 543-616.
320. Hollingsworth M.A. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface / M.A. Hollingsworth, B. J. Swanson // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – № 4. – P. 45-60.
321. Holmberg S.D. Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials / S.D. Holmberg [et al.] // *N. Eng. J. Med.* – 1984. – № 311. – P. 617-622.
322. Hooper L.V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat. Rev. Microbiol.* – 2009. – № 7. – P. 367-374.

323. Hu Z. Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens / Z. Hu, Y. Guo // *Anim Feed Sci Technol.* – 2007. – № 132. – P. 240-249.

324. Hughes E.R. Microbial Respiration and Formate Oxidation as Metabolic Signatures of Inflammation-Associated Dysbiosis / E.R. Hughes [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2017. – № 21(2). – P. 208-219.

325. Hughes L. Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms / L. Hughes, P. Hermans, K. Morgan // *J Antimicrob Chemother.* – 2008. – № 61(4). – P. 947-952.

326. Humbert F. The risk of transmission of salmonellae in poultry farming: Detection and prevention in Europe / F. Humbert, G. Salvat // *Rev. Sci. Tech.* – 1997. – № 16. – P. 83-90.

327. Huyghebaert G. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers / G. Huyghebaert, R. Ducatelle, F. Van Immerseel // *Vet J.* – 2011. – № 187. – P. 182-188.

328. Hydén H. Biochemical and functional interplay between neuron and glia // *Res. Adv. in Biol. Psychiatry.* – 1964. – v. 6. – P. 31-54.

329. Iizuka M. Wound healing of intestinal epithelial cells / M. Iizuka, S. Konno // *World J Gastroenterol.* – 2011. – № 17. – C. 2161-2171.

330. Ilan Y. Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in non-alcoholic steatohepatitis / Y. Ilan // *World J Gastroenterol.* – 2012. – № 18(21). – P. 2609-2618.

331. Irwin R.J. The prevalence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and antimicrobial resistance patterns of nonverocytotoxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* in Ontario broiler chickens / R.J. Irwin [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 1989. – № 53. – P. 411-418.

332. Ivanov I.I. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine / I.I. Ivanov [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2008. – № 4. – P. 337-349.

333. Izat A.L. Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on microflora of the intestine and carcass / A.L. Izat [et al.] // *Poult Sci.* – 1990. – № 69. – P. 818-826.

334. Janssen Duijghuijsen L.M. Mitochondrial ATP Depletion Disrupts Caco-2 Monolayer Integrity and Internalizes Claudin 7 / L.M. Janssen Duijghuijsen [et al.] // *Front Physiol.* – 2017. – № 8. – P. 794.

335. Jarriyawattanachaikul W. Antimicrobial activity of Thai-Herbal plants against food-borne pathogens E. Coli, S. Aureus and C. Jejuni / W. Jarriyawattanachaikul, P. Chaveerach, N. Chokesajjawatee // *Agri and Agri Sci Procedia.* – 2016. – № 11. P. 20-24.

336. Jennewein J. Low-oxygen tensions found in Salmonella-infected gut tissue boost Salmonella replication in macrophages by impairing antimicrobial activity and augmenting Salmonella virulence / J. Jennewein [et al.] // *Cell Microbiol.* – 2015. – № 17(12). – P. 1833-1847.

337. Jerzsele A. Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and bacillus amyloliquefaciens spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers / A. Jerzsele [et al.] // *Poult Sci.* – 2012. – № 91. – P. 837-843.

338. Jia J. Selection for growth rate and body size have altered the expression profiles of somatotropic axis genes in chickens / J. Jia., I. Ahmed, L. Liu [et al.] // *PLoS One.* – 2018 – № 13(4).

339. Johansson M.E. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria / M.E. Johansson [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – № 105. – P. 15064-15069.

340. Johnson R.W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated view / R.W. Johnson // *J. Anim. Sci.* – 1997. – № 75. – P. 1244-1255.

341. Jones S.D. *Valuing Animals. Veterinarians and their patients in modern America.* Johns Hopkins University Press, London and Baltimore. 2003.

342. Jong E.U. Uso de avoparcina e virginiamicina como promotores de crescimento em rações de frangos de corte. 2. Efeito sobre a flora intestinal e estrutura

física do intestine / E.U. Jong [et al.] // Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia. – 1985. – № 14. – P. 536-42.

343. Jordan F.T. Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock / F.T. Jordan [et al.] // Vet. Rec. – 2005. – № 157. – P. 573-577.

344. Józefiak D. A note on the effects of selected prebiotics on the performance and ileal microbiota of broiler chickens. / D. Józefiak, S. Kaczmarek, A. Rutkowski // J Anim Feed Sci. – 2008. – № 17. – № 392-397.

345. Kaakoush N.O. Microbial dysbiosis in pediatric patients with Crohn's disease / N.O. Kaakoush [et al.] // J Clin Microbiol. – 2012. – № 50(10). – P. 3258-3266.

346. Kacprzyk S.S. Ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u 1-letniego dziecka wywołane przez pałeczki *Klebsiella ozaenae* / S.S. Kacprzyk, G. Krysiak // «Wiad. Lek.». – 1983. – № 10. – P. 871-872.

347. Karaffová V. Interaction of TGF- $\beta$ 4 and IL-17 with IgA secretion in the intestine of chickens fed with *E. faecium* AL41 and challenged with *S. enteritidis* / V. Karaffová [et al.] // Res Vet Sci. – 2015. – № 100. – C. 75-79.

348. Karnaukhov V.N. Spectral analysis in cell-level monitoring of environmental state. Nauka, Moscow. 2001.

349. Karnaukhova N. Application of microspectral luminescent analysis to study the intracellular metabolism in single cells and cell systems / N. Karnaukhova, L. Sergievich, V. Karnaukhov // Natural Science. – 2010. – № 2. – P. 444-449.

350. Karnaukhova N.A. Changes in fluorescent spectra of acridine orange stained blood cells from patient suffering from lymphosarcoma and leukemias in the course of chemotherapy. Experimental Oncology. – 1991. – № 13(1). – P. 50-53.

351. Karnaukhova N.A. Changes in the synthetic activity of lymphocytes under the action of physical factors related to Solar activity variations / N.A. Karnaukhova [et al.] // Biophysics. – 2004. – № 49. – P. 552-559.

352. Karnaukhova N.A. Luminescence parameters of blood nuclear cells in process of immune reaction in organism // Biophysics. – 1984. – № 29(2). – 276-279.

353. Karnaukhova N.A. Microspectral studies on neuroendocrine regulation of gametogenesis in mollusk / N.A. Karnaukhova [et al.] // *Biophysics*. – 2003. – № 48(5). – P. 869-873.
354. Karnaukhova N.A. Study into the changes in the functional state of the synthesis apparatus of blood lymphocytes under the action of weak low-frequency magnetic fields / N.A. Karnaukhova [et al.] // *Biophysics*. – 2000. – № 45(4). – P. 697-703.
355. Karnaukhova N.A. Synthetic activity of rat blood lymphocytes under acute and continuous gamma irradiation-fluorescent microspectral study / N.A. Karnaukhova [et al.] // *Radiation and Environmental Biophysics*. – 1999. – № 38(1). – P. 49-56.
356. Kaspersson, T. The cell function and the cell growth. W.W.Norton and Go. – 1950.
357. Kaur K. Enterotoxigenicity, klebocinogeny and antibiotic resistance pattern of food isolated of *Klebsiella pneumoniae* / K. Kaur, M. Kaul, S. Chhibber // *Folia Microbiol.* – 1988. – Vol. 3, № 6. – P. 500-506.
358. Keku T.O. The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer / T.O. Keku [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2015. – № 308(5). – P. 351-363.
359. Kempf I. Coût biologique De La résistance aux antibiotiques: analyse et consequences / I. Kempf, S. Zeitouni // *Pathol Biol.* – 2012. – № 60. – P. 9-14.
360. Kerr B.J. Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets J. Anim / B.J. Kerr, T.A. Kellner, G.C. Shurson // *Sci. Biotechnol.* – 2015. – № 6. – P. 30.
361. Khamisabadi H. Comparison of the effects of licorice extract (*Glycyrrhiza glabra*) and lincomycine on abdominal fat biochemical blood parameter and immunity of broiler chickens / H. Khamisabadi // *Anim Sci J.* – 2015. – № 105. – P. 229-244.
362. Khodambashi Emami N. The effect of peppermint essential Oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance,

digestibility, gut morphology and immune response of male broilers / N. Khodambashi Emami [et al.] // *Anim Feed Sci Technol.* – 2012. – № 175. – P. 57-64.

363. Kiela P.R. Physiology of intestinal absorption and secretion / P.R. Kiela, F.K. Ghishan // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2016. – № 30. – P. 145-159.

364. King K.L. 28S ribosome degradation in lymphoid cell apoptosis: Evidence for caspase and Bcl-2-dependent and -independent pathways / K.L. King [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2000. – № 7. – P. 994-1001.

365. Kirchhelle C. Pyrrhic progress. Antibiotics in Anglo-American food production 1935-2013. Rutgers University Press, Newark. 2019.

366. Kirchhelle C. Swann song British antibiotic regulation in livestock production (1953-2006) / C. Kirchhelle // *Bull Hist Med.* – 2018. – № 92. – P. 317-350.

367. Kirubakaran A. Influence of combinations of fenugreek, garlic, and black pepper powder on production traits of the broilers / A. Kirubakaran [et al.] // *Vet World.* – 2016. – № 9. – P. 470-474.

368. Knarreborg A. Dietary antibiotic growth promoters enhance the bioavailability of alpha-tocopheryl acetate in broilers by altering lipid absorption / A. Knarreborg [et al.] // *J Nutr.* – 2004. – № 134(6). – P. 1487-92.

369. Knarreborg A. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages / A. Knarreborg [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2002. – № 68(12). – P. 5918-5924.

370. Korpe P.S. Environmental enteropathy: critical implications of a poorly understood condition / P.S. Korpe, W.A. Petri // *Trends Mol Med.* – 2012. – № 18. – P. 328-336.

371. Kowalczyk J. Klebsiella spp. in the pathology of poultry and their role in epidemiology of human foodborne diseases / J. Kowalczyk // *Medycyna Weterynaryjna.* – 2017. – № 73. – P. 528-531.

372. Krinke A.L. Effects of Feed Antibiotic Avoparcine on Organ Morphology in Broiler Chickens / A.L. Krinke, D. Jamroz // *Poultry Science*. – 1996. – № 6. – P. 705-710.
373. Krysko D.V. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis / D.V. Krysko [et al.] // *Methods*. – 2008. – № 44. – P. 205-221
374. Kum S. Effects of dietary organic acid supplementation on the intestinal mucosa in broilers / S. Kum [et al.] // *Rev Med Vet*. – 2010. – № 10. – P. 463-468.
375. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. // *Chemosphere*. – 2009. – № 75. – P. 417–434.
376. Kusuzaki K. Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity / K. Kusuzaki [et al.] // *Curr Pharm Des*. – 2012. – № 18. – P. 1414-1420.
377. La Ragione R.M. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia / R.M. La Ragione, M.J. Woodward // *Res. Vet. Sci*. – 2002. – № 73. – P. 27-35.
378. Landecker H. The food of our food: Medicated feed and the industrialisation of metabolism (Keynote, Oxford, Keble College – Oxford Interdisciplinary Microbiome Project Workshop – 15 Feb 2017). 2017.
379. Landy N. Performance, carcass characteristics, and immunity in broiler chickens fed dietary neem (*Azadirachta Indica*) as alternative for an antibiotic growth promoter / N. Landy, G. Ghalamkari, M. Toghyani // *Livest Sci*. – 2011. – № 142. – P. 305-309.
380. Laroche E. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia Coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France) / E. Laroche [et al.] // *FEMS Microbiol Ecol*. – 2009. – № 68. – P. 118-130.
381. Latha S. John dickson calvin D., dhanasekaran D. In vitro probiotic profile based selection of indigenous actinobacterial probiont *Streptomyces* sp. Jd9 for enhanced broiler production / S. Latha, G. Vinothini // *J Biosci Bioeng*. – 2016. – № 121. – P. 124-131.

382. Le Pecq J.B. A fluoroscens complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization / J.B. Le Pecq, C. Paoletti // *J. Molecular Biology*. – 1967. – Vol. 27, № 1. – P. 87-106.

383. Le Pecq J.B. A new fluorometric method for RNA and DNA determination / J.B. Le Pecq, C. Paoletti // *Anal. Biochem.* – 1966. – № 17. – P. 100-107.

384. Lee K.W. Effects of anticoccidial and antibiotic growth promoter programs on broiler performance and immune status / K.W. Lee [et al.] // *Res Vet Sci.* – 2012. – № 93. – P. 721-728.

385. Lee M.J. Detergent extraction and enzymatic analysis for fecal long-chain fatty acids, triglycerides, and cholesterol / M.J. Lee [et al.] // *Clin. Chem.* – 1994. – № 40. – P. 2230-2234.

386. Lei K. Influence of dietary inclusion of *Bacillus licheniformis* on laying performance, egg quality, antioxidant enzyme activities, and intestinal barrier function of laying hens / K. Lei [et al.] // *Poult Sci.* – 2013. – № 92(9). – P. 2389-2395.

387. Lesch J.E. The first miracle drugs. How the sulfa drugs transformed medicine / Lesch J.E. // Oxford University Press, Oxford. 2007.

388. Levkut M. Leukocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers protected with *Enterococcus faecium* Ef55 and challenged with salmonella enteritidis / M. Levkut [et al.] // *Res Vet Sci.* – 2012. – № 93. – P. 195-201.

389. Lewis J.D. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease // *Gastroenterology*. – 2011. – № 140(6). – P. 1817-1826.

390. Li H.L. Phytoncide, phytogetic feed additive as an alternative to conventional antibiotics, improved growth performance and decreased excreta gas emission without adverse effect on meat quality in broiler chickens / H.L. Li [et al.] // *Livest Sci.* – 2015. – № 181. – P. 1-6.

391. Li X.S. Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from diseased chickens / X.S. Li [et al.] // *J. Vet. Sci.* – 2007. – № 8. – P. 243-247.

392. Lien K.A. Mucin output in ileal digesta of pigs fed a protein-free diet / K.A. Lien, W.C. Sauer, M. Fenton // *Z. Ernährungswiss.* – 1997. – № 36. – P. 182-190.
393. Liljebjelke K. A. Diversity of Antimicrobial Resistance Phenotypes in Salmonella Isolated from Commercial Poultry Farms / K.A. Liljebjelke // *Frontiers in veterinary science.* – 2017. – № 4. – P. 96.
394. Lin H. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*): 1.Chronic exposure / H. Lin, E. Decuyper, J. Buyse // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* – 2004. – № 139. – C. 737-744.
395. Lin J. Response of intestinal microbiota to antibiotic growth promoters in chickens / J. Lin [et al.] // *Foodb Pathog Dis.* – 2013. – № 10. – P. 331-337.
396. Liu F. Effects of a short-term supranutritional selenium supplementation on redox balance, physiology and insulin-related metabolism in heat-stressed pigs / F. Liu [et al.] // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* – 2018. – № 102. – P. 276-285.
397. Liu S.G. Studies on Klebsiella infection in chickens. I. Diagnosis and control of ophthalmia caused by Klebsiella. / S.G. Liu, M.H. Gan, Z.M. Zhao // *Chinese J Vet Med.* – 1988. – № 14. – C. 7-9.
398. Liu Y.W. Tetrathionate stimulated growth of *Campylobacter jejuni* identifies a new type of bi-functional tetrathionate reductase (TsdA) that is widely distributed in bacteria / Y.W. Liu [et al.] // *Mol Microbiol.* – 2013. – № 88(1). – P. 173-188.
399. Lobley G.E. Responses in tissue protein synthesis to suband supra-maintenance intake in young growing sheep: comparison of large-dose and continuous-infusion techniques / G.E. Lobley [et al.] // *Brit. J. Nutr.* – 1992. – № 68. – P. 373-388.
400. Lobley G.E. Whole body and tissue protein synthesis in cattle / G.E. Lobley [et al.] // *Brit. J. Nutr.* – 1980. – № 43. – P. 491-502.
401. Loddi M.M. Ação isolada ou combinada de antibiótico ou probiótico como promotores de crescimento em rações iniciais de frangos de corte / M.M.

Loddi [et al.] // Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa. Anais. – 2000. – P. 254.

402. Logan A.C. Immune-Microbiota Interactions: Dysbiosis as a Global Health Issue / A.C. Logan, F.N. Jacka, S.L. Prescott // *Curr Allergy Asthma Rep.* – 2016. – № 16(2). – P. 13.

403. López-Posadas R. Interplay of GTPases and Cytoskeleton in Cellular Barrier Defects during Gut Inflammation / R. López-Posadas [et al.] // *Front Immunol.* – 2017. – № 8. – P. 1240.

404. Louis P. Development of a semiquantitative degenerate real-time pcr-based assay for estimation of numbers of butyryl-coenzyme A (CoA) CoA transferase genes in complex bacterial samples / P. Louis, H.J. Flint // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – № 73(6). – P. 2009-2012.

405. Lutful Kabir S.M. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns // *International journal of environmental research and public health.* – 2010. – № 7(1). – P. 89-114.

406. Mabona U. Antimicrobial activity of southern african medicinal plants with dermatological relevance: from an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound / U. Mabona [et al.] // *J Ethnopharmacol.* – 2013. – № 148. – P. 45-55.

407. Macfarlane G.T. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health / G.T. Macfarlane, S. Macfarlane // *J. AOAC Int.* – 2012. – № 95. – P. 50-60.

408. Machiels K. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis / K. Machiels [et al.] // *Gut.* – 2014. – № 63(8). P. 1275-1283.

409. Mack D.R. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression / D.R. Mack [et al.] // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – № 39. – P. 941-950.

410. MacRae J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism / J.C. MacRae // *Proceedings of the Nutrition Society.* – 1993. – № 52. – P. 121-130.

411. Banner K.H. Macroscopic, microscopic and biochemical characterisation of spontaneous colitis in a transgenic mouse, deficient in the multiple drug resistance 1a gene / K.H. Banner [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2004. – № 143(5). – P. 590-598.
412. Makkink M.K. Fate of goblet cells in experimental colitis / M.K. Makkink et al. // *Dig. Dis. Sci.* – 2002. – № 47. – P. 2286-2297.
413. Mandel P. Metabolism of the nucleic acids in various zones of the brain / P. Mandel, S. Harth, T. Borkowski // In: *Regional Neurochemistry*. S.S.Kety and J.Elkes (Eds). New York, Pergamon Press. 1961.
414. Manichanh C. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach / C. Manichanh [et al.] // *Gut.* – 2006. – № 55(2). – P. 205-211.
415. Manning J. Screening for salmonella in backyard chickens / J. Manning, V. Gole, K. Chousalkar // *Prev Vet Med.* – 2015. – № 120. – P. 241-245.
416. Manzetti S. The environmental release and fate of antibiotics / S. Manzetti, R. Ghisi // *Mar Pollut Bull.* – 2014. – № 79. – P. 7-15.
417. Marti E. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance / E. Marti, E. Variatza, J.L. Balcazar // *Trends Microbiol.* – 2014. – № 22. – P. 36-41.
418. Mattes B.R. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos / B.R. Mattes [et al.] // *Arquivos do Instituto Biológico.* – 2005. – № 72. – P. 13-16.
419. McCole D.F. Epithelial transport and gut barrier function in colitis / D.F. McCole, K.E. Barrett // *Curr Opin Gastroenterol.* – 2003. – № 19(6). – P. 578-582.
420. McGrath J. Nutritional strategies in ruminants: a lifetime approach / J. McGrath [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 2018. – № 116. – P. 28-39.
421. McGruder E.D. Use of lipopolysaccharide (LPS) as a positive control for the evaluation of immunopotentiating drug candidates in experimental avian colibacillosis models / E.D. McGruder, G.M. Moore // *Res. Vet. Sci.* – 1998. – № 66. – P. 33-37.

422. Mehdi Y. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives / Y. Mehdi [et al.] // *Anim Nutr.* – 2018. – № 4(2). – P. 170-178.
423. Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends // *Foodborne Pathog Dis.* – 2013. – № 10(11). – P. 916-932.
424. Mergny J.L. Intercalation of ethidium bromide into a triple-stranded oligonucleotide / J.L. Mergny [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – № 19(7). – P. 1521-1526.
425. Minor L. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Boone R, Castenholz W, editors. Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA. – 1984. – P. 427-458.
426. Mohammadagheri N. Effects of dietary supplementation of organic acids and phytase on performance and intestinal histomorphology of broilers / N. Mohammadagheri, R. Najafi, G. Najafi // *Vet Res Forum.* – 2016. – № 7. – P. 189-195.
427. Mohammed Aly M. Isolation and Molecular Identification of *Klebsiella* Microbe Isolated from Chicks / Aly M. Mohammed, S. Khalil, A. Metwaly // *Alexandria Journal of Veterinary Sciences.* – 2014. – № 43. – P. 97-103.
428. Montagne L. Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay / L. Montagne, R. Toullee, J.P. Lalles // *J. Dairy Sci.* – 2000. – № 83. – P. 507-517.
429. Montgomerie J.Z. *Klebsiella* bacteremia / J.Z. Montgomerie, J.K. Ota // *Arch. Intern. Med.* – 1980. – Vol. 140, № 4. – P. 525-527.
430. Morales-Lopez R. Use of yeast cell walls; Beta-1, 3/1, 6-glucans; and mannoproteins in broiler chicken diets / R. Morales-Lopez [et al.] // *Poult Sci.* – 2009. – № 88. – P. 601-607.
431. Motta J.P. Hydrogen sulfide protects from colitis and restores intestinal microbiota biofilm and mucus production / J.P. Motta [et al.] // *Inflamm Bowel Dis.* – 2015. – № 21(5). – P. 1006-1017.
432. Mountzouris K.C. Assessment of a phytogetic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition

/ K.C. Mountzouris [et al.] // *Anim Feed Sci Technol.* – 2011. – № 168. – P. 223-231.

433. Mouttotou N. Prevalence, Risks and Antibiotic Resistance of Salmonella in Poultry Production Chain. 2017.

434. Mpofu D.A. The effects of *Lippia javanica* dietary inclusion on growth performance, carcass characteristics and fatty acid profiles of broiler chickens / D.A. Mpofu [et al.] // *Anim Nutri.* – 2016. – № 2. – P. 160-167.

435. Myers J.M. A Method for Enhancing the Sensitivity and Stability of Stains-All for Phosphoproteins Separated in Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gels / J.M. Myers [et al.] // *Analytical Biochemistry.* – 1996. – № 240 (2). – P. 300-302.

436. Nagalingam N.A. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases / N.A. Nagalingam, S.V. Lynch // *Inflamm Bowel Dis.* – 2012. – № 18(5). – P. 968-984.

437. Nash D. On the denaturation of chromosomal DNA in situ / D. Nash, W. Plaut // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1964. – V. 51, № 5. – P. 731-735.

438. Nava G.M. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation / G.M. Nava [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2009. – № 137. – P. 345-353.

439. Nevarez Garza A.M. Peso humedo del pulmon de Conejos diabeticos sometidos a un desafio transtoracico con el lipopolisacarido de *Klebsiella pneumoniae* / A.M. Nevarez Garza [et al.] // *Veterinaria – Mexico.* – 1997. – Vol. 28, № 3. – P. 247-250.

440. Nieto R. Integration of protein metabolism within the whole body and between organs. In: Lobely, G.E., White, A., MacRae, J.C. (Eds.), *Proceedings of the 8th International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition* / R. Nieto, G.E. Lobley // *EAAP Publication No.* – 1999. – № 96. – P. 69-99.

441. Niewold T.A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis / T.A. Niewold // *World Poultry Science Journal.* – 2007. – № 86. – P. 605-609.

442. Nolan L.K. Diseases of Poultry. 13th ed. Ch. 18. Ames: Wiley-Blackwell, Print. Colibacillosis. – 2013.
443. Okolo M.I. Bacterial drug resistance in meat animals: A review // *Int. J. Zoonoses*. – 1986. – № 13. – P. 143-152.
444. Omer M.M. An out break of gumboro disease associated with Colibacillosis among broiler and layer chicks in Kassala state, Eastern Sudan / M.M. Omer [et al.] // *Res. J. Poultry Sci.* – 2008. – № 2. – P. 27-28.
445. Orajaka L.J. Aerobic bacterial flora from dead-in-shell chicken embryos from Nigeria / L.J. Orajaka, K. Mohan // *Avian Dis.* – 1985. – № 29(3). – C. 583-589.
446. Celi P. PBiomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health / P. Celi, V. Verlhac, E. Pérez Calvo [et al.] / *Anim. Feed Sci. Technol.*, – 2019. – № 250. –P. 9-31.
447. Pakpinyo S. Molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of mycoplasma gallisepticum isolated from chickens / S. Pakpinyo, J. Sasipreeyajan // *Vet Microbiol.* – 2007. – № 125. – P. 59-65.
448. Pan D. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet / D. Pan, Z. Yu // *Gut Microb.* – 2014. – № 5. – P. 108-119.
449. Pan M. Leaching behavior of veterinary antibiotics in animal manure-applied soils / M. Pan, L.M. Chu // *Sci Total Environ.* – 2017. – № 579. – P. 466-473.
450. Pang T. Fecal biomarkers of intestinal health and disease in children / T. Pang [et al.] // *Front Pediatr.* – 2014. – № 2. – P. 6.
451. Park S.H. Microbial populations in naked neck chicken ceca raised on pasture flock fed with commercial yeast cell wall prebiotics via an illumina miseq platform / S.H. Park, S.I. Lee, S.C. Ricke // *PLoS One.* – 2016. – № 11.
452. Pedron T. Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing menage a trois / Pedron T., Sansonetti P. // *Cell Host Microbe.* – 2008. – № 3. – P. 344-347.
453. Pedroso A.A. Efeito de probiótico dietético sobre o desempenho, qualidade dos ovos e alguns aspectos morfológicos do trato intestinal e tecido ósseo de

poedeiras. [Dissertação] Jaboticabal, SP: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 1999.

454. Peng Q.Y. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens / Q.Y. Peng [et al.] // *Anim Feed Sci Technol.* – 2016. – № 214. – P. 148-153.

455. Pietro C. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health / C. Pietro [et al.] // *Animal Feed Science and Technology.* – Vol. 250. – 2019. – P. 9-31.

456. Pirgozliev V. Growth performance and endogenous losses of broilers fed wheat-based diets with and without essential oils and xylanase supplementation / V. Pirgozliev [et al.] // *Poult Sci.* – 2015. – № 94. – P. 1227-1232.

457. Plemel J.R. Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis / J.R. Plemel [et al.] // *J Cell Biol.* – 2017. – № 216. – P. 1163-1181.

458. Po E. Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of Thoroughbred foals / E. Po [et al.] // *Vet. J.* – 2013. – № 196. – P. 269-271.

459. Popova T. Effect of probiotics in poultry for improving meat quality / T. Popova // *Curr Opin Food Sci.* – 2017. – № 14. – P. 72-77.

460. Pourbakhsh S.A. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens / S.A. Pourbakhsh [et al.] // *Avian Dis.* – 1997. – № 41. – P. 221-233.

461. Qaisrani S. Diet structure, butyric acid, and fermentable carbohydrates influence growth performance, gut morphology, and cecal fermentation characteristics in broilers / S. Qaisrani [et al.] // *Poultry sci.* – 2015. – № 94. – P. 2152-2164.

462. Qaisrani S.N. Dietary factors affecting hindgut protein fermentation in broilers: a review / S.N. Qaisrani [et al.] // *World Poult Sci J.* – 2015. – № 71. – P. 139-160.

463. Radaelli M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens* / M. Radaelli, B. Parraga da Silva, L. Weidlich [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2016. – Vol. 47(2). – P. 424-430.
464. Rahman M.A. Bacterio-pathological studies on salmonellosis, colibacillosis and pasteurellosis in natural and experimental infections in chickens / M.A. Rahman [et al.] // *Bangl. J. Vet. Med.* – 2004. – № 2. – P. 1-8.
465. Rahman M.A. In vitro antibiotic sensitivity and therapeutic efficacy of experimental salmonellosis, colibacillosis and pasteurellosis in broiler chickens / M.A. Rahman // *Bangl. J. Vet. Med.* – 2004. – № 2. – P. 99-102.
466. Raila J. Validation of a new point-of-care assay for determination of beta-carotene concentration in bovine whole blood and plasma / J. Raila [et al.] // *Vet. Clin. Pathol.* – 2012. – № 41. – P. 119-122.
467. Raila J. Validation of blood vitamin A concentrations in cattle: comparison of a new cow-side test (iCheck™ FLUORO) with high-performance liquid chromatography (HPLC) / J. Raila [et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2017. – № 13. – P. 126.
468. Ranade R. Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of dairy heifer calves from birth to weaning / R. Ranade [et al.] // *Vet. J.* – 2014. – № 202. – P. 583-587.
469. Razmyar J. An outbreak of yolk sac infection and dead-in-shell mortality in common canary (*Serinus canaria*) caused by *Klebsiella pneumoniae*. / J. Razmyar, A.H. Zamani // *Iran J Vet Res.* – 2016. – № 17(2). – C. 141-143.
470. Rigler R. Microfluorimetric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine orange / R. Rigler // *Acta physiol. scand.* – 1966. – V. 67. – P. 267.
471. Rigler R. Molecular interactions and structure as analysed by fluorescence relaxation spectroscopy / R. Rigler, M. Ehrenberg // *Quart. Rev. Biophys.* – 1973. – V. 6, № 2. – P. 139-199.
472. Ritari J. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database / J. Ritari [et al.] // *BMC Genomics.* – 2015. – № 16. – P. 1056.

473. Rodriguez-Siek K.E. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis / K.E. Rodriguez-Siek [et al.] // *Microbiology*. – 2005. – № 151. – P. 2097-2110.

474. Roediger W.E. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis / W.E. Roediger, J. Moore, W. Babidge // *Dig Dis Sci*. – 1997. – № 42(8). – P. 1571-1579.

475. Rosen G.D. Antibacterials in poultry and pig nutrition. In: Wallace R.J., Chesson A., ed. *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*. – 1995. – P. 143-172.

476. Rosen G.D. Pronutrient antibiotic replacement standards discussed / G.D. Rosen // *Feedstuffs*. – 1996. – № 75. – P. 11-13.

477. Rosenberger J.K. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity / J.K. Rosenberger [et al.] // *Avian Dis*. – 1985. – № 29. – P. 1094–1107.

478. Round J.L. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease / J.L. Round, S.K. Mazmanian. // *Nat. Rev. Immunol*. – 2009. – № 9. – P. 313-323.

479. Ruff M.D. Lowered blood carotenoid levels in chickens infected with coccidian / M.D. Ruff, W.M. Reid, J.K. Johnson // *Poult. Sci*. – 1974. – № 53. – P. 1801-1809.

480. RUMA. Responsible use of medicines in agriculture alliance (Ruma) information on antibiotic resistance: 2016. [Ruma.org.UK/about/position-papers/ruma-information-note-antibiotics-responsible-use-antibiotics-farm-animals/](http://Ruma.org.UK/about/position-papers/ruma-information-note-antibiotics-responsible-use-antibiotics-farm-animals/).

481. Russo T.A. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem / T.A. Russo, J.R. Johnson // *Microbes Infect*. – 2003. – № 5(5). – P. 449-456.

482. Saenz Y. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals / Y. Saenz [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother*. – 2003. – № 51. – P. 1001-1005.

483. Salzman N.H. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa / N.H. Salzman, M.A. Underwood, C.L. Bevins // *Semin. Immunol.* – 2007. – № 19. – P. 70-83.
484. Samli H.E. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota / H.E. Samli [et al.] // *Arch Anim Nutr.* – 2007. – № 61. – P. 42-49.
485. Sanchez S. Animal sources of salmonellosis in humans / S. Sanchez [et al.] // *JAVMA.* – 2002. – № 221. – P. 492-497.
486. Sarakbi T.M.B. *Klebsiella* – a killer in the hatchery / T.M.B. Sarakbi // *Int Hatchery Pract.* – 1989. – № 3. – C. 19-21.
487. Sarakbi T.M.B. *Klebsiella* infection, a threat to the industry / T.M.B. Sarakbi // *Poultry.* – 1986. – T. 2. N 2. – P. 28-29.
488. Sarrabayrouse G. CD4CD8 $\alpha$  lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease / G. Sarrabayrouse [et al.] // *PLoS Biol.* – 2014. – № 12(4).
489. Saso L. *Commun* / L. Saso [et al.] // *Mol. Pathol. Pharmacol.* – 1999. – № 104. – P. 277-284.
490. Scanes C.G. Effect of chicken growth hormone, triiodothyronine and hypophysectomy in growing domestic fowl // C.G. Scanes, D.R. Duyka, T.J. Lauterio et al. *Growth.* – 1986. – № 50(1). – P. 12-31.
491. Scaria P. V. Binding of ethidium bromide to a DNA triple helix. Evidence for intercalation / P.V. Scaria, R.H. Shafer // *J. Biol. Chem.* – 1991. – № 266. – P. 5417.
492. Scharff R.L. State estimates for the annual cost of foodborne illness / R.L. Scharff // *J. Food Protect.* – 2015. – № 78. – P. 1064-1071.
493. Schoenberg D.R. Regulation of cytoplasmic mRNA decay / D.R. Schoenberg, L.E. Maquat // *Nat. Rev. Genet.* – 2012. – № 13. – P. 246-259.
494. Schouler C. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes / C. Schouler [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – № 50. – P. 1673-1678.

495. Sekirov I. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection / I. Sekirov et al. // *Infect. Immun.* – 2008. – № 76. – P. 4726-4736.
496. Semisotnov G.V. [et al.]. *Biopolymers.* – 1991. – № 31. – P. 119-128.
497. Sharma Y. Binding site conformation dictates the color of the dye stains-all. A study of the binding of this dye to the eye lens proteins crystallins / Y. Sharma [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1989. – № 264 (35). – P. 20923–7.
498. Shin N.R. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota / N.R. Shin, T.W. Whon, J.W. Bae // *Trends Biotechnol.* – 2015. – № 33(9). – P. 496-503.
499. Shivaprasad H.L. Fowl typhoid and pullorum disease / H.L. Shivaprasad // *Rev. Sci. Tech.* – 2000. – № 19. – P. 405-424.
500. Shivaprashad H.L. Pullorum disease and fowl typhoid. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDoughald LR, Saif YM, editors. *Diseases of Poultry.* 10th ed. Iowa State University press; Ames, IA, USA: – 1997. – P. 82-96.
501. Siddiqui I. Update on clinical and research application of fecal biomarkers for gastrointestinal diseases / I. Siddiqui, H. Majid, S. Abid // *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* – 2017. – № 8. – P. 39-46.
502. Silbergeld E.K. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health / E.K. Silbergeld, J. Graham, L.B. Price // *Annu Rev Publ Health.* – 2008. – № 29. – P. 151-169.
503. Silva M.A. Intestinal mucosa structure of broiler chickens infected experimentally with *Eimeria tenella* and treated with essential oil of oregano / M.A. Silva [et al.] // *Cienc. Rural [online].* – 2009. – Vol.39, N. 5. – P.1471-1477.
504. Singh P. Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens / P. Singh [et al.] // *Poult Sci.* – 2013. – № 92. – P. 272-276.
505. Slavik J. *Biochim Biophys Acta.* – 1982. – № 694. – P. 1-25.

506. Smith M.W. Growth and cell replacement in the new-born pig intestine / M.W. Smith, L.G. Jarvis // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1978. – № 203. – P. 69-89.
507. Smith S.B. Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis / S.B. Smith, P.K. Aldridge, J.B. Callas // Science. – 1989. – № 243. – P. 203-206.
508. Smith-Howard K. Healing animals in an antibiotic age: Veterinary drugs and the professionalism crisis, 1945–1970 / K. Smith-Howard // Technol Cult. – 2017. – № 58. – P. 722-748.
509. Smolin E.M. s-Triazines and Derivatives / E.M. Smolin, L. Rapoport // New York: Interscience Publishers, Inc. – 1959. – 644 p.
510. Sneha P. In-Vitro Studies of Bio-Silver Nanoparticles in Cytotoxicity and Anti- Inflammatory / P. Sneha, S. Sasikumar, M. Dakshinamoorthi // Journal of Complementary Medicine and Alternative Healthcare. – 2018. – Vol. 7. Iss. 4. – P. 01-10.
511. Sonawane M. C-reactive protein: a major inflammatory biomarker / M. Sonawane, S.B. Nimse // Anal Methods. – 2017. – № 9. – P. 3400–3413.
512. Sorensen J.S. Efflux transporters as a novel herbivore countermechanism to plant chemical defenses / J.S. Sorensen, M.D. Dearing // J Chem Ecol. – 2006. – № 32(6). – P. 1181-1196.
513. Stanley D. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences / D. Stanley [et al.] // BMC Microbiol. – 2015. – № 27. – P. 51.
514. Stecher B. The role of microbiota in infectious disease / B. Stecher, W.D. Hardt // Trends Microbiol. – 2008. – № 16. – P. 107-114.
515. Stoll B. Enteral nutrient intake determines the rate of intestinal protein synthesis and accretion in neonatal pigs / B. Stoll [et al.] // Amer. J. Physiol. – 2000. – № 279. – P. 288-294.
516. Stoll B. Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets / B. Stoll [et al.] // Amer. J. Physiol. – 1999. – № 277. – P. 168-175.

517. Stromberg Z.R. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health / Z.R. Stromberg [et al.] // *PloS one*. – 2017. – № 12(7).

518. Sunuwar L. The zinc sensing receptor, ZnR/GPR39, in health and disease / L. Sunuwar, D. Gilad, M. Hershfinkel // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2017. – № 22. – P. 1469-1492.

519. Szondy Z. The effect of various concentrations of nucleobases, nucleosides or glutamine on the incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine into DNA in rat mesenteric-lymph-node lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin / Z. Szondy, E.A. Newsholme // *Biochem. J*. – 1990. – № 270. – P. 437-440.

520. Taatjes D.J. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis / D.J. Taatjes, B.E. Sobel, R.C. Budd // *Histochem. Cell Biol*. – 2008. – № 129. – P. 33-43.

521. Teirlynck E. The cereal type in feed influences gut wall morphology and intestinal immune cell infiltration in broiler chickens / E. Teirlynck [et al.] // *Br J Nutr*. – 2009. – № 102(10). – P. 1453-1461.

522. Tellez G. Rye affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition and bone mineralization in Turkey poults / G. Tellez [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – № 10(4).

523. Tellez G. Utilization of rye as energy source affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition, and bone mineralization in broiler chickens / G. Tellez [et al.] // *Front Genet*. – 2014. – № 5. – P. 339.

524. Thim L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell. Mol. Life Sci*. – 1997. – № 53. – P. 888-903.

525. Thirugnanasampandan R. Antigenotoxic and apoptotic activities of essential oil of *Atalantia monophylla* Correa / R. Thirugnanasampandan, G. Ramya, M. Gogulramnath // *Indian J Pharmacol*. – 2016. – № 48(6). – P. 720-724.

526. Thoms U. Between promise and threat. antibiotics in foods in west Germany 1950-1980 // *NTM*. – 2012. – № 20. – P. 181-214.

527. Toghyani M. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks / M. Toghyani [et al.] // *Livest Sci.* – 2011. – № 138. – P. 167-173.

528. Toghyani M. Evaluation of kefir as a potential probiotic on growth performance, serum biochemistry and immune responses in broiler chicks / M. Toghyani [et al.] // *Animal Nutr.* – 2015. – № 1. – P. 305-309.

529. Torok V.A. Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance / V.A. Torok [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2011. – № 77. – P. 3380-3390.

530. Travis S. Intestinal permeability: functional assessment and significance / S. Travis, I. Menzies // *Clin Sci (Lond).* – 1992. – № 82(5). – P. 471-488.

531. Umoh F.I. Markers of systemic exposures to products of intestinal bacteria in a dietary intervention study / F.I. Umoh [et al.] // *Eur J Nutr.* – 2016. – № 55(2). P. 793-798.

532. Upton M.L. Transfer of macroscale tissue strain to microscale cell regions in the deformed meniscus / M.L. Upton [et al.] // *Biophys J.* – 2008. – № 95. – P. 2116-2124.

533. Valentin A. Untersuchungen zur Aetiologie und Pathogenese der tiefen Dermatitis bei Schlachtbroilern / A. Valentin, K. Willsch // *Mh. Veter.-Med.* – 1987. – T. 42. № 19. – P. 708-711.

534. Vallee B.L. Spectro-chemical probes for protein conformation and function.- Cold Spring Harbor Sympos / B.L. Vallee [et al.] // *Quant. Biol.* – 1972. – V. 36. – P. 517-531.

535. Van den Abbeele P. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept / P. Van den Abbeele [et al.] // *FEMS Microbiol Rev.* – 2011. – № 35(4). – P. 681-704.

536. Van der Sluis M. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection / M. Van der Sluis et al. // *Gastroenterology.* – 2006. – № 131. – P. 117-129.

537. Van Klinken B.J. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion / B.J. Van Klinken [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1995. – № 269. – P. 613-627.
538. Vanden Berghe T. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo / T. Vanden Berghe [et al.] // *Methods.* – 2013. – № 61. – P. 117-129.
539. Vanderkerchove D. Risk factors associated with colibacillosis outbreaks in caged layer flock / D. Vanderkerchove [et al.] // *Avian Pathol.* – 2004. – № 33. – P. 337-342.
540. VerBerkmoes N.C. Systems biology: Functional analysis of natural microbial consortia using community proteomics / N.C. VerBerkmoes [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* – 2009. – № 7(3). – P. 196-205.
541. Vieira M.M. Carotenoids, Retinol, and Intestinal Barrier Function in Children From Northeastern Brazil / M.M. Vieira [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2008. – № 47. – P. 652-659.
542. Volozhantsev N.V. The genome sequence and proteome of bacteriophage Phicpv1 virulent for *Clostridium perfringens* / N.V. Volozhantsev [et al.] // *Virus Res.* – 2011. – № 155. – P. 433-439.
543. Von Allmen D. Increased intestinal protein synthesis during sepsis and following the administration of tumour necrosis factor “or interleukin-1” / Von Allmen D. [et al.] // *Biochem. J.* – 1992. – № 286. – P. 585-589.
544. Wagner A. Energy constraints on the evolution of gene expression // *Mol. Biol. Evol.* – 2005. – № 22. – P. 1365-1374.
545. Waltman W.D. Isolation and Identification of Avian Pathogens / W.D. Waltman, R.K. Gast, E.T. Mallinson // 5th ed. American Association of Avian Pathologists; Jacksonville, FL, USA: Salmonellosis. – 2008. – P. 3-9.
546. Wang Q. Endotoxemia in mice stimulates production of complement C3 and serum amyloid A in mucosa of small intestine / Q. Wang [et al.] // *Amer. J. Physiol.* – 1998. – № 275. – P. 1584-1592.
547. Waring M.J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids // *J Mol Biol.* – 1965. – № 13(1). P. 269-282.

548. Wati T. Comparative efficacy of a phyto-genic feed additive and an anti-biotic growth promoter on production performance, caecal microbial population and humoral immune response of broiler chickens inoculated with enteric pathogens / T. Wati [et al.] // *Anim Nutr.* – 2015. – № 1. – P. 213–219.

549. Weiss W.P. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review / W.P. Weiss // *J. Dairy Sci.* – 1998. – № 81. – P. 2493-2501.

550. Wernicki A. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry / A. Wernicki, A. Nowaczek, R. Urban-Chmiel // *Virologia*. – 2017. – № 14(1). – P. 179.

551. White D.G. Characterization of fluoroquinolone resistance among veterinary isolates of avian *Escherichia coli* / D.G. White [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – № 44. – P. 2897-2899.

552. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en>. (accessed 20.02.2018).

553. WHO. Food and agriculture organization of the united nations/world health organization (Fao/Who). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. [Internet] Report of a Joint Fao/Who Expert Consultation. 2001.

554. Windisch W. Use of phyto-genic products as feed additives for swine and poultry / W. Windisch [et al.] // *J Anim Sci.* – 2008. – № 86. – P. 140-148.

555. Winter S.E. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella* / S.E. Winter [et al.] // *Nature*. – 2010. – № 467(7314). – P. 426–429.

556. Wiseman J. Comparison between pigs and poultry in the prediction of the dietary energy value of fats *Anim* / J. Wiseman, J. Powles, F. Salvador // *Feed Sci. Technol.* – 1998. – № 71. – P. 1-9.

557. Wlodarska M. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis / M. Wlodarska et al. // *Infection and immunity*. – 2011. – № 79(4). – P. 1536-1545.

558. World Bank. Drug-resistant infections: a threat to our economic future. 2016. <http://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-oureconomic-future> (20.11.2020).
559. Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism / G. Wu // *J. Nutr.* – 1998. – № 128. – P. 1249-1252.
560. Wullepit N. De Smet Influence of management and genetic merit for milk yield on the oxidative status of plasma in heifers / N. Wullepit [et al.] // *Livest. Sci.* – 2009. – № 123. – P. 276-282.
561. Xu K. Analysis of Mucosa-Associated Microbiota in Colorectal Cancer / K. Xu, B. Jiang // *Med Sci Monit.* – 2017. – № 23. – P. 4422-4430.
562. Yacoubi N. Short-chain arabinoxylans prepared from enzymatically treated wheat grain exert prebiotic effects during the broiler starter period / N. Yacoubi [et al.] // *Poult Sci.* – 2018. – № 97(2). – P. 412-424.
563. Yadav R. The Incidence, Morbidity and Mortality of the Diseases of Broiler Birds in and around NDUAT, Kumarganj, Faizabad / R. Yadav [et al.] // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* – 2018. Special Issue-7. – 2018. – P. 5095-5105.
564. Yang H. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China / H. Yang [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – № 42. – P. 3483-3489.
565. Yao C.K. Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications / C.K. Yao, J.G. Muir, P.R. Gibson // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2016. – № 43(2). – P. 181-196.
566. Yen J.T. Oxygen consumption by portal veindrained organs and by whole animal in conscious growing swine / J.T. Yen [et al.] // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1989. – № 190. – P. 393-398.
567. Yogaratnam V. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant // *Vet. Rec.* – 1995. – № 137. – P. 215-217.
568. Yu B. Effects of crude fiber level in the diet on the intestinal morphology of growing rabbits / B. Yu, P.W.S. Chiou // *Lab Anim.* – 1996. – № 30. – C. 143-148.

569. Yulistiani R. Prevalence of antibiotic-resistance enterobacteriaceae strains isolated from chicken meat at traditional markets in Surabaya, Indonesia, IOP conference series: materials science and Engineering). – 2017. – P. 012007.

570. Zanella A. Severe Escherichia coli O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay / A. Zanella [et al.] // Avian Pathology. – 2000. – № 29. – P. 311-317.

571. Zaph C. Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine / C. Zaph et al. // J. Exp. Med. – 2008. – № 205. – P. 2191-2198.

572. Zeger S. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework // Biomarkers Definitions Working Group. Clin Pharmacol Ther. – 2001. – № 69(3). – P. 89-95.

573. Zhang A.W. Effects of yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks / A.W. Zhang [et al.] // Poult Sci. – 2005. – № 84. – P. 1015-1021.

574. Zhang K. The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity / K. Zhang, M.W. Hornef, A. Dupont // Cell Microbiol. – 2015. – № 17(11). – P. 1561-1569.

575. Zhang Y. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex / Y. Zhang [et al.] // J. Neurosci. – 2014. – № 34. – P. 11929-11947.

576. Zhang Z.F. Effects of *Bacillus subtilis* Ubt-Mo2 on growth performance, relative immune Organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens / Z.F. Zhang, J.H. Cho, I.H. Kim // Livest Sci. – 2013. – № 155. – P. 343-347.

577. Zhou H. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique / H. Zhou [et al.] // Poult Sci. – 2007. – № 86. – P. 2541-2549.

578. Zimmer M. The murein hydrolase of the bacteriophage Phi3626 dual lysis system is active against all tested clostridium perfringens strains / M. Zimmer [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2002. – № 68. – P. 5311-5317.

579. Zulkifli I. Gut microflora and intestinal morphology of commercial broiler chickens and Red Jungle Fowl fed diets containing palm kernel meal / I. Zulkifli [et al.] // Arch Geflügelk. – 2009. – № 73. – C. 49-55.

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

		Стр.
Рисунок 1	Структурно-логическая схема научно-исследовательской работы	86
Рисунок 2	Гистограмма зависимости максимума величины интенсивности люминесценции (нм) неокрашенных гистологических срезов печени и железистого желудка цыплят от толщины гистологического среза (мкм)	98
Рисунок 3	Гистограмма зависимости максимума величины интенсивности люминесценции (нм) окрашенных ДХТАФ гистологических срезов печени и железистого желудка цыплят от толщины гистологического среза (мкм)	98
Рисунок 4	Железистый желудок цыплят контрольной группы. Люминесценция неокрашенного флуорохромом гистологического препарата железистого желудка цыплят. Ув. X 100.	103
Рисунок 5	Спектры люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы на неокрашенном и окрашенном этидиумом бромидом гистологических препаратах, нм	103
Рисунок 6	Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция окрашенного этидиумом бромидом гистологического среза. Ув. X 200.	104
Рисунок 7	Спектры пропускания и поглощения гистологического препарата стенки железистого желудка цыплят, окрашенного этидиумом бромидом	105
Рисунок 8	Спектры оптической плотности и люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки, окрашенного этидиумом бромидом гистологического среза железистого желудка цыплят и спектр люминесценции уранового стекла	106
Рисунок 9	Спектры люминесценции гепатоцитов в гистологическом срезе печени цыплят, неокрашенном и окрашенном ДХТАФ	109

Рисунок 10	Печень цыплят II опытной группы. Люминесценция окрашенного ДХТАФ гистологического среза. Ув. X 100.	110
Рисунок 11	Спектры оптической плотности и люминесценции гепатоцитов окрашенного ДХТАФ гистологического среза печени цыплят	111
Рисунок 12	Спектр люминесценции уранового стекла	112
Рисунок 13	Спектры люминесценции покровного эпителия слизистой оболочки неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят	116
Рисунок 14	Спектры люминесценции соединительной ткани подслизистой основы неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят	116
Рисунок 15	Спектры люминесценции эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят	117
Рисунок 16	Спектры люминесценции клеток серозной оболочки неокрашенного и окрашенного «Stains all» гистологических срезов железистого желудка цыплят	117
Рисунок 17	Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция при длине волны 620 нм окрашенного Stains all гистологического среза. Ув. X 200.	118
Рисунок 18	Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция при длине волны 480 нм окрашенного Stains all гистологического среза. Ув. X 200.	118
Рисунок 19	Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция при длине волны 624 нм окрашенного этидиумом бромида и ДХТАФ гистологического среза. Ув. X 200.	132
Рисунок 20	Железистый желудок цыплят II опытной группы. Люминесценция при длине волны 528 нм окрашенного этидиумом бромида и ДХТАФ гистологического среза. Ув. X 200.	133

Рисунок 21	Спектр люминесценции зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят контрольной группы	134
Рисунок 22	Спектр люминесценции зоны эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят опытной группы	135
Рисунок 23	Масса тела цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, г.	147
Рисунок 24	Динамика количества нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромида, у.е.	150
Рисунок 25	Динамика нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромида, у.е.	152
Рисунок 26	Содержание нуклеиновых кислот $I_{НК}$ клетках мышечного слоя железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромида, у.е.	154
Рисунок 27	Динамика нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в клетках железистого желудка цыплят I контрольной группы по данным метода с этидиумом бромида, у.е.	155
Рисунок 28	Динамика нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в клетках железистого желудка цыплят I опытной группы по данным метода с этидиумом бромида, у.е.	156
Рисунок 29	Динамика нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в клетках железистого желудка цыплят II опытной группы по данным метода с этидиумом бромида, у.е.	157
Рисунок 30	Динамика нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в железистого желудка цыплят III опытной группы по данным метода с этидиумом бромида, у.е.	158
Рисунок 31	Содержание белков $I_B$ в гепатоцитах цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с ДХТАФ, у.е.	165
Рисунок 32	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) в клетках покровного эпителия слизистой	

	оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.	171
Рисунок 33	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_a$ ) в клетках альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.	174
Рисунок 34	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_m$ ) в клетках соединительной ткани подслизистой основы слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.	177
Рисунок 35	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков $K_s$ в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.	180
Рисунок 36	Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят I контрольной группы, у.е.	182
Рисунок 37	Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят I опытной группы, у.е.	183
Рисунок 38	Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят II опытной группы, у.е.	184
Рисунок 39	Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках железистого желудка цыплят III опытной группы, у.е.	185
Рисунок 40	Масса тела цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, г.	194
Рисунок 41	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.	197
Рисунок 42	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_a$ ) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят (II) контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.	200

Рисунок 43	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_m$ ) в клетках соединительной ткани слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.	203
Рисунок 44	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_s$ ) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп.	205
Рисунок 45	Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках железистого желудка цыплят II контрольной группы.	207
Рисунок 46	Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках железистого желудка цыплят IV опытной группы.	208
Рисунок 47	Динамика коэффициентов соотношений нуклеиновых кислот и белков (в условных единицах) в клетках железистого желудка цыплят V опытной группы	209
Рисунок 48	Количество нуклеиновых кислот в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп	220
Рисунок 49	Количество белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп.	221
Рисунок 50	Железистый желудок. I опытная группа. 6 сутки после заражения. Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки. Отек подслизистого слоя слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув. $\times 300$ .	330
Рисунок 51	Печень. I опытная группа. 5 сутки после заражения. Дискомплексація балочной структуры, гиперемия кровеносного сосуда. Окраска ГЭ. Ув. $\times 300$ .	330
Рисунок 52	Железистый желудок. II опытная группа. 7 сутки после заражения. Лимфоидная инфильтрация слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув. $\times 300$ .	331
Рисунок 53	Тонкий кишечник. II опытная группа. 6 сутки после заражения. Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки. Отек подслизистого слоя слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув. $\times 300$ .	331

- Рисунок 54 Печень. II опытная группа. 6 сутки после заражения. Дискомплексація балочной структуры, гиперемия кровеносного сосуда. Окраска ГЭ. Ув. ×300. 332
- Рисунок 55 Печень. II опытная группа. 10 сутки после заражения. Дискомплексація балочной структуры, гиперемия сосуда, диффузная лимфоидная инфильтрация. Окраска ГЭ. Ув. ×300. 332
- Рисунок 56 Железистый желудок. III опытная группа. 6 сутки после заражения. Отек подслизистого слоя слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув. ×300. 333
- Рисунок 57 Тонкий кишечник. III опытная группа. 6 сутки после заражения. Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув. ×300. 333
- Рисунок 58 Толстый кишечник. III опытная группа. 6 сутки после заражения. Отек подслизистой основы слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув. ×150. 334
- Рисунок 59 Печень. III опытная группа. 8 сутки жизни. Дискомплексація балочной структуры, лимфоидный инфильтрат. Окраска ГЭ. Ув. ×300. 334
- Рисунок 60 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят I контрольной групп 335
- Рисунок 61 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят I опытной группы 335
- Рисунок 62 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят II опытной группы 336
- Рисунок 63 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в

	клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят III опытной группы	336
Рисунок 64	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят I контрольной группы	337
Рисунок 65	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят I опытной группы	337
Рисунок 66	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят II опытной группы	338
Рисунок 67	Рисунок 67 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят III опытной группы	338
Рисунок 68	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы цыплят I контрольной группы	339
Рисунок 69	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы цыплят I опытной группы	339
Рисунок 70	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы цыплят II опытной группы	340
Рисунок 71	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны	340

- 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы цыплят III опытной группы
- Рисунок 72 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I контрольной группы 341
- Рисунок 73 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I опытной группы 341
- Рисунок 74 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II опытной группы 342
- Рисунок 75 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят III опытной группы 342
- Рисунок 76 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной группы 343
- Рисунок 77 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят IV опытной группы 343
- Рисунок 78 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы 344

- Рисунок 79 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной группы 344
- Рисунок 80 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят IV опытной группы 345
- Рисунок 81 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы 345
- Рисунок 82 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка цыплят II контрольной группы 346
- Рисунок 83 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка цыплят IV опытной группы 346
- Рисунок 84 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка цыплят V опытной группы 347
- Рисунок 85 Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной группы 347

Рисунок 86	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят IV опытной группы	348
Рисунок 87	Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы	348
Таблица 1	Показатели микроклимата помещений в ходе первого и второго экспериментов	89
Таблица 2	Масса тела цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, г.	146
Таблица 3	Количественное содержание нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромида, у.е.(нк:эб)	149
Таблица 4	Количественное содержание нуклеиновых кислот $I_{НК}$ (в условных единицах) в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромида, у.е.(нк:эб)	151
Таблица 5	Количественное содержание нуклеиновых кислот $I_{НК}$ в клетках мышечного слоя железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с этидиумом бромида, у.е.(нк:эб)	153
Таблица 6	Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) по результатам метода с этидиумом бромида, у.е.	159
Таблица 7	Содержание белков $I_B$ в гепатоцитах цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп по данным метода с ДХТАФ, у.е.	164
Таблица 8	Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния	167

	гепатоцитов печени цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) по результатам метода с ДХТАФ, у.е.	
Таблица 9	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.	170
Таблица 10	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_a$ ) в клетках альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.	173
Таблица 11	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_m$ ) в клетках соединительной ткани подслизистой основы слизистой оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп	176
Таблица 12	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_s$ ) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I контрольной и опытных (I, II, III) групп, у.е.	179
Таблица 13	Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) по результатам Метода со Stains all, у.е.	186
Таблица 14	Масса тела цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, г.	193
Таблица 15	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_p$ ) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят (II) контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.	196
Таблица 16	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков $K_a$ в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.	199
Таблица 17	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_m$ ) в клетках соединительной ткани	202

	подслизистой основы железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.	
Таблица 18	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков ( $K_s$ ) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и опытных (IV, V) групп, у.е.	204
Таблица 19	Люминесцентно-микроскопические критерии ранней диагностики функционального состояния клеток железистого желудка цыплят при антибиотикотерапии клебсиеллеза по результатам Метода со Stains all, у.е.	210
Таблица 20	Коэффициенты соотношений нуклеиновых кислот и белков в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной ( $\lambda_1$ ) и V опытной ( $\lambda_2$ ) групп, показатель функционального состояния клеток альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка V опытной группы (C)	216
Таблица 21	Количество нуклеиновых кислот в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп	219
Таблица 22	Количество белков в эпителии альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной и V опытной групп, у.е.	221
Таблица 23	Показатели функционального состояния клеток эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы, определяемый по количественному содержанию нуклеиновых кислот ( $Kn$ ) и белков ( $Kb$ )	222
Таблица 24	Сводные сведения об апробации методов оценки функционального состояния клеток и тканей органов желудочно-кишечного тракта цыплят	230

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU**<sup>(11)</sup> **2 469 296**<sup>(13)</sup> **C1**(51) МПК  
**G01N 21/64** (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2011127028/10, 30.06.2011**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**30.06.2011**

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **30.06.2011**(45) Опубликовано: **10.12.2012** Бюл., № **34**(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: **КАРНАУХОВ В.Н. Люминесцентный  
спектральный анализ клетки. - М.: Наука,  
1978, с.90-93. CN 101467877 A, 01.07.2009.**

Адрес для переписки:

**410012, г.Саратов, Театральная пл., 1,  
Саратовский государственный аграрный  
университет имени Н.И. Вавилова,  
патентный отдел**

(72) Автор(ы):

**Ларионов Сергей Васильевич (RU),  
Акчурин Сергей Владимирович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
"Саратовский государственный аграрный  
университет имени Н.И. Вавилова" (RU)**

(54) **ЛЮМИНЕСЦЕНТНО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ  
ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ОБМЕНА ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В СТЕНКЕ ЖЕЛЕЗИСТОГО  
ЖЕЛУДКА ПТИЦ ПРИ КЛЕБСИЛЛЕЗЕ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии. Представленный способ включает люминесцентный спектральный анализ окрашенных с использованием специфической метахроматической люминесцентной метки-красителя «Steins all» гистологических срезов, проведение исследования гистологических срезов стенки железистого желудка контрольной здоровой птицы и обследуемой птицы, далее на каждом гистологическом срезе с помощью визуальной микроскопии определяют зону эпителиальных клеток глубоких альвеолярных желез слизистой оболочки, в которой выделяют три

участка с наибольшей степенью интенсивности люминесценции, с каждого участка получают спектр люминесценции и проводят его цифровую обработку, по коэффициенту соотношения нуклеиновых кислот и белков зоны эпителиальных клеток глубоких альвеолярных желез слизистой оболочки устанавливают показатель степени нарушения внутриклеточного обмена. Представленный способ позволяет повысить точность диагностики состояния внутриклеточного обмена нуклеиновых кислот и белков в стенке железистого желудка птиц при клебсиеллезе. 2 з.п. ф-лы, 2 ил., 2 табл.

RU 2 4 6 9 2 9 6 C 1

RU 2 4 6 9 2 9 6 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 537 165** <sup>(13)</sup> **C1**(51) МПК  
G01N 33/48 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013109359/15, 30.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
30.05.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.05.2013

(45) Опубликовано: 27.12.2014 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2303254 C2, 20.07.2007 . US 20120234678 A1, 20.09.2012. ЛАРИОНОВ С.В. и др., Использование метода люминесцентного спектрального анализа клеток железистого желудка цыплят для идентификации кишечных инфекций, *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*, 2012, N3, С. 27-30. Найдено из Интернета [он-лайн] 06.03.2014 на сайте (см. прод.)

Адрес для переписки:

410012, г.Саратов, Театральная пл., 1,  
Саратовский государственный аграрный  
университет имени Н.И. Вавилова, патентный  
отдел

(72) Автор(ы):

Акчурич Сергей Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
"Саратовский государственный аграрный  
университет имени Н.И. Вавилова" (RU)

RU 2 537 165 C1

RU 2 537 165 C1

## (54) МИКРОСПЕКТРАЛЬНЫЙ СПОСОБ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАКОТЕРАПИИ В РАННИЕ СРОКИ ЛЕЧЕНИЯ КЛЕБСИЕЛЛЕЗА ПТИЦ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к ветеринарии и может быть использовано для оценки эффективности фармакотерапии в первые 7 суток лечения клебсиеллеза птиц антибактериальными препаратами. Для чего методом двухволнового люминесцентного спектрального анализа изучают гистологические срезы ткани железистого желудка птиц, окрашенных специфическими люминесцентными метками-красителями дихлор-симм-триазиниламинофлуоресцеином-1 и этидиумом бромида. При этом проводят исследование гистологических срезов ткани железистого желудка здоровой и обследуемой птицы. На каждом гистологическом срезе определяют зону эпителия глубоких

альвеолярных желез слизистой оболочки, в которой выделяют пять участков с наибольшей степенью интенсивности люминесценции. Получают спектр люминесценции и спектр оптической плотности каждого участка. Проводят их цифровую обработку: в спектре люминесценции регистрируют величину интенсивности люминесценции при длине волны, характерной для белков 528 нм, и при длине волны, 624 нм, характерной для нуклеиновых кислот. В спектре оптической плотности регистрируют величину оптической плотности при длине волны 648 нм, которую используют в качестве толщины фотометрируемого участка, затем в каждом участке определяют количество

УТВЕРЖДАЮ



Проректор по науке и  
инновационному развитию  
ФГБОУ ВО «Российский  
государственный аграрный  
университет – МСХА имени К.А.  
Тимирязева», профессор, д.т.н.  
*И.С. Константинов*  
« 9 » *ноября* 2020 г.

### КАРТА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Материалы научных исследований доцента кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», к.в.н. Акчурина Сергея Владимировича «Диагностика функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальных клебсиеллезе, эшерихиозе, сальмонеллезе и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза» используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по дисциплинам «Патологическая анатомия», «Болезни птиц» со студентами специальности 36.05.01 «Ветеринария», при проведении научных исследований аспирантами и сотрудниками на кафедре «Ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева».

Декан факультета  
зоотехнии и биологии  
ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА  
имени К.А. Тимирязева,  
профессор, д. с.-х. н., академик РАН



*Ю.А. Юлдашбаев*  
Ю.А. Юлдашбаев

Заведующий кафедрой  
«Ветеринарная медицина» ФГБОУ  
ВО РГАУ-МСХА имени К.А.  
Тимирязева, профессор, д.в.н.

*Г.П. Дюльгер*

Г.П. Дюльгер

УТВЕРЖДАЮ  
 Врио ректора ФГБОУ ВО  
 "Рязанский государственный  
 агротехнологический  
 университет имени П.А. Костычева"  
 С.Н. Борычев  
 " 01 " декабря 2020 г.

**Карта обратной связи  
 на информационное письмо**

Акчурина Сергей Владимировича по теме диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук "Диагностика функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальных клебсиеллезе, эшерихиозе, сальмонеллезе и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза".

Результаты научных исследований Акчурина С.В. по теме диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук "Диагностика функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальных клебсиеллезе, эшерихиозе, сальмонеллезе и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза" используются при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по дисциплинам морфологического и биологического профилей, а также в научной работе сотрудников и аспирантов кафедры анатомии и физиологии с. – х. животных ФГБОУ ВО "Рязанский агротехнологический университет имени П.А. Костычева", как справочный материал.

Заведующий кафедрой  
 анатомии и физиологии с. – х. животных  
 ФГБОУ ВО "Рязанский агротехнологический  
 университет имени П.А. Костычева",  
 Россия, 390044, ЦФО, Рязанская область,  
 г. Рязань, ул. Костычева, д. 1  
 Телефон: 89105601281  
 E-mail: kashirina@rgatu.ru  
 Доктор биологических наук,  
 профессор

Лидия Григорьевна Каширкина



Подпись *Л.Г. Каширкина* заверено

Начальник УК *Суды Е.В. Сурядкина*

" 01 " декабря 20 20 г.

УТВЕРЖДАЮ

И.о. проректора по научной и  
инновационной работеФГБОУ ВО «Саратовский  
государственный аграрный  
университет имени Н.И. Вавилова»

И.Л. Воротников

30 ноября 2020 г.

**КАРТА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ**

на информационное письмо Акчурина Сергея Владимировича по теме диссертации «Диагностика функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальных клебсиеллезе, эшерихиозе, сальмонеллезе и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза» на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук

Результаты научных исследований Акчурина С.В. по теме диссертации «Диагностика функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальных клебсиеллезе, эшерихиозе, сальмонеллезе и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза», на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук, используются при проведении занятий лекционного и семинарского типов по дисциплинам морфологического профиля, а также в научной работе аспирантов и студентов на кафедре «Морфология, патология животных и биология» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» в качестве справочного материала.

Заведующий кафедрой «Морфология,  
патология животных и биология»  
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный  
аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,  
доктор ветеринарных наук, профессор

В.В. Салаутин

Россия, 410012, г. Саратов,  
Театральная пл., 1  
Телефон: +7 903 329-79-24  
E-mail: salautin60@mail.ru



Общество с ограниченной ответственностью "НИТА-ФАРМ"  
Росси́я, 410010 г. Саратов, ул. им. Осипова В.И., д. 1  
Тел./факс: +7 (8452) 338 000  
E-mail: [ofarm@nita-farm.ru](mailto:ofarm@nita-farm.ru)  
[WWW.NITA-FARM.RU](http://WWW.NITA-FARM.RU) [WWW.NITA-FARM.COM](http://WWW.NITA-FARM.COM)

Исх. № 1424/20 от «11» декабря 2020 г. В Диссертационный совет Д 220.061.01  
410012, Саратов, Театральная пл., 1

## АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Настоящим подтверждаем, что результаты диссертационного исследования Акчурина Сергея Владимировича на тему: "Диагностика функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальных клебсиеллезе, эшерихиозе, сальмонеллёзе и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза" обладают актуальностью, представляют практический интерес и были использованы при проектировании и разработке новых антибактериальных препаратов.

Начальник службы НИОКР, к.х.н.



М.И. Сафарова

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ -  
МСХА ИМЕНИ К.А. ТИМИРЯЗЕВА»**

**РЕКОМЕНДАЦИИ**

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

**Саратов  
2020**

УДК 619:616-091:636.52/58

ББК 52.812:55.141

Р36

**Р36** Рекомендации по оценке функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и проведении антибиотикотерапии. Саратов, 2020. – 42 с.

Настоящие рекомендации включают материалы по применению методов оценки функционального состояния клеток печени и железистого желудка цыплят при кишечных инфекциях (клебсиеллез, эшерихиоз, сальмонеллез) и при проведении антибиотикотерапии. На основании научных исследований, проведенных в рамках диссертационной работы «Новые методы диагностики функционального состояния клеток желудочно-кишечного тракта цыплят при экспериментальном заражении клебсиеллезом, эшерихиозом, сальмонеллезом и проведении антибиотикотерапии клебсиеллеза» на базе ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ» и ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева».

Рекомендации предназначены для научных сотрудников, преподавателей образовательных организаций высшего образования, ветеринарных врачей, использующих методы люминесцентного спектрального анализа для диагностики заболеваний животных и разработки средств лечения и профилактики болезней.

Рекомендовано 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.

**Автор:** доцент кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», к.в.н. Акчурин С.В.

**Адрес:** г. Москва, ул. Тимирязевская, 49.

**Рецензенты:** 1. Домницкий И.Ю., профессор кафедры морфологии, патологии и биологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», д-р. ветеринар. наук, профессор.

2. Красников А.В., заведующий кафедрой зоотехнии и ветеринарии ФГБОУ ВО «Мичуринский государственный аграрный университет», д-р. ветеринар. наук, доцент.

**РЕКОМЕНДАЦИИ**

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

---

Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Подписано в печать 4.12.2020.

Гарнитура Times. Печать Riso.

Усл. печ. л. 2,44. Тираж 300 экз. Заказ 0103.

---

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии ИП «Экспресс типографование»  
410005, Саратов, Рахова, 187/213, офис 220 ☎ 27-26-93

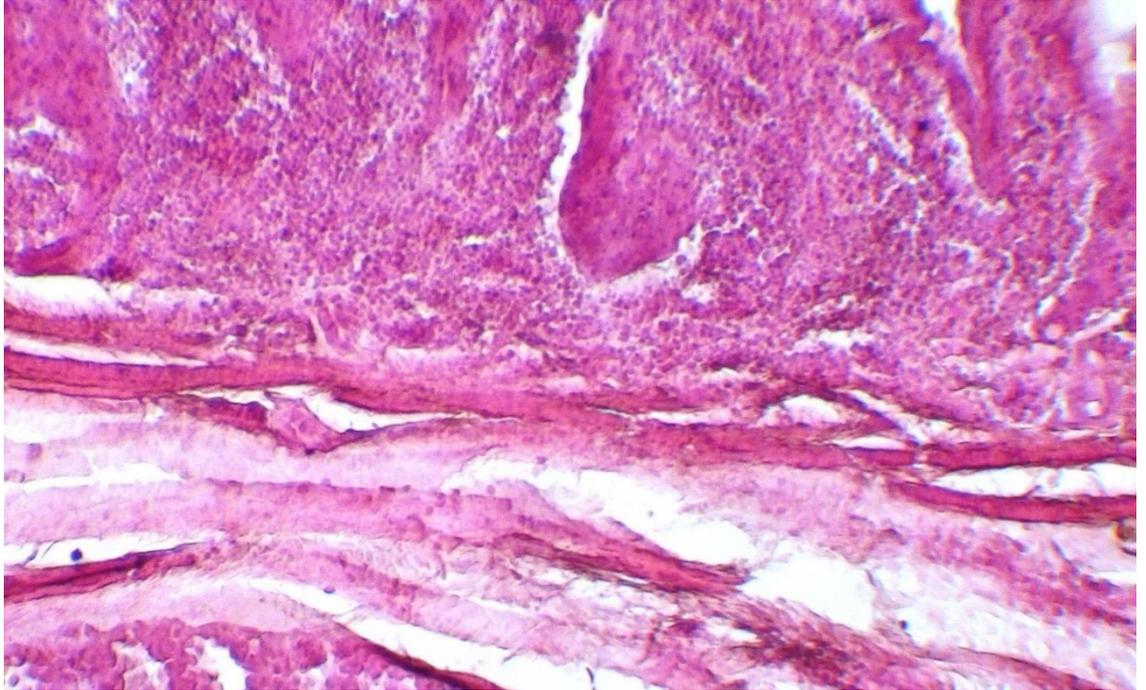
**Гистологическая картина патоморфологических изменений**

Рисунок 50 – Железистый желудок. I опытная группа. 6 сутки после заражения. Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки. Отек подслизистого слоя слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув.×300.

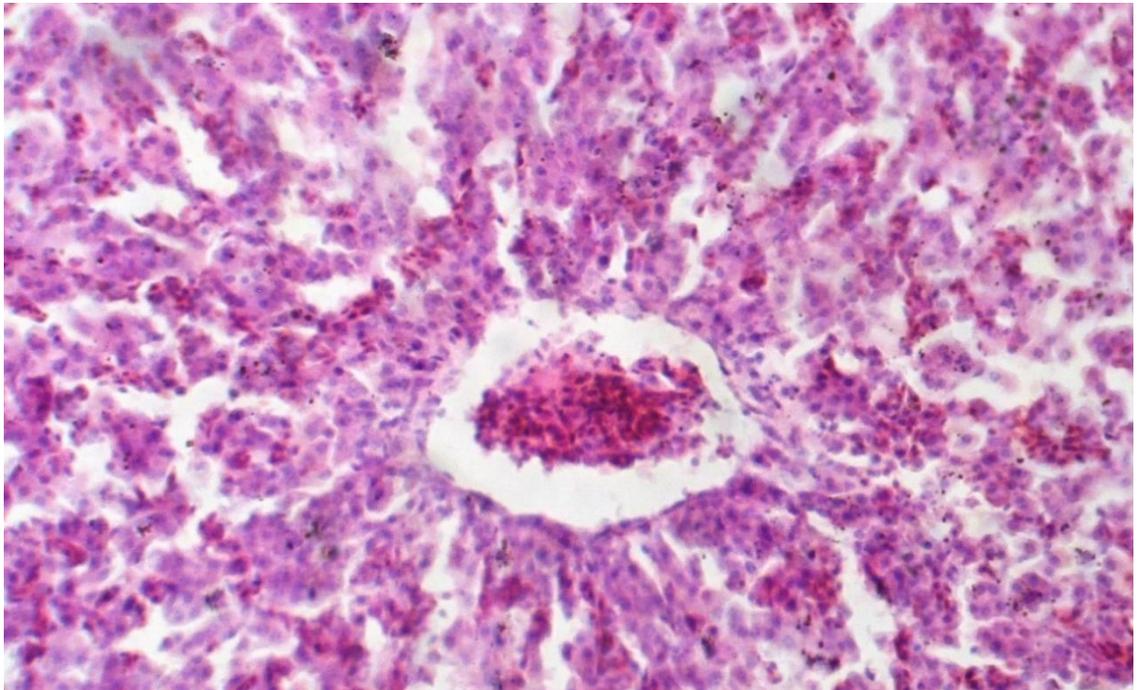


Рисунок 51 – Печень. I опытная группа. 5 сутки после заражения. Дискомплексація балочної структури, гіперемія кровеносного суду. Окраска ГЭ. Ув. ×300.

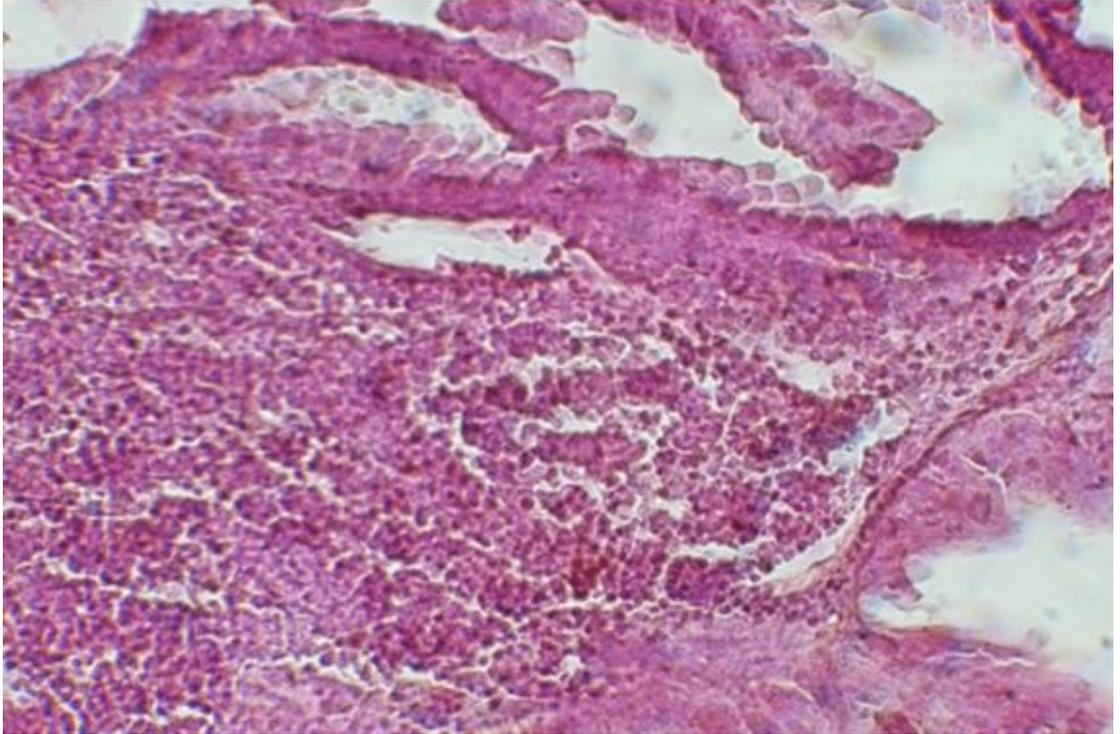


Рисунок 52 – Железистый желудок. II опытная группа. 7 суток после заражения. Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув.  $\times 300$ .

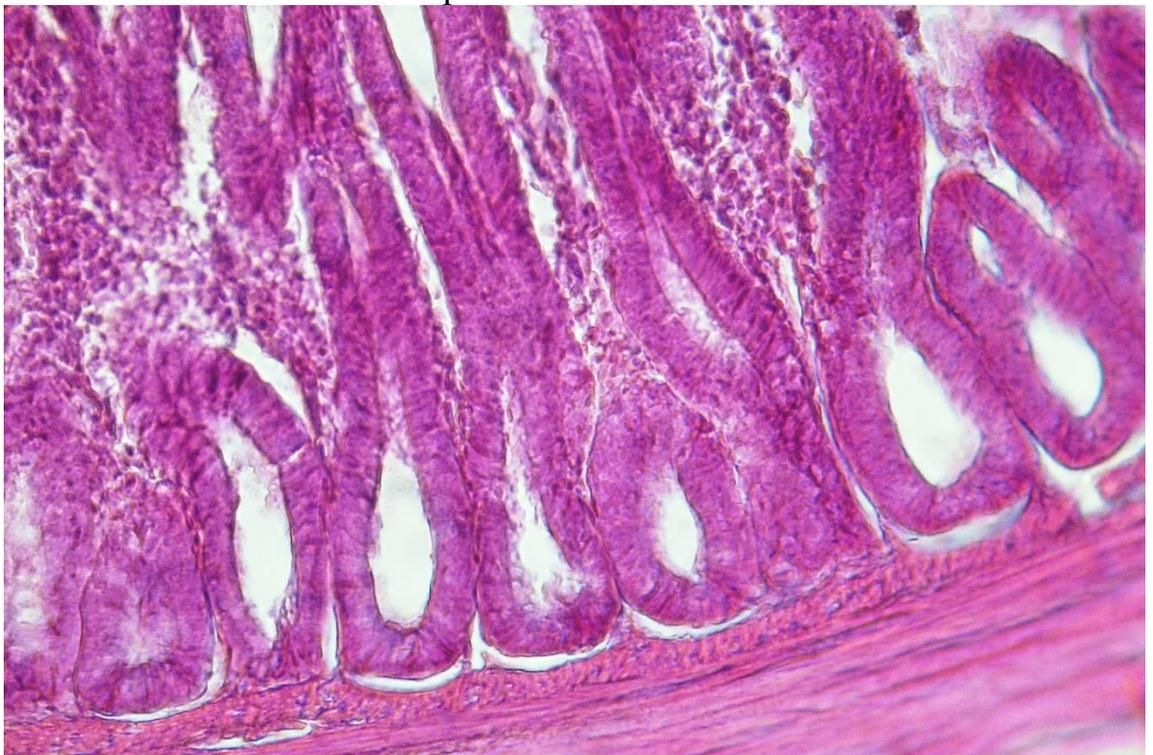


Рисунок 53 – Тонкий кишечник. II опытная группа. 6 суток после заражения. Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки. Отек подслизистого слоя слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув.  $\times 300$ .

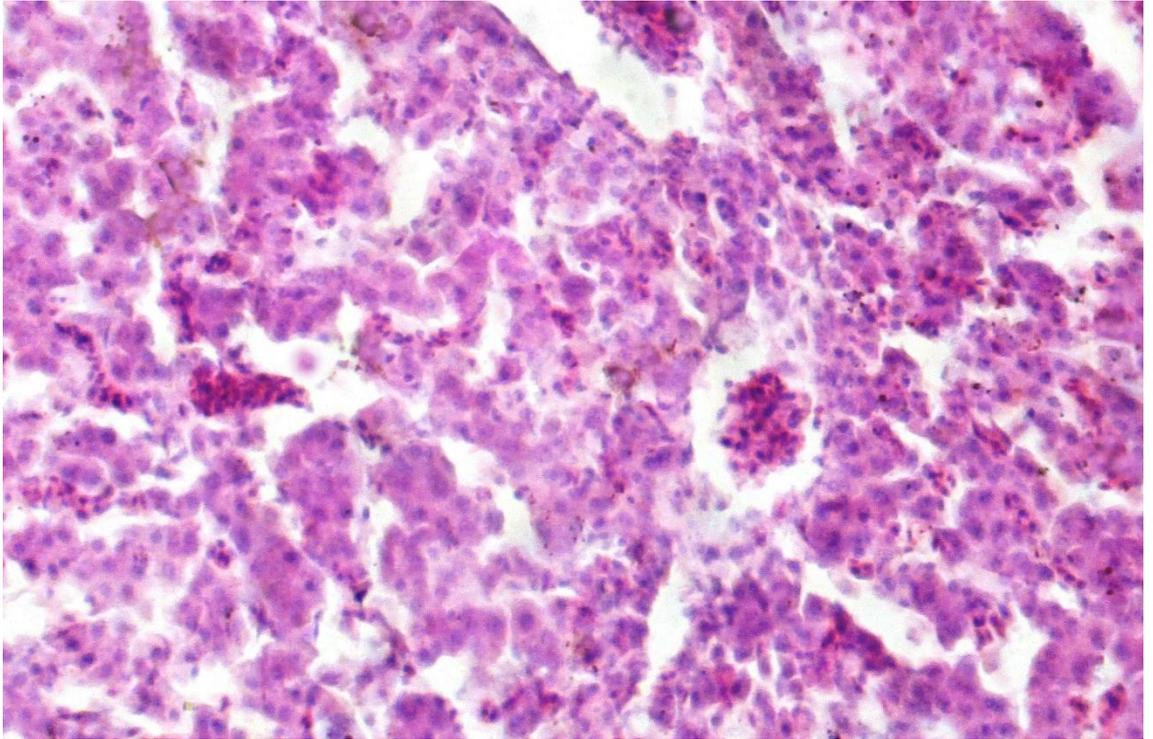


Рисунок 54 – Печень. II опытная группа. 6 сутки после заражения. Дискомплексація балочної структури, гіперемія кровеносного суду. Окраска ГЭ. Ув.  $\times 300$ .

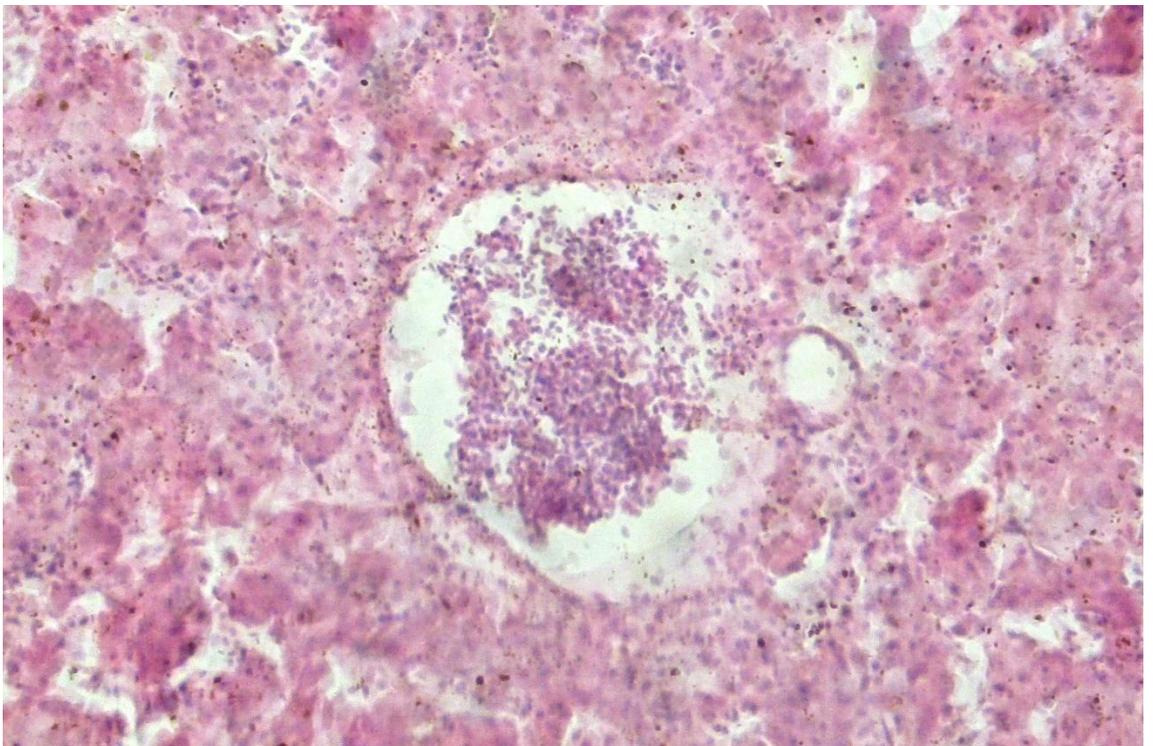


Рисунок 55 – Печень. II опытная группа. 10 сутки после заражения. Дискомплексація балочної структури, гіперемія суду, диффузна лімфоїдна інфільтрація. Окраска ГЭ. Ув.  $\times 300$ .

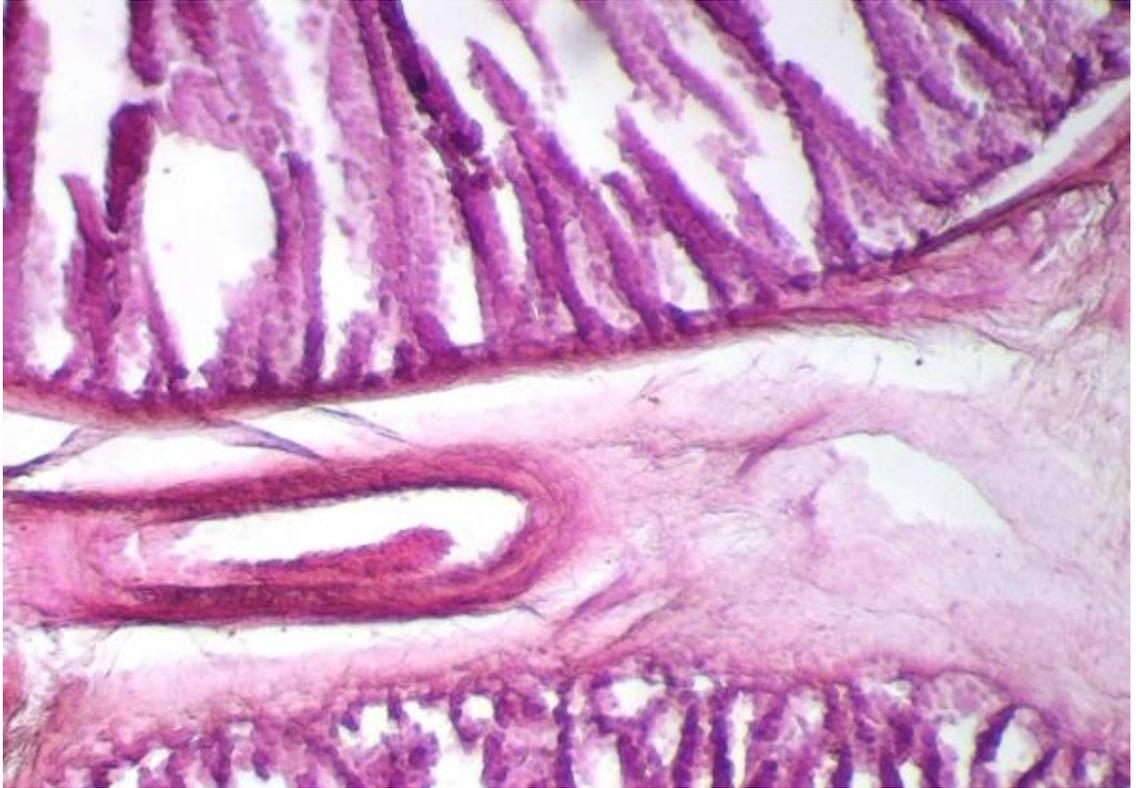


Рисунок 56 – Железистый желудок. III опытная группа. 6 сутки после заражения. Отек подслизистого слоя слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув.  $\times 300$ .

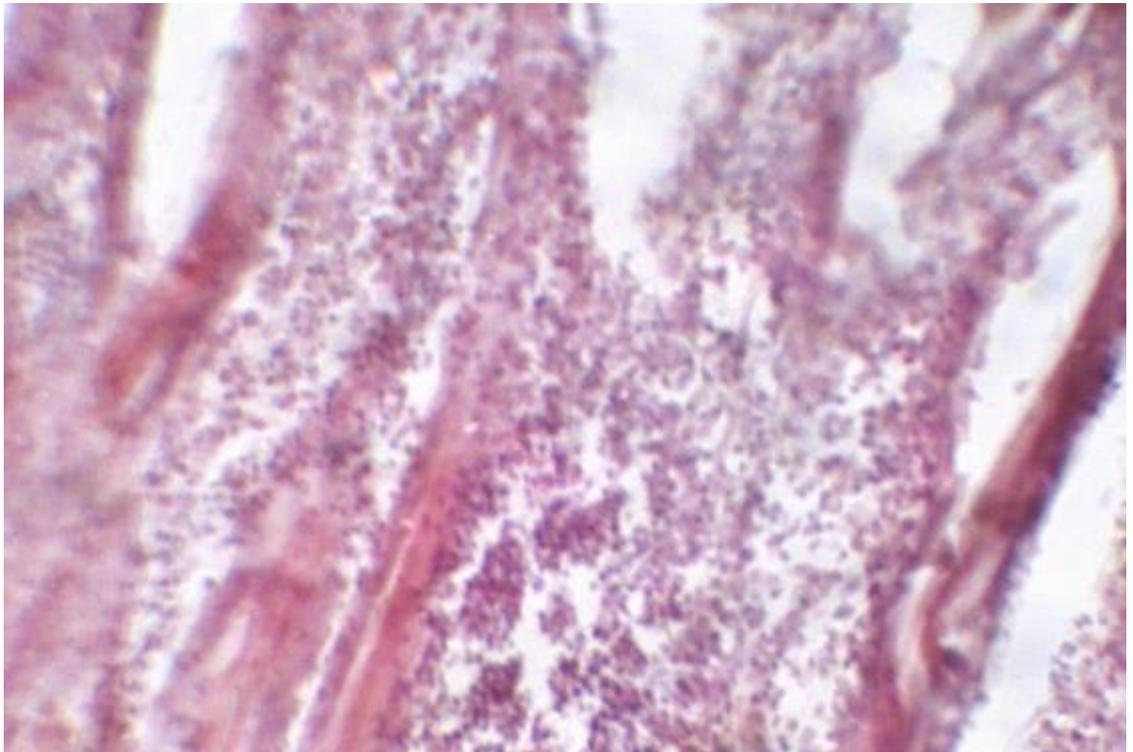


Рисунок 57 – Тонкий кишечник. III опытная группа. 6 сутки после заражения. Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув.  $\times 300$ .

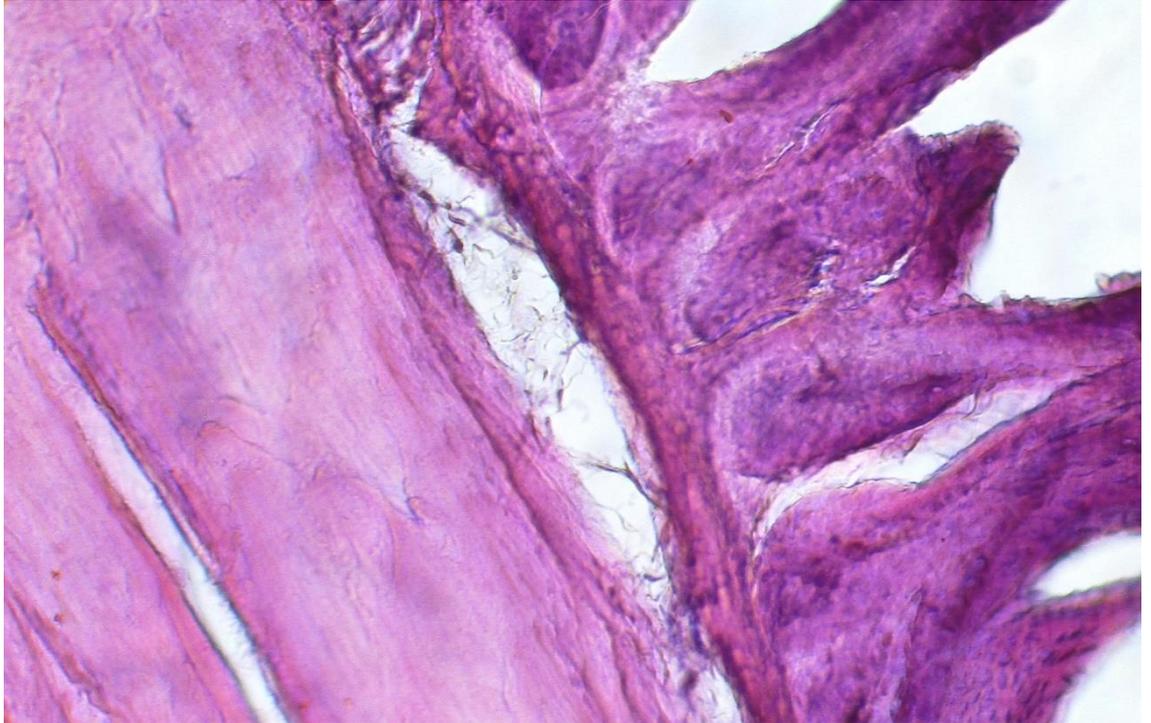


Рисунок 58 – Толстый кишечник. III опытная группа. 6 сутки после заражения. Отек подслизистой основы слизистой оболочки. Окраска ГЭ. Ув. ×150.

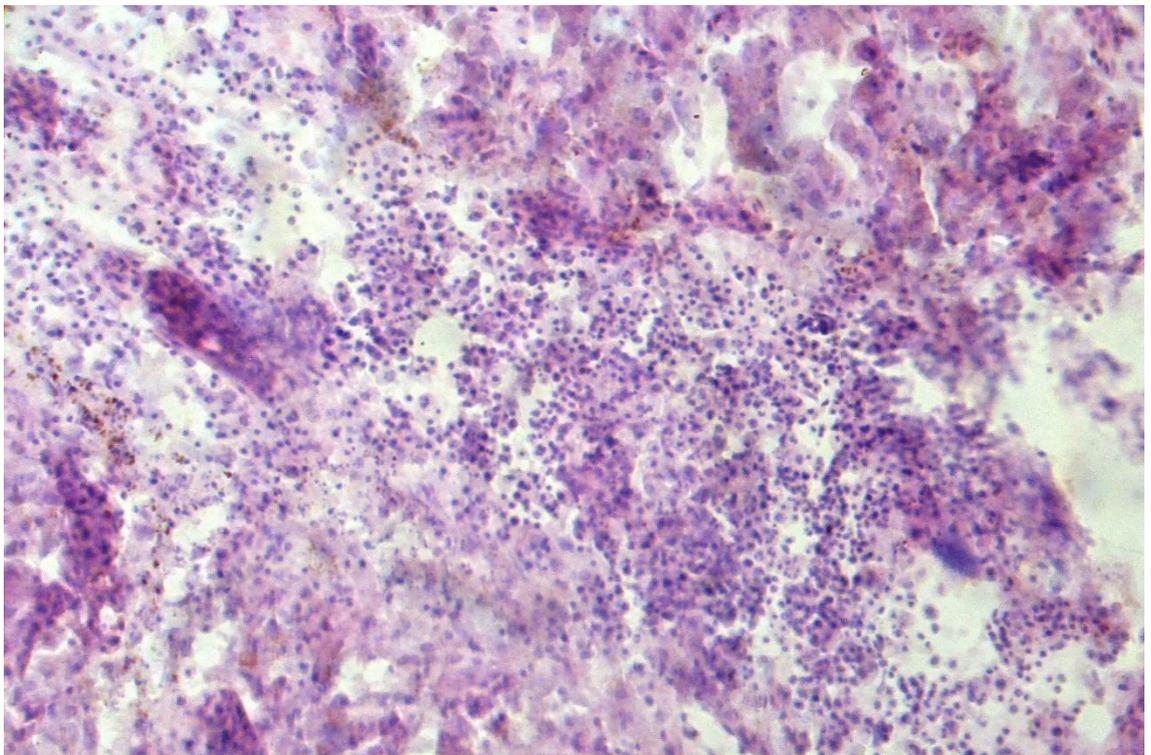


Рисунок 59 – Печень. III опытная группа. 8 сутки после заражения. Дислокация балочной структуры, лимфоидный инфильтрат. Окраска ГЭ. Ув. ×300.

**Дополнительная информация к разделу «3.3.5 Метод оценки функционального состояния клеток и тканей железистого желудка цыплят по соотношению нуклеиновых кислот и белков с использованием флуорохрома «Stains all»**

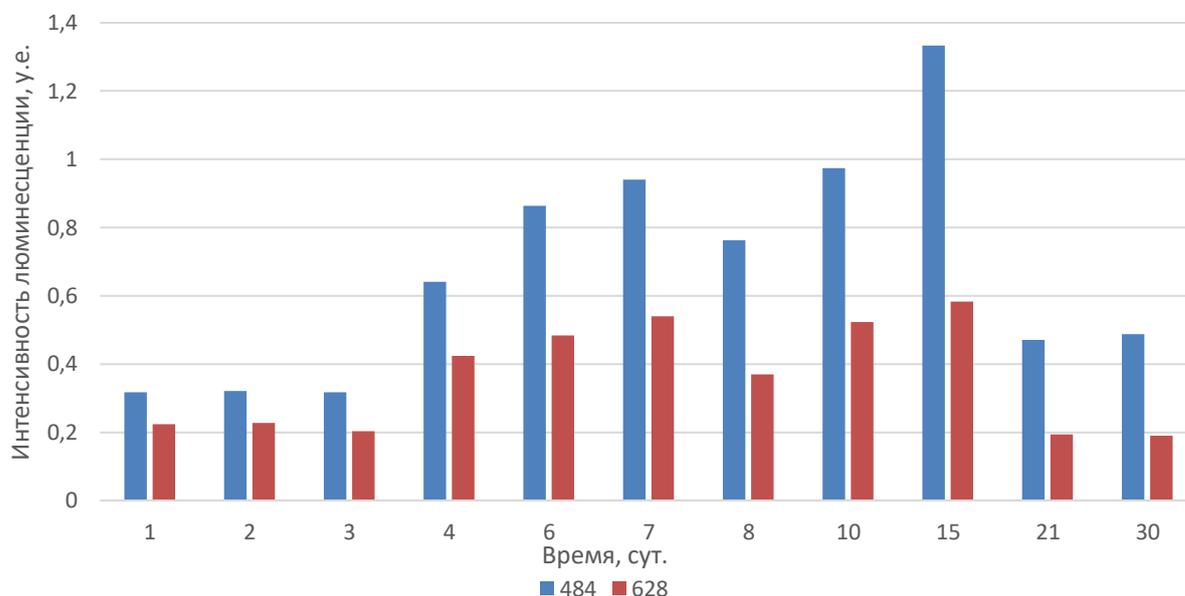


Рисунок 60 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят I контрольной групп

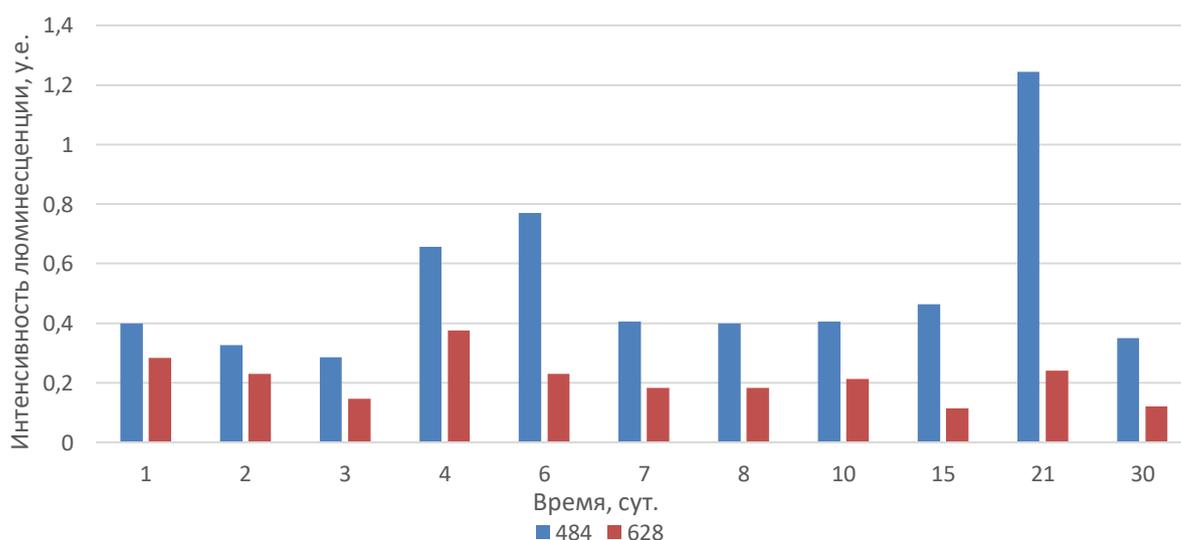


Рисунок 61 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят I опытной группы

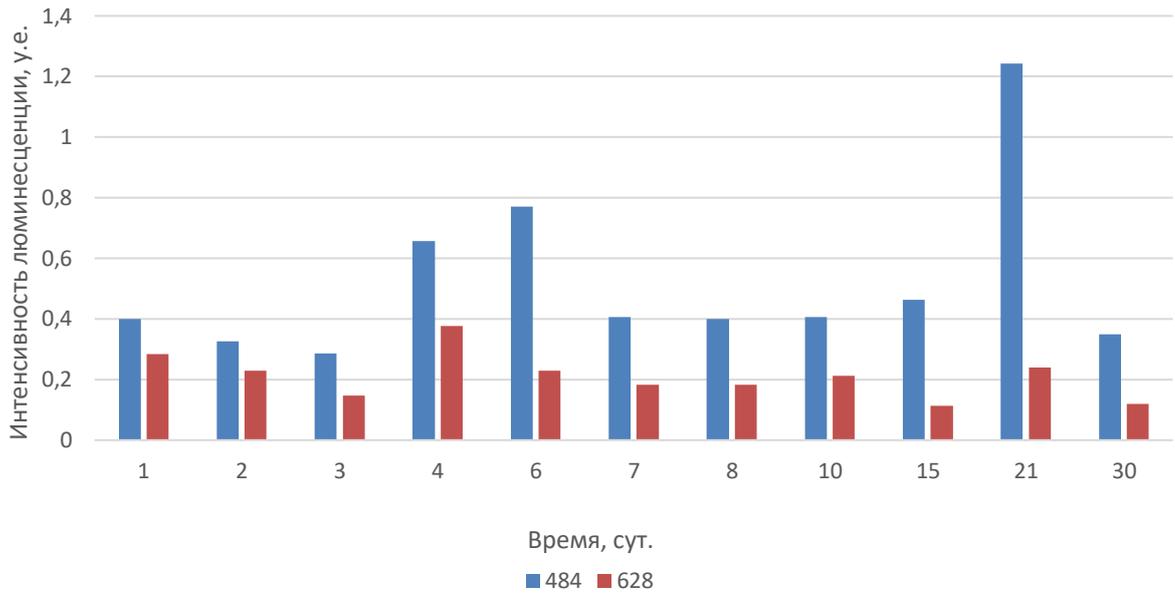


Рисунок 62 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят II опытной группы

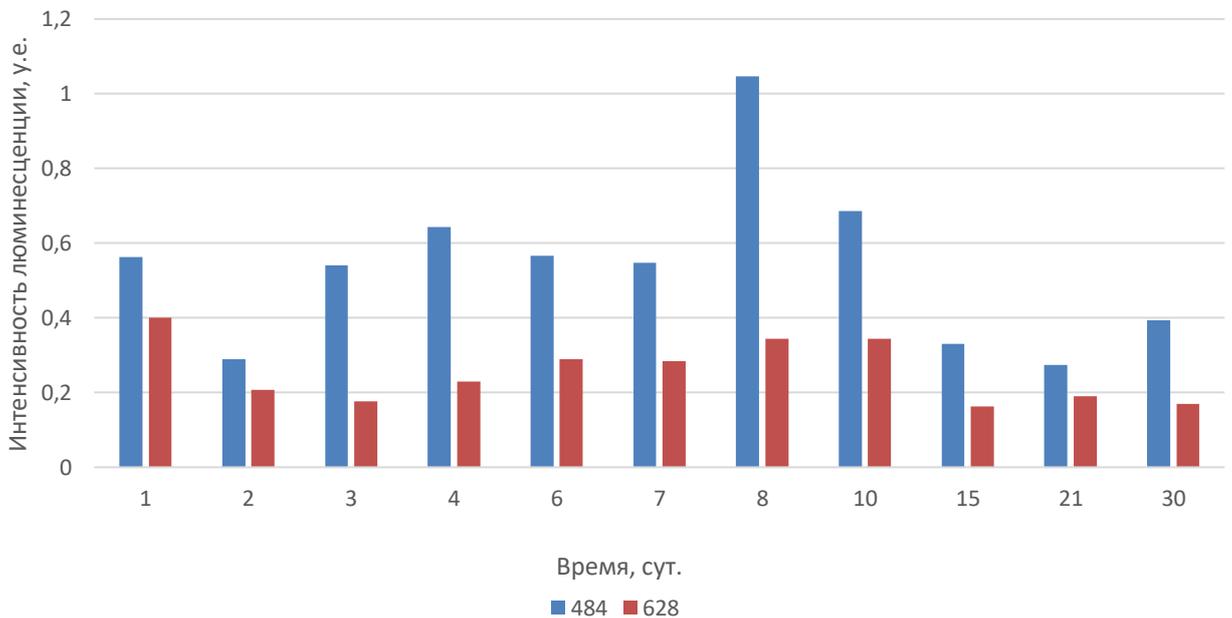


Рисунок 63 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки цыплят III опытной группы

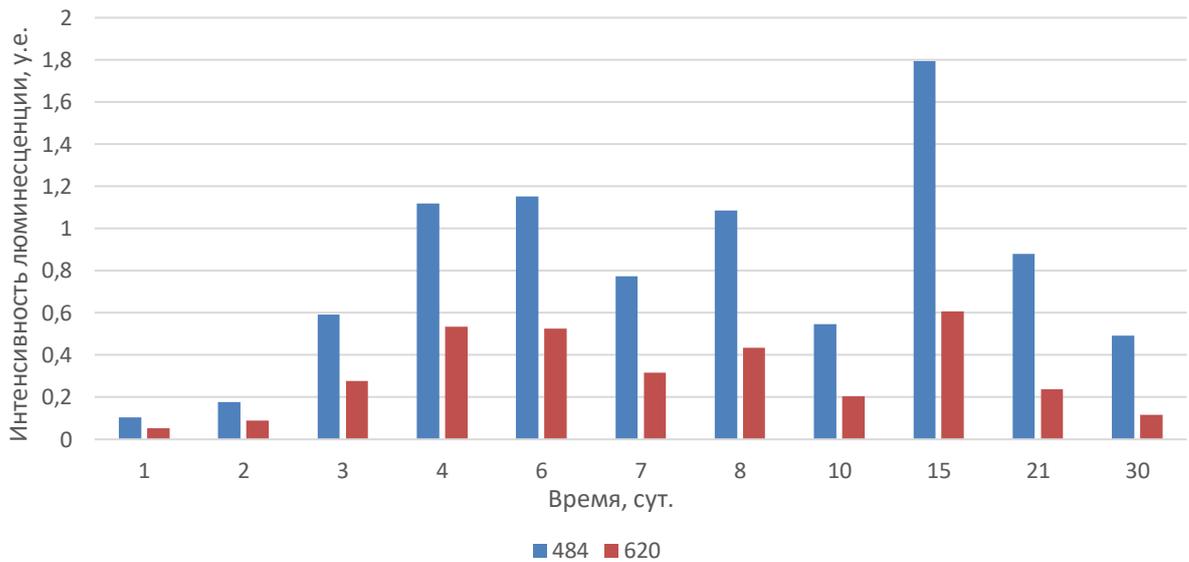


Рисунок 64 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят I контрольной группы

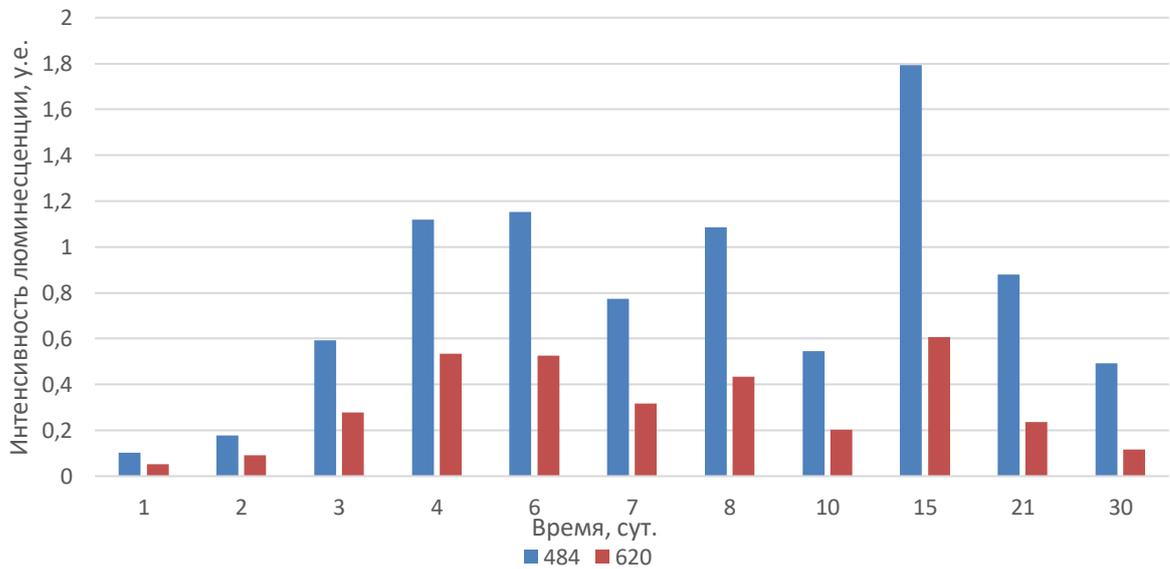


Рисунок 65 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят I опытной группы

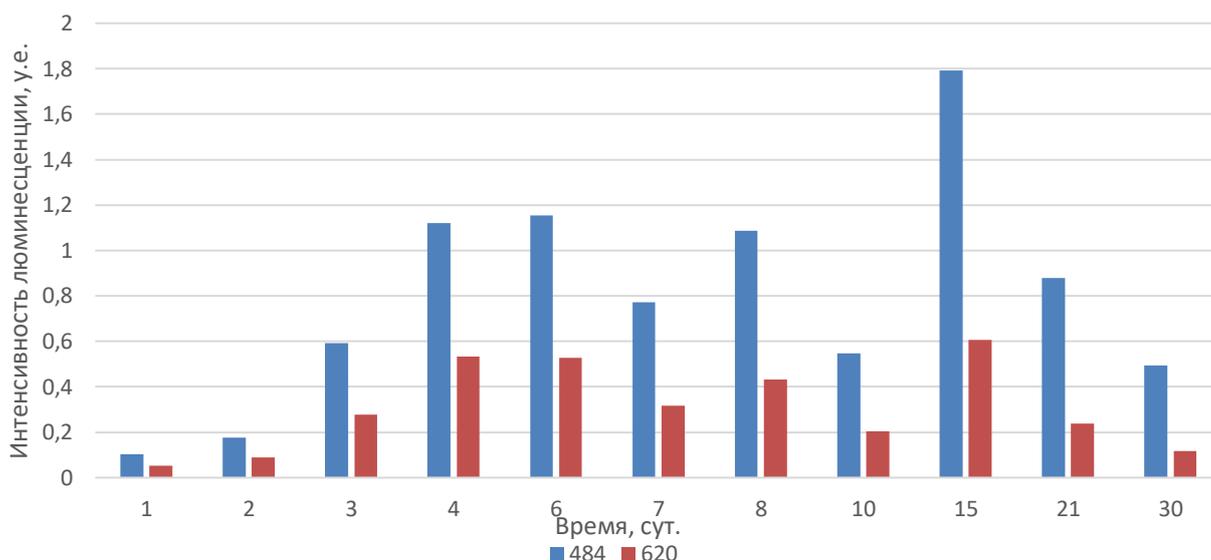


Рисунок 66 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят II опытной группы

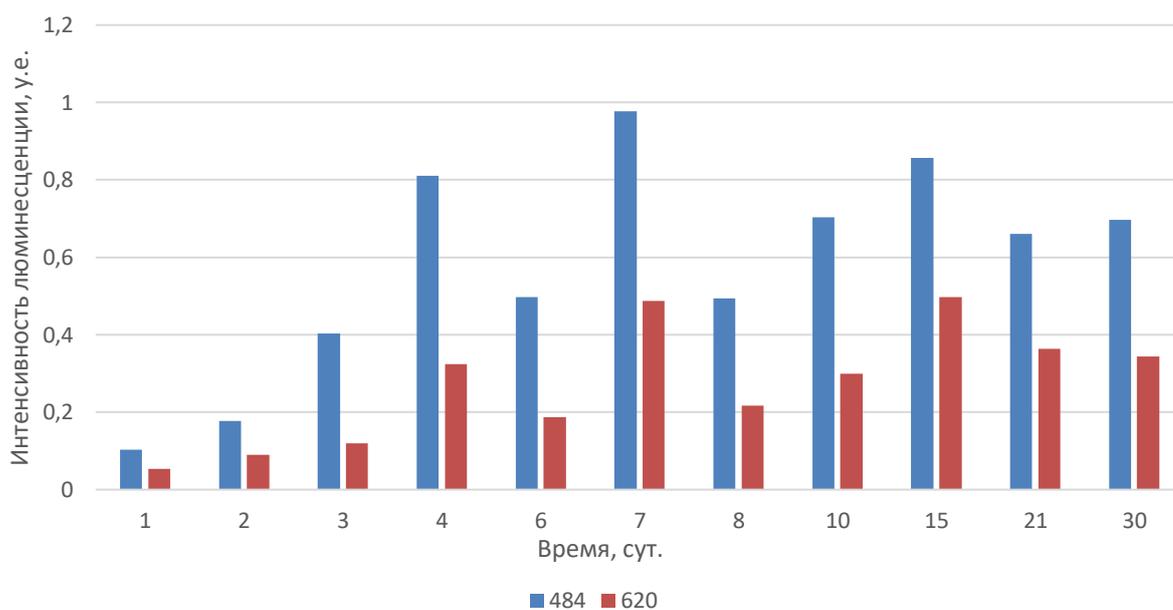


Рисунок 67 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки цыплят III опытной группы

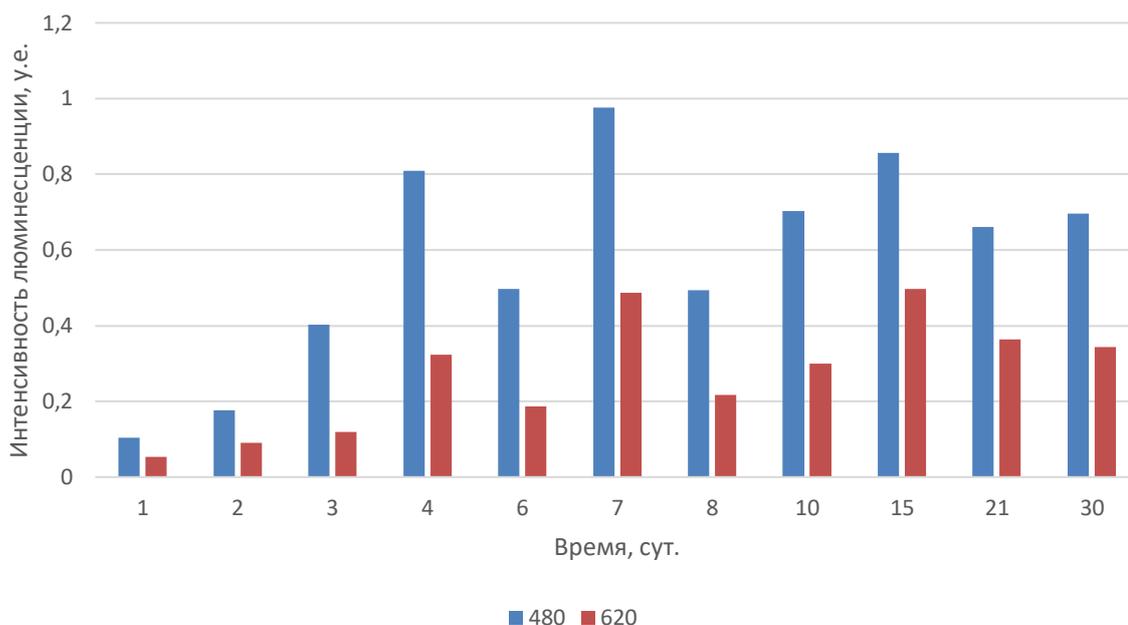


Рисунок 68 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы цыплят I контрольной группы

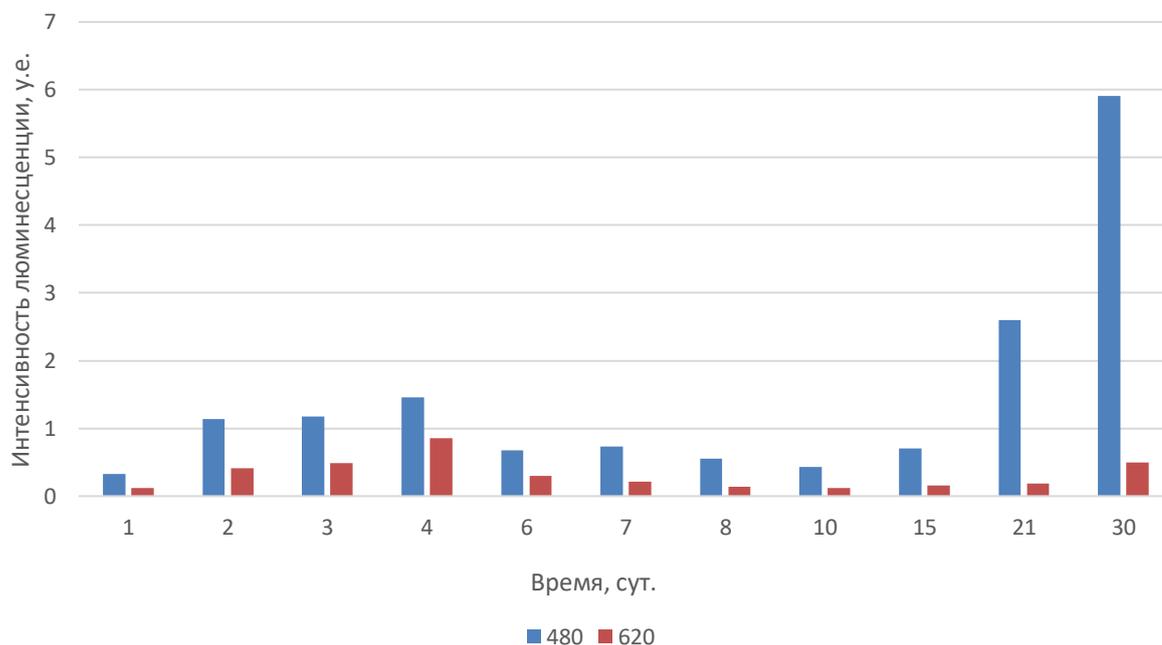


Рисунок 69 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы цыплят I опытной группы

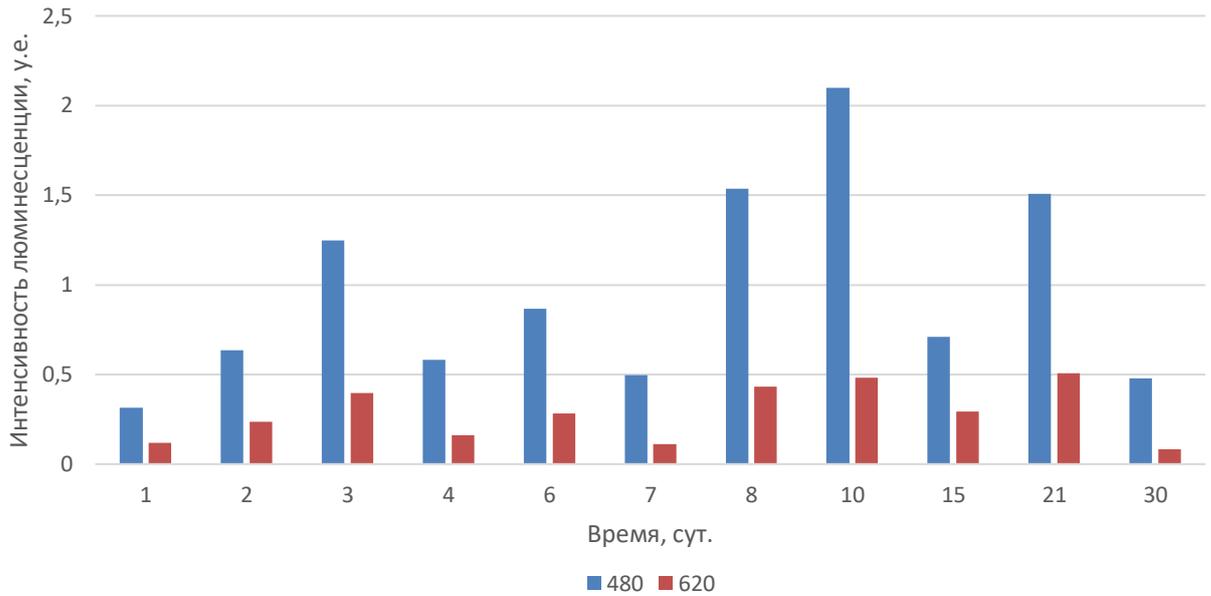


Рисунок 70 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в соединительной ткани подслизистой основы цыплят II опытной группы

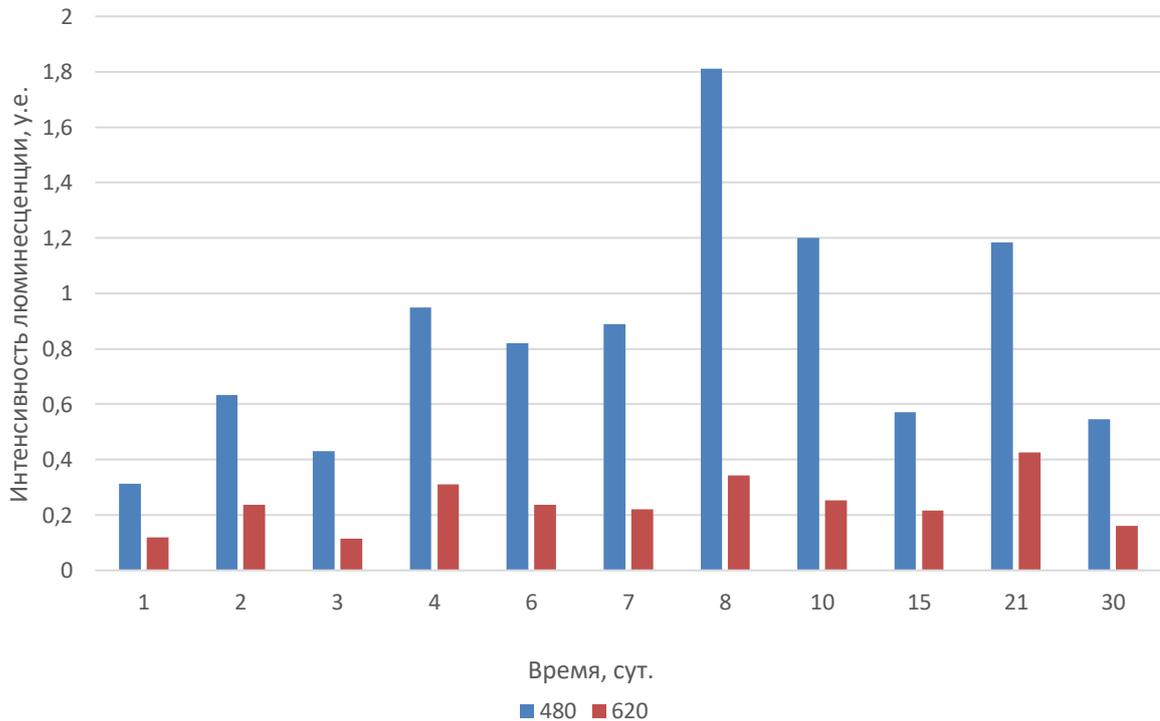


Рисунок 71 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы цыплят III опытной группы

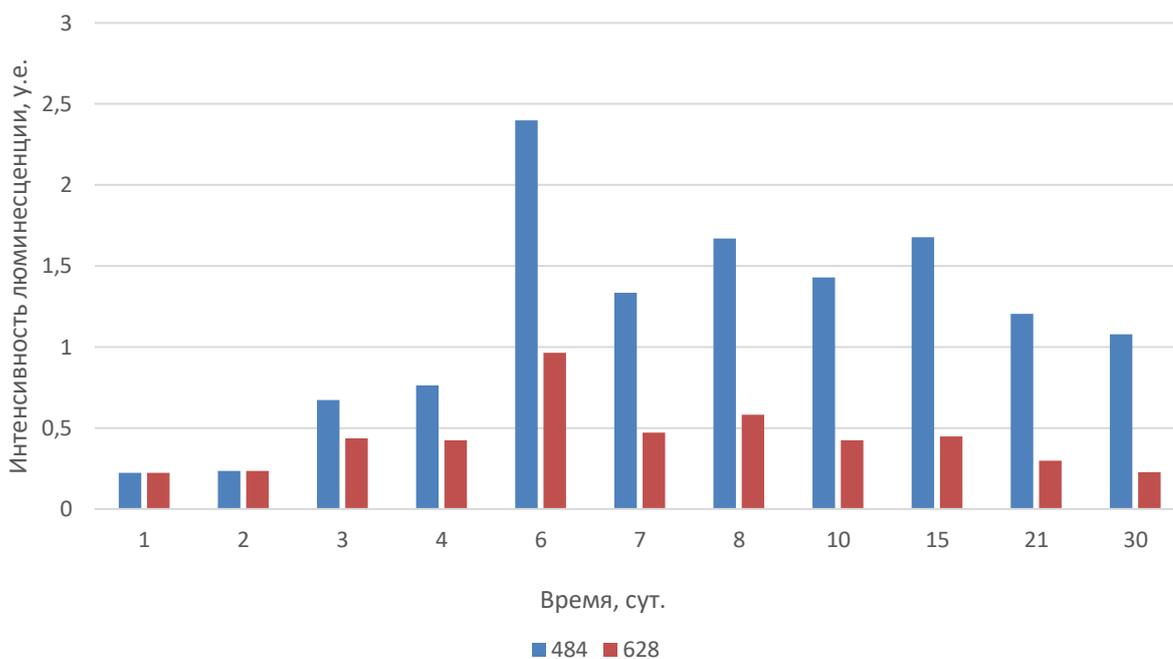


Рисунок 72 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I контрольной группы

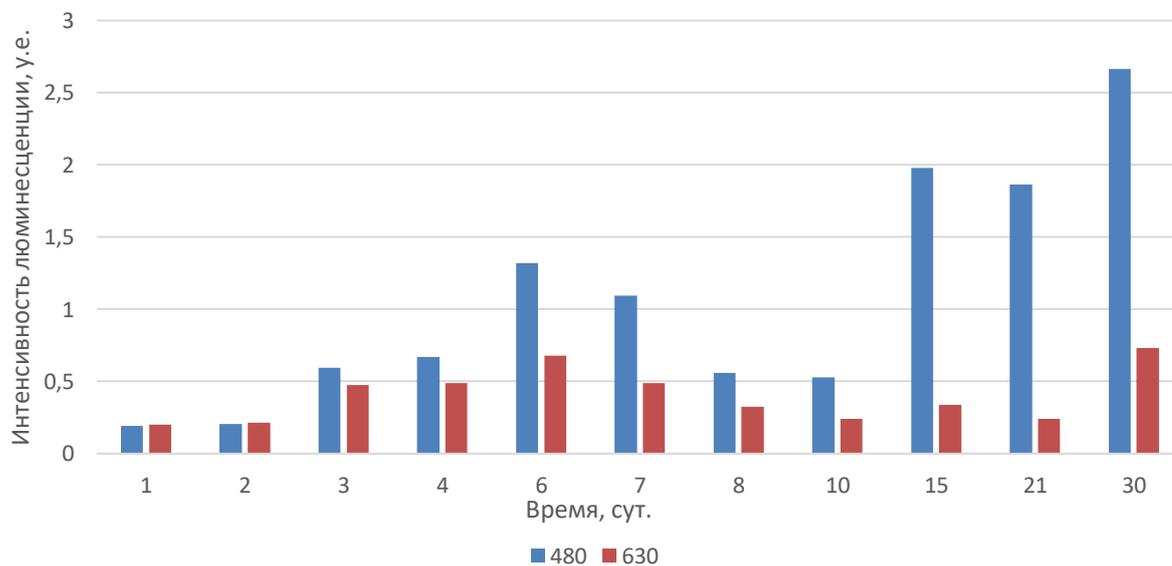


Рисунок 73 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят I опытной группы

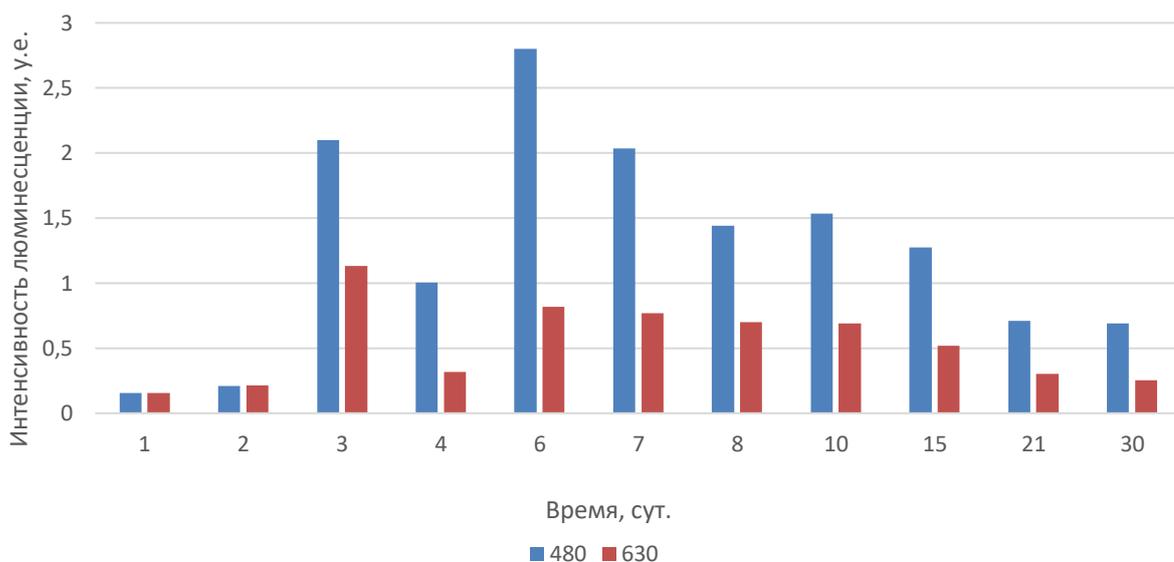


Рисунок 74 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II опытной группы

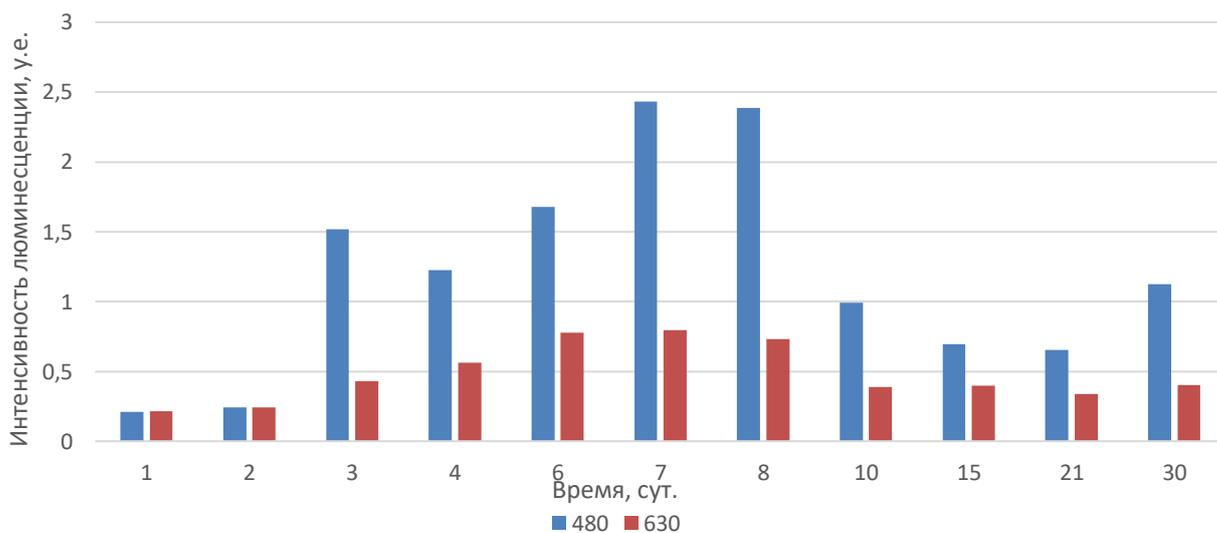
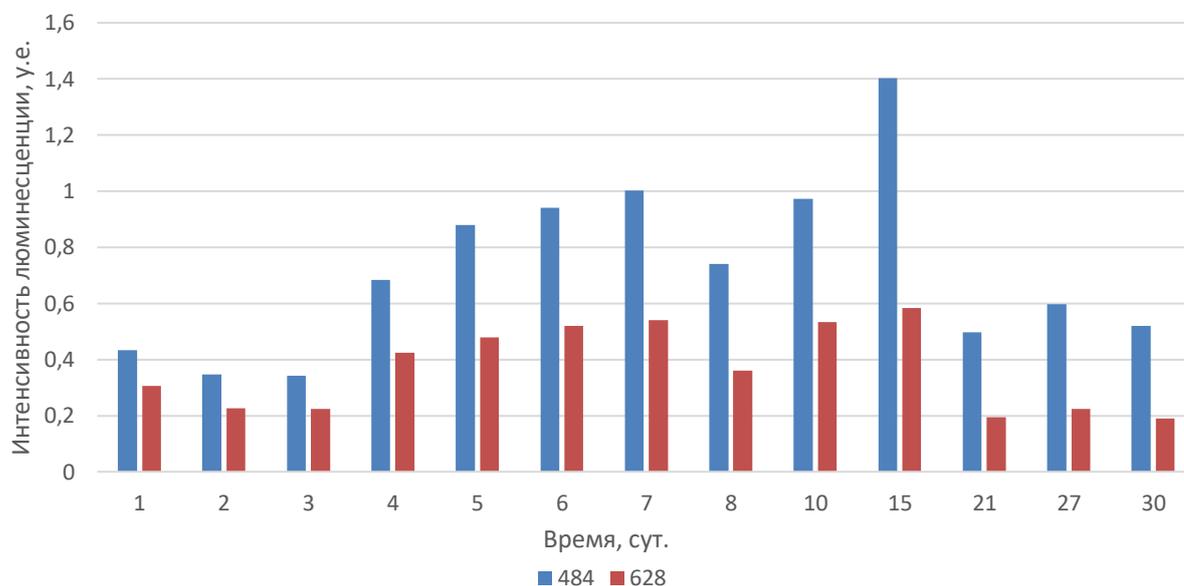
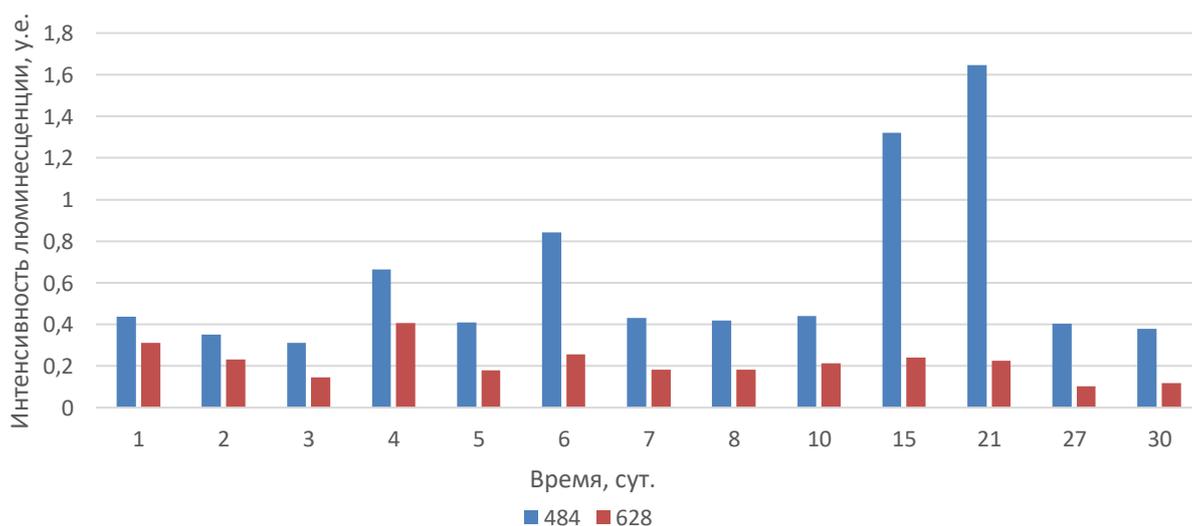


Рисунок 75 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят III опытной группы

**Дополнительная информация к разделу «3.4.3 Сведения о функциональном состоянии клеток и тканей железистого желудка цыплят, полученные методом со Stains all»**



**Рисунок 76 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной группы**



**Рисунок 77 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 628 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят IV опытной группы**

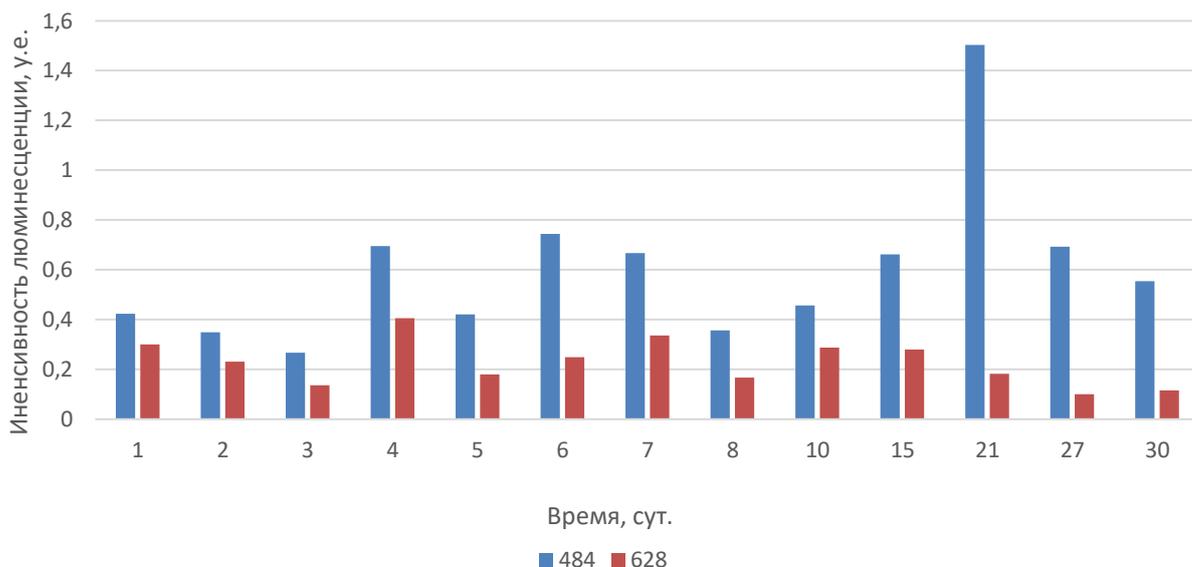


Рисунок 78 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках покровного эпителия слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы

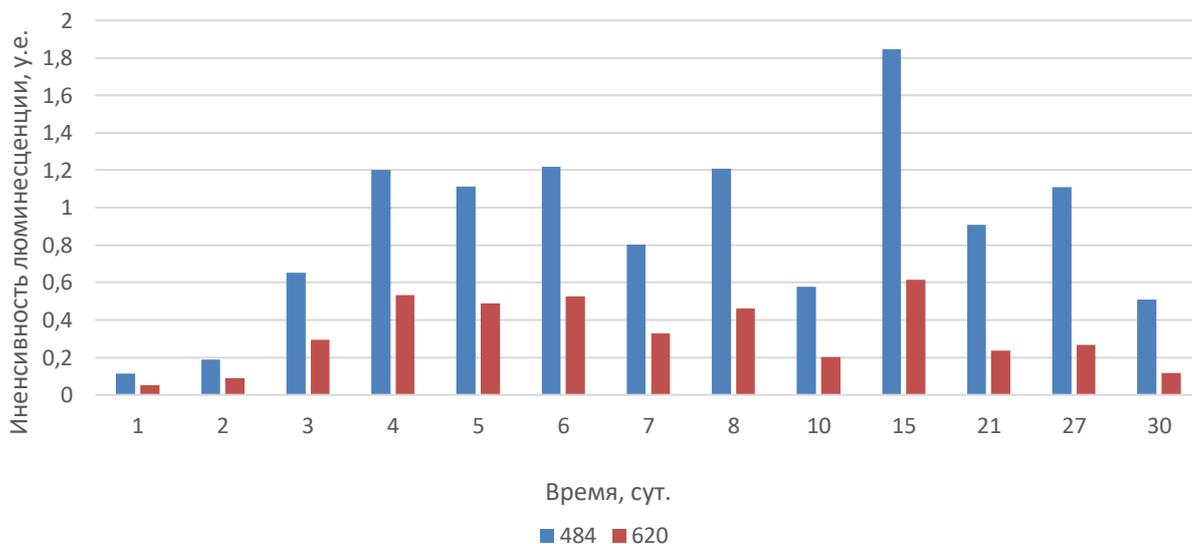


Рисунок 79 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят II контрольной группы

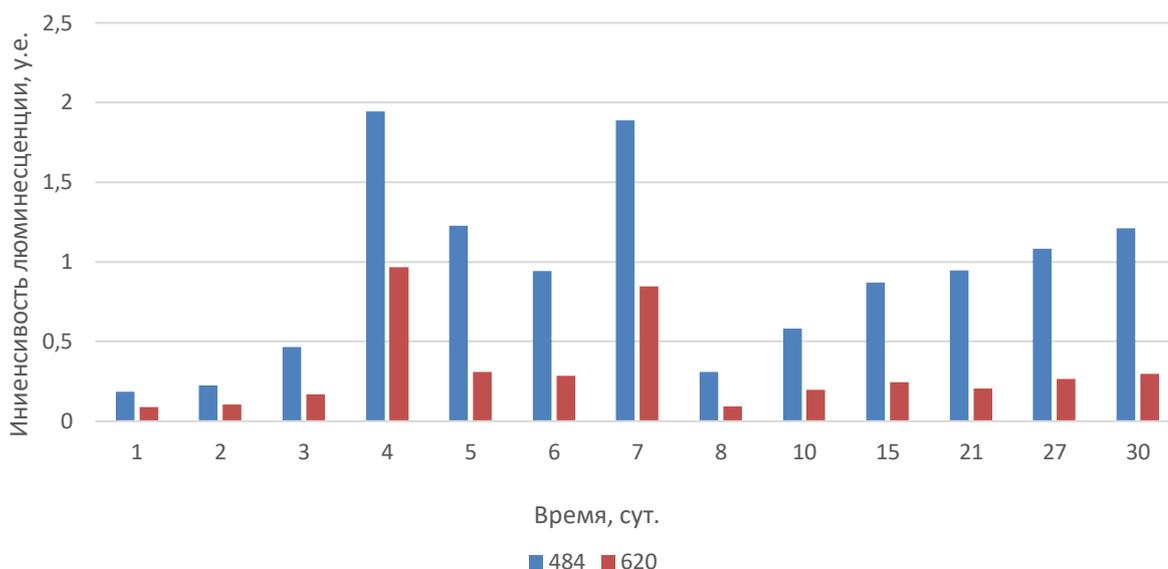


Рисунок 80 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят IV опытной группы

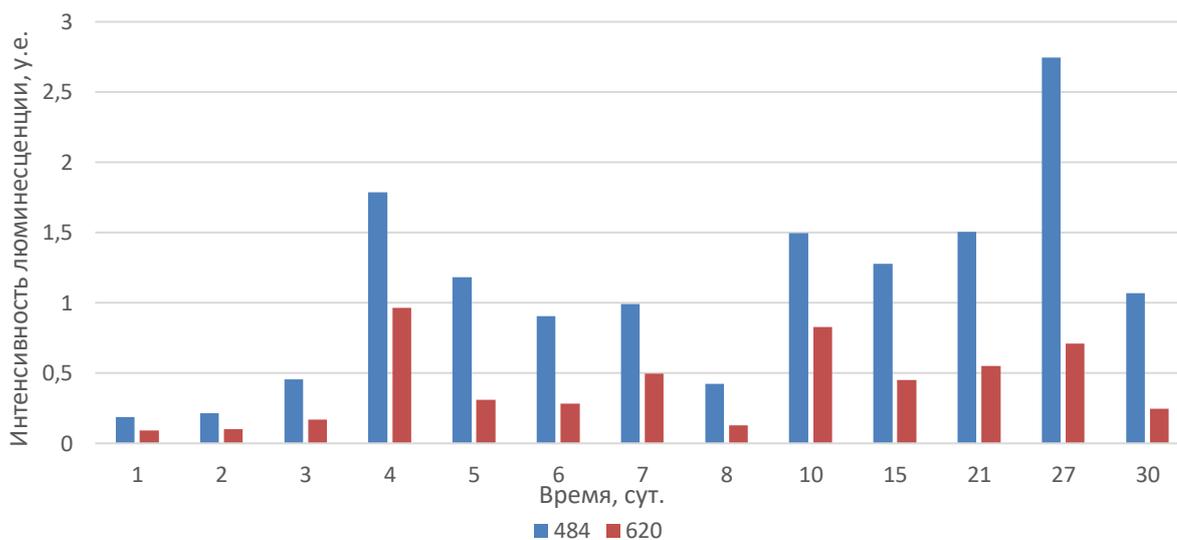


Рисунок 81 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 484 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках эпителия альвеолярных желез слизистой оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы

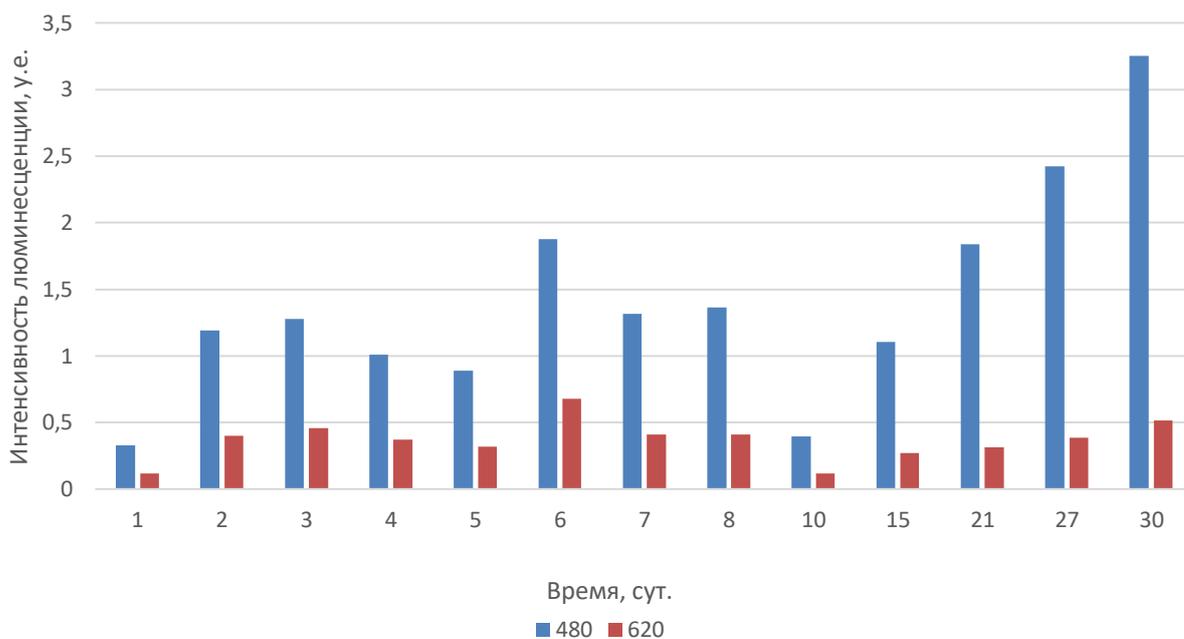


Рисунок 82 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка цыплят II контрольной группы

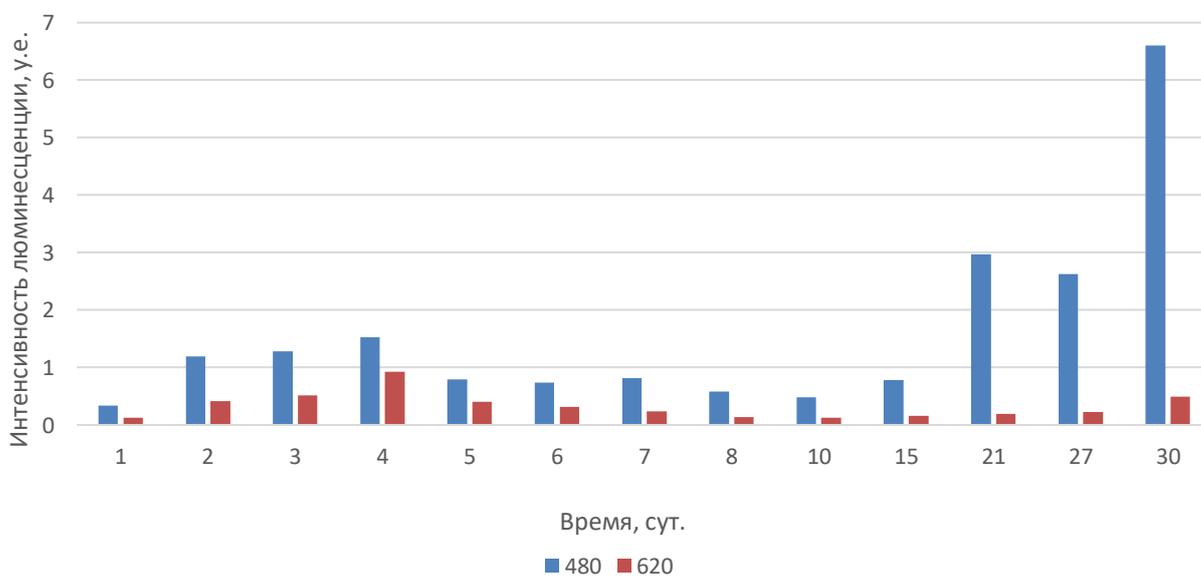


Рисунок 83 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка цыплят IV опытной группы

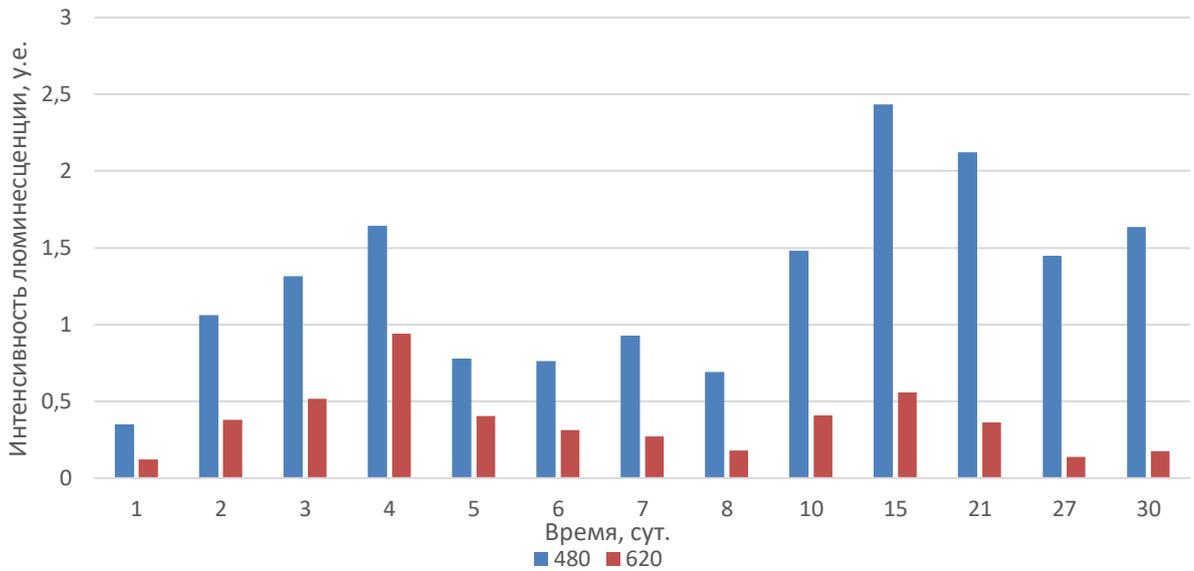


Рисунок 84 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 620 нм (белки) в клетках соединительной ткани подслизистой основы железистого желудка цыплят V опытной группы

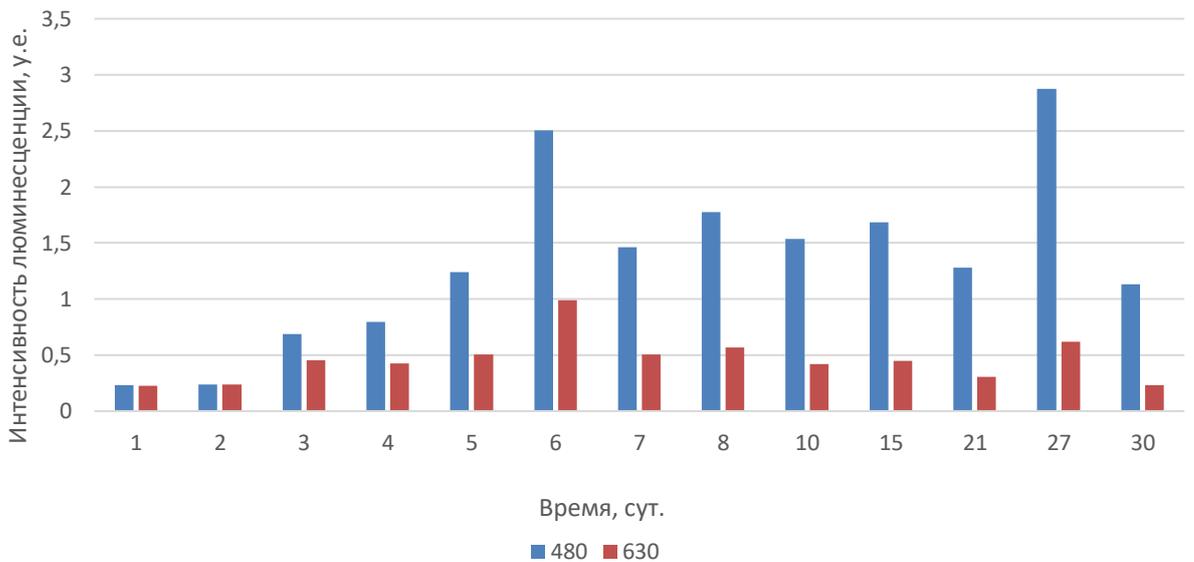


Рисунок 85 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят II контрольной группы

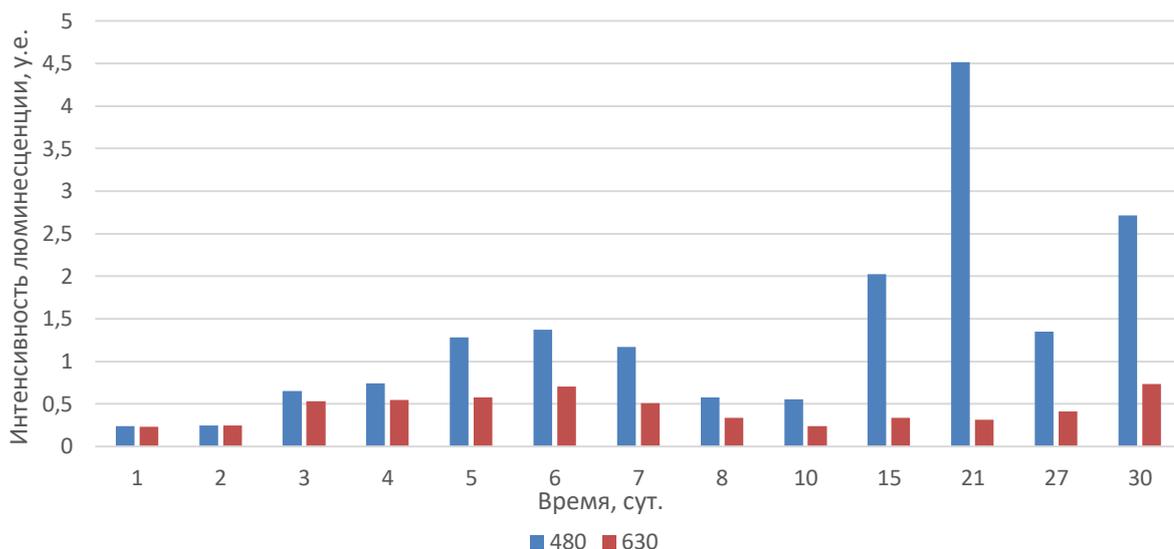


Рисунок 86 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят IV опытной группы

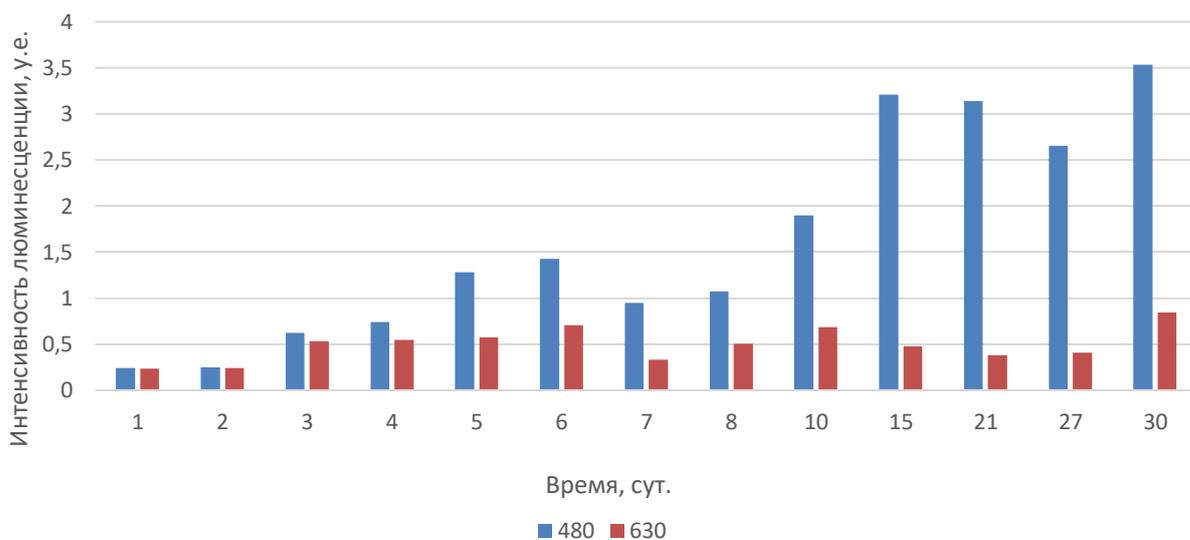


Рисунок 87 – Сведения о средних значениях величин интенсивности люминесценции, определяемой при длине волны 480 нм (нуклеиновые кислоты) и 630 нм (белки) в клетках серозной оболочки железистого желудка цыплят V опытной группы