

**МИКРОЦИРКУЛЯТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТОНКОМ
КИШЕЧНИКЕ ТЕЛЯТ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ**

**В. В. Малашко¹, А. Н. Петушок¹, В. Л. Сукач¹, В. Т. Пальчевская¹,
Л.-Д. Шенгаут¹, Д. В. Малашко², Фаридун А. М. Амин³**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,

г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by);

² – УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»

г. Горки, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 213410, г. Горки,
Могилевская область, ул. Мичурина, 10);

³ – Университет в Сулеймани

Курдистан – Ирак

Ключевые слова: гистохимия, колибактериоз, кровеносная система, морфология, телята, тонкий кишечник, ультраструктура.

Аннотация. Исследованы морфологические и ультраструктурные изменения в микроциркуляторном русле тонкого кишечника телят при микробном поражении.

**MICROCIRCULATORY CHANGES IN SMALL BOWEL OF
CALVES UNDER BACTERIA AFFECTION**

**V. Malashko¹, A. Petuchok¹, V. Sukach¹, V. Palchevskaya¹, L. Šengaut¹,
D. Malashko², Faraidoon A. M. Amin³**

¹ – EI «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by);

² – EI «Belarusian state agricultural academy»

Gorki, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 213410, Gorki,
10 Michurina st.);

³ – Department of Surgery and Theriogenology, College of Veterinary Medicine, University of Sulaimani

Kurdistan Region Iraq; e-mail: Faraidoon.muhamad@univsul.edu.iq

Key words: histochemistry, colisepticaemia, circulatory system, morphology calves, small bowel, ultrastructure.

Summary. The morphological and ultrastructural changes in microcirculatory bloodstream of small bowel under bacteria affection have been investigated.

(Поступила в редакцию 12.05.2020 г.)

Введение. Изучение состояния микроциркуляторного русла при воспалительных процессах в желудочно-кишечном тракте молодняка

сельскохозяйственных животных актуально, но его перестройка в различных отделах алиментарной системы оставалась без глубокого анализа [15]. Метаболические и циркуляторные сдвиги являются тем сигналом, по которым кровеносная система адаптируется к соответствующим запросам органа. Снабжение тканей кислородом зависит от двух величин: минутного объема крови (кровоток в единицу времени, объемная скорость кровотока) и артериовенозной разности по кислороду, т. е. количество O^2 извлекаемого из каждой единицы объема крови [6, 7, 14].

Относительно алиментарной системы телят, вопросы взаимоотношений его специфических функций (моторной, секреторной, всасывательной) с кровоснабжением и роли последнего в обеспечении этих функций практически не изучены. Тем не менее в последние годы получены важные данные о нутритивном (тканевом) значении ауторегуляции [8, 9, 10].

При развитии инфекционных заболеваний животных, таких как сальмонеллез, колибактериоз, пастереллез и др., в органах выявляются микроциркуляторные расстройства, которые выражаются в дистонии сосудов, стазе, сладже, агглютинации эритроцитов и т. д. В артериолах происходит спазм, набухание эндотелия, отек стенок, полнокровие с отмешиванием плазмы. В венах и капиллярах тонкого кишечника наблюдается внутрисосудистое свертывание крови с выпадением фибрина в виде пересекающихся нитей, тяжей или формирование фибриновых, глобулярных, реже гиалиновых тромбов, покрытие фибрином стенок венул и артериол [8, 9, 10, 11].

На фоне нарушения микроциркуляции развивается ишемия/гипоксия в кишечнике. При гипоксии происходит накопление свободных жирных кислот, которые, во-первых, являются разобщителями окислительного фосфорилирования и способствуют накоплению Ca^+ в митохондриях, во-вторых, обладают детергентными свойствами и могут повреждать плазматические мембраны, в-третьих, выступают как основной субстрат перекисного окисления липидов [12, 19].

Таким образом, при тканевой гипоксии развивается комплекс патобиохимических событий: замедление тканевого дыхания, разобщение окисления и фосфорилирования, увеличение восстановленности редокс-систем, накопление недоокисленных продуктов, свободных жирных кислот, ионов кальция.

Важное значение в патогенезе гипоксии является накопление цАМФ, опосредованное выбросом адреналина, норадреналина и других биогенных аминов, что показано в ряде исследований [17]. В условиях редуцированного кишечного кровообращения наряду с деструк-

тивными изменениями слизистой оболочки кишечника наблюдается избыточное накопление в ее тканях гистамина и серотонина [3].

Ульцерогенные эффекты аминов связывают с активацией ими аденилатциклазы и повышением внутриклеточной концентрации цАМФ, неизменно сопутствует развитию язвенных поражений энтеральной слизистой оболочки [20].

Дефицит кислорода обуславливает активацию гликолиза, повышение уровня лактата, ионов H^+ и восстановленных эквивалентов, что увеличивает вероятность образования O_2 , H_2O_2 , а также OH , особенно при нарастающем снижении рН среды [2].

Активация перекисного окисления липидов в условиях гипоксии ведет к нарушению структуры митохондриальных мембран, модификации их фосфолипидного состава и проницаемости, ингибированию митохондриальных ферментов, разобщению окисления и фосфорилирования.

Следует отметить процессы, отягощающие состояние клеток. Во-первых, в присутствии ионов Fe^{2+} перекисному окислению подвергаются мембраны лизосом, что сопровождается освобождением лизосомальных ферментов [13, 21]. Во-вторых, вследствие дезорганизации внутриклеточных структур происходит выход из мест своего функционирования железосодержащих белков и ферментов, которые способны катализировать перекисное окисление [4, 18].

Цель работы – провести морфологический анализ состояния микроциркуляторного русла тонкого кишечника телят на фоне колибактериального поражения.

Материал и методика исследований. Исследовались образцы ткани на участках соответствующих 1-1,5 % (двенадцатиперстная кишка), 6-8 % (проксимальный отдел тощей кишки), 32-37 % (средний участок тощей кишки), 65-70 % (дистальный участок тощей кишки) и 95-100 % (подвздошная кишка) длины тонкого кишечника телят. Биоптаты тонкого кишечника фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалином по Р. Лилли при $t +4^\circ C$ и $t +20^\circ C$, фиксаторе ФСУ А. М. Бродского, 700 спирте, а для проведения гистохимических исследований биоматериал замораживали в жидком азоте ($t -196^\circ C$) в сосуде Дьюара. После вскрытия брюшной полости, отбор проб тонкого кишечника проходил не позднее 10-15 мин после эвтаназии. Всего было исследовано 9 телят, из которых 4 животных служили в качестве контроля 30-65-дневного возраста.

Для получения обзорной информации структурных компонентов тонкого кишечника гистосрезы окрашивали гематоксилин-эозином по

П. Эрлиху, прочным зеленым по И. Ван Гизону, альциновым синим с докраской ядер гематоксилином.

Функциональное состояние микроциркуляторного русла оценивали по следующим параметрам: за один капилляр принимали фрагмент капиллярной сети, не имеющей боковых ветвлений; плотность капилляров определяли как относительную величину, характеризующую густоту распределения капилляров в оболочках тонкого кишечника, равную числу капилляров, отнесенную к единице площади ($n_{уд.}$). Количественную оценку капилляризации тонкого кишечника телят проводили с использованием методики С. М. Блинкова и др. [1961] по формуле: $L_0 = 2n_c$; $n_c = N_c / 2a$, где N_c – число концов сосудов в пределах сетки; n_c – плотность концов капилляров на 1 мм^2 ; a – площадь срезов, покрываемой сеткой; L_0 – длина капилляров на 1 мм^3 .

Исследовали следующие основные морфометрические параметры сосудов микроциркуляторного русла: диаметр просвета сосуда – $D_{пр}$ (мкм), диаметр сосуда – D_c (мкм), толщина стенки сосуда – $T_{ст}$ (мкм). Также измерялись площадь сосуда, включая просвет – S_c (мкм^2), площадь просвета сосуда – $S_{пр}$ (мкм^2), площадь стенки – $S_{ст}$ (мкм^2). Вычислялись индекс Керногана (ИК) – отношение толщины стенки сосуда к диаметру его просвета ($ИК = T_{ст} / D_{пр}$).

Микроциркуляторное русло тонкого кишечника выявляли методом импрегнации по Бильшовскому-Гросс и гистохимическим методом по Г. Гомори, основанного на выявлении щелочной фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.1.1) в эндотелии кровеносных сосудов. В качестве субстрата применяли β -глицерофосфат натрия. Срок инкубации для щелочной фосфатазы составлял 1 ч. Для импрегнации кровеносных сосудов азотнокислым серебром применяли тотальные пленочные препараты тонкой кишки телят, изготовленные по методике В. В. Малашко [1993]. Срезы готовили на ротационном микротоме МПС-2 и МС-2 толщиной 5-8 мкм. Из нефиксированной ткани гистосрезы готовили на микротоме-криостате МК-25 толщиной 8-10 мкм. Гистосрезы монтировали на предметных стеклах Ц1923. Для дегидрирования срезов использовали калибровочные спиртовые растворы.

Для электронно-микроскопического исследования брали соответствующие участки тонкого кишечника около 3-6 см, которые были лигированы, и внутривенно вводился методом диффузии 2%-й раствор глутарового альдегида. В последующем ткани помещали в 5%-й раствор глутарового альдегида на 2 ч. Глутаровый альдегид готовился на 0,1М фосфатном буфере рН 7,2-7,4 и фиксировали при $t +40C$. Затем делали вертикальные разрезы по отношению к оси кишки и изготавливали кубики с длиной края 1-1,5 см. После 3-кратной про-

мывки в 0,1М фосфатном буфере материал обрабатывали 2%-м раствором четырехокси осмия, дегидрировали в спиртах возрастающей концентрации, контрастировали уранил ацетатом и заключали в аралдит. Срезы готовили на ультрамикротоме ЛКБ (Швеция), контрастировали цитратом свинца и просматривали под микроскопом JEM-100CX «JEOL» (Япония). Статистическую обработку цифрового материала проводили с использованием программного пакета Microsoft Excel с уровнем достоверности при $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты наших исследований показывают, что при бактериальном поражении тонкого кишечника телят в гемомикроциркуляторном русле отмечено резкое расширение всех венозных сосудов. Переполнение кровью вен приводит к варикозным выбуханиям. В подслизистой основе тонкой кишки, где локализуется основной венозный коллектор, варикозные изменения наблюдались в венах всех порядков.

Морфометрические показатели сосудистого русла тонкой кишки изложены в таблице. Как показывают данные таблицы, в подслизистой основе установлено достоверное увеличение диаметра артериол по отношению к норме на 32,45 % ($P < 0,01$). Мы полагаем, что такие структурные изменения артериол, а именно увеличение просвета, направлены на то, чтобы путем резкой активизации притока крови к кишечнику и повышения давления в сосудах минимизировать причину нарушения венозного оттока. Это, в свою очередь, обуславливает раскрытие многочисленных внутриорганных и экстраорганных окольных путей оттока крови.

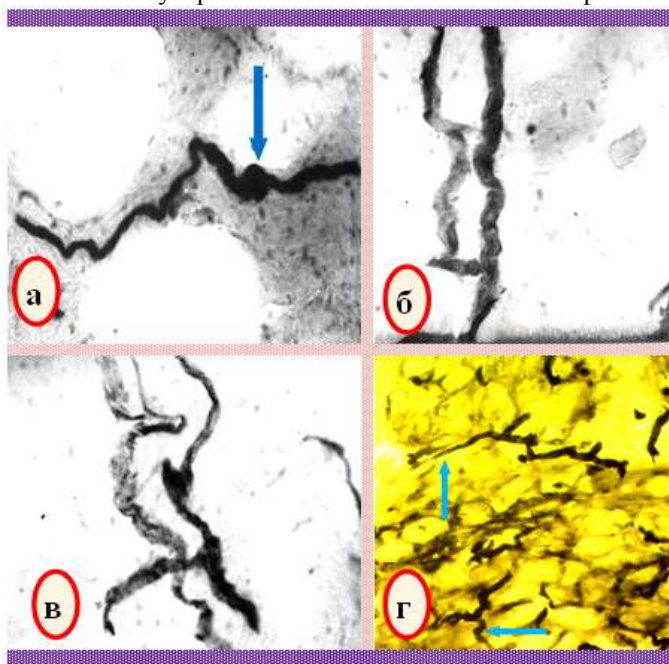
Таблица – Сравнительная характеристика диаметров сосудов гемомикроциркуляторного русла в оболочках стенки тонкой кишки телят при колибактериозе

Вид микрососуда	Оболочки стенки тонкой кишки	Норма	Патология
Артериолы	Подслизистая основа	21,39 ± 0,78	28,33 ± 0,47**
	Мышечная оболочка	19,43 ± 0,65	17,08 ± 0,82 ^{н/д}
	Серозная оболочка	17,8 ± 0,29	16,04 ± 0,23 ^{н/д}
Капилляры	Подслизистая основа	63,96 ± 2,57	51,62 ± 2,27*
	Мышечная оболочка	44,62 ± 1,46	38,16 ± 1,94*
	Серозная оболочка	48,35 ± 1,58	42,12 ± 1,17*
Венулы	Подслизистая основа	32,56 ± 1,91	39,61 ± 1,34*
	Мышечная оболочка	23,36 ± 1,11	34,05 ± 1,84*
	Серозная оболочка	25,17 ± 0,43	29,47 ± 0,91*

*Примечание – * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; н/д – недостоверно*

В подслизистом слое вены представлены венами-спутницами, из которых в обычных условиях одна вена имеет более широкий просвет. Вены с меньшим диаметром в результате перерастяжения становятся

извилистыми, приобретают неравномерную извилистость (рисунок 1). Расширятся анастомозы между венами, поэтому границы вено-венозных и вено-венулярных петель становятся более очерченными.



а – варикозное расширение вен (стрелка); б – извитость стенок сосудов; в – формирование дугообразных аркад; г – спазм капилляров в подслизистом слое тонкой кишки (стрелки)

Рисунок 1 – Структурные изменения микроциркуляторного русла тонкой кишки при колибактериозе. Метод Гомори. Микрофото.

Биоскан. Ув.: а, б, в – 280, г – 140

По другой причине этот феномен связан с тем, что прекапиллярные сфинктеры в условиях патологии находятся в состоянии резкого спазма. Спазмы также характерны и для мелких артерий и артериол. В ответ на резкий спазм сосудов, регулирующих поступление крови в микроциркуляторные системы, и в ответ на нарастание тканевой ишемии, обусловленной застойными явлениями, происходит компенсаторное увеличение притока крови по крупным артериями к структурам тонкого кишечника. Установлены достоверные различия по реакции капиллярного русла при патологии. В подслизистой основе диаметр

капилляров уменьшился на 19,29 % ($P < 0,05$), в мышечной оболочке – на 14,48 % ($P < 0,05$) и в серозной оболочке – на 12,88 % ($P < 0,05$) по отношению к норме. Венозный застой крови сопровождался увеличением диаметра сосудов, в подслизистой основе этот показатель был выше нормы на 21,65 % ($P < 0,05$), в мышечной оболочке – на 45,58 % ($P < 0,05$) и в серозной оболочке – на 11,71 % ($P < 0,05$). Аневризматические дилатации артерий и артериол приводят к локальному увеличению их просветов в 1,5-2 раза. Перерастяжение стенки сосуда сопровождается ее удлинением и возникновением извилистости. Расширение просветов сосудов сопровождается появлением складчатости эндотелия (рисунок 2).



Рисунок 2 – Складчатость эндотелия (двойная стрелка) артерии тонкой кишки при колибактериозе.

Гематоксилин-эозин. Микрофото. Биоскан. Ув.: – 400

Во всех оболочках тонкого кишечника установлена инфильтрация, отечность клеточных элементов и стаз в микрососудах. При электронной микроскопии выявлен межклеточный отек, вакуолизация цитоплазмы энтероцитов, у 45-57 % энтероцитов наблюдается редукция микроворсинок. Нарушается архитектоника крипт, а именно: наблюдается горизонтальный рост крипт вдоль мышечной пластинки слизистой оболочки, расширение базальных отделов крипт, зубчатость крипт,

уходящая до базальных отделов (в нижней трети) и ассиметричная пролиферация. Клетки крипт низкие столбчатые, набухшие, их ядра округлые, расположены в базальной части клеток, межкрипталльная строма отечна. Ворсинки приобретают разнообразную форму, многие из них укорочены и истончены, местами встречаются участки с микроэрозиями. Многие энтероциты тонкой кишки (28-33 %) находятся в состоянии глубоких патологических изменений (рисунок 3).

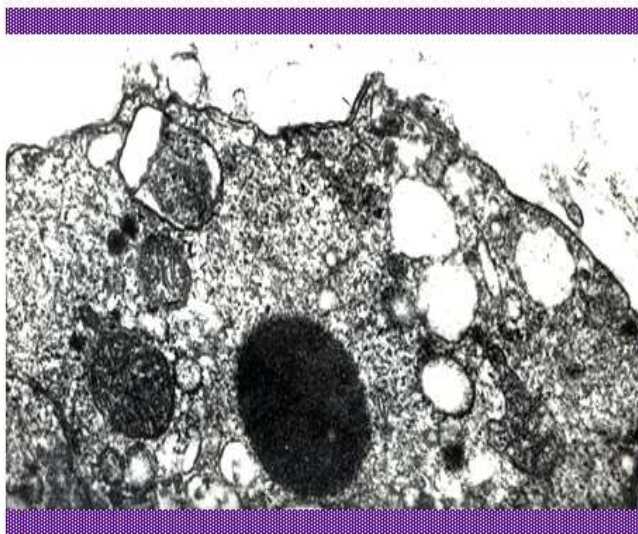


Рисунок 3 – Ультраструктура энтероцита: исчезновение микроворсинок «облысение плазмолеммы», многочисленные вакуоли, первичные и вторичные лизосомы, фрагментация плазмолеммы. Электронограмма. Ув.: – 20000

Ключевыми морфологическими признаками перестройки микроциркуляторного русла тонкого кишечника телят при бактериальном поражении наряду с уменьшением высоты и десквамацией эпителия, фиброзом и инфильтрацией иммунокомпетентными клетками собственной пластинки слизистой оболочки, разволокнением коллагеновых волокон являются расслоение и утолщение базальной мембраны, подэндотелиальным и периваскулярным фиброзом микроциркуляторного русла кишечника.

Заключение. Во внутриорганном и гемомикроциркуляторном русле тонкого кишечника телят при колибактериозе выявлено резкое расширение всех венозных сосудов во всех оболочка тонкой кишки. В

результате чрезмерного переполнения кровью венул формируются аневризмы. В подслизистой основе тонкой кишки варикозные выбухания наблюдались в венах всех порядков. Венулы с меньшим диаметром в результате перерастяжения приобретают неравномерную извилистость. Характерную форму имеют аневризмы стенки артериол в местах отхождения дочерних сосудов. По ходу артериол аневризмы имеют форму раздутого баллончика, то в указанных местах для них свойственна куполообразная форма.

Определенные морфологические изменения капиллярного русла тонкого кишечника телят характеризуются десквамацией эндотелия, расслоением и утолщением базальной мембраны, подэндотелиальным и периваскулярным фиброзом. На фоне развития ишемии возникает дефицит энергии, изменяется ионное равновесие, происходит активация внутриклеточных ферментов (например, щелочной фосфатазы) в итоге развивается некроз в слизистой оболочке тонкой кишки.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ НАН Беларуси грант Б20МС-008.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян, Г. А. Мобилизация перицитов при воспалении и регенерации соединительной ткани / Г. А. Арутюнян, М. Г. Костяева // Морфология. – 2016. – Т. 149, № 3. – С. 20-24.
2. Афанасьев, И. Б. Свободные кислородные радикалы и процессы жизнедеятельности / И. Б. Афанасьев. – Минск: Наука и техника, 1984. – С. 13-29.
3. Гавровская, Л. К. Содержание биогенных аминов в тканях желудка крыс в условиях редуцированного желудочного кровообращения / Л. К. Гавровская, В. М. Седов, А. К. Гусаков // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1983. – Т. 96, № 7. – С. 21-22.
4. Гелашвили, О. А. Особенности ветвления приносящего звена микроциркуляторного русла скелетных мышц человека в пренатальном онтогенезе / О. А. Гелашвили // Морфология. – 2016. – Т. 149, № 3. – С. 61-63
5. Джавахишвили, Н. А. Закономерности строения кровеносных капилляров в норме и эксперименте / Н. А. Джавахишвили, М. Р. Комахидзе // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1969. – Т. 57, вып. 11. – С. 3-9.
6. Куприянов, В. В. Система микроциркуляции и микроциркуляторное русло / В. В. Куприянов // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1972. – Т. 62, вып. 3. – С. 14-24.
7. Куприянов, В. В. Морфологические изменения в системе микроциркуляции как проявление адаптации / В. В. Куприянов // Успехи соврем. биол. – 1979. – Т. 88, № 5. – С. 241-250.
8. Курдеко, А. П. Совершенствование лечебно-профилактических мероприятий при желудочно-кишечных заболеваниях поросят в условиях промышленных комплексов / А. П. Курдеко // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2001. – № 2. – С. 33-34.
9. Малашко, В. В. Гастроинτερальная патология и реабилитация больных животных / В. В. Малашко, Е. Л. Микулич, Е. М. Кравцова // Актуальные проблемы животноводства: сб. науч. тр. – Горки, 2000. – С. 242-245.
10. Малашко, В. В. Структура интрамуральной нервной системы пищеварительного тракта поросят – гипотрофиков / В. В. Малашко, Т. М. Скудная, В. Л. Ковалевич // Тез. докл., посвящ. 50-летию со дня основания института физиологии. – Минск, 2003. – С. 96-97.
11. Малашко, В. В. Структурно-функциональные изменения в организме животных при воздействии стресс-факторов / В. В. Малашко, И. В. Кулеш, Т. М. Скудная // V междунар. науч. – практ. конф.: материалы конф. – Горки, 2002. – С. 249-257.

12. Манасян, А. В. Активность ферментов пищеварительной системы у телят при диспепсии / А. В. Манасян, Г. Р. Петроян, А. М. Шахбазян // Ветеринария. – 2003. – № 7. – С. 39-40.
13. Мотавкин, П. А. Капилляры головного мозга / П. А. Мотавкин, А. В. Ломакин, В. М. Черток. – Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1983. – 140 с.
14. Теплов, С. И. Кровоснабжение и функции органов / С. И. Теплов. – Л.: Наука, 1987. – 125 с.
15. Тихомирова, А. Н. Системные и органные изменения микроциркуляторного русла при экспериментальной дегидратации организма / А. Н. Тихомирова, Е. А. Соколова // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1989. – Т. 97, № 9. – С. 54-60.
16. Чернух, А. М. Микроциркуляция / А. М. Чернух, П. Н. Александров, О. В. Алексеев. – М.: Медицина, 1984. – 432 с.
17. Gross, R. A. Mechanisms of cyclic AMP regulation in cerebral anoxia and their relationship to glycogenolysis / R. A. Gross, S. A. Ferrendelli // J. Neurochem. – 1980. – Vol. 34. – P. 1309-1318.
18. Halliwell, B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // Biochimistry. – 1984. – Vol. 219. – P. 1-14.
19. Kats, A.M. Lipid-membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium / A. M. Kats, F. C. Messengos // Circulat. Res. – 1981. – Vol. 48. – P. 1-16.
20. Mozsik, G. Interrelationship between the cholinergic influence, gastric mucosa Na^+ – K^+ -dependent ATP, ADP ions of gastric juice and basal secretion in patents / G. Mozsik, J. Kutas, L. Nadi // Gastric ion transport. – 1978. – P. 199-208.
21. Sato, M. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidative of rat liver lysosomes / M. Sato, L. Konagal, R. Kumura // Chem. Pharmacol. Bull. – 1983. – Vol. 31. – P. 3665-3670.

УДК 636.087.8 (047.31)

**ПРОВЕРКА АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И
ИСПЫТАНИЯ ПАТОГЕННОСТИ И ТОКСИГЕННОСТИ
ОТОБРАННЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ, НА
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**А. Н. Михалюк¹, А. А. Сехин¹, А. В. Малец¹, И. М. Лойко¹,
Э. И. Коломиец², Т. В. Романовская²**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,

г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by);

² – Институт микробиологии НАН Беларуси

г. Минск, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 220141,

г. Минск, ул. акад. В. Ф. Купревича, 2; e-mail: microbio@mbio.bas-net.by)

***Ключевые слова:** штаммы спорообразующих бактерий, безвредность, токсигенность, лабораторные животные.*

***Аннотация.** На основании результатов исследований считаем, что штаммы спорообразующих бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* 45, *Bacillus**