

the effectiveness, depending on an epizootic situation, from 10.5 to 32.8 rubles per ruble of investment. Novelty of the research has been confirmed by 7 patents for invention of the Russian Federation, and by 20 methodical recommendations for practice.

Keywords: maral, sika deer, pasteurellosis, brucellosis, tuberculosis, parasitic diseases, complex schemes of prevention.

УДК 619:579.62:616.9-036.22+636.5

В.Н. АФОНЮШКИН, кандидат биологических наук, заведующий сектором,
М.Л. ФИЛИПЕНКО*, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией,
В.Ю. КОПТЕВ, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
М.А. ТИТОВА, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
С.А. БОЛЯХИНА кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
В.С. ЧЕРЕПУШКИНА**, студент

Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока,

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины,*

***Новосибирский государственный аграрный университет*

e-mail: kastrolog@mail.ru

ПЕРЕМЕШИВАНИЕ КОРМОВЫХ МАСС В КИШЕЧНИКЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРЕПАРАТОВ, МОДУЛИРУЮЩИХ МОТОРИКУ КИШЕЧНИКА

Изучены процессы смешивания пищевых масс в кишечнике как фактор поддержания гомеостаза его микробиоты. Лабораторным мышам вводили в желудочно-кишечный тракт две флюоресцентные метки, после чего проводили анализ смешивания флюоресцентных красителей в кишечном содержимом. Выявлено, что жидкий компонент кишечных масс характеризуется значительно более интенсивным перемещением, в том числе в оральном направлении кишечной трубки. В естественных условиях при локальном воспалительном процессе это может приводить к диссеминации источника воспаления по желудочно-кишечному тракту. Установлено, что процессы перемешивания и скорость выведения флюоресцентных меток в просвете кишечника (в составе оформленных каловых масс) и в пристеночной зоне кишечной трубки существенно различаются и красители остаются в слизистой тонкого отдела кишечника спустя 4–5 ч после введения.

Ключевые слова: кишечник, моторика желудочно-кишечного тракта, кишечные инфекции.

Проблема профилактики и лечения кишечных инфекций бактериального и вирусного происхождения [1] ввиду снижения эффективности использования антибиотиков [2–5], снижения резистентности сельскохозяйственных животных и птицы к инфекционным заболеваниям и росту потребительских требований к экологической чистоте и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции в настоящее время особенно актуальна.

Современные исследователи пытаются компенсировать снизившуюся эффективность антибиотиков разработкой новых методических подходов к лечению кишечных инфекций [6], в том числе нацеленных на повышение эффективности элиминации микроорганизмов из кишечника.

ка самим макроорганизмом [7–9]. Исходя из этого возникает вопрос: можно ли простимулировать элиминацию условно-патогенных микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта путем модуляции моторики кишечника?

Цель работы – изучить процессы смешивания пищевых масс в кишечнике мышей как фактор поддержания гомеостаза микробиоты кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работу выполняли на базе группы фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины (Новосибирск), сектора молекулярной биологии и лаборатории болезней молодняка Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск).

На первом этапе работы для оценки смешиваемости пищевых масс в кишечнике необходимо различать флюоресценцию двух разных меток, отдельно введенных в желудочно-кишечный тракт. Флюориметрию выполняли с использованием реал-тайм амплификатора «Lightcycler nano» (Roche). В экспериментах использовали зеленую и красную краски (гуашь флюоресцентная «Аква-колор»). Красители титровали с шагом 1 : 2 в фосфатно-буферном растворе как отдельно, так и в смеси.

На втором этапе работы для визуальной оценки распределения пищевых масс в кишечнике мышей выполняли инъекции желтого и красного красителей (гуашь флюоресцентная «Аква-колор») в слепую кишку. Красный краситель вводили вблизи илеоцекального клапана, желтый – в каудальной части слепой кишки по 100 мкл. Через 0,5–1 ч мышей выводили из эксперимента путем декапитации. Аналогично делали инъекции в ободочную кишку – красный и желтый краситель вводили в дозах 100 мкл на расстоянии 1 см друг от друга. В процессе эксперимента наблюдали за перистальтикой кишечника. После выведения мышей из эксперимента кишечник препарировали и рассматривали с использованием трансиллюминатора и ультрафиолетовой лампы.

На третьем этапе работы в опыте по изучению перемешивания пищевых масс в кишечнике под воздействием препаратов, модулирующих моторику кишечника, использована 21 мышь. Из животных сформировали две опытных и контрольную группы ($n = 7$). Все измерения делали в трех повторностях. Для подавления моторики кишечника животным 1-й опытной группы использовали 4-(4-Хлорфенил)-4-гидрокси-N,N-диметил-альфа, альфа-дифенил-1-пиперидин бутанамид (в виде гидрохлорида). Для стимуляции моторики кишечника животным 2-й опытной группы использовали 4,4'-(2-Пиридинилметил)бисфенола бис(гидрогенсульфат)(эфир) динатриевую соль. Препараты выпаивали с водой в течение суток. Флюоресцентные метки вводили с интервалом 1 ч по 500 мкл внутривентрально. По истечении 4 ч выводили мышей из эксперимента декапитацией. Отбирали участки кишечника длиной 1 см из всех отделов кишечника. Из проб физиологическим раствором экстрагировали флюоресцентный краситель и проводили спектральный анализ с целью выявления смешивания красителей с использованием реал-тайм амплификатора «Lightcycler nano» (Roche).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны различия флюоресценции разных соотношений красной и зеленой меток в смеси.

Как следует из рис. 1, красная метка различима при разведении в 16 раз, зеленая – в 64 раза, что требует введения в кишечник неразбавленных красителей.

Перемешивание флюоресцентных меток происходило в толстом отделе кишечника весьма неравномерно. Жидкая фракция кишечного содержимого распространялась по кишечной трубке существенно быстрее, чем плотная, причем жидкая фракция в процессе перистальтики перемещалась как в каудальном, так и в краниальном направлении. В результате структура флюоресцирующих пятен не сохранялась в процессе перистальтики, что особенно заметно в слепой кишке.

В ободочной кишке флюоресцентные метки синхронно перемещались в каудальном направлении, постепенно размываясь и перемешиваясь, также часть красителя перемещалась в краниальном направлении, иногда компактными зонами (рис. 2).

Из сделанных наблюдений следует, что необходимо учитывать отдельно перемещение и перемешивание жидкой и плотной фракций кишечного содержимого. При диарейном синдроме, когда количество жидкости в ки-

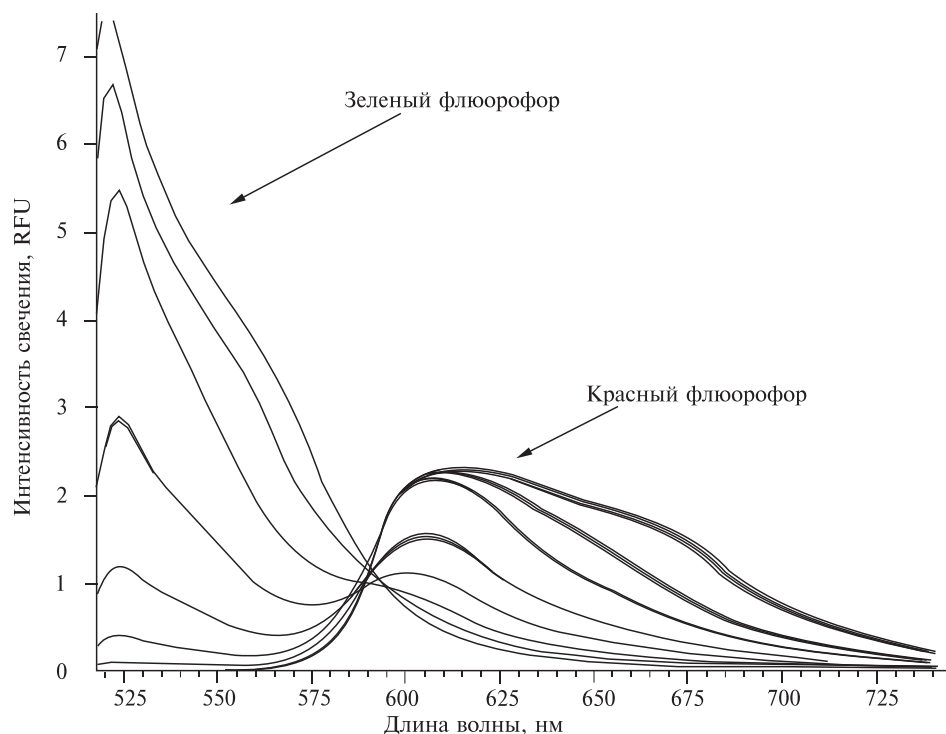


Рис. 1. Спектры флюоресценции меток, смешанных друг с другом в различных соотношениях

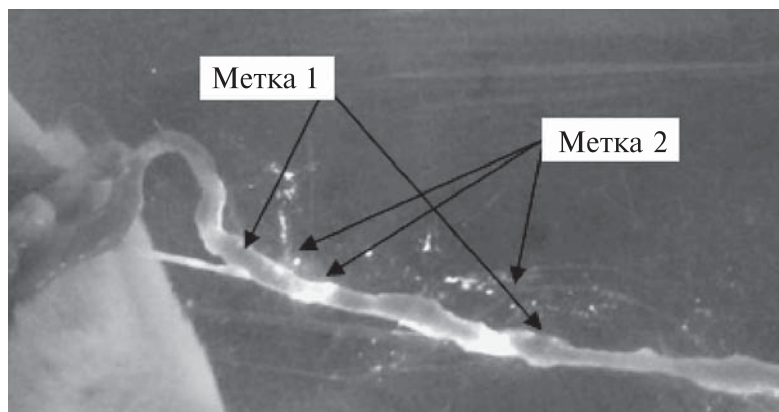


Рис. 2. флюоресценция красителей в ободочной кишке мышей

шечной трубке увеличивается, можно ожидать дисцизию микробиоты кишечника из воспаленного отдела кишечника.

Животным 1-й опытной группы подавляли моторику кишечника указанным выше препаратом. Данный препарат взаимодействует с опиатными рецепторами продольных и кольцевых мышц стенки кишечника и ингибирует высвобождение ацетилхолина и ПГ, замедляет перистальтику кишечника и увеличивает время прохождения кишечного содержимого, повышает тонус анального сфинктера, способствует удержанию каловых масс и урежению позывов к дефекации, ингибирует секрецию жидкости и электролитов в просвет кишечника и/или стимулирует всасывание солей и воды из кишечника.

Животным 2-й опытной группы стимулировали моторику кишечника указанным выше соединением. Данное соединение стимулирует рецепторы слизистой оболочки кишечника, усиливает перистальтику. Активная форма препарата, образующаяся путем гидролиза под влиянием кишечных микроорганизмов, непосредственно возбуждает нервные структуры кишечной стенки. В результате ускоряется продвижение кишечного содержимого, уменьшается всасывание электролитов и воды. Слабительный эффект наступает через 6–12 ч после приема.

Оценивали флюоресценцию красителей, экстрагирующихся из стенки кишечника. Оформленные каловые массы окрашивались последовательно, сначала зеленым красителем, затем красным. Встречались единичные образцы, где отмечали четкую границу между красным и зеленым флюоресцентными метками. Из анализа экстрактов из стенки кишечника следует, что распределение флюоресцентных красителей в пристеночном пространстве существенно отличается от такового в просвете кишечника.

Как следует из рис. 3, 4, перемешивание красителей происходит начиная с тонкого отдела кишечника (вероятно, там кишечное содержимое более жидкое и лучше перемешивается в процессе перистальтических движений кишечной трубки). Зеленый краситель (пик флюоресценции

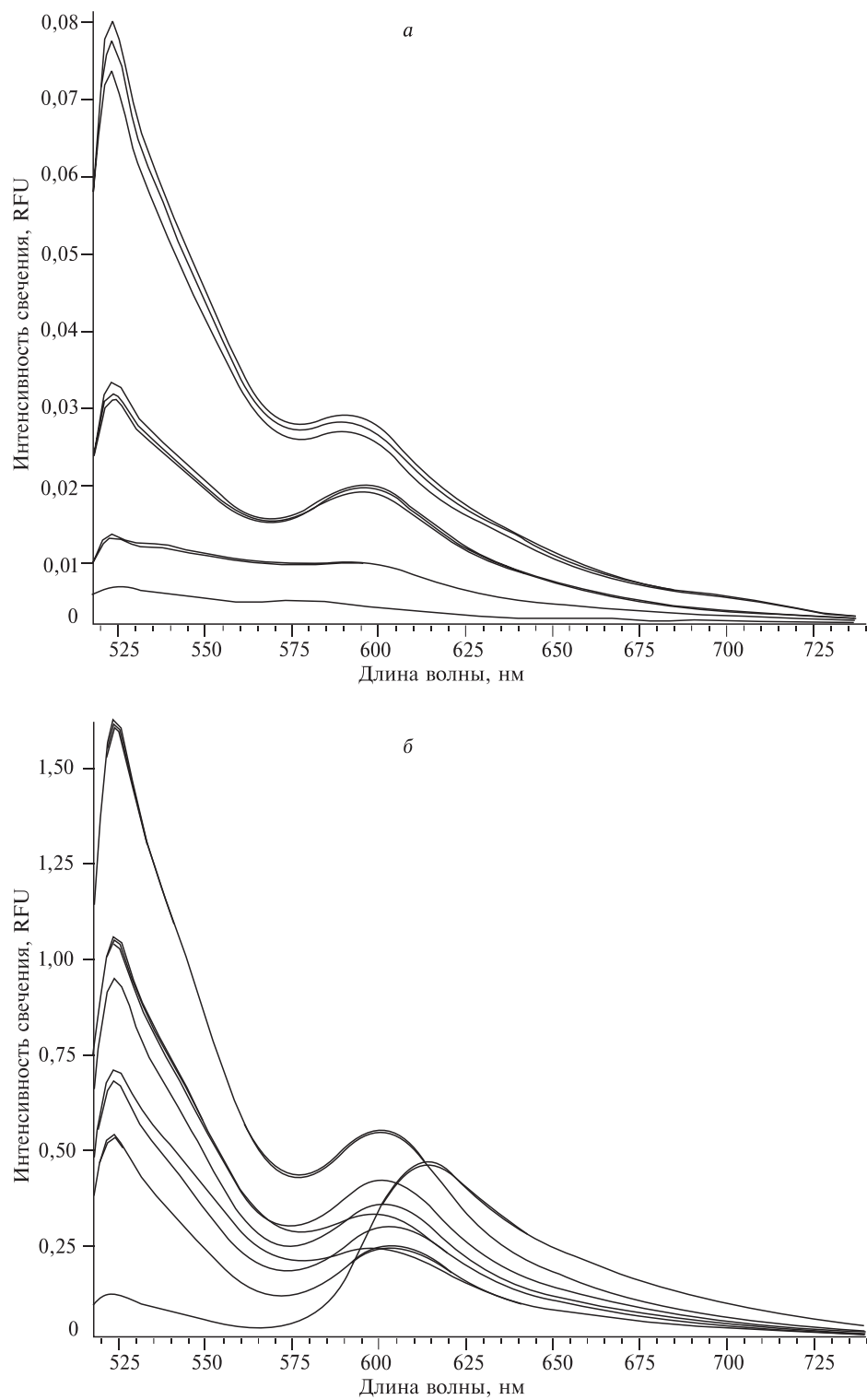


Рис. 3 →

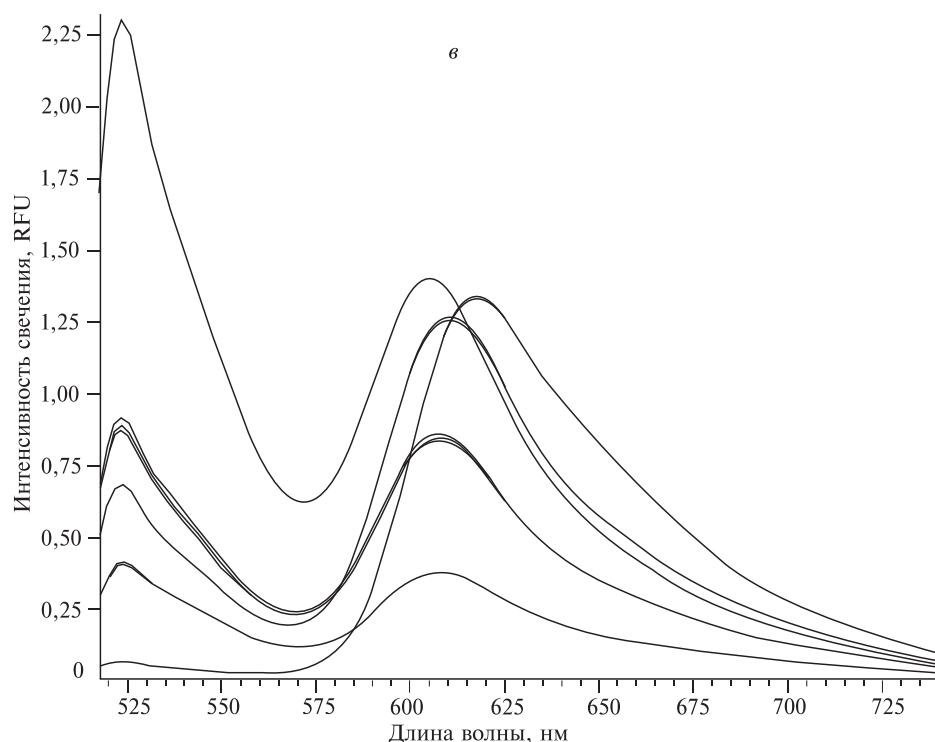


Рис. 3. Тонкий отдел кишечника (тощая кишка) мышей:
а – 1-я опытная группа; б – 2-я опытная; в – контрольная

525 нм) добавлен первым, но оставался в стенке кишечника на всем протяжении. Соотношение пиков менялось незначительно, и к концу эксперимента в тонком отделе кишечника оставались оба красителя. Статистически достоверных различий по интенсивности флюоресценции красителей пристеночной зоне тонкого отдела кишечника в опытных группах не отмечено.

Ввиду равномерного перемешивания обеих флюоресцентных меток в пристеночной зоне кишечника можно свидетельствовать о незначительной роли препаратов, модифицирующих моторику кишечника, на скорость удаления микрочастиц туши, попавших между ворсинками кишечника. Длительное сохранение микрочастиц флюоресцентной туши между ворсинками кишечника (в пристеночной зоне) позволяет утверждать о возможности создания фармацевтических пероральных препаратов пролонгированного действия, которые могли бы сохраняться в тонком отделе кишечника не менее 5 ч, обеспечивая оптимальную фармакокинетику лекарственного средства в организме. Изучение процессов перемешивания кишечного содержимого в толстом отделе кишечника, обладающего разнообразной кишечной микробиотой, также имеет большее значение для анализа патогенеза энтероколитов.

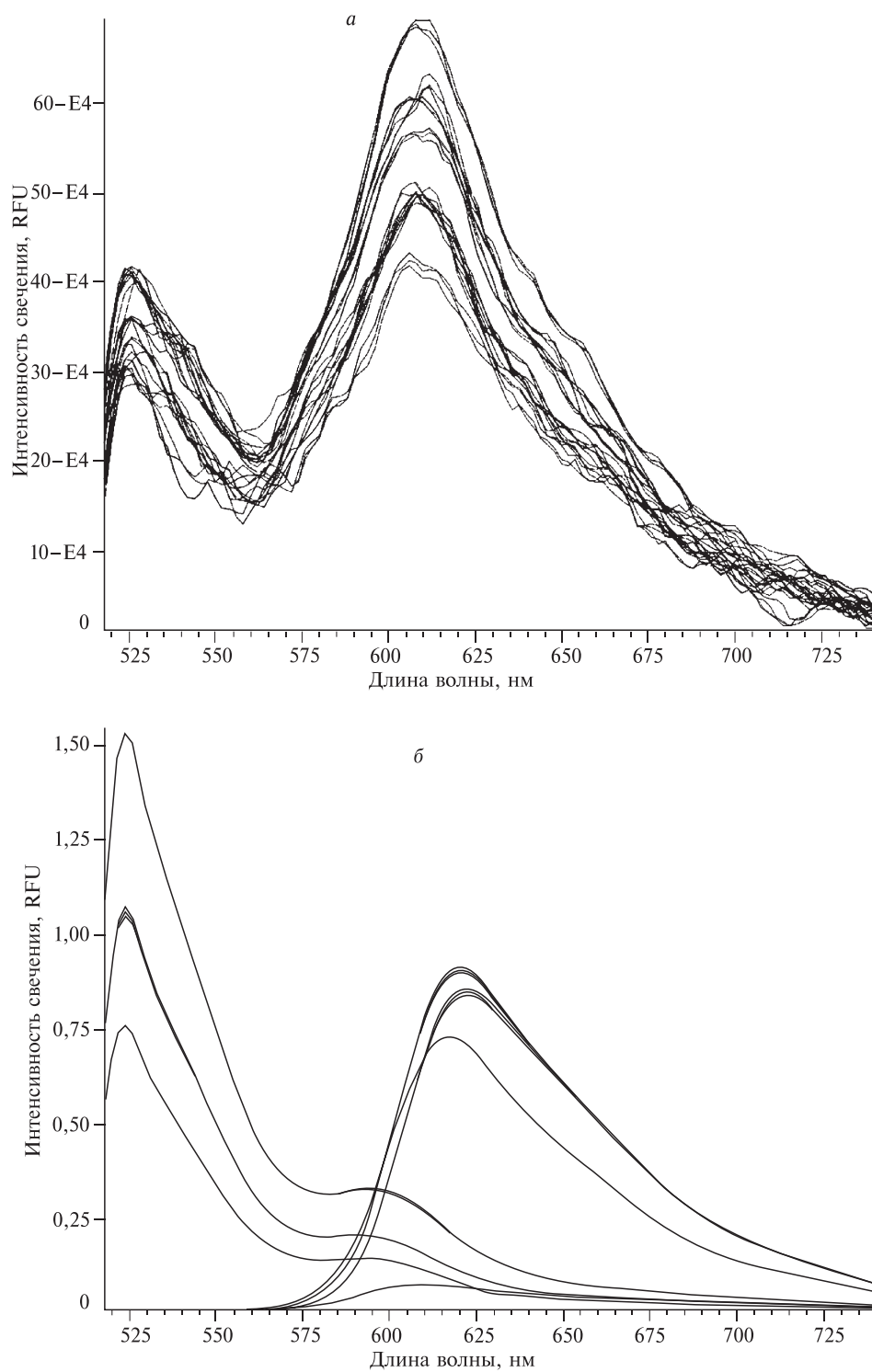


Рис. 4. Ободочная кишка мышей:
а – 1-я опытная группа; б – 2-я опытная

ВЫВОДЫ

1. Жидкий компонент кишечных масс у лабораторных мышей характеризуется значительно более интенсивным перемещением, в том числе в оральном направлении кишечной трубки, что в естественных условиях при локальном воспалительном процессе может приводить к диссеминации источника воспаления по желудочно-кишечному тракту.

2. Процессы перемешивания и скорость выведения флюоресцентных меток в просвете кишечника (в составе оформленных каловых масс) и в пристеночной зоне кишечной трубки существенно различаются, и красители остаются в тонком отделе кишечника спустя 4–5 ч после введения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Афонюшкин В.Н., Шкиль Н.А., Коптев В.Ю., Нестерова И.С. Биохимический полиморфизм *E. coli* серотипа 0157:H7 // Вестн. РАСХН. – 2007. – № 4. – С. 75–77.
2. Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? // Clinical Microbiology Reviews. – 2005. – Vol. 18 (2) – P. 306–325.
3. Cloeckaert A., Baucheron S., Chaslus-Dancla E. Nonenzymatic chloramphenicol resistance mediated by IncC plasmid R55 is encoded by a floR gene variant // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2001. – Vol. 45. – P. 2381–2382.
4. Heisig P. High-level fluoroquinolone resistance in a *Salmonella typhimurium* isolate due to alterations in both gyrA and gyrB genes // J. Antimicrob. Chemother. – 1993. – N 32. – P. 367–377.
5. Nishino K., Nikaido E., Yamaguchi A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella* // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1794. – P. 834–843.
6. Афонюшкин В.Н., Дударева Е.В., Малахеева Л.И., Филипенко М.Л. Антибиотикорезистентность сальмонелл в Сибири // Ветеринария. – 2008. – № 1. – С. 7–9.
7. Коптев В.Ю., Шкиль Н.А., Титова М.А. и др. Сорбционная активность маннанолигосахаридов в отношении микроорганизмов рода *Salmonella* в опытах *in vitro* и *in vivo* // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2014. – № 2. – С. 47–52.
8. Афонюшкин В.Н., Троменшлегер И.Н., Филипенко М.Л. и др. Подавление подвижности *Salmonella enterica* // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2012. – № 5. – С. 76–82.
9. Афонюшкин В.Н., Троменшлегер И.Н., Филипенко М.Л., Титова М.А. Изменение устойчивости *Salmonella enterica* и *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальной и иммобилизационной активности хлорамфеникола // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2013. – № 5. – С. 66–74.

Поступила в редакцию 07.11.2014

V.N. AFONYUSHKIN, Candidate of Science in Biology, Sector Head,
M.L. FILIPENKO*, Candidate of Science in Biology, Laboratory Head,
V.YU. KOPTEV, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher,
M.A. TITOVA, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher,
S.A. BOLYAKHINA, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher,
V.S. CHEREPUSHKINA**, Student

Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East,

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,*

*** Novosibirsk State Agrarian University*

e-mail: kastrollog@mail.ru

MIXING OF FODDER MASSES IN THE INTESTINES OF LABORATORY MICE AS INFLUENCED BY DRUGS MODULATING INTESTINAL MOTILITY

The aim of the work was to study processes of mixing food masses in the intestines as a factor in maintaining the homeostasis of the microbiota of the intestines. Laboratory mice were administered the two fluorescent labels to the gastrointestinal tract, then the process of mixing fluorescent dyes with

the intestinal contents was analyzed. It has been found that the liquid component of the intestinal mass has much more intense movements including those in the oral direction of the intestinal tube. Theoretically, if there is a local inflammation, the accumulation of fluid may results in dissemination of the inflammation source throughout the gastrointestinal tract. The mixing processes and the rate of excretion of fluorescent labels in the lumen of the intestines (as a component of feces) and in the edge zone of the intestinal tube differ significantly, and the dyes remain in the mucosa of the small intestine after 4–5 hours after administration.

Keywords: the intestines, motility of the gastrointestinal tract, intestinal infections.

УДК 619: 578.828.11:616-079.4

Н.Г. ДВОЕГЛАЗОВ, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
В.В. ХРАМЦОВ, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией,
Т.А. АГАРКОВА, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
Н.А. ОСИПОВА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
e-mail: lableucosis@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ ИФА И РИД ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Представлены результаты сравнительного анализа практического использования двух методов диагностики – реакции иммунодиффузной преципитации (РИД) и иммуноферментного анализа (ИФА) при проведении оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота. Диагностические исследования на инфекцию, вызванную вирусом лейкоза крупного рогатого скота, проводили на базе лаборатории лейкозов Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск). Сравнительный анализ осуществлен на большом поголовье крупного рогатого скота из хозяйств с разной степенью распространения инфекции. Установлено, что практически всегда при помощи ИФА дополнительно выявляются животные, не установленные в РИД. Показаны преимущества ИФА перед РИД. Более высокие показатели чувствительности ИФА позволяют дополнительно к результатам РИД выявлять до 15,3 % вирусоносителей. При использовании ИФА возможно использовать в качестве материала для исследования как индивидуальные, так и сборные пробы молока и сыворотки крови. Процедура проведения анализа и учета результатов может быть автоматизирована. Время получения результатов при проведении иммуноферментного анализа занимает несколько часов в отличие от нескольких дней, необходимых при постановке РИД. Сделано заключение о том, что методика иммуноферментного анализа более затратна в сравнении с реакцией иммунодиффузной преципитации, однако благодаря преимуществам ИФА происходит сокращение кратности исследований и сроков оздоровления стада от лейкоза.

Ключевые слова: лейкоз крупного рогатого скота, диагностические исследования, реакция иммунодиффузной преципитации, иммуноферментный анализ.

Лейкоз – самая распространенная инфекционная болезнь крупного рогатого скота в Российской Федерации. Для эффективной борьбы с ним необходимо осваивать и использовать в практике современные методы диагностики, к которым относится иммуноферментный анализ (ИФА). Возможность применения ИФА при диагностике лейкоза крупного рогатого скота отражена в нормативных документах, однако на практике основу диагностических серологических исследований в настоящее время, как и