

ПОГОДАЕВА ПОЛИНА СЕРГЕЕВНА

**ФОРМИРОВАНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В ТКАНЯХ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА
АНТИГЕННУЮ СТИМУЛЯЦИЮ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ)**

**06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология
и морфология животных**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

Научный руководитель - Карпенко Лариса Юрьевна,
доктор биологических наук, профессор.

Официальные оппоненты: Зирук Ирина Владимировна,
доктор ветеринарных наук, доцент, профессор кафедры морфологии, патологии животных и биологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова»;

Дилекова Ольга Владимировна,
доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора С. Н. Никольского ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

Ведущая организация - ФГБОУ ВО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия».

Защита состоится «15» сентября 2022 года в 13.00 часов на заседании диссертационного Совета Д 220.059.05 на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д.5; тел/факс (812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «СПбГУВМ» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д.5, и на официальном сайте <https://spbguvm.ru>

Автореферат размещен на сайтах: ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ <https://minobrnauki.gov.ru> 01.07.2022 г. и ФГБОУ ВО СПбГУВМ <https://spbguvm.ru> 01.07.2022 г

Автореферат разослан: «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Кузнецова Татьяна Шамильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В 2021 году Госдума Российской Федерации приняла законопроект о контроле над применением антибиотиков в животноводстве, который предполагает введение жесткого контроля за назначением и применением антимикробных препаратов в рамках борьбы с антибиотикорезистентностью. Таким образом, разработка альтернативных методов лечения и профилактики инфекционных болезней является актуальной для ветеринарии и животноводства.

Молочное скотоводство в свою очередь, является одной из основных отраслей сельского хозяйства в России, однако, зачастую, серьезным препятствием для получения качественной молочной продукции становится высокий процент заболеваемости маститами среди продуктивных животных.

Согласно данным Боженова, С. Е. (2012), Галкина, А. В. (2017), Джавадова, Э. Д., (2021), Зирук, И. В., (2016), Климова, Н. Т. Слободяника В.И. (2014), Кононенко, К.Н. (2020), Костерина, Д.Ю. (2020), Макавчик, С.А., Смирновой, Л.И., Сухина, А.А., (2020) главную роль в этиологии маститов играет бактериальный фактор, а основными возбудителями являются бактерии группы стафилококков, стрептококков и кишечная палочка.

Как сообщают Белкин, Б. Л. (2021), Конопельцев, И. Г. (2010), Скопичев, В. Г. (2016, 2018) основным способом лечения маститов до настоящего времени является применение многокомпонентных антибиотических препаратов. Однако этот метод лечения имеет ряд существенных недостатков, таких как: нарастающая устойчивость возбудителей к данной группе препаратов и негативное влияние антибиотиков на качество получаемого молока.

Таким образом, основное внимание в вопросе борьбы с маститом должно быть направлено на защиту поголовья от его возбудителей. Весьма перспективными представляются методы, направленные на активацию эндогенных защитных механизмов животных. Одним из них является метод локальной антигенной стимуляции. К его достоинствам можно отнести достаточно продолжительный период защиты от заболевания, отсутствие негативного влияния на получаемую молочную продукцию и отсутствие приспособительных механизмов у возбудителей мастита (Евглевский, А. А. 2003, Скопичев, В. Г. 2009, 2018).

Дилекова, О. В. (2019, 2020), Карпенко, Л. Ю. (2011, 2013), Скопичев, В. Г. (2016), Слободяник, В. И. (2007) и Соловьева, Л. П. (2013, 2021) считают, что благоприятным фактором для проведения локальной антигенной стимуляции молочной железы является ее строение, а именно, наличие большого количества лимфоидной ткани, участвующей в синтезе факторов клеточного иммунитета.

Однако сам механизм формирования локального иммунного ответа молочной железы на данный момент изучен недостаточно подробно. Поэтому выявление и характеристика первичного звена, индуцирующего реакцию иммунной системы в ответ на воздействие термостабильных антигенов, раскрытие роли антигенпрезентирующих клеток макрофагальной природы в формировании

локального иммунного ответа молочной железы является, на наш взгляд, актуальным и имеет большое научное и практическое значение.

Степень разработанности проблемы. Одной из первых разработок в области иммунологической терапии мастита стала работа Спесивцева, Ю.А. (1995) представлявшая собой способ лечения и профилактики острых лактационных маститов с применением лейкоцитарных взвесей, полученных от доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином. Позднее Евглевский, А.А. (2003) предложил вводить стафилококковый анатоксин интерцистернально в пораженные доли вымени, после чего, проводя бактериологическое исследование секрета вымени и учитывая клинические признаки зафиксировал успешное терапевтическое действие данного метода. Скопичев, В.Г. (2009, 2018) в своих разработках предложил нанесение композиции, содержащей стафилококковый анатоксин на область молочного зеркала, что также оказывало терапевтический эффект. Однако, не смотря на доказанную эффективность данных методов лечения и профилактики мастита, сам механизм формирования локального иммунитета в молочной железе все ещё остается недостаточно изученным и требует проведения дальнейших исследований.

Цель и задачи исследования. Цель исследования - изучить механизмы формирования локального иммунитета в молочной железе.

Согласно выдвинутой рабочей гипотезе, первичным звеном локального иммунного ответа могут являться антигенпрезентирующие клетки макрофагальной природы, находящиеся в тканях молочной железы, подкожно-жировой клетчатке и эпидермисе.

Для реализации поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Обнаружить антигенпрезентирующие клетки макрофагальной природы в молочной железе путем цитологического и гистологического исследования.
2. Выявить роль антигенпрезентирующих клеток в формировании иммунитета путем их количественного анализа после воздействия термостабильными антигенами, а также на различных этапах лактации.
3. Выявить взаимосвязь локальной иммунизации и содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови.
4. Определить взаимосвязь между количеством антигенпрезентирующих клеток и содержанием иммуноглобулинов в сыворотке крови.

Научная новизна работы. В представленном исследовании впервые на опытной модели была доказана роль антигенпрезентирующих клеток в формировании локального иммунного ответа в молочной железе на локальную антигенную стимуляцию термостабильными антигенами. Впервые была выявлена корреляционная зависимость между количеством антигенпрезентирующих клеток макрофагальной природы и изменениями концентрации иммуноглобулинов различных классов в сыворотке крови подопытных животных.

Теоретическая и практическая значимость. Значимость выбранной темы определяется отсутствием теоретической проработанности методов локальной антигенной стимуляции молочной железы, а также потребностью в применении альтернативных методик профилактики маститов бактериальной этиологии у

сельскохозяйственных животных. Более глубокое понимание физиологических механизмов формирования локального иммунитета молочной железы позволит в дальнейшем применять на практике различные комбинации термостабильных антигенов или аутовакцины, а также предлагать более эффективные схемы их использования в рамках локальной антигенной стимуляции, для комплексной защиты животных от всех основных возбудителей мастита.

Методология и методы исследования. Методологической основой данной работы стали труды отечественных и зарубежных ученых в области иммунологической профилактики заболеваний бактериальной этиологии. Также учитывались последние данные бактериологических исследований, раскрывающих свойства основных возбудителей мастита. В ходе исследования применялись утвержденные методики для изготовления и окраски гистологических и цитологических препаратов; сертифицированная лабораторная техника и специализированные иллюстрированные пособия для изучения морфологии молочной железы. Для получения данных о содержании иммуноглобулинов в сыворотке крови применялись утвержденные методики иммунологического анализа в соответствии с инструкциями к сертифицированным наборам.

В процессе проведения исследований применялись клинические, патоморфологические, иммунологические, цитологические и гистологические методы, а также статистические методы исследования, включающие использование современного программного обеспечения (обработка полученного цифрового материала с использованием вариационной статистики и применением критерия погрешности по Стьюденту на компьютере с использованием лицензированного программного обеспечения, применяемого в биологических и ветеринарных исследованиях).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. наличие антигенпрезентирующих клеток макрофагальной природы в молочной железе;
2. изменение количества антигенпрезентирующих клеток после воздействия термостабильными антигенами, а также на различных этапах лактации;
3. влияние локальной антигенной стимуляции на содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови;
4. связь в изменении количества антигенпрезентирующих клеток с показателями иммуноглобулинов сыворотки крови.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Достоверность данных определяется достаточным объемом выборки анализируемых данных и их статистической обработкой. Полученные данные согласуются между собой и взаимно дополняют друг друга, выводы обоснованы и вытекают из результатов исследования. Результаты исследований доложены на следующих научных и научно-практических конференциях: 23-th Annual conference of the European society for domestic animal reproduction (Санкт-Петербург, 2019); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, 2020); 75-ой международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ

(Санкт-Петербург, 2021); Международной научно-практической конференции «Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК» (Санкт-Петербург, 2021); 2021 ASAS-CSAS-SSASAS Annual Meeting and Trade Show (2021).

Результаты исследования используются в учебном процессе кафедры физиологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»; кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия»; кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии «Казанской государственной академии ветеринарной медицины», кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», а также в клинической практике сети ветеринарных клиник «Нева-Барс» и диагностической работе ветеринарной лаборатории «Барс-Диагностикс».

Материалы диссертационной работы представлены на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в 2022 году, где получили диплом за третье место.

Личный вклад соискателя. Представленная диссертационная работа является результатом научных исследований автора в период с 2017 по 2022 годы. Личный вклад автора состоит в самостоятельной разработке концепции работы; подготовке опытной модели; получении патологоанатомического материала; проведении гистологических, микроскопических и иммунологических исследований; анализе и интерпретации полученных результатов. Некоторые исследования и публикации выполнены совместно с профессорско-преподавательским составом кафедры биохимии и физиологии, а также другими учёными, которые не возражают против использования в диссертационной работе материалов совместных исследований.

Публикации результатов исследований. Основные положения и выводы диссертационной работы изложены в 12 публикациях, 4 из которых изданы в рецензируемых журналах рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Международный вестник ветеринарии – 3, Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана - 1), в международных библиографических базах цитирования Scopus - 1, Web of science – 1, в региональной печати - 6.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 122 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, заключение, предложения для практики, перспективы дальнейшей разработки темы, список использованной литературы, приложения. Иллюстрационный материал диссертации включает 36 рисунков и 7 таблиц. Список использованной литературы включает 160 наименования, в том числе 48 иностранных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования проводились с 2017 года по 2022 год в Федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» на кафедре биохимии и физиологии, а также на базе ветеринарного центра «Ягуар» и ветеринарной лаборатории «Барс-диагностикс».

Для создания опытной модели использовали нелинейных мышей, приобретенных в ФГУП Питомник лабораторных животных «Рапполово» в возрасте от 3 до 5 месяцев и массой тела 17-25 г. Животные содержались в виварии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины» согласно «Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях», принятой в Страсбурге в 1987 году.

Перед исследованием все животные были подвергнуты профилактическому карантинированию и клиническому осмотру. Животных содержали в поликарбонатных клетках на подстиле из опилок деревьев хвойных пород. Для кормления использовали комбикорм полнорационный для лабораторных животных ЛБК-120 (Тосненский комбикормовый завод), соответствующий ГОСТ 34566-2019. Профильтрованная водопроводная вода давалась в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках.

Подготовка опытной модели и локальная антигенная стимуляция молочной железы - в рамках создания опытной модели от приобретенных особей было получено потомство, содержащееся в одинаковых условиях, согласно требованиям, к врачебно-биологическому эксперименту. По достижении половой зрелости мышей группировали для получения беременных самок. Из них в свою очередь были сформированы опытные и контрольные группы.

Целью первой серии опытов было провести локальную антигенную стимуляцию молочной железы лакирующих мышей стафилококковой вакциной и зафиксировать морфологические изменения молочной железы путем гистологического исследования и количественные изменения в составе антигенпрезентирующих клеток макрофагального ряда на разных этапах лактации, а также корреляцию количественного изменения макрофагальных клеток с количеством иммуноглобулинов в крови исследуемых особей.

В первой части эксперимента были сформированы опытная группа и группа контроля по 30 беременных самок в каждой. Самки опытной группы за 5-7 дней до родов были обработаны фабричной стафилококковой вакциной (производство АО «Биомед» им. И.И.Мечникова), введенной подкожно в область молочных желез в дозировке 0,2 мл. Для контрольной группы использовался стерильный изотонический раствор натрия хлорида.

Получение патологоанатомического материала – Отбор крови и патологоанатомического материала проводился в начале первой, второй и третьей недель лактации. Кровь отбирали согласно стандартной методике взятия крови из

малой подкожной вены голени у мышей (О. И. Степанова, 2006) в шприцы, омытые гепарином для консервации и предотвращения формирования сгустков.

Патологоанатомическое исследование проводилось на базе ветеринарного центра «Ягуар», в специально оборудованном помещении. Мышей усыпляли, согласно принципам биоэтики, в соответствии с «Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1987). После наступления смерти скальпелем рассекали кожу вдоль белой линии живота и с помощью пинцета и скальпеля отделяли пакеты молочных желез согласно «Морфологическим исследованиям в ветеринарных лабораториях» (2002).

Прикладывая извлеченные пакеты молочных желез к предметному стеклу изготовили мазки-отпечатки. Фрагменты молочных желез были помещены в стерильные пластиковые контейнеры с раствором 10% гистологически нейтрального забуференного формалина. Фиксация образцов длилась не менее 24 часов, после чего они поступали в дальнейшую обработку.

Определение количества иммуноглобулинов в сыворотке крови мышей - проводилось на базе ветеринарной лаборатории «Барс-диагностикс». Для получения плазмы кровь переливали в эпендорфы и центрифугировали образцы при 1000 оборотов в течение 30 минут. Сразу же отбирали плазму и проводили анализ. Для определения количества иммуноглобулинов в плазме использовали сертифицированные наборы тестов ELISA Kit for Immunoglobulin A, G, M, в основе которых лежит метод иммуноферментного анализа конкурентного ингибирования.

Цитологическое исследование мазков-отпечатков молочной железы - Окраска и исследование мазков-отпечатков проводилось на базе ветеринарной лаборатории «Барс-диагностикс», для получения предварительных результатов и оценки успешности эксперимента. Мазки-отпечатки после просушивания окрасили по Паппенгейму, используя готовые красители Майн-Грюнвальда и Романовского-Гимзе. Микроскопию мазков проводили на светооптическом микроскопе Миромед-2 вар. 3-20 inf. при увеличении x100 под иммерсией.

Гистологическое исследование препаратов молочной железы - Изготовление и исследование гистологических препаратов проводилось на базе ветеринарной лаборатории «Барс-диагностикс». Фрагменты молочных желез подвергали стандартной гистологической проводке (Мужикян, А.А., Макарова, М.Н., Гушин, Я.А., 2014), заливали в парафиновые блоки и нарезали на микротоме срезы толщиной 2-4 мкм. Далее срезы помещали на предметное стекло, депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ гистосрезов проводили при помощи светооптического микроскопа Миромед-2 вар. 3-20 inf. Микрофотографирование осуществляли при помощи видеоокуляра TourCam 5,1 Мпикс и соответствующего программного обеспечения.

Целью второй серии опытов было провести локальную антигенную стимуляцию молочной железы и изучить влияние различных термостабильных антигенов на формирование локального иммунного ответа молочной железы путем гистологического исследования.

Во второй части эксперимента было сформировано 3 опытных группы и

группа контроля, по 10 беременных мышей в каждой. За 5-7 дней до родов самок опытных групп обрабатывали фабричными вакцинами: стафилококковой вакциной (производство АО «Биомед» им. И.И.Мечникова, Россия), вакциной СТАРТВАК (STARTVAK) (производство Laboratorios Hipra, Spain) и вакциной ПРЕВЕНАР 13 (производство НПО Петровакс Фарм, Россия) аналогичным образом. Для контрольной группы использовался стерильный изотонический раствор натрия хлорида. Выбор данных вакцин обоснован их активностью в отношении основных возбудителей мастита. Отбор патологоанатомического материала проводился в начале второй недели лактации. Методики получения, изготовления и окраски гистологических препаратов аналогичны методикам, применяемым в первой серии опытов.

Полученные в опытах цифровые данные обрабатывались на компьютере с использованием пакета статистических программ Exel Statistica 6.0. Достоверность различий между сериями определяли с помощью *t*- критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Локальный иммунный ответ молочной железы на под влиянием стафилококковой вакцины

Цитологическое исследование мазков-отпечатков молочной железы

В поле зрения наблюдаются эритроциты, капли молочного жира, кокковая микрофлора и искомые клетки макрофагального ряда. Они представляют собой крупные клетки диаметром 15-80 мкм, неправильной формы, с крупными овальными ядрами, окрашенными в фиолетовый цвет. Иногда наблюдаются клетки, имеющие несколько ядер. Цитоплазма обильная, светлая, окрашена в синий и голубой цвета, без четких границ с большим количеством эндоплазматических включений: эндоцитозных микровезикул, вакуолей и лизосом, придающих клетке пенный вид.



Рисунок 1 и 2 – Клетки макрофагального ряда в мазках-отпечатках молочной-железы мышей, окраска по Паппенгейму, увеличение x1000 под иммерсией.

В связи с обнаружением искомых клеток в мазках-отпечатках, предварительные результаты эксперимента были признаны успешными, что позволило перейти к дальнейшему исследованию гистологических препаратов молочной железы.

Гистологическое исследование препаратов молочной железы

В гистосрезах молочной железы первой и второй недель лактации ткань состоит из долек, сформированных из скопления жировых клеток. Дольки отделены друг от друга прослойками рыхлой соединительной ткани, альвеолы заполнены секретом.

Стенка молочной альвеолы образована лактоцитами и звёздчатыми миоэпителиоцитами. Снаружи альвеолы выстланы базальной мембраной. В ходе лактации лактоциты приобретают низко-кубическую форму, ядра лактоцитов круглые. Лактоциты объединены друг с другом с помощью плотных контактов и десмосом. На апикальной поверхности лактоцитов присутствуют микроворсинки, а в цитоплазме накапливаются включения – сферические капельки молочного жира различных размеров, содержащие преимущественно триглицериды.

Между базальной мембраной и основанием лактоцитов находятся миоэпителиоциты (звёздчатые клетки), которые охватывают секреторные клетки своими пальцевидными выростами. Ядра миоэпителиоцитов тёмные палочковидные, в цитоплазме содержатся актиномиозиновые комплексы.

Клетки, образующие млечный альвеолярный ход, лежат в один слой, содержат меньшее количество цитоплазмы. Млечные альвеолярные ходы переходят в разветвлённые внутридольковые протоки, затем объединяясь в междольковые протоки, которые выстланы кубическим и призматическим эпителием (рисунок 3,4,5).

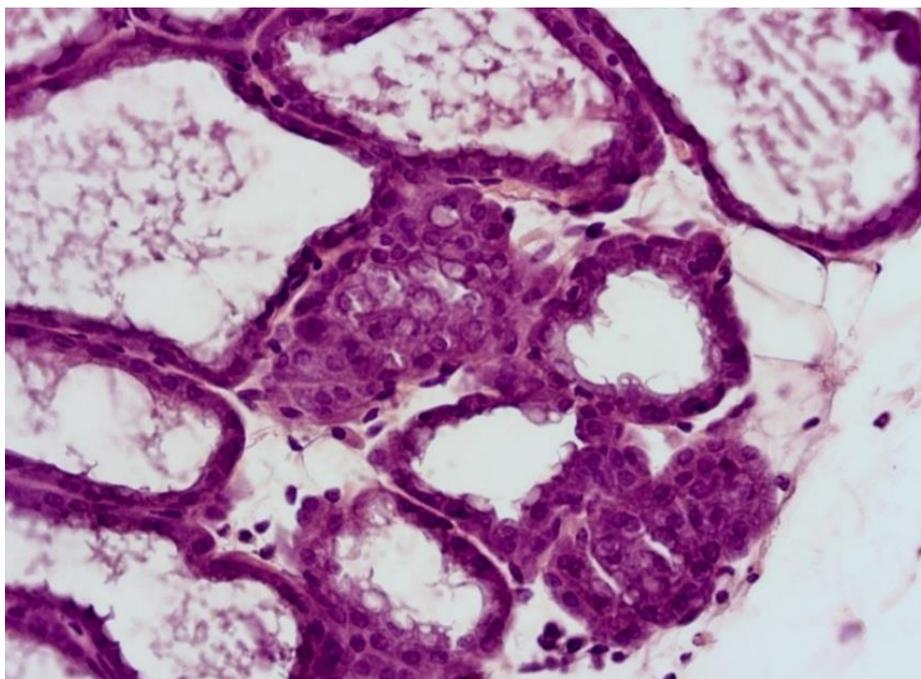


Рисунок 3 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы на первой неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400

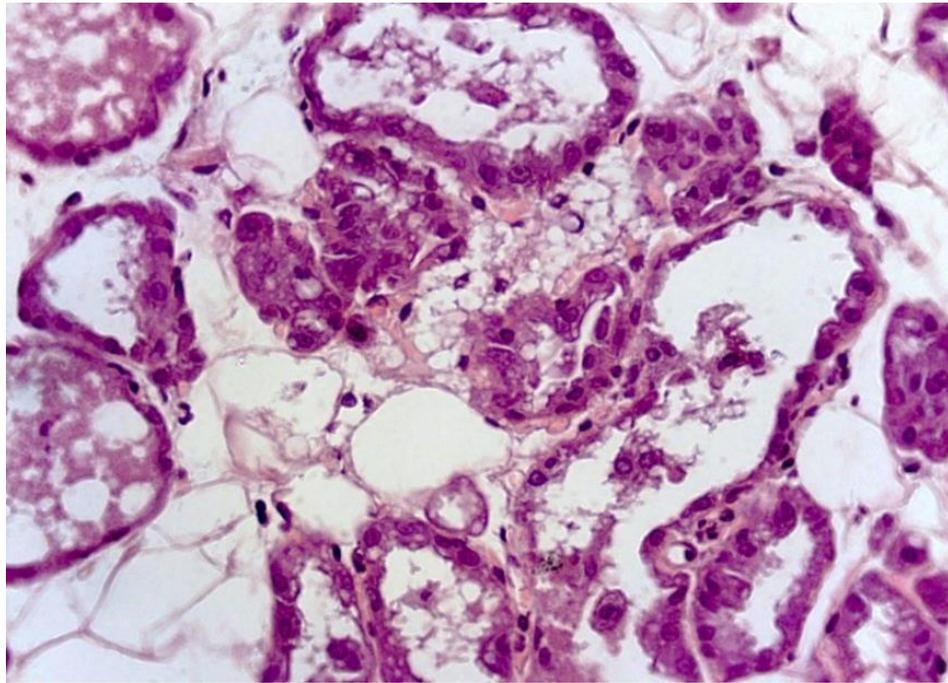


Рисунок 4 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

В препаратах третьей недели лактации кубический эпителий становится более плоским, увеличивается количество рыхлой соединительной ткани, уменьшается количество секрета. Начинается постепенное замещение секреторного эпителия жировой тканью, что связано с завершением процесса лактации и началом процессов инволюции молочной железы (рисунок 5).

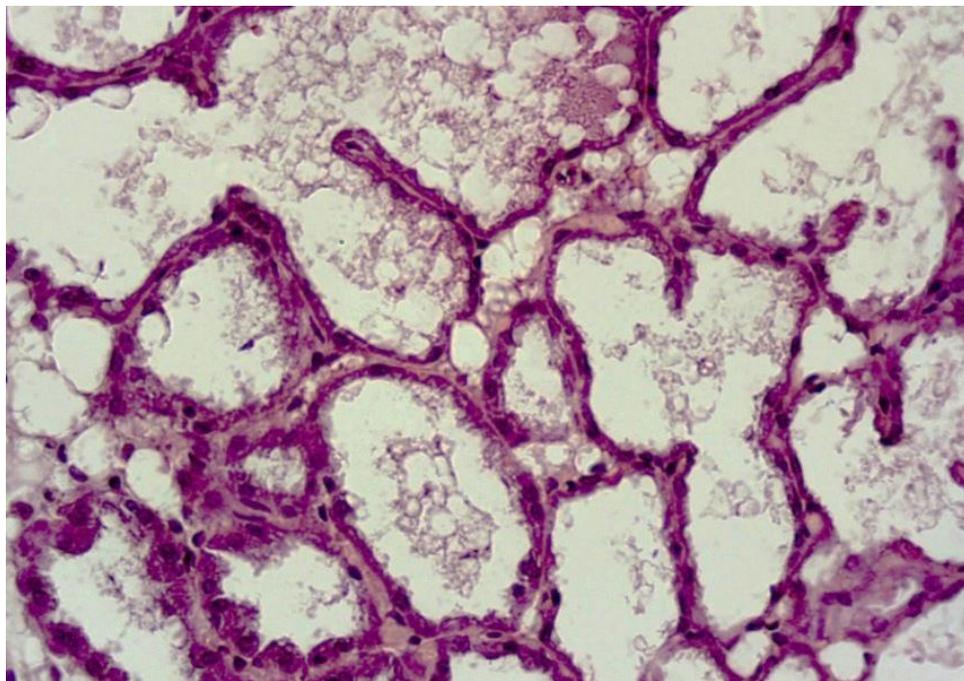


Рисунок 5 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы на третьей неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

В контрольных образцах общая гистологическая структура молочной железы сходна со структурой опытных образцов, однако визуальная дифференцировка клеток просматривается хуже, препараты имеют меньшую четкость, клеточные элементы зачастую трудно различимы.

У всех исследуемых образцов в некоторых полях зрения обнаруживаются искомые тканевые макрофаги. Они представляют собой крупные клетки диаметром 15-80 мкм, неравномерно распределенные в ткани, неправильной формы, зачастую имеющие множественные отростки. Ядра овальные или продолговатые, часто наблюдаются клетки, имеющие несколько ядер; хроматин неплотный, локализован под ядерной оболочкой. Цитоплазма обильная, без четких границ с большим количеством эндоплазматических включений: эндоцитозных микровезикул, вакуолей и лизосом, придающих клетке пенистый вид (рисунок 6).

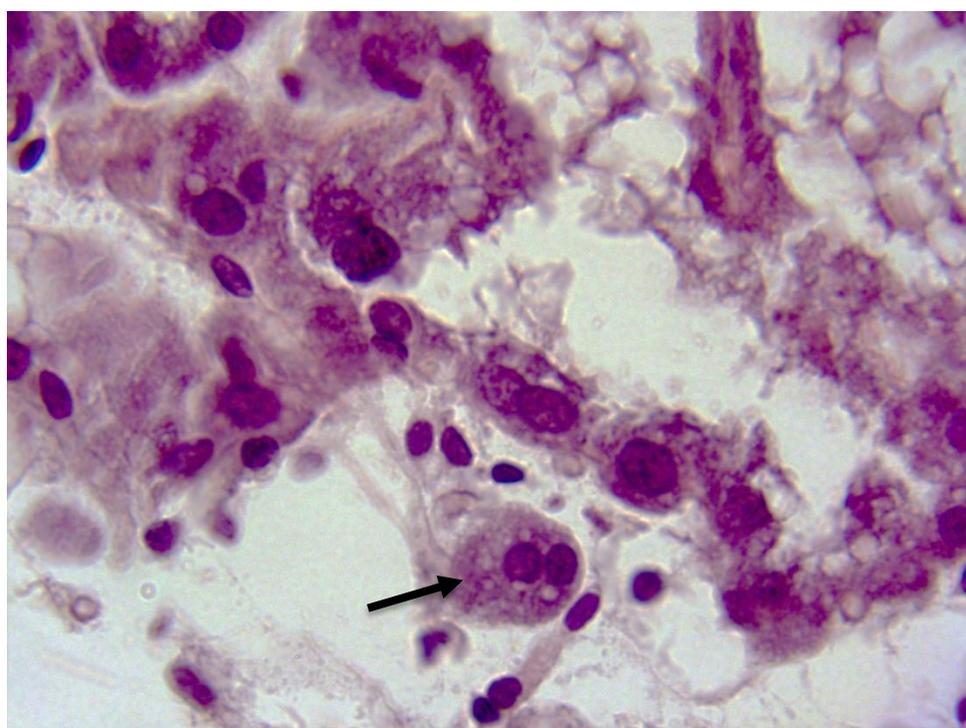


Рисунок 6 – Клетка макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы иммунизированной мыши на третьей неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000 под иммерсией.

В ходе микроскопии гистосрезов также был проведен подсчет клеток макрофагального ряда в каждом из полученных препаратов, подсчет выполнялся в ста полях зрения, в результате чего были получены следующие данные:

Таблица 1 - Среднее число клеток макрофагального ряда в ста полях зрения

	1 неделя лактации	2 неделя лактации	3 неделя лактации
Опытная группа (кол-во клеток в ста полях зрения)	69,6±5,07*	78,2±6,38*	50,8±5,74*
Контрольная группа (кол-во клеток в ста полях зрения)	38,3±6,51	47,3±5,52	23,3±4,67

* $P \leq 0,02$ по сравнению с группой контроля

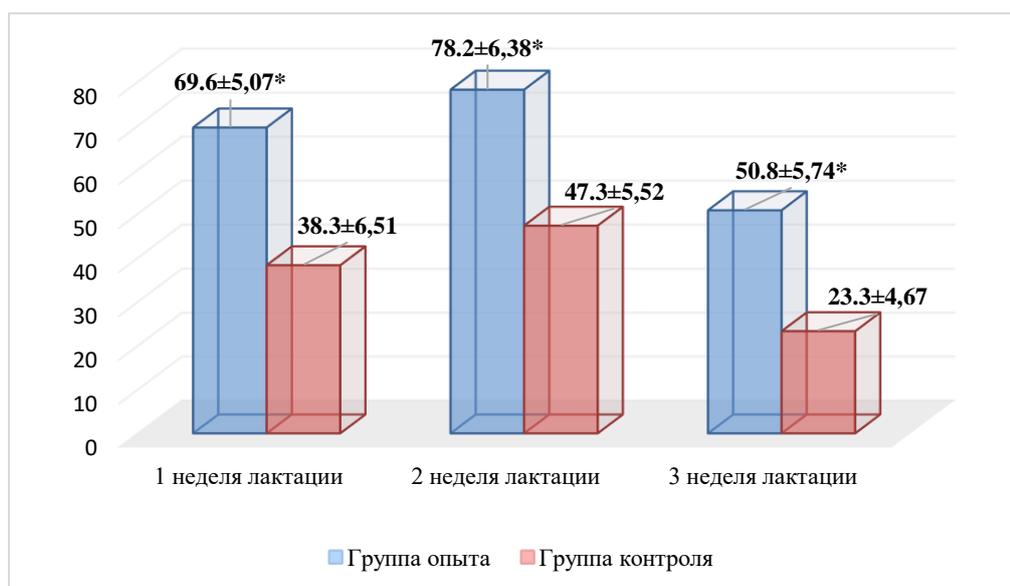


Рисунок 7 - Сравнение количественных показателей клеток макрофагального ряда

Наибольшее количество антигенпрезентирующих клеток наблюдается в молочной железе на второй неделе лактации, что справедливо для опытной и контрольной групп. Препараты, полученные на третьей неделе лактации, демонстрируют резкое снижение числа макрофагальных клеток, что связано с завершением лактации и постепенным угнетением иммунных процессов в молочной железе.

Полученные результаты показывают повышение эффективности миграции макрофагальных клеток в ткани молочной железы у животных, подвергнутых иммунизации стафилококковой вакциной, что подтверждается более высокими

числовыми значениями в опытной группе - в 1,7– 2,2 раза на всех сроках исследования.

Результаты иммунологического исследования сыворотки крови лактирующих мышей

Таблица 2 - Показатели иммуноглобулинов А, G, М в крови подопытных мышей (г/л)

Стадия лактации / исследуемые показатели	Ig A (г/л)	Ig G (г/л)	Ig M (г/л)
Группа контроля (NaCl 0,9%)			
1 неделя лактации	0,96±0,04	3,83±0,18	1,35±0,05
2 неделя лактации	1,01±0,03	4,16±0,35	1,13±0,07
3 неделя лактации	0,81±0,03	2,83±0,18	0,72±0,06
Группа опыта (стафилококковая вакцина)			
1 неделя лактации	1,12±0,05*	4,81±0,19*	1,55±0,08*
2 неделя лактации	1,22±0,06*	5,3±0,27*	1,39±0,08*
3 неделя лактации	0,9±0,03*	3,6±0,22*	0,98±0,09*

*P ≤ 0,05, по сравнению с группой контроля.

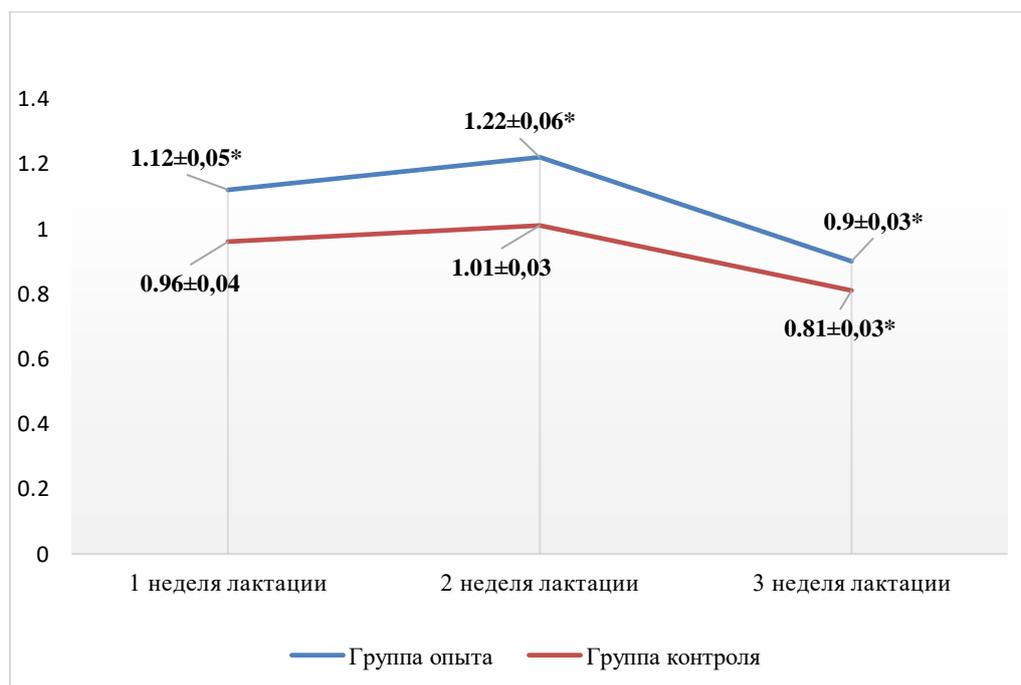


Рисунок 8 - Изменение концентрации Ig A (г/л)

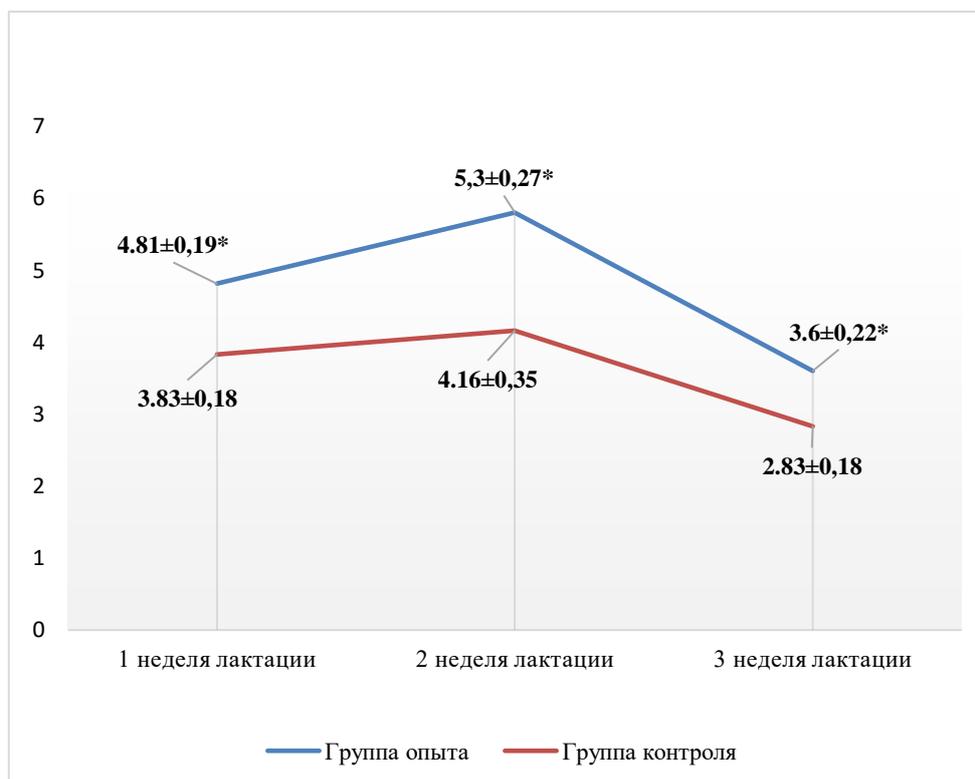


Рисунок 9 - Изменение концентрации Ig G (г/л)

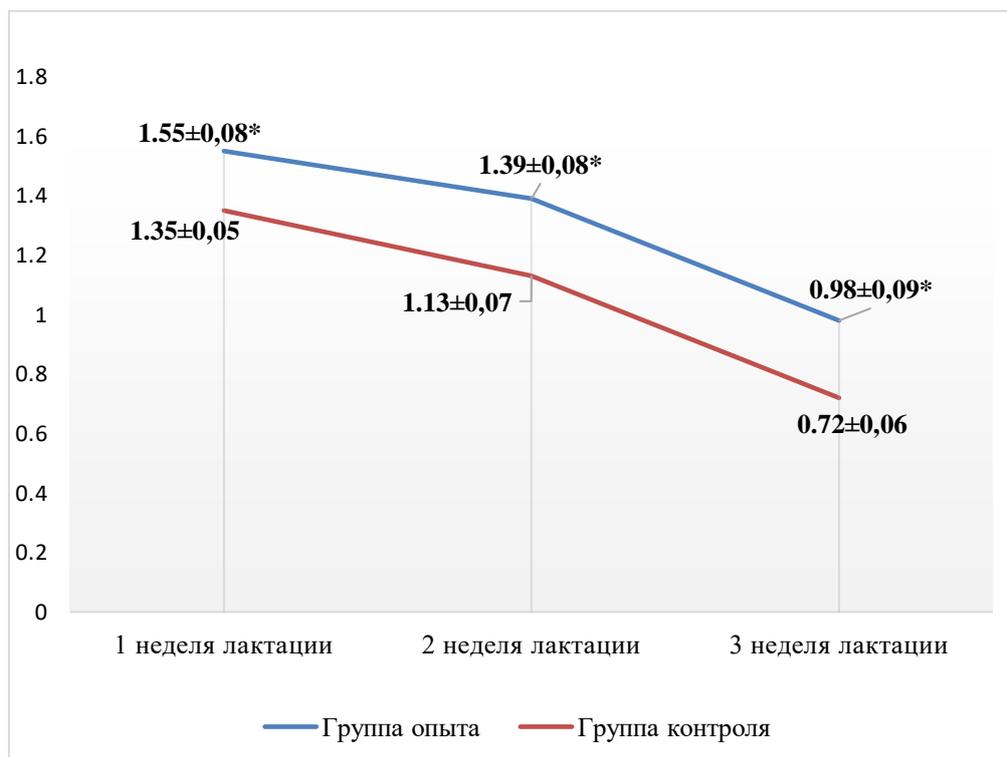


Рисунок 10 - Изменение концентрации Ig M (г/л)

Исходя из полученных данных, концентрация иммуноглобулинов класса А в крови животных обработанных стафилококковой вакциной выше в среднем на 15 %, класса G выше в среднем на 23 % и класса M выше в среднем на 24 % чем у

животных контрольной группы на всех этапах лактации, что свидетельствует о стимулирующем влиянии локального антигенного воздействия на гуморальные факторы иммунитета.

Корреляционная зависимость антигенпрезентирующих клеток макрофагального ряда и иммуноглобулинов в сыворотке крови

Таблица 3 – Коэффициенты корреляции антигенпрезентирующих клеток макрофагального ряда и иммуноглобулинов классов А, G и М в сыворотке крови (r)

Опытная группа (r)	1 неделя лактации	2 неделя лактации	3 неделя лактации
Макрофагальные клетки / Ig А	-0,43	-0,19	0,22
Макрофагальные клетки / Ig G	-0,14	-0,10	0,80
Макрофагальные клетки / Ig М	0,11	0,72	0,61
Контрольная группа (r)	1 неделя лактации	2 неделя лактации	3 неделя лактации
Макрофагальные клетки / Ig А	0,74	0,03	-0,35
Макрофагальные клетки / Ig G	0,62	-0,25	-0,01
Макрофагальные клетки / Ig М	0,57	0,74	0,22

Изначальное отсутствие значительной положительной корреляции в опытной группе и её нарастание к третьей неделе лактации объясняется тем, что в начале механизм гуморального иммунного ответа реализуется главным образом за счет пула В-лимфоцитов и плазматических клеток организма. Однако для дальнейшего поддержания напряженности специфического иммунного ответа, количество макрофагальных клеток способных продолжать презентацию антигена имеет решающее значение, что мы наблюдаем по высоким показателям корреляции на третьей неделе лактации, особенно для иммуноглобулинов G и М.

Для контрольной группы напротив, пик положительной корреляционной зависимости наблюдается на первой неделе лактации для всех классов иммуноглобулинов. Это обусловлено активным течением иммунных реакций, связанных с процессом беременности и начала лактации. В условиях отсутствия дополнительной антигенной стимуляции пик иммунологической активности тканей молочной железы должен приходиться на молозивный период и первые дни лактации. Далее к третьей неделе лактации иммунные процессы в молочной железе постепенно снижают свою активность, что отражено в снижении концентрации иммуноглобулинов, уменьшении количества макрофагальных клеток и переходе корреляционной зависимости из положительной в отрицательную.

Локальный иммунный ответ молочной железы под влиянием различных термостабильных антигенов

Гистологическое исследование препаратов молочной железы

В ходе микроскопии гистосрезов был проведен подсчет клеток макрофагального ряда в каждом из полученных препаратов, подсчет выполнялся в ста полях зрения, в результате чего были получены следующие данные:

Таблица 4 - Среднее число клеток макрофагального ряда в ста полях зрения

Стафилококковая вакцина (кол-во клеток в ста полях зрения)	70,1±0,69*
СТАРВАК (кол-во клеток в ста полях зрения)	79,7±0,67*
ПРЕВЕНАР 13 (кол-во клеток в ста полях зрения)	57,7±0,86*
Контроль (кол-во клеток в ста полях зрения)	40,6±0,84

* $P \leq 0,02$ по сравнению с группой контроля

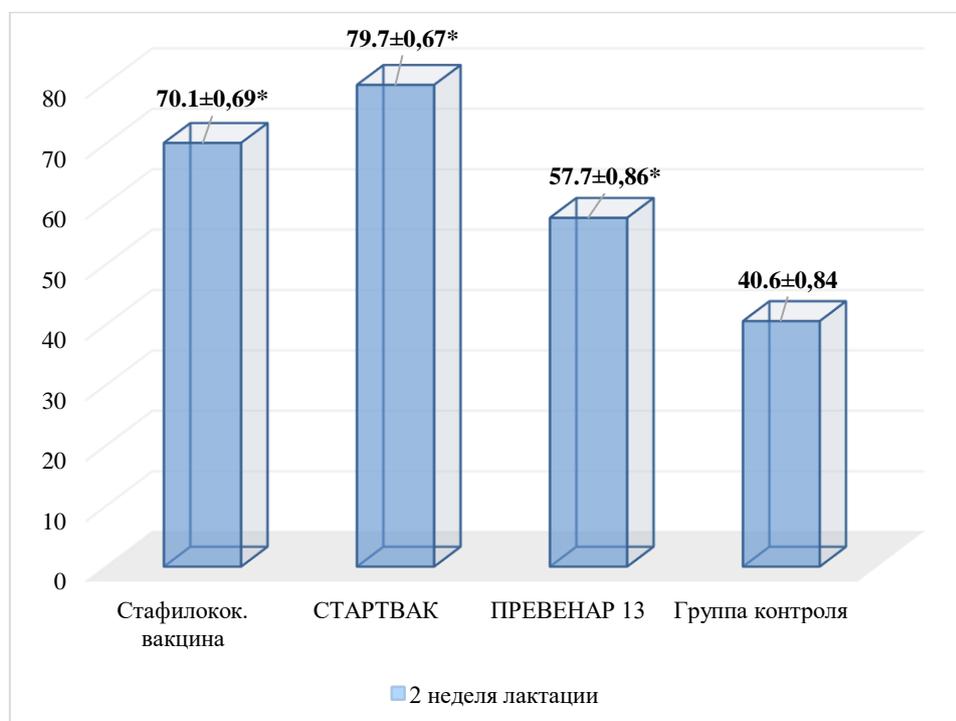


Рисунок 11 - Сравнение количественных показателей клеток макрофагального ряда

Количество макрофагов у иммунизированных мышей в опытных группах достоверно превышает количество макрофагов у мышей контрольной группы (стафилококковая вакцина на 75%, вакцина СТАРТВАК на 97,5% и Превенар 13 на 42,5%), что позволяет сделать вывод о иммунной активности макрофагальных клеток молочной железы и наличии стимулирующего влияния использованных вакцин. Наибольшее количество макрофагальных клеток наблюдается при иммунизации вакциной СТАРТВАК, что можно связать с наличием в данной вакцине антигенов двух различных возбудителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы нами был изучен механизм формирования локального иммунитета в молочной железе. Нам удалось подтвердить заявленную рабочую гипотезу, согласно которой первичным звеном локального иммунного ответа являются антигенпрезентирующие клетки макрофагальной природы, находящиеся в тканях молочной железы. Антигенпрезентирующая роль данных клеток была доказана значительным повышением их количества в результате антигенной стимуляции молочной железы, а также положительной корреляцией их количества с количеством основных классов иммуноглобулинов в крови иммунизированных животных.

Также в ходе исследования была доказана возможность иммунологического взаимодействия молочной железы с различными термостабильными антигенами на примере трех различных по своему антигенному составу вакцин, что открывает широкие перспективы для применения методики локальной антигенной стимуляции как для защиты от возбудителей мастита, так и для формирования пассивного иммунитета молодняка.

ВЫВОДЫ

1. Клетки макрофагальной природы представлены в тканях молочной железы.
2. Наибольшее число клеток макрофагальной природы наблюдается в молочной железе мышей на второй неделе лактации, что справедливо как для опытной, так и для контрольных групп. При этом данные показатели незначительно превышали число клеток макрофагального ряда, обнаруженное в препаратах первой недели лактации. В свою очередь, препараты, полученные на третьей неделе лактации, демонстрировали резкое снижение числа макрофагальных клеток, что было связано с завершением лактации и постепенным угнетением иммунных процессов в молочной железе. Наблюдается повышение эффективности миграции макрофагальных клеток в ткани молочной железы у животных, подвергнутых иммунизации стафилококковой вакциной, что подтверждается более высокими числовыми значениями в опытной группе - в 1,7– 2,2 раза на всех сроках исследования.
3. Наибольшее количество макрофагальных клеток наблюдалось при

иммунизации вакциной СТАРТВАК. Средние показатели продемонстрировала стафилококковая вакцина, наименьшие показатели из опытных групп продемонстрировала вакцина Превенар 13. Все показатели опытных групп достоверно превышают показатели контрольной группы: стафилококковая вакцина на 75%, вакцина СТАРТВАК на 97,5% и Превенар 13 на 42,5%, что позволяет сделать вывод о иммунной активности макрофагальных клеток молочной железы и наличии стимулирующего влияния всех использованных вакцин.

4. Содержание иммуноглобулинов классов А, G и М в крови иммунизированных мышей также было выше, чем содержание соответствующих иммуноглобулинов у животных контрольной группы на всех этапах лактации. Концентрация иммуноглобулинов класса А в крови животных обработанных стафилококковой вакциной выше в среднем на 15 %, класса G выше в среднем на 23 % и класса М выше в среднем на 24 % чем у животных контрольной группы на всех этапах лактации, что свидетельствует о стимулирующем влиянии локального антигенного воздействия на гуморальные факторы иммунитета.
5. Установлена положительная корреляция количества антигенпрезентирующих клеток с показателями иммуноглобулинов в сыворотке крови для третьей недели лактации в опытной группе, что свидетельствует о значимости количества макрофагальных клеток способных продолжать презентацию антигена для поддержания напряженности иммунного ответа, индуцированного локальной антигенной стимуляцией.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Полученные в результате исследований данные об иммунологическом потенциале молочной железы мы рекомендуем использовать:

- 1) в клинической практике для лечения маститов бактериальной этиологии;
- 2) в рамках эпизоотологических мероприятий для профилактики маститов бактериальной этиологии;
- 3) в рамках эпизоотологических мероприятий для профилактики инфекционных диспепсий новорожденных;
- 4) при проведении научно-исследовательских работ по изучению иммунобиологических и морфологических свойств молочной железы;
- 5) в учебном процессе при чтении лекций, практических занятий; написании учебников, монографий, методических пособий и указаний, а также справочных руководств по иммунобиологии и морфологии молочной железы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дальнейшие исследования по данной тематике должны быть направлены на разработку более эффективных схем локальной антигенной стимуляции молочной железы; создание многокомпонентных стандартизированных антимаститных вакцин и исследование возможности применения аутовакцин для локальной антигенной стимуляции.

Также, перспективным направлением является изучение возможности формирования колострального иммунитета, достигаемого путем локальной антигенной стимуляции молочных желез лакирующих самок различными термостабильными антигенами, соответствующими возбудителям инфекционных болезней молодняка.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в журналах, внесенных в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации:

1. Погодаева, П. С. Некоторые аспекты локального иммунного ответа в тканях молочной железы / П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко, В. С. Понамарев // Международный вестник ветеринарии. – 2020. – № 4. – С. 129-133. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2020.4.129. – EDN SDGXWT.
2. Погодаева, П. С. Влияние локальной антигенной стимуляции молочной железы на показатели иммуноглобулинов в крови мышей/ П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко, В. С. Понамарев // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 2. – С. 126-130. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.2.126. – EDN MYGGHY.
3. Погодаева, П. С. Влияние различных термостабильных антигенов на формирование локального иммунитета молочной железы / П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко, В. С. Понамарев // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 1. – С. 247-251. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.1.247. – EDN FGTTEY.
4. Погодаева, П. С. Физиологические механизмы локального иммунного ответа молочной железы / П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко, О. А. Душенина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2022. – Т. 249. – № 1. – С. 156-160. – DOI 10.31588/2413_4201_1883_1_249_156. – EDN RPAEVV.

Статьи, опубликованные в журналах, включенных в международные базы цитирования Scopus и Web of Science:

1. Cells of immune memory in mice in the colostrums / P. Pogodaeva, N. Panova, V. Skopichev [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2019. – Vol. 54. – No S3. – P. 103. – EDN RVJCFU.
2. PSXVI-13 Study of migration of antigen-presenting cells in the tissue of the lactating mammary gland under the influence of staphylococcal vaccine / P. Pogodaeva, L. Y. Karpenko, S. V. Vasileva [et al.] // *Journal of Animal Science*. – 2021. – Vol. 99. – No S3. – P. 329-330. – DOI 10.1093/jas/skab235.606. – EDN PXRHFO.

Статьи, опубликованные в сборниках научных трудов и материалах конференций:

1. Погодаева, П. С. Особенности формирования локального иммунного ответа молочной железы / П. С. Погодаева, В. С. Понамарев // *Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны: Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Санкт-Петербург, 19–20 ноября 2020 года*. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2020. – С. 285-286. – EDN ZZXTGQ.

2. Погодаева, П. С. Сравнительное влияние различных термостабильных антигенов на антигенпрезентирующие клетки молочной железы / П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко // *Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию кафедры фармакологии и токсикологии СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 19–21 мая 2021 года*. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 195-197. – EDN XWTTQE.

3. Погодаева, П. С. Влияние стафилококковой вакцины на антигенпрезентирующие клетки молочной железы / П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко // *Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию кафедры фармакологии и токсикологии СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 19–21 мая 2021 года*. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 194-195. – EDN CAWBPS.

4. Погодаева, П. С. Особенности влияния термостабильных антигенов в контексте становления топического иммунитета / П. С. Погодаева, О. А. Душенина // *Материалы 75-й юбилейной международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, посвященной, объявленному в 2021 году президентом РФ Путиным В.В., году науки и технологий, Санкт-Петербург, 05–09 апреля 2021 года*. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 176-177. – EDN DKVWAJ.

5. Погодаева, П. С. Воздействие локальной антигенной стимуляции

молочной железы на гуморальные факторы иммунитета / П. С. Погодаева // Материалы национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 24–28 января 2022 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2022. – С. 55-57. – EDN ABMFUN.

6. Погодаева, П. С. Действие различных термостабильных антигенов на иммунокомпетентные клетки молочной железы / П. С. Погодаева // Материалы 76-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 04–11 апреля 2022 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2022. – С. 190-191.