

mezhs"ezdovskoj konferencii parazitocenologov Ukrainy. – Har'kov ; Lugansk, 1997. – S. 83–84. 5. Kopeckij, V. F. O metodologicheskikh osnovaniyah parazitocenologii / V. F. Kopeckij // Problemy i perspektivy parazitocenologii : materialy V mezhs"ezdovskoj konferencii parazitocenologov Ukrainy. – Har'kov ; Lugansk, 1997. – S. 88–89. 6. Morfofunkcional'nye izmeneniya u nutrij pri asociacii kokcidioz i sal'monellez : rekomendacii / A. A. Mironova [i dr.]. – Novoherkassk, 2007. – 11 s. 7. Prudnikov, V. S. Patomorfologicheskaya diagnostika boleznej zhivotnyh pri asociativnom techenii / V. S. Prudnikov, I. N. Gromov, A. V. Prudnikov // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya «Vitebskaya ordena «Znak Pocheta» gosudarstvennaya akademiya veterinarnoj mediciny» : nauchno-prakticheskij zhurnal. – 2011. – T. 47, vyp. 1. – S. 114–117. 8. Izuchenie morfologicheskoy struktury vnutrennih organov embrionov krysa pri primenenii preparata Kap-1 / E. V. Mihajlov [i dr.] // Veterinarnyj farmakologicheskij vestnik. – 2019. – № 3 (8). – S. 26–32. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2019.3.26. 9. Krasnikov G. A. Patogistologiya organov immuniteta u kur pri dejstvii immunosuppressivnyh virusov / G. A. Krasnikov // Veterinarna medicina : mizhvidom. temat. nauk. zb. – Harkiv, 2000. – № 78, t. 1. – S. 173–180.

Поступила в редакцию 11.01.2022.

DOI 10.52368/2078-0109-58-1-39-42

УДК 616-018:616.34-002:636.4

ВЛИЯНИЕ ГМ-КСФ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТИМУСА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ПОРОСЯТ

Михайлов Е.В. ORCID ID 0000-0001-5457-1325, Степанов Д.С. ORCID ID 0000-0002-5887-8284, Шабунин Б.В. ORCID ID 0000-0002-2234-3851, Некрасов А.В. ORCID ID 0000-0002-5957-1583, Воротникова С.М. ORCID ID 0000-0001-82444-0605

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

Было проведено исследование влияния гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на функциональное состояние тимуса при терапии желудочно-кишечных заболеваний у поросят. Опыт был проведен в крупном свиноводческом хозяйстве Воронежской области. Для опыта было подобрано 3 группы по 20 больных поросят в возрасте 5-7 дней, у которых регистрировали желудочно-кишечные заболевания бактериальной этиологии. Группа 1 являлась контрольной и не получала лечения, группе 2 применялся препарат «Квинокол», а группе 3 – квинокол в сочетании с ГМ-КСФ. Гистологические и иммуногистохимические исследования проводились по общепринятым методикам. В результате было показано достоверное ($p < 0,01$) снижение CD-3 положительных клеток в поле зрения на 12% в группе 3, что является следствием миграции клеток из тимуса в периферические органы. Достоверных различий в количестве PAX-5 клеток выявлено не было. **Ключевые слова:** тимус, поросята, ГМ-КСФ, неонатальная диарея, кластер дифференцировки.

EFFECT OF GM-CSF ON THE FUNCTIONAL STATE OF THYMUS IN THE TREATMENT OF GASTROINTESTINAL DISEASES IN PIGLETS

Mikhailov E.V., Stepanov D.S., Shabunin B.V., Nekrasov A.V., Vorotnikova S.M.
FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy",
Voronezh, Russian Federation

The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on the functional state of the thymus in the treatment of gastrointestinal diseases in piglets was studied. The experiment was carried out on a large pig breeding farm in the Voronezh region. For the experiment, 3 groups of 20 sick piglets at the age of 5-7 days were formed in which gastrointestinal diseases of bacterial etiology were registered. The group 5 was the control, and the piglets of it did not receive treatment, the piglets of group 2 received the drug Quinocol, and the piglets of group 3 – Quinocol in combination with GM-CSF. Histological and immunohistochemical studies were carried out according to commonly accepted methods. As a result, a significant ($p < 0.01$) decrease in CD-3 positive cells in the field of view by 12% in group 3 was shown, which was a consequence of cell migration from the thymus to peripheral organs. There were no significant differences in the number of PAX-5 cells. **Keywords:** thymus, piglets, GM-CSF, neonatal diarrhea, cluster of differentiation.

Введение. Диарея у новорожденных поросят является достаточно распространенной проблемой животноводства в Российской Федерации. Этому способствуют такие факторы, как: большая скученность животных на фермах, неблагоприятная эпизоотологическая ситуация в регионе или же резкий переход с одного рациона на другой. Из-за этого распространенность неонатальной диареи составляет до 90% среди молодняка до двух месяцев [1].

Среди этиологических факторов, которые приводят к развитию неонатальной диареи, наиболее часто выделяют вирусную (ротавирусная инфекция, коронавирусный энтерит), бактериальную (смещение баланса нормальной микрофлоры в кишечнике в сторону условно-патогенных бактерий), гельминтную, протозойную (амебы, кокцидии), грибковую (кандидомикоз, микотоксикозы). Также достаточно часто встречается диарея незаразной этиологии, вызванная отклонениями от норм кормления и содержания.

У новорожденных поросят высокий риск развития заболеваний желудочно-кишечного тракта: иммунная функция пищеварительного тракта еще не активна, заканчивает формироваться, или «созревать». В сыворотке крови при вскармливании молозива иммуноглобулины почти отсутствуют. Защита от неблагоприятных факторов окружающей среды, патогенов в первые дни жизни обеспечивается за счет иммуноглобулинов (антител), поступающих с молозивом (колостральный иммунитет). Колостральный иммунитет продолжается 35 дней [2]. Затем формируется барьерная функция слизистой оболочки и ферментативная система, снижается концентрация иммуноглобулинов в результате разрушения колостральных иммуноглобулинов и низкого уровня синтеза собственных иммуноглобулинов, особенно у поросят-гипотрофиков.

При диарее нарушаются всасывающие функции кишечника, из-за чего в кровь поступает значительно меньше питательных веществ, чем должно. Из-за этого поросята не могут набрать вес, и у них развивается гипотрофия. Гипотрофия оказывает отрицательное влияние на органы иммунной системы. Это происходит, в первую очередь, из-за того, что органы иммунитета не получают в достаточном количестве питательные вещества. В наших предыдущих исследованиях было показано, что у поросят-гипотрофиков в селезенке наблюдалась гипоплазия лимфоидных клеток как в белой пульпе, так и в периартериальной зоне, что указывает на иммунодефицит Т-звена. Были также заметны яркие изменения в паренхиме органа, характеризовавшиеся резким снижением объемной доли белой пульпы [3]. Проведенные исследования показали, что в лимфатическом узле у поросят-гипотрофиков наблюдалась гипоплазия и мономорфность лимфоидной ткани в корковом слое [4].

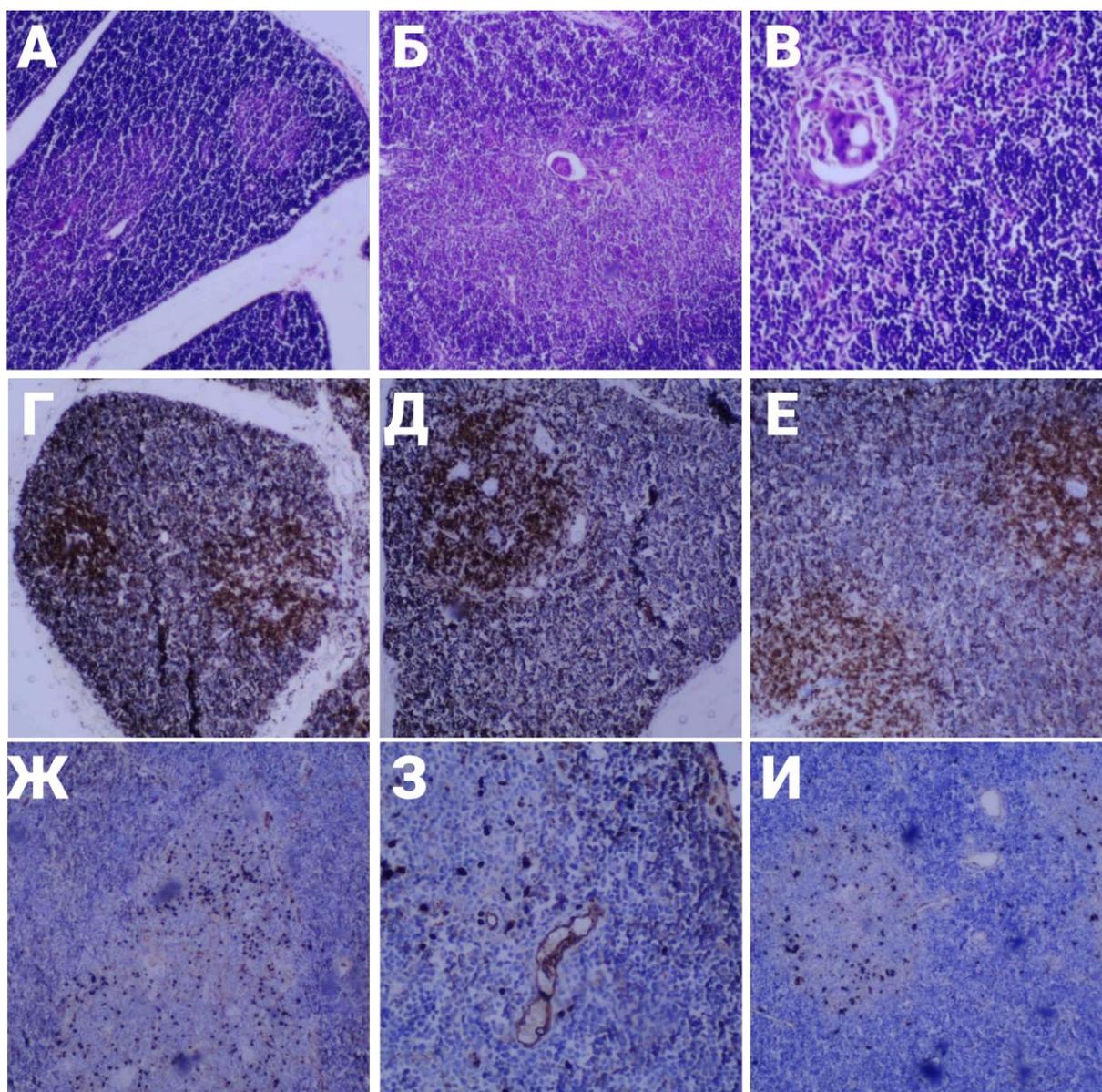
Поэтому при лечении диареи у поросят стоит обращать внимание не только на этиотропную терапию, но также и принимать меры по поддержанию естественного иммунитета. В данном исследовании будет рассмотрено влияние гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ КСФ) на гистологическую структуру вилочковой железы поросят. ГМ КСФ является регуляторным цитокином, который стимулирует пролиферацию иммунных клеток в костном мозге. В нашем исследовании будет изучена возможность применения данного цитокина в качестве иммуномодулятора.

Целью данного исследования являлось изучение влияния гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора на функциональное состояние тимуса во время лечения желудочно-кишечных заболеваний бактериальной этиологии у поросят.

Материалы и методы исследований. Для опыта было подобрано 3 группы по 40 больных поросят в возрасте 5-7 дней, у которых регистрировали диарею смешанной этиологии. Первая группа являлась контрольной. Животным 2 группы применяли внутримышечно квинокол в дозе 0,5 мл/10 кг раз в сутки в течение 5 дней. Третьей – квинокол в той же дозе в сочетании с ГМ-КСФ в дозе 0,1 мл/кг двукратно с интервалом 48 часов. От вынужденно убитых поросят (убой проводили в соответствии с Directive 93/119/E C) с диарейным синдромом (n=4) и от животных опытных групп (n=4) после лечения отбирали образцы тимуса для проведения морфологических и иммуногистохимических исследований. Материал фиксировался в 10% растворе забуференного формалина, затем обезжиривался в спиртах возрастающей крепости, после чего заливался в гистологический парафин Histomix (Biovitrum, Россия) [5]. Из парафиновых блоков изготавливались срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивались гематоксилином-эозином, а также проводили иммуногистохимическое исследование на маркеры CD-3 (маркер Т-лимфоцитов), PAX-5 (маркер регуляции В-лимфоцитов). Иммуногистохимическое исследование проводилось на автоматическом иммуностейнере. Для визуализации каждой иммуногистохимической реакции был использован набор «DakoEnVision+ System Peroxidase (DAB)» (Германия). Иммуногистохимическую окраску проводили по инструкции в протоколе. Для каждой реакции проводился отрицательный контроль – вместо первичных антител на срезы наносили буфер. После проведения иммуногистохимической реакции ядра докрасивали гематоксилином Вейгерта. Препараты монтировали под полистирол, фотографии были сделаны на микроскопе «Microscreen» (HospitexDiagnostics, Италия) со встроенной камерой. Для подсчета клеток была использована программа «ToopView» и морфометрический стандарт. Для анализа данных использовали MSOffice «Excel 2013» с пакетом для анализа данных.

Результаты исследований. Тимус у всех животных имел хорошо выраженное дольчатое строение (рисунок, А – В), строма органа была представлена зрелой жировой тканью с запустевшими сосудами. Дольки были разных размеров, преобладали крупные. Граница коркового и мозгового слоя были с трудом различимы, видны лишь в крупных, неправильной формы дольках, расположенных в центре препарата. Тельца Гассалья были мелкие, единичные, концентрического вида, располагались в центре тимических долек.

Антитело к CD3, являющееся пан-Т-Лейкоцитарным маркером, дало сильную экспрессию в клетках тимуса (рисунок, Г - Е), большая часть из которых тесно располагалась в центре мозгового слоя, в то время как плотность CD3 позитивных клеток в корковом слое была заметно ниже. Ген PAX5 кодирует белок – активатор, специфичный для линии В-клеток (BSAP), который экспрессируется на ранних стадиях дифференцировки В-клеток, на поздних же стадиях его экспрессия снижается. В тимусе экспрессия PAX-5 почти не наблюдалась, что также видно из рисунка, Ж - И.



А, Г, Ж – строение тимуса поросят группы 1; Б, Д, З - строение тимуса поросят группы 2;
 В, Е, И - строение тимуса поросят группы 3; А, Б, В – окраска гематоксилин-эозин;
 Г, Д, Е – иммуногистохимия маркер CD-3; Ж, З, И - иммуногистохимия маркер PAX-5;
 А, Б, Г – увеличение 100х; В, Д, Е, Ж, З, И – увеличение 400х

Рисунок – Гистологическое строение тимуса подопытных поросят

При проведении подсчетов учитывалось количество положительно окрашенных иммунокомпетентных клеток в поле зрения 400х. Результаты расчетов представлены в таблице. Видно, что различий в количестве PAX-5 клеток отмечено не было. В то же время при подсчете количества CD-3 положительных клеток было видно, что в группе 3 их количество в поле зрения достоверно снижалось на 12% по сравнению с группой 1 и на 11% по сравнению с группой 2.

Таблица - Результаты количественного подсчета иммунокомпетентных положительно окрашенных клеток в поле зрения 400х

Показатели	Группа 1, контроль	Группа 2, квинокол	Группа 3, квинокол + ГМ-КСФ
CD-3	211,2 ± 4,56**	208,5 ± 3,81**	187,2 ± 2,78
PAX-5	2,81 ± 0,29	2,75 ± 0,16	3,02 ± 0,54

Примечание. ** - $p < 0,01$ по сравнению с группой 3.

Полученные результаты указывают на то, что при применении ГМ-КСФ количество CD-3 положительных лимфоцитов в тимусе достоверно снижается. Shatskikh O.A. и соавторы указывают, что

уменьшение количества CD-3 положительных клеток в тимусе может указывать на их усиленную миграцию в кровотоки или ткани [6, 7].

РАХ-5-положительные клетки в тимусе практически не визуализировались. Это является следствием того, что основная функция тимуса – дифференцировка Т-клеток, а данный белок экспрессируется только в созревающих В-лимфоцитах.

Заключение. Проведенные исследования указывают на то, что воздействие ГМ-КСФ приводило к активации иммунного ответа. Это было видно из снижения количества Т-лимфоцитов в поле зрения в опытной группе на 12%. Данное снижение является следствием миграции Т-лимфоцитов из тимуса в кровяное русло и ткани. Полученные данные показывают, что ГМ-КСФ можно применять в ветеринарной практике как иммуномодулирующий препарат при лечении желудочно-кишечных заболеваний поросят.

Conclusion. The studies carried out indicate that exposure to GM-CSF led to the activation of the immune response. This was evident from the decrease in the number of T-lymphocytes by 12%, in the field of view in the experimental group. This decrease is a consequence of the migration of T-lymphocytes from the thymus into the bloodstream and tissues. The findings show, that GM-CSF can be used in veterinary practice as an immunomodulatory drug in the treatment of gastrointestinal diseases in piglets.

Список литературы. 1. *Histomorphometric indicators of small intestine in piglets with neonatal diarrhea* / П. А. Паршин [и др.] // *Ветеринарный фармакологический вестник*. – 2000. – №2 (11). – С. 214–223. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.2.214 2. Бочкарева, В. В. *Современные подходы к специфической профилактике и лечению неонатальной диареи поросят* / В. В. Бочкарева // *Ветеринария*. – 2018. – № 2. – С. 14–17. 3. *Архитектоника селезенки новорожденных поросят-гипотрофиков* / Е. В. Михайлов [и др.] // *Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. – 2020. – Т. 56, вып. 4. – С. 45–49. 4. *Морфо-функциональное состояние лимфатических узлов поросят-гипотрофиков* / Е. В. Михайлов [и др.] // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. – 2020. – № 3. – С. 214–217. DOI 10.17238/issn2072-6023.2020.3.214. 5. *Методы морфологических исследований: методическое пособие* / С. М. Сулейманов [и др.]. – 2-е изд., испр. и доп. – Воронеж, 2007. – 87 с. 6. *Распределение нейрональных и глиальных антигенов в колонках соматосенсорной коры мозга крысы (иммуногистохимическое исследование)* / Е. Ю. Кириченко [и др.] // *Морфология*. – 2014. – № 145 (2). – С. 7–11. 7. *Шатских, О. А. Реакция cd1a-и cd3-позитивных клеток тимуса при введении мелатонина в различных световых условиях* / О. А. Шатских, Е. М. Лузикова, В. Е. Сергеева // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 5. – С. 40

References. *Histomorphometric indicators of small intestine in piglets with neonatal diarrhea* / P. A. Parshin [i dr.] // *Veterinary farmakologicheskij vestnik*. – 2000. – №2 (11). – S. 214–223. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.2.214 2. *Bochkareva, V. V. Sovremennye podhody k specificheskoy profilaktike i lecheniyu neonatal'noj diarei porosyat* / V. V. Bochkareva // *Veterinariya*. – 2018. – № 2. – S. 14–17. 3. *Arhi-tektonika selezenki novorozhdennyh porosyat-gipotrofikov* / E. V. Mihajlov [i dr.] // *Uchenye zapiski uchre-zhdeniya obrazovaniya «Vitebskaya ordena «Znak Pocheta» gosudarstvennaya akademiya veterinarnoj mediciny»*. – 2020. – T. 56, vyp. 4. – S. 45–49. 4. *Morfo-funkcional'noe sostoyanie limfaticheskikh uzlov porosyat-gipotrofikov* / E. V. Mihajlov [i dr.] // *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii*. – 2020. – № 3. – S. 214–217. DOI 10.17238/issn2072-6023.2020.3.214. 5. *Metody morfologicheskikh issledovaniy: meto-dicheskoe posobie* / S. M. Sulejmanov [i dr.]. – 2-e izd., ispr. i dop. – Voronezh, 2007. – 87 s. 6. *Raspredelenie nejronal'nyh i glial'nyh antigenov v kolonkah somatosensornoj kory mozga krysy (immunogistohimicheskoe issledovanie)* / E. YU. Kirichenko [i dr.] // *Morfologiya*. – 2014. – № 145 (2). – S. 7–11. 7. *SHatskih, O. A. Reakciya cd1a-i cd3-pozitivnyh kletok timusa pri vvedenii melatonina v razlichnyh svetovyh usloviyah* / O. A. SHatskih, E. M. Luzikova, V. E. Sergeeva // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. – 2015. – № 5. – S. 40

Поступила в редакцию 11.01.2022.

DOI 10.52368/2078-0109-58-1-42-47
УДК 619:[612.12:615.03:618.14]:636.2

ВЛИЯНИЕ АНТИМЕТРИМАСТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КОРОВ ПРИ ТЕРАПИИ ОСТРОГО ПОСЛЕРОДОВОГО ЭНДОМЕТРИТА

Михалёв В.И. ORCID ID 0000-0001-9684-4045, Скориков В.Н. ORCID ID 0000-0002-3135-5811,
Пасько Н.В. ORCID ID 0000-0003-0513-7252, Сашнина Л.Ю. ORCID ID 0000-0001-6477-6156,
Чусова Г.Г. ORCID ID 0000-0003-1494-8807, Ермолова Т.Г. ORCID ID 0000-0002-3695-8494

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

В статье представлены результаты морфологических, биохимических и иммунологических исследований крови коров при терапии острого послеродового эндометрита с применением антиметримаста. Комплексное лечение коров с острым послеродовым эндометритом, предусматривающее внутриматочное введение антимицробных средств и внутримышечные инъекции препарата антиметримаст трижды с 24-часовым интервалом, начиная с первого дня терапевтического курса, в дозе 10 мл, сопровождается клиническим выздоровлением 90,9% животных, снижением явлений воспалительного характера, процессов перекисно-