

DOI 10.52368/2078-0109-2021-57-3-8-12

УДК 619[612.12:612.33:616-08:616.34-008.314.4]636

УРОВЕНЬ CD-3 ЛИМФОЦИТОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОНКОГО ОТДЕЛА КИШЕЧНИКА ПОРОСЯТ ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Воротникова С.М. ORCID iD 0000-0001-82444-0605, Шабунин Б.В. ORCID iD 0000-0002-2234-3851, Михайлов Е.В. ORCID iD 0000-0001-5457-1325, Степанов Д.С. ORCID iD 0000-0002-5887-8284
ФГБНУ «Всероссийский научно исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

*Для проведения опыта было подобрано 3 группы по 40 больных поросят в возрасте 5-7 дней, у которых регистрировали заболевания ЖКТ смешанной бактериальной этиологии. Первая группа являлась контрольной и не получала лечения. Животным 2 группы применяли внутримышечно препарат «Квинокол». Третьей – «Квинокол» в сочетании с ГМ-КСФ. При проведении иммуногистохимических исследований выявленный уровень CD-3 положительных клеток в слизистой оболочке в группе 3 был выше, чем в группах 1 и 2 на 62% и 51% соответственно. Это указывает на стимуляцию миграции Т-клеток в кишечник для поддержания местного иммунитета. **Ключевые слова:** желудочно-кишечные заболевания, поросята, кластер дифференцировки, иммуногистохимия, терапия, Т-лимфоциты, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.*

LEVEL OF CD-3 LYMPHOCYTES IN THE MUCOSA OF THE SMALL INTESTINE OF PIGLETS IN A COMPLEX THERAPY OF GASTROINTESTINAL DISEASES OF BACTERIAL ETIOLOGY

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

*For the experiment, 3 groups of 40 sick piglets at the age of 5-7 days were selected, in which gastrointestinal tract diseases of mixed bacterial etiology were recorded. The first group was the control one and underwent no treatment. The animals of group 2 were administered intramuscularly the drug "Quinokol". The animals of the third group were administered "Quinokol" in combination with GM-CSF. In the immune histochemical studies the revealed level of CD-3 positive cells in the mucous membrane in group 3 was found higher than in groups 1 and 2 by 62% and 51%, respectively. This indicates the stimulation of the migration of T cells into the intestine to maintain local immunity. **Keywords:** gastrointestinal diseases, piglets, cluster of differentiation, immunohistochemistry, therapy, T-lymphocytes, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.*

Введение. Желудочно-кишечный тракт является не только органом пищеварения, но и важным звеном иммунитета. Особенность его функционирования обусловлена воздействием многочисленных антигенов внешней среды (компонентов пищи, бактерий, вирусов, паразитов), большой площадью контактов с ними и необходимостью развития защитных реакций против патогенных микроорганизмов и многих неорганических веществ.

Кишечник — самый большой иммунный орган. Примерно 25% его слизистой оболочки состоит из иммунологически активной ткани, локализовано около 80% иммунокомпетентных клеток, каждый метр содержит 10^{10} Li (Римарчук Г.В., 2008).

Иммунная система кишечника высших позвоночных включает клеточные элементы: лимфоидные клетки (В- и Т- лимфоциты), интраэпителиальные клетки и в *Lamina propria*; плазматические клетки; зрелые миелоидные клетки (макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, мастоциты); энтероциты; фолликулоассоциированные специализированные эпителиальные клетки (М-клетки). Структурные элементы: пейеровы бляшки, солитарные лимфофолликулы, аппендикс, мезентериальные лимфатические узлы. Лимфоцитам принадлежит ключевая роль в осуществлении следующих процессов, лежащих в основе иммунитета: распознавание антигена, удаление его из организма, запоминание контакта с антигеном (Мухина Ю.Г., Дубровская М.И., Кафарская Л.И., 2006).

Условно в иммунной системе ЖКТ можно выделить индуктивную и эффекторную зоны. Первая состоит из пейеровых бляшек, аппендикса и регионарных лимфоузлов; вторая - из собственной пластинки (*Lamina propria*) и эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника. В соответствии с названиями в индуктивной зоне происходит распознавание, презентация антигена и формирование популяции антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов; в эффекторной зоне — синтез иммуноглобулинов В-лимфоцитами, цитокинов моноцитами/макрофагами, Т- и НК-лимфоцитами, т.е. выполнение ими своих эффекторных функций. Как уже отмечалось, эффекторная зона иммунной системы ЖКТ состоит из лимфоидных клеток *Lamina propria* и межэпителиальных лимфоцитов. Последние характе-

ризуются двумя важными особенностями: - наличие повышенного числа среди CD-3+ Т-лимфоцитов клеток, (до 75%), в то время как в периферической крови количество этих клеток не превышает 35% (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1998).

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 скармливании молозива иммуноглобулины почти отсутствуют. Защита от неблагоприятных факторов окружающей среды, патогенов впервые дни жизни обеспечивается за счет иммуноглобулинов (антител), поступающих с молозивом (колостральный иммунитет). Колостральный иммунитет продолжается 35 дней. Затем формируется барьерная функция слизистой оболочки и ферментативная система, снижается концентрация иммуноглобулинов в результате их разрушения и низкого уровня синтеза собственных иммуноглобулинов.

Заболевания ЖКТ у новорожденных поросят является достаточно распространенной проблемой животноводства в Российской Федерации. Этому способствует большое количество факторов: большая скученность животных на фермах, некачественные половые покрытия, в которых остается грязь, нерегулярная уборка животноводческих помещений, несоблюдение стандартов кормления. В Российской Федерации распространенность заболеваний ЖКТ составляет до 90% среди молодняка до двух месяцев. При желудочно-кишечных заболеваниях бактериальной этиологии происходит снижение продуктивности животных, что выражается в 10—30 дополнительных днях откорма, преждевременной выбраковки животных, а нередко — и их гибели. В исследованиях, проведенных в Швеции и Дании, на заболевания ЖКТ приходилось 5—24% общей смертности до отъема (Svendsen J., Bille N., Nielsen N.C., 1975) и снижение среднесуточного прироста на 8—14 г/день в течение первой недели жизни (Kongsted H. et al., 2014).

Среди этиологических факторов, которые приводят к развитию заболеваний ЖКТ, 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) природу. Исследованиями М. Morin et al (1983) было показано, что 60% случаев данных заболеваний у поросят приходилось на вирусные агенты, 23% - на бактерии и 15,3% приходилось на кокцидии. На фоне предрасполагающих факторов указанные патологические агенты действуют как по отдельности, так и в различных ассоциациях.

Поросята с желудочно-кишечными заболеваниями, независимо от их происхождения, страдают от обезвоживания, токсикоза, нарушения белкового, минерального, углеводного и витаминного обмена, моторной и ферментативной функций желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой недостаточности. У них снижается реактивность иммунной системы, поэтому их терапия должна включать применение этиотропных препаратов и препаратов, нормализующих иммунный статус организма.

Одним из таких модуляторов иммунной системы является экспериментальный препарат на основе видоспецифичного рекомбинантного цитокина, относящегося к группе гранулоцитарно-макрофагальных колониестимулирующих факторов (ГМ-КСФ), который эффективно стимулирует Т-клеточный иммунитет. В предыдущих исследованиях мы провели изучение гистологической структуры кишечника поросят при желудочно-кишечных инфекциях (Паршин П.А. et al, 2020). Данное исследование посвящено изучению методов терапии.

Целью данной работы явилось изучение уровня CD-3 лимфоцитов в слизистой оболочке (*lamina propria*) тонкого отдела кишечника поросят при комплексной терапии желудочно-кишечных заболеваний бактериальной этиологии.

Материалы и методы исследований. Для опыта в крупном специализированном хозяйстве Воронежской области по выращиванию свиней было подобрано 3 группы по 40 больных поросят в возрасте 5-7 дней, у которых регистрировали заболевания ЖКТ смешанной бактериальной этиологии (*E. coli* энтеропатогенного серотипа O137, *Staph. Epidermalis*, *Staph aureus*, *Str. Suis*). Первая группа являлась контрольной и не получала лечения. Животным 2 группы применяли внутримышечно препарат «Квинокол» (данный препарат является комбинацией гентамицина и энрофлоксацина) в дозе 0,5 мл/10кг 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. Вынужденный убой (убой проводили в соответствии с Directive 93/119/E C) животных первой группы проводили на 1-2-е сутки после обнаружения клинических признаков (вялость, шаткая походка, жидкий «стул»), а поросят второй и третьей группы - на 2-3-и сутки после последнего введения препаратов. От вынужденно убитых больных поросят (n=4) и от животных опытных групп (n=4) после лечения отбирали образцы тонкого отдела кишечника для проведения морфологических и иммуногистохимических исследований.

Морфологические исследования проводились по общепринятым методикам. Материал фиксировался в 10% растворе забуференного формалина, затем обезвоживался в спиртах возрастающей крепости, после чего заливался в гистологической парафин Histomix (Biovitrum, Россия). Из парафиновых блоков изготавливались срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивались гематоксилином-

езином. Также проводили иммуногистохимическое исследование маркеров для выявления CD-3+ лимфоцитов (пан-Т-лимфоцитарный маркер). Иммуногистохимическое исследование проводилось на автоматическом иммуноштейнере. Для визуализации каждой иммуногистохимической реакции был использован набор «Dako En Vision+ 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 докрашивали гематоксилином Вейгерта. Препараты монтировали под полистирол, фотографии были сделаны на микроскопе «Microscreen» (Hospitex Diagnostics, Италия) со встроенной камерой. Для подсчета клеток была использована программа «Top View» и морфометрический стандарт. Для анализа данных использовали MS Excel 2013 с пакетом для анализа данных.

Результаты исследований. При гистологическом исследовании кишечника поросят первой группы была выявлена обильная десквамация эпителиальной выстилки, слущенный эпителий диффузно располагался в просвете кишечника. В микропрепаратах наблюдается отек стромы, визуализируются как целые ворсины, так и отдельные энтероциты. Диффузно выявлялись древоподобные крипты, с атрофией, а также формирование ворсиноподобных складок, что свидетельствует о нарушении процессов тканевого созревания слизистой оболочки. Проведенные исследования показали, что у поросят при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, в тонком отделе кишечника происходила частичная десквамация и деструкция эпителиальной выстилки ворсинок, что уменьшало всасывающую способность кишечника. Нарушенный адгезивный барьер слизистой оболочки приводит к колонизации патогенной микрофлоры. Бактериальные токсины активируют аденилатциклазу энтероцитов, что приводит к нарастанию внутриклеточной концентрации цАМФ. В результате нарушается трансмембранный транспорт ионов Na^+ и Cl^- с накоплением их в просвете кишки. По нарастающему осмотическому градиенту за ними следует вода, что вызывает обильный жидкий стул (Белоусова Е.А., Златкина А.Р., 2003).

У животных второй группы кишечник характеризовался типичным гистологическим строением. Сосуды были равномерно кровенаполнены, ворсинки имели сохранную эпителиальную выстилку, подслизистая основа имела обычный вид, мышечная и серозная оболочки также имели обычное строение. В строме ворсин визуализировались единичные гранулоциты (чаще всего эозинофилы), в криптах отмечалась умеренная митотическая активность.

У поросят третьей группы слизистая оболочка кишечника была представлена длинными ворсинками и криптами. Строма ворсин была представлена в основном соединительной тканью с умеренным количеством мононуклеарных клеток. Крипты средней глубины, слабо извитые, с выраженной митотической активностью. Мышечная оболочка была представлена гладкими мышечными волокнами, имела обычный вид. Серозная оболочка также была без изменений.

Вышеперечисленные гистологические изменения у больных поросят не являлись критическими, поэтому при проведении своевременного курса этиотропной терапии с применением ГМ-КСФ симптомы купировались, что подтверждается полной гистологической ремиссией у животных как второй, так и третьей группы.

При проведении иммуногистохимических исследований выявленный уровень CD-3 положительных клеток в собственной пластинке был заметно больше в группе 3 по сравнению с группами 1 и 2 (рисунок 1). При подсчете количества положительных клеток на единицу площади (микромметр квадратный) было показано, что в группе поросят, которым совместно с этиотропной терапией применяли ГМ-КСФ, данный показатель был выше, чем в группах 1 и 2 на 62% и 51% соответственно. Различия были достоверны при $p < 0,0001$.

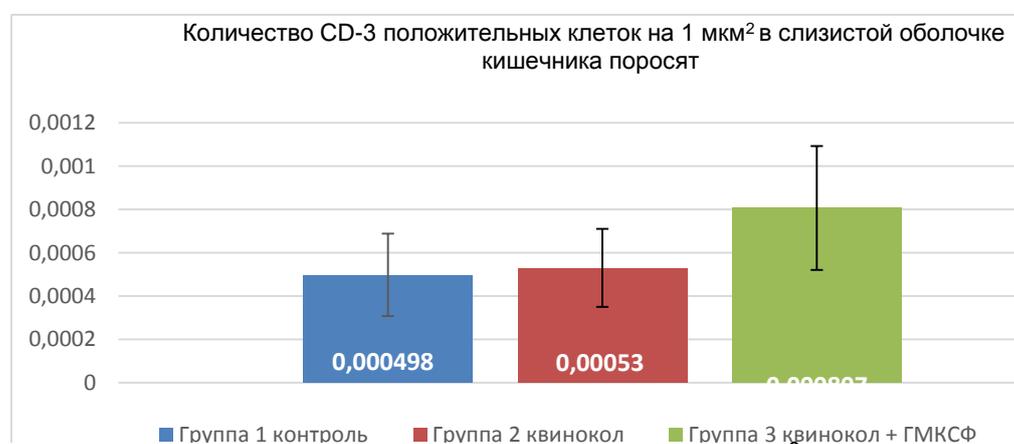


Диаграмма 1 - Количество CD-3 положительных клеток на 1 мкм² в слизистой оболочке кишечника поросят

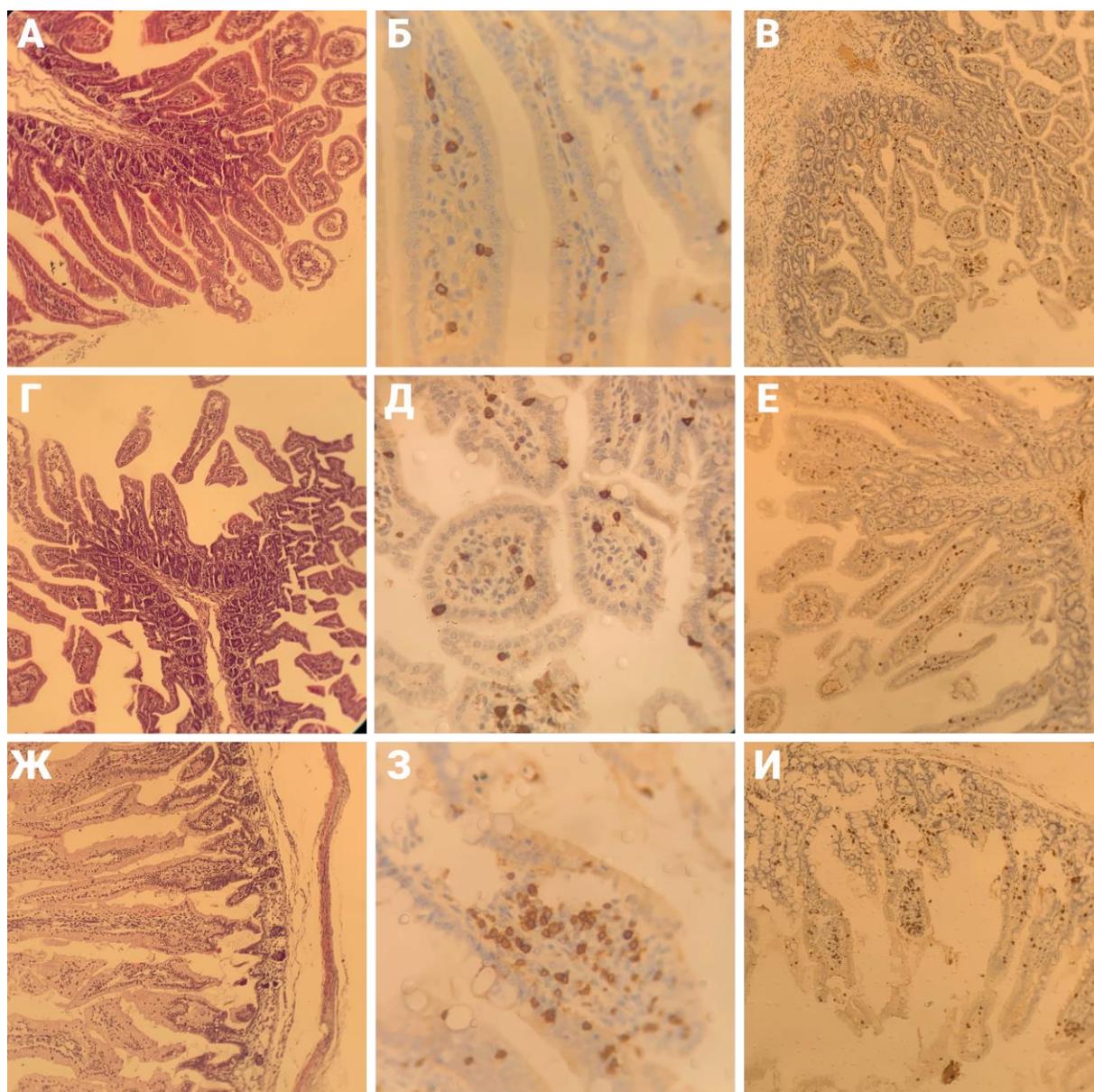


Рисунок 1 - Гистологическая структура кишечника поросят. А, Б, В – структура кишечника поросят группы 1 – контроль. Г, Д, Е – структура кишечника поросят группы 2 – Квинокол. Ж, З, И – структура кишечника поросят группы. 3 – Квинокол + гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор. А, Г, Ж – окраска гематоксилин – эозин, ув. 100х. Б, Д, З – иммуногистохимическая окраска CD-3 маркер ув. 400х. В, Е, И – иммуногистохимическая окраска CD-3 маркер ув. 100х

Как видно из таблицы и рисунка, применение ГМ-КСФ на фоне курса этиотропной терапии стимулирует миграцию лимфоидных Т-клеток в кишечник для поддержания местного иммунитета. Возможно, миграция Т-лимфоцитов происходит из тимуса. Это было показано в исследовании Е.А. Postovalova., где при остром колите было видно значимое снижение объемной доли коркового вещества и количества Т-лимфоцитов по сравнению со здоровыми животными (Postovalova E.A., Makarova O.V, Michailova L.P., 2019).

Также в исследовании было показано, что применение ГМ-КСФ индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов типа 1 Т-лимфоцитами. Цитокины 2 типа подавляются ГМ-КСФ, и пролиферация аллогенных Т-клеток увеличивалась (Eksioglu E.A., Mahmood S.S., Chang M., 2007).

Заключение. Проведенные исследования показывают, что применение ГМ-КСФ в сочетании с препаратом «Квинокол» оказывало положительный эффект на кишечный иммунитет. Это было видно по достоверному повышению количества CD-3 клеток в толще слизистой оболочки кишечника у опытных животных. Это позволяет сделать вывод, что ГМ-КСФ обладает иммуномодулирующим эффектом и его можно применять как поддерживающую терапию при лечении желудочно-кишечных заболеваний бактериальной этиологии у поросят.

Conclusion. The conducted studies show that the use of GM-CSF in combination with the drug "Quinocol" had a positive effect on intestinal immunity. This was marked by a significant increase in the number of CD3 cells in the thickness of the intestinal mucosa in the experimental animals. This allows us to conclude that GM-CSF has an immune modulating effect and it can be used as a supportive therapy in the treatment of gastrointestinal diseases of bacterial etiology in piglets.

Исследование было проведено в рамках гранта РФФИ № 20-316-90036.

Список литературы. 1. Eksioglu, E. A., Mahmood, S. S., Chang, M., & Reddy, V. (2007). GM-CSF promotes differentiation of human dendritic cells and T lymphocytes toward a predominantly type 1 proinflammatory response. *Experimental hematology*, 35(8), 1163-1171. doi: 10.1016/j.exphem.2007.05.001. 2. Kongsted, H., Stege, H., Toft, N., & Nielsen, J. P. (2014). The effect of New Neonatal Porcine Diarrhoea Syndrome (NNPDS) on average daily gain and mortality in 4 Danish pig herds. *BMC veterinary research*, 10(1), 1-7. doi: 10.1186/1746-6148-10-90. 3. Morin, M., Turgeon, D., Jolette, J., Robinson, Y., Phaneuf, J. B., Sauvageau, R., ... & Lariviere, S. (1983). Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47(1), 11. 4. Postovalova, E. A., Makarova, O. V., Kosyreva, A. M., & Michailova, L. P. (2019). Morphology of the thymus and the specific features of its cellular composition in experimental acute and chronic ulcerative colitis. *Архив патологии*, 81(5), 53-63. doi: 10.17116/patol20198105153. 5. Svendsen, J., Bille, N., Nielsen, N. C., Larsen, J. L., & Riising, H. J. (1975). Prewaning mortality in pigs. 4 *Diseases of the gastrointestinal tract in pigs*. *Nordisk veterinärmedicin*, 27(2), 85-101. 6. Белоусова, Е. А., & Златкина, А. Р. (2003). Синдром диареи в практике гастроэнтеролога: патофизиология и дифференцированный подход к лечению. *Фарматека*, 10, 65-71. 7. Мухина, Ю. Г., Дубровская, М. И., & Кафарская, Л. И. (2006). Иммунная система и микрофлора кишечника у детей. Обоснование функционального питания. *Фарматека*, 2, 22-28. 8. Римарчук, Г. В. (2008). Опыт применения Кипферона в практике педиатра. 9. Паршин, П. А., Сашнина, Л. Ю., Михайлов, Е. В., Хохлова, Н. А., Шабунин, Б. В., Пономарева, Ю. О., & Воротникова, С. М. (2020). Гисто-морфометрические показатели тонкого отдела кишечника поросят с неонатальной диареей. *Ветеринарный фармакологический вестник*, (2), 214-223. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.2.214. 10. Хаитов, Р. М., & Пинегин, Б. В. (1998). Особенности организации и функционирования иммунной системы желудочно-кишечного тракта и заболевания, связанные с нарушениями ее функционирования. *Анналы хирургической гепатологии*, 3(1), 112-116.

References. 1. Eksioglu, E. A., Mahmood, S. S., Chang, M., & Reddy, V. (2007). GM-CSF promotes differentiation of human dendritic cells and T lymphocytes toward a predominantly type 1 proinflammatory response. *Experimental hematology*, 35(8), 1163-1171. doi: 10.1016/j.exphem.2007.05.001. 2. Kongsted, H., Stege, H., Toft, N., & Nielsen, J. P. (2014). The effect of New Neonatal Porcine Diarrhoea Syndrome (NNPDS) on average daily gain and mortality in 4 Danish pig herds. *BMC veterinary research*, 10(1), 1-7. doi: 10.1186/1746-6148-10-90. 3. Morin, M., Turgeon, D., Jolette, J., Robinson, Y., Phaneuf, J. B., Sauvageau, R., ... & Lariviere, S. (1983). Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47(1), 11. 4. Postovalova, E. A., Makarova, O. V., Kosyreva, A. M., & Michailova, L. P. (2019). Morphology of the thymus and the specific features of its cellular composition in experimental acute and chronic ulcerative colitis. *Архив патологии*, 81(5), 53-63. doi: 10.17116/patol20198105153. 5. Svendsen, J., Bille, N., Nielsen, N. C., Larsen, J. L., & Riising, H. J. (1975). Prewaning mortality in pigs. 4 *Diseases of the gastrointestinal tract in pigs*. *Nordisk veterinärmedicin*, 27(2), 85-101. 6. Belousova, E. A., & Zlatkina, A. R. (2003). Sindrom diarei v praktike gastroenterologa: patofiziologiya i differentsirovanny podkhod k lecheniyu. *Farmateka*, 10, 65-71. 7. Mukhina, Yu. G., Dubrovskaya, M. I., & Kafarskaya, L. I. (2006). Immunnaya sistema i mikroflora kischechnika u detey. Obosnovanie funktsional'nogo pitaniya. *Farmateka*, 2, 22-28. 8. Rimarchuk, G. V. (2008). Opyt primeneniya Kipferona v praktike pediatri. 9. Parshin, P. A., Sashnina, L. Yu., Mikhaylov, E. V., Khokhlova, N. A., Shabunin, B. V., Ponomareva, Yu. O., & Vorotnikova, S. M. (2020). Histomorphometric indicators of small intestine in piglets with neonatal diarrhea. *Bulletin of Veterinary Pharmacology*, (2), 214-223. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.2.214. 10. Khaitov, R. M., & Pinegin, B. V. (1998). Osobennosti organizatsii i funktsionirovaniya immunnnoy sistemy zheludochno-kishechnogo trakta i zabolevaniya, svyazannye s narusheniyami ee funktsionirovaniya. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*, 3(1), 112-116.

Поступила в редакцию 05.08.2021.

DOI 10.52368/2078-0109-2021-57-3-12-16

УДК 619:[612.015.3:615.2]:636.4

ИЗУЧЕНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ (ПЕРЕНОСИМОСТИ) АМИНОСЕЛЕФЕРОНА-С НА СВИНЬЯХ

Востроилова Г.А. ORCID iD 0000-0002-2960-038X, Бригадиров Ю.Н. ORCID iD 0000-0003-3804-1732,
Чусова Г.Г. ORCID iD 0000-0003-1494-8807, Корчагина А.А. ORCID iD 0000-0002-8561-417X,
Коцарев В.Н. ORCID iD 0000-0002-9114-1176, Перепёлкина И.С. ORCID iD 0000-0002-6462-8724
ФГНБУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

Исследование токсичности препарата на целевых животных является необходимым этапом доклинической оценки. Целью настоящей работы явилось изучение безвредности (переносимости) препарата аминокселеферон-С, применяемого в качестве иммуномодулятора, на свиньях и его влияние на морфо-биохимические показатели крови животных. Установлено, что аминокселеферон-С, вводимый однократно