

В. И. Зимников, Л. Ю. Сашнина, Н. В. Пасько

Иммунологический статус крови клинически здоровых и больных маститом лактирующих коров

Аннотация.

Мастит у высокопродуктивных лактирующих коров является наиболее распространенным заболеванием, которое наносит огромный экономический ущерб животноводческим хозяйствам. По мнению ведущих ученых, при изучении проблемы мастита наибольший интерес представляет оценка динамики изменений иммунологических показателей крови коров при возникновении и развитии воспалительного процесса в вымени. Для проведения исследований было сформировано три группы лактирующих коров голштинской породы 2-3 лактации с годовой молочной продуктивностью 7356-8000 кг молока, принадлежащих одному из хозяйств Воронежской области. В первую группу (n=8) вошли клинически здоровые животные, во вторую (n=8) — коровы, больные субклиническим маститом, в третью (n=8) — коровы, больные клинически выраженным катаральным маститом. От всех животных были отобраны пробы крови для определения иммунобиохимических, молекулярно-генетических показателей. Проведенными исследованиями установлено, что уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-4 в 2,6 и 1,5 раз, соответственно, был ниже у коров, больных субклиническим маститом, и в 5,8 и 3,9 раза, соответственно, ниже у коров, больных клинически выраженным катаральным маститом, в сравнении с клинически здоровыми животными. В то же время экспрессия провоспалительного ИНФ-γ была выше в 7,6 и 14,8 раза у коров, больных субклиническим и катаральным маститом, соответственно, в сравнении с клинически здоровыми животными.

Ключевые слова: коровы, субклинический мастит, катаральный мастит, экспрессия генов, цитокины, иммунологический статус.

Авторы:

Зимников В. И. – кандидат ветеринарных наук;

Сашнина Л. Ю. – доктор ветеринарных наук;

Пасько Н. В. – кандидат биологических наук.

ФГБНУ «Ссероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии»; 394087, Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114б.

Введение. Мастит у высокопродуктивных лактирующих коров является наиболее распространенным заболеванием, которое наносит огромный экономический ущерб животноводческим хозяйствам. По мнению ведущих ученых, при изучении проблемы мастита наибольший интерес представляет изучение динамики изменений иммунологических показателей крови коров при возникновении и развитии воспалительного процесса в вымени [1].

Воспалительные процессы в организме животных протекают на фоне нарушения баланса между системами клеточного и гуморального иммунитета неспецифической резистентности и не зависят от их локализации, будь то молочная железа или другой орган. Количество выработанных про- и противовоспалительных цитокинов определяет результат воспалительного процесса [2, 3].

Цитокины являются одной из разновидностей сигнальных белков. Интерферон гамма (ИНФ-γ) относится к провоспалительным цитокинам, а интерлейкин-4 (ИЛ-4) и интерлейкин-10 (ИЛ-10) к противовоспалительным [4]. ИЛ-4 является гли-

копротеином с молекулярной массой 18-20 кД, ТН-2- лимфоциты являются основными продуцентами интерлейкина-4. Также ИЛ-4 через ТН-2 клетки усиливает гуморальный иммунитет, увеличивает содержание тучных клеток и эозинофилов, тем самым усиливая эозинофилию, образование иммуноглобулины G4, ингибирует выработку провоспалительных цитокинов (α-ФНО, ИЛ-1, ИЛ-8) и простагландинов из активированных моноцитов. Из-за снижения содержания ИЛ-4 уменьшается выработка антител В-клетками, что приводит к увеличению выработки провоспалительных цитокинов и простагландинов. На этом фоне происходит истощение системы иммунитета, что приводит к возникновению длительного воспалительного процесса [5, 6].

Интерлейкин-10 — за счет индукции Т-зависимого гуморального иммунитета, влияет на увеличение выработки ИЛ-4, за счет этого снижается синтез интерферона-γ. Увеличение выработки интерлейкина-10, являющегося сильным противовоспалительным цитокином, способствует торможению выработки провоспалительных цитокинов

(интерлейкина-1 и интерферона- α) [5, 6].

Особенность иммунного ответа и его характер определяется сигнальными белками (цитокинами). Во время возникновения воспалительной реакции цитокины способствуют стимуляции нейтрофилов и их миграции в очаг воспаления, а также участвуют в процессе восстановления тканей после окончания воспалительного процесса. Цитокины взаимодействуют практически со всеми клетками организма, и круг их влияния довольно широк, в связи с этим изучение реторсии сигнальных белков при воспалительном процессе в молочной железе коров остается актуальным до настоящего времени [7, 8].

Согласно аналитическим данным Международной молочной федерации, частота регистрации патологии молочной железы у высокопродуктивных молочных коров варьируется в среднем от 15 % до 50 % переболевших животных в течении года. Скрытая форма мастита (субклинический мастит), согласно источникам, понижает генетически заложенную продуктивность дойного стада минимум на 10,0-15,0 %, что эквивалентно недополучению 450,0-750,0 кг сырого молока за период лактации. Таким образом, определение сезонности, патоморфологических и пат-физиологических процессов, протекающих при воспалении молочной железы коров, обеспечивает разработку и применение современных и адаптивных средств диагностирования, а также применение более современных протоколов лечения различных форм мастита с учетом его течения и интенсивности. Отмечается, что лечебные мероприятия должны не только купировать этиопатогенез мастита, но и повышать регенеративные свойства альвеолярной ткани вымени [9].

Немалая роль в формировании иммунной реактивности вымени принадлежит регионарным иммунокомпетентным клеткам и структурам. Объясняется это прямым воздействием текущих воспалительных реакций на нейрогуморальную, иммунную и другие системы вымени и организма лактирующей коровы в целом. Давно установлена тесная взаимосвязь патогенеза различных форм мастита и увеличение концентрации провоспалительного кластера цитокинов. Определение напряженности клеточного иммунитета молочной железы до, во время и после протекания мастита в различных его формах проявления, оценка функциональной активности цитокинов противовоспалительного и провоспалительного ряда, изучение морфофункционального аспекта течения воспаления молочной железы — все это позволит оценить и разработать критерии ранней

диагностики мастита, его профилактирования и терапии [10-12].

Материалы и методы. Для проведения исследований было сформировано три группы лактирующих коров голштинской породы 2-3 лактации с годовой молочной продуктивностью 7356-8000 кг молока, принадлежащих одному из хозяйств Воронежской области. В первую группу ($n=8$) вошли клинически здоровые животные, во вторую ($n=8$) — коровы, больные субклиническим маститом, в третью ($n=8$) — коровы, больные клинически выраженным катаральным маститом. От всех животных были отобраны пробы крови для определения иммунобиохимических, молекулярно-генетических показателей.

Лабораторные исследования проводили с применением установленных методик, морфологический состав крови определяли на гематологическом анализаторе ABX MICRO S60. Количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу определяли общепринятыми методами. Общий белок, белковые фракции, общие иммуноглобулины (Ig), циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), бактерицидную (БАСК) и лизоцимную активность сыворотки крови (ЛАСК), фагоцитарную активность лейкоцитов (ФАЛ), фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) — на сертифицированном оборудовании, согласно утвержденным «Методическим рекомендациям по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных» [13].

Выделение РНК из крови проводили, используя набор РНК-Экстран (Синтол, Россия). При проведении реакции обратной транскрипции для получения кДНК использовали амплификатор «Терцик» («НПО ДНК-Технология», Россия) с применением набора реактивов MMLVRTkit («Евроген», Россия). В дальнейшем проведена ПЦР-реакция с учётом праймеров для интерлейкинов (ИЛ-4, ИЛ-10 и ИНФ- γ). Полимеразная цепная реакция проведена на детектирующем амплификаторе «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с готовой коммерчески доступной смесью для PCR 5X qPCRmix-HSLowROX (Евроген, Россия).

Обработку полученного в ходе проведения опыта цифрового материала проводили с применением программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. Проведенными исследованиями установлено, что уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-4 в 2,6 и 1,5 раз соответственно был ниже у коров, больных субклиническим маститом, и в 5,8 и 3,9 раза со-

ответственно, ниже у коров, больных клинически выраженным катаральным маститом, в сравнении с клинически здоровыми животными.

В то же время экспрессия провоспалительного ИНФ- γ была выше в 7,6 и 14,8 раза у коров, больных субклиническим и катаральным маститом, соответственно, в сравнении с клинически здоровыми животными.

Полученные данные по определению экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в крови клинически здоровых, больных субклиническим и клинически выраженным катаральным маститом коров подтверждаются результатами проведенных иммунологических исследований. Так, нами установлено (табл. 1), что заболевание коров субклиническим маститом сопровождалось повышением в крови лейкоцитов — на 22,2 % ($P<0,001$), эозинофилов — на 62,8 % ($P<0,001$), палочкоядерных нейтрофилов — на 42,8 % ($P<0,001$), моноцитов — на 61,7 % ($P<0,05$), при снижении α -глобулиновой фракции белка — на 23,1 % ($P<0,05$), β -глобулиновой фракции белка — на 29,6 % ($P<0,001$), общих иммуноглобулинов — на 6,8 %, лизоцимной активности сыворотки крови — на 45,9 % ($P<0,001$), фагоцитарной активности лейкоцитов — на 4,5 %, спонтанного НСТ теста — на 30,5 % ($P<0,01$) при возрастании содержания циркулирующих иммунных комплексов — на 20,5 % ($P<0,05$), бактерицидной активности сыворотки крови — на 5,0 % ($P<0,02$), стимулированного НСТ теста — на 14,8 % ($P<0,01$), коэффициента стимуляции нейтрофилов — на 55,7 % ($P<0,02$), миелопероксидазы нейтрофилов — на 41,7 % ($P<0,02$).

Следовательно, заболевание лактирующих коров субклиническим маститом сопровождается повышенной антигенной нагрузкой, высокой эндогенной интоксикацией. Вместе с этим, при изучении показателей неспецифического иммунитета у коров, больных клинически выраженным

катаральным маститом, выявлены более глубокие нарушения в иммунном статусе. Так, у данных животных в крови отмечено более высокое содержание лейкоцитов — на 24,7 % ($P<0,001$), эозинофилов в 1,9 раза ($P<0,01$), палочкоядерных нейтрофилов — в 2,1 раза ($P<0,001$), моноцитов — на 70,5 % ($P<0,05$), при снижении лимфоцитов — на 10,4 %, альбуминов — на 17,7 % ($P<0,001$), α -глобулиновой фракции белка на 45,0 % ($P<0,001$), β -глобулиновой фракции белка на 71,8 % ($P<0,001$), γ -глобулиновой фракции белка — на 21,5 % ($P<0,05$), содержания общих иммуноглобулинов на 24,8 % ($P<0,002$), бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови — на 7,6 % и 52,1 % ($P<0,001$), соответственно, фагоцитарной активности лейкоцитов — на 9,1 % ($P<0,02$), фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа — на 17,2 % ($P<0,05$) и 17,6 % ($P<0,02$), уровня спонтанного НСТ теста — на 19,4 % ($P<0,02$), при возрастании содержания циркулирующих иммунных комплексов — на 42,8 % ($P<0,002$), стимулированного НСТ теста — на 22,1 % ($P<0,02$), коэффициента стимуляции нейтрофилов — на 56,7 % ($P<0,01$) и миелопероксидазы нейтрофилов — на 39,0 % ($P<0,01$).

Закключение. Таким образом, развитие воспаления молочной железы у лактирующих коров сопровождается повышенной экспрессией генов провоспалительного ИНФ- γ на фоне снижения экспрессии противовоспалительных ИЛ-10 и ИЛ-4, что приводит к недостаточному синтезу антител В-клетками и способствует протеканию длительной воспалительной реакции и истощению иммунокомпетентных клеток, равно как и иммунной системы. Так, у коров, больных субклинической и катаральной формами мастита, были снижены показатели клеточного (ФАЛ, ФЧ, ФИ, НСТ СП, НСТ СТ, КСН, МПО) и гуморального (БАСК, ЛАСК, ЦИК) звеньев неспецифической резистентности организма.

Литература

1. Камышанов А. С. Изучение биохимических и морфологических показателей крови коров в различные периоды лактации при заболевании маститом / А. С. Камышанов // Международный научно-исследовательский журнал. — 2021. — №3(105). — С. 48-52. DOI: 10.23670/IRJ.2021.105.3.033.
2. Анциферова Ю. С. Цитокины в акушерстве, гинекологии и неонатологии / Ю. С. Анциферова, Н. Ю. Сотникова, М. Н. Шохина // Цитокины и воспаление. — 2002. — № 2(1). — С. 145-156.
3. Жидовинов А. А. Клинико-лабораторная стратификация эндогенной интоксикации и SIRS у больных с распространённой формой аппендикулярного перитонита / А. А. Жидовинов, С. В. Чупров // Цитокины и воспаление. — 2007. — № 6(1). — С. 25-30.
4. Симбирцев А. С. Цитокины: классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2004. — № 3(2). — С. 16-22.
5. Серебренникова С. Н. Интерлейкин-1, интерлейкин-10 в регуляции воспалительного процесса / С. Н. Серебренникова, И. Ж. Семинский, Н. В. Семёнов, Е. В. Гузовская // Сибирский медицинский журнал. — 2012. — № 8. — С. 5-7.

6. Chubenko V. A. Immunotherapy is based on cytokines (IL-1, IL-2, FNO, CSF, IFN) / V. A. Chubenko // Hum.Reprod. – 2016. – № 5. – P. 35-41.
7. Yazd A. S. The interleukin-1 family / A. S. Yazd, K. Ghoreschi // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – № 941. – P. 21-29. DOI: 10.1007/978-94-024-0921-5.
8. Cicinelli E., Matteo M., Tinelliet R. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy // Hum.Reprod. – 2015. – № 30(2). – P. 323-353. DOI: 10.1093/humrep/deu292.
9. Кочарян В. Д. Биохимические показатели крови и молока при маститах у коров голштинизированной породы / В. Д. Кочарян, К. А. Баканова, М. А. Ушаков, Ж. Ш. Ушакова // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2022. – № 25-1. – С. 69-76.
10. Жданова И. Н. Влияние фитобактериального комплекса БЦЛ на морфобиохимический статус коров при клинической форме мастита / И. Н. Жданова // Вестник Пермского научного центра УрО РАН. – 2018. – № 3. – С. 51-57. DOI 10.7242/1998-2097/2018.3.5.
11. Иммунологические аспекты борьбы с маститом коров / В. Слободяник, Н. Климов, Л. Ческидова, Е. В. Зверев. – Воронеж : Издательство Истоки, 2020. – 222 с. – ISBN 978-5-4473-0284-9.
12. Камышанов А. С. Гематологические показатели коров в период стельности при субклиническом мастите и развитие у них родовых и послеродовых заболеваний / А. С. Камышанов // БИО. – 2021. – № 4(247). – С. 8-11.
13. Методические рекомендации по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных // Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины / А. М. Смирнов [и др.]. – Москва: РАСХН, 2007. – Ч. III.: Методы исследований по проблемам ветеринарной патологии у продуктивных животных. – С. 174-215.

Zimnikov V., Sashnina L., Pasko N.

Immunological status of the blood of clinically healthy and lactating cows with mastitis

Abstract.

Mastitis in high yielding lactating cows is the most common disease that causes enormous economic damage to livestock farms. According to leading scientists, when studying the problem of mastitis, the greatest interest is in studying the dynamics of changes in the immunological blood indicators of cows during the occurrence and development of the inflammatory process in the udder. To conduct research, three groups of lactating Holstein cows of 2–3 lactations with an annual milk production of 7356–8000 kg of milk, belonging to one of the farms in Voronezh region, were formed. The first group (n=8) included clinically healthy animals, the second (n=8) – cows with subclinical mastitis, the third (n=8) – cows with clinically pronounced catarrhal mastitis. Blood samples were taken from all animals to determine immunobiochemical and molecular genetic indicators. The studies have established that the level of expression of the genes for the pro- and anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4 was by 2.6 and 1.5 times lower, respectively, in the cows with subclinical mastitis and by 5.8 and 3.9 times lower in the cows with clinically pronounced catarrhal mastitis, respectively, in comparison with clinically healthy animals. At the same time, the expression of pro-inflammatory INF- γ was by 7.6 and 14.8 times higher in the cows with subclinical and catarrhal mastitis, respectively, compared to clinically healthy animals.

Key words: cows, subclinical mastitis, catarrhal mastitis, gene expression, cytokines, immunological status

*Authors:***Zimnikov V.** – PhD (Vet. Sci.);**Sashnina L.** – Dr. Habil. (Vet. Sci.);**Pasko N.** – PhD (Biol. Sci.).

Federal State Budgetary Institution "All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy", 394087, Russia, Voronezh, st. Lomonosova, 114b.

References

1. Kamyshanov A. S. Study of biochemical and morphological parameters of the blood of cows during different periods of lactation with mastitis / A. S. Kamyshanov // International Scientific Research Journal. – 2021. – № 3(105). – P. 48-52. DOI: 10.23670/IRJ.2021.105.3.033.
2. Antsiferova Yu. S. Cytokines in obstetrics, gynecology and neonatology / Yu. S. Antsiferova, N. Yu. Sotnikova, M. N. Shokhina // Cytokines and inflammation. – 2002. – № 2(1). – P. 145-156.
3. Zhidovinov A. A. Clinical and laboratory stratification of endogenous intoxication and SIRS in patients with a common form of appendiceal peritonitis / A. A. Zhidovinov, S. V. Chuprov // Cytokines and inflammation. – 2007. – № 6(1). – P. 25-30.
4. Simbirtsev A. S. Cytokines: classification and biological functions / A. S. Simbirtsev // Cytokines and inflammation. – 2004. – № 3(2). – P. 16-22.
5. Serebrennikova S.N. Interleukin-1, interleukin-10 in the regulation of the inflammatory process / S.N. Serebrennikova, I.Zh. Seminsky, N.V. Semenov, E.V. Guzovskaya // Siberian Medical Journal. – 2012. – № 8. – P. 5-7.
6. Chubenko V. A. Immunotherapy is based on cytokines (IL-1, IL-2, FNO, CSF, IFN) / V. A. Chubenko // Hum.Reprod. – 2016. – № 5. – P. 35-41.
7. Yazd A. S. The interleukin-1 family / A. S. Yazd, K. Ghoreschi // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – № 941. – P. 21-29. DOI: 10.1007/978-94-024-0921-5.
8. Cicinelli E., Matteo M., Tinelliet R. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy // Hum.Reprod. – 2015. – № 30(2). – P. 323-353. DOI: 10.1093/humrep/deu292.
9. Kocharyan V. D. Biochemical parameters of blood and milk during mastitis in Holstein cows / V. D. Kocharyan, K. A. Bakanova, M. A. Ushakov, Zh. Sh. Ushakova // Current problems of intensive development of animal husbandry. – 2022. – №. 25-1. – P. 69-76.
10. Zhdanova I. N. The influence of the phytobacterial complex BCL on the morphobiochemical status of cows with clinical mastitis / I. N. Zhdanova // Bulletin of the Perm Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. – 2018. – № 3. – P. 51-57. DOI 10.7242/1998-2097/2018.3.5.
11. Immunological aspects of the fight against cow mastitis / V. Slobodyanik, N. Klimov, L. Cheskidova, E. V. Zverev. – Voronezh: Istoki Publishing House, 2020. – 222 p. – ISBN 978-5-4473-0284-9.
12. Kamyshanov A. S. Hematological parameters of cows during pregnancy with subclinical mastitis and the development of birth and postpartum diseases in them / A. S. Kamyshanov // BIO. – 2021. – № 4(247). – P. 8-11.
13. Methodological recommendations for the assessment and correction of nonspecific resistance of animals // New research methods on problems of veterinary medicine / A. M. Smirnov [etc.]. – Moscow: Russian Academy of Agricultural Sciences, 2007. – Ch. III.: Research methods on problems of veterinary pathology in productive animals. – P. 174-215.