

УДК: 616-097:612.1:577.112.853:599.323.45

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.2.126

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В КРОВИ МЫШЕЙ

Погодаева П.С.-асп. каф. биохимии и физиологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ, (ORCID: 0000-0001-7115-5921), Карпенко Л.Ю.-д.б.н., проф.каф. биохимии и физиологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ (ORCID: 0000-0002-2781-5993), Понамарёв В.С.- асс. кафедры фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ (ORCID: 0000-0002-6852-3110)

Ключевые слова: локальный иммунный ответ, молочная железа, иммуноглобулины, мыши, стафилококковая вакцина. **Key words:** local immune response, mammary gland, immunoglobulins, mice, staphylococcal vaccine



РЕФЕРАТ

Имуноглобулины являются крупными гломерулярными белками плазмы крови и представляют собой важнейший фактор гуморального иммунитета. Концентрация иммуноглобулинов в плазме крови напрямую характеризует способность организма к защите от чужеродных агентов. Чрезвычайно важную роль иммуноглобулины играют в процессе беременности и лактации. Иммуноглобулины классов А, М и G поступают в организм новорожденных с молозивом, таким образом реализуется биологический механизм защиты новорожденных от инфекционных воздействий окружающей среды. Недополучение молодняком иммунологических составляющих молозива связано с широким распространением маститов на животноводческих комплексах, так как любые формы мастита неблагоприятно сказываются на составе и санитарно-гигиенических показателях молока.

Решить данную проблему можно путем локальной антигенной стимуляции молочной железы различными термостабильными антигенами, соответствующими основным возбудителям мастита. Например, обработка молочных желез стафилококковой вакциной за несколько дней до родов позволяет не только защитить лактирующее стадо от маститов стафилококковой этиологии, но и дает возможность передать противостафилококковый иммунитет молодняку в процессе выпойки молозива.

В своем исследовании мы, продолжая изучение физиологических механизмов реализации локального иммунного ответа молочной железы, хотели зафиксировать изменения гуморальных факторов иммунитета при локальной стимуляции молочной железы стафилококковой вакциной на опытной модели лактирующих мышей.

Основной целью настоящего исследования являлось сравнение концентрации иммуноглобулинов классов А, М и G в плазме крови у лактирующих мышей иммунизированных стафилококковой вакциной и особей, не подвергавшихся иммунизации.

По результатам опыта были получены данные, показывающие, что концентрация иммуноглобулинов всех исследуемых классов у иммунизированных особей достоверно превышает концентрацию соответствующих иммуноглобулинов у мышей контрольной группы.

ВВЕДЕНИЕ

Имуноглобулины являются крупными глобулярными белками плазмы крови и представляют собой важнейший фактор гуморального иммунитета [2]. Их основная функция заключается в нейтрализации патогенных микроорганизмов и вирусов. Концентрация иммуноглобулинов в плазме крови напрямую характеризует напряженность иммунитета и способность организма к защите от чужеродных агентов. Чрезвычайно важную роль иммуноглобулины играют в процессе беременности и лактации. Известно, что иммуноглобулины класса G способны преодолевать трансплацентарный барьер, и начинают формировать иммунную систему плода еще в эмбриональном периоде [3]. Позднее, иммуноглобулины классов A, M и G поступают в организм новорожденных с молозивом, таким образом реализуется биологический механизм, дополняющий другие способы защиты новорожденных от инфекционных воздействий окружающей среды. В процессе лактации в молоко поступают антитела, обеспечивающие защиту от тех заболеваний, к которым у матери сохранилась иммунная память. Таким образом, в ходе пассивной иммунизации молодняк приобретает свой собственный физиологический иммунитет. Значение молозивных антител состоит не только в обеспечении пассивного иммунитета, считается также, что они играют роль и в дальнейшем становлении активного иммунитета. Зачастую недополучение молодняком иммунологических составляющих из молозива связано с широким распространением маститов на животноводческих комплексах. Любые формы мастита неблагоприятно сказываются на составе и санитарно-гигиенических показателях молока [4]. Молоко, полученное от коров больных маститом, содержит большое количество соматических клеток, имеет высокую бактериальную обсемененность и зачастую содержит стафилококки, обладающие повышенной биологической активностью. Таким образом молодняк либо вовсе лишается молозива, не получая его

от матерей больных маститом, либо получает молозиво и молоко низкого качества, не способное обеспечить их достаточным количеством необходимых иммуноглобулинов, вместо этого обсеменяя желудочно-кишечный тракт патогенной микрофлорой, приводящей к развитию тяжелых диспепсий.

Решить данную проблему можно путем локальной антигенной стимуляции молочной железы различными термостабильными антигенами, соответствующими основным возбудителям мастита [5]. Одним из наиболее актуальных антигенов в данном вопросе является стафилококковая вакцина [6]. Обработка молочной желез стафилококковой вакциной за несколько дней до родов и начала лактации позволяет не только защитить лактирующее стадо от маститов стафилококковой этиологии, но и дает возможность передать противостафилококковый иммунитет молодняку в процессе выпойки молозива.

В своем исследовании мы, продолжая изучение физиологических механизмов реализации локального иммунного ответа молочной железы, хотели зафиксировать изменения гуморальных факторов иммунитета при локальной стимуляции молочной железы стафилококковой вакциной на опытной модели лактирующих мышей.

Основные цели нашей работы:

Определить концентрацию иммуноглобулинов классов A, M и G в плазме крови у мышей опытной и контрольной групп

Сравнить показатели полученные в результате обработки мышей стафилококковой вакциной и показатели неиммунизированных особей

Сделать вывод о реализации не только клеточных, но и гуморальных механизмов локального иммунитета при введении инфекционного агента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования были проведены согласно принципам биоэтики [1]. Для проведения эксперимента нами были приобретены клинически здоровые декоративные мыши. От них получили потом-

ство, сгруппированное для получения беременных самок, содержащихся в одинаковых условиях. Далее, согласно методике [8] были сформированы опытная (30 особей) и контрольная (30 особей) группы. Мышей, составляющих опытные группы, за 5-7 дней до родов обработали фабричной стафилококковой вакциной (производство АО «Биомед» им. И.И.Мечникова, Россия), введенной подкожно в область молочных желез. Для контрольной группы использовался стерильный изотонический раствор натрия хлорида, по аналогичной схеме. Отбор проб крови проводился в начале первой, второй и третьей недель лактации, для наблюдения динамики изменений. Кровь для исследования отбирали согласно стандартным методикам [7].

Для определения количества иммуноглобулинов в плазме использовали тесты ELISA Kit for Immunoglobulin A, G, M. В основе данных тестов лежит метод иммуноферментного анализа конкурентного ингибирования. Микропланшеты, входящие в этот набор, покрыты антителом, специфичным к соответствующим иммуноглобулинам. Стандарты или образцы добавляются в лунки микропланшета с биотин-конъюгированными антителами, специфичным к соответствующим иммуноглобулинам. Таким образом, запускается реакция конкурентного ингибирования между иммуноглобулинами, мечеными биотином и немечеными иммуноглобулинами (стандарты или образцы). После инкубации несвязанный конъюгат смывается. Далее авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, добавляется в каждую лунку микропланшета и инкубируется. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации иммуноглобулинов в растворе. После добавляется раствора ТМБ-субстрата только в те лунки, которые содержат специфичные иммуноглобулины и биотин-конъюгированные антитела, конъюгированные с авидином изменятся в цвете. После добавления раствора субстрата интенсивность окраски обратно пропор-

циональна концентрации иммуноглобулинов в образце. Ферментно-субстратная реакция прекращается добавлением серной кислоты. Изменение цвета измеряется спектрофотометрически. Затем определяют концентрацию иммуноглобулинов в образцах путем сравнения оптической плотности образцов к стандарту.

Обозначив ожидаемые границы значений, опираясь на имеющиеся литературные данные о концентрации иммуноглобулинов в крови мышей, рассчитали необходимую концентрацию сывороток в исследуемых образцах и приготовили соответствующие разведения. Реагенты и стандарты для анализа были подготовлены в соответствии с инструкцией к наборам. Проведение анализа также осуществлялось в соответствии с инструкцией.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований влияния локальной антигенной стимуляции молочной железы на показатели иммуноглобулинов в крови мышей представлены в таблице 1.

Исходя из полученных данных, мы видим, что содержание иммуноглобулинов классов А, G и M в крови иммунизированных мышей достоверно выше, чем содержание соответствующих иммуноглобулинов у животных контрольной группы на всех этапах лактации. При этом 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 12 % чем у животных контрольной группы на всех этапах лактации, что свидетельствует о стимулирующем влиянии локального антигенного воздействия на гуморальные факторы иммунитета.

ВЫВОДЫ

Наиболее высокие показатели иммуноглобулинов классов А и G приходились на период второй недели лактации, что соответствовало также максимальным показателям количества антигенпрезентирующих клеток молочной железы, установленным в наших предыдущих исследованиях. Таким образом, мы предполага-

Таблица 1

Показатели иммуноглобулинов А, G, М в крови подопытных мышей (n=30)

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±0,039	3,83±0,18	1,35±0,1
2 неделя лактации	1,01±0,033*	4,16±0,14*	1,13±0,068*
3 неделя лактации	0,81±0,047*	2,83±0,075*	0,73±0,07*
Группа опыта (стафилококковая вакцина)			
1 неделя лактации	1,12±0,085**	4,81±0,19**	1,45±0,16**
2 неделя лактации	1,22±0,06**	5,3±0,1**	1,19±0,08**
3 неделя лактации	0,9±0,06**	3,6±0,1**	0,91±0,07**

P < 0,05, по сравнению с предыдущей стадией лактации;

** *P* < 0,05, по сравнению с группой контроля

ем наличие связи между увеличением количества клеток макрофагальной природы и повышением концентрации иммуноглобулинов в крови исследуемых особей, за счет процессинга антигена клетками макрофагального ряда и запуском реакции последовательной активации иммунокомпетентных клеток, финальным звеном которой являются плазматические клетки синтезирующие иммуноглобулины.

EFFECT OF LOCAL ANTIGENIC BREAST STIMULATION ON IMMUNOGLOBULIN INDICATORS IN MICE BLOOD Pogodaeva P.S.-asp. department. Biochemistry and Physiology FGBOU VO SPbGUVU, (ORCID: 0000-0001-7115-5921), Karpenko L.Yu. - Doctor of Biological Sciences, prof. Biochemistry and Physiology FGBOU VO SPbGUVU (ORCID: 0000-0002-2781-5993), Ponamarev V.S. - ass. Department of Pharmacology and Toxicology, FGBOU HE SPbGUVU (ORCID: 0000-0002-6852-3110)

ABSTRACT

Immunoglobulins are large glomerular proteins in blood plasma and are an important factor in humoral immunity. The concentration of immunoglobulins in blood plasma directly characterizes the body's ability to protect itself from foreign agents. Immunoglobulins play an extremely important role

during pregnancy and lactation. Immunoglobulins of classes A, M and G enter the body of newborns with colostrum, thus realizing the biological mechanism of protecting newborns from infectious environmental influences. The shortage of immunological components of colostrum by young animals is associated with the widespread prevalence of mastitis in livestock complexes, since any form of mastitis adversely affects the composition and sanitary and hygienic parameters of milk.

This problem can be solved by local antigenic stimulation of the mammary gland with various thermostable antigens corresponding to the main causative agents of mastitis. For example, the treatment of the mammary glands with staphylococcal vaccine a few days before giving birth allows not only to protect the lactating herd from mastitis of staphylococcal etiology, but also makes it possible to transfer anti-staphylococcal immunity to young animals in the process of drinking colostrum.

In our study, while continuing to study the physiological mechanisms of the implementation of the local immune response of the mammary gland, we wanted to record changes in the humoral factors of immunity upon local stimulation of the mammary gland with staphylococcal vaccine in an experimental model of lactating mice.

The main purpose of this study was to com-

pare the concentration of immunoglobulins of classes A, M and G in blood plasma in lactating mice immunized with staphylococcal vaccine and individuals that were not immunized.

According to the results of the experiment, data were obtained showing that the concentration of immunoglobulins of all studied classes in immunized individuals significantly exceeds the concentration of the corresponding immunoglobulins in mice of the control group.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ нормативных документов, регламентирующих требования к проведению доклинических исследований ветеринарных препаратов / С. В. Герасимов, В. С. Понамарев, Н. Л. Андреева [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 3. – С. 27-29. – DOI 10.17238/issn2072-6023.2020.3.27.

2. Методы диагностики болезней сельскохозяйственных животных / А. П. Курдеко, С. П. Ковалев, В. Н. Алешкевич [и др.]. – 2-е издание, стереотипное. – Санкт-Петербург : Издательство "Лань", 2020. – 208 с. – (Учебники для вузов. Специальная литература). – ISBN 9785811449521.

3. Николаева, О. Н. Изменение содержания сывороточных иммуноглобулинов при коррекции противои инфекционного иммунитета молодняка сельскохозяйственных животных / О. Н. Николаева, А. В. Андреева // Сборник научных трудов по материалам XVII международной научно-практической конференции "Инновационные направления развития АПК

и повышение конкурентоспособности предприятий, отраслей и комплексов - вклад молодых ученых", Ярославль, 29–30 января 2014 года. – Ярославль: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Ярославская государственная сельскохозяйственная академия", 2014. – С. 103-108.

4. Осипова, Н. И. Диагностика скрытых форм мастита у коров / Н. И. Осипова // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2005. – № 2. – С. 494.

5. 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.

6. 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.

7. Степанова, О. И. Метод взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей / О. И. Степанова // Биомедицина. – 2006. – № 2. – С. 137-139.

8. Immunobiology of the mammary gland in mice in the phases of lactation and physiological rest / F. Alistratova, N. Panova, V. Skopichev [et al.] // Reproduction in Domestic Animals. – 2019. – Vol. 54. – No S3. – P. 103.