

УДК: 619:616-018:618.19-002
DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.4.254

КЛЕТОЧНЫЙ БЛОК КАК НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА СЕКРЕТА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Шабунин Б. В. м.н.с. (ORCID ID 0000-0002-2234-3851), Зимников В.И. к. вет. н., ст. науч. сотр. (ORCID ID 0000-0002-6371-7143)
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии фармакологии и терапии, Воронеж, Россия.

Ключевые слова: Клеточный блок, диагностика, мастит, соматические клетки, молоко.
Keywords: cell block, diagnostics, mastitis, somatic cells, milk.

РЕФЕРАТ



Одной из актуальных проблем современного высокопродуктивного молочного скотоводства является проблема массового проявления патологии органов репродукции у коров, влекущей за собой снижение потенциала их плодовитости и молочной продуктивности. В статье представлены данные о характеристике клеточного пула молока у коров при различных формах мастита, а также при нормальном функционировании молочной железы. Для исследования у лактирующих коров ($n = 20$) с подтвержденным диагнозом на субклинический ($n = 8$) и клинически выраженный маститом ($n = 8$), а также у здоровых животных ($n = 6$) отбирался секрет молочной железы для проведения гистологических исследований. В современной науке популярность набирает методика клеточных блоков. С её помощью можно более детально изучить биологические жидкости, при надобности – провести дополнительные гистохимические исследования. Данная методика применяется достаточно редко, так как является достаточно трудозатратной, но несмотря на это она имеет огромную ценность при изучении патогенеза воспалительных заболеваний молочной железы. Было показано, что у здоровых коров в препаратах визуализируется небольшое количество клеток, среди которых лейкоциты составляют порядка 50%. При субклинической форме нейтрофилы составляли 70% клеточного пула, при этом у части из них была вакуолизированная цитоплазма. В препаратах клеточных блоков молока при клиническом мастите нейтрофилы занимали практически всю площадь препарата, при этом помимо вакуолизации, отмечалась гиперсегментация ядра, кариопикноз и кариорексис. Проведенные исследования показали, что данный метод является перспективным при изучении патогенеза заболеваний молочной железы.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современного высокопродуктивного молочного скотоводства является проблема массового проявления патологии органов репродукции у коров, влекущей за собой снижение потенциала их плодовитости и молочной продуктивности. Воспаление вымени или мастит является одной из самых

распространенных патологий в животноводстве, в животноводческих предприятиях Российской Федерации по разным данным маститом переболевает от 20 до 60% поголовья. В США по данным Philpot and Nickerson ущерб от мастита составляет 180\$ на корову в год [4].

Разработка новых методик диагностики мастита является одной из основных

задачей ветеринарной науки. На данный момент существует большое количество методов диагностики мастита. На больших комплексах используют диагностику измерением электропроводности молока во время доения [3]. Это обусловлено сложностью использования ручных методов на большом поголовье, помимо этого, данный метод позволяет проводить диагностику ежедневно, что способствует своевременному выявлению и применению мер по коррекции заболевания.

На фермах с поголовьем до 1000 голов чаще используют метод «Кенотест» или его аналоги [2]. Данная методика обладает хорошей точностью, проста в использовании, но является трудозатратной, поэтому такие диагностические мероприятия проводят раз в 14 дней. Из-за этого можно упустить коров, которые заболели маститом в промежуток между мероприятиями.

Подсчет соматических клеток также является современной методикой выявления мастита. Её большим преимуществом является возможность более точное отслеживание динамики развития заболевания и его санации [2]. Однако оборудование для подсчета является весьма дорогостоящим и присутствует не в каждом хозяйстве.

Для научных исследований в разной степени используются все вышеперечисленные методики, однако ни одна из них не может в полной мере показать клеточ-

ный состав молока, а также провести дополнительные научные исследования для изучения соматических клеток.

В современной науке популярность набирает методика клеточных блоков. С её помощью можно более детально изучить биологические жидкости, при необходимости – провести дополнительные гистохимические исследования [6]. Данная методика применяется достаточно редко, так как является достаточно трудозатратной, но несмотря на это она имеет огромную ценность при изучении патогенеза воспалительных заболеваний молочной железы.

Целью данной работы является апробация метода клеточных блоков для исследования клеточного состава секрета молочной железы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для исследования у лактирующих коров ($n = 20$) с подтвержденным диагнозом на субклинический ($n = 8$) и клинически выраженный маститом ($n = 8$), а также у здоровых животных ($n = 6$) отбирался секрет молочной железы для проведения гистологических исследований.

Секрет вымени для исследований отбирался в стерильные пробирки объемом 20 мл. Для изготовления клеточных блоков, молоко помещали в пробирки ерindorph 1,5 мл, затем центрифугировали в течение 10 минут при скорости 700 об/мин [5]. Затем из пробирки удаляли недо-

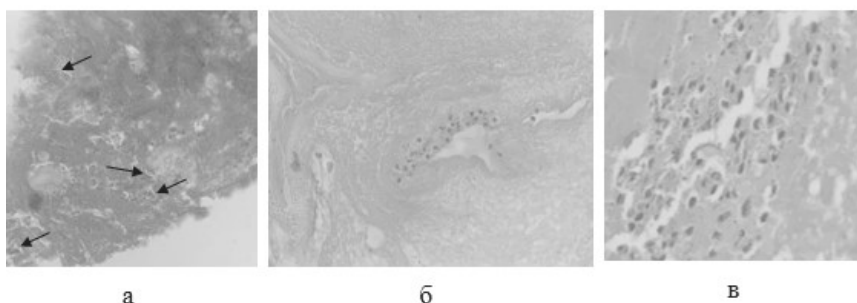


Рисунок 1 клеточный блок молока от здоровых животных. А – ув. 40х, Б – ув. 100х, В – ув. 1000х. Окраска гематоксиллин-эозин.

садочную жидкость и отбирали осадок при помощи лабораторных пипеток. При необходимости осадок подкрашивали гематоксилином для того чтобы сделать его более заметным для глаз. Затем в пробирку к образцу добавляли подогретый жидкий агар и перемешивали. Смесь замораживали при температуре -20 градусов Цельсия для затвердевания агара. Затем сгусток переносили в гистологические кассеты с паралоновыми прокладками. После этого кассету с образцом помещали в 10% забуференный гистологический формалин для фиксации на 1 час. После фиксации материал обезживался в спиртах возрастающей крепости, для заливки использовался гистологический парафин «Histomix», изготовление гистологических срезов толщиной 3мм проводили на микротоме МПС-2. Полученные препараты окрашивались Гематоксилином-Эозином по стандартному протоколу. Для морфометрии и получения фото-

графий использовали микроскоп «Биомед» со встроенной камерой и программным обеспечением «TourView».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В гистологических препаратах, полученных от здоровых животных визуализировался небольшой фрагмент, окрашенный эозинофильно. Такая структура препарата является следствием центрифугирования молока, из-за чего в осадке остается белок и небольшое количество соматических клеток – нейтрофилов и единичных эпителиальных. Клеточные блоки, полученные от здоровых коров, имеют сравнительно небольшой размер и трудно различимы невооруженным глазом. Из рисунка 1 «А» видно, что большая часть препарата в поле зрения окрашена эозинофильно. Базофильные островки, отмеченные стрелочками – скопления клеток. На рисунке 1 «Б» представлен другой препарат, из которого также видно, что при физиологически здоровой молочной

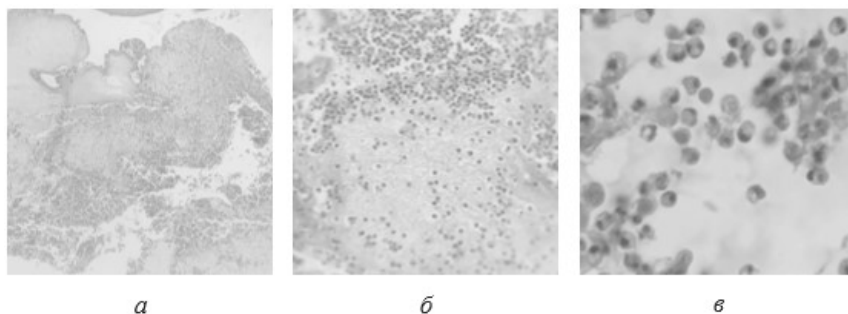


Рисунок 2 клеточный блок с субклиническим маститом. А – ув. 40х, Б – ув. 200х, В – ув. 1000х. Окраска гематоксилин-эозин.

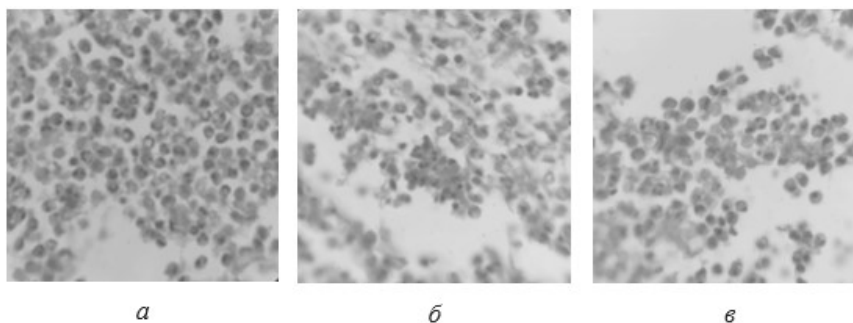


Рисунок 3 клеточный блок с клиническим маститом. А, Б, В – ув. 1000х, окраска гематоксилин-эозин.

железе визуализируется минимальное количество лейкоцитов. На рисунке 1 «В» видно, что клетки в поле зрения располагаются диффузно, их количество в поле зрения 1000 крат минимальное. Среди клеток преобладали эпителиальные (50%), лейкоциты были представлены единичными макрофагами, лимфоцитами и нейтрофилами. Нейтрофилы имели ядро из двух сегментов, оптически-светлую цитоплазму. У лимфоцитов ядро было округлым, смещено к полюсу и занимало почти всю цитоплазму. Макрофаги характеризовались большей по сравнению с другими лейкоцитами цитоплазмой с центрально расположенным ядром. Сама цитоплазма была окрашена слабо-эозинофильно, с единичными вакуольными включениями.

У коров с субклинической формой мастита в микропрепаратах молока было видно, что лейкоциты и белковые массы скапливались по разным полюсам среза, что наблюдается на рисунке 2 «а». Расположение клеток на одном из полюсов является следствием того, что при центрифугировании клетки оседают ниже белков из-за их большей массы. Клетки были представлены в большинстве нейтрофилами (70%), у части гранулоцитов была вакуолизированная цитоплазма и смещенное к полюсу ядро, состоящее из двух сегментов. Макрофаги имели вытянутую цитоплазму с вакуольными включениями. Лимфоциты визуализировались в небольшом количестве, имели характерное для данных клеток строение. В поле зрения микроскопа 1000х визуализировалось от 12 до 40 клеток, что показано на рисунке 2 «в». На рисунке 2 «б» представлено поле зрения препарата, где видно, как при приближении к полюсу, расстояние между клетками уменьшалось.

В препаратах молока с подтвержденным клиническим маститом было видно значительное преобладание клеток воспаления, которые занимали 90% препарата. При исследовании на увеличении 1000 крат (рис 3) было отмечено, что обнаруженные нейтрофилы имели вакуолизированную цитоплазму, гиперсегментирован-

ное ядро, встречались также клетки с признаками кариорексиса и кариопикноза. Данные изменения в гранулоцитах являются маркером сильной воспалительной реакции, а также воздействия на них токсинов бактерий. Между клетками визуализировались нити фибрина, которые также появились в молоке вследствие воспалительных процессов. Клетки лимфоидного ряда были представлены в небольшом количестве, среди них преобладали гистиоциты со смещенным к полюсу ядром и светлым участком около него. Макрофаги имели ядро с признаками пикноза и вакуолизированную цитоплазму.

Из приведенных данных можно сделать заключение, что при исследовании мастита методом клеточных блоков стоит обращать внимание на площадь среза, площадь, которую на препарате занимают соматические клетки, количество клеток в поле зрения и наличие изменений в них. В таблице представлены гистологические характеристики клеточного пула секрета молочной железы у исследуемых коров. Видно, что с увеличением тяжести мастита, увеличивается размер среза на предметном стекле, клетки на препарате занимают большую площадь, при этом также увеличивается их количество в поле зрения микроскопа. Важной характеристикой является наличие качественных изменений в клетках. При клиническом мастите будут присутствовать нейтрофилы с кариопикнозом и кариорексисом, в то время как клетки с вакуолизированной цитоплазмой присутствуют также и при субклиническом мастите.

Проведенные исследования показали, что данный метод обеспечивает возможность более детального изучения клеточного состава секрета молочной железы, что является несомненным преимуществом в первую очередь для научных исследований [1]. Данный метод также дает возможность проводить иммуногистохимические исследования, которые позволяют более детально изучить патогенез разных форм мастита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследова-

Таблица

Морфологические характеристики гистологических показателей молока при различных формах мастита

	Здоровое вымя	Субклинический мастит	Клинический мастит
Размер препарата в диаметре	2 – 5 мм	6 – 10 мм	> 10 мм
Доля соматических клеток	Менее 20%	20% - 60%	От 65% - 100%
Кол-во клеток в поле зрения 1000х	0-10	12-40	50 и более
Наличие изменений в клетках	-	Вакуолизация цитоплазмы в части клеток	Вакуолизация цитоплазмы у большинства клеток, гиперсегментация ядра, кариопикноз, кариорексис

ний была изучена характеристика клеточного пула секрета молочной железы при ее физиологически нормальном функционировании, а также при субклиническом и клинически выраженном мастите. Так субклинический мастит характеризуется диаметром среза 6 – 10 мм, клетки занимают до 60% площади, и у части из них имеется вакуолизованная цитоплазма. А при клинической форме мастита клеточный пул представлен нейтрофилами и макрофагами, которые занимают до 100% площади среза, при этом визуализируются изменения ядер нейтрофилов – кариорексис и кариопикноз.

CELL BLOCK AS A NEW METHOD FOR STUDYING THE CELLULAR COMPOSITION OF THE MAMMARY GLAND SECRETION

Shabunin B. V., Junior Scientific Associate (ORCID ID 0000-0002-2234-3851), Zimnikov V.I., Cand. of Vet. Sciences, Senior Scientific Associate (ORCID ID 0000-0002-6371-7143), FSBSI “All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy”, Voronezh, Russia.

ABSTRACT

One of the urgent problems of modern highly productive dairy cattle breeding is the problem of the mass manifestation of the pathology of the reproductive organs in cows, which entails a decrease in the poten-

tial of their fertility and milk productivity. The article presents data on the characteristics of the milk cell pool in cows with various forms of mastitis, as well as with the normal functioning of the mammary gland. For the study in lactating cows (n = 20) with a confirmed diagnosis of subclinical (n = 8) and clinically expressed mastitis (n = 8), as well as in healthy animals (n = 6), the secret of the mammary gland was taken for histological studies. In modern science, the technique of cell blocks is gaining popularity. With its help, it is possible to study biological fluids in more detail, if necessary, to conduct additional histochemical studies. This technique is used quite rarely, as it is quite labor-intensive, but despite this it is of great value in studying the pathogenesis of inflammatory diseases of the mammary gland. It has been shown that in healthy cows a small number of cells are visualized in preparations, among which leukocytes make up about 50%. In the subclinical form, neutrophils accounted for 70% of the cell pool, while some of them had vacuolated cytoplasm. In the preparations of cell blocks of milk with clinical mastitis, neutrophils occupied almost the entire area of the preparation, while in addition to vacuolization, hypersegmentation of the nucleus, karyopyknosis and karyorrhexis were noted. The conducted studies have shown that this method is promising in the study of the pathogenesis of breast diseases.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Климов Н.Т. Влияние бычьих рекомбинантных альфа и гамма-интерферонов на цитологические и микробиологические показатели молока при субклиническом мастите / Н. Т. Климов, В. И. Зимников, Д. А. Ерин [и др.] // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2018. – № 3(4). – С. 100-103.
2. Пашенцев А. В. Оксидантно-антиоксидантный статус клинически здоровых коров при применении Имунофана / Пашенцев, А. В., Климов, Н. Т., Зимников, В. И., Ермолова, Т. Г., Алиев, А. Ю // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2019. – №. 2. – С. 133-137.
3. Сковцов Е. А. Влияние применения доильной робототехники на качество молока / Сковцов, Е. А., Сковцова, Е. Г., Орешкин, А. А., Потехин, В. Н // Агропродовольственная политика России. – 2016. – №. 9. – С. 44 - 47.
4. Philpot W. N., Nickerson S. C. Mastitis: counter attack. – 1991.
5. Hegazy R.A. Fine needle aspiration cytology and cell-block study of various breast lumps / Hegazy, R.A., Hegazy, A.A., Fetouh, F.A., Ibrahim, S. // American Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2014. – Т. 2. №. 1. – С. 8-17.
6. Jana S. Evaluation of the diagnostic role of P63 immunostaining in aspiration cytology by smear or cell block preparation for the characterisation of breast lesions / Jana, S., Jagani, R., Mukherjee, D., Basak, U., Singh, E. // Exploratory Animal and

Medical Research. – 2014. – С.131-47.

REFERENCES

1. Klimov N.T., Zimnikov V.I., Erin D.A. [et al.] Effect of recombinant bovine interferons alpha and gamma on cytological and microbiological indicators of milk in case of sub-clinical mastitis. Bulletin of Veterinary Pharmacology. 2018. - No. 3(4). - P. 100-103 (in Russ.)
2. Pashentsev A.V., Klimov N.T., Zimnikov V.I., Ermolova T.G., Aliev A.Yu. Oxidant-antioxidant status of clinically healthy cows when using Imunofan. Bulletin of Veterinary Pharmacology. 2019. – No. 2. - P. 133-137 (in Russ.)
3. Skvortsov E.A., Skvortsova E.G., Oreshkin A.A., Potekhin V.N. Effect of the use of milking robotics on the quality of milk [Агропродовольственная политика России]. 2016. – No. 9. - P. 44 – 47 (in Russ.)
4. Philpot W. N., Nickerson S. C. Mastitis: counter attack. – 1991.
5. Hegazy R.A. Fine needle aspiration cytology and cell-block study of various breast lumps / Hegazy, R.A., Hegazy, A.A., Fetouh, F.A., Ibrahim, S. // American Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2014. – V. 2. No. 1. – P. 8-17.
6. Jana S. Evaluation of the diagnostic role of P63 immunostaining in aspiration cytology by smear or cell block preparation for the characterisation of breast lesions / Jana, S., Jagani, R., Mukherjee, D., Basak, U., Singh, E. // Exploratory Animal and Medical Research. – 2014. – P.131-47.