

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

На правах рукописи

Погодаева Полина Сергеевна

**ФОРМИРОВАНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В ТКАНЯХ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА
АНТИГЕННУЮ СТИМУЛЯЦИЮ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ)**

06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология
и морфология животных

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Карпенко Лариса Юрьевна

Санкт-Петербург, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ | |
| 1. Обзор литературы..... | 11 |
| 1.1 Иммунологические процессы в молочной железе..... | 11 |
| 1.1.1 Строение и морфогенез молочной железы..... | 11 |
| 1.1.2 Механизмы иммунного ответа в молочной железе..... | 19 |
| 1.1.3 Влияние молозива на формирование колострального иммунитета..... | 29 |
| 1.1.4 Пути антигенной стимуляции при борьбе с маститом..... | 33 |
| 1.2 Основные возбудители мастита и факторы их патогенности..... | 36 |
| 1.2.1 Факторы патогенности стафилококков..... | 37 |
| 1.2.2 Факторы патогенности кишечной палочки..... | 39 |
| 1.2.3 Факторы патогенности стрептококков..... | 42 |
| 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 46 |
| 2.1 Материалы и методы исследований..... | 46 |
| 2.2 Результаты исследований..... | 65 |
| 2.2.1 Локальный иммунный ответ молочной железы на под влиянием стафилококковой вакцины..... | 65 |
| 2.2.1.1 Результаты цитологического исследования мазков-отпечатков молочной железы..... | 65 |
| 2.2.1.2 Результаты гистологического исследования препаратов молочной железы..... | 69 |
| 2.2.1.3 Результаты иммунологического исследования сыворотки крови лактлирующих мышей..... | 78 |
| 2.2.1.4 Корреляционная зависимость антигенпрезентирующих клеток макрофагального ряда и иммуноглобулинов в сыворотке крови..... | 81 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.2 Локальный иммунный ответ молочной железы под влиянием различных термостабильных антигенов..... | 84 |
| 2.2.2.1 Результаты гистологического исследования препаратов молочной железы..... | 84 |
| 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 92 |
| 3.1 Обсуждение результатов исследования..... | 92 |
| 3.2 ВЫВОДЫ..... | 97 |
| 3.3 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ..... | 99 |
| 3.4 РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ..... | 99 |
| 4. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 100 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В 2021 году Госдума Российской Федерации приняла законопроект о контроле над применением антибиотиков в животноводстве, который предполагает введение жесткого контроля за назначением и применением антимикробных препаратов в рамках борьбы с антибиотикорезистентностью. Таким образом, разработка альтернативных методов лечения и профилактики инфекционных болезней является актуальной для ветеринарии и животноводства [123].

Молочное скотоводство в свою очередь, является одной из основных отраслей сельского хозяйства в России, однако, зачастую, серьезным препятствием для получения качественной молочной продукции становится высокий процент заболеваемости маститами среди продуктивных животных.

Согласно данным Боженова, С.Е. (2012), Галкина, А.В. (2017), Джавадова, Э.Д. (2021), Зирук, И.В. (2016), Климова, Н.Т., Слободяника В.И. (2014), Кононенко, К.Н. (2020.), Костерина, Д.Ю. (2020), Макавчик, С.А., Смирновой, Л.И., Сухинина, А.А., (2020), главную роль в этиологии маститов играет бактериальный фактор, а основными возбудителями являются бактерии группы стафилококков, стрептококков и кишечная палочка.

Как сообщают Белкин, Б.Л. (2021), Конопельцев, И.Г. (2010), Скопичев, В.Г. (2016, 2018) основным способом лечения маститов до настоящего времени является применение многокомпонентных антибиотических препаратов. Однако этот метод лечения имеет ряд существенных недостатков, таких как: нарастающая устойчивость возбудителей мастита к данной группе препаратов и негативное влияние антибиотиков на качество получаемого молока.

Таким образом, основное внимание в вопросе борьбы с маститом должно быть направлено на защиту поголовья от его возбудителей. Весьма

перспективными представляются методы, направленные на активацию эндогенных защитных механизмов животных. Одним из них является метод локальной антигенной стимуляции. К его достоинствам можно отнести достаточно продолжительный период защиты от заболевания, отсутствие негативного влияния на получаемую молочную продукцию и самое главное, отсутствие приспособительных механизмов у возбудителей мастита.

Дилекова, О.В. (2019, 2020), Карпенко, Л.Ю. (2011, 2013), Скопичев, В.Г. (2016), Слободяник, В.И. (2007), Соловьева, Л.П. (2013., 2021) считают, что благоприятным фактором для проведения локальной антигенной стимуляции молочной железы является само ее строение, а именно, наличие большого количества лимфоидной ткани, участвующей в синтезе факторов клеточного иммунитета.

Однако сам механизм формирования локального иммунного ответа молочной железы на данный момент изучен недостаточно подробно. Поэтому выявление и характеристика первичного звена, индуцирующего реакцию иммунной системы в ответ на воздействие термостабильных антигенов, раскрытие роли антигенпрезентирующих клеток макрофагальной природы в формировании локального иммунного ответа молочной железы является, на наш взгляд, актуальным и имеет большое научное и практическое значение.

Степень разработанности проблемы. Одной из первых разработок в области иммунологической терапии мастита стала работа Спесивцева Ю.А. (1995) представлявшая собой способ лечения и профилактики острых лактационных маститов с применением лейкоцитарных взвесей, полученных от доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином. Позднее Евглевский, А.А. (2003) предложил вводить стафилококковый анатоксин интерцистернально в пораженные доли вымени, после чего, проводя бактериологическое исследование секрета вымени и учитывая клинические признаки зафиксировал успешное терапевтическое действие данного метода.

Скопичев, В.Г. (2009, 2018) в своих разработках предложил нанесение композиции, содержащей стафилококковый анатоксин на область молочного зеркала, что также оказывало терапевтический эффект.

Однако, не смотря на доказанную эффективность данных методов лечения и профилактики мастита, сам механизм формирования локального иммунитета в молочной железе все ещё остается недостаточно изученным и требует проведения дальнейших исследований.

Цель и задачи исследования. Цель исследования - изучить механизмы формирования локального иммунитета в молочной железе.

Согласно выдвинутой рабочей гипотезе, первичным звеном локального иммунного ответа могут являться антигенпрезентирующие клетки макрофагальной природы, находящиеся в тканях молочной железы, подкожно-жировой клетчатке и эпидермисе.

Для реализации поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Обнаружить антигенпрезентирующие клетки макрофагальной природы в молочной железе путем цитологического и гистологического исследования.
2. Выявить роль антигенпрезентирующих клеток в формировании иммунитета путем их количественного анализа после воздействия термостабильными антигенами, а также на различных этапах лактации.
3. Выявить взаимосвязь локальной иммунизации и содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови.
4. Определить взаимосвязь между количеством антигенпрезентирующих клеток и содержанием иммуноглобулинов в сыворотке крови.

Научная новизна работы. В представленном исследовании впервые на опытной модели была доказана роль антигенпрезентирующих клеток в формировании локального иммунного ответа молочной железы в ответ на локальную антигенную стимуляцию термостабильными антигенами.

Впервые была выявлена корреляционная зависимость между количеством антигенпрезентирующих клеток макрофагальной природы и изменениями концентрации иммуноглобулинов различных классов в сыворотке крови подопытных животных.

Теоретическая и практическая значимость. Значимость выбранной темы определяется отсутствием теоретической проработанности методов локальной антигенной стимуляции молочной железы, а также потребностью в применении альтернативных методик профилактики маститов бактериальной этиологии у сельскохозяйственных животных. Более глубокое понимание физиологических механизмов формирования локального иммунитета молочной железы позволит в дальнейшем применять на практике различные комбинации термостабильных антигенов или аутовакцины, а также предлагать более эффективные схемы их использования в рамках локальной антигенной стимуляции, для комплексной защиты животных от основных возбудителей мастита.

Методология и методы исследования. Методологической основой данной работы стали труды отечественных и зарубежных ученых в области иммунологической профилактики заболеваний бактериальной этиологии. Также учитывались последние данные бактериологических исследований, раскрывающих свойства основных возбудителей мастита. В ходе исследования применялись утвержденные методики для изготовления и окраски гистологических и цитологических препаратов, сертифицированная лабораторная техника и специализированные иллюстрированные пособия для изучения морфологии молочной железы. Для получения данных о содержании иммуноглобулинов в сыворотке крови применялись утвержденные методики

иммунологического анализа в соответствии с инструкциями к сертифицированным наборам.

В процессе проведения исследований применялись клинические, патоморфологические, иммунологические, цитологические и гистологические методы, а также статистические методы исследования, включающие использование современного программного обеспечения (обработка полученного цифрового материала с использованием вариационной статистики и применением критерия погрешности по Стьюденту на компьютере с использованием лицензированного программного обеспечения, применяемого в биологических и ветеринарных исследованиях).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. наличие антигенпрезентирующих клеток макрофагальной природы в молочной железе;
2. изменение количества антигенпрезентирующих клеток после воздействия термостабильными антигенами, а также на различных этапах лактации;
3. влияние локальной антигенной стимуляции на содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови;
4. связь в изменении количества антигенпрезентирующих клеток с показателями иммуноглобулинов сыворотки крови.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Достоверность данных определяется достаточным объемом выборки анализируемых данных и их статистической обработкой. Полученные данные согласуются между собой и взаимно дополняют друг друга, выводы обоснованы и вытекают из результатов исследования.

Результаты исследований доложены на следующих научных и научно-практических конференциях: 23-th Annual conference of the European society

for domestic animal reproduction (Санкт-Петербург, 2019); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны»» (Санкт-Петербург, 2020); 75-ой международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ (Санкт-Петербург, 2021); Международной научно-практической конференции «Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК» (Санкт-Петербург, 2021); 2021 ASAS-CSAS-SSASAS Annual Meeting and Trade Show (2021).

Результаты исследования используются в учебном процессе кафедры физиологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»; кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия»; кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии «Казанской государственной академии ветеринарной медицины», кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», а также в клинической практике сети ветеринарных клиник «Нева-Барс» и диагностической работе ветеринарной лаборатории «Барс-Диагностикс».

Материалы диссертационной работы представлены на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в 2022 году, где получили диплом за третье место.

Личный вклад соискателя. Представленная диссертационная работа является результатом научных исследований автора в период с 2017 по 2022 годы. Личный вклад автора состоит в самостоятельной разработке концепции работы; подготовке опытной модели; получении патологоанатомического материала; проведении гистологических, цитологических и иммунологических исследований; анализе и интерпретации полученных

результатов. Некоторые исследования и публикации выполнены совместно с профессорско-преподавательским составом кафедры биохимии и физиологии, а также другими учёными, которые не возражают против использования в диссертационной работе материалов совместных исследований.

Публикации результатов исследований. Основные положения и выводы диссертационной работы изложены в 12 публикациях, 4 из которых изданы в рецензируемых журналах рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Международный вестник ветеринарии – 3, Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана - 1), в международных библиографических базах цитирования Scopus - 1, Web of science – 1, в региональной печати - 6.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 121 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, заключение, предложения для практики, перспективы дальнейшей разработки темы, список использованной литературы, приложения.

Иллюстрационный материал диссертации включает 36 рисунков и 7 таблиц. Список использованной литературы включает 160 наименований, в том числе 48 иностранных источников.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Обзор литературы

1.1 Иммунологические процессы в молочной железе

1.1.1 Строение и морфогенез молочной железы

Строение молочной железы, её морфология и видовые особенности достаточно подробно изучены и описаны специалистами в области ветеринарной анатомии и физиологии – Зеленеvским, Н.В. (2013, 2020), Климовым, А.Ф., Акаевским, А.И. (2011), Скопичевым, В.Г (2016, 2017, 2018), Соловьевой, Л.П. (2013, 2021), Щипакиным, М.В. (2013, 2014).

Молочные железы (*glandulae lactiferae*) – симметричные производные кожи, имеющие сложное трубчато-альвеолярное строение. У свиней, грызунов и хищников располагаются в области живота в виде отдельных долей, образующих множественное вымя. У жвачных животных и лошадей располагаются на брюшной стенке между бедрами в области паха образуя компактное вымя.

Согласно данным Зеленеvского, Н.В. (2013, 2020), Климова, А.Ф., Акаевского, А.И. (2011), Щипакина, М.В. (2013, 2014) - молочная железа состоит из тела (*corpus mammae*) и сосков (*papillae*), имеет паренхиму и соединительнотканную строму. Паренхима железы состоит из долек (*lobuli lactiferae*), образованных молочными альвеолами (*alveolae lactiferae*), молочными трубочками (*tubulae lactiferae*), молочными каналами (*canales lactiferes*) и молочными протоками (*ductus lactiferi*). Последние из указанных выше структур открываются в молочную цистерну (*sinus lactiferi*). В молочных альвеолах и трубочках осуществляется секреция молока, а во время усиленной лактации оно может секретироваться и в молочных каналах. Альвеолы, трубочки и каналы состоят из монослоя кубических железистых и корзинчатых миоэпителиальных клеток. Молочные ходы выстилает слизистая оболочка, состоящая из двухрядного цилиндрического эпителия и

соединительнотканной стромы. От молочной цистерны к верхушке соска тянется сосковый канал (*canalis papillaris*), который открывается на вершине соска отверстием соскового канала (*orificium lactiferum*). Слизистая оболочка соскового канала выстлана многослойным плоским неороговевающим эпителием. В основе выходного отверстия соскового канала лежит кольцевая мышца – сфинктер соска (*m. sphinter papillae*). Снаружи сосок покрыт безволосой кожей. Между кожей соска и слизистой оболочкой соскового канала залегают эластическая и мышечная ткани.

Строма железы представлена соединительной тканью, содержащей значительное число адипоцитов. От крупных трабекул отходят более мелкие пучки соединительной ткани, окутывая молочные альвеолы, молочные трубочки и молочные каналы, они поддерживают их и обеспечивают проход элементов гемомикроциркуляторного русла. По соединительнотканным прослойкам проходят интрамуральные артерии и вены, включая терминальные микрососуды [19,34,86,109].

Согласно данным Hollmann, К. Н. (1997), Зеленецкого, Н.В. (2013, 2020), Скопичева, В.Г. (2016, 2017, 2018), Корзенникова, С.Ю. (2016) - морфогенез молочной железы начинается в эмбриональном периоде. У эмбрионов по обеим сторонам вдоль белой линии живота они закладываются в виде узких длинных полосок утолщенного эпителия (млечные тяжи). Затем млечные тяжи уменьшаются, становятся прерывистыми и образуют серию расширенных и утолщенных эктодермальных млечных бугорков. Развивающиеся млечные бугорки погружаются в мезенхиму и переформируются в млечные почки – первичную структуру будущего вымени. Разрастаясь, мезенхима даёт начало будущей соединительной ткани и адипоцитам молочных холмов. Во время роста млечной почки мезодерма дифференцируется на четыре различных морфофункциональных слоя:

- 1) ближайший к млечной почке слой – предшественник мышечного слоя сфинктера соска;

2) следующая зона – будущий соединительнотканый скелет (стромы) соска;

3) мезенхимальные клетки третьей зоны рыхло окружают ветвящиеся терминалии протоков и образуют в дальнейшем соединительнотканую строму долек и долей;

4) следующая зона является предшественником внутридольковых соединительнотканых трабекул и межальвеолярных перегородок.

По данным Hollmann, K. H. (1978), Pitelka, D. R. (1984), Зеленецкого, Н.В. (2013, 2020) и Корзенникова, С.Ю. (2016) - к моменту рождения у большинства животных оказываются сформированными соски, соединительнотканый скелет, включая связочный аппарат, и междольковые перегородки молочной железы. От рождения до наступления половой зрелости развитие молочной железы характеризуется наиболее интенсивным ростом системы протоков и концевых отделов.

Таким образом, в период пренатального онтогенеза молочной железы с опережением развиваются мезенхима и терминальные кровеносные сосуды, а вслед за ними – паренхиматозные и нервные элементы органа. Дальнейшее развитие молочной железы сводится, главным образом, к увеличению ее размеров и нарастанию объема массы структурных элементов органа.

Ряд авторов – Hollmann, K. H. (1978), Pitelka, D. R. (1984), Племяшов, К.В. (2007), Селезнев, С.Б. (2021), Слободяник, В.И. (2009), Скопичев, В.Г. (2017, 2018), сходятся во мнении, что ткань молочной железы претерпевает циклические изменения, связанные с половой функцией животного. Интенсивный рост железистой ткани происходит после полового созревания и особенно после наступления первой беременности. В первый месяц беременности, на фоне активного транспорта триглицеридов из жировых депо, отмечается снижение скорости роста вымени. В объемных структурах, резервированных жировыми дольками, формируются железистые структуры. Развитие секреторного аппарата обуславливает повышение молокообразования в первые месяцы лактации. Вследствие прогрессивного

увеличения объема паренхимы на поздних стадиях беременности значительно возрастает скорость роста массы железы. После этого молочная продуктивность постепенно уменьшается. К концу лактации альвеолярная ткань редуцируется, замещаясь жировой тканью, размеры железы уменьшаются, и она перестает функционировать., наступает сухостойный период.

По мнению Скопичева, В.Г. (2017, 2018) - изучение морфогенетических процессов молочной железы является одним из ключевых аспектов в понимании механизма лактации. На финальном этапе маммогенеза завершается формирование структуры железистой паренхимы молочной железы. Изменения же, происходящие в молочной железе в предлактационный период, принято рассматривать как процесс физиологической регенерации. В связи с этим особого внимания заслуживает изучение роли лимфоидной системы в организации морфогенетических процессов.

Иммунокомпетентные клетки (сегментоядерные лейкоциты, лимфоциты и макрофаги) оказывают влияние на ряд ключевых процессов в молочной железе выполняя функции локальных регуляторов, что успешно доказано в работах Карпенко, Л.Ю. (2004, 2011, 2013) по определению активности лейкоцитарных клеток в молозиве. Лимфоидная система так же принимает активное участие в деструктивных состояниях молочной железы и влияет на изменение антигенной природы ткани в период после окончания кормления.

Слабая активность иммунной системы, а также использование ее резервов на борьбу с другими антигенами приводит к нарушению предлактационной подготовки молочной железы и последующему возникновению гипогалактии [87].

1.1.1.1 Формирование структуры альвеол при участии иммунной системы

Одним из важных аспектов изучения процессов становления лактации является период завершения процессов маммогенеза, в результате которых формируется структура стромы и железистой паренхимы органа.

Согласно исследованиям Hollmann, K. H. (1978), Pitelka, D. R. (1984), Sordillo, L. (1988), Скопичева, В.Г. (2016, 2017, 2018), Слободяника, В.И. (2009) и Соловьевой, Л.П. (2013, 2021) - наступление беременности у животных сопровождается в молочной железе интенсивными пролиферативными процессами, которые обеспечивают дальнейший рост её протоков и образование ампулообразных альвеолярных зачатков. Образование альвеолярных клеточных скоплений происходит в условиях перехода клеток от недифференцированного состояния к клеточной специализации. В конце беременности дифференциация клеток значительно преобладает над пролиферативными процессами. Сосуществование обоих процессов позволяет наблюдать многочисленные митозы, включая морфологические признаки наступающего секретобразования. Первичными эффектами пробуждения синтетической активности секреторные клетки обязаны индуцирующим влияниям мезенхимы.

Мезенхима является не только материалом для формирования соединительнотканной стромы, она также принимает непосредственное участие в дифференцировке клеток молочной железы как в эмбриональный период, так и в ходе предлактационного адаптогенеза молочной железы.

Sordillo, L. (1997), Скопичев, В.Г. (2016, 2017, 2018) и Толкунов, Ю.А. (2005) считают, что альвеолы начинают свое формирование в результате активной пролиферации в ампулообразных концевых утолщениях протоков из накапливающихся недифференцированных групп клеток. При этом мезенхима, способствующая дифференциации клеток секреторного эпителия, имеет не одинаковое влияние на клеточные элементы различной

локализации, и преимущественно действует на периферический слой клеток за счет индуцирующего мезенхимального фактора.

В ходе этого процесса, благодаря активным миграционным свойствам клеток зачатков альвеол обеспечивается специфическое распределение клеток – одни оказываются снаружи, другие располагаются внутри клеточного конгломерата.

Клетки, не затронутые действием мезенхимального фактора, подвергаются дегенеративным изменениям и деструкции при участии протеолитических ферментов лимфоидных клеток и аутолиза, в результате чего в альвеоле остаются лишь наружно расположенные клетки.

Таким образом, завершается формирование монослоя секреторного эпителия, выстилающего полость и осуществляющего эвакуацию оформленного молочивного секрета из железы [87,89].

По данным Sordillo, L. (1988), Племяшова, К. В., Конопатова, Ю. В., Соколова, В. И. (2007) - исследование механизмов гормональной регуляции пролиферации и дифференциации выявило последовательность молекулярных процессов, приводящих к активации специфических генов, определяющих деятельность секреторных клеток. Инсулин, СТГ способны увеличивать скорость синтеза ДНК, что призвано, очевидно, стимулировать митотическую активность, благодаря которой наращивается клеточная масса развивающегося органа. При сочетании эстрадиола с инсулином обнаруживается увеличение митотической активности, связанное с изменением скорости перехода клетки из фазы G в фазу S клеточного цикла.

Помимо образования иммунологических факторов молочива лимфоидные клетки полости альвеол участвуют и в формировании альвеолярного комплекса, а также дифференцировке секреторных клеток молочной железы. Включение в дифференцировку индуцирующих влияний мезенхимы и аутоиммунных процессов дополняется специфическими изменениями в строении секреторных клеток и их мембран в периоде становления лактационной функции. Следовательно, состав молочива и его

отличие от зрелого молока определяются интенсивностью аутоиммунных процессов [87,106].

В последнее время проявляется большой интерес к иммунокомпетентным клеткам, в систему которых входят сегментоядерные лейкоциты, лимфоциты и макрофаги, рассматриваемые некоторыми авторами (Васильев, А.А. 1986, Панова, Н.А 2018, Касумов М.К. 2010) как локальные регуляторы, оказывающие влияние на течение целого ряда ключевых процессов.

1.1.1.2 Лимфатическая система молочной железы

Развитие молочной железы напрямую связано с функционированием лимфоидной системы организма. Лимфатическая система молочной железы состоит из замкнутых лимфатических капилляров, которые располагаются в тканях паренхимы железы и являются последующим ветвлением отводящих лимфатических сосудов и лимфатических узлов [25].

Согласно исследованиям Зеленецкого, Н.В. (2020), Селезнева, С.Б. (2020), Щипакина, М. В, (2014), отток лимфы от вымени крупного рогатого скота и кобылы осуществляется в поверхностные паховые лимфатические узлы. У хищных домашних и сельскохозяйственных животных отток лимфы от множественного вымени осуществляется в подмышечные и поверхностные паховые лимфатические узлы.

В лимфатических капиллярах происходит образование лимфы. Хотя в узком смысле слова лимфой называется только жидкость, находящаяся в системе лимфатических сосудов, к ее образованию относится также капиллярная фильтрация и распространение жидкости в соединительной ткани [25].

Лимфатические капилляры расположены в пределах покровных оболочек (слизистые, серозные и кожа), а также в строме молочной железы, околососудистой соединительной ткани, в стенках крупных венозных стволов. Стенка лимфатического капилляра состоит из однослойного

плоского эпителия – эндотелия, который прилегает непосредственно к соединительнотканым элементам. В более крупных лимфатических сосудах стенки их более толстые из продольных пучков коллагена, эластических волокон и гладких мышц. В интеральвеолярной соединительной ткани и на поверхности мембраны альвеол располагаются лимфатические пространства, связанные с лимфатическими капиллярами [25,26,110].

Лимфатические сосуды в тканях вымени образуют петли, эта особенность наиболее ярко представлена в области сосков и верхней трети железы и отражает приспособляемость тканей молочной железы к растяжению. Диаметр лимфатических сосудов и количество их на единицу площади зависит от функционального состояния железы. При увеличении лактационной функции растет число и диаметр лимфатических сосудов [25, 26,110].

Между надвыменными лимфатическими узлами и выносящими лимфатическими сосудами двух соседних молочных желез в большинстве случаев имеются анастомозы. Лимфатические узлы в молочной железе играют роль фильтров и защитную функцию при воспалительных процессах. Через них проходит также удаление ряда веществ и поврежденной ткани. Согласно данным Корзенникова, С.Ю. (2016) - подавление деятельности регионарного лимфатического узла существенно нарушает морфологические процессы и подавляет развитие стромы и структур альвеол.

По мнению Селезнева, С.Б. (2020), Скопичева, В.Г. (2018), Слободяника, В.И (2009) - наличие в молочной железе большого количества лимфоидной ткани и иммунокомпетентных клеток свидетельствует о высоком иммунологическом потенциале данного органа и является благоприятным фактором для проведения локальной антигенной стимуляции. Мощная лимфатическая система вымени крупного рогатого скота служит не только для оборота большого объема жидкости в ходе секреции молока, но и очевидно, для синтеза факторов клеточного

иммунитета, необходимых для формирования колострального иммунитета у телят.

1.1.2 Механизмы иммунного ответа в молочной железе

Известно, что функционирование секреторных органов тесно связано с деятельностью иммунной системы. Согласно мнению ряда ученых, (Нежданов, А.Г., Слободяник, В.И. 1997; Племяшов, К. В., Конопатов, Ю. В., Соколов, В. И., 2007; Скопичев, В. Г., 2017, 2018) это участие проявляется в том, что на определенных стадиях активности, мигрирующие в орган лимфоидные клетки, могут включаться в процесс регуляции секретообразования. Кроме того, продукты деятельности иммунной системы и даже ее клеточные элементы могут становиться составляющими ряда секретов.

Согласно исследованиям Карпенко, Л.Ю. (2004, 2011, 2013) - в молозиве присутствуют значительные количества иммуноглобулинов, обеспечивающих пассивную иммунизацию новорожденного животного. Кроме того, в молоке постоянно присутствуют лейкоциты и лимфоциты, количество которых значительно увеличивается при физиологических реакциях органа. В литературе также накоплены данные о регуляторной роли иммунных реакций в лактогенезе и лактопоэзе. Важное значение в регуляции синтеза молока и молокоотдачи имеют клетки лейкоцитарного ряда. Достаточно подробно изучена роль сегментоядерных лейкоцитов в период лактации у человека и некоторых животных. Однако, как отмечают Скогорева, Г. М. (2012), Шульга, Н. Н. (2008) в литературе отсутствуют данные, достаточно полно характеризующие иммунный ответ и касающиеся функции моноцитов и макрофагов в период развития молочной железы и её функционирования. Моноцитарная активность важна для понимания восстановительных и иммунных процессов, протекающих в молочной железе в период лактации.

Sordillo, L. (1997), Селезнев, С.Б. (2020) и Скопичев, В.Г. (2018) отмечают также важность роли иммунных процессов в инволюции молочной

железы, когда существенно изменяется антигенная природа ткани и лимфоидная система принимает активное участие в деструктивных изменениях. Эффект "очищения" просвета молочных протоков и альвеол обязательно проявляется в появлении в составе секрета значительного количества соматических клеток. Миграция в полость альвеол клеток лимфоидного ряда отражает их активную роль в организации деструктивных процессов.

Исследованиями ряда ученых (Карпенко, Л.Ю. 2004, Селезнев, С.Б. 2021, Слободяник, В.А. 2009, Скопичев, В.Г. 2020) доказано, что конечный эффект в цепи реакций на попадание в организм чужеродного белка (антигена) не может быть обеспечен одним типом клеток, а требует последовательного или одновременного взаимодействия нескольких клеток различных типов. Это явление легло в основу современной трёхклеточной схемы иммуногенеза. В осуществлении иммунного ответа важное значение играет совместное функционирование Т- и В-лимфоцитов, а также макрофагов, которые в своей совокупности и формируют трехклеточную систему иммуногенеза.

Каскад иммунологических реакций запускается в ответ на проникновение в организм чужеродного агента обладающего антигенной детерминантой, при этом первичным ответом иммунной системы является реализация механизмов фагоцитоза. Фагоцитоз может закончиться полным уничтожением микроорганизмов и окончательным разрушением чужеродных антигенов, в таком случае он считается завершённым [8,25].

Однако, при наличии у возбудителя факторов патогенности, препятствующих завершению фагоцитоза, поглощенные микроорганизмы остаются живыми. Появившийся в организме антиген подвергается опсонизации - обволакиванию белковыми веществами, которые представлены иммуноглобулинами и отдельными компонентами системы комплемента. После этого антигенпрезентирующие клетки макрофагального ряда, (предположительно клетки Лангерганса и Гринштейна) связывают его

на своей поверхности и мигрируют вначале в дерму, а затем попадают в лимфотические сосуды кожи и по ним в регионарные лимфоузлы. При этом они частично расщепляют антиген и оформляют его в комплекс с собственными антигенами главного комплекса гистосовместимости, т.е. осуществляют процессинг. В регионарном лимфоузле клетки Лангерганса мигрируют в паракортикальную зону, где превращаются в интердигитирующие клетки, после чего представляют антиген находящимся в паракортикальной зоне неиммунным лимфоцитам, мигрировавшим из тимуса и еще не встречавшимся с антигенами. Происходит активация этих лимфоцитов, после чего они через кровеносное русло покидают лимфоузел [8,87,99].

По данным Sordillo, L. (1997) и Скопичева, В.Г. (2018) - среди активированных Т-лимфоцитов преобладают Т-хелперы-1 обеспечивающие иммунный ответ по клеточному типу, защищая макроорганизм от внутриклеточных возбудителей болезней. Их функция также состоит в интенсивной продукции цитокинов интерлейкина-2 и гамма-интерферона. Данные интерлейкины вызывают резкую стимуляцию макрофагов, присутствующих в дерме периваскулярно. Активированные макрофаги являются исполнительными эффекторными клетками, которые подвергают внедрившиеся в кожу антигены деструкции и элиминации.

Клетки Т-хелперы 2 типа активируют В-лимфоциты - антиген распознается В-лимфоцитом, который также несет процессированный антиген и активируется (на его мембране синтезируются рецепторы для различных интерлейкинов: факторов активации, роста, дифференцировки). Активированный В-лимфоцит размножается и дифференцируется в плазматические клетки и клетки памяти. Плазматические клетки синтезируют иммуноглобулины различных классов и обеспечивают иммунный ответ по гуморальному типу, в ходе которого антитела связываются с антигеном и маркируют его для узнавания другими компонентами иммунной системы. Клетки памяти, в свою очередь,

сохраняют на длительное время информацию о данном антигене, для последующего формирования вторичного иммунного ответа [98].

Иммуноглобулины - это особый класс гликопротеинов, присутствующих на поверхности В-клеток в виде мембраносвязанных рецепторов, в тканевой жидкости и в сыворотке крови в виде молекул. Согласно исследованиям Markowska-Daniel, I. (2010), Карпенко, Л.Ю. (2004), Макавчик, С.В., Сухина, А.А. (2019), - у млекопитающих имеется пять классов антител — IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Они различаются по строению и аминокислотному составу тяжёлых цепей и по выполняемым эффекторным функциям. Иммуноглобулины всех изотипов бифункциональны. Это означает, что иммуноглобулин любого типа связывает и распознает антиген, а затем усиливает киллинг или удаление иммунных комплексов, сформированных в результате активации эффекторных механизмов. Одна область молекулы антител определяет ее антигенную специфичность, а другая осуществляет эффекторные функции: связывание с рецепторами, которые экспрессированы на клетках организма; связывание с первым компонентом системы комплемента для инициации классического пути каскада комплемента.

IgG является основным иммуноглобулином сыворотки и благодаря малым размерам молекул является единственной фракцией иммуноглобулинов, способной к преодолению плацентарного барьера и тем самым обеспечивающей иммунитет плода и новорожденного.

IgM обладает наиболее крупными иммуноглобулинами. Содержат 10-12% углеводов. Он встраиваются в поверхностные структуры мембраны клетки, выполняя роль антиген распознающего рецептора; с этого момента клетки пре-В-лимфоцитов становятся зрелыми и способными к участию в иммунном ответе.

Сывороточный IgA составляет 15-20% всей фракции иммуноглобулинов животного. При этом 80% молекул IgA представлено в

мономерной форме. Секреторный IgA содержится в серозно-слизистых секретах (слюна, слеза, молозиво, молоко и др.).

IgD составляет менее одного процента фракции иммуноглобулинов плазмы крови животного. Он содержится на мембране некоторых В-лимфоцитов. Функции его до конца не выяснены. Предположительно он является антигенным рецептором с высоким содержанием связанных с белком углеводов для В-лимфоцитов.

IgE в свободном виде в плазме крови почти отсутствует. Он способен осуществлять защитную функцию в организме от действия паразитарных инфекций, обуславливает развитие многих аллергических реакций [8].

1.1.2.1 Антигенпрезентирующие клетки молочной железы

Не смотря на сходство механизма клеточного иммунного ответа в молочной железе с общими механизмами иммунного ответа, остается недостаточно изученной функция антигенпрезентирующих клеток молочной железы в формировании иммунитета при её локальной антигенной стимуляции [86].

Согласно данным Thomas, J. A. (1984) антиген-презентирующим клеткам кожи и региональных лимфатических узлов относятся дермальные дендриты, фолликулярные дендритические клетки (в лимфоузлах), моноциты, макрофаги и В-клетки.

Предположительно, роль антигенпрезентирующих клеток в молочной железе принадлежит клетками системы фагоцитирующих мононуклеаров, а именно – макрофагам, находящимся в коже, которыми являются клетки Лангерганса, дендритным клеткам Гринштейна локализованным в слизистых оболочках и макрофагам соединительной ткани [43,86].

1.1.2.1.1 Клетки Лангерганса

Популяция макрофагов в коже представлена клетками различной локализации и значительной функциональной вариабельности. Клетки Лангерганса, или внутриэпидермальные макрофаги, впервые описаны в 1868 году немецким гистологом Паулем Лангергансом, который применил для их выявления метод золочения. Он считал их нервными элементами. В последующем клетки Лангерганса рассматривали как стареющие меланоциты. Лишь в недавнее время было доказано, что эти клетки имеют костномозговое (моноцитарное) происхождение и являются разновидностью макрофагов [13,15].

Чаще всего клетки Лангерганса лежат в эпидермисе и выявляются у всех млекопитающих, включая человека; несколько меньшее число их находится в сосочковом слое дермы. Помимо эпидермиса, они могут находиться также в многослойных эпителиях эктодермального происхождения: полости рта, пищевода, роговицы и конъюнктивы глаза, влагалища и шейки матки. Эти клетки обнаружены также в лимфоузлах, селезенке, мозговом веществе тимуса [13,15].

При использовании стандартных методов окраски данные клетки имеют вид «светлых» клеток, что обуславливает их визуальное сходство с меланоцитами. Наиболее точными в данном вопросе считаются методы иммуногистохимического обнаружения клеток Лангерганса, связанные с выявлением специфических антигенов на поверхности клеток при помощи флуоресцирующих моноклональных антител. Также достаточно достоверным способом определения внутриэпидермальных макрофагов благодаря их характерной морфологии является электронная микроскопия [28,54].

Морфологически клетки Лангерганса характеризуются лопастным плотным ядром, в котором содержатся среднего размера 1-2 ядрышка. Цитоплазма светлая, «воздушная» и содержит множество органелл: большое количество митохондрий, развитую гранулярную эндоплазматическую сеть и

комплекс Гольджи, многочисленные лизосомы, меланосомы и микрофиламенты. Наличие большого количества цитоплазматических включений придает клетке характерный «пенистый» вид. Определяющей ультраструктурной особенностью считается наличие гранул Бирбека имеющих форму теннисной ракетки, длина гранул около 200-300нм, а толщина около 30 нм [28,54].

Среди данных о морфологии клеток Лангерганса интересным является исследование Галил-Оглы, Г.А. (2005), которое сообщает, что среди популяции клеток Лангерганса они выделили два вида клеток. Первый тип назван «светлыми клетками»: они характеризуются прозрачной цитоплазмой и большим количеством отростков, содержат много гранул Бирбека и локализуются в супрабазальных слоях эпидермиса. Второй тип - «темные клетки», содержат единичные гранулы Бирбека и располагаются в базальном слое эпидермиса; имеют небольшое количество цитоплазматических отростков, которые простираются на большие расстояния между кератиноцитами.

Мяделец, О.Д. (2008) отмечает, что в базальном слое или супрабазальнонаходятся лишь перикарионы клеток Лангерганса, при этом их ветвистые отростки отходят в разные стороны и образуют сложную сеть. В некоторых случаях наблюдается, что к клеткам Лангерганса из дермы проходят тонкие нервные волокна, которые заканчиваются в непосредственной близости от клеток булавовидным утолщением.

Таким образом, обнаруженные связи клеток Лангерганса с гемоциркуляторным руслом дермы и нервными окончаниями дали возможность предполагать, что именно здесь замыкаются три основных регуляторных системы организма: иммунная, нервная и эндокринная. В таком случае можно говорить о роли клеток не только в защитных реакциях кожи, но и в регуляции гомеостаза всего организма [28,54].

Jakob, T. (2001), Mosser, D. M. (2008), Murray, P. J., Wynn, T. A. (2011), Шварц, Я.Ш. (2012) сходятся во мнении, что являясь разновидностью

макрофагов, клетки Лангерганса отчасти разделяют их свойства и функции, такие как: наличие активности неспецифической эстеразы и кислой фосфатазы; наличие на плазмолемме рецепторов к Fc-фрагменту IgG и C3-компоненту комплемента; способность к активной миграции; способность к секреции интерлейкина-1; способность к фагоцитозу; экспрессия антигенов гистосовместимости класса II; способность презентировать антиген и стимулировать лимфоциты. Однако наряду с этим, имеют и существенные отличия от типичных макрофагов: обладают меньшей фагоцитарной активностью; не могут поглощать целые клетки или их фрагменты, а фагоцитируют лишь растворимые и мелкозернистые вещества; у них отсутствует активность типичных для макрофагов ферментов (p-глюкуронидаза, пероксидаза, 5-нуклеотидаза, лизоцим, α -1-антитрипсин и α -1-антихимотрипсин). Помимо этого, клетки Лангерганса несут на своей поверхности отличающийся от макрофагов антигенный набор: они сильнее экспрессируют на своей поверхности HLA-DR-антиген и кроме классических антигенов макрофагов имеют некоторые маркеры T-лимфоцитов. У клеток выявляется также белок S-100, характерный для нервной ткани и обычно отсутствующий у макрофагов. Из секретируемых клетками Лангерганса веществ известны интерлейкин-1, γ -интерферон.

Количественные показатели клеток Лангерганса в эпидермисе по данным исследователей сильно разнятся, от нескольких десятков (30-40) до 1500 на 1 мм² площади поверхности кожи. Иногда их количество выражают в процентах по отношению ко всем эпидермоцитам, тогда число клеток составляет 2-5%. Такая разница в количестве определяемых клеток связана с различными методами выявления, видовыми особенностями и возрастом исследуемых особей, областью исследования и т.д [13, 99].

На данный момент наиболее изученной считается антигенпрезентирующая роль клеток Лангерганса. Известно, что они способны захватывать антигены, перерабатывать их и экспрессировать на своей поверхности. Таким образом, чужеродный антиген в комплексе с

собственными антигенам клетки и интерлейкином-1 представляется проникающим в эпидермис лимфоцитам, в основном Т-хелперам. В ответ на антигенпрезентацию активированные лимфоциты продуцируют интерлейкин-2, который в свою очередь индуцирует пролиферацию Т-лимфоцитов, непосредственно участвующих в иммунном ответе [43].

Известно также, что клетки Лангерганса способны длительно сохранять на своей поверхности захваченные антигены, формируя, таким образом, иммунологическую память. Галил-Оглы, Г.А. (2005), Сарбаева, Н.Н. (2016), Мяделец, О.Д. (2008) описывают способность данных клеток транспортировать захваченный антиген по лимфатическим сосудам из кожи в регионарные лимфоузлы. Там их обнаруживали в маргинальных синусах и паракортикальной тимусзависимой зоне. В паракортикальной зоне клетки Лангерганса способны превращаться в интердигитирующие макрофаги, являющиеся обязательными участниками реакций клеточного иммунитета. Таким образом, клетки Лангерганса связывают в единую функциональную систему два органа: кожу и лимфоузлы.

Клетки Лангерганса весьма подвижны, их популяция постоянно обновляется за счет миграции клеток из эпидермиса в дерму и лимфоузлы; миграции гематогенных предшественников в кожу и превращение их в эпидермисе в клетки Лангерганса; старения клеток Лангерганса, их гибели в эпидермисе и слущивание с поверхности вместе с корнеоцитами [16, 94, 110].

1.1.2.1.3 Клетки Гринштейна и недетерминированные дендритические клетки

В 1983 году Granstein R. обнаружил в эпидермисе мышей популяцию дендритических клеток, которая по ряду показателей, как морфологических, так и иммунологических, существенно отличалась от клеток Лангерганса. Эти клетки экспрессировали Thy-1-антиген, являющийся маркером периферических лимфоцитов и тимоцитов. Было установлено, что клетки (они получили название Thy-Г-клеток или клеток Гринштейна, а также

недетерминированных клеток, дендритических эпидермальных клеток) образуют в эпидермисе регулярную сеть, соединяясь друг с другом при помощи отростков. Возникшее предположение о том, что это клетки Лангерганса, не подтвердилось: при помощи метода двойной метки было показано, что это две самостоятельные популяции дендритических клеток эпидермиса [128, 139].

Как сообщает Мяделец, О.Д. (2008) - на поверхности клеток Гринштейна отсутствуют рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов и C3-компоненту комплемента, а также Ia-антиген, характерные для клеток Лангерганса. С другой стороны, клетки несут мембранные антигены (упоминавшийся Thy-1-антиген), отсутствующие на клетках Лангерганса. Клетки имеют морфологическую структуру, сходную с клетками Лангерганса, для них характерно дольчатое ядро с маргинально расположенным хроматином и содержание большого количества цитоплазматических включений. Однако у клеток Гринштейна отсутствуют гранулы Бирбека, вместо них имеется большое количество специфических гранул с уплотнением в центре и периферической прозрачной зоной, окруженных мембраной, являющихся ультраструктурным маркером клеток.

Количество клеток Гринштейна составляет от 1-3% всех клеток эпидермиса, а по некоторым данным, может колебаться от 5 до 600 кл/мм². Следовательно, их количество в большинстве случаев примерно соответствует числу клеток Лангерганса [99].

Функция клеток Гринштейна до конца не выяснена, однако некоторые авторы (Галил-Оглы, Г.А. 2005, Сарбаева, Н.Н. 2016, Мяделец, О.Д. 2008) считают, что дендритические клетки могут представлять собой фазу жизненного цикла многих клеток моноцитарно-макрофагальной серии. Существуют две точки зрения на их роль в эпидермисе:

- 1) Они являются естественными киллерами, осуществляющими лизис трансформированных кератиноцитов.

2) Дендритические клетки являются антигенпредставляющими клетками для Т-супрессоров, проникающих в эпидермис.

Ряд проведенных исследований показали, что клетки Гринштейна как и клетки Лангерганса, несут на своей поверхности, антигены типа II HLA-DR и способны активировать пролиферацию Т-лимфоцитов. При этом они более эффективно, чем мононуклеарные клетки периферической крови, стимулируют пролиферацию Т-клеток, но менее эффективны в индукции Т-киллеров. Исходя из этих данных, было выдвинуто предположение, что клетки Лангерганса и клетки Гринштейна стимулируют две различных субпопуляции Т-лимфоцитов; таким образом получается, что в эпидермисе существует своеобразная регуляторная система иммунных реакций, действующая по типу «плюс-минус». Один полюс этой системы представляют клетки Лангерганса и Т-хелперы, второй - клетки Гринштейна и Т-супрессоры, при этом превалирование одной из систем будет определять характер иммунной реакции [13,99,128,139].

1.1.3 Влияние молозива на формирование колострального иммунитета

В настоящее время многими авторами (Карпенко, Л.Ю. 2011, 2013., Скопичев, В.Г. 2017, 2018, Слободяник, В. И. 2009, Племяшов, К.В. 2020) разрабатывается теория о возможности передачи и формировании иммунитета у детёныша с помощью и под контролем иммунной системы матери. Передача клеток иммунной системы (нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, тканевых макрофагов) осуществляется через молозиво. Доказано, что непосредственно перед лактацией имеет место снижение уровня белка в кров матери, одновременно снижается и количество некоторых классов лейкоцитов. Ряд отечественных исследователей отмечает что, снижение общего белка крови, лейкоцитов и нейтрофилов в молозивный период обусловлено поступлением их в молочную железу и использованием на синтез белков молозива. Число соматических клеток в молозиве возрастает в 10 и более раз.

Согласно литературным данным Карпенко, Л.Ю. (2011, 2013), в молозивном периоде значительно повышается содержание макрофагов и клеток лимфоцитарного ряда в секрете молочной железы. На протяжении всего молозивного периода в секрете преобладают цитотоксические нейтрофилы, способные к эффективному фагоцитозу. Отмирающие клетки эпителия альвеол и протоков фагоцитируются и удаляются при участии макрофагов. Присутствующие в молозиве в небольших количествах эозинофилы снижают интенсивность иммунных реакций, нейтрализуя гистамин и кинины. Базофилы в свою очередь, выделяют гепарин и гистамин способствуя расширению кровеносных сосудов вымени. Таким клеточным составом представлена картина молозива как функционально зрелого и весьма активного агента иммунной системы.

После завершения молозивного периода количество иммунокомпетентных клеток в молоке снижается, и они вновь появляются лишь в конце лактационного периода, когда инволюция железистой паренхимы проходит с использованием подвижных и оседлых макрофагов и место альвеолярной ткани занимает жировая ткань [62, 84].

Также, в состав молозива входит лизоцим – важный компонент неспецифического гуморального иммунитета. Самая высокая активность лизоцима обнаруживается в молозиве до первого кормления и составляет $37,0 \pm 3,4$ мкг/мл. В течение суток активность лизоцима быстро падает и составляет $6,5 \pm 0,52$ мкг/мл [84].

Исходя из данных Карпенко, Л.Ю. (2004) - у новорожденных в крови практически отсутствуют иммуноглобулины, являющиеся основным фактором гуморальной защиты. Так же, при рождении лимфатическая система относительно незрела, хотя в морфологическом плане и достаточно развита. Все Т- и В-лимфоциты еще не сталкивались с антигенами и клетками памяти. В связи с этим в настоящее время развивается теория о передаче и формировании иммунитета у детёныша с помощью и под контролем иммунной системы матери в постнатальный период.

Иммуноглобулины являются крупными гломерулярными белками плазмы крови и представляют собой важнейший фактор гуморального иммунитета. 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 плацентарный барьер, и начинают формировать иммунную систему плода еще в эмбриональном периоде. 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 [5,84,87].

По данным Карпенко, Л.Ю. (2004) и Селезнева, Б.С. (2021) - в течение двух недель перед родами концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови самок снижается и во время родов доходит до минимальной величины и начинает постепенно повышаться лишь к 14-му дню после родов. Снижение антител в крови самок исследователи объясняют физиологической закономерностью передачи иммуноглобулинов новорожденным поросятам посредством молозива. По составу иммунных белковых фракций сыворотка молозива практически не отличается от сыворотки крови. Известно, что основная часть иммуноглобулинов переходит в секрет молочной железы из крови в неизменном состоянии (81%), активизируясь в молозиве за 3-9 дней до отела. Оставшаяся часть иммуноглобулинов способна синтезироваться плазматическими клетками непосредственно в молочной железе. При этом количество иммуноглобулинов в сыворотке молозива достигает 60% общего количества белка и, в основном, они представлены иммуноглобулинами класса M и G. Наибольший уровень антител определяется в первой порции молозива -2261 ± 706 ед/мл. В течении первых суток содержание антител снижается.

В исследованиях Скопичева, В.Г. (2016, 2018) имеются данные о высокой корреляционной зависимости между концентрацией иммуноглобулинов в материнском молозиве и содержанием иммуноглобулинов в сыворотке крови новорожденных. В процессе лактопоэза в молоко поступают или же синтезируются непосредственно в молочной железе, антитела, обеспечивающие защиту от тех заболеваний, к которым у матери сохранилась иммунологическая память. Таким образом, в ходе получения молозива детеныши приобретают временный колостральный иммунитет.

Однако, значение молозивных антител состоит не только в обеспечении временного пассивного иммунитета. Согласно современным представлениям, своевременное получение материнских иммунологических факторов с молозивом закладывает необходимый базис для дальнейшего развития собственной иммунной системы молодняк. По данным Батракова, А.Я., Пдемяшова, К.В., Виденина, В.Н., Яшина, А.В. (2021) - иммунологическая недостаточность у телят, лишенных молозива, обусловлена отсутствием у них минимального количества антител, необходимого для связывания антигена и переноса его к иммунокомпетентным клеткам крови и лимфоидных органов.

Иммунокомпетентные клетки молозива так же влияют и на активацию клеточного иммунитета. Возможность проникновения иммунокомпетентных клеток молозива в кровотоки детенышей была доказана Скопичевым В.Г. с соавторами в эксперименте с использованием естественной метки клеток самок – полового хроматина. Меченые по половому хроматину лейкоциты искали у новорожденных мужского пола, обнаружение молозивных клеток в кишечной стенке и кровеносном русле детёныша при попадании их с молозивом приблизительно составляет 25% в крови, 1% в лимфе и около 70% в кишечнике [42,61].

Ряд авторов (Конопельцев, И.Г. 2010, Племяшов, К.В., Соколов, В. И., Чумасов, Е. И. 2007, Скопичев, В.Г. 2018, 2020) пришли к мнению, что

состояние здоровья матерей оказывает непосредственное влияние на качество молозива. Так у самок, болеющих маститом, в период близкий к родам, в дальнейшем наблюдается снижение концентрации иммуноглобулинов и повышение кислотности молозива. Кроме того, в нем содержится большое количество микробов-возбудителей мастита и продуцируемых ими токсинов, представляющих опасность для новорожденных. Выпойка такого молозива приводит к снижению резистентности организма и развитию тяжелых диспепсий у молодняка.

Считается, что материнский иммунитет, передаваемый новорожденному через молозиво, может быть усовершенствован путем активной иммунизации матерей антигенами возбудителей, участвующих в этиологии и патогенезе различных инфекций новорожденных [87].

1.1.4 Пути антигенной стимуляции при борьбе с маститом

Долгое время основным способом лечения маститов было применение различных антибиотических препаратов. Однако, в связи с нарастающей антибиотикорезистентностью основных возбудителей маститов этот метод лечения становится все менее эффективным. Все большую актуальность в вопросе борьбы с маститом приобретают методы антигенной стимуляции. Преимуществами данного метода являются: отсутствие развития резистентности возбудителей, относительно длительный период защиты и отсутствие негативного воздействия на получаемую молочную продукцию.

Одной из первых разработок в области иммунологической терапии мастита стала работа Спесивцева, Ю.А. (1995) представлявшая собой способ лечения и профилактики острых лактационных маститов с применением лейкоцитарных взвесей. Им было предложено осуществлять переливание лейкоцитарных взвесей от доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином, в результате чего был сделан вывод, что трансфузии лейкоцитов от иммунизированных доноров, содержащих стимулированные фагоцитирующие клетки, оказывают иммунокоррегирующее действие на

систему клеточного иммунитета больных и препятствуют генерализации инфекции.

Васильев, А.А. (1986) изучал иммунологические свойства молочной железы проводя внутривенную локальную антигенную стимуляцию вакцинами из штаммов *Brucella abortus*, после чего зафиксировал повышение количества иммунокомпетентных клеток в молозиве и молоке.

García V.E., Gomes M.I., Sanjuan N. (1996, 2002) провели опыт по интрамаммарной иммунизации мышей аттенуированным *S. aureus* после чего проводили заражение различными штаммами стафилококка, выделенными от животных больных маститом. Интрамаммарная иммунизация индуцировала значительное увеличение IgA и IgG в сыворотке крови подопытных животных. Таким образом была продемонстрирована возможность локальной иммунизации молочной железы мышей, а модель была предложена для скрининга чувствительности *S. aureus* при разработке вакцины.

Позднее Евглевский, А.А. и Скопичев, В.Г. предложили более экономически целесообразные и простые в реализации методы локальной антигенной стимуляции молочной железы для применения на продуктивных животных в рамках лечения и профилактики мастита. В качестве основного компонента препаратов для антигенной стимуляции применяется стафилококковый анатоксин, в сочетании с различными дополнительными веществами.

Евглевский, А.А. (2002, 2016) с соавторами предложили вводить стафилококковый анатоксин интерцистернально в пораженные доли вымени, после чего, проводя бактериологическое исследование секрета вымени и учитывая клинические признаки зафиксировал успешное терапевтическое действие данного метода.

Скопичев, В.Г. (2009, 2018) с соавторами предложил еще более простую для исполнения методику – нанесение композиции, содержащей стафилококковый анатоксин на область молочного зеркала. Этот способ не требует наличия квалифицированных специалистов и исключает

возможность травмирования соскового канала. В своих исследованиях Скопичев, В.Г. обращал внимание не только на исчезновение клинических признаков заболевания и отрицательные результаты экспресс тестов на мастит, но и изучал иммунологические факторы, такие как: изменение количества иммуноглобулинов в молозиве и сыворотке крови, изменение картины клинической крови и клеточного состава молозива. Кроме того, сравнивая показатели иммуноглобулинов в молозиве и сыворотке крови при общей (вакцина СТАРВАК) и локальной антигенной стимуляции он доказал, что локальная стимуляция предпочтительна в вопросе лечения и профилактики мастита так как характеризуется более высокими показателями локального гуморального иммунного ответа, в сравнении с общей.

Согласно данным Скопичева, В.Г. (2009) при внутримышечном пути стимуляции наибольшее количество иммуноглобулинов находится в крови животных, в то время как количество иммуноглобулинов в молозиве значительно меньше. Этот факт свидетельствует о нарушении транспорта иммуноглобулинов через секреторный эпителий альвеол, и обуславливает недостаточную эффективность защиты от возбудителя и сравнительно короткий период действия препарата.

Более высокие показатели иммуноглобулинов в молозиве при локальном воздействии препаратами на молочную железу исключают путь их пассивного транспорта и могут свидетельствовать в пользу образования этих компонентов непосредственно в альвеоле молочной железы, что позволяет допустить возможность рассмотрения молочной железы как самостоятельного лимфоидного органа, способного к формированию прочного локального иммунитета.

Данное положение обуславливает необходимость более подробного изучения иммунологических процессов в молочной железе и возможности их применения для разработки и совершенствования методов профилактики мастита.

1.2 Основные возбудители мастита и факторы их патогенности

Согласно данным Боженова, С.Е. (2012), Галкина, А.В. (2017), Джавадова, Э.Д. (2021), Зирук, И.В. (2016), Климова, Н.Т. (2014), Кононенко, К.Н. (2020), Костерина, Д.Ю. (2020), Макавчик, С.А., Смирновой, Л.И. Сухинина, А.А. (2020) - в настоящее время известно более 140 возбудителей мастита, основные из которых - стафилококки и стрептококки. Многие из этих бактерий, патогенны не только для животных, но и для человека. Они способны вызывать токсикоинфекции, что означает употребление в пищу такого молока или молочных продуктов, приводящих к тяжелым отравлениям.

Авторы также отмечают, что помимо стафилококковых и стрептококковых маститов распространены маститы, вызываемые кишечной палочкой. Различные сероварианты этой бактерии являются нормальными микрофлорами кишечника человека и животных, однако при попадании на поврежденный кожный покров, эти бактерии вызывают маститы. Тяжесть токсикоинфекций, вызываемых кишечной палочкой, зависит от ее сероварианта и вырабатываемых ею токсинов [3,6,9].

Именно эти бактерии чаще всего выделяются учеными в ходе изучения секрета молочных желез у животных и людей, больных маститом. Маститы, вызванные другими микроорганизмами - синегнойной палочкой, энтеробактериями, листериями, клебсиеллами и т.д. встречаются реже [18].

Большинство возбудителей мастита имеют сложную многокомпонентную систему факторов патогенности и вирулентности, способны быстро повысить устойчивость к антибиотическим веществам, а также обмениваться генетической информацией друг с другом, что ведет к мутациям и изменениям свойств возбудителей. В связи с этим терапия маститов и в особенности применение антибиотиков становится все менее эффективным, однако своевременная вакцинопрофилактика способна обеспечить защиту от данных возбудителей. Таким образом, видовой состав

микрофлоры, вызывающая маститы бактериальной этиологии, имеет важное значение для подбора термостабильных антигенов в ходе антигенной стимуляции молочной железы [3,6,9].

1.2.1 Факторы патогенности стафилококков

Согласно данным Cheung, A.L (2004), Holmes, M.A., Zadoks, R.N. (2011), Горбатова, А.В. (2019), Грубера, И.М. с соавторами (2013, 2014, 2016), Макавчик, С.А., Смирновой, Л.И. и Сухина, А.А. (2020) молекулярных механизмах патогенности стафилококков ключевыми являются: потребление бактериями питательных веществ в тканях хозяина, индукция механизмов коагуляции, способствующая агрегации стафилококков в сосудистой системе, и супрессия врожденного и адаптивного иммунного ответа. Каждому из этих этапов соответствуют определенные факторы вирулентности *S. aureus*.

Клеточная стенка *S. aureus* состоит из капсульного полисахарида, пептидогликана, липотейхоевой кислоты, рибитол-содержащей тейхоевой кислоты и многочисленных поверхностных белков. Daum, R.S. (2008) приводит основные факторы патогенности (вирулентности) *S. aureus*, участвующие в различных этапах инфекционного процесса, которые могут быть использованы при разработке вакцин:

1) Полисахариды клеточной стенки – капсульные полисахариды, способствуют иммунной эвазии стафилококка, подавляя фагоцитоз; поли-N-ацетилглюкозамин, являясь адгезином, облегчает формирование биопленки.

2) Поверхностные бактериальные белки, к которым относятся адгезины, обеспечивают колонизацию тканей; инвазины обеспечивают распространение в тканях хозяина; а также белок А, связывающийся с Fc-фрагментом IgG, ингибирует фагоцитоз.

3) Экстрацеллюлярные белковые продукты (лейкоцидины) лизируют клеточную мембрану нейтрофилов человека и обладают дермонекротическими свойствами в моделях на животных; суперантигены,

относящиеся к пирогенным токсинам (эксфолиативные А- и В-токсины, а также токсины синдрома токсического шока и энтеротоксины), приводят к неспецифической стимуляции клеток иммунной системы, повреждению клеток сосудистого эндотелия [11,44,136].

Известно несколько механизмов защиты животных от инфекции, вызываемой *S. aureus*, которые включают барьер слизистых и эпителия, минимизацию питательных веществ, необходимых для роста и размножения стафилококка, выработку сигналов опасности на микробные продукты, направленных на активирование врожденного иммунного ответа и поглощение бактерий профессиональными фагоцитами, в частности нейтрофилами, а также участие компонентов адаптивной иммунной системы, таких как антитела и Т-клетки [11,143].

В профилактике стафилококковых инфекций важен механизм антитело-опосредованного клиренса, управляемого адаптивной иммунной системой, в которой ключевую роль играют секретируемые В-лимфоцитами антитела и цитокин-секретирующие и цитолитические Т-клетки.

Было показано, что цитокины, секретируемые клетками Т-хелперов, повышают эффекторную функцию нейтрофилов, что необходимо учитывать при подборе и применении вакцин [136,154].

Поскольку полиморфноядерные нейтрофилы являются одним из первичных этапов клеточной защиты от стафилококковой инфекции, чему способствует опсонизация микробной поверхности антителами и комплементом, их дисфункция, а также другие нарушения, приводят к повышению чувствительности к инфекции *S. Aureus* [114, 135].

При изучении влияния различных факторов патогенности, используемых в качестве перспективных при разработке вакцин, в исследованиях, проведенных на животных моделях, также было показано, что Т-хелперы 17 и Интерлейкины-17 участвуют в противостафилококковом иммунитете. Активирование дендритных клеток антигенами *S. aureus*

происходит через Интерлейкины-23, которые запускают активацию Т-хелперов 17 [136,141,142].

Фенол-растворимые модулины снижают секрецию дендритными клетками противовоспалительных цитокинов некротического противоопухолевого фактора, Интерлейкинов 12 и 6, но повышают Интерлейкины-10 и, как следствие нарушают способность дендритных клеток индуцировать активацию и пролиферацию Т-хелперов. В результате, наблюдается снижение количества Т-хелперов и увеличение количества регуляторных Т-клеток, которые как раз и секретируют большое количество Интерлейкинов-10 [44,143].

Показано, что фенол-растворимые модулины высоковирулентных штаммов стафилококков воздействуют на функцию дендритных клеток, модулируя при этом адаптивный иммунный ответ. Таким образом, антитела продуцируемые в ответ на антигены *S.aureus*, являясь маркером иммунного ответа, не гарантируют защиту, тогда как реальное протективное действие реализуется через иммунитет опосредованный Т-хелперами 17, что подтверждено в исследованиях S. Vagnoli и A. Joshi. Именно Интерлейкин-17-зависимый Т-клеточный иммунитет играет роль в пополнении и активировании клеток воспаления и повышении антистафилококковой защиты [11, 154].

1.2.2 Факторы патогенности кишечной палочки

По данным Завьянцева, В. Е (2003), Мальцева, Б. М (1999), Тереховой, В.И., Сердюченко, И.В. (2016) - кишечная палочка относится к условно патогенным микроорганизмам и является неотъемлемой частью симбионтной микрофлоры кишечника в организме животных или человека. Патогенные свойства бактерий могут проявляться в случаях снижения естественной резистентности организма и ослабления иммунитета. Например, при попадании на кожные покровы кишечная палочка вызывает заражение раны, а на вымя – маститы. Тяжесть токсикоинфекций, вызываемых кишечной

палочкой зависит от её сероварианта и вырабатываемых ею токсинов. Особенно опасна в этом отношении энтерогеморрагическая кишечная палочка, которая входит в состав микрофлоры кишечника крупного рогатого скота. Пищевые токсикоинфекции, вызываемые энтерогеморрагической кишечной палочкой, сходны с дизентерией, в тяжелых случаях они сопровождаются гемолитико-уремическим синдромом, который нередко приводит к летальным исходам.

Эшерихии, способные вызвать заболевания, обладают разным набором факторов патогенности. Гены, детерминирующие патогенность эшерихий, обнаруживаются в составе хромосомы в виде островов патогенности, переносятся с помощью плазмид, бактериофагов, транспозонов. Основными факторами патогенности эшерихий являются факторы адгезии и колонизации, факторы инвазии, эндотоксины и экзотоксины [27, 55].

В зависимости от факторов патогенности и механизма их патогенетического воздействия на макроорганизм *E. coli*, патогенные для животных и человека, подразделяются на две группы. Первую группу составляют инвазивные штаммы, вызывающие энтероколиты. Во вторую входят неинвазивные формы, характеризующиеся следующими особенностями: они размножаются и колонизируются в области тонкого кишечника; продуцируют один или более энтеротоксинов [18,45].

Адгезины кишечной палочки выполняют роль медиатора в прикреплении микробной клетки к микроворсинкам эпителия, и поэтому рассматриваются как факторы колонизации. С помощью адгезинов осуществляется процесс узнавания энтеротоксигенной кишечной палочкой соответствующей ткани в тонком кишечнике, чувствительной к действию токсина, продуцируемого этим патогеном. Адгезин энтеропатогенных эшерихий взаимодействует с микроворсинками или гликокаликсом эпителиальных клеток. Кроме адгезинов, в адгезии энтеропатогенных *E. coli* с клетками тканей животных и человека участвуют электростатические силы и силы гидрофобного взаимодействия [27,105].

Все энтеропатогенные штаммы, продуцирующие какой-либо вид адгезинов, вырабатывают один или два энтеротоксина.

Согласно литературным данным, энтеротоксины эшерихий стимулируют секрецию ионов натрия, калия, хлора, бикарбонат-ионов, эпителиальными клетками кишечника, что приводит к нарушению водно-солевого обмена и развитию диареи. Выделяют термолабильные энтеротоксины (LT - labile toxin) и термостабильные энтеротоксины (ST - stable toxin) [18,55].

Молекула термолабильных энтеротоксинов состоит из субъединиц А и В. Фрагмент В связывается с рецепторами на мембране энтероцитов и формирует трансмембранный канал, по которому субъединица А проникает в клетку и активирует аденилатциклазу. В результате этого в клетке повышается уровень цАМФ и нарушается водно-солевой обмен: подавляется всасывание натрия, хлоридов и воды на вершине ворсинок и стимулируется секреция этих ионов в криптах. Термолабильный токсин иммуногенен, обладает нейротропным и некротизирующим действием. Вызывает расширение изолированных петель кишечника и образование в них серозно-геморрагического экссудата [27].

Термостабильный энтеротоксин связывается с рецептором энтероцитов и увеличивает внутриклеточную концентрацию циклического гуанозинмонофосфата. В результате этого стимулируется секреция хлоридов и ингибируется абсорбцию натрия, что приводит к потере жидкости кишечником. Термостабильный токсин - низкомолекулярный, устойчив к действию трипсина, химотрипсина, панкреатина и проназы, сохраняет свою активность после 10-ти минутного кипячения. [31, 120].

Шига-подобный токсин аналогичен экзотоксину *Shigella dysenteriae*, его называют также веротоксином. Различают два типа этого токсина: SLT-1 (Stx-1) и SLT-2 (Stx-2). Шига-подобные токсины внутри энтероцитов блокируют биосинтез белка. Именно этот токсин и обуславливает развитие

геморрагического колита и гемолитикоуремического синдрома. Рецепторами для SLT служат гликолипиды Gb3 и Gb4 [45, 55].

Эндотоксин эшерихий представляет собой липополисахарид, который определяет специфичность O-антигена бактерий. Липополисахарид вызывает повреждение сосудов микроциркуляторного русла слизистой оболочки кишечника, обуславливает экспрессию цитокинов, что приводит к развитию воспаления [27, 105].

Некоторые штаммы патогенных эшерихий способны вырабатывать гемолизины, лизирующие эритроциты крови различных видов животных и человека. Гемолизин – термолабильный высокомолекулярный белок, является порообразующим цитолизином. Синтез гемолизина отмечается у многих энтеропатогенных, энтеротоксигенных, уропатогенных штаммов [18].

Также для некоторых эшерихий характерно наличие цитотоксического некротического фактора (CNF) типа 1 и 2, представляющего собой деамидазу, способную повреждать белки-регуляторы актинового цитоскелета. Этот фактор обнаружен у уропатогенных штаммов кишечной палочки. В эукариотических клетках CNF вызывает складчатость мембраны, реорганизацию актиновых волокон, изменение репликации ДНК с образованием гигантских многоядерных клеток [45].

1.2.3 Факторы патогенности стрептококков

В соответствии с данными Weiser, J.N., Ferreira, D.M., Paton, J.C. (2018), Masomian, M., Ahmad, Z., (2020), Крюковой, В.В. (2010), Макавчик, С.А. (2018), Приходько, Е.И., Смирновой, Л.И. и Сухинина, А.А. (2014, 2020), способность стрептококков вызывать различные патологии обусловлена высокой степенью генетической гетерогенности и наличием в их геноме разнообразных генов, повышающих вирулентность штаммов. Многие из генов вирулентности стрептококков локализованы на мигрирующих генетических элементах – так называемых «островах патогенности».

Известно, что эти «острова» являются структурами, которые могут перемещаться из одного участка генома в другой, таким образом, интеграция, стабилизация и экспрессия генов вирулентности, входящих в состав "островов патогенности", лежат в основе формирования новых свойств, в том числе вирулентных, у родственных непатогенных видов бактерий.

По данным Brooks, L.R.K., Mias, G.I. (2018) - стрептококки группы Mitis (*S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis*) естественно трансформируемы, что позволяет осуществлять обмен генетической информацией между видами путем гомологичной рекомбинации. Именно по этой причине увеличение резистентности к пенициллину в популяции пневмококков было связано с формированием измененных вариантов пенициллинсвязывающих белков в результате приобретения штаммами генов резистентности к пенициллину от *S. mitis* и *S. oralis*. Наличие у штаммов *S. pyogenes* и *S. Agalactiae* большого количества хромосомных генетических элементов способствует горизонтальному переносу генов вирулентности не только между представителями одного вида, но и представителями разных видов. Приобретение генов вирулентности от представителей патогенных видов способствует проявлению непатогенными стрептококками ранее не присущих им свойств.

Помимо этого, бактерии группы стрептококков имеют широкий спектр факторов патогенности. Так, основным фактором вирулентности является белок М, который появляется в виде волосовидных выступов на поверхности клеток. Он придает устойчивость бактериям к комплемент-опосредованному уничтожению полиморфноядерными лейкоцитами и макрофагами, тем самым защищая бактерии от фагоцитоза. Белок М также вызывает агрегацию стрептококков во время адгезии к клеткам тонзиллярного эпителия, поэтому он также может играть важную роль в инициации колонизации слизистой оболочки дыхательных путей [90,151].

Капсула, состоящая из гиалуроновой кислоты, защищает стрептококки от фагоцитоза и облегчает адгезию к клеткам эпителия, при этом проявляет

минимальную иммуногенную активность и бактерии самостоятельно разрушают капсулу при инвазии в ткани за счет синтеза гиалуронидазы [115,123].

Кроме того, стрептококки продуцируют ряд ферментов таких как: пептидаза, стрептолизин, гиалуронидаза, стрептокиназа и другие, которые способны расщеплять и инактивировать С5а-компонент комплемента, что является мощным хемоаттрактантом; вызывать гемолиз эритроцитов; разрушать фагоциты; облегчать распространение стрептококков по соединительной ткани; оказывать кардиотоксическое и лейкоцитоксическое действие; активировать плазминоген, что приводит к образованию плазмينا и растворению фибриновых волокон [90, 158].

Помимо синтеза ферментов, важным фактором патогенности стрептококков является продукция токсинов, среди них представлены эритрогенные токсины и кардиогепатический токсин. Эритрогенные токсины, подобные токсинам стафилококков; проявляют пирогенную активность за счет непосредственного действия на гипоталамус, кроме того имеют суперантигенные свойства и оказывают митогенный эффект на Т-клетки, а также стимулируют секрецию макрофагами ИЛ-1 и фактора некроза опухолей, являющихся медиаторами септического шока. Кардиогепатический токсин продуцируют некоторые штаммы стрептококков группы А, этот токсин вызывает поражения миокарда и диафрагмы, а также образование гранулем в печени [10,134,160].

Заключение

Таким образом, из обзора литературных данных следует, что вопросы лечения и профилактики мастита бактериальной этиологии по-прежнему остаются актуальными. Хорошо изучен видовой состав и свойства микрофлоры, вызывающей маститы. Также достаточно хорошо представлены особенности анатомического строения и морфологии молочной железы и иммунологическая роль молочной железы в обеспечении колострального иммунитета, клеточные и гуморальные аспекты его формирования. Предложены и изучены различные варианты локальной антигенной стимуляции молочной железы, доказана их терапевтическая эффективность в вопросах лечения мастита и его профилактики.

Наряду с этим иммунобиологические свойства молочной железы раскрыты недостаточно и методы локальной антигенной стимуляции на данный момент не имеют теоретической обоснованности. Популяция антигенпрезентирующих клеток в молочной железе остается практически неизученной на сегодняшний день.

В связи с этим мы решили рассмотреть более подробно механизм антигенпрезентации в молочной железе при локальной антигенной стимуляции и определить роль антигенпрезентирующих клеток макрофагальной природы в механизме формирования локального иммунного ответа, тем самым подводя теоретическое обоснование для применения методов локальной антигенной стимуляции.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Научно-исследовательская работа выполнялась в 2017 – 2022 гг. в ФГБОУ ВО «СПбГУВМ» на кафедре биохимии и физиологии, а также на базе ветеринарного центра «Ягуар» и ветеринарной лаборатории «Барс-диагностикс» расположенных по адресу – Санкт-Петербург, Витебский проспект 41. В подготовке опытной модели и лабораторных исследованиях принимали участие: Погодаева П.С., Карпенко Л.Ю., Жичкина Л.В.

Экспериментальная часть научно-квалификационной работы посвящена исследованиям по изучению иммунологических свойств молочной железы на опытной модели лактирующих мышей. В ходе эксперимента были изучены изменения качественных и количественных показателей клеток макрофагальной природы на разных этапах лактации при локальном воздействии на молочную железу различными термостабильными антигенами. Также в ходе исследования было изучено изменение концентрации иммуноглобулинов классов А, G и М в крови подопытных животных на различных этапах лактации в условиях локальной стимуляции молочной железы стафилококковой вакциной.

Опытные модели были сгруппированы и содержались на базе вивария кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «СПбГУВМ» в соответствии с «Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1987), с учетом требований к врачебно-биологическому эксперименту по соблюдению одинаковых условий кормления и содержания животных в период проведения работы и учета результатов.

Для проведения экспериментов в ФГУП Питомник лабораторных животных «Рапполово» приобретали клинически здоровых половозрелых мышей стандартной массы (17-25 г). Перед исследованием все животные были подвергнуты профилактическому карантинированию и клиническому осмотру. Мышей содержали в поликарбонатных клетках на подстилке из

опилок деревьев хвойных пород. Для кормления использовался комбикорм полнорационный для лабораторных животных ЛБК-120 (Тосненский комбикормовый завод), соответствующий ГОСТ 34566-2019. Профильтрованная водопроводная вода давалась в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках.

Целью первой серии опытов было провести локальную антигенную стимуляцию молочной железы лакирующих мышей стафилококковой вакциной и зафиксировать морфологические изменения молочной железы путем гистологического исследования и количественные изменения в составе антигенпрезентирующих клеток макрофагального ряда на разных этапах лактации, а также корреляцию количественного изменения макрофагальных клеток с количеством иммуноглобулинов в крови исследуемых особей.

Для данной серии опытов приобрели мышей в количестве 6 самок и 2 самцов. Особи были подвергнуты клиническому осмотру и сгруппированы по 2 самки и 1 самцу и рассажены в отдельные клетки для оплодотворения самок и получения потомства, содержащегося в одинаковых условиях, согласно требованиям, к врачебно-биологическому эксперименту [49].

Спустя две недели, по наличию визуальных признаков – увеличение объемов брюшной полости и увеличение массы самок, было определено наступление беременности. Беременных самок отсадили в отдельные от самцов клетки, по две самки в каждой для создания оптимальных условий для родов и выкармливания потомства. Всего от беременных самок было получено 54 детеныша. Мышата содержались вместе с матерями до окончания периода лактации – 21 день, после чего были рассажены в 8 клетки по 8 особей в каждой до наступления половой зрелости и определения половой принадлежности.

Приблизительно через месяц стало возможным определить половую принадлежность мышей и сгруппировать их для получения беременных самок непосредственно для постановки эксперимента. Из них в свою очередь сформированы опытная (30 самок) и контрольная (30 самок) группы. Мыши

были сгруппированы по 10 самок и 2 самца в одной клетке. После появления визуальных признаков беременности самцы были удалены из клеток.

Согласно литературным данным, основным возбудителем маститов бактериальной этиологии являются бактерии вида *Staphylococcus aureus*, таким образом, защита от данного возбудителя является основной целью в ходе разработки методов лечения и профилактики данного заболевания [41,23].

В связи с этим, для изучения механизма локального иммунного ответа молочной железы была выбрана стафилококковая вакцина, содержащая комплекс растворимых термостабильных антигенов, извлеченных из микробных клеток стафилококка водно-фенольной экстракцией. Кроме того, данная вакцина является наиболее изученной и доказавшей свою эффективность в клинических исследованиях по лечению и профилактике мастита согласно данным Скопичева, В.Г. (2009, 2018) и Евглевского, А.А (2002, 2014).

Самки опытной группы за 5-7 дней до родов были обработаны фабричной стафилококковой вакциной (производство АО «Биомед» им. И. И. Мечникова), введенной подкожно в область молочных желез в дозировке 0.2 мл. Для контрольной группы использовался стерильный изотонический раствор натрия хлорида, по аналогичной схеме.

В связи с поставленной целью – зафиксировать изменения иммунного статуса молочной железы путем цитологического, гистологического и иммунологического исследования на разных этапах лактации, отбор материала проводился в три этапа:

- 1) в начале первой недели лактации (10 самок из опытной группы и 10 из контрольной);
- 2) в начале второй недели лактации (10 самок из опытной группы и 10 из контрольной);
- 3) в начале третьей недели лактации (10 самок из опытной группы и 10 из контрольной).

Кровь отбирали для исследования на базе ветеринарного центра «Ягуар», согласно стандартной методике взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей (О. И. Степанова, 2006). Кровь собирали в шприцы предварительно омытые гепарином для консервации и предотвращения формирования сгустков. Для получения плазмы кровь переливали в эпендорфы и центрифугировали образцы при 1000 оборотов в течение 30 минут (рисунок 1). Сразу же отбирали плазму замораживали для дальнейшего исследования [49].

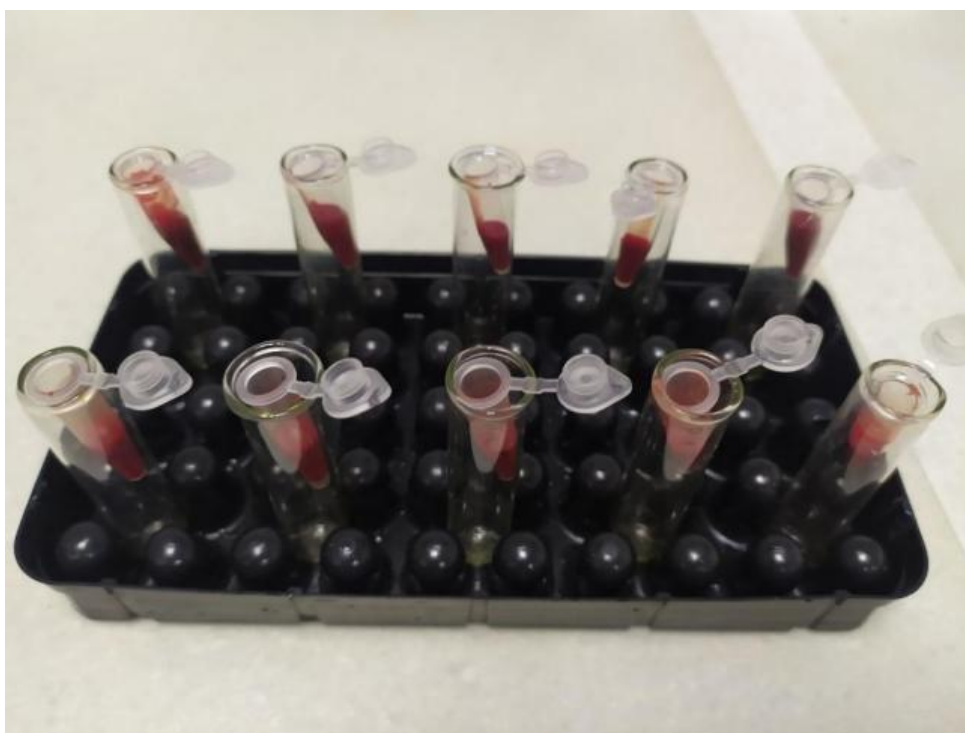


Рисунок 1 – Пробы крови мышей

Для определения количества иммуноглобулинов в плазме использовали тесты ELISA Kit for Immunoglobulin A, G, M (рисунок 2). В этом анализе используется метод иммуноферментного анализа конкурентного ингибирования. Микропланшеты, входящие в наборы, 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 добавления раствора ТМБ-субстрата, только те лунки, которые содержат специфичные определяемые иммуноглобулины, антитела с биотином и авидин с пероксидазой хрена изменятся в цвете. После добавления раствора субстрата интенсивность окраски обратно пропорциональна 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.

Для определения концентрации иммуноглобулинов реагенты подготавливали в соответствии с инструкцией к наборам. Перед использованием доводили все компоненты набора и образцы до комнатной температуры (18-25 ° C).

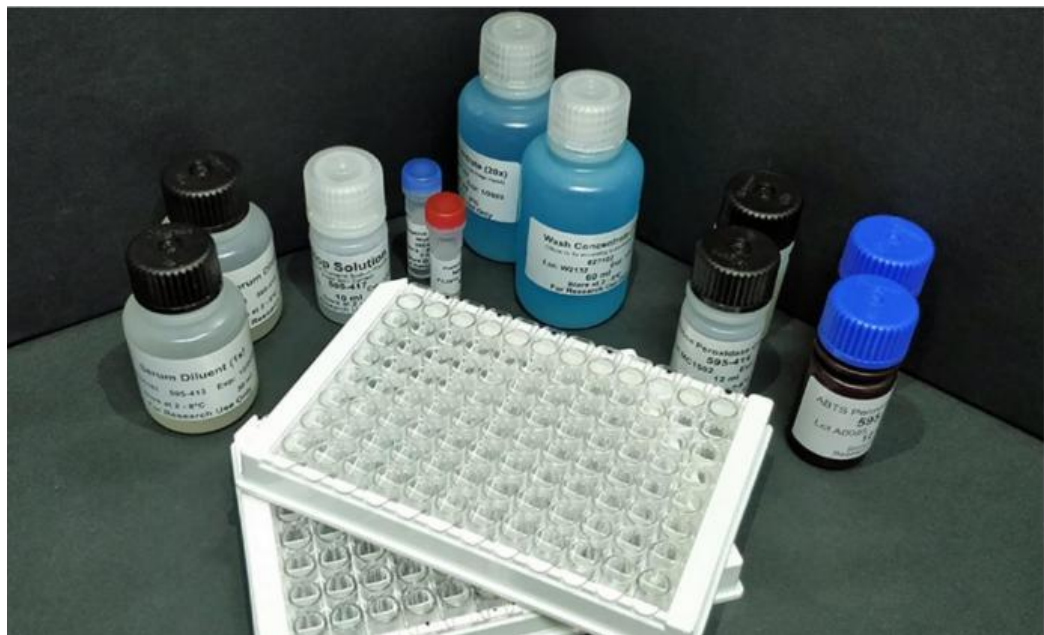


Рисунок 2 - Набор реагентов для определения концентрации иммуноглобулинов.

Для определения концентрации иммуноглобулинов класса А подготавливали стандарт восстановив его добавлением 1,0 мл стандартного разбавителя, и оставив на 10 минут при комнатной температуре. Концентрация стандарта в исходном растворе составляет 40 нг/мл. Далее разбавляли исходный раствор до концентрации 10 нг/мл, данная концентрация принимается за наивысший стандарт. Затем приготовили 7 пробирок, содержащих 0,5 мл стандартного разбавителя, и использовали разбавленный стандарт концентрации 10 нг/мл для получения серии двойных разведений. Таким образом получили 7 точек разбавленного стандарта, с его концентрацией 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл соответственно и последнюю пробирку со стандартным разбавителем концентрацией 0 нг/мл использовали в качестве бланка.

Стандартные реагенты А и В развели до их рабочей концентрации в 100 раз разбавителем для А и В, соответственно. Промывочный раствор приготовили, разбавив 20 мл концентрата промывочного раствора в 580 мл дистиллированной воды.

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: 1:40000, 1:80000 и 1:160000.

Определили 7 лунок для стандарта, 1 лунку для бланка и лунки, соответствующие количеству исследуемых образцов, при этом для каждого образца было приготовлено три варианта последовательных разведений 1:40000, 1:80000 и 1:160000. Добавили по 100 мкл каждого разведения стандарта, холостой пробы и образцов в соответствующие лунки. Накрыли пластину пленкой и инкубировали 1 час при 37°C в термостате, после чего удалили жидкость из каждой лунки. Добавили по 100 мкл реагента А в каждую лунку, накрыли лунки пленкой для планшетов и инкубировали 1 час при 37°C в термостате. Аспирировали раствор и промыли каждую лунку 350 мкл промывочного раствора с помощью пипетки. Удалили оставшуюся

жидкость из лунок перевернув планшет на абсорбирующую бумагу. Повторили процедуру промывки 3 раза. При последней промывки удалили остатки промывочного буфера путем аспирации, перевернули пластину и промокнули впитывающей бумагой. Добавили 100 мкл рабочего раствора реагента В в каждую лунку, накрыли лунки герметиком для планшетов и инкубировали 30 минут при 37°C в термостате. Затем повторили процесс аспирации и промывки 5 раз, по аналогичной схеме, как для реагента А. После этого добавили 90 мкл раствора ТМБ-субстрата в каждую лунку, накрыли новой пленкой для пластин и инкубировали 20 минут при 37°C.

Для определения концентрации иммуноглобулина класса G подготавливали стандарт восстановив его добавлением 0,5 мл стандартного разбавителя, и оставив на 10 минут при комнатной температуре. Концентрация стандарта в исходном растворе составляет 100 мкг/мл. Затем приготовили 5 пробирок, содержащих 0,6 мл стандартного разбавителя, и использовали разбавленный стандарт концентрации 100 мкг/мл для получения серии тройных разведений. Таким образом получили 5 точек разбавленного стандарта, с его концентрацией 100 мкг/мл, 33,33 мкг/мл, 11,11 мкг/мл, 3,70 мкг/мл, 1,23 мкг/мл соответственно и последнюю пробирку со стандартным разбавителем концентрацией 0 мкг/мл использовали в качестве бланка.

Стандартный реагент А развели до рабочей концентрации в 100 раз разбавителем. Промывочный раствор приготовили, разбавив 20 мл концентрата промывочного раствора в 580 мл дистиллированной воды.

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: 1:1000, 1:2000 и 1:4000.

Определили 5 лунок для стандарта, 1 лунку для бланка и лунки, соответствующие количеству исследуемых образцов, при этом для каждого образца было приготовлено три варианта последовательных разведений

1:1000, 1:2000 и 1:4000. Добавили по 50 мкл каждого разведения стандарта, холостой пробы и образцов в соответствующие лунки. Сразу же добавили по 50 мкл реагента А в каждую лунку, накрыли лунки пленкой для планшетов и инкубировали 1 час при 37°C в термостате. Аспирировали раствор и промыли каждую лунку 350 мкл промывочного раствора с помощью пипетки. Удалили оставшуюся жидкость из лунок, перевернув планшет на абсорбирующую бумагу. Повторили процедуру промывки 5 раз. При последней промывки удалили остатки промывочного буфера путем аспирации, перевернули пластину и промокнули впитывающей бумагой. После этого добавили 90 мкл раствора ТМБ-субстрата в каждую лунку, накрыли новой пленкой для пластин и инкубировали 20 минут при 37°C.

Для определения концентрации иммуноглобулинов класса М подготавливали стандарт восстановив его добавлением 0,5 мл стандартного разбавителя, и оставив на 10 минут при комнатной температуре. Концентрация стандарта в исходном растворе составляет 100000 нг/мл. Затем приготовили 5 пробирок, содержащих 0,4 мл стандартного разбавителя, и использовали разбавленный стандарт концентрации 100000 нг/мл для получения серии пятикратных разведений. Таким образом получили 5 точек разбавленного стандарта, с его концентрацией 100000 нг/мл, 20000 нг/мл, 4000 нг/мл, 800 нг/мл, 160 нг/мл соответственно и последнюю пробирку со стандартным разбавителем концентрацией 0 нг/мл использовали в качестве бланка.

Стандартные реагенты А и В развели до их рабочей концентрации в 100 раз разбавителем для А и В, соответственно. Промывочный раствор приготовили, разбавив 20 мл концентрата промывочного раствора в 580 мл дистиллированной воды.

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: 1:100, 1:200 и 1:400.

Определили 5 лунок для стандарта, 1 лунку для бланка и лунки, соответствующие количеству исследуемых образцов при этом для каждого образца, было приготовлено три варианта последовательных разведений 1:100, 1:200 и 1:400. Добавили по 50 мкл каждого разведения стандарта, холостой пробы и образцов в соответствующие лунки. Сразу же добавили по 50 мкл реагента А в каждую лунку, накрыли лунки пленкой для планшетов и инкубировали 1 час при 37°C в термостате. Аспирировали раствор и промыли каждую лунку 350 мкл промывочного раствора с помощью шприца. Удалили оставшуюся жидкость из лунок, перевернув планшет на абсорбирующую бумагу. Повторили процедуру промывки 3 раза. При последней промывки удалили остатки промывочного буфера путем аспирации, перевернули пластину и промокнули впитывающей бумагой. Добавили 100 мкл рабочего раствора реагента В в каждую лунку, накрыли лунки герметиком для планшетов и инкубировали 30 минут при 37°C в термостате. Затем повторили процесс аспирации и промывки 5 раз, по аналогичной схеме, как для реагента А. После этого добавили 90 мкл раствора ТМБ-субстрата в каждую лунку, накрыли новой пленкой для пластин и инкубировали 20 минут при 37°C.

Далее процесс одинаков для всех наборов - при добавлении субстрата жидкость меняет свой цвет на синий (рисунок 3). После экспозиции и фиксации изменения цвета добавляли 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку и тщательно перемешивали, в результате чего жидкость изменяет свой цвет на желтый. Протирали нижнюю часть планшета для удаления возможных загрязнений и отпечатков пальцев, запускали считыватель микропланшетов и немедленно проводили измерение при длине волны 450 нм.

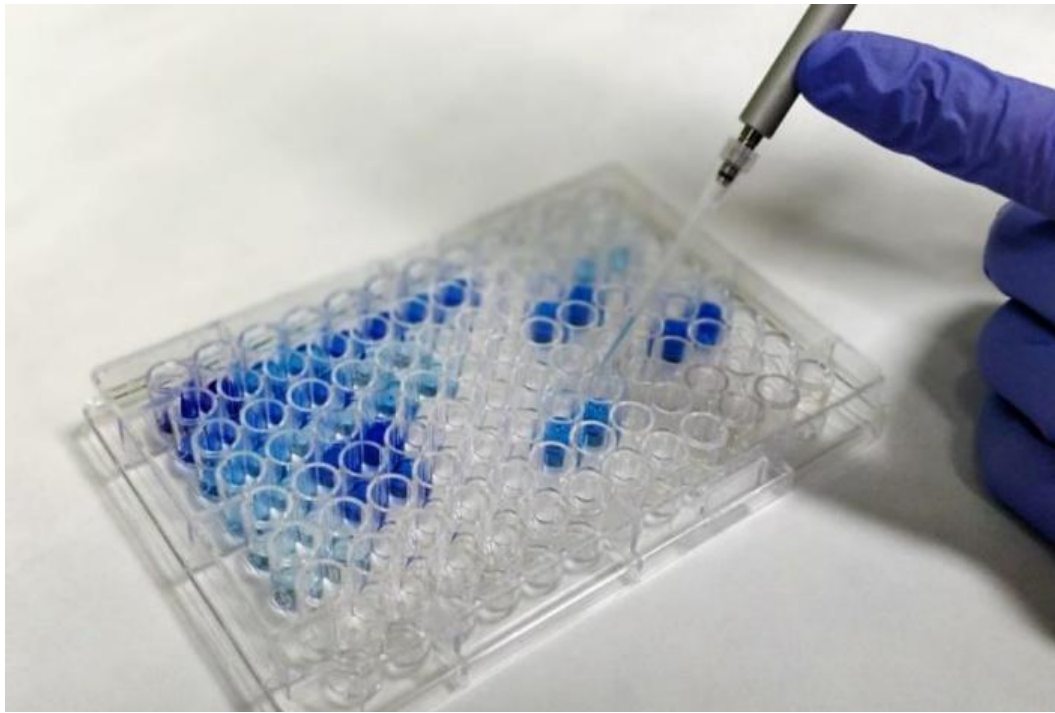


Рисунок 3 – добавление ТМБ-субстрата в лунки планшета, изменение окрашивания на синий цвет.

Для расчета результатов анализа мы создали стандартную кривую с логарифмической диаграммой концентрации стандартов по оси ординат и оптической плотностью по оси абсцисс используя стандартный пакет Excel. Далее на полученном графике мы отмечали данные оптической плотности по оси абсцисс, соответствующие исследуемым образцам и таким образом, вычисляли концентрацию иммуноглобулинов по оси ординат. Если образцы были разбавлены, концентрация, считанная со стандартной кривой, умножалась на коэффициент разбавления. После чего полученные данные были переведены в г/л и подвергнуты статистической обработке.

Патологоанатомическое исследование проводилось на базе ветеринарного центра «Ягуар», в специально оборудованном помещении. Мышей усыпляли, согласно принципам биоэтики, в соответствии с «Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1987). После наступления смерти скальпелем рассекали кожу вдоль белой линии живота и с помощью пинцета и скальпеля отделяли пакеты молочных желез.

Прикладывая извлеченные пакеты молочных желез к предметному стеклу изготовили мазки-отпечатки, которые после просушивания окрасили по Паппенгейму [47].

Методика окраски по Паппенгейму применяется для окраски мазков крови, не требует дополнительной фиксации и даёт более чёткие результаты. Вследствие этого она была выбрана нами в качестве подходящей для окраски клеток макрофагального ряда, сходных по морфологии с лейкоцитарными клетками крови.

Не фиксированные мазки заливали неразведённой готовой краской Май-Грюнвальда (смесь эозина и метиленовой сини на метиловом спирте, имеющая свойства фиксатора) на 3 минуты. После этого добавляли к красителю небольшое количество воды. Через 1 минуту, не споласкивая, добавляли рабочий раствором красителя Романовского-Гимза (смесь азура II, эозина и метиленового синего) на 10-12 минут. По окончании окраски промывали мазки в забуференной воде [49,50].

Полученные фрагменты молочных желез были помещены в стерильные пластиковые контейнеры с раствором 10% гистологически нейтрального забуференного формалина. Формалин наливали в таком количестве, чтобы его объем превышал объем образца не менее чем в 10 раз. Фиксация образцов длилась не менее 24 часов, после чего они поступали на дальнейшую обработку [51].

Изготовление гистологических препаратов проводилось на базе ветеринарной лаборатории «Барс-диагностикс» по стандартной методике.

После фиксации в 10% растворе формалина материал промывали в течение 30 минут в проточной воде, чтобы избавиться от избытка фиксатора. Обезвоживание ткани производили постепенно путем проведения ее через изопропиловые спирты возрастающей крепости: 70°, 80°, 90° и абсолютный изопропиловый спирт. Проводка по спиртам проводилась ручным методом, в плотно закрывающихся стеклянных емкостях. Степень обезвоживания

контролировали осмотром и пальпацией. В каждом спирте кусочки находились несколько часов [56].

Для этапа пропитывания в парафинах использовали три смены расплавленного парафина. Использовали гранулированный парафин (Производитель ООО «Лабико») с температурой плавления 54-56°C. Проводка по расплавленным парафинам проводилась ручным методом, в стеклянных емкостях, расположенных в термостате.

Заливку в парафин проводили на полуавтоматическом диспенсере для гистологической заливки с нагревающей и охлаждающей платой (ДИП-02, «АТМ-практика»). Пластиковую гистологическую формочку помещали на нагревательную пластину и заполняли парафином на 70% объема. Далее перемещали формочку на охлаждающую пластину и помещали в нее образцы, ориентируя нужным образом и аккуратно прижимая к дну формочки для стабилизации положения образца. Затем накрывали формочку корпусом кассеты, которая далее служила основанием блока и аккуратно прижимали. После заливки блоки переносили в холодильник на ночь, для полного застывания парафина. Застывшие блоки вынимали из формочек и удаляли лишний парафин с ребер основания кассеты притупленным скальпелем (рисунок 4) [56].

Таблица 1 - Проводка гистологических препаратов в спиртах и парафине

| Реактив | Время нахождения образца, ч | Температура, °С |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------|
| Изопропиловый спирт, 70% | 16 | 22-25 |
| Изопропиловый спирт, 80% | 1,5 | 22-25 |
| Изопропиловый спирт, 90% | 1,5 | 22-25 |
| Изопропиловый спирт, абс. | 1,5 | 22-25 |
| Парафин I | 1,5 | 56-60 |
| Парафин II | 1,5 | 56-60 |
| Парафин III | 1,5 | 56-60 |

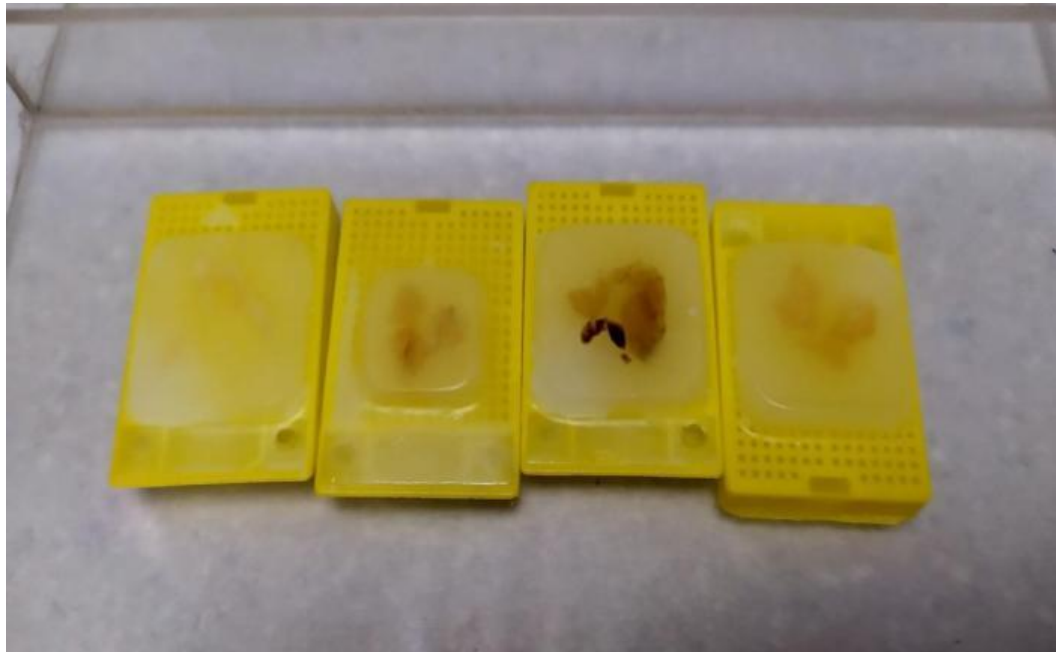


Рисунок 4 – Гистологические препараты молочных желез, заключенные в парафиновые блоки

Нарезку блоков осуществляли на полуавтоматическом микротоме (Microm HM340, Zeiss). После получения ровной поверхности среза на всей площади блока двигали нож, подводя под блок его острую половину. Далее движения блока регулировались автоматической ручкой, что позволяло получить срезы толщиной 2-4 мкм. Полученные срезы гистологическими иглами переносили на предметное стекло с предварительно нанесенным желатиновым адгезивом (ООО «Лабико»). Расправленный от складок на стекле образец перемещали на термостолик (OTS 40.3030, Medite) при температуре 37,0-37,4°C до полного высыхания. Перед окраской из парафиновых срезов удаляли парафин растворением в О-Ксилоле (ООО «Лабико») и трех порциях «Деола» - заменителя абсолютированного этанола (ООО «Лабико») [56].

Для окраски гистосрезов был выбран стандартный метод окраски гематоксилином и эозином. Данный метод включает использование основного красителя гематоксилина, окрашивающего синим цветом базофильные клеточные структуры и спиртового кислого красителя эозина

У, окрашивающего красно-розовым цветом эозинофильные структуры клетки [56].

На полученные срезы наносили краситель Гематоксилин Джилла (ООО «Лабико») на 10 минут, затем срезы промывали водой (рисунок 5). После этого наносили краситель водно-спиртовой раствор эозина (ООО «Лабико») на 5-10 секунд и снова смывали дистиллированной водой (рисунок 6). Далее обезвоживали срезы в батарее изопропиловых спиртов возрастающей крепости (70°, 80°, 90° и абсолютный изопропиловый спирт) в течение 10 секунд в каждом и осветляли, погружая сначала в смесь изопропилового спирта с О-Ксилолом (1:1) на 5 секунд, а затем в чистый О-Ксилол на 2 минуты, после чего получили готовые срезы (рисунок 7) [56].

Таблица 2 - Депарафинизация и окраска гистосрезов

| Реактив | Время нахождения стеклов |
|---|--------------------------|
| Депарафинизация | |
| О-Ксилол I | 3 мин. |
| О-Ксилол II | 3 мин. |
| О-Ксилол III | 3 мин. |
| Деол, абс. | 3 мин. |
| Деол, абс. | 3 мин. |
| Деол, 70% | 3 мин. |
| Вода | 2 мин. |
| Окраска гематоксилином и эозином | |
| Гематоксилин Джилла (ООО «Лабико») | 10 мин. |
| Проточная вода | 10 мин. |
| Промывка в проточной воде | До прозрачной воды |
| Водно-спиртовой раствор эозина (ООО «Лабико») | 5-10 секунд |
| Промывка в проточной воде | До прозрачной воды |
| Дегидратация и просветление | |
| Изопропиловый спирт, 70% | 10 сек. |
| Изопропиловый спирт, 90% | 10 сек. |
| Изопропиловый спирт, абс | 10 сек. |
| Смесь изопропилового спирта с О-Ксилолом 1:1 | 5 сек. |
| О-Ксилол | 2 мин. |

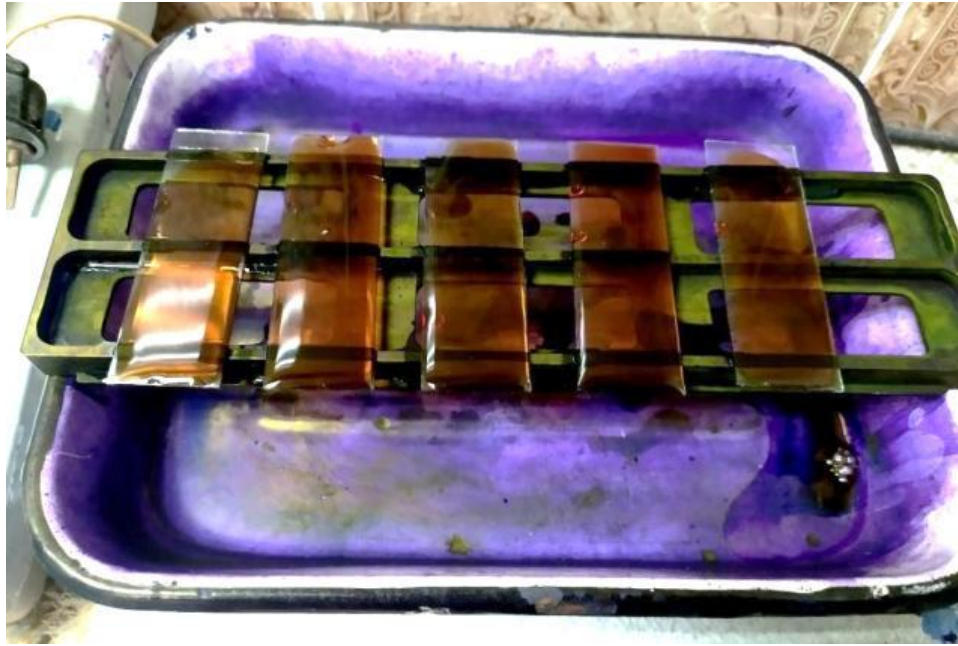


Рисунок 5 – Окраска гистосрезов Гематоксилином Джилла (ООО «Лабико»)

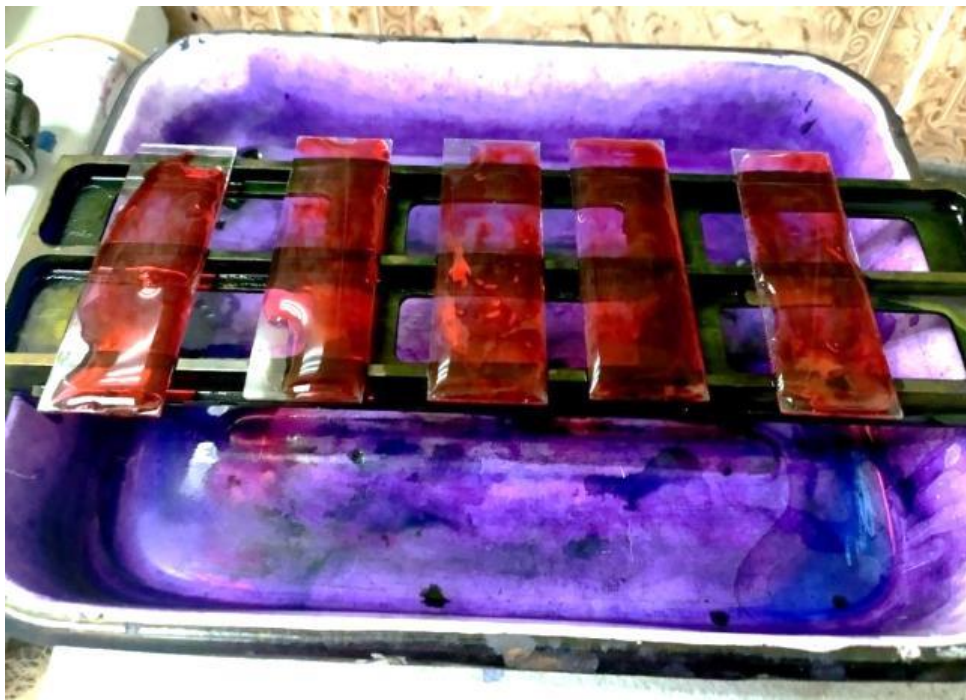


Рисунок 6 – Окраска гистосрезов водно-спиртовым раствором эозина (ООО «Лабико»)



Рисунок 7 – Окрашенные гистосрезы молочной железы мышей

Целью второй серии опытов было провести локальную антигенную стимуляцию молочной железы и изучить влияние различных термостабильных антигенов на формирование локального иммунного ответа молочной железы путем гистологического исследования. Для этого были выбраны следующие термостабильные антигены:

- 1) Стафилококковая вакцина (производство АО «Биомед» им. И.И.Мечникова, Россия) – содержит комплекс растворимых термостабильных антигенов, извлеченных из микробных клеток стафилококка водно-фенольной экстракцией;
- 2) Вакцина СТАРТВАК (STARTVAK) (производство Laboratorios Hipra, Spain) – содержит инактивированные штаммы *Escherichia coli* (штамм J5) и *Staphylococcus aureus* CP8 (штамм SP140);
- 3) Вакцина ПРЕВЕНАР 13 (производство НПО Петровакс Фарм, Россия) – содержит 13-ти валентный очищенный и конъюгированный пневмококковый полисахаридный антиген.

Согласно литературным данным, основными возбудителями маститов бактериальной этиологии являются бактерии видов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Streptococcus agalactiae*, таким образом, защита от данных возбудителей является основной целью в ходе разработки методов лечения и профилактики данного заболевания [41,23].

Помимо стафилококковой вакцины, соответствующей основному возбудителю - *Staphylococcus aureus*, для эксперимента на опытной модели были выбраны вакцины СТАРТВАК и ПРЕВЕНАР 13.

Вакцина СТАРТВАК была заявлена в качестве экспериментальной за счет входящих в её состав штаммов *Escherichia coli*, являющихся вторыми по значимости среди возбудителей мастита бактериальной этиологии, а также в связи с отсутствием на данный момент вакцины, направленной на защиту исключительно от этого вида бактерий.

Вакцина ПРЕВЕНАР 13 не является специфической по отношению к третьему по значимости возбудителю маститов бактериальной этиологии - *Streptococcus agalactiae*, однако содержит антигены родственных ему по виду пневмококков. Согласно литературным данным, выработка в организме антител родственных, но не тождественных возбудителю также способна снизить риск заражения или же облегчить течение заболевания. Таким образом, за счет отсутствия на рынке вакцины специфической для данного возбудителя, вакцина ПРЕВЕНАР 13 была заявлена в качестве пригодной для использования на экспериментальной модели.

Для проведения эксперимента нами были приобретены мыши в количестве 6 самок. Для их оплодотворения использовали самцов, оставшихся после постановки предыдущего опыта. Особи были подвергнуты клиническому осмотру и сгруппированы по 2 самки и 1 самцу и рассажены в отдельные клетки для оплодотворения самок и получения потомства, содержащегося в одинаковых условиях согласно требованиям к врачбно-биологическому эксперименту [49].

Спустя две недели по наличию визуальных признаков – увеличение объемов брюшной полости и увеличение массы самок, было определено наступление беременности. Беременных самок отсадили в отдельные от самцов клетки, по две самки в каждой для создания оптимальных условий для родов и выкармливания потомства. Всего от беременных самок было получено 52 детеныша. Мышата содержались вместе с матерями до окончания периода лактации – 21 день, после чего были рассажены в 6 клеток по 8 или 9 особей в каждой до наступления половой зрелости и определения половой принадлежности.

Приблизительно через месяц стало возможным определить половую принадлежность мышей и сгруппировать их для получения беременных самок непосредственно для постановки эксперимента. Из них в свою очередь сформированы опытная (30 самок) и контрольная (10 самок) группы. Мыши были сгруппированы по 6 самок и 2 самца в одной клетке для группы опыта и 5 самок и 2 самца в контрольной группе. После появления визуальных признаков беременности самцы были удалены из клеток.

Мышей составляющих опытные группы за 5-7 дней до родов обработали фабричными вакцинами: стафилококковой вакциной (производство АО «Биомед» им. И.И.Мечникова, Россия), вакциной СТАРТВАК (STARTVAK) (производство Laboratorios Hipra, Spain) и вакциной ПРЕВЕНАР 13 (производство НПО Петровакс Фарм, Россия) введенными подкожно в область молочных желез в дозировке 0.2 мл. Для контрольной группы использовался стерильный изотонический раствор натрия хлорида, по аналогичной схеме [49].

Так как в предыдущем опыте наиболее высокие показатели клеток макрофагального ряда в молочных железах наблюдались у мышей в ходе второй недели лактации, было принято решение провести отбор патологоанатомического материала именно в этот период.

Патологоанатомическое исследование проводилось на базе ветеринарного центра «Ягуар», в специально оборудованном помещении.

Мышей усыпляли, согласно принципам биоэтики, в соответствии с «Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1987). После наступления смерти скальпелем рассекали кожу вдоль белой линии живота и с помощью пинцета и скальпеля отделяли пакеты молочных желез.

Полученные фрагменты молочных желез были помещены в стерильные пластиковые контейнеры с раствором 10% гистологически нейтрального забуференного формалина. Формалин наливали в таком количестве, чтобы его объем превышал объем образца не менее чем в 10 раз. Фиксация образцов длилась не менее 24 часов, после чего они поступали на дальнейшую обработку [56]. Методики изготовления и окраски гистологических препаратов аналогичны методикам, применяемым в первой серии опытов.

Для микроскопии использовался светооптический микроскоп Миромед-2 вар. 3-20 inf. Микрофотографирование осуществляли при помощи видеоокуляра TourCam 5,1 Мпикс и соответствующего программного обеспечения. В ходе микроскопии гистосрезов также был проведен подсчет клеток макрофагального ряда в каждом из полученных препаратов, подсчет выполнялся в ста полях зрения.

Полученные в опытах цифровые данные обрабатывались на компьютере с использованием пакета статистических программ Excel Statistica 6.0. Достоверность различий между сериями определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

2.2. Результаты исследований

2.2.1 Локальный иммунный ответ молочной железы на под влиянием стафилококковой вакцины

2.2.1.1 Результаты цитологическое исследование мазков-отпечатков молочной железы

Мазки-отпечатки использовались для получения быстрых предварительных результатов, для оценки успешности эксперимента. Целью микроскопического исследования было обнаружить в мазках клетки макрофагального ряда, что означало бы, что мы сможем увидеть их и в гистологических препаратах в ходе дальнейшего исследования.

В результате окраски по Паппенгейму ядра клеток окрашиваются в красно-фиолетовый цвет, цитоплазма лимфоидных клеток в светло-синий, лимфоидная азурная грануляция в ярко красный, миелоидная азурная грануляция в фиолетовый с коричневым, нейтрофильные гранулы – светло-фиолетовые, эозинофильные гранулы – красные, базофильные гранулы – темно-фиолетовые, эритроциты – розовые [49].

В ходе микроскопии клетки макрофагального ряда определялись по следующим морфологическим признакам клеток [13,28,99]:

- 1) фагоцитоз и наличие цитоплазматических включений;
- 2) крупные размеры клетки;
- 3) неровные края клетки и наличие отростков;
- 4) наличие нескольких ядер.

В результате микроскопии мазков-отпечатков были получены следующие данные: в поле зрения наблюдаются эритроциты, капли молочного жира, кокковая микрофлора и искомые клетки макрофагального ряда. Они представляют собой крупные клетки диаметром 15-80 мкм, неправильной формы, с крупными овальными ядрами, окрашенными в фиолетовый цвет. Иногда наблюдаются клетки, имеющие несколько ядер. Цитоплазма обильная, светлая, окрашена в синий и голубой цвета, без четких границ с большим количеством эндоплазматических включений:

эндоцитозных микровезикул, вакуолей и лизосом, придающих клетке пенистый вид (рисунок 8,9,10,11,12,13).

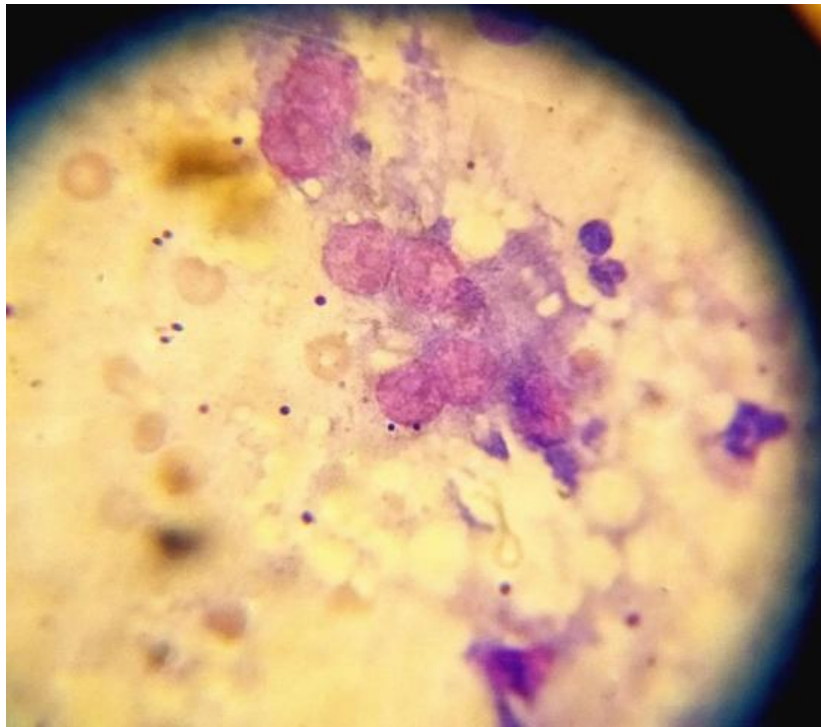


Рисунок 8 – Клетки макрофагального ряда в мазке-отпечатке молочной железы мыши иммунизированной стафилококковой вакциной в первую неделю лактации, окраска по Паппенгейму, увеличение x1000 под иммерсией.



Рисунок 9 – Клетки макрофагального ряда в мазке-отпечатке молочной-железы мыши иммунизированной стафилококковой вакциной в первую неделю лактации, окраска по Паппенгейму, увеличение x1000 под иммерсией.

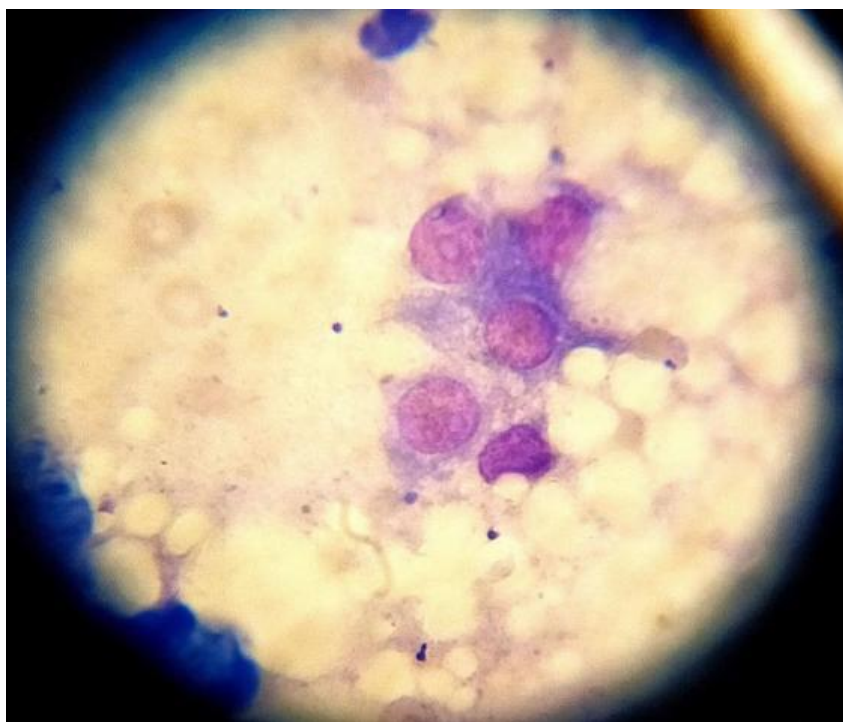


Рисунок 10 – Клетки макрофагального ряда в мазке-отпечатке молочной-железы мыши иммунизированной стафилококковой вакциной на второй неделе лактации, окраска по Паппенгейму, увеличение $\times 1000$ под иммерсией.

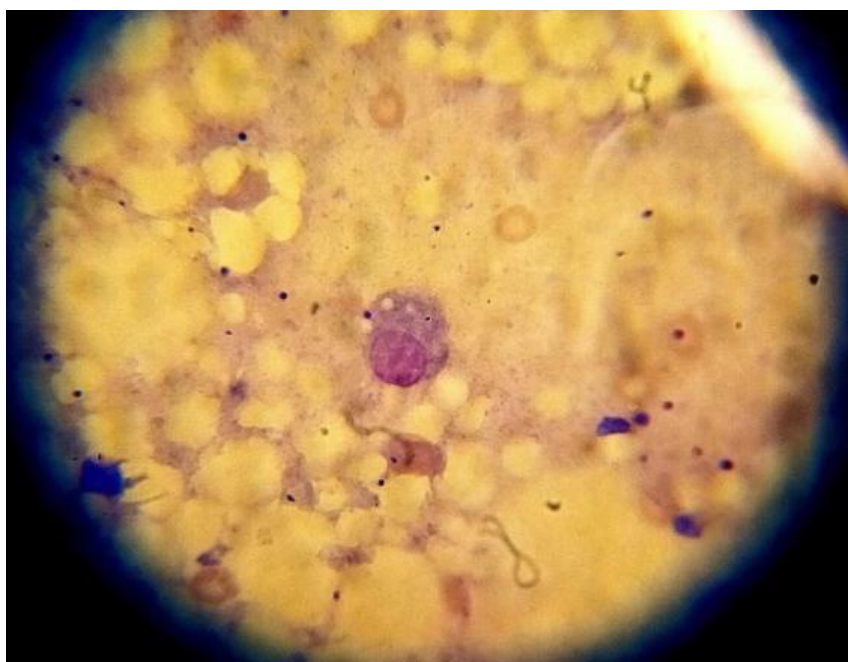


Рисунок 11 – Клетка макрофагального ряда в мазке-отпечатке молочной-железы мыши иммунизированной стафилококковой вакциной на второй неделе лактации, окраска по Паппенгейму, увеличение $\times 1000$ под иммерсией.

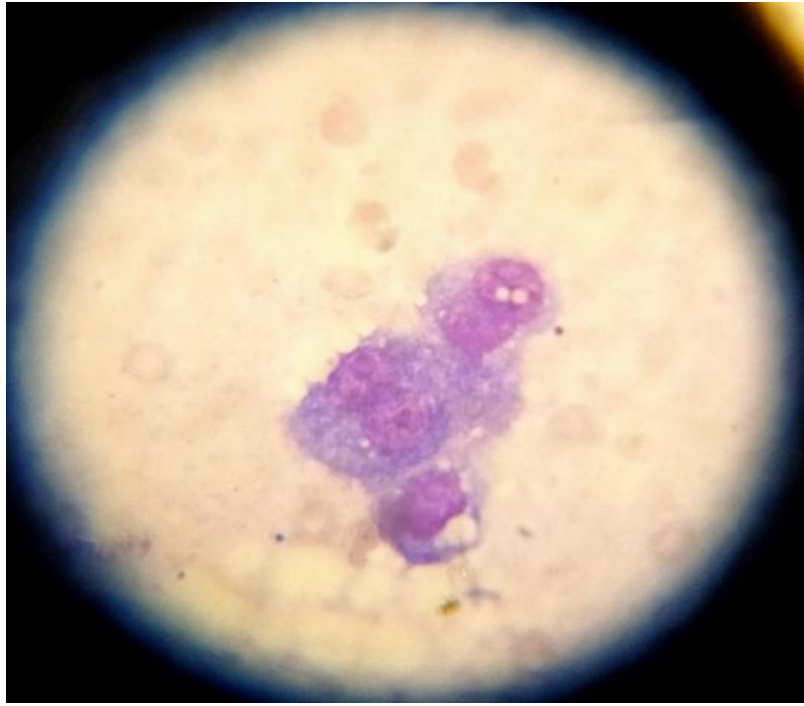


Рисунок 12 – Клетки макрофагального ряда в мазке-отпечатке молочной-железы мыши иммунизированной стафилококковой вакциной на третьей неделе лактации, окраска по Паппенгейму, увеличение x1000 под иммерсией.



Рисунок 13 – Клетки макрофагального ряда в мазке-отпечатке молочной-железы мыши иммунизированной стафилококковой вакциной на второй неделе лактации, окраска по Паппенгейму, увеличение x1000 под иммерсией.

В связи с обнаружением искомых клеток в мазках-отпечатках, предварительные результаты эксперимента были признаны успешными, что позволило перейти к дальнейшему исследованию гистологических препаратов молочной железы.

2.2.1.2 Результаты гистологического исследования препаратов молочной железы

Метод окраски гематоксилин-эозином включает использование основного красителя гематоксилина, окрашивающего синим цветом базофильные клеточные структуры – клеточное ядро, рибосомы, участки цитоплазмы богатые РНК, структуры содержащие нуклеиновые кислоты, и спиртового кислого красителя эозина Y, окрашивающего красно-розовым цветом эозинофильные структуры клетки – цитоплазму, структуры содержащие внутриклеточные и внеклеточные белки [49].

В ходе микроскопии полученных гистологических препаратов молочной железы мышей наблюдается следующая картина:

В гистосрезах молочной железы первой и второй недель лактации ткань состоит из долек, сформированных из скопления жировых клеток. Дольки отделены друг от друга прослойками рыхлой соединительной ткани, альвеолы заполнены секретом.

Стенка молочной альвеолы образована лактоцитами и звёздчатыми миоэпителиоцитами. Снаружи альвеолы выстланы базальной мембраной. В ходе лактации лактоциты приобретают низко-кубическую форму, ядра лактоцитов круглые. Лактоциты объединены друг с другом с помощью плотных контактов и десмосом. На апикальной поверхности лактоцитов присутствуют микроворсинки, а в цитоплазме накапливаются включения – сферические капельки молочного жира различных размеров, содержащие преимущественно триглицериды.

Между базальной мембраной и основанием лактоцитов находятся миоэпителиоциты (звёздчатые клетки), которые охватывают секреторные

клетки своими пальцевидными выростами. Ядра миоэпителиоцитов тёмные палочковидные, в цитоплазме содержатся актиномиозиновые комплексы.

Клетки, образующие млечный альвеолярный ход, лежат в один слой, содержат меньшее количество цитоплазмы. Млечные альвеолярные ходы переходят в разветвлённые внутридольковые протоки, затем объединяясь в междольковые протоки, которые выстланы кубическим и призматическим эпителием (рисунок 14,15).

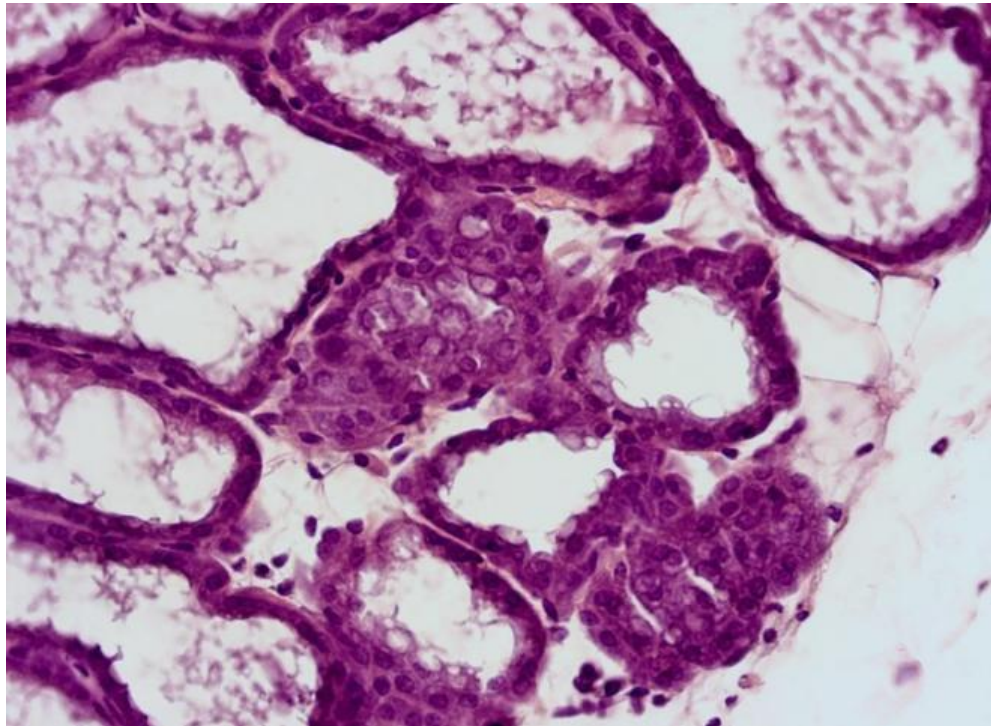


Рисунок 14 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы на первой неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

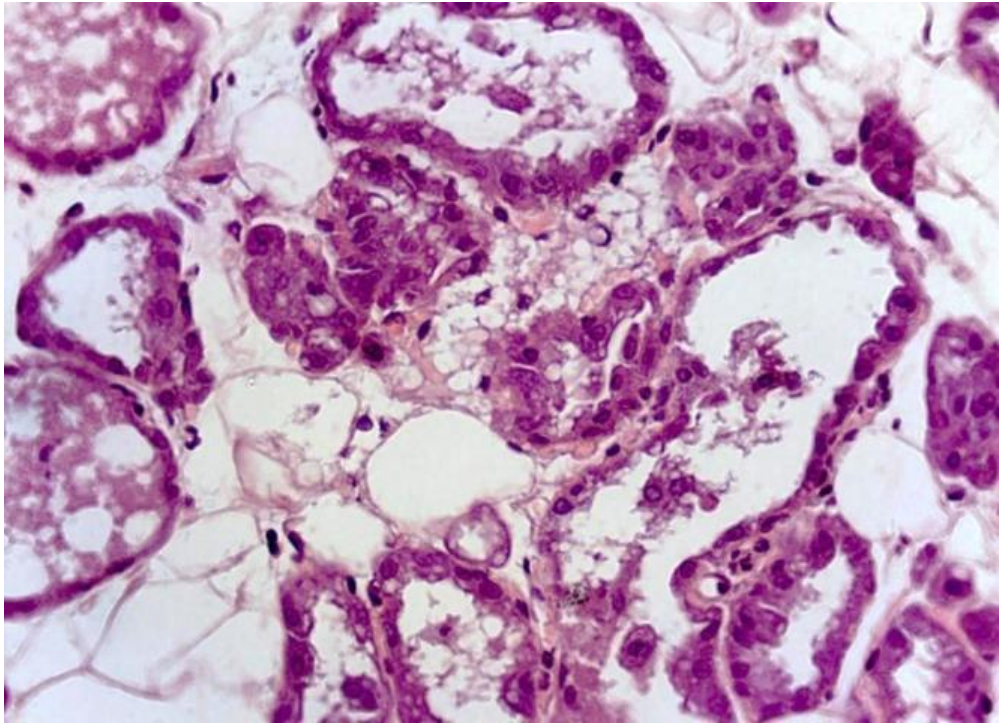


Рисунок 15 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

В препаратах третьей недели лактации кубический эпителий становится более плоским, увеличивается количество рыхлой соединительной ткани, уменьшается количество секрета. Начинается постепенное замещение секреторного эпителия жировой тканью, что связано с завершением процесса лактации и началом процессов инволюции молочной железы (рисунок 16).

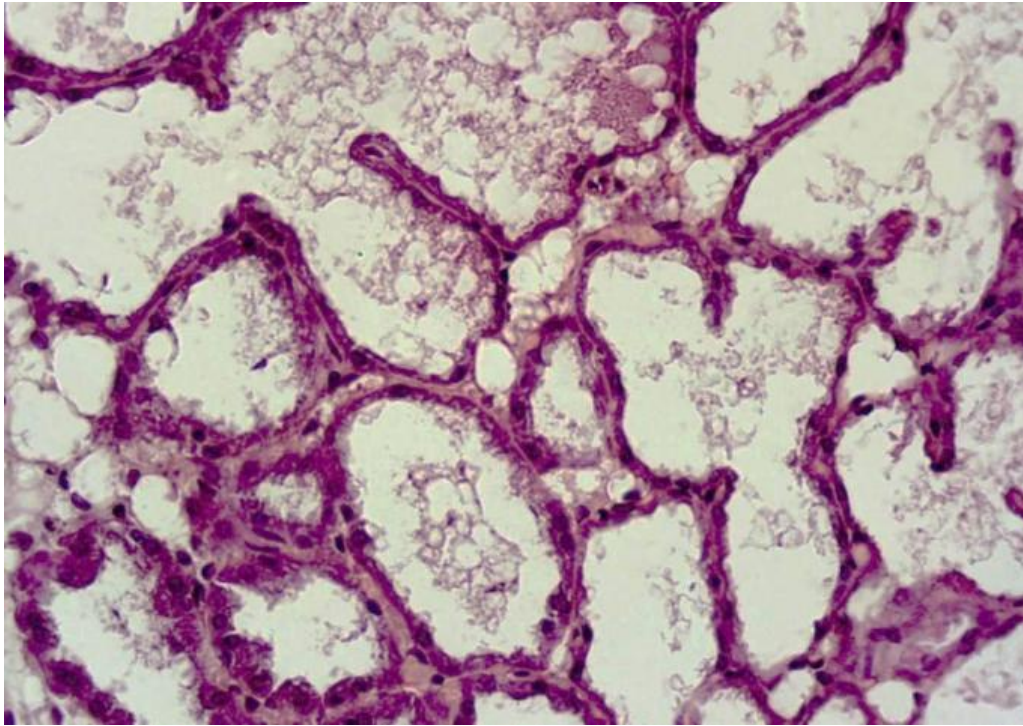


Рисунок 16 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы на третьей неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

В контрольных образцах общая гистологическая структура молочной железы сходна со структурой опытных образцов, однако визуальная дифференцировка клеток просматривается хуже, препараты имеют меньшую четкость, клеточные элементы зачастую трудноразличимы (рисунок 17,18,19).

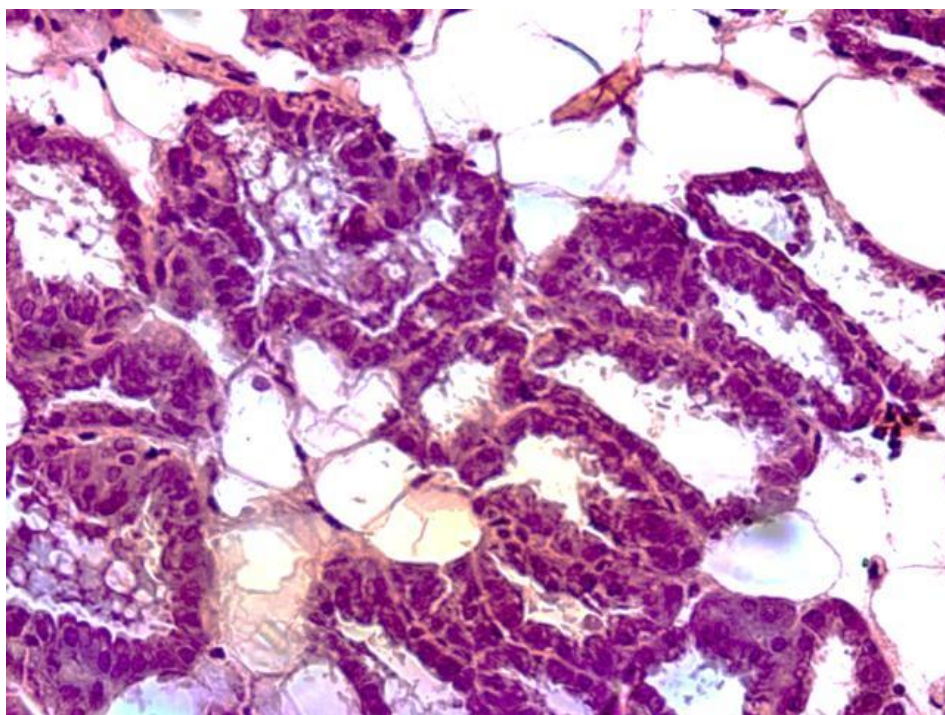


Рисунок 17 – Гистологическая структура молочной железы мыши из контрольной группы на первой неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

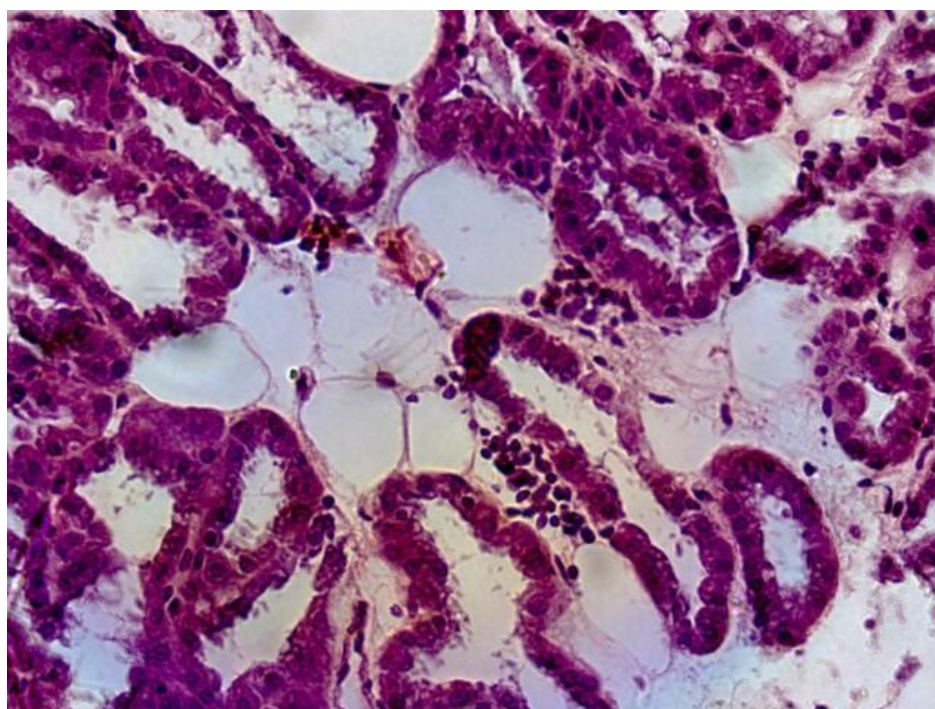


Рисунок 18 – Гистологическая структура молочной железы мыши из контрольной группы на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

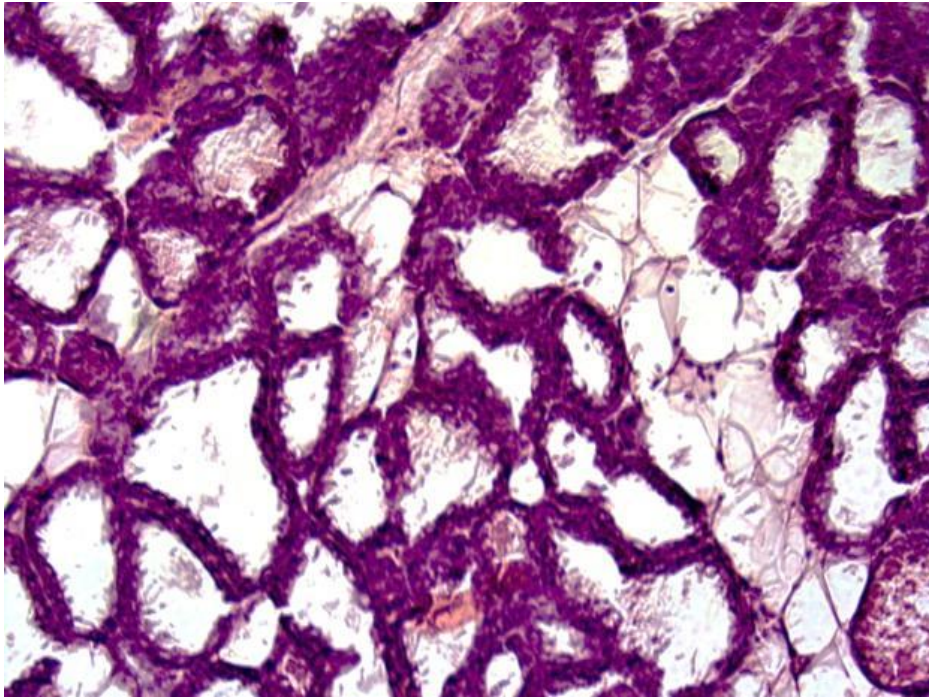


Рисунок 19 – Гистологическая структура молочной железы мыши из контрольной группы на третьей неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

У всех исследуемых образцов в некоторых полях зрения обнаруживаются искомые тканевые макрофаги. Они представляют собой крупные клетки диаметром 15-80 мкм, неравномерно распределенные в ткани, неправильной формы, зачастую имеющие множественные отростки.

Ядра овальные или продолговатые, часто наблюдаются клетки, имеющие несколько ядер; хроматин неплотный, локализован под ядерной оболочкой. Цитоплазма обильная, без четких границ с большим количеством эндоплазматических включений: эндоцитозных микровезикул, вакуолей и лизосом, придающих клетке пенистый вид (рисунок 20,21,22,23).

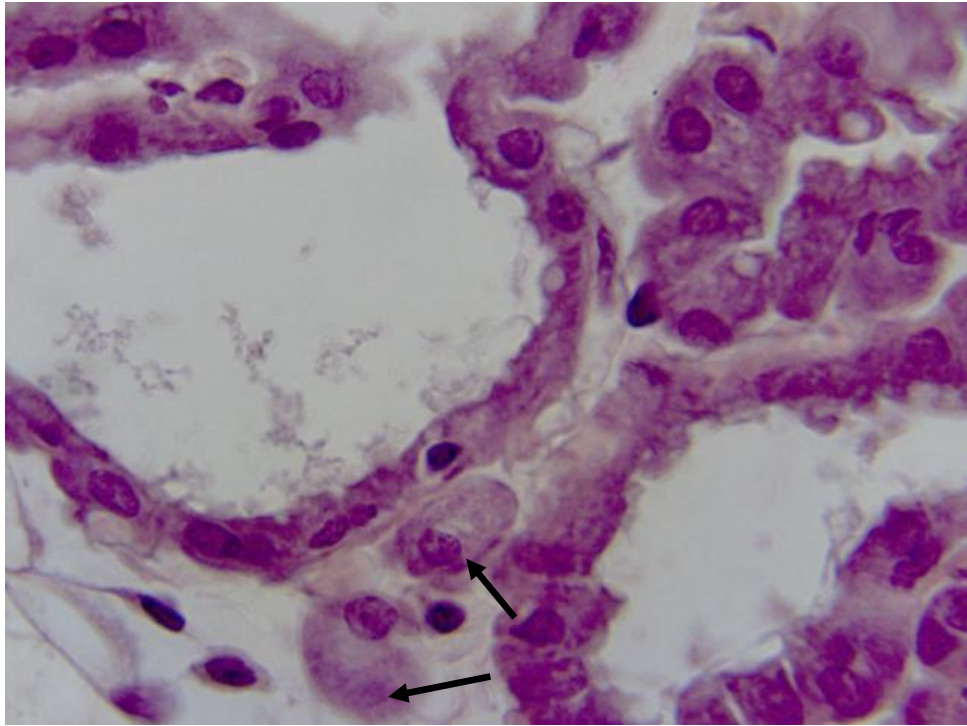


Рисунок 20 – Клетки макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы иммунизированной мыши на первой неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000 под иммерсией.

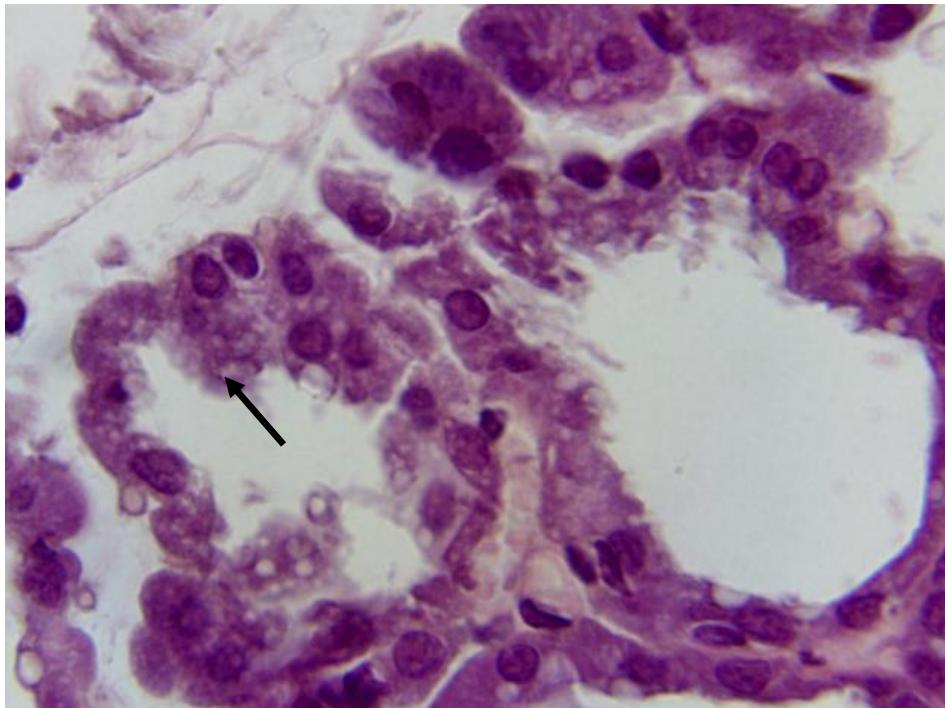


Рисунок 21 – Клетка макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы, иммунизированной мыши на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000 под иммерсией.

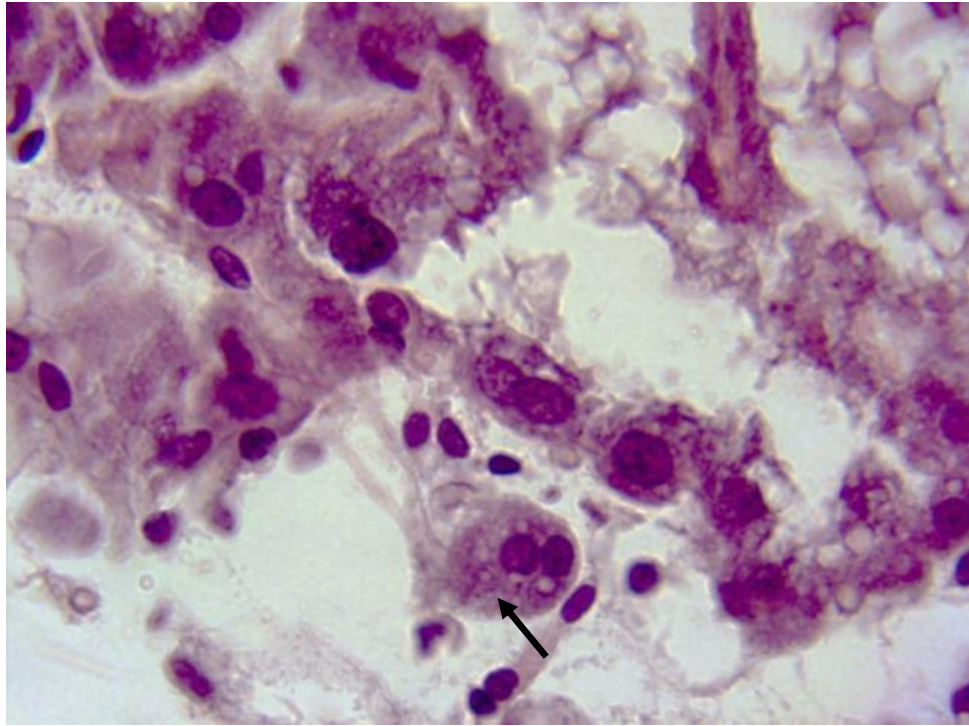


Рисунок 22 – Клетка макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы иммунизированной мыши на третьей неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000 под иммерсией.

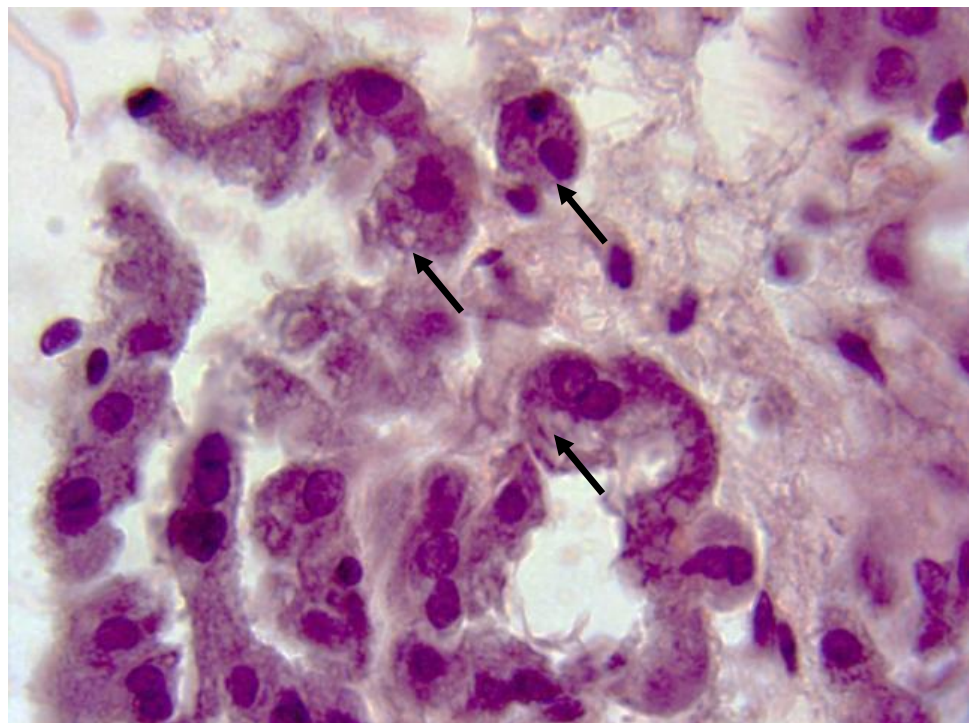


Рисунок 23 – Клетки макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы мыши из группы контроля на первой неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000 под иммерсией.

Таблица 3 – Среднее число клеток макрофагального ряда в ста полях зрения

| | 1 неделя лактации | 2 неделя лактации | 3 неделя лактации |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| Опытная группа (кол-во клеток в ста полях зрения) | 69,6±5,07* | 78,2±6,38* | 50,8±5,74* |
| Контрольная группа (кол-во клеток в ста полях зрения) | 38,3±6,51 | 47,3±5,52 | 23,3±4,67 |

* $P \leq 0,02$ по сравнению с группой контроля

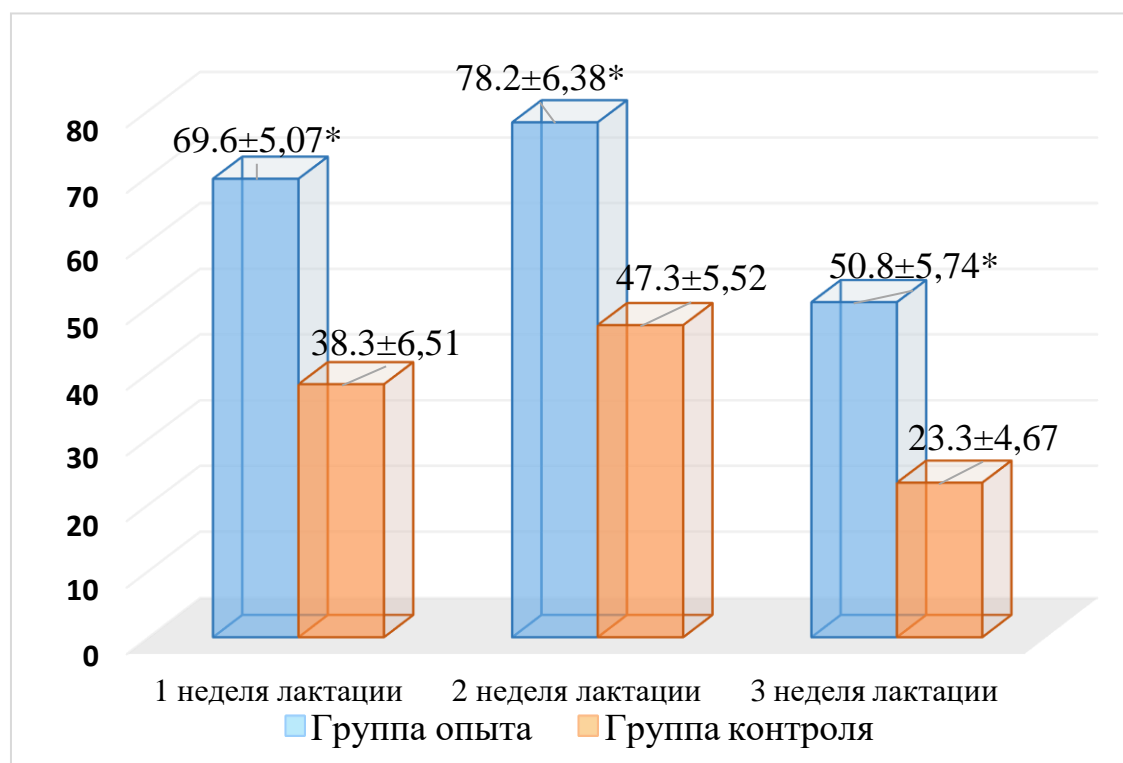


Рисунок 24 - Сравнение количественных показателей клеток макрофагального ряда

Согласно полученным данным, наибольшее количество антигенпрезентирующих клеток наблюдается в молочной железе мышей на второй неделе лактации, что справедливо как для опытной, так и для контрольной группы. При этом данные показатели незначительно превышают количество клеток макрофагального ряда обнаруженное в препаратах первой недели лактации. В свою очередь, препараты, полученные

на третьей неделе лактации, демонстрируют резкое снижение числа макрофагальных клеток, что можно связать с завершением лактации и постепенным угнетением иммунных процессов в молочной железе (рисунок 24).

Кроме того, полученные результаты показывают повышение эффективности миграции макрофагальных клеток в ткани молочной железы у животных, подвергнутых иммунизации стафилококковой вакциной, что подтверждается более высокими числовыми значениями в опытной группе - в 1,7-2,2 раза на всех сроках исследования.

2.2.1.3 Результаты иммунологического исследования сыворотки крови лактирующих мышей

Таблица 4 – Показатели иммуноглобулинов А, G, М в кровиподопытных мышей (г/л)

| 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±0,04 | 3,83±0,18 | 1,35±0,05 |
| 2 неделя лактации | 1,01±0,03 | 4,16±0,35 | 1,13±0,07 |
| 3 неделя лактации | 0,81±0,03 | 2,83±0,18 | 0,72±0,06 |
| Группа опыта (стафилококковая вакцина) | | | |
| 1 неделя лактации | 1,12±0,05* | 4,81±0,19* | 1,55±0,08* |
| 2 неделя лактации | 1,22±0,06* | 5,3±0,27* | 1,39±0,08* |
| 3 неделя лактации | 0,9±0,03* | 3,6±0,22* | 0,98±0,09* |

* $P \leq 0,05$, по сравнению с группой контроля.

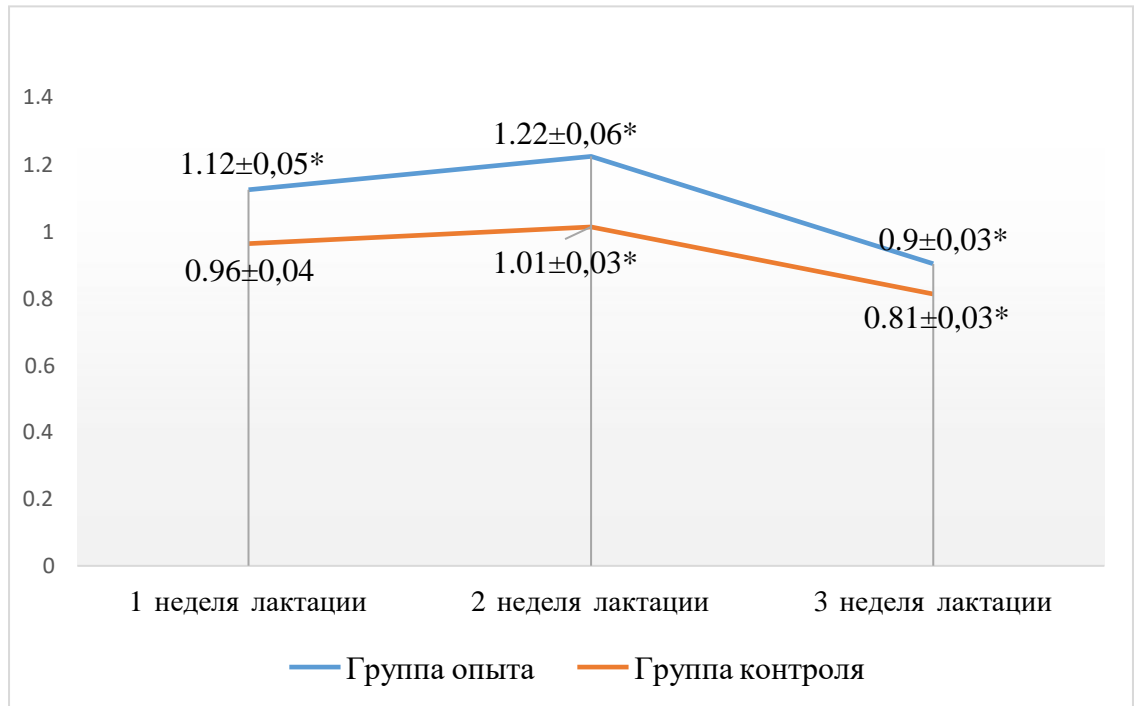


Рисунок 25 - Изменение концентрации Ig A (г/л)

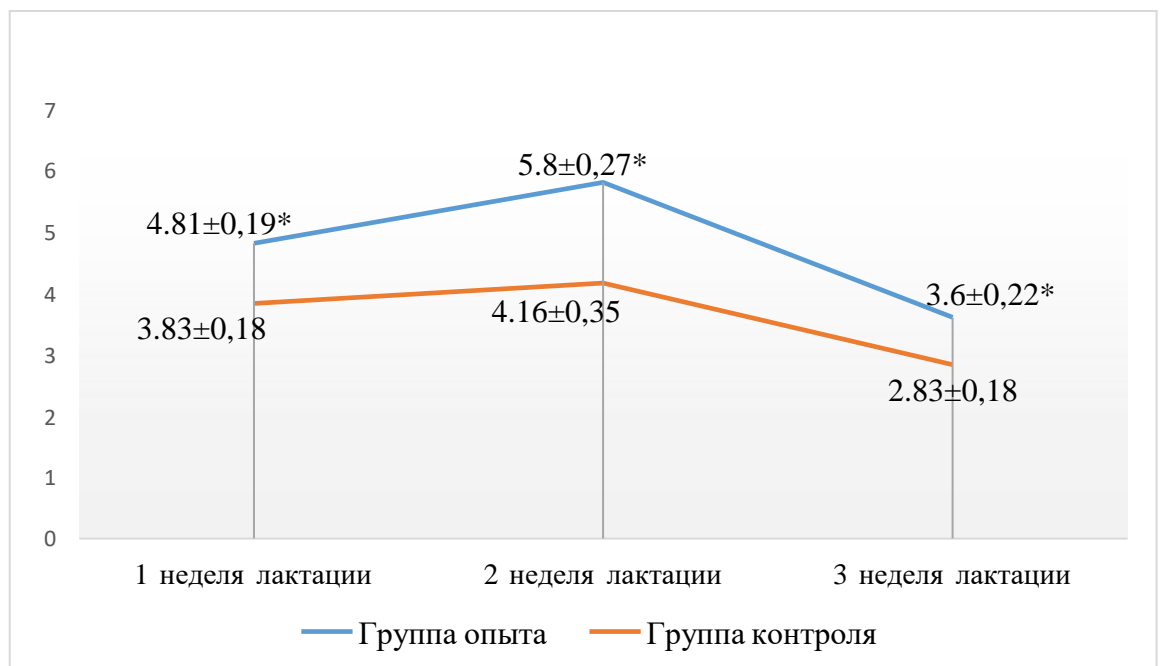


Рисунок 26 - Изменение концентрации Ig G (г/л)

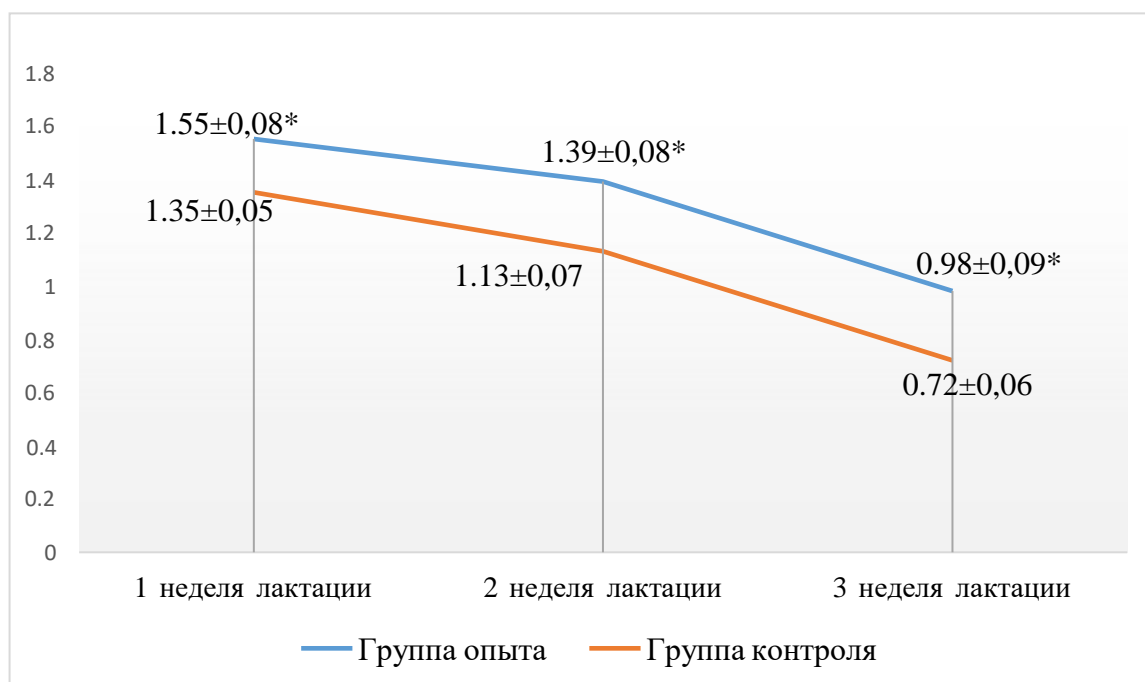


Рисунок 27 - Изменение концентрации Ig M (г/л)

Исходя из полученных данных, мы видим, что содержание иммуноглобулинов классов А, G и М в крови иммунизированных мышей достоверно выше, чем содержание соответствующих иммуноглобулинов у животных контрольной группы на всех этапах лактации. При этом наиболее высокие показатели иммуноглобулинов классов А, G приходятся на период второй недели лактации (рисунок 25,26). Концентрация иммуноглобулинов класса М выше в первую неделю лактации как у опытной, так и у контрольной групп, а со второй недели лактации показатели начинают снижаться (рисунок 27).

Таким образом, концентрация иммуноглобулинов класса А в крови животных обработанных стафилококковой вакциной выше в среднем на 15 %, класса G выше в среднем на 23 % и класса М выше в среднем на 24 % чем у животных контрольной группы на всех этапах лактации, что свидетельствует о стимулирующем влиянии локального антигенного воздействия на гуморальные факторы иммунитета.

2.2.1.4 Корреляционная зависимость антигенпрезентирующих клеток макрофагального ряда и иммуноглобулинов в сыворотке крови

Таблица 5 – Коэффициенты корреляции антигенпрезентирующих клеток макрофагального ряда и иммуноглобулинов классов А, G и M в сыворотке крови (r)

| Опытная группа (r) | 1 неделя лактации | 2 неделя лактации | 3 неделя лактации |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Макрофагальные клетки / Ig A | -0,43 | -0,19 | 0,22 |
| Макрофагальные клетки / Ig G | -0,14 | -0,10 | 0,80 |
| Макрофагальные клетки / Ig M | 0,11 | 0,72 | 0,61 |
| Контрольная группа (r) | 1 неделя лактации | 2 неделя лактации | 3 неделя лактации |
| Макрофагальные клетки / Ig A | 0,74 | 0,03 | -0,35 |
| Макрофагальные клетки / Ig G | 0,62 | -0,25 | -0,01 |
| Макрофагальные клетки / Ig M | 0,57 | 0,74 | 0,22 |

Согласно общепринятой интерпретации корреляционных коэффициентов, если корреляция положительная - то зависимость однонаправленная (чем больше одного, тем больше и другого), если корреляция отрицательная, то она разнонаправленная (чем больше одного, тем меньше другого). Чем ближе значение к единице (1 или -1), тем выше зависимость одного показателя от другого [49].

Таблица 6 – Определение связи в зависимости от величины коэффициента корреляции

| Интервал значений коэффициента корреляции (r) | Связь |
|---|-------------------------|
| $0,01 < r \leq 0,29$ | Слабая положительная |
| $0,30 < r \leq 0,69$ | Умеренная положительная |
| $0,70 < r \leq 1,00$ | Сильная положительная |
| $-0,01 > r \geq 0,29$ | Слабая отрицательная |
| $-0,30 > r \geq -0,69$ | Умеренная отрицательная |
| $-0,70 > r \geq -1,00$ | Сильная отрицательная |

Согласно данной таблице и результатам, полученным в ходе исследования, мы наблюдаем слабую положительную корреляцию для иммуноглобулинов класса А в опытной группе на третьей неделе лактации, для иммуноглобулинов класса М в опытной группе на первой неделе лактации, для иммуноглобулинов класса А в контрольной группе на второй неделе лактации и для иммуноглобулинов класса М в контрольной группе на третьей неделе лактации. Умеренная положительная корреляция характерна для иммуноглобулинов класса М в опытной группе на третьей неделе лактации и для иммуноглобулинов класса G и М в контрольной группе на первой неделе лактации. Сильную положительную корреляцию мы видим для иммуноглобулинов класса G в опытной группе на третьей неделе лактации, для иммуноглобулинов класса М в опытной группе на второй неделе лактации, для иммуноглобулинов класса А в контрольной группе на первой неделе лактации и для иммуноглобулинов класса М в контрольной группе на второй неделе лактации. Слабая отрицательная корреляция прослеживается для иммуноглобулинов класса А в опытной группе на второй неделе лактации, для иммуноглобулинов класса G в опытной группе на первой и второй неделях лактации, и для иммуноглобулинов класса G в

контрольной группе на второй и третьей неделях лактации. Умеренная отрицательная корреляция в свою очередь актуальна для иммуноглобулинов класса А в опытной группе на первой неделе лактации и для иммуноглобулинов класса А в контрольной группе на третьей неделе лактации.

Изначальное отсутствие значительной положительной корреляции в опытной группе и её нарастание к третьей неделе лактации объясняется тем, что в начале иммунной реакции количество антигенпрезентирующих клеток не оказывает серьезного влияния на уровень продукции иммуноглобулинов, так как данная реакция гуморального иммунного ответа реализуется главным образом за счет пула В-лимфоцитов и плазматических клеток организма. Таки образом в первые две недели лактации мы видим повышение показателей иммуноглобулинов в сыворотке крови мышей, однако не видим значительной связи этого процесса с высоким количеством макрофагальных клеток в молочной железе. Однако для дальнейшего поддержания напряженности специфического иммунного ответа, индуцированного локальной антигенной стимуляцией, количество макрофагальных клеток способных продолжать презентацию антигена имеет решающее значение, что мы можем наблюдать по высоким показателям корреляции на третьей неделе лактации, особенно для иммуноглобулинов G и M.

Для контрольной группы напротив, пик положительной корреляционной зависимости наблюдается на первой неделе лактации для всех классов иммуноглобулинов. Это обусловлено активным течением иммунных реакций, связанных с процессом беременности и начала лактации. В условиях отсутствия дополнительной антигенной стимуляции пик иммунологической активности тканей молочной железы должен приходиться на молозивный период и первые дни лактации, так как именно в этот момент детеныш должен получить максимальное количество компонентов колострального иммунитета. Таким образом, на первой неделе лактации мы видим сильную положительную зависимость продукции иммуноглобулинов

с количеством макрофагальных клеток, также принимающих активное участие в подготовке молочной железы к началу лактационного периода. Далее к третьей неделе лактации иммунные процессы в молочной железе постепенно снижают свою активность, что также отражено в снижении концентрации иммуноглобулинов, уменьшении количества макрофагальных клеток и переходе корреляционной зависимости из положительной в отрицательную.

2.2.2 Локальный иммунный ответ молочной железы под влиянием различных термостабильных антигенов

2.2.2.1 Результаты гистологического исследования препаратов молочной железы

В гистосрезах молочной железы ткань состоит из долек, сформированных из скопления жировых клеток. Дольки отделены друг от друга прослойками рыхлой соединительной ткани, альвеолы заполнены секретом. Стенка молочной альвеолы образована лактоцитами и звездчатыми миоэпителиоцитами. Снаружи альвеолы выстланы базальной мембраной. В ходе лактации лактоциты приобретают низко-кубическую форму, ядра лактоцитов круглые. Лактоциты объединены друг с другом с помощью плотных контактов и десмосом. На апикальной поверхности лактоцитов присутствуют микроворсинки, а в цитоплазме накапливаются включения – сферические капельки молочного жира различных размеров, содержащие преимущественно триглицериды.

Между базальной мембраной и основанием лактоцитов находятся миоэпителиоциты (звёздчатые клетки), которые охватывают секреторные клетки своими пальцевидными выростами. Ядра миоэпителиоцитов тёмные палочковидные, в цитоплазме содержатся актиномиозиновые комплексы.

Клетки, образующие млечный альвеолярный ход, лежат в один слой, содержат меньшее количество цитоплазмы. Млечные альвеолярные ходы

переходят в разветвлённые внутридольковые протоки, затем объединяясь в междольковые протоки, которые выстланы кубическим и призматическим эпителием (рисунок 28,29,30).

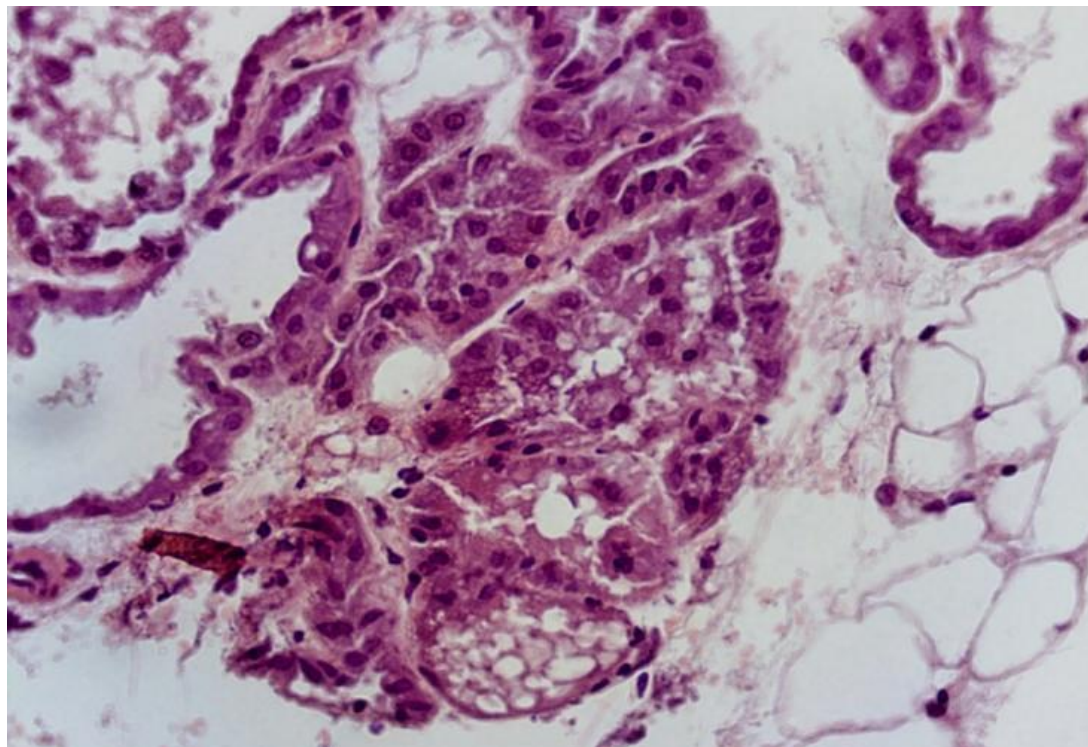


Рисунок 28 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы (Стафилококковая вакцина) на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

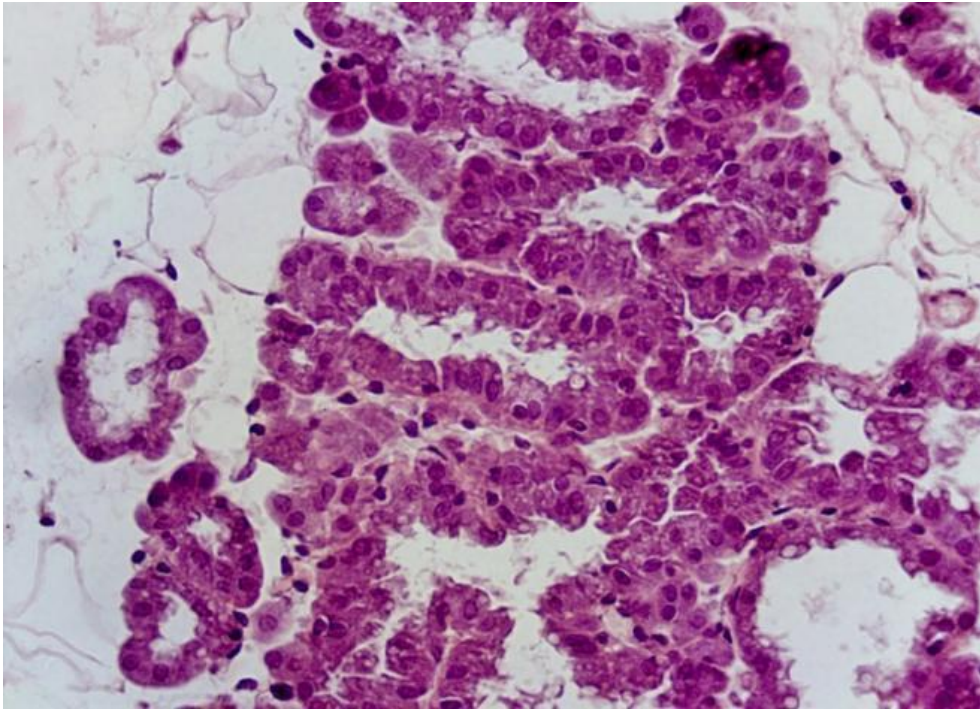


Рисунок 29 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы (Вакцина СТАРВАК) на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

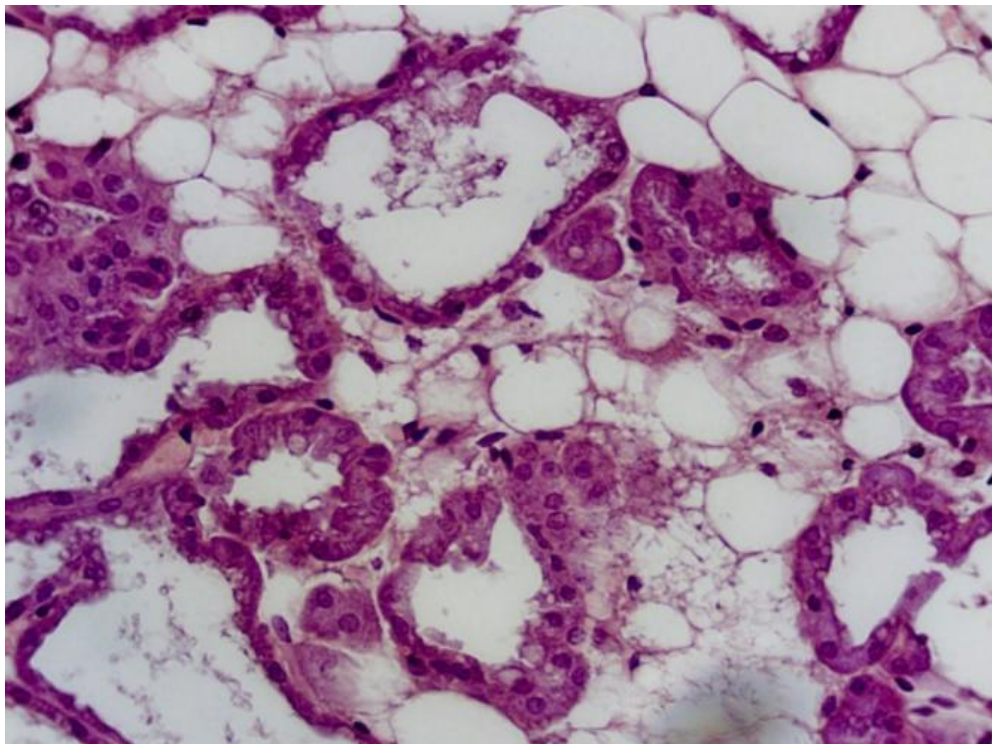


Рисунок 30 – Гистологическая структура молочной железы мыши из опытной группы (Вакцина ПРЕВЕНАР 13) на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

В контрольных образцах общая гистологическая структура молочной железы сходна со структурой опытных образцов, однако визуальная дифференцировка клеток просматривается хуже, препараты имеют меньшую четкость, клеточные элементы зачастую трудноразличимы (рисунок 31).

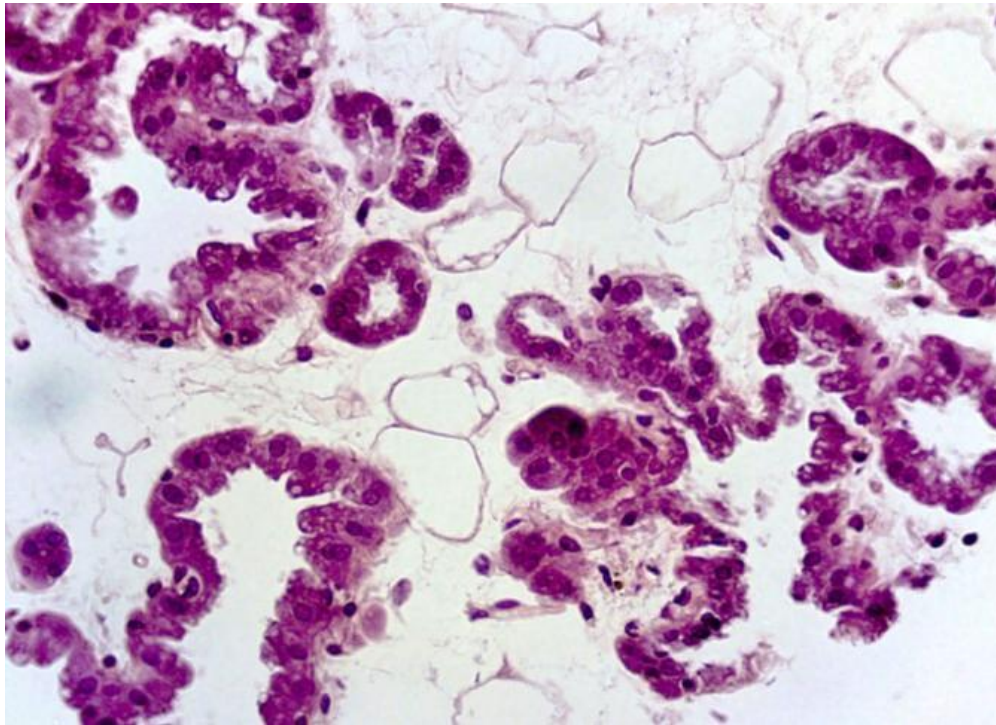


Рисунок 31 – Гистологическая структура молочной железы мыши из контрольной группы на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400.

У всех исследуемых образцов в некоторых полях зрения обнаруживаются искомые тканевые макрофаги. Они представляют собой крупные клетки диаметром 15-80 мкм, неравномерно распределенные в ткани, неправильной формы, зачастую имеющие множественные отростки.

Ядра овальные или продолговатые, часто наблюдаются клетки, имеющие несколько ядер; хроматин неплотный, локализован под ядерной оболочкой. Цитоплазма обильная, без четких границ с большим количеством эндоплазматических включений: эндоцитозных микровезикул, вакуолей и лизосом, придающих клетке пенистый вид (рисунок 32,33,34,35).

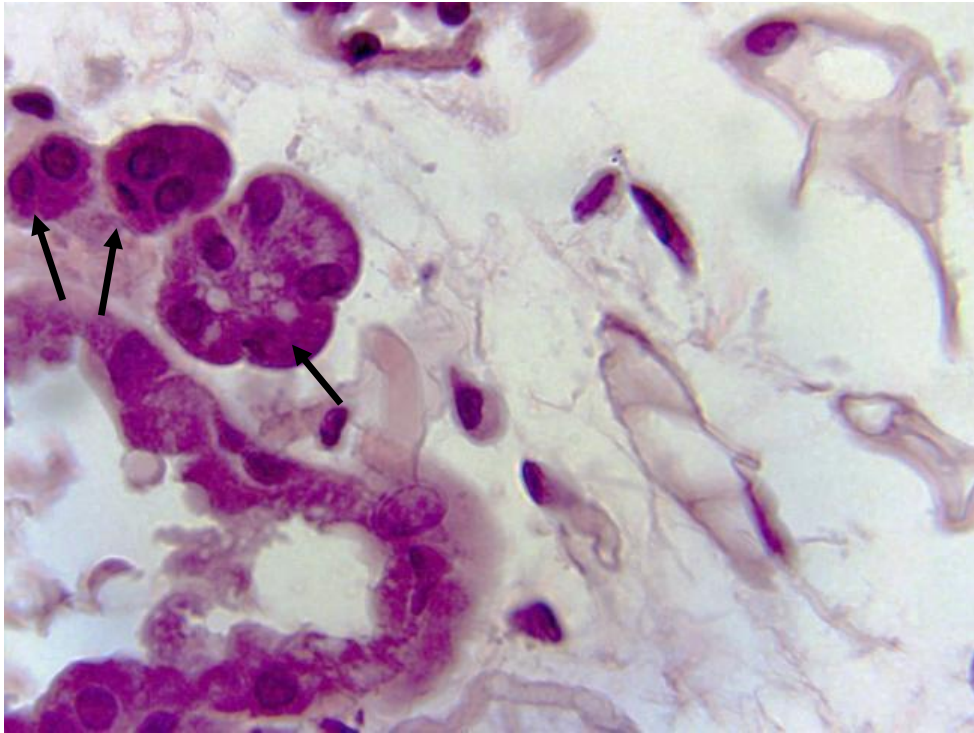


Рисунок 32 – Клетки макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы мыши из опытной группы (Стафилококковая вакцина) на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000

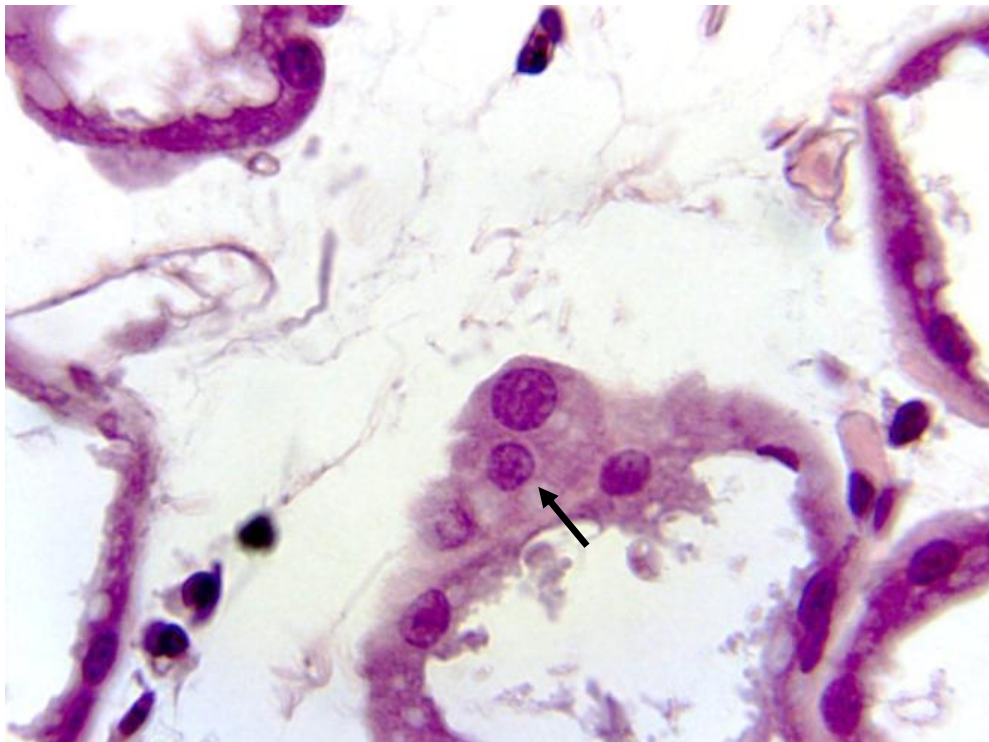


Рисунок 33 – Клетка макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы мыши из опытной группы (вакцина СТАРТВАК) на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000 под иммерсией.

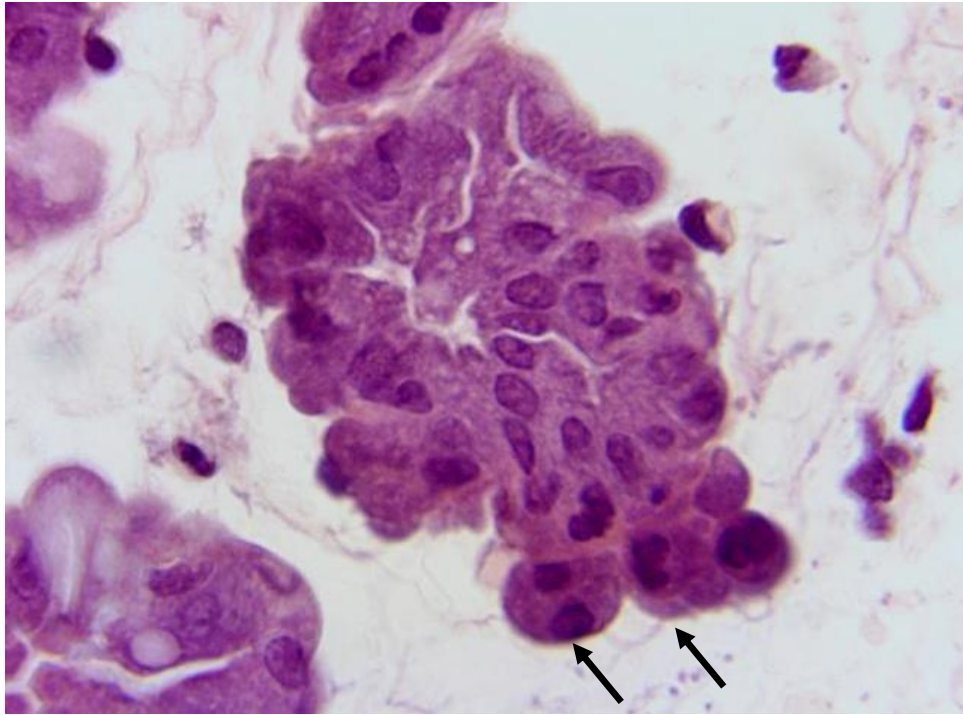


Рисунок 34 – Клетки макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы мыши из опытной группы (вакцина ПРЕВЕНАР-13) на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000 под иммерсией.

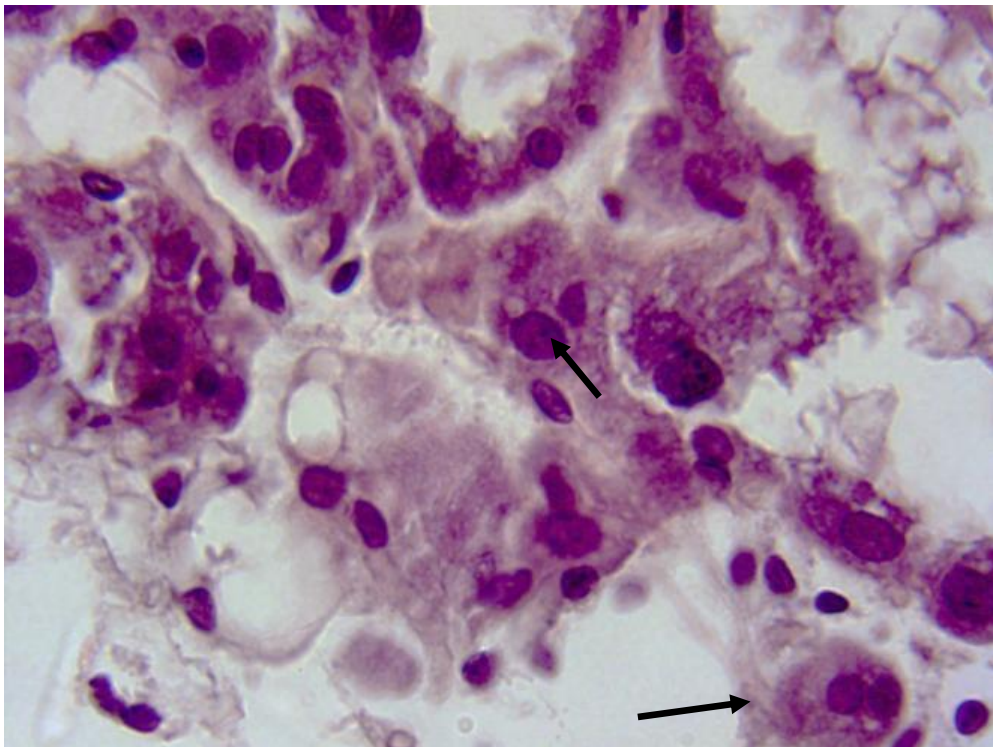


Рисунок 35 – Клетки макрофагальной природы в гистосрезе молочной железы мыши из контрольной группы на второй неделе лактации, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x1000 под иммерсией.

Таблица 7 – Среднее число клеток макрофагального ряда в ста полях зрения

| | |
|--|------------|
| Стафилококковая вакцина (кол-во клеток в ста полях зрения) | 70,1±6,69* |
| СТАРВАК (кол-во клеток в ста полях зрения) | 79,7±8,67* |
| ПРЕВЕНАР 13 (кол-во клеток в ста полях зрения) | 57,7±3,86* |
| Контроль (кол-во клеток в ста полях зрения) | 40,6±4,84 |

* $P \leq 0,02$ по сравнению с группой контроля

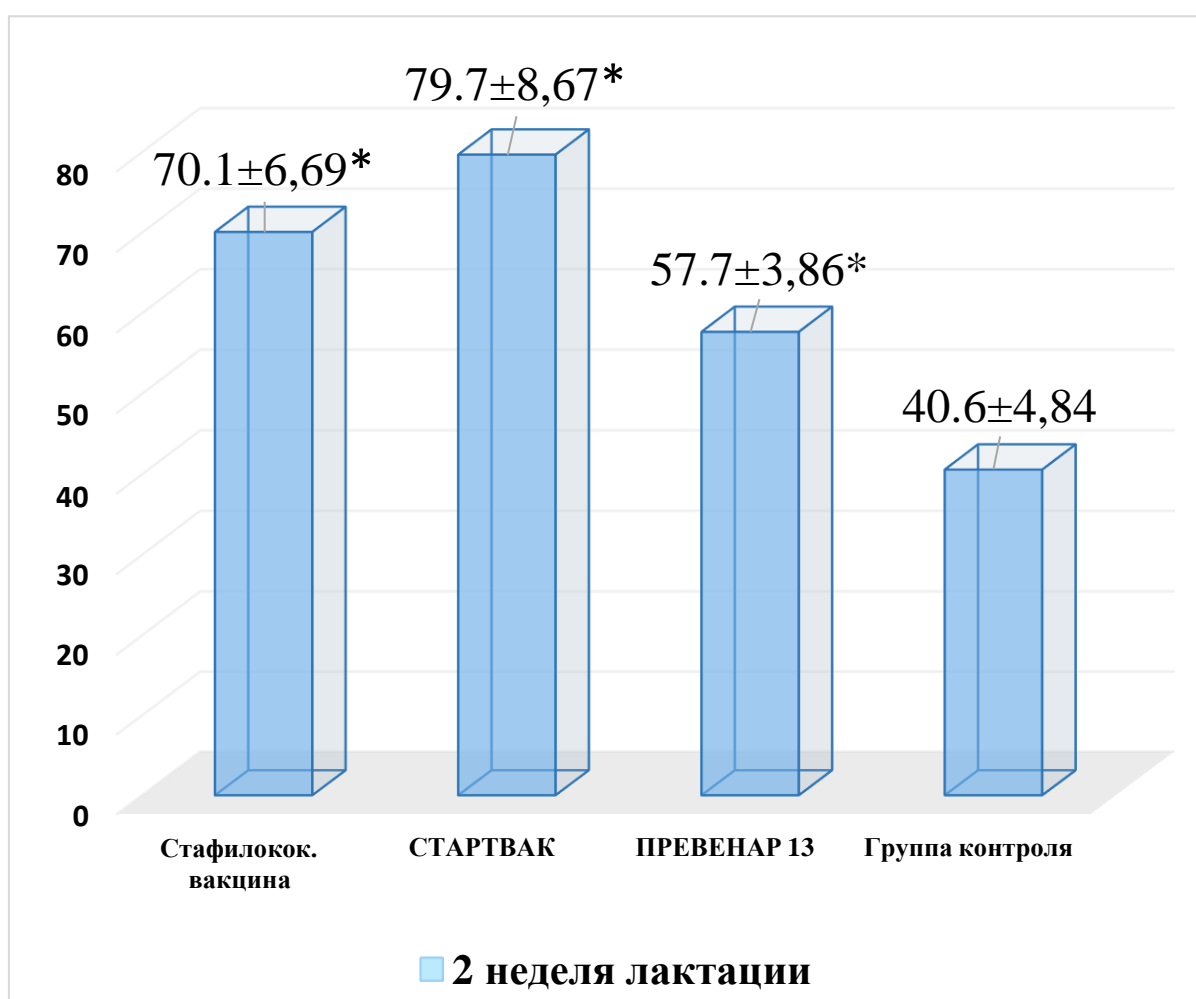


Рисунок 36 – Сравнение количественных показателей клеток макрофагального ряда

Таким образом, можно сделать вывод, что наибольшее количество макрофагальных клеток наблюдается при иммунизации вакциной СТАРТВАК, что можно связать с наличием в данной вакцине антигенов двух различных возбудителей. Средние показатели демонстрирует стафилококковая вакцина, наименьшие показатели из опытных групп продемонстрировала вакцина Превенар 13, однако все показатели опытных групп достоверно превышают показатели контрольной группы: стафилококковая вакцина на 75%, вакцина СТАРТВАК на 97,5% и Превенар 13 на 42,5% (рисунок 36).

Количество макрофагов у иммунизированных мышей во всех опытных группах достоверно превышает количество макрофагов у мышей контрольной группы, что позволяет сделать вывод о иммунной активности макрофагальных клеток молочной железы и наличии стимулирующего влияния использованных вакцин.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1 Обсуждение результатов исследования

Разработка, исследование и внедрение в ветеринарную практику новых методов лечения и профилактики маститов является актуальной задачей для современных ветеринарных специалистов. В патогенезе маститов основополагающую роль играет воздействие патогенных и условно патогенных бактерий групп стафилококков, стрептококков и кишечной палочки. Учитывая наличие сложных механизмов реализации патогенности и вирулентности у этих групп возбудителей, а также постоянное увеличение количества антибиотикорезистентных штаммов, наиболее перспективными в вопросах лечения и профилактики маститов бактериальной этиологии представляются методы антигенной стимуляции.

Данная работа посвящена изучению физиологических механизмов действия термостабильных антигенов при локальной антигенной стимуляции молочной железы. Значимость выбранной темы определена отсутствием теоретической проработанности методов локальной антигенной стимуляции молочной железы.

На первом этапе исследования изучалось воздействие стафилококковой вакцины на количественные показатели антигенпрезентирующих клеток макрофагальной природы в молочной железе и концентрацию иммуноглобулинов классов А, G и M в крови мышей, подвергнутых локальной антигенной стимуляции незадолго до родов и начала лактационного периода.

Согласно данным полученным в ходе первого этапа эксперимента, наибольшее количество антигенпрезентирующих клеток наблюдалось в молочной железе мышей на второй неделе лактации, что справедливо как для опытной, так и для контрольной групп. При этом данные показатели незначительно превышали количество клеток макрофагального ряда обнаруженное в препаратах первой недели лактации. В свою очередь,

препараты, полученные на третьей неделе лактации, демонстрировали резкое снижение числа макрофагальных клеток.

По данным ряда авторов (Касумов, М.К. 2010, Корзенников, С.Ю. 2016, Панова Н.А. 2021, Скопичев, В.Г. 2018) изучавших изменения количества иммунокомпетентных клеток в молозиве и молоке на различных этапах лактационного периода, наибольшее количество иммунокомпетентных клеток, представленных в секрете молочной железы наблюдается в молозивном периоде в первые 5 дней лактации, после чего начинает постепенно снижаться. Однако по данным нашего исследования, количество тканевых макрофагов молочной железы продолжало повышаться вплоть до второй недели лактации, что свидетельствует о том, что активная антигенпрезентация не прекращается в молочной железе с окончанием молозивного периода. Далее количество макрофагальных клеток снижалось к третьей неделе лактации, в связи с угнетением иммунных процессов в молочной железе.

Изменения гистологической структуры молочной железы, отмеченные на третьей неделе лактации: увеличение высоты кубического эпителия, увеличение количества рыхлой соединительной ткани, уменьшение количества секрета, постепенное замещение секреторного эпителия жировой тканью, согласуется с данными Hollmann, K. H. (1978), Sordillo, L. M. (1988), Нежданова, А.Г, Слободяника, (1997), Скопичева, В.Г. (2017), Пановой, Н.А. (2018), Соловьевой Л.П. (2013, 2021), Щипакина, М.В. (2013, 2014) и связаны с завершением процесса лактации и началом процессов инволюции молочной железы.

Полученные результаты также показали повышение эффективности миграции макрофагальных клеток в ткани молочной железы у животных, подвергнутых иммунизации стафилококковой вакциной. Таким образом, был сделан вывод о иммунологической активности данных клеток и подтверждено их участие в процессе формирования локального иммунитета молочной железы в ответ на проведение антигенной стимуляции. Эти

выводы находят подтверждение и в работах Васильева, А.А. (1984), проводившего локальную антигенную стимуляцию молочной железы вакциной из штаммов *Brucella abortus* и отметившего увеличение в молоке коров абсолютного количества макрофагов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, что также демонстрирует значительную миграцию иммунокомпетентных клеток к месту локальной антигенной стимуляции.

Содержание иммуноглобулинов классов А, G и М в крови иммунизированных мышей также было выше, чем содержание соответствующих иммуноглобулинов у животных контрольной группы на всех этапах лактации, что свидетельствует о стимулирующем влиянии локального антигенного воздействия на гуморальные факторы иммунитета. Согласно исследованиям Скопичева В.Г. (2009), наблюдается незначительное повышение концентрации иммуноглобулинов в кровяном русле коров после локальной антигенной стимуляции молочной железы стафилококковым анатоксином, что связано предположительно с более крупными размерами исследуемых им животных. В то же время, Garcia, V.E., Gomes, M.I., Sanjuan, N. (1996, 2002) наблюдали значительное повышение иммуноглобулинов классов А и G сыворотке крови мышей, подвергнутых локальной стимуляции молочной железы аттенуированными штаммами *S. aureus*

Для иммуноглобулинов класса М максимальная концентрация отмечалась на первой неделе лактации, что совпадает с литературными данным (Макавчик, С.А, Сухинин, А.А., Белкина, И.В. 2019, Селезнев, С.Б., Ветошкина, Г.А., Куликов, Е.В., 2021) отмечающими что этот класс иммуноглобулинов начинает синтезироваться быстрее всего, в ответ на проникновение в организм чужеродных антигенов.

Таким образом, мы предполагаем 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.

Установленная в исследовании положительная корреляционная зависимость количества антигенпрезентирующих клеток и концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови на третьей неделе лактации в опытной группе свидетельствует о важности клеток макрофагального ряда для поддержания напряженности специфического иммунного ответа, индуцированного локальной антигенной стимуляцией.

В ходе второго этапа исследования было проведено сравнение количественных показателей антигенпрезентирующих клеток молочной железы при обработке различными термостабильными антигенами: стафилококковой вакциной (производство АО «Биомед» им. И. И. Мечникова, Россия), вакциной СТАРТВАК (STARTVAK) (производство Laboratorios Hipra, Spain) и вакциной ПРЕВЕНАР 13 (производство НПО Петровакс Фарм, Россия) на опытной модели лактирующих мышей.

По результатам данных полученных на втором этапе исследования наибольшее количество макрофагальных клеток наблюдалось при иммунизации вакциной СТАРТВАК, что можно связать с наличием в данной вакцине антигенов к двум различным возбудителям. Средние показатели демонстрировала стафилококковая вакцина, наименьшие показатели из опытных групп продемонстрировала вакцина Превенар 13, однако все показатели опытных групп достоверно превышают показатели контрольной группы, что позволяет сделать вывод об иммунной активности макрофагальных клеток молочной железы и наличии стимулирующего влияния всех использованных вакцин. Полученные данные согласуются с работой Васильева А.А. (1984) применявшего вакцину из штаммов *Brucella abortus* и работами Скопичева В.Г. (2018, 2019) применявшего стафилококковый анатоксин для локальной антигенной стимуляции молочной железы, отметивших иммуностимулирующий эффект этих термостабильных антигенов.

В ходе данной работы был более подробно изучен механизм формирования локального иммунитета в молочной железе. Нам удалось подтвердить заявленную рабочую гипотезу, согласно которой первичным звеном локального иммунного ответа являются антигенпрезентирующие клетки макрофагальной природы, находящиеся в тканях молочной железы, подкожно-жировой клетчатке и эпидермисе. Антигенпрезентирующая роль данных клеток была доказана значительным повышением их количества в результате антигенной стимуляции молочной железы, а также взаимосвязью между повышением их количества и количественными изменениями факторов гуморального иммунитета, а именно повышением в крови иммунизированных животных основных классов иммуноглобулинов.

Также в ходе исследования была доказана возможность иммунологического взаимодействия молочной железы с различными термостабильными антигенами на примере трех различных по своему антигенному составу вакцин, что открывает широкие перспективы для применения методики локальной антигенной стимуляции как для защиты от возбудителей мастита, так и для формирования пассивного иммунитета молодняка.

3.2 ВЫВОДЫ

В ходе данной работы нами был изучен механизм формирования локального иммунитета в молочной железе. Нам удалось подтвердить заявленную рабочую гипотезу, согласно которой первичным звеном локального иммунного ответа являются антигенпрезентирующие клетки макрофагальной природы, находящиеся в тканях молочной железы, подкожно-жировой клетчатке и эпидермисе. Также в ходе исследования была доказана возможность иммунологического взаимодействия молочной железы с различными термостабильными антигенами. Подводя итоги проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Клетки макрофагальной природы представлены в тканях молочной железы.
2. Наибольшее число клеток макрофагальной природы наблюдается в молочной железе мышей на второй неделе лактации, что справедливо как для опытной, так и для контрольных групп. При этом данные показатели незначительно превышали число клеток макрофагального ряда, обнаруженное в препаратах первой недели лактации. В свою очередь, препараты, полученные на третьей неделе лактации, демонстрировали резкое снижение числа макрофагальных клеток, что было связано с завершением лактации и постепенным угнетением иммунных процессов в молочной железе. Наблюдается повышение эффективности миграции макрофагальных клеток в ткани молочной железы у животных, подвергнутых иммунизации стафилококковой вакциной, что подтверждается более высокими числовыми значениями в опытной группе - в 1,7– 2,2 раза на всех сроках исследования.
3. Наибольшее количество макрофагальных клеток наблюдалось при иммунизации вакциной СТАРТВАК. Средние показатели демонстрировала стафилококковая вакцина, наименьшие показатели

из опытных групп продемонстрировала вакцина Превенар 13. Все показатели опытных групп достоверно превышают показатели контрольной группы: стафилококковая вакцина на 75%, вакцина СТАРТВАК на 97,5% и Превенар 13 на 42,5%, что позволяет сделать вывод о иммунной активности макрофагальных клеток молочной железы и наличии стимулирующего влияния всех использованных вакцин.

4. Содержание иммуноглобулинов классов А, G и М в крови иммунизированных мышей также было выше, чем содержание соответствующих иммуноглобулинов у животных контрольной группы на всех этапах лактации. Концентрация иммуноглобулинов класса А в крови животных обработанных стафилококковой вакциной выше в среднем на 15 %, класса G выше в среднем на 23 % и класса М выше в среднем на 24 % чем у животных контрольной группы на всех этапах лактации, что свидетельствует о стимулирующем влиянии локального антигенного воздействия на гуморальные факторы иммунитета.
5. Установлена положительная корреляция количества антигенпрезентирующих клеток с показателями иммуноглобулинов в сыворотке крови для третьей недели лактации в опытной группе, что свидетельствует о значимости количества макрофагальных клеток способных продолжать презентацию антигена для поддержания напряженности иммунного ответа, индуцированного локальной антигенной стимуляцией.

3.3 ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Полученные в результате исследований данные об иммунологическом потенциале молочной железы мы рекомендуем использовать:

- 1) в клинической практике для лечения маститов бактериальной этиологии;
- 2) в рамках эпизоотологических мероприятий для профилактики маститов бактериальной этиологии;
- 3) в рамках эпизоотологических мероприятий для профилактики инфекционных диспепсий новорожденных;
- 4) при проведении научно-исследовательских работ по изучению иммунобиологических и морфологических свойств молочной железы;
- 5) в учебном процессе при чтении лекций, практических занятий; написании учебников, монографий, методических пособий и указаний, а также справочных руководств по иммунобиологии и морфологии молочной железы.

3.4 ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования по данной тематике должны быть направлены на разработку более эффективных схем локальной антигенной стимуляции молочной железы; создание многокомпонентных стандартизированных антимаститных вакцин и исследование возможности применения аутовакцин для локальной антигенной стимуляции.

Также, перспективным направлением является изучение возможности формирования колострального иммунитета, достигаемого путем локальной антигенной стимуляции молочных желез лактирующих самок различными термостабильными антигенами, соответствующими возбудителям инфекционных болезней молодняка.

4. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, А. Б. Иммунный статус у жеребых кобыл / А. Б. Андреева, Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. – 2011. – Т. 47. – № 2-2. – С. 8-10.
2. Андреева, А. Б. Особенности состояния иммунной системы жеребых кобыл / А. Б. Андреева, Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7(16). – № 2-4. – С. 182.
3. Атипичные биологические свойства и чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов - возбудителей мастита / Л. И. Смирнова, С. А. Макавчик, А. А. Сухинин [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 4. – С. 62-66. – DOI 10.17238/issn2072-6023.2020.4.62.
4. Бала, С. С. Факторы персистенции микрофлоры при маститах коров: специальность 16.00.03: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Бала Сергей Сергеевич. – Уфа, 2007. – 22 с.
5. Белкин, Б. Л. Мастит коров. Этиология, патогенез, диагностика, лечение и профилактика / Б. Л. Белкин, В. Ю. Комаров, В. Б. Андреев. – Москва Русайнс, 2021. – 112 с. – ISBN 978-5-4365-3134-2.
6. Боженков, С. Е. Значение микробного фактора при возникновении и развитии острого мастита у коров / С. Е. Боженков, Э. Н. Грига, О. Э. Грига // Ветеринарная патология. – 2012. – № 4(42). – С. 13-15.
7. Васильев, А. А. Т-, И- лимфоциты и мононуклеарные фагоциты в молозиве, молоке и крови коров в норме и после антигенной стимуляции : специальность 16.00.03 : диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Васильев Александр Алексеевич. – Омск, 1984. – 219 с. – EDN NPFDTT.

8. Ветеринарная иммунология: учебное пособие / С. А. Макавчик, А. А. Сухинин, И. В. Белкина [и др.]; Авт.-сост.: С. А. Макавчик, А. А. Сухинин, И. В. Белкина, Е. И. Приходько, Л. И. Смирнов. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2019. – 25 с.
9. Галкин, А. В. О выявлении возбудителей мастита и их чувствительности к антибиотикам / А. В. Галкин, Е. Трепалина // Эффективное животноводство. – 2017. – № 7(137). – С. 22-23.
10. Горбатов, А. В. Факторы вирулентности стрептококков и стафилококков и специфическая профилактика маститов у коров / А. В. Горбатов, Н. А. Соколова, М. Н. Лощинин // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2019. – № 4(32). – С. 428-433. – DOI 10.25725/vet.san.hyг.ecol.201904014.
11. Грубер, И. М. Факторы патогенности *Staphylococcus aureus* - их роль в инфекционном процессе и в формировании поствакцинального иммунитета / И. М. Грубер, Н. Б. Егорова, Е. А. Асташкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15. – № 3(88). – С. 72-82.
12. Гуцин, Я. А. Влияние фиксирующих жидкостей на микроскопическую структуру органов мелких лабораторных животных / Я. А. Гуцин, А. А. Мужикян // Международный вестник ветеринарии. – 2014. – № 3. – С. 88-95.
13. Дерматоонкология / В. А. Молочков, Г. А. Галил-Оглы, Ю. В. Сергеев [и др.] ; Редакторы: Молочков В.А., Галил-Оглы Г.А., Сергеев Ю.В.. – Москва: Медицина для всех, 2005. – 872 с. – ISBN 5-93649-019-X.
14. Дифференциация стрептококков, выделенных из молока коров при маститах / Л. И. Смирнова, А. А. Сухинин, Е. И. Приходько, И. М. Дородняя // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2014. – № 4. – С. 136-140.

15. Душкин, М. И. Макрофаг/пенистая клетка как атрибут воспаления: механизмы образования и функциональная роль обзор / М. И. Душкин // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – № 4. – С. 419-432.
16. Евглевский, А. А. Биотехнологическое обоснование средств и способов профилактики и терапии коров, больных маститом / А. А. Евглевский, Б. М. Тагирмирзоев // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 1. – С. 68-69.
17. Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, Страсбург, 1987
18. Завьянцев, В. Е. Клинико-бактериологические исследования и оценка распространения токсического мастита, ассоциированного главным образом с кишечной палочкой, у коров в Северной Ирландии, Великобритания / В. Е. Завьянцев // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2003. – № 4. – С. 1275.
19. Зеленевский, Н. В. Анатомия и физиология животных: учебник / Н. В. Зеленевский, М. В. Щипакин, К. Н. Зеленевский; под общей редакцией Н. В. Зеленевского. – 4-е издание, стереотипное. – Санкт-Петербург: Издательство "Лань", 2020. – 368 с. – (Учебники для вузов. Специальная литература). – ISBN 978-5-8114-5336-8.
20. Зеленевский, Н. В. Международная ветеринарная анатомическая номенклатура на латинском и русском языках. *Nomina Anatomica Veterinaria*. (пятая редакция): Учебники для вузов. Специальная литература / Н. В. Зеленевский; пер. и рус. терминология Н. В. Зеленевского. – Санкт-Петербург: Издательство "Лань", 2013. – 400 с. – ISBN 978-5-8114-1492-5.
21. Значение факторов патогенности некоторых видов стрептококков и клебсиелл при определении их этиологической роли в развитии воспалительных процессов респираторного тракта / Л. А. Краева, Е. С. Кунилова, О. А. Бургасова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. – № 1. – С. 121-128. – DOI 10.15789/2220-7619-ТЮ-1339.

22. Изучение иммуногенеза у коров при применении экспериментальной кампилобактериозной бивалентной вакцины / В. А. Гришина, А. В. Гришина, А. А. Бахта [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2012. – № 2. – С. 62-64.

23. Изучение микробного пейзажа содержимого секрета молочной железы при маститах у коров / К. Н. Кононенко, А. А. Зубенко, Л. Н. Фетисов [и др.] // Ветеринария Северного Кавказа. – 2021. – № 2. – С. 32-37.

24. Изучение микрофлоры молока коров при разных формах мастита / Д. Ю. Костерин, О. В. Иванов, М. Г. Алигаджиев, Л. Э. Мельникова // Вестник АПК Верхневолжья. – 2020. – № 4(52). – С. 40-43. – DOI 10.35694/YARCX.2020.52.4.008.

25. Иммунная и лимфатическая системы домашних животных / С. Б. Селезнев, Г. А. Ветошкина, Е. В. Куликов, Е. А. Кротова. – Москва: Российский университет дружбы народов (РУДН), 2021. – 32 с. – ISBN 978-5-209-11124-5.

26. Иммунологические аспекты физиологии и патологии молочной железы коров / В. И. Слободяник, В. А. Париков, Н. Т. Климов, В. В. Подберезный ; Таганрогский государственный педагогический институт. – Таганрог: Таганрогский государственный педагогический институт им. А.П. Чехова, 2009. – 375 с. – ISBN 978-5-87976-545-8.

27. Индуцирование диареи, вызванной штаммом K99 кишечной палочки у новорожденных телят, получающих молозиво от своих матерей, пораженных маститом в сухостойный период. (Япония) // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2001. – № 4. – С. 1189.

28. Исследование морфофункционального состояния макрофагов различного происхождения в условиях культивирования / М. В. Улитко, А. Н. Ульянова, В. А. Поздина [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы IX международного конгресса, Москва, 20–22 февраля 2017 года. – Москва: Общество с ограниченной

ответственностью "Русские Экспо Дни Групп", 2017. – С. 267-269. – EDN YPKXTD.

29. Карпенко, Л. Ю. Изменение содержания иммуноглобулинов в молозиве лошадей по дням лактации / Л. Ю. Карпенко, С. В. Крицина // XII международный Московский конгресс по болезням мелких домашних животных, Москва, 22–24 апреля 2004 года. – Москва: ЗАО "Издательский Дом", 2004. – С. 212-213.

30. Касумов, М. К. Антигенное воздействие на регионарные лимфоузлы молочных желез высокопродуктивных коров перед лактацией / М. К. Касумов, В. Г. Скопичев, Н. С. Дмитриева // Ветеринария и кормление. – 2014. – № 4. – С. 12-14.

31. Касумов, М. К. Возможности неинвазивной профилактики маститов у коров / М. К. Касумов, М. Ю. Кумыкова, В. Г. Скопичев // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2013. – № 1. – С. 99-100.

32. Касумов, М. К. Оценка клеточного состава мазков молозива коров / М. К. Касумов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2010. – № 4. – С. 75-77.

33. Киреева, Л. С. Идентификация и изучение антибиотикорезистентности бактерий, выделенных из маститного молока / Л. С. Киреева, С. А. Макавчик // Бактериология. – 2018. – Т. 3. – № 1. – С. 67-70. – DOI 10.20953/2500-1027-2018-1-67-70.

34. Климов, А. Ф. Анатомия домашних животных: учебник по специальности 310800 - "Ветеринария" / А. Ф. Климов, А. И. Акаевский ; А. Ф. Климов, А. И. Акаевский. – Изд. 8-е, стер.. – Санкт-Петербург [и др.]: Лань, 2011. – (Учебники для вузов. Специальная литература). – ISBN 978-5-8114-0493-3.

35. Конопельцев, И. Г. Воспаление вымени у коров / И. Г. Конопельцев, В. Н. Шулятьев. – Киров: Вятская государственная сельскохозяйственная академия, 2010. – 355 с.

36. Корзенников, С. Ю. Возрастная морфология молочной железы свиньи // Иппология и ветеринария. 2016. №1(19). - С. 63-70.
37. Корзенников, С. Ю. Клеточный состав молозива свиноматок // Иппология и ветеринария. 2016. №1(19). - С. 70-75.
38. Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – СПб: СпецЛит, 2010. – 772 с. – ISBN 978-5-299-00425-0.
39. Крюкова, В. В. Молекулярно-генетический анализ патогенных стрептококков возбудителей мастита коров в хозяйствах Ленинградской области: специальность 06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология": автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Крюкова Вера Валентиновна. – Санкт-Петербург, 2010. – 18 с.
40. Курченко, Г. А. Изменение возбудителей субклинического мастита коров при лечении антимаститными препаратами / Г. А. Курченко // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2010. – № 2. – С. 397.
41. Лабораторная оценка и видовой состав маститогенной микрофлоры у коров / А. В. Егунова, И. В. Зирук, С. Н. Поветкин, А. Н. Симонов // Современные проблемы товароведения, экономики и индустрии питания: сборник статей по итогам I заочной Международной научно-практической конференции, Саратов, 30 ноября 2016 года / Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Саратовский социально-экономический институт (филиал). – Саратов: Саратовский социально-экономический институт (филиал) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова", 2016. – С. 103-108.

42. Литвинова, Д. Н. Обнаружение иммунокомпетентных клеток матери в крови новорожденных бычков / Д. Н. Литвинова, В. Г. Скопичев // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – № 5. – С. 458.
43. Лямина, С. В. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа / С. В. Лямина, И. Ю. Малышев // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10-5. – С. 930-935. – EDN SZUGUF.
44. Макавчик, С. А. Биологические свойства *Staphylococcus haemolyticus* как возбудителя мастита сельскохозяйственных животных / С. А. Макавчик, Л. И. Смирнова, А. А. Сухинин // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2019. – № 4. – С. 54-56. – DOI 10.17238/issn2072-6023.2019.4.54.
45. Мальцева, Б. М. Изучение факторов патогенности эпизоотических штаммов эшерихий, выделенных от телят / Б. М. Мальцева // Ветеринария. Реферативный журнал. – 1999. – № 1. – С. 137.
46. Мастит: этиология, профилактика, диагностика, лечение / С. В. Щепеткина, О. А. Ришко, В. Г. Скопичев [и др.]. – 2-е издание, дополненное. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2020. – 308 с.
47. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных. Сообщение 2: мышь / К. Е. Коптяева, А. А. Мужикян, Я. А. Гуцин [и др.] // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – № 4. – С. 50-73. – DOI 10.29296/2618723X-2018-04-05.
48. Методические указания по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях / Департамент ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации / 11.09.00 г. N 13-7-2/2137

49. Методы клинических лабораторных исследований / [В. С. Камышников и др.] ; под ред. В. С. Камышникова. – 4-е изд.. – Москва: МЕДпресс-информ, 2011. – 751 с. – ISBN 978-5-98322-687-6.

50. Методы морфологических исследований: Методическое пособие / С. М. Сулейманов, А. В. Гребенщиков, Е. В. Михайлов [и др.]. – 2-е издание, исправленное и дополненное. – Воронеж: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Российской академии сельскохозяйственных наук, 2007. – 87 с.

51. Методы подготовки биологического материала для гистологических исследований (принцип GLP) / П. О. Варакса, И. А. Дьяченко, Е. А. Калабина, В. В. Стаффорд. – Москва: Российская академия кадрового обеспечения агропромышленного комплекса, 2020. – 140 с. – ISBN 978-5-93098-090-5.

52. Микрофлора секрета вымени клинически здоровых и больных маститом коров / Н. Т. Климов, А. Г. Нежданов, И. Т. Шапошников [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2014. – № 3. – С. 69-71.

53. Микрофлора, выделяемая при мастите и определение ее чувствительности к антибактериальным препаратам / Э. Д. Джавадов, А. А. Стекольников, М. А. Ладанова, О. Б. Новикова // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 1. – С. 13-17. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.1.13.

54. Морфологическая характеристика резидентных макрофагов различной локализации / Д. В. Луговец, М. В. Улитко, В. А. Поздина, И. Г. Данилова // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием, Воронеж, 18–22 сентября 2017 года. – Воронеж: Издательство Истоки, 2017. – С. 2231-2232. – EDN XXZNFV.

55. Моторыгин, А. В. Этиологическая структура, морфофункциональная характеристика эшерихиоза телят: специальность

06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология" : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Моторыгин Антон Валерьевич. – Москва, 2011. – 23 с.

56. Мужикян, А. А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных / А. А. Мужикян, М. Н. Макарова, Я. А. Гущин // Международный вестник ветеринарии. – 2014. – № 2. – С. 103-109.

57. Нежданов, А. Г. Морфофизиологические основы лактации и болезни молочной железы сельскохозяйственных животных: Учебное пособие / А. Г. Нежданов, В. И. Слободяник, А. В. Ходаков. – Воронеж: Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I, 1997. – 66 с.

58. Некоторые особенности фиксации органов и тканей лабораторных животных для повышения качества гистологического анализа / К. Е. Коптяева, А. А. Мужикян, Я. А. Гущин [и др.] // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – № 2. – С. 60-70. – DOI 10.29296/2618723X-2018-02-07.

59. Опыт использования препарата на основе стафилококкового анатоксина при мастите коров / В. А. Кузьмин, Л. В. Темникова, Л. В. Кудрявцева, Д. А. Нуднов // Иппология и ветеринария. – 2014. – № 2(12). – С. 61-65.

60. Оценка действия комплексного препарата на основе стафилококкового анатоксина при лечении коров с маститом / В. А. Кузьмин, Л. С. Фогель, Л. В. Темникова, Д. А. Нуднов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2014. – № 2. – С. 80-83.

61. Панова, Н. А. Значение молозивного периода в передаче клеточного иммунитета новорожденному / Н. А. Панова // Труды международной научной онлайн-конференции "АгроНаука-2020": Сборник статей, Новосибирск, 05–06 ноября 2020 года / Сибирский федеральный

научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук, Государственная публичная научно-техническая библиотека Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирский государственный аграрный университет. – Новосибирск: Государственная публичная научно-техническая библиотека СО РАН, 2020. – С. 185-187.

62. Панова, Н. А. Миграция иммунокомпетентных клеток в молозивный период / Н. А. Панова // Материалы национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 25–29 января 2021 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 70-72.

63. Панова, Н. А. Состав иммунокомпетентных клеток и клеточная структура молочной железы у мышей в фазы лактации и физиологического покоя / Н. А. Панова, В. Г. Скопичев, П. А. Полистовская // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2018. – № 3. – С. 193-196.

64. Патент № 2116085 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/085, А61К 39/09. Способ профилактики мастита : № 97104972/13 : заявл. 01.04.1997 : опубл. 27.07.1998 / А. А. Евглевский, Е. П. Евглевская, В. А. Есепенок, В. Н. Петрова; заявитель Курская государственная сельскохозяйственная академия им.проф.И.И.Иванова.

65. Патент № 2230571 С2 Российская Федерация, МПК А61К 39/085, А61К 39/09. Способ лечения мастита у коров: № 2002114565/13: заявл. 03.06.2002 : опубл. 20.06.2004 / Е. П. Евглевская, А. А. Евглевский, Н. В. Воробьева, В. В. Галкин ; заявитель Курская государственная сельскохозяйственная академия им. проф. И.И. Иванова.

66. Патент № 2377016 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/116, А61К 39/085, А61К 39/09. Способ получения стафило-стрептококковой анатоксин-вакцины: № 2008115049/13 : заявл. 16.04.2008 : опубл. 27.12.2009 / А. А. Евглевский, Д. А. Евглевский, Л. А. Майстренко ; заявитель ФГОУ

ВПО Курская государственная сельскохозяйственная академия им. профессора И.И. Иванова.

67. Патент № 2396089 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/085, А61К 35/04, А61К 9/06. Способ лечения острых лактационных маститов у коров: № 2009112103/13: заявл. 01.04.2009 : опубл. 10.08.2010 / Г. М. Андреев, В. А. Кузьмин, В. Г. Скопичев, Л. В. Темникова ; заявитель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины" (ФГОУ ВПО СПГАВМ).

68. Патент № 2622017 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/00, А61К 31/194, А61К 31/245. Способ лечения мастита у лактирующих коров: № 201611745: заявл. 04.05.2016 : опубл. 08.06.2017 / Н. В. Воробьева, В. С. Попов, А. А. Евглевский [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Курский научно-исследовательский институт агропромышленного производства".

69. Патент № 2663293 С1 Российская Федерация, МПК А61К 9/06, А61Р 15/14, А61К 39/085. Способ лечения острых лактационных маститов у свиноматок: № 2018102773: заявл. 24.01.2018 : опубл. 03.08.2018 / В. Г. Скопичев; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины ФГБОУ ВО СПбГАВМ.

70. Патент № 2699353 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/085, А61К 47/20, А61Р 31/04. Способ профилактики лактационных маститов у коров: № 2018107854: заявл. 02.03.2018 : опубл. 05.09.2019 / В. Г. Скопичев, Н. Б. Редфилд ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины (ВПО СПбГ ГАВМ).

71. Патент № 2743345 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ оценки клеточного иммунитета при молозивном вскармливании животных: № 2019143557: заявл. 20.12.2019 : опубл. 17.02.2021 / В. Г.

Скопичев, Н. А. Панова ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины ФГБОУ ВО СПбГАВМ.

72. Племяшов, К. В. Молочная железа. Морфология, физиология и биохимические аспекты лактогенеза / К. В. Племяшов, Ю. В. Конопатов, В. И. Соколов. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская государственная академия, 2007. – 30 с.

73. Погодаева, П. С. Влияние локальной антигенной стимуляции молочной железы / П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко, В. С. Понамарев // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 2. – С. 126-130. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.2.126.

74. 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.

75. Погодаева, П. С. Влияние стафилококковой вакцины на антигенпрезентирующие клетки молочной железы / П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко // Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию кафедры фармакологии и токсикологии СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 19–21 мая 2021 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 194-195.

76. 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.

77. Погодаева, П. С. Особенности влияния термостабильных антигенов в контексте становления топического иммунитета / П. С.

Погодаева, О. А. Душенина // Материалы 75-й юбилейной международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, посвященной, объявленному в 2021 году президентом РФ Путиным В.В., году науки и технологий, Санкт-Петербург, 05–09 апреля 2021 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 176-177.

78. Погодаева, П. С. Особенности формирования локального иммунного ответа молочной железы / П. С. Погодаева, В. С. Пономарев // Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны: Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Санкт-Петербург, 19–20 ноября 2020 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2020. – С. 285-286.

79. Погодаева, П. С. Сравнительное влияние различных термостабильных антигенов на антигенпрезентирующие клетки молочной железы / П. С. Погодаева, Л. Ю. Карпенко // Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию кафедры фармакологии и токсикологии СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 19–21 мая 2021 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 195-197.

80. Профилактика и диагностика мастита коров / А. А. Стекольников, К. В. Племяшов, Е. А. Корочкина [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2016. – № 4. – С. 136-138.

81. Профилактика и лечение диспепсии у новорожденных телят : учебное пособие для вузов / А. Я. Батраков, К. В. Племяшов, В. Н. Виденин, А. В. Яшин ; А. Я. Батраков, К. В. Племяшов, В. Н. Виденин, А. В. Яшин. – Санкт-Петербург : Общество с ограниченной ответственностью "Квадро",

2021. – 56 с. – (Учебники и учебные пособия для высших учебных заведений). – ISBN 978-5-906371-71-1. – EDN JC DLKN.

82. Роль микробного фактора в возникновении и развитии мастита у коров / Н. Т. Климов, В. А. Париков, В. И. Слободяник [и др.] // Ветеринария. – 2008. – № 12. – С. 33-36.

83. Руденко, П. А. Микробный пейзаж при маститах у коров / П. А. Руденко, А. А. Руденко, Ю. А. Ватников // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 2(50). – С. 172-179. – DOI 10.18286/1816-4501-2020-2-172-179.

84. Самбуров, Н. В. Молозиво коров его состав и биологические свойства / Н. В. Самбуров, И. Л. Палаус // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 4. – С. 59-61.

85. Сарбаева, Н. Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами / Н. Н. Сарбаева, Ю. В. Пономарева, М. Н. Милякова // Гены и Клетки. – 2016. – Т. 11. – № 1. – С. 9-17.

86. Скопичев, В. Г. Анализ морфогенеза структуры железистой паренхимы молочной железы белой мыши в период маммогенеза / В. Г. Скопичев, Н. С. Дмитриева // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2017. – № 1. – С. 120-123.

87. Скопичев, В. Г. Иммунобиология молочной железы и молочная продуктивность / В. Г. Скопичев. – Beau Bassin: LAP LAMBERT, 2018. – 328 с. – ISBN 978-613-9-84393-0.

88. Скопичев, В. Г. Морфо-физиологические и иммунологические аспекты животноводства / В. Г. Скопичев, Н. Н. Максимюк. – Санкт-Петербург: Квадро, 2016. – 564 с. – ISBN 978-5-906371-15-7.

89. Слободяник, В. И. Иммунологические аспекты решения проблемы мастита у коров / В. И. Слободяник // Вестник ветеринарии. – 2007. – № 1-2(40-41). – С. 135-143.

90. Смирнова, Л. И. Атипичные свойства *Streptococcus dysgalactiae* - возбудителей мастита коров / Л. И. Смирнова, Е. И. Приходько, С. А. Макавчик // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 4. – С. 56-59. – DOI 10.17238/issn2072-6023.2020.4.56.

91. Современный взгляд на этиологию, патогенез и диагностику мастита у коров / М. А. Ладанова, Э. Д. Джавадов, К. В. Племяшов [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 4. – С. 29-34. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2021.4.29.

92. Соколов, В. И. Цитология, гистология и эмбриология / В. И. Соколов, Е. И. Чумасов, В. С. Иванов. – Санкт-Петербург: Квадро, 2016. – 400 с. – ISBN 978-5-906371-15-5.

93. Соловьева, Л. П. Динамика микроструктуры молочной железы лактирующих коз / Л. П. Соловьева, Е. В. Ремизова // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2013. – № 2(27). – С. 110-112.

94. Соловьева, Л. П. Закономерности развития структурных элементов паренхимы молочной железы у телок костромской породы / Л. П. Соловьева // Аграрный вестник Нечерноземья. – 2021. – № 1(1). – С. 40-49. – DOI 10.52025/2712-8679_2021_01_40.

95. Состав маститогенной микрофлоры коров / А. В. Егунова, И. В. Зирук, Ю. В. Якимов [и др.] // Актуальные проблемы современной ветеринарной науки и практики: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института, Краснодар, 22–23 июня 2016 года / ФГБНУ «Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт»; ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет». – Краснодар: Общество с ограниченной ответственностью "Издательский Дом - Юг", 2016. – С. 371-373.

96. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных:

Доклинические исследования / Т. В. Абрашова, Я. А. Гушин, М. А. Ковалева [и др.]. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство "ЛЕМА", 2013. – 116 с. – ISBN 978-5-98709-619-2.

97. Сравнительная характеристика клеток Лангерганса производных кожи у человека и белой крысы / О. Д. Мяделец, Т. Н. Кичигина, В. О. Мяделец [и др.] // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2008. – Т. 7. – № 1. – С. 12-23.

98. Стасевич, Н. Б. Морфогенез паренхимы молочной железы у коров в молозивный период / Н. Б. Стасевич, В. Г. Скопичев // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – № 5. – С. 460.

99. Стафилококковая вакцина: влияние на киллерную активность лейкоцитов и неспецифическую резистентность / Н. К. Ахматова, И. М. Грубер, Э. А. Ахматов [и др.] // Иммунология. – 2014. – Т. 35. – № 3. – С. 143-146.

100. Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 / Правительство Российской Федерации / 25.09.17 N 2045-р

101. Стратегия разработки противостафилококковых иммунопрофилактических и иммунотерапевтических препаратов / И. М. Грубер, Н. Б. Егорова, Е. А. Курбатова, Н. А. Михайлова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2013. – № 4. – С. 31-38.

102. Сулейманов, С. М. Гистоструктура молочной железы больных маститом коров, получавших эндобактерин / С. М. Сулейманов, В. В. Подберезный, В. И. Слободяник // Материалы Всероссийской научной и учебно-методической конференции по акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных, Воронеж, 25–27 октября 1994 года. – Воронеж: Издательство Истоки, 1994. – С. 243-244.

103. Сулейманов, С. М. Иммунологическая перестройка в лимфатических узлах у больных маститом коров, получавших эндобактерин / С. М. Сулейманов, В. И. Слободяник, В. В. Подберезный // Материалы

Всероссийской научной и учебно-методической конференции по акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных, Воронеж, 25–27 октября 1994 года. – Воронеж: Издательство Истоки, 1994. – С. 245-246.

104. Темникова, Л. В. Результаты иммунологических исследований сыворотки крови у коров с острой формой мастита / Л. В. Темникова, Г. М. Андреев, В. Г. Скопичев // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2(11). – № 2-3. – С. 171.

105. Терехов, В. И. Бактерии рода *Escherichia* (Аналитический обзор) / В. И. Терехов, И. В. Сердюченко // Вестник ветеринарии. – 2016. – № 2(77). – С. 35-42.

106. Толкунов, Ю. А. Физиология альвеолы молочной железы / Ю. А. Толкунов, А. Г. Марков; Ю. А. Толкунов, А. Г. Марков; [Рос. акад. наук, Ин-т физиологии им. И. П. Павлова]. – СПб.: НАУКА, 2005. – ISBN 5-02-026229-3.

107. Федеральный закон от 30.12.2021 № 463-ФЗ "О внесении изменений в Закон Российской Федерации "О ветеринарии" и Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств", 0001202112300122

108. Шварц, Я. Ш. Функциональные фенотипы макрофагов и концепция M1-M2-поляризации. Ч. I. провоспалительный фенотип / Я. Ш. Шварц, А. В. Свистельник // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – № 3. – С. 312-329.

109. Щипакин, М. В. Анализ гистогенеза молочной железы коз зааненской породы при смене функциональных состояний / М. В. Щипакин // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2013. – № 4(20). – С. 84-88.

110. Щипакин, М. В. Гистогенез лимфатических узлов вымени коз зааненской породы / М. В. Щипакин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – Т. 218. – № 2. – С. 335-340.

111. Щипакин, М. В. Ультраструктурные изменения молочной железы коз зааненской породы в период лактации / М. В. Щипакин, А. Н. Горшков // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2014. – № 4(24). – С. 47-50.

112. Argudin M.A., Mendoza M.C., Rodicio M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2010, 2: 1751-1773 (doi: 10.3390/toxins2071751).
113. Arnold, R. Ultrastructural changes in the post lactation rat mammary // *J. Anat*, 1986. - P. 149-252.
114. Briles D.E., Paton J.C., Mukerji R. et al. Pneumococcal Vaccines. *Microbiol Spectr* 2019;7(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0028-2018
115. Brooks L.R.K., Mias G.I. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Front Immunol* 2018;9:1366. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01366
116. Broughan J., Anderson R., Anderson A.S. Strategies for and advances in the development of *Staphylococcus aureus* prophylactic vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 2011; 10: 695 – 708.
117. Cells of immune memory in mice in the colostrums / P. Pogodaeva, N. Panova, V. Skopichev [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2019. – Vol. 54. – No S3. – P. 103.
118. Cheung A.L., Bayer A.S., Zhang G. et al. Regulation of virulence determinations in vitro and in vivo *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004, 40: 1-9.
119. Daum R.S. *Staphylococcus aureus* vaccines. In: *Vaccines*. S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, P.A. Offit (ed.). Elsevier, 2008, p. 1307-1315.
120. Fattom A.L., Sarwar J., Ortiz A., Naso R. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. *Infect. Immun.* 1996, 64 (5): 1659-1665.
121. Garcia V.E., Gomes M.I., Sanjuan N. et al. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996, 14: 45-51.
122. Garcia YM, Barwinska-Sendra A, Tarrant E, Skaar EP, Waldron KJ, Kehl-Fie TE (2017) A Superoxide Dismutase Capable of Functioning with Iron or

Manganese Promotes the Resistance of *Staphylococcus aureus* to Calprotectin and Nutritional Immunity. PLoS Pathog 13(1): e1006125

123. Ginsburg A.S., Alderson M.R. New conjugate vaccines for the prevention pneumococcal disease in developing countries. *Drugs Today* 2011;47(3):207-14. DOI: 10.1358/dot.2011.47.3.1556471

124. Gomes M.I., Sordelli D.O, Bizzola F.R, Garcia V.E. Induction cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. *Infect. Immun.* 2002, 70: 4254-4260.

125. Hollmann, K. H. Cytology and fine structure of the mammary gland / K. H. Hollmann // In: Lactation. V. 1. - New York, London, 1978. - P. 3-95.

126. Holmes M.A., Zadoks R.N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2011, 16(4): 373-382 (doi: 10.1007/s10911-011-9237-x).

127. Iwatsuki K., Yamasaki O., Morizane S., Oono T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *J. Dermatol. Sci.* 2006, 42 (3): 203-214.

128. Jakob, T. Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin / T. Jakob, J. Ring, M. C. Udey // *J. Allergy Clin Immunol.* – 2001. – Vol.108, N 5. – P. 688-696.

129. Jernej Ogorevc; Sonja Prpar; Peter Dovc In vitro mammary gland model: establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line. – *Acta agriculturae Slovenica / Univ. of Ljubljana. Biotechn. fac.*, 2009; letn. 94 stev. 2. - P. 133-138.

130. Kim L., McGee L., Tomczyk S., Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and postconjugate vaccine eras: a United States perspective. *Clin Microbiol Rev* 2016;29(3):525-52. DOI: 10.1128/CMR.00058-15

131. Lyon G.J., Wright J.S., Muir T.W., Novick R.P. Key determination of receptor activation in the agr autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*. 2002, 41 (31): 10095-10104.
132. Mantovani A., Sica A., Sozzani S. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunol* 2004; 25 (12): 677-686.
133. Markowska-Daniel, I, Pomorska-Mól, M, Pejsak, Z. Dynamic changes of immunoglobulin concentrations in pig colostrum and serum around parturition // *Pol. J. Vet. Sci.* - 2010. - Vol. 13, № 1. - P. 21-7.
134. Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T., Poh C.L. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines (Basel.)* 2020;8(1):132. DOI: 10.3390/vaccines8010132
135. Mato W., Jonsson P., Flock J.L. et al. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunologic response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (Fn BP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine*. 1994, 12: 988-992.
136. McCarthy A.J., Lindsay J.A. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiology* 2010; 10: 173. PMC 2905362.
137. Mosser D. M., Edwards J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation/ D. M. Mosser, J. P. Edwards // *Nat Rev Immunol.* - 2008. - Vol. 8, №12. - P. 958-969.
138. Muntjewerff E.M., Meesters L.D., van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1276. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01276
139. Murray P. J., Wynn T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // *Nature reviews immunology.* - 2011. - V. 11, №. 11. - P. 723-737.

140. Nishimoto A.T., Rosch J.W., Tuomanen E.I. Pneumolysin: pathogenesis and therapeutic target. *Front Microbiol* 2020;11:1543. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01543
141. Nour El-Din A., Shkreta L., Talbot B.G. et al. DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. 2005, 24 (12): 1997-2006.
142. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64: 143 – 162.
143. Peacock S.J., Moore C.E., Justice A. et al. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2002. 70 (9): 4987-4996.
144. Peeler E.J. Study of clinical mastitis in British dairy herds with bulk milk somatic cell counts less than 150, 000 cells / ml / E.J. Peeler, M.J. Green, J.L. Fitzpatrick // *Veter. Rec.* - 2002. - Vol. 151, № 6. - P. 170 - 176.
145. Pfeifer J.D., Wick M.J., Roberts R.L., Findlay K., Normark S.J., Harding C.V. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature*. 1993; 361: 359-362. DOI: 10.1038/361359a0
146. Pitelka, D. R. The mammary gland / D. R. Pitelka // In: *Histology*. - №4 1984. -P. 944-965.
147. Pragman A.A., Yarwood J.M., Tripp T.J., Scblievert P.M. Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2004, 186 (8): 2430-2438.
148. PSXVI-13 Study of migration of antigen-presenting cells in the tissue of the lactating mammary gland under the influence of staphylococcal vaccine / P. Pogodaeva, L. Y. Karpenko, S. V. Vasileva [et al.] // *Journal of Animal Science*. – 2021. – Vol. 99. – No S3. – P. 329-330. – DOI 10.1093/jas/skab235.606.
149. Radkowski M. The effect of polyphosphates on streptococci isolated from mastitis cases / M. Radkowski // *Pol. J. veter. Sc.* - 2006. - Vol.9, № 2. - P. 135138.

150. Shkreta L., Talbot B.G., Diarra M.S., Lacasse P. Immune responses to a DNA/protein vaccination against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine*. 2004, 23: 114-126.
151. Smeester P.R., Mardulyn P., Vergison A., Leplae R., Van Melderen L. Genetic diversity of group A *Streptococcus* M protein: implications for typing and vaccine development. *Vaccine*. 2008; 26: 5835–5842.
152. Sordillo, L. M. Immunobiology of the mammary gland / L. M. Sordillo, K. Shafer–Weaver, D. DeRosa // *Journal of Dairy Science*. – 1997. – Vol. 80. – P. 1851–1865.
153. Sordillo, L. M. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis / L. M. Sordillo, S. C. Nickerson // *Veterinary research*, 1988. -Vol. 49. - №7. -P. 1112-1120.
154. Spaulding A.R., Salgado – Pabyn W., Kohler P.L., Horswill A.R., Leung D.Y., Schlievert P.M. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev*, 2013, 26(3): 422-447 (doi: 10.1128/CMR.00104-12).
155. Steinman R.M., Inaba K., Turley S., Pierre P., Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum. Immunol*. 1999; 60: 562-567. DOI: 10.1016/S0198-8859(99)00030-0
156. Taponen, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase–negative staphylococci identified with API or AFLP / S. Taponen, H. Simojoki, M. Haveri, H. D. Larsen, S. Pyorala // *Veterinary Microbiology*. – 2006. – Vol. 115. – P. 199–207.
157. Thomas, J. A. Immunological and histochemical analysis of regional variations of epidermal Langerhans cell in normal human skin / J. Thomas, M. Biggerschaff, J. Sloane // *Histochem J*. – 1984. – N 5. - P. 507-519.
158. Totolian, A. A. Past and Present of *Streptococcus pyogenes*: Some Pathogenic Factors and Their Genetic Determination / A. A. Totolian // *Annals of*

the Russian Academy of Medical Sciences. – 2015. – Vol. 70. – No 1. – P. 63-69.
– DOI 10.15690/vramn.v70i1.1233.

159. van Dinther D., Veninga H., Iborra S., Borg E.G.F., Hoogterp L., Olesek K., Beijer M.R., Schetters S.T.T., Kalay H., Garcia-Vallejo J.J., Franken K.L., Cham L.B., Lang K.S., van Kooyk Y., Sancho D., Crocker P.R., den Haan J.M.M. Functional CD169 on macrophages mediates interaction with dendritic cells for CD8⁺ T cell cross-priming. *Cell. Rep.* 2018; 22: 1484-1495. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.01.021

160. Weiser J.N., Ferreira D.M., Paton J.C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol* 2018;16(6):355-67. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8