

ГИСТОПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ МОРСКИХ СВИНОК
ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА КИМ-М2

V.S. Vlasenko, Yu. M. Gichev,
T.S. Dudoladova, E.A. Kosobokov, I.N. Koshkin

HISTOPATOMORPHOLOGICAL CHANGES OF INTERNAL ORGANS OF GUINEA PIGS DURING
THE INTRODUCTION OF ANTITUBERCULOSIS PREPARATION KIM-M2

Власенко В.С. – д-р ветеринар. наук, проф. каф. ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, г. Омск.
E-mail: vvs-76@list.ru

Гичев Ю.М. – канд. ветеринар. наук, доц. учебно-лабораторного комплекса «Ветеринарная клиника» Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, г. Омск.
E-mail: yum.gichev@omgau.org

Дудолодова Т.С. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. диагностических исследований Омского аграрного научного центра, г. Омск.
E-mail: vniibtg18@rambler.ru

Кособоков Е.А. – мл. науч. сотр. лаб. диагностических исследований Омского аграрного научного центра, г. Омск.
E-mail: vniibtg18@rambler.ru

Кошкин И.Н. – асп. каф. ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, г. Омск.
E-mail: in.koshkin36.06.01@omgau.org

Vlasenko V.S. – Dr. Veterinary Sci., Prof., Chair of Veterinary Microbiology, Infectious and Invasive Diseases, Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk.
E-mail: vvs-76@list.ru

Gichev Yu.M. – Cand. Veterinary Sci., Assoc. Prof., Educational and Laboratory Complex "Veterinary Clinic", Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk.
E-mail: yum.gichev@omgau.org

Dudoladova T.S. – Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Lab. Of Diagnostic Researches, Omsk Agrarian Scientific Center, Omsk.
E-mail: vniibtg18@rambler.ru

Kosobokov E.A. – Junior Staff Scientist, Lab. Of Diagnostic Researches, Omsk Agrarian Scientific Center, Omsk.
E-mail: vniibtg18@rambler.ru

Koshkin I.N. – Post-Graduate Student, Chair of Veterinary Microbiology, Infectious and Invasive Diseases Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk.
E-mail: in.koshkin36.06.01@omgau.org

Цель исследования – изучение динамики гистопатоморфологических изменений в лимфатических узлах, селезенки, легких и печени морских свинок, подвергнутых введению противотуберкулезного препарата КИМ-М2 после инфицирования вирулентной культурой *M. bovis*. Для экспериментального заражения морских свинок использовали вирулентную культуру *M. bovis* штамм 8, полученную из биоресурсной коллекции культур микроорганизмов отдела ветеринарии ФГБНУ «Омского АНЦ». Экспериментальных животных содержали в условиях специализированного вивария для проведения исследований с инфекционным агентом. Через 45 сут после инфицирования

животных выводили из эксперимента путем декапитации. Для гистологического исследования были взяты аутопаты легких, селезенки, печени и паховых лимфатических узлов. Аутопаты были заключены в кассеты и помещены в 10 %-й раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере. Подготовку материала осуществляли на станции MICROM STR-120. Заливку парафином проводили на заливочной станции MICROM ES-350. Готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопию и морфометрию осуществляли на микроскопе Zeiss AXIO Imager A1. Морским свинкам 1-й группы (n

= 5) вводили вирулентную культуру *M. bovis* штамм 8 подкожно в дозе 0,001 мг/мл, животным 2-й группы ($n = 5$) подкожно вводили вирулентную культуру *M. bovis* штамм 8 в дозе 0,001 мг/мл, а через 14 сут – КИМ-М2 в дозе 0,5 мг/мл белка. Выявленные гистоморфологические изменения у животных 1-й группы можно рассматривать как морфологический эквивалент реакции иммунологической супрессии. В то же время, во 2-й экспериментальной группе установлено усиление иммуногенеза при введении препарата КИМ-М2 на фоне экспериментального заражения возбудителем туберкулеза, что подтверждается гистоморфологическими данными. Препарат КИМ-М2 способствует более быстрому восстановлению морфологической структуры исследованных органов, значительной пролиферации лимфоцитов и макрофагов, следовательно, его в предложенных дозах можно использовать как противотуберкулезный препарат.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, вирулентный штамм *M. bovis*, противотуберкулезный препарат, гистоморфология органов.

The research objective was studying the dynamics of histomorphological changes in lymph nodes, spleens, lungs and liver of the guinea pigs subjected to introduction of antitubercular preparation of KIM-M2 after the infection with virulent culture of *M. of bovis*. For experimental infection of guinea pigs virulent culture of *M. of bovis* strain 8 received from a bioresource collection of cultures of microorganisms of department of veterinary science of FSBRIOmsk ARC" was used Experimental animals were supported in conditions of a specialized vivarium for carrying out the researches with infectious agent. In 45 days after the infection of animals brought out of experiment by a decapitation. For histological research autoptata of lungs, spleens, liver and inguinal lymph nodes were taken. Autoptata were concluded in cartridges and were placed in 10 % solution of neutral formalin on phosphatic buffer. The preparation of the material was carried out at MICROM STR-120 station. Filling by paraffin was carried out at filling station MICROM ES-350. Prepared histological cuts were 5–7 microns thick then were painted with hematoxylin and eosin. The microscopy and morphometry were carried out on a microscope of Zeiss AXIO Imager A1. To guinea pigs of the 1st

group ($n = 5$) virulent culture of *M. bovis* a strain 8 hypodermically in a dose of 0,001 mg/ml was used, to the animals of the 2nd group ($n = 5$) virulent culture of *M. bovis* a strain 8 in a dose of 0.001 mg/ml, and in 14 days - KIM -M2 in a dose of 0.5 mg/ml of protein was used hypodermically. Revealed histomorphological changes in animals of the 1-st group can be considered as a morphological equivalent of immunological suppression reaction. At the same time, in the 2-nd experimental group immunogenesis strengthening at the introduction of the preparation of KIM-M2 against experimental infection with the causative agent of tuberculosis that was confirmed by histomorphological data was established. KIM-M2 preparation promoted faster restoration of morphological structure of studied bodies, considerable proliferation of lymphocytes and macrophages, therefore, in offered doses it can be used as antitubercular preparation.

Keywords: cattle, virulent strain of *M. bovis*, antitubercular preparation, bodies histomorphology.

Введение. Туберкулез крупного рогатого скота по-прежнему остается серьезной проблемой для здоровья человека и животных во всем мире, и для борьбы с этим заболеванием необходимы новые средства [8]. За последние 20 лет был достигнут значительный прогресс в разработке и оценке противотуберкулезных вакцин для крупного рогатого скота с новыми аттенуированными микобактериальными штаммами, обеспечивающими альтернативу использования вакцины БЦЖ и субъединичных вакцин [6,7,9].

На наш взгляд, наиболее перспективной концепцией конструирования противотуберкулезных препаратов является конъюгация иммуногенной фракции, выделенной из вакцинных бактерий. Как показали результаты исследований, необходимыми для этого свойствами обладают синтетические неприродные полиэлектролиты с контролируемой структурой [1, 3, 4]. Среди таких препаратов можно отметить конъюгаты, приготовленные на основе антигенов БЦЖ и синтетических полиэлектролитов, в частности иммуномодулятор КИМ-М2, обладающий доказанными протективными свойствами [5].

Известно, что при различных формах и стадиях туберкулеза происходит вовлечение в патологический процесс всех органов гистиоцитарной системы организма с последующим формированием гранулематозного воспаления

[10]. Вместе с тем гистопатоморфологические изменения, развивающиеся в организме животных, вовлеченных в туберкулезный инфекционный процесс, остаются слабо изученными [6].

В этом плане определенный теоретический и практический интерес представляет изучение влияния сконструированного нами препарата КИМ-М2 [5] на патогистоморфологические изменения в органах и тканях инфицированных возбудителем туберкулеза экспериментальных животных.

Цель исследования: изучение динамики гистопатоморфологических изменений в лимфатических узлах, селезенки, легких и печени морских свинок, подвергнутых введению противотуберкулезного препарата КИМ-М2 после инфицирования вирулентной культурой *M. bovis*.

Объект и методы исследования. Исследование проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [2]. Для экспериментального заражения морских свинок использовали вирулентную культуру *M. bovis* штамм 8, полученную из биоресурсной коллекции культур микроорганизмов отдела ветеринарии ФГБНУ «Омского АНЦ».

10 морских свинок инфицировали вирулентной культурой *M. bovis* штамм 8, подкожно в дозе 0,001 мг/мл. Через 14 сут после инфицирования 5 опытным животным ввели КИМ-М2 под-

кожно в дозе 0,5 мг/мл белка (2-я группа). Остальные морские свинки (n=5) служили в качестве контроля (1-я группа).

Экспериментальных животных содержали в условиях специализированного вивария для проведения исследований с инфекционным агентом.

Через 45 сут после инфицирования животных выводили из эксперимента путем декапитации. Для гистологического исследования были взяты аутопаты легких, селезенки, печени и паховых лимфатических узлов. Аутопаты были заключены в кассеты и помещены в 10 %-й раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере. Подготовку материала осуществляли на станции MICROM STR-120.

Заливку парафином проводили на заливочной станции MICROM ES-350. Готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопию и морфометрию осуществляли на микроскопе Zeiss AXIO Imager A1.

Результаты исследования и их обсуждение. Проведенные гистологические исследования показали, что у морских свинок 1-й группы через 45 сут после заражения культурой *M. bovis* штамм 8 в корковом веществе паховых лимфатических узлов обнаруживается большое количество гранулем, находящихся в различной стадии развития (рис. 1).

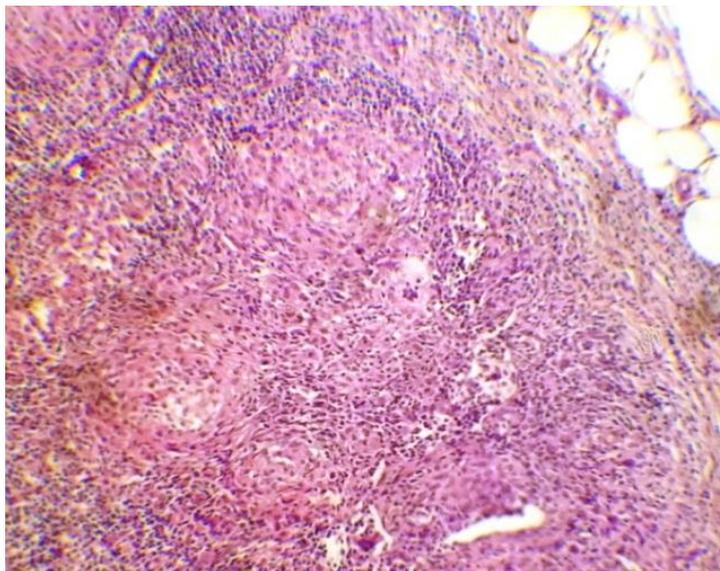


Рис. 1. Туберкулезные гранулемы в корковом веществе пахового лимфатического узла морской свинки 1-й группы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 1×10.

В центральной части гранулем содержатся эпителиоидные макрофаги. Снаружи зона эпителиоидных клеток окружена фибробластами и фиброцитами. Признаков минерализации в формирующихся гранулемах не отмечалось.

В прилегающем к туберкулезным гранулемам корковом веществе лимфоузла происходит интенсивная пролиферация клеток стромы, а также наблюдается пролиферация эндотелия сосудов микроциркуляторного русла. Лимфатические фолликулы расположены относительно редко, не имеют четких выраженных границ, со слабо выраженными центрами размножения.

Краевые синусы в лимфатических узлах в одних местах заполнены редко расположенными лимфоцитами, в других наблюдается разрастание фибробластов, фиброцитов и образование коллагеновых волокон. Расположенные между мякотными тяжами мозговые синусы расширены, в них редко расположены ретикулоциты, лимфоциты, плазмобласты и немногочисленные плазмоциты, а также макрофаги.

В селезенке морских свинок 1-й группы наблюдается уменьшение количества и размера лимфатических фолликулов, в центрах размножения которых отмечали редкое расположение лимфоцитов. В красной пульпе селезенки отмечается расширение синусов, в просвете которых обнаруживаются макрофаги с фагоцитированными эритроцитами, лимфоцитами и в небольшом количестве плазмоциты. Мякотные тяжи красной пульпы утолщены, в них наблюдается пролиферация ретикулоцитов и макрофагов.

В легких морских свинок 1-й группы регистрировали выраженную пролиферацию макрофагов в перибронхиальной соединительной ткани и стенках альвеол. По всей поверхности гистосрезов периферической части долей легких морских свинок этой группы рассеяны многочисленные разного размера лимфатические фолликулы. Основными клеточными элементами межальвеолярных перегородок являются альвеолярные макрофаги, лимфоциты и единичные гранулоциты.

Бронхи, а также сопровождающие их сосуды окружены сплошными полями из пролиферирующих макрофагов, среди которых обнаруживаются крупные лимфатические фолликулы и участки, инфильтрированные лимфоидными клетками. В то же время характерных для туберкулезного процесса гранулем в легких не обнаруживали.

В некоторых участках вокруг желчных протоков мононуклеары образовывали скопления. В венозных сосудах обнаруживалось большое количество гранулоцитов. В печени морских свинок 1-й и 2-й групп вокруг кровеносных сосудов и желчных протоков некоторых триад печени обнаруживались скопления мононуклеаров, состоящие преимущественно из лимфоцитов (рис. 2). В некоторых участках органа наблюдалась зернистость и жировая дистрофия, чаще всего в гепатоцитах, расположенных вокруг центральной вены.

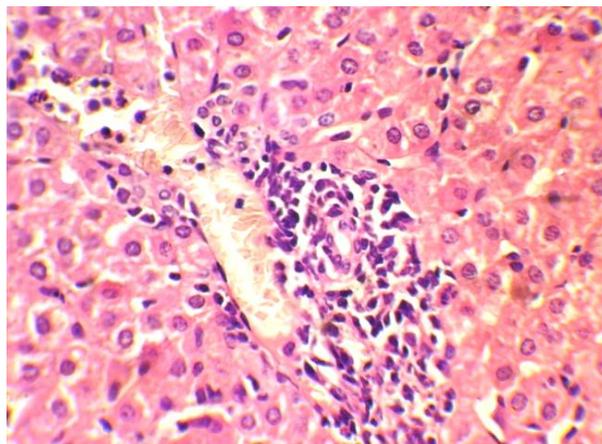


Рис. 2. Печень морской свинки 2-й группы. Вокруг кровеносных сосудов и желчных протоков – скопление мононуклеар, состоящие в основном из лимфоцитов (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 1×10)

В паховых лимфатических узлах морских свинок 2-й группы в отличие от животных 1-й группы в корковом веществе обнаружилось большое количество лимфатических фолликулов. В некоторых участках, в результате увеличения размеров фолликулов и их количества, они сливались и полностью заполняли корковое вещество. Кроме того, у животных 2-й группы в отличие от 1-й группы в лимфоузлах не выражены процессы образования специфических гранулем и отсутствуют морфологические признаки супрессии, лимфопозоза и плазмоцитопозоза. Среди клеток пролиферата обнаруживаются участки некроза.

В селезенке у животных 2-й группы, в отличие от морских свинок 1-й группы, в мягкотных тяжах пролиферативные процессы слабо выражены, в них преобладают процессы экссудации, в результате которых отмечается межклеточный отек и инфильтрация гранулоцитами. В лимфатических фолликулах отмечена интенсивная пролиферация макрофагов и ретикулоцитов.

В синусах селезенки животных 2-й группы обнаруживается большое количество гранулоцитов. В некоторых участках красной пульпы селезенки наблюдается нарушение гистоархитектоники, обусловленное некротическими процессами.

В легких у морских свинок 2-й группы в стенках альвеол, перибронхиальной и периваскулярной соединительной ткани отмечена менее выраженная, чем в 1-й группе, пролиферация макрофагов. При этом лимфоцитарная пролиферация наблюдалась в большей части респираторного отдела, только вокруг кровеносных сосудов с образованием периваскулярных муфт и лимфатических фолликулов. В некоторых участках стенки альвеол утолщены за счет пролиферации макрофагов.

В печени морских свинок 2-й группы, как и 1-й группы, специфических гранулем не обнаружено. Отмечена незначительная пролиферация мононуклеаров вокруг сосудов и мелких желчных протоков. В просветах капилляров обнаруживается большое количество гранулоцитов, возможно занесенных из селезенки, где они в большом количестве обнаруживались в венах.

Выводы. Проведенное исследование показало, что в паховых лимфоузлах морских свинок

1-й группы, инфицированных *M. bovis*, происходит формирование типичных туберкулезных гранул, которые сопровождаются диффузной пролиферацией клеток стромы и фиброцитов коркового вещества органа. В то же время, у животных 2-й группы, которым применяли противотуберкулезный препарат КИМ-М2, туберкулезных гранулем в паховых лимфоузлах не наблюдали. Необходимо отметить, что в мягкотных тяжах селезенки морских свинок 2-й группы пролиферативные процессы выражены слабо, в синусах и периваскулярных муфтах регистрировали небольшое скопление плазматических клеток.

В селезенке животных 1-й группы, в отличие от 2-й группы, отмечали морфологические признаки снижения активности лимфатических фолликулов. В мягкотных тяжах красной пульпы происходило уменьшение количества лимфоцитов и пролиферация ретикулоцитов и макрофагов. Указанные патологические изменения являются морфологическим свидетельством иммуносупрессивного действия возбудителя туберкулеза.

В легких у морских свинок 1-й группы к 45 суткам возникает иммунный ответ на генерализацию возбудителя, проявляющийся периваскулярной пролиферацией лимфоцитов и образованием типичных лимфатических фолликулов.

Следовательно, анализ патогистологических изменений регионарных лимфоузлов, селезенки, легких и печени свидетельствует о том, что применение противотуберкулезного препарата КИМ-М2 можно рекомендовать при терапии животных, инфицированных *M. bovis*.

Литература

1. Бажин М.А., Власенко В.С., Неворотова Г.П. Получение специфических антиген-полимерных комплексов и оценка их протективных свойств // Вестн. Омского ГАУ. – 2016. – № 4 (24). – С. 124–134.
2. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. – М., 2011.
3. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Успешные вакцинации реальны // Наука в России. – 2014. – № 3 (201). – С. 18–25.
4. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экс-

- периментов или в иных научных целях. Страсбург, 18.03.1986. – URL: www.msu.ru.
5. Пат. 2478399 РФ, М11К А61К 39/04, А61К47/48. Способ получения специфического иммуномодулятора. – № 2011124695; заявл. 16.06.2011; опубл. 10.04.2013, Бюл. № 10.
 6. Blanco F.C., Bianco M.V., Garbaccio S., Meiklc V., Gravisaco M.J. et al. Mycobacterium bovis Amce2 double deletion mutant protects cattle against challenge with virulent M. bovis. Tuberculosis, 2013, 93 (3): 363–372.
 7. Dean G., Whelan A., Clifford D., Salguero F.J., Xing Z., Gilbert S. et al. Comparison of the immunogenicity and protection against bovine tuberculosis following immunization by BCG-priming and boosting with adenovirus or protein based vaccines. Vaccine, 2014, 32 (11): 1304–1310.
 8. Ghebremariam M.K., Rutten V.P., Vernooij J.C., Uqbazghi K., Tesfaalem T., Butsuamlak T., Idris A.M., Nielen M., Michel A.L. Prevalence and risk factors of bovine tuberculosis in dairy cattle in Eritrea. BMC Veterinary Research, 2016, 12: 80–86.
 9. Lahey T., Von Reyn C.F. Mycobacterium bovis BCG and new vaccines for the prevention of tuberculosis. Microbiology Spectrum, 2016, 4 (5): TNM17-0003-2016.
 10. Menin A., Fleith R., Reck C., Marlow M., Fernandes P., Pilati C. et al. Asymptomatic cattle naturally infected with Mycobacterium bovis present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. PLoS One, 2013, 8 (1): c53884.
 2. Petrov R.V., Haitov P.M. Immunogeny i vakciny novogo pokolenija. – М., 2011.
 3. Petrov R.V., Haitov P.M. Uspeshnye vakcinacii real'ny // Nauka v Rossii. – 2014. – № 3 (201). – S. 18–25.
 4. Evropejskaja konvencija o zashhite pozvonochnyh zhivotnyh, ispol'zuemyh dlja jeksperimentov ili v inyh nauchnyh celjah. Strasburg, 18.03.1986. – URL: www.msu.ru.
 5. Пат. 2478399 RF, М11К А61К 39/04, А61К47/48. Sposob poluchenija specificheskogo immunomoduljatora. – № 2011124695; zajavl. 16.06.2011; opubl. 10.04.2013, Bjul. № 10.
 6. Blanco F.C., Bianco M.V., Garbaccio S., Meiklc V., Gravisaco M.J. et al. Mycobacterium bovis Amce2 double deletion mutant protects cattle against challenge with virulent M. bovis. Tuberculosis, 2013, 93 (3): 363–372.
 7. Dean G., Whelan A., Clifford D., Salguero F.J., Xing Z., Gilbert S. et al. Comparison of the immunogenicity and protection against bovine tuberculosis following immunization by BCG-priming and boost-ing with adenovirus or protein based vaccines. Vaccine, 2014, 32 (11): 1304–1310.
 8. Ghebremariam M.K., Rutten V.P., Vernooij J.C., Uqbazghi K., Tesfaalem T., Butsuamlak T., Idris A.M., Nielen M., Michel A.L. Prevalence and risk factors of bovine tuberculosis in dairy cattle in Eritrea. BMC Veterinary Research, 2016, 12: 80–86.
 9. Lahey T., Von Reyn C.F. Mycobacterium bovis BCG and new vaccines for the prevention of tuberculosis. Microbiology Spectrum, 2016, 4 (5): TNM17-0003-2016.
 10. Menin A., Fleith R., Reck C., Marlow M., Fernandes P., Pilati C. et al. Asymptomatic cattle naturally infected with Mycobacterium bovis present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. PLoS One, 2013, 8 (1): c53884.

Literatura

1. Bazhin M.A., Vlasenko B.C., Nevorotova G.P. Poluchenie specificheskikh antigen-polimernyh kompleksov i ocenka ih pro-tektivnyh svojstv // Vestn. Omskogo GAU. – 2016. – № 4 (24). – S. 124–134.