

Научная статья/Research Article

УДК 618.14-002:577.112

DOI: 10.36718/1819-4036-2025-4-160-173

Владимир Семенович Авдеенко^{1✉}, Георгий Сергеевич Никитин²,

Александра Игоревна Мороз³

^{1,2,3}Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

¹avdeenko0106@mail.ru

²nikitin.g.s007@mail.ru

³sashamoroz.shuramoroz@mail.ru

ИММУНОРЕАКТИВНОЕ СОСТОЯНИЕ БОЛЬНЫХ ПОСЛЕРОДОВЫМ МЕТРИТОМ КОРОВ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ

Цель исследований – изучить иммунологический статус у здоровых и больных послеродовым метритом коров в сыворотке крови и содержимом влагалища. Объект исследований – лактирующие коровы в послеродовом периоде голштинской породы массой 600–700 кг, 10 000–13 000 кг молочной продуктивности за 305 дней лактации, принадлежащих АО племзавод «Детское сельский» Ленинградской области. Для исследования отобрали 20 новотельных животных, которые в дальнейшем были разделены на две группы: в состав первой группы ($n = 10$) входили клинически здоровые коровы, в состав второй группы ($n = 10$) – с диагнозом послеродовой метрит. В результате отмечали достоверное снижение количества Т-супрессоров, установили анизоцитоз за счет макроцитов (+), пойкилоцитоз за счет эхиноцитов (+) и единичных акантоцитов, в то время как метарубрицитов – 3 на 100 клеток. При изучении морфологии лейкоцитов определили гиперсегментацию нейтрофилов (+) и токсические изменения за счет пенистости цитоплазмы. Определение концентрации цитокинов ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-2 и ИЛ-IFN β в сыворотке крови и содержимом влагалища проводили с применением наборов для иммуноферментного анализа (Cloud-Clone Corp, Китай). Воспалительный процесс, протекавший у коров с послеродовым метритом, подтвердил повышенную экспрессию интерлейкинов. Местная сосудистая реакция, необходимая для регенерации тканей, объясняется избыточной секрецией противовоспалительных цитокинов как естественного механизма защиты организма в ответ на повреждение. Уровень ИЛ-4 и ИЛ-8 в сыворотке крови и содержимом влагалища животных с диагностированным послеродовым метритом в сравнении с клинически здоровыми коровами оказался выше в 1,2 и 1,3 раза соответственно. Одновременно с этим экспрессия генов цитокинов ИЛ-2 и ИЛ-IFN β значительно снижалась как в сыворотке крови, так и в содержимом влагалища коров, больных послеродовым метритом.

Ключевые слова: высокопродуктивные коровы, послеродовой метрит, цитокины, сыворотка крови коров, содержимое влагалища коров, иммуноферментный анализ

Для цитирования: Авдеенко В.С., Никитин Г.С., Мороз А.И. Иммунореактивное состояние больных послеродовым метритом коров и уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов // Вестник КрасГАУ. 2025. № 4. С. 160–173. DOI: 10.36718/1819-4036-2025-4-160-173.

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда 23-26-00284.

Vladimir Semenovich Avdeenko^{1✉}, Georgy Sergeevich Nikitin², Alexandra Igorevna Moroz³

^{1,2,3}Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russia

¹avdeenko0106@mail.ru

²nikitin.g.s007@mail.ru

³sashamoroz.shuramoroz@mail.ru

IMMUNOREACTIVE STATUS OF COWS WITH POSTPARTUM METRITIS AND THE LEVEL OF EXPRESSION OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE GENES

The aim of research is to study the immunological status of healthy and sick cows with postpartum metritis in the blood serum and vaginal contents. The object of research is lactating cows in the postpartum period of the Holstein breed weighing 600–700 kg, 10,000–13,000 kg milk productivity for 305 days of lactation, belonging to the Detskoselsky breeding farm in the Leningrad Region. For the study, 20 newly calved animals were selected, which were then divided into two groups: the first group (n = 10) included clinically healthy cows, the second group (n = 10) – with a diagnosis of postpartum metritis. As a result, a reliable decrease in the number of T-suppressors was noted, anisocytosis due to macrocytes (+), poikilocytosis due to echinocytes (+) and single acanthocytes were established, while metarubricites were 3 per 100 cells. When studying the morphology of leukocytes, hypersegmentation of neutrophils (+) and toxic changes due to foaminess of the cytoplasm were determined. The concentration of IL-4, IL-8, IL-2 and IL-IFN β cytokines in the blood serum and vaginal contents was determined using enzyme immunoassay kits (Cloud-Clone Corp, China). The inflammatory process that occurred in cows with postpartum metritis confirmed the increased expression of interleukins. Local vascular reactions necessary for tissue regeneration are explained by excessive secretion of anti-inflammatory cytokines as a natural mechanism of the body's defense in response to damage. The level of IL-4 and IL-8 in the blood serum and vaginal contents of animals diagnosed with postpartum metritis compared to clinically healthy cows was 1.2 and 1.3 times higher, respectively. At the same time, the expression of IL-2 and IL-IFN β cytokine genes significantly decreased both in the blood serum and in the vaginal contents of cows with postpartum metritis.

Keywords: highly productive cows, postpartum metritis, cytokines, cow blood serum, cow vaginal contents, enzyme immunoassay

For citation: Avdeenko VS, Nikitin GS, Moroz AI. Immunoreactive status of cows with postpartum metritis and the level of expression of pro- and anti-inflammatory cytokine genes. *Bulletin of KSAU*. 2025;(4):160-173. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2025-4-160-173.

Acknowledgments: the study was supported by the Russian Science Foundation grant 23-26-00284.

Введение. Диагноз послеродовой метрит у молочных коров может быть поставлен в ранний период уже на 4–5-й день после отела и обычно определяется цитологическим путем с учетом количества нейтрофилов, когда доля гранулоцитов превышает 18 %. При ректальной пальпации или трансректальном ультразвуковом исследовании послеродовой метрит характеризуется растяжением матки, активно функционирующим желтым телом и закрытой шейкой матки. Однако важно помнить, что цервикальный канал не всегда бывает полностью закрыт, и в некоторых ситуациях возможно появление выделений во влагалищной полости. Сонографически, согласно публикациям P. Brodzki et al., 2015 [1], «...послеродовой метрит характеризуется активным желтым телом в яичнике,

накоплением смешанных лохий в полости рогов матки». Исследования С.А. Макавчик с соавт., опубликованные в 2024 г. [2], показали, что «...для выбора успешной схемы лечения, а также для количественной оценки степени тяжести заболевания, в равной мере, как и для измерения чувствительности и специфичности клинических критериев, имеется мало данных о взаимообусловленности послеродовых, эхографических и цитологических изменений». Тем не менее ни одна из вышеперечисленных процедур не позволяет быстро определить диагноз. Кроме того, по данным V. Bronzo et al. [3]: «У части животных заметна задержка инволюции матки или шейки матки, что связано с более низким уровнем фертильности». Использование клинических записей, таких как случаи мертво-

рождения, многоплодия, задержания последа, дистоции и гипокальциемии, действительно позволяет ветеринарным специалистам идентифицировать животных, находящихся в группе повышенного риска развития заболеваний матки, включая послеродовой метрит, однако важно отметить, что такие клинические данные хотя и информативны, но не представляют специфического диагноза.

Многочисленные исследования (P. Abeysinghe et al. [4]; В.С. Болотова и др. [5]), проведенные в последние годы, показали, что уровень выработки провоспалительных и противовоспалительных цитокинов может предоставить ценную информацию о тяжести заболевания у высокопродуктивного молочного скота в послеродовой период. Это также касается перехода состояния на системный уровень и прогнозирования эффективности лечебных протоколов, что имеет немаловажное значение для дифференциальной диагностики инфекционных и иммунопатологических процессов сразу после родов. В данном случае, как утверждает С.А. Макавчик с соавт. [6], важную предиктивную способность осуществляют цитокины – интерлейкин-1 (Ил-1), интерлейкин-6 (Ил-6) и интерлейкин-10 (Ил-10). Согласно исследованиям N. Naim et al. [7], среди сигнальных белков особенно выделяются интерлейкины, чаще всего ИЛ-1 α и ИЛ-1 β . Экспрессия интерлейкинов происходит как в процессе нормальной беременности, так и при различных патологических состояниях репродуктивного тракта. Исследования С. Peker et al. [8], показывают, что главная биологическая функция интерлейкина-10 (Ил-10) заключается в снижении воспалительного ответа. Избыточный воспалительный иммунный ответ может наносить вред тканям, и именно поэтому Ил-10 был признан ключевым супрессором иммунного ответа и воспалительной активности.

С.В. Шабунин с соавторами [9] подчеркивают, что в формировании иммунного ответа цитокины занимают первостепенное место, способствуя распознаванию антигенов, имеют схожую молекулярную массу и практически идентичный спектр биологической активности, наряду с этим они являются и конкурентами за связь с одними и теми же рецепторами основного комплекса гистосовместимости клеток иммунной системы. А В.И. Михалев и его соавторы особое внимание уделяют как способности цитокинов к активации перемещения нейтрофи-

лов, эозинофилов и моноцитов, так и их участие в регуляции различных воспалительных реакций, включая восстановление тканей после воспалительных реакций [10]. Про- и противовоспалительные цитокины, в качестве медиаторов иммунного ответа, оказывают влияние на метаболические процессы в слизистых слоях матки и влагалища коров. Они также определяют темпы развития воспалительных и деструктивных изменений в этих органах [11]. При воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта у скота после отела высокотехнологичные молочные предприятия гарантированно несут экономические и материальные убытки.

Многочисленными отечественными (С.А. Макавчик и др.) [12] и зарубежными исследователями (R.A. Saxton et al.) [13] установлено, что основное влияние на маточный эпителий оказывает микробный фактор, приводящий к вторичным морфофункциональным модификациям. Данные модификации касаются циклической биотрансформации слизистого слоя матки, вследствие этого анализ содержания про- и противовоспалительных цитокинов в биоматериале коров с послеродовым метритом позволит разработать критерии для прогнозирования, дифференциальной диагностики, а также осуществления мониторинга за процессом лечения и вероятными исходами патологического состояния. Цитокины («цитос» – клетка, «кинос» – движение) представляют собой широкую категорию интракринных, аутокринных, паракринных и эндокринных сигнальных агентов, которые регулируют врожденные и адаптивные иммунные реакции. Эти молекулы включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, факторы некроза опухоли и лимфокины. Известны различные неиммунные действия цитокинов, и в этом обзоре будет освещена эмбриокиновая активность этих цитокинов [5, 12]. Введен термин «эмбриокин» для описания молекул, вырабатываемых клетками в репродуктивной системе матери или эмбрионом, которые регулируют развитие эмбриона. Современная классификация цитокинов учитывает их строение, функциональную активность, происхождение, тип цитокиновых рецепторов. Цитокины с учетом их биологической активности принято разделять на следующие группы: как регуляторы воспалительных реакций (провоспалительные и противовоспалительные цитокины) и иммунного ответа (клеточного и гуморального) и многие другие

процессы, в которых участвуют цитокины [6]. В эти группы входят интерлейкины (ИЛ), интерфероны (ИФН), факторы некроза опухоли (ФНО), трансформирующие факторы роста (ТФР), миграционные ингибирующие факторы и более мелкие хемокины.

Система цитокинов включает клетки-продуценты; растворимые цитокины и их антогонисты; клетки-мишени и их рецепторы. В последние годы описана популяция Th 3, которая вырабатывает трансформирующий фактор роста β (ТФР β) и супрессирует функцию как Th 1, так и Th 2. Семейство цитокинов IL-1 может оказывать провоспалительное или противовоспалительное действие, наиболее изученными при беременности коров являются IL-1 α и IL-1 β , которые экспрессируются при нормальной беременности и патологии [13]. Провоспалительные цитокины, в частности IL-1 α , преобладают на этапе имплантации бластоцисты, что обусловлено локальной активацией медиаторов воспаления в ответ на ее внедрение. Первым в защитную реакцию организма при действии патогенных факторов включается IL-1 β . Этот цитокин с широким спектром действия играет ключевую роль в развитии неспецифической защиты и специфического иммунитета. IL-1 β инициирует и регулирует воспалительные и иммунные процессы, активирует нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты, стимулирует синтез белков острой фазы и других цитокинов. Антогонистом IL-1 β является IL-10, который продуцируется клетками Th-2, IL-10, является противовоспалительным цитокином. Именно соотношение уровней этих цитокинов, а не их абсолютные значения, наиболее полно отражает направленность иммунной реакции и активность воспаления и может быть использовано в качестве критерия определения степени тяжести воспаления.

Считается, что чем больше величина соотношения IL-1 β / IL-10, тем более тяжелым является течение воспалительного процесса [14]. Интерлейкин-6 имеет прогностическую ценность при раннем воспалении, но многие ветеринарные врачи предпочитают сочетание клинической картины, анализа лейкоцитов, уровня СРБ и контроля температуры вместо дорогостоящего определения IL-6. Другим действием IL-6 является преимущественное стимулирование линии примитивных клеток эндодермы (РЕ) в бластоцистах IVP крупного рогатого скота. Количество РЕ-клеток постепенно снижается по

мере старения бластоцисты *in vitro* с 8-го по 10-й день после оплодотворения, но добавление IL-6 увеличивает количество РЕ-клеток в течение этого периода времени. Неясно, улучшает ли IL-6 пролиферацию РЕ-клеток или ограничивает их апоптоз. Нельзя оставить без внимания и тот факт, что действие IL-6 на эмбрион зарегистрировано не только у крупного рогатого скота, но и у других биологических видов [10, 15]. Интерлейкин-8 представляет собой цитокин репродуктивной функции, который является медиатором развития фолликулов, овуляции и формирования желтого тела. Впервые был описан в качестве хемоаттрактанта для гранулоцитов, прежде всего нейтрофилов *in vivo*. Каждая клетка с TLR может продуцировать и секретировать IL-8, включая макрофаги и гладкомышечные клетки, тогда как эндотелиальные клетки накапливают IL-8 в везикулах [2]. IL-8 направляет и активирует нейтрофилы в направлении воспаления (хемотаксис), что проявляется в увеличении концентрации этого цитокина. Основная биологическая функция IL-10 заключается в уменьшении воспалительного ответа, поскольку чрезмерный иммунный ответ может приводить к повреждению тканей. IL-10 принимает участие в регуляции цитокинов и ингибирует избыточный синтез макрофагами и Т-хелперами 1-го типа провоспалительных цитокинов – IL-1 β . IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор некроза опухоли – альфа (ФНО α), интерферон гамма (ИФН γ). Одновременно повышает активность Т-хелперов 2-го типа и их продукцию цитокинов, т. е. вызывает изменения иммунного ответа с клеточного на гуморальный. Также индуцируются процессы пролиферации и дифференцировки клеток в плазмочиты, что запускает продукцию антител. Еще IL-10 стимулирует выработку иммуноглобулинов Е, участвующих в развитии аллергических реакций и антипаразитарной защите [15]. Побочным эффектом избыточного синтеза IL-10 и других противовоспалительных цитокинов может быть развитие хронического воспаления и инфекций вследствие неспособности иммунных механизмов полностью подавлять воспаление.

При сепсисе высокие концентрации IL-10 связаны с неблагоприятным исходом. Биологическое воздействие интерлейкина-10 на клетки врожденного иммунитета подавляет высвобождение

дение иммунных медиаторов, экспрессию антигена и фагоцитоз [16]. Фактор некроза опухоли (*TNF- α*), кахексин, как многофункциональный провоспалительный цитокин, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами. Получил свое название из-за способности ингибировать рост некоторых опухолей, кроме того, через свои рецепторы вызывает апоптоз, а также является одним из важных факторов защиты от внутриклеточных микроорганизмов, в т. ч. и вирусов. Фактор некроза опухоли (*TNF- β*), лимфотоксин, секретируют Т- и В-лимфоциты, подавляет выработку провоспалительных цитокинов, повреждает клетки, вызывая апоптоз. Цитокины оказывают влияние на многие биологические процессы: эмбриональное развитие, патогенез болезней, неспецифический и специфический иммунный ответ, изменения когнитивных функций, а также участвуют в эффективности вакцин. Следует отметить, что соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов во время беременности изменяется, а также они регулируют практически все этапы гестационного процесса: имплантацию blastocysts, рост плаценты и плода, продукцию гормонов, апоптоз клеток, созревание шейки матки и механизмов родов. Таким образом, цитокины являются неспецифическими факторами, поэтому диагностика инфекционных, аутоиммунных болезней с помощью определения уровня цитокинов невозможна. Тем не менее изучение цитокинового профиля позволяет получить информацию о тяжести воспалительного процесса, его переходе на системный уровень и прогнозе, что важно при дифференциальной диагностике ряда инфекционных и иммунопатологических процессов.

Цель исследований – изучить иммунологический статус у здоровых и больных послеродовым метритом коров в сыворотке крови и содержимом влагалища.

Объекты и методы. Объектом исследований служили принадлежащие АО племзавод «Детскосельский» Ленинградской области лактирующие коровы голштинской породы в послеродовом периоде, массой 600–700 кг, 10 000–13 000 кг молочной продуктивности за 305 дней лактации. Ультразвуковые исследования проводились с использованием беспроводного ультразвукового сканера Easi-Scan: Go, который обеспечивает сканирование на глубинах 8; 12; 16 и 24 см при угле обзора 60°, а также аппара-

та EchoPad Mini, способного сканировать на глубине до 15 см и частоте до 10 МГц, с возможностью оцифровки объема и измерения толщины стенок рогов матки. В ходе ультразвукового обследования матки животных акцентировалось внимание на таких параметрах, как диаметр шейки матки и рогов, состояние их полостей, а также уровень эхогенности эндометрия и маточных рогов. Диспансеризации подлежало 140 лактирующих коров. В вакуумные пробирки Vacuette™ (Австрия) пробы крови брали утром до кормления из яремной вены. Для общего анализа крови был задействован гематологический анализатор Mindrey BC-2800 Vet (Китай). В исследовании [7] был выполнен НСТ-тест с использованием нитросинего тетразолия в крови. Относительное количество Т-лимфоцитов (%) оценивалось путем подсчета розеток, образованных лимфоцитами с эритроцитами барана при различных условиях инкубации, в то время как количество В-лимфоцитов определялось на основании подсчета розеток с эритроцитами мыши. Абсолютное число Т- и В-лимфоцитов (кл/мм³) и коэффициент соотношения «индукторов-хелперов» к «киллерам-супрессорам» (%) вычислялись расчетным способом. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) определялись методом, основанным на селективной преципитации антиген-антитело комплексов, с применением 3,75 %-го раствора полиэтиленгликоля М-6000 (ПЭГ), после чего проводилось фотометрическое измерение плотности преципитата при длине волны 450 нм.

Для исследования отобрали 20 новотельных коров, которые в дальнейшем были разделены на две группы согласно принципу аналогов. В состав первой группы (n = 10) вошли клинически здоровые коровы, а в состав второй группы (n = 10) – коровы с послеродовым метритом. Образцы из влагалища и крови подвергались центрифугированию при 1000×g в течение 20 мин, после чего замораживались при –20 °С и хранились при –70 °С до анализа на наличие цитокинов. Были отобраны пробы крови и влагалищного содержимого для определения уровней цитокинов интерлейкин-4 (ИЛ-4), интерлейкин-8 (ИЛ-8), интерлейкин-2 (ИЛ-2) и интерферона бета (ИЛ-IFN β) с использованием наборов для ИФА китайской компании Cloud-Clone Corp. Для оценки результатов использовался фотометрический микропланшетный ридер, длина волны 450 нм (Multiscan FC, Thermo Scientific,

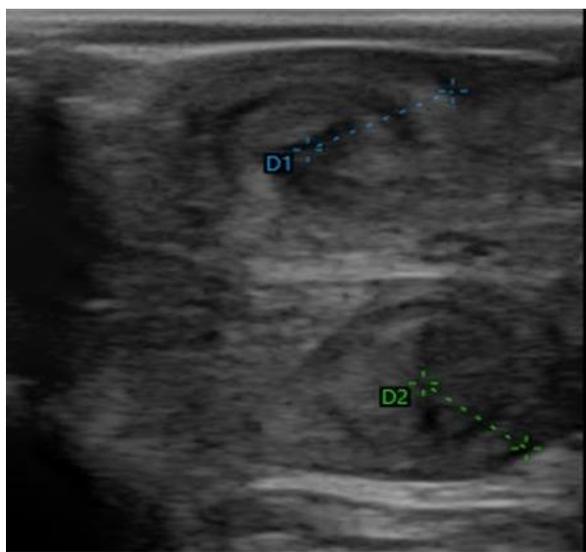
США). Статистический анализ данных был произведен с использованием программы CurveExpert Basic.

Для расчета чувствительности результатов среди коров использовалась следующая формула: $Se = x / (x + y) \cdot 100 \%$, где x обозначает количество больных коров. Специфичность отрицательных результатов среди коров с метритом рассчитывалась по формуле $Sp = b / (b + z) \cdot 100 \%$, где z – количество больных коров с положительным результатом в той же подгруппе. Полученная информация была систематизирована и обработана с помощью программы Statistica 6.0 (Statsoft Inc., США), а также программного обеспечения MS Excel и SPSS 10.0.5.

Результаты и их обсуждение. Полевые исследования показали, что на высокотехнологических молочных предприятиях частота метрита составляла 53 % на 4–7-й день после родов.

Послеродовой метрит наблюдается после оказания помощи при родах, а также в результате дистоции, задержания последа и апикального пролапса матки, а также после родильного пареза. Ректальная пальпация и эхография (рис. 1) анатомических структур матки у коров с послеродовыми метритами на 4–7-й день после отела выявляют значительное увеличение полости бывшего рога-плодовместилища, которая по сравнению с аналогичными показателями у здоровых животных в 2,34 раза больше.

Анализ эхограмм (рис. 2), полученных от коров с послеродовым метритом, показал, что в роге-плодовместилище матки имеется выраженная полость, размеры которой в 1,9 раза ($p < 0,01$) превышают показатели, зафиксированные у клинически здоровых животных в тот же период исследования.



А



Б

Рис. 1. Эхографическая картина рога матки здоровой коровы (А), шейки матки здоровой коровы (Б) (сканер EchoPad Mini)

Echographic picture of the uterine horn of a healthy cow (A), the cervix of a healthy cow (B) (EchoPad Mini scanner)

Средняя толщина стенки матки у коров с диагнозом послеродовой метрит достигала ($24,23 \pm 0,32$) мм, что свидетельствует об увеличении в 1,37 раза по сравнению с таковой у здоровых животных. Мышечный слой имеет увеличенную толщину, средний уровень эхогенности и однородную мелкозернистую структуру. Средняя толщина стенки шейки матки при наличии метрита составила ($28,2 \pm 0,6$) мм, что

является увеличением на 35,1 % ($p < 0,01$) по сравнению с показателями у здоровых коров аналогичного срока исследования. Разбор и интерпретация эхограмм, выполненных у коров с послеродовым метритом, показали: более чем в половине случаев состояние внутреннего слоя матки не соответствовало норме. Области повышенной эхогенности различной величины были отмечены в 49,2 % случаев. Гиперэхоген-

ные изменения в базальном слое эндометрия, такие как очаги фиброза и кальциноза, фиксировались в среднем в 23,4 % случаев. Варикозное расширение вен параметрия было зарегистрировано в 50,5 % случаев. Также отмечался гипозоногенный контур матки, как в изоляции, так

и в сочетании с варикозным расширением вен параметрия, был отмечен в 60,8 % случаев; истончение эндометрия наблюдалось в 56,7 % случаев. Характеристика лимфоцитарного индекса представлена на рисунке 3.

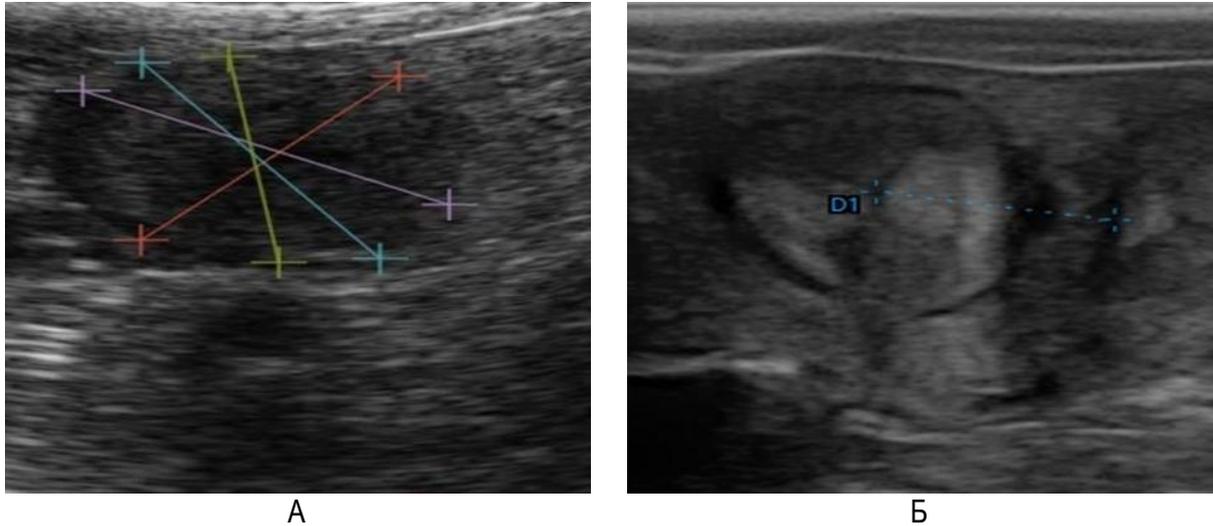


Рис. 2. Эхографическая картина шейки матки (А), рога матки (Б) больной послеродовым метритом коровы (диаметр рога, Easi-Scan: Go.)

Echographic picture of the cervix (А), horns of the uterus (Б) of a sick cow with postpartum metritis (horn diameter, Easi-Scan: Go.)

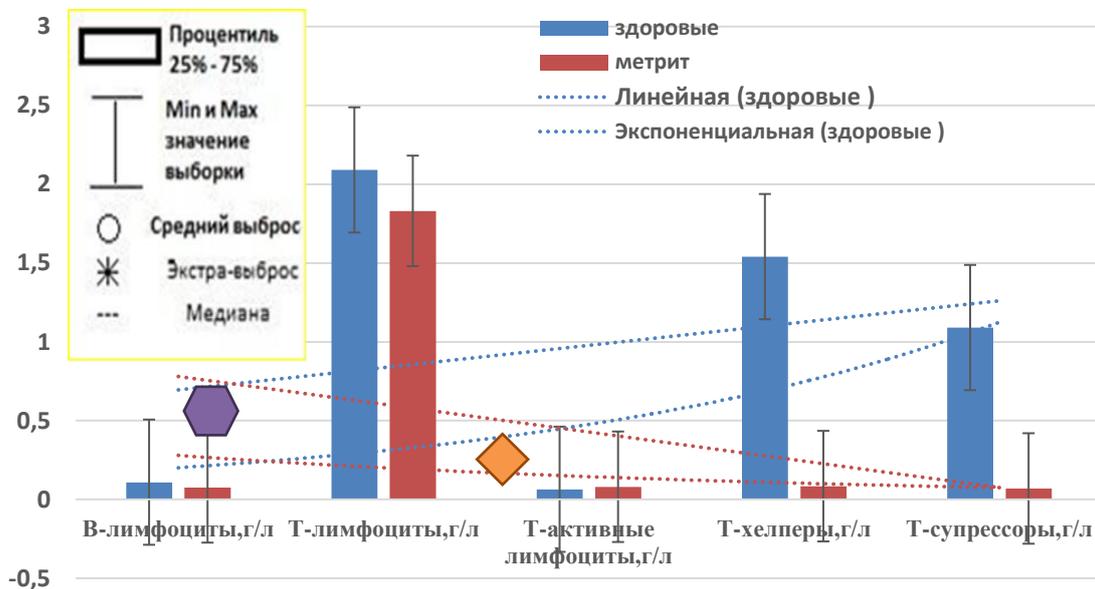


Рис. 3. Лимфоцитарный индекс у здоровых коров после отела и с осложнением послеродовым метритом

Lymphocytic index in healthy cows after calving and with postpartum metritis complication

Медианное содержание лейкоцитов составляет $(7,32 \pm 0,86) \cdot 10^9/L$. Установлено достоверное снижение количества Т-супрессоров на 30,9 % ($p < 0,001$) у больных коров с диагнозом послеродовой метрит. У больных метритом коров понизилось в три раза количество НСТ-клеток ($p < 0,001$) с одновременным снижением иммунореактивного индекса (ИРИ) (рис. 4). Снижение активности нейтрофилов, которые обычно участвуют в клеточной адаптации, указывает на аутоиммунный характер перестройки, возникающей на фоне гиперсинтеза эмбриотропных аутоантител в 54,4 % случаев. Данное наблюдение указывает не только на рост специфического иммунитета, но и на потенциальную активацию аутоантител посредством пролифе-

ративных процессов в матке после родов. Такие изменения могут способствовать развитию воспалительных процессов и нарушению нормального заживления, что необходимо учитывать при диагностике и лечении послеродового метрита. У коров исследуемых групп в крови количество крупных ЦИК (С4) понизилось на 67,2 % ($p < 0,001$), средних (С3) – на 40,1 % ($p < 0,01$), тогда как мелких ЦИК, напротив, увеличилось на 52,4 % ($p < 0,001$) по сравнению с показателями больных послеродовым метритом животных.

Очевидно, что функциональная дисфункция лимфоцитов шестого типа сыграла значительную роль в устойчивом сохранении внутриклеточных патогенов (рис. 5).

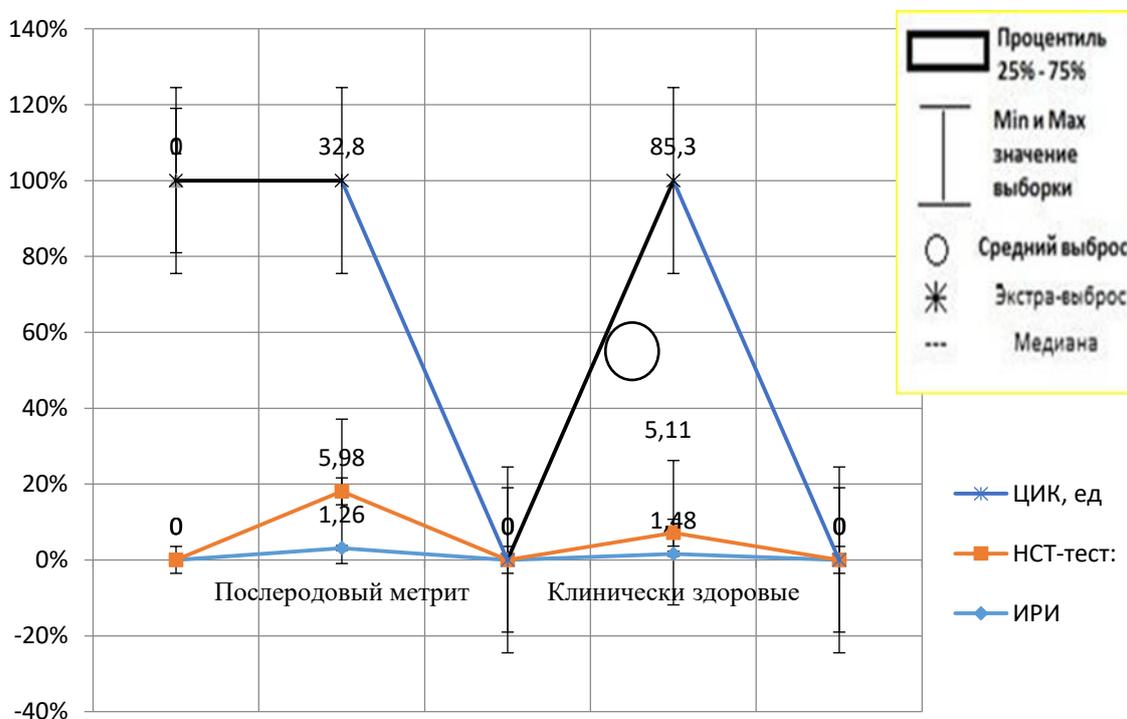


Рис. 4. Иммунореактивный индекс, НТС и ЦИК клеточных компонентов гомеостаза у здоровых коров и с осложнением послеродовым метритом

Immunoreactive index, NTS, and CEC of cellular components of meostasis in healthy cows and with complications of postpartum metritis

В условиях, характерных для данной группы, наблюдается избыточная продукция эмбриотропных аутоантител в сочетании с ограниченной способностью организма к санации. Сопос-

тавительная оценка клеток, обнаруженных во влагалищной слизи коров при цитологическом исследовании, представлена в таблице 1.

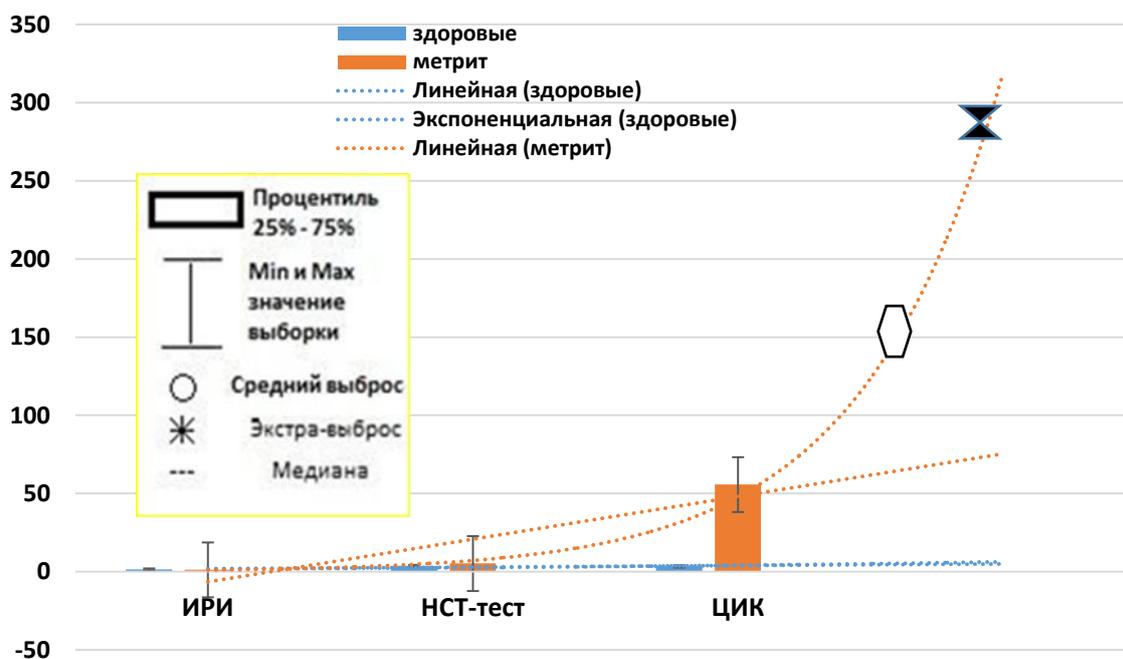


Рис. 5. Иммунологический индекс, экспоненциально прогнозирующий состояние репродуктивной системы после отела

The immunological index exponentially predicts the state of the reproductive system after calving

Таблица 1

Сопоставительная оценка клеточного состава больных и клинических здоровых коров (в поле зрения микроскопа), 10⁹/л
Comparative assessment cellular structure sick and clinically healthy cows (in sight microscope), 10⁹/l

Показатель	Нейтрофилы П	Нейтрофилы С	Лимфоциты	Макрофаги
Послеродовый метрит	4,35±0,01**	42,0±2,0***	11,31±0,33***	12,303±0,11**
Клинически здоровые	1,0±0,01**	8,0±1,41	0,1±0,01	3,0±0,01

Здесь и далее: *p≤0,05; **p≤0,01; *** p≤0,001.

Такой сценарий развития аутоиммунных реакций действительно указывает на способность вредоносных факторов «выходить» за рамки контроля со стороны иммунной системы, что в свою очередь приводит к постоянной адаптационной неустойчивости в послеродовом периоде, связанной с инволюционными процессами в матке и яичниках. Данные наблюдения подтверждают концепцию мультифакторности в происхождении инфекционных или реактивных патологических процессов.

В эндометрии у 67,8 % коров фиксировалось развитие аутоиммунной ситуации, когда становилось недостаточно энергии клеток для реге-

нерации и ремоделирования матки после прошедшей беременности и завершившихся родов.

Результаты определения уровней цитокинов, таких как Ил-4 и Ил-8, в сыворотке крови и в содержимом влагалища больных послеродовым метритом и здоровых коров отражены в таблице 2.

Концентрация интерлейкина IL-8 составила (40,37 ± 0,08) пг/мл в влагалищном содержимом и (29,92 ± 0,05) пг/мл в сыворотке крови коров с послеродовым метритом (p < 0,05). Значения превышают показатели у здоровых животных в 1,3 раза. Уровень экспрессии IL-4 в сыворотке крови здоровых животных оказался в 1,2 раза ниже, чем у больных коров. Во влагалищном со-

держимом уровень экспрессии интерлейкина-4 у здоровых особей оказался в 1,39 раза меньше, чем у коров с послеродовым метритом. Полученные нами данные подтверждают выводы, сделанные в работе В.С. Болотовой и др. (2023) [5], в которой было установлено, что экспрессия цитокина IL-8 в сыворотке крови клинически

здоровых животных была ниже в 1,92 раза ($p < 0,05$) по сравнению с больными животными. Аналогично при исследовании сыворотки крови коров было замечено, что уровень цитокинов IL-4 у клинически здоровых животных также ниже, чем у животных с послеродовым метритом.

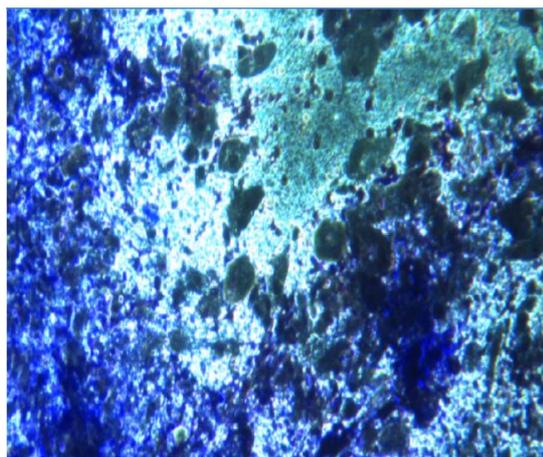
Таблица 2

Концентрация Ил-4 и Ил-8 в сыворотке крови и содержимом влагалища клинически здоровых и больных коров, пг/мл
Concentration of Il-4 and Il-8 in blood serum and vaginal contents of clinically healthy and sick cows, pg/ml

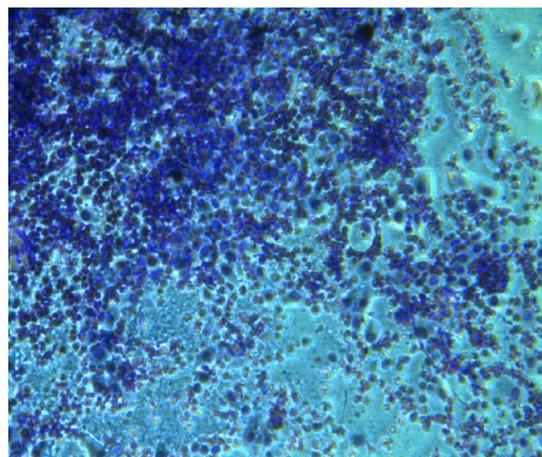
Показатель	Группа животных	
	клинически здоровых коров (n = 10) (контрольная)	больные послеродовым метритом коровы (n = 10) (подопытная)
Сыворотка крови:		
Ил-8	26,22 ± 0,21	48,32 ± 0,05 пг/мл**
Ил-4	138,20 ± 0,40	166,83 ± 0,13 пг/мл**
Содержимое влагалища:		
Ил-8	29,92 ± 0,05	40,37 ± 0,08 пг/мл**
Ил-4	117,13 ± 0,11	151,55 ± 0,09 пг/мл***

В исследованных цитограммах коров с послеродовым метритом содержалось большое количество клеток базального и парабазального ряда, что является признаком активации процессов регенерации эпителия. В некоторых образцах также встречались безъядерные чешуйчатые

клетки, что свидетельствует о десквамации клеток. Во многих цитопрепаратах была выявлена умеренно выраженная вакуолизация цитоплазмы клеток и лейкоцитарная инфильтрация (рис. 6), что указывает на метаболические изменения или на воспалительную реакцию.



1



2

Рис. 6. Цитограмма мазка-отпечатка на 4–7-й день после отела с наружного устья шейки матки (1) и влагалища (2) у коров с послеродовым метритом

Cytogram of a smear print on the 4th–7th day after calving from the external mouth of the cervix (1) and vagina (2) in cows with postpartum metritis

Данные, полученные в ходе нашего исследования, согласуются с результатами работ S. Makavchik et al. (2019) и R.A. Saxton et al. (2021) [13, 14], что подтверждает значимость цитокинов как маркеров состояния иммунной системы и их потенциальную роль в патогенезе послеродовых заболеваний.

Заключение. У больных животных было выявлено снижение числа Т-супрессоров на 30,9 %. Анализ результатов НСТ-теста у коров с метритом выявил трехкратное сокращение числа НСТ-клеток, что сопровождалось уменьшением иммунореактивного индекса (ИРИ). Супрессия лейкоцитов происходит за счет снижения их кислородзависимой активности, что подтверждается полученными результатами спонтанного НСТ-теста, поскольку неактивированные фагоциты менее подготовлены к уничтожению бактерий даже при наличии антигенной стимуляции. Более того, у представителей данной группы животных чаще регистрировались случаи послеродового метрита, провоцируемого остатками плаценты в полости матки. Количество крупных (С4) циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у больных коров с послеродовым метритом понизилось на 67,2 %, средних (С3) – на 40,1 %, а мелких ЦИК, напротив, увеличилось на 52,4 %. Установлен анизоцитоз за счет макроцитов (+), пойкилоцитоз за счет эхиноцитов (+) и единичных акантоцитов, в то время как метарубрицитов – 4 %. При изучении морфологии лейкоцитов определили гиперсегментацию нейтрофилов (+) и токсические изменения за счет пенистости цитоплазмы. В ранний послеродовой период развитие метрита у коров сопровождается дисбалансом между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами. В свою очередь, воспалительный процесс, местная сосудистая реакция, необходимая для регенерации тканей, сопровождается избыточной секрецией противовоспалительных цитокинов как естественного механизма защиты организма в ответ на повреждение чужеродного агента. Иммуноферментный анализ (ИФА) представляет собой чувствительный анализ, в котором используются первичные и вторичные антитела, специфичные к интересующим бел-

кам, включая цитокины [10], который позволяет измерить концентрацию высвобождаемых цитокинов. По данным исследований [11], большинство цитокинов обычно присутствуют на низких уровнях (пикограмм/мл) в сыворотке или плазме *in vivo* и имеют диапазон активности от низких пг/мл до нг/мл, поэтому эти анализы должны быть достаточно чувствительными для количественного определения этих низких уровней. Уровни цитокинов, измеренные иммуноферментным методом, могут быть неинформативными из-за присутствия растворимых рецепторов для цитокинов. В этих случаях специфическое взаимодействие цитокина с рецептором ведет к кажущемуся исчезновению его из крови. Циркулирующие аутоантитела к цитокинам являются ингибиторами, которые присутствуют в сыворотке животных, получавших цитокиновую терапию [12, 17]. Определение экспрессии генов цитокинов в клетках по накоплению мРНК – еще один подход к оценке их синтеза. Измеряются мРНК цитокинов на молекулярном уровне, когда необходимый продукт (мРНК) искусственно амплифицируется после преобразования в копию ДНК (кДНК). Хотя метод имеет ряд преимуществ, таких как его количественная особенность и отсутствие необходимости в специфических антителах, он не дает информации о реальных концентрациях цитокинов, которые вырабатываются и высвобождаются во внеклеточную среду. Показано, что для некоторых цитокинов уровни мРНК не связаны напрямую с уровнями активных цитокинов. Например, фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) сначала вырабатывается в неактивной форме в виде трансмембранного белка и только после расщепления он высвобождается во внеклеточную среду в своей биологически активной форме.

Таким образом, измерение уровня цитокинов в биологических жидкостях позволяет оценить их уровень в норме и при патологии. Для получения более полной информации о содержании цитокинов в тканях необходимо использовать комбинацию методов, позволяющих оценить как экспрессию мРНК, так и синтез данного цитокина в клетке.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Brodzki P., Kostro K., Krakowski L., et al. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period // *Vet Res Commun*. 2015. Vol. 39, № 2. P. 143–149. DOI: 10.1007/s11259-015-9635-4. PMID: 25846950. PMID: PMC4427656.
2. Макавчик С.А., Авдеенко В.С., Моисеева К.А., et al. Цитокины как эмбриокины и их биологическая роль в практике // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2024 № 7. С. 34–40. DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202408005.
3. Bronzo V., Lopreiato V., Riva F., et al. The Role of Innate Immune Response and Microbiome in Resilience of Dairy Cattle to Disease: The Mastitis Model // *Animals*. 2020. № 10. P. 1397. DOI: 10.3390/ani10081397. EDN: MLZXBV.
4. Abeysinghe P., Turner N., Mosaad E., et al. Dynamics of inflammatory cytokine expression in bovine endometrial cells exposed to cow blood plasma small extracellular vesicles (sEV) may reflect high fertility // *Sci Rep*. 2023. № 13. P. 5425. DOI: 10.1038/s41598-023-32045-1. EDN: EVVHLV.
5. Болотова В.С., Пасько Н.В., Михалев В.И. Уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов крови коров, больных хроническим эндометритом // *Международный вестник ветеринарии*. 2023. № 1. С. 175–180. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.1.175. EDN: СТТСКQ.
6. Макавчик С.А., Авдеенко В.С., Моисеева К.А., и др. Лабораторные методы оценки функционирования цитокинов в ветеринарной практике // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2024. № 4. С. 34–40. DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202404004.
7. Naim N., Amrit F.R.G., McClendon T.B., et al. The molecular tug of war between immunity and fertility: Emergence of conserved signaling pathways and regulatory mechanisms // *Bioessays*. 2020. № 42 (12). e2000103. DOI: 10.1002/bies.20200103. EDN: TQLLAU.
8. Peker C., Musal B. Assessment of inflammatory cytokine concentrations during diagnosis and after treatment of postpartum dairy cows with clinical and subclinical endometritis // *Large Animal Review (LAR)*. 2022. Vol. 28, No 5. P. 213–220.
9. Шабунин С.В., Востроилова Г.А., Григорьева Н.А., et al. Интерфероны- α и - γ в клинической ветеринарной практике при профилактике и лечении инфекционных заболеваний у крупного рогатого скота и свиней (обзор) // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2022. Т. 23, № 1. С. 16–35. DOI: 10.30766/2072-9081.2022.23.1.16-35. EDN: VRTZSZ.
10. Михалев В.И., Чусова Г.Г. Оценка возможности использования показателей свертывающей системы крови коров для прогнозирования позднего токсикоза беременных // *Международный вестник ветеринарии*. 2023. № 4. С. 396–403. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.4.396. EDN: HCKYOT.
11. Герунов Т.В., Герунова Л.К., Плешакова В.И., и др. Оппортунистические инфекции у животных: причины распространения и меры профилактики // *Вестник КрасГАУ*. 2022. № 10 (187). С. 152–160. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-10-152-160. EDN: IGFOGE.
12. Макавчик С.А., Авдеенко В.С., Павлова В.С. Интерлейкин-6 как биомаркер клинических и субклинических стрептококковых маститов крупного рогатого скота // *Международный вестник ветеринарии*. 2024. № 3. С. 13–19. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.13. EDN: TNTHTP.
13. Saxton R.A., Tsutsumi N., Su L.L., et al. Structure-based decoupling of the pro-and anti-inflammatory functions of interleukin-10 // *Science*. 2021. № 371 (6535). eabc8433. DOI: 10.1126/science.abc8433. EDN: DMBCOG.
14. Makavchik S., Sukhinin A., Danko Y., et al. Results of vaginal samples in cows in the post-partum period // *Reproduction in Domestic Animals*. 2019. V. 54, № S3. P. 98. EDN: FHINXK.
15. Abeysinghe P., Turner N., Mosaad E. et al. Dynamics of inflammatory cytokine expression in bovine endometrial cells exposed to cow blood plasma small extracellular vesicles (sEV) may reflect high fertility // *Sci Rep*. 2023. № 13. P. 5425. DOI: 10.1038/s41598-023-32045-1. EDN: EVVHLV.

16. Naim N., Amrit F.R.G., McClendon T.B., et al. The molecular tug of war between immunity and fertility: Emergence of conserved signaling pathways and regulatory mechanisms // *Bioessays*. 2020. Vol. 42 (12). e2000103. DOI: 10.1002/bies.202000103(2020). EDN: TQLLAU.
17. Мороз А.И., Авдеенко В.С., Ахмадов В.Т. Выявление прогностических маркеров для диагностики клинического метрита у коров в послеродовой период // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2024. № 4 (64). С. 32–36. DOI: 10.24412/2074-5036-2024-464-32-36. EDN: ALQALK.

References

1. Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, et al. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Vet Res Commun*. 2015;39(2):143-149. DOI: 10.1007/s11259-015-9635-4. EDN: HMQMXR. PMID: 25846950. PMCID: PMC4427656.
2. Makavchik SA, Avdeenko VS, Moiseeva KA. Laboratory methods for evaluating the functioning of cytokines in veterinary practice. *Veterinariya, Zootekhnika i Biotekhnologiya*. 2024;(7):34-40. (In Russ.). DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202408005. EDN: RBDRLV.
3. Bronzo V, Lopreiato V, Riva F, et al. The role of innate immune response and microbiome in resilience of dairy cattle to disease: the mastitis model. *Animals*. 2020;(10):1397. DOI: 10.3390/ani10081397. EDN: MLZXBV.
4. Abeysinghe P, Turner N, Mosaad E, et al. Dynamics of inflammatory cytokine expression in bovine endometrial cells exposed to cow blood plasma small extracellular vesicles (sEV) may reflect high fertility. *Sci Rep*. 2023;(13):5425. DOI: 10.1038/s41598-023-32045-1. EDN: EVVHLV.
5. Bolotova VS, Pasko NV, Mikhalev VI. Level of gene expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in the blood of cows with chronic endometritis. *International Journal of Veterinary Medicine*. 2023;(1):175-180. (In Russ.). DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.1.175. EDN: CTTCKQ.
6. Makavchik SA, Avdeenko VS, Moiseeva KA, et al. Laboratory methods for evaluating the functioning of cytokines in veterinary practice. *Veterinariya, Zootekhnika i Biotekhnologiya*. 2024;(4):34-40. (In Russ.). DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202404004. EDN: RBDRLV.
7. Naim N, Amrit FRG, McClendon TB, et al. The molecular tug of war between immunity and fertility: Emergence of conserved signaling pathways and regulatory mechanisms. *Bioessays*. 2020;42(12): e2000103. DOI: 10.1002/bies.202000103. EDN: TQLLAU.
8. Peker C, Musal B. Assessment of inflammatory cytokine concentrations during diagnosis and after treatment of postpartum dairy cows with clinical and subclinical endometritis. *Large Animal Review (LAR)*. 2022;28(5):213-220.
9. Shabunin SV, Vostroilova GA, Grigoryeva NA, et al. Interferons- α and - γ in clinical veterinary practice in the prevention and treatment of infectious diseases in cattle and pigs (review). *Agricultural Science Euro-North-East*. 2022;23(1):16-35. (In Russ.). DOI: 10.30766/2072-9081.2022.23.1.16-35. EDN: VRTZSZ.
10. Mikhalev VI, Chusova GG. Evaluation of the possibility of using indicators of the blood coagulation system of cows to predict late toxicosis of pregnant women. *International Journal of Veterinary Medicine*. 2023;(4):396-402. (In Russ.). DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.4.396. EDN: HCKYOT.
11. Gerunov TV, Gerunova LK, Pleshakova VI, et al. Opportunistic infections in animals: spread causes and preventive measures. *Bulletin KSAU*. 2022;(10):152-160. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-10-152-160. EDN: IGFOGE.
12. Makavchik SA, Avdeenko VS, Pavlova VS. Interleukin-6 as a biomarker of clinical and subclinical streptococcal mastitis in cattle. *International Journal of Veterinary Medicine*. 2024;(3):13-19. (In Russ.). DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.13. EDN: TNTHTP.
13. Saxton RA, Tsutsumi N, Su LL, et al. Structure-based decoupling of the pro-and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science*. 2021;371(6535):eabc8433. DOI: 10.1126/science.abc8433. EDN: DMBCOG.

14. Makavchik S, Sukhinin A, Danko Y, et al. Results of vaginal samples in cows in the post-partum period. *Reproduction in Domestic Animals*. 2019;54(S3):98. EDN: FHINXK.
15. Abeysinghe P, Turner N, Mosaad E, et al. Dynamics of inflammatory cytokine expression in bovine endometrial cells exposed to cow blood plasma small extracellular vesicles (sEV) may reflect high fertility. *Sci Rep*. 2023;(13):5425. DOI: 10.1038/s41598-023-32045-1. EDN: EVVHLV.
16. Naim N, Amrit FRG, McClendon TB, et al. The molecular tug of war between immunity and fertility: Emergence of conserved signaling pathways and regulatory mechanisms. *Bioessays*. 2020;42(12):e2000103. DOI: 10.1002/bies.202000103(2020). EDN: TQLLAU.
17. Moroz AI, Avdeenko VS, Akhmadov VT. Identification of prognostic markers for the diagnosis of clinical metritis in cows in the postpartum period. *Actual questions of veterinary biology*. 2024;(4):32-36. DOI: 10.24412/2074-5036-2024-464-32-36. EDN: ALQALK.

Статья принята к публикации 06.03.2025 / The article accepted for publication 06.03.2025.

Информация об авторах:

Владимир Семенович Авдеенко¹, профессор кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий, доктор ветеринарных наук, профессор

Георгий Сергеевич Никитин², доцент кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий, кандидат ветеринарных наук, доцент

Александра Игоревна Мороз³, аспирант кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий

Information about the authors:

Vladimir Semenovich Avdeenko¹, Professor at the Department of Genetic and Reproductive Biotechnology, Doctor of Veterinary Sciences, Professor

Georgy Sergeevich Nikitin², Associate Professor at the Department of Genetic and Reproductive Biotechnology, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor

Alexandra Igorevna Moroz³, Postgraduate student at the Department of Genetic and Reproductive Biotechnology

