

ИММУНОДЕФИЦИТ И ДИСБИОЗ ВЛАГАЛИЩА В ПРОЯВЛЕНИИ ВНУТРИУТРОБНОЙ ЗАДЕРЖКИ РАЗВИТИЯ И СМЕРТИ ЭМБРИОНА У КОРОВ

Елена Геннадьевна Лозовая

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии

Рассматривается состояние иммунологического статуса и вагинального микробиоценоза влагалища коров при физиологическом формировании эмбриона, задержке его развития и гибели. Объектом исследования были коровы красно-пестрой и чёрно-пестрой голштинской пород со среднегодовой продуктивностью 6,0–7,6 тыс. кг. На 19-23, 28-32, 38-45 и 60-65-й дни после осеменения животных подвергали трансректальному эхографическому обследованию для оценки состояния матки, яичников и метрических показателей формирующегося эмбриона. Одновременно от них получали венозную кровь и влагалищно-цервикальную слизь. В крови определяли содержание лейкоцитов, показатели лейкограммы и фагоцитарной реакции, содержание иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов, бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови, а в вагинальной слизи – общую бактериальную обсемененность, наличие и показатели титра энтеро-, лакто- и бифидобактерий, а также грибов. Полученные данные подвергали статистической обработке. Установлено, что у коров, предрасположенных к задержке развития и особенно гибели зародышей, на всех сроках ранней гестации регистрируется стимуляция лейкопоэза, моноцитоза, эозинофилии и повышенная концентрация в крови циркулирующих иммунных комплексов, отражающих высокую реакцию организма на воздействие антигенов зародыша и эндогенных токсинов организма матери. Отмечено угнетение клеточных и гуморальных факторов естественной резистентности, что свидетельствует о присутствии иммунодефицита и пониженных адаптационных возможностях животных к формированию беременности. Выявлено уменьшение в микробиоте влагалища нормофлоры и увеличение условно-патогенных микроорганизмов, что создает условия для снижения как локальной, так и общей резистентности организма животных, возможного восходящего инфицирования матки и развития в ней воспалительных реакций, что негативно отражается на формировании эмбриона и плода. Иммунодефицит и влагалищный дисбиоз являются одной из причин формирования и проявления эмбриопатий у коров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коровы, формирование эмбриона, задержка развития и гибель эмбриона, иммунодефицит, микробиоценоз влагалища.

IMMUNE DEFICIENCY AND VAGINAL DYSBIOSIS IN THE MANIFESTATION OF INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION AND EMBRYONIC DEATH IN COWS

Elena G. Lozovaya

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy

The author considers the immunologic status and vaginal microbiocenosis in cows during physiological embryo growth, its delayed development and mortality. The object of research included cows of Red Pied and Black Spotted Holstein breeds with average annual productivity of 6.0-7.6 thousand kg. On 19-23, 28-32, 38-45 and 60-65 days after insemination the animals were subjected to a transrectal ultrasound examination to evaluate the condition of the uterus and ovaries and dimensions of the developing embryo. At the same time samples of venous blood and cervicovaginal mucus were obtained. The blood samples were analyzed to determine the leukocyte count, leukogram, phagocytic reaction, the content of immunoglobulins and circulating immune complexes, and bactericidal and lysozyme activity of blood serum. The vaginal mucus was analyzed for the total bacterial count, the presence and values of titers of entero-, lacto- and bifidobacteria and fungi. The obtained data was processed statistically. It was found that cows predisposed to embryo delayed development and particularly to embryo mortality at all stages of early gestation exhibited a stimulation of leukopoiesis, monocytosis and eosinophilia and increased blood level of circulating immune complexes that are indicative of high reactive response to the actions of embryonic antigens and endogenous toxins in the maternal body. It was noted that there was depression of cellular and humoral factors of natural resistance, which was indicative of immune deficiency and decreased adaptive abilities of animals to pregnancy development. The vaginal microbiota had a decreased normal flora count and increased opportunistic pathogenic microorganism count, which created conditions for a decrease in both local and general resistance in the bodies of animals, possible ascending infection of the uterus and development of uterine inflammatory reactions, which adversely affects the formation

of the embryo and fetus. Immune deficiency and vaginal dysbiosis are one of the reasons for the development and manifestation of embryopathies in cows.

KEY WORDS: cows, embryo growth, embryo delayed development and mortality, immune deficiency, vaginal microbiocenosis.

Введение
Среди важнейших проблем современного высокопродуктивного молочного скотоводства и практического ветеринарного акушерства одно из существенных мест занимает внутриутробная задержка развития и гибель зародышей на ранних этапах их развития. Частота регистрации данных патологий среди осеменяемых коров достигает 30-40% и более. Среди множества причин нарушений эмбрионального развития особо выделяют роль иммунитета матери и нарушение иммуотрофического равновесия её организма по отношению к формирующемуся зародышу [4, 5, 7, 10]. Прямым стимулирующим влиянием на систему иммунокомпетентных структур репродуктивного тракта и общую иммунологическую реактивность организма обладает нормофлора влагалища [2, 9].

Цель исследования заключалась в изучении состояния иммунологического статуса и вагинального микробиоценоза коров при физиологическом формировании эмбриона, задержке его развития и гибели.

Материалы и методы

Исследования выполнены на коровах красно-пёстрой и чёрно-пёстрой голштинской пород со среднегодовой продуктивностью 6,0–7,6 тыс. кг, принадлежащих ООО «Агротех-Гарант» Нащедино, ООО «СП Вязноватовка» Воронежской и ЗАО «Славянское» Орловской областей. В опыте находилось 47 коров. На 19-23, 28-32, 38-45 и 60-65-й дни после осеменения животных подвергали трансректальному эхографическому обследованию с использованием ультразвукового сканера «Easi-Scan-3» с оценкой состояния матки, яичников и метрических показателей формирующегося эмбриона [1, 8]. В эти же сроки от коров была получена венозная кровь и влагалищно-цервикальная слизь для лабораторных исследований. В крови общепринятыми методами определяли содержание лейкоцитов, показатели лейкограммы и фагоцитарной реакции, содержание иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), бактерицидную (БАСК) и лизоцимную (ЛАСК) активность сыворотки крови, а в вагинальной слизи общую бактериальную обсемененность, наличие и показатели титра энтеро-, лакто- и бифидобактерий, а также грибов. Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью программы Statistica V.6.0 и Statistica 8.0.

Результаты исследований

Выявлено, что уже на 19-23-й день гестации у коров с задержкой развития эмбриона и риском его гибели (вторая и третья группы) отмечено увеличение в крови общего количества лейкоцитов на 12,9% и их нейтрофильных форм – на 9,1-14,0%, что может отражать как проявление признаков интоксикации организма животных, так и возможное развитие в половых органах воспалительного процесса (табл. 1). Подтверждением этого является также увеличение содержания моноцитов на 7,4 и 77,8%, являющихся активными фагоцитами и предшественниками тканевых макрофагов и вырабатывающих отдельные компоненты комплемента.

Развитие токсических, аллергических и аутоиммунных реакций у коров с задержкой развития и гибелью эмбриона сопровождается увеличением содержания в крови эозинофилов соответственно на 53,8 и 203,8% ($p < 0,001$), обеспечивающих разрушение гистамина, токсинов белкового сопровождения, чужеродных белков и иммунных комплексов. При этом уровень концентрации ЦИК (комплекс антиген – антитело – комплимент) у животных данных групп был выше такового у коров с нормальным формированием беременности соответственно в 2,01 и 2,96 раза ($p < 0,001$). Избыточное их накопление, связанное с развитием аллергических реакций, ведёт к разрушению тканевых структур половых органов, не исключая и ткани формирующегося зародыша.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

Таблица 1. Показатели иммунитета и естественной резистентности коров при задержке развития и гибели эмбриона

Показатели	Дни гестации			
	19-23-й	28-32-й	38-45-й	60-65-й
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	¹ 8,50 ± 0,50	9,00 ± 0,28	8,50 ± 0,34	7,50 ± 0,34
	² 9,60 ± 0,45	9,40 ± 0,40	9,00 ± 0,40	7,70 ± 0,31
	³ 9,60 ± 0,44	10,00 ± 0,62	10,00 ± 0,46	8,10 ± 0,61
Нейтрофилы, %	28,6 ± 1,8	30,8 ± 2,1	29,3 ± 1,7	30,6 ± 1,8
	31,2 ± 2,1	29,6 ± 1,8	34,9 ± 2,1	30,9 ± 2,6
	32,6 ± 2,1	27,8 ± 1,4	35,0 ± 2,9	38,0 ± 2,1
Моноциты, %	2,7 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,0 ± 0,2
	2,9 ± 0,2	3,2 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2
	4,8 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Эозинофилы, %	5,2 ± 0,3	6,4 ± 0,3	5,6 ± 0,3	5,6 ± 0,4
	8,0 ± 0,5	9,6 ± 0,8	9,8 ± 0,8	11,3 ± 1,2
	10,6 ± 0,9	14,0 ± 1,2	13,3 ± 1,1	9,5 ± 0,7
Лимфоциты, %	63,2 ± 2,1	60,4 ± 2,3	62,1 ± 2,8	61,8 ± 1,6
	58,0 ± 2,1	57,6 ± 2,2	52,6 ± 2,6	55,6 ± 2,6
	52,0 ± 3,5	54,9 ± 3,4	48,4 ± 2,6	51,1 ± 2,4
ФАЛ, %	68,8 ± 2,9	69,4 ± 2,9	76,1 ± 2,6	88,9 ± 2,1
	63,3 ± 4,9	64,4 ± 3,2	74,2 ± 2,9	87,3 ± 2,3
	58,8 ± 4,3	63,9 ± 4,3	69,7 ± 3,7	81,0 ± 2,4
Иммуноглобулины, г/л	29,3 ± 0,7	28,6 ± 0,8	27,0 ± 0,7	27,9 ± 0,8
	24,7 ± 0,8	23,4 ± 1,4	22,3 ± 1,0	25,5 ± 1,3
	21,8 ± 1,1	20,8 ± 0,9	20,4 ± 1,4	25,3 ± 1,8
ЦИК, г/л	0,23 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,18 ± 0,02
	0,48 ± 0,03	0,47 ± 0,04	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,02
	0,68 ± 0,06	0,61 ± 0,02	0,57 ± 0,04	0,29 ± 0,02
БАСК, %	82,2 ± 1,9	73,6 ± 2,8	79,0 ± 2,9	83,7 ± 1,3
	66,7 ± 2,3	61,5 ± 3,0	67,0 ± 2,3	67,4 ± 1,8
	61,4 ± 5,3	52,7 ± 3,8	57,5 ± 3,2	59,4 ± 4,1
ЛАСК, мкг/мл	0,48 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,45 ± 0,03	0,29 ± 0,01
	0,39 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,21 ± 0,02
	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,12 ± 0,01

Примечание: ¹ – физиологическое формирование эмбриона, ² – задержка его развития, ³ – гибель эмбриона

Концентрация ЦИК в крови находилась в обратной зависимости к уровню фагоцитарной активности лейкоцитов, которая у коров второй и третьей групп была ниже, чем у животных с нормальным формированием эмбриона, на 8,0 и 14,5%. Сочетание высокого уровня ЦИК с пониженной активностью полинуклеарных лейкоцитов свидетельствует как о перегруженности фагоцитарной системы, так и о повышенной миграции из костного мозга функционально незрелых форм нейтрофилов под воздействием интерлейкина-1, уровень которого увеличивается во время беременности.

У коров с задержкой развития и гибелью эмбрионов по сравнению с физиологическим течением беременности относительное количество лимфоцитов в крови было ниже соответственно на 8,2 и 14,5%, а содержание общих иммуноглобулинов на 15,7 и

25,6% ($p < 0,001$). Последнее может быть связано как с угнетением их синтеза, так и с увеличением образования и утилизации ЦИК.

Деадаптация животных с нарушением эмбрионального развития к стресс-воздействию при формировании беременности сочеталась со снижением показателей гуморальных факторов естественной резистентности организма: БАСК – на 18,9 и 25,3% ($p < 0,001$), ЛАСК – на 18,8 и 39,6% ($p < 0,001$), что коррелировало с угнетением фагоцитарной реакции лейкоцитов.

На 28-32-й день беременности в целом ранее выявленные различия в показателях клеточного и гуморального иммунитета у коров разных групп сохранились. У животных при задержке развития и гибели эмбриона по сравнению с нормальной гестацией отмечено увеличение количества лейкоцитов в крови соответственно на 4,4 и 11,1%, содержания моноцитов – на 33,3 и 37,5%, эозинофилов – на 50,0 и 218,7% ($p < 0,001$), ЦИК – на 62,1 и 210,0% ($p > 0,001$) и снижение ФАЛ – на 7,2 и 7,9%, количества лимфоцитов – на 4,6 и 9,1%, БАСК – на 16,4 и 28,4% ($p < 0,05-0,001$), ЛАСК – на 37,5 и 30,0% ($p < 0,001$).

Аналогичные данные получены и в последующие сроки исследования, за исключением ряда показателей у коров с задержкой развития эмбриона, когда к 60-65-му дню беременности произошло сглаживание различий в содержании лейкоцитов, их нейтрофильных и моноцитарных форм, ФАЛ.

Таким образом, у коров, предрасположенных к задержке развития и особенно гибели зародышей на всех сроках ранней гестации, регистрируется стимуляция лейкопоэза, моноцитоза, эозинофилии и повышенная концентрация в крови ЦИК, отражающих высокую реакцию организма на воздействие эндотоксинов и антигенов зародыша. Косвенно это отражает нарушения в процессах его имплантации и плацентации. Одновременно отмечаемое угнетение клеточных и гуморальных факторов естественной резистентности: ФАЛ, иммуноглобулинов, БАСК, ЛАСК свидетельствует о присутствии иммунодефицита и пониженных адаптационных возможностях животных к формированию беременности.

Известно, что довольно существенную роль в обеспечении гомеостаза половых органов, их колонизационной резистентности и противомикробной защиты репродуктивного тракта играет микробиоценоз влагалища [2, 3, 6]. Основными представителями его нормофлоры являются лакто- и бифидобактерии, выступающие в качестве антагонистов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, подавляя их рост и размножение. Защитный механизм лактобактерий и бифидобактерий связан с продуцированием большого количества молочной и других органических кислот, различных бактериоцинов, витаминов и иных видов биологически активных веществ, а также прямым стимулирующим влиянием на систему иммунокомпетентных структур репродуктивного тракта, местную и общую иммунологическую реактивность организма [2, 9].

Устойчивость микробиоценоза влагалища обеспечивается скоординированным взаимодействием эндокринной и иммунной систем. Нарушение функции любой из них приводит к дисбиозу, что проявляется замещением представителей нормальной микрофлоры условно-патогенными и патогенными микроорганизмами [3].

Нами установлено, что при физиологическом течении эмбриогенеза общая микробная обсеменённость слизи влагалища достаточно стабильна и колеблется в пределах $503,9 \pm 35,4 - 573,2 \pm 48,4$ КОЕ/мл (табл. 2). Присутствие лактобактерий зарегистрировано у 66,6–83,3% при титре $10^4-10^8 - 10^3-10^8$. При задержке развития зародыша на этапе эмбриогенеза и его завершения (60-65 дней) лактобактерии были выделены из влагалищной слизи у 50,0–66,6% животных при снижении их титра в 1,24-1,25 раза.

Бифидобактерии, входящие в состав нормофлоры, также обладающие высокой колонизационной антагонистической и адгезивной активностью, при нормальном формировании зародыша и задержке его развития были выявлены у 100% животных. Однако у последних их титр оказался ниже на 22,0-45,8%. При смерти эмбриона присутствие бифидобактерий в слизи влагалища на 28-60-й день гестации выявлено только у 50-75% животных. Титр их концентрации в эти сроки оказался ниже здоровых животных в 2,22-2,95 раза.

Снижение колонизации половых органов нормофлорой сопровождалось увеличением в слизи влагалища энтеробактерий (*E. coli*, *Ent. faecalis*) с 10,0-16,6% случаев выделения до 33,3-70,0%, а также грибов – в 1,4-2,0 раза. При этом одновременно установлено повышение рН влагалищной слизи в щелочную сторону с $7,38 \pm 0,16 - 7,62 \pm 0,07$ до $7,84 \pm 0,10 - 8,37 \pm 0,11$ у коров с задержкой развития эмбриона и до $8,25 \pm 0,15 - 8,63 \pm 0,18$ – у коров с его гибелью.

Таблица 2. Микробиоценоз влагалища коров при физиологическом и патологическом течении эмбриогенеза

Показатель	Дни гестации			
	19-23-й	28-32-й	38-45-й	60-65-й
Общая микробная контаминация, КОЕ/мл	¹ 531,1 ± 22,4 ² 627,8 ± 44,1 ³ 782,5 ± 51,7	509,7 ± 24,3 749,5 ± 55,3 946,8 ± 62,4	573,2 ± 48,8 909,6 ± 76,2 1349,4 ± 57,1	503,9 ± 35,4 703,0 ± 61,0 1112,5 ± 66,2
Бифидобактерии, %/титр	100/10 ^{-4,0} 100/10 ^{-2,6} 100/10 ^{-2,5}	100/10 ^{-5,7} 100/10 ^{-2,8} 75/10 ^{-1,75}	100/10 ^{-3,75} 100/10 ^{-2,85} 50/10 ^{-1,3}	100/10 ^{-4,43} 100/10 ^{3,46} 75/10 ^{-2,00}
Лактобактерии, %/титр	Не исследованы	Не исследованы	66,6/10 ^{-4,08} 50,0/10 ^{-3,17} Не исследованы	83,3/10 ^{-3,33} 66,6/10 ^{-2,50} Не исследованы
Энтеробактерии, %/титр	83,3/10 ^{-2,33} 80,0/10 ^{-2,8} 100/10 ^{-3,75}	66,7/10 ^{-2,67} 60,0/10 ^{-3,0} 100/10 ^{-4,25}	66,6/10 ^{-2,58} 81,6/10 ^{-3,38} 100/10 ^{-4,75}	75,0/10 ^{-2,35} 71,6/10 ^{-3,0} 100/10 ^{-4,5}
Микроскопические грибы, %	33,3 60,0 50,0	50,0 60,0 75,0	33,4 38,4 75,0	54,9 53,3 75,0
рН цервикально-влагалищной слизи	7,62 ± 0,07 8,37 ± 0,11 8,25 ± 0,15	7,38 ± 0,16 8,25 ± 0,11 8,55 ± 0,13	7,57 ± 0,09 7,92 ± 0,24 8,63 ± 0,18	7,42 ± 0,12 7,84 ± 0,10 8,31 ± 0,16

Примечание: ¹ – физиологическое формирование эмбриона, ² – задержка его развития, ³ – гибель эмбриона

Следовательно, состояние микробиоценоза половых путей коров и их колонизационной резистентности оказывает определенное влияние на формирование и развитие эмбриона и плода. Уменьшение в микробиоте влагалища нормофлоры и увеличение условно-патогенных микроорганизмов создает условия для снижения как локальной, так и общей резистентности организма животных и возможного восходящего инфицирования матки и развития в ней воспалительных реакций, что негативно отражается на формировании эмбриона и плода.

Таким образом, общий иммунный статус и колонизационная резистентность половых органов осеменяемых коров играют исключительную роль в формировании и развитии эмбриона. Иммунодефицит и влагалищный дисбиоз являются одной из причин формирования и проявления эмбриопатий у коров.

Библиографический список

1. К вопросу внутриутробной гибели и задержки развития зародышей у молочных коров / А.Г. Нежданов, В.И. Михалёв, Г.П. Дюльгер, Е.Г. Лозовая // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2014. – № 3. – С. 120-124.
2. Коррекция нарушений биоценоза влагалища: марш на месте или движение вперед? / Е.В. Радзинский, М.Б. Хомошина, Л.А. Кайгородова [и др.] // Доктор.Ру. – 2011. – № 9 (68). 1. Гинекология. – С. 26-32.
3. Красноженов Е.П. Колонизационная резистентность организма человека в норме и при патологии : монография / Е.П. Красноженов, Я.А. Ахременко. – Киров : МЦНИП, 2013. – 115 с.
4. Радченков В.П. Иммунорегуляция эмбрионального развития. Экспериментальное моделирование : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.13; 14.00.36 / В.П. Радченков. – Дубровицы, 1993. – 30 с.
5. Сидельникова В.М. Невынашивание беременности – современный взгляд на проблему / В.М. Сидельникова // Акушерство и гинекология. – 2007. – № 5. – С. 24-27.
6. Современные подходы к выбору препарата локального действия в терапии бактериального вагиноза / Е.Ф. Кира, В.Н. Прилепская, М.Н. Костава [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 7. – С. 60-67.
7. Соколовская И.И. Зависимость пренатальной выживаемости от состояния иммунной системы самки / И.И. Соколовская, В.П. Радченков, А.В. Бронская // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1984. – № 2. – С. 87-91.
8. Ультразвуковая диагностика беременности и задержки развития эмбриона и плода у коров : метод. пособие / А.Г. Нежданов, В.И. Михалёв, Н.Т. Климов, Е.В. Смирнова, Г.П. Дюльгер – Воронеж, 2013. – 20 с.
9. Чернова Н.И. Место лактофлоры при коррекции нарушений микробиоценоза влагалища у сексуальноактивных женщин / Н.И. Чернова, Ю.Н. Перламутров // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 10. – С. 104-108.
10. Чомаев А.М. Эмбриональные потери у коров / А.М. Чомаев, Ч.Б. Колодиев // Ветеринария. – 2013. – № 5. – С. 15-16.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ
Принадлежность к организации

Елена Геннадьевна Лозовая – аспирант отдела патологии воспроизводства и молочной железы, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», Российская Федерация, г. Воронеж, тел. 8(473) 278-48-12, E-mail: llozovaja@yandex.ru.

Дата поступления в редакцию 10.12.2016

Дата принятия к печати 26.01.2017

AUTHOR CREDENTIALS
Affiliations

Elena G. Lozovaya – Post-graduate Student, Reproductive and Mammary Gland Pathology Division, All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Russian Federation, Voronezh, tel. 8(473) 278-48-12, E-mail: llozovaja@yandex.ru.

Date of receipt 10.12.2016

Date of admittance 26.01.2017