


## Морфофункциональное состояние органов иммунной системы у поросят-гипотрофиков в ранний неонатальный период

Б. В. Шабунин, А. В. Некрасов, Е. М. Степанов, Е. В. Михайлов 

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия

 E-mail: voronezh81@rambler.ru

**Аннотация.** Цель исследования – изучить состояние органов иммунной системы у поросят-гипотрофиков в ранний неонатальный период в условиях промышленного свиноводческого комплекса. **Методы.** Эксперимент проведен в 2023 г. в крупном промышленном свиноводческом хозяйстве Воронежской области на поросятах раннего неонатального периода, полученных от свиноматок 3-4-го опороса. На начальном этапе эксперимента полученные во время опороса поросята проходили клинический осмотр и взвешивание. Не достигшие 800 г животные учтены как поросята-гипотрофики ( $n = 30$ ), животные свыше 800 г – соответственно нормотрофики ( $n = 30$ ). После формирования групп был произведен вынужденный убой животных до приема молозива ( $n = 5$ ), и от каждой группы проведено взятие биологического материала (тимус, лимфатические узлы (паховые), селезенка для гистологических и иммуногистохимических исследований). **Результаты.** Уровень митотической активности в тимусе у поросят-нормотрофиков был выше на 9,4 % ( $p \leq 0,05$ ), чем у поросят с дефицитом массы тела. В селезенке уровень митотической активности не имел достоверных различий и был примерно одинаковым у всех животных, участвующих в эксперименте. В лимфатических узлах митотическая активность клеток у нормотрофиков была выше на 12,7 % ( $p \leq 0,05$ ). Исследование положительно экспрессированных клеток CD-3 в селезенке выявило достоверные различия: так, у поросят-нормотрофиков количество клеток, положительно окрашенных данным маркером, было достоверно выше, чем у поросят с дефицитом массы тела, на 10,2 % ( $p \leq 0,05$ ). Количество CD-3-клеток в тимусе различалось на 5,6 %, а в лимфоузлах – на 2,4 % между группами, но не имело достоверных различий. Клеточная экспрессия «незрелых» форм В-лимфоцитов (РАХ-5) в лимфоузлах нормотрофиков была достоверно выше на 12,9 % ( $p < 0,05$ ) в сравнении с таковой у поросят-гипотрофиков. **Научная новизна** заключается в том, что впервые проведено комплексное гистологическое и иммуногистохимическое исследование органов иммунной системы поросят в ранний неонатальный период с помощью моноклональных антител CD-3, Ki-67 и РАХ-5.

**Ключевые слова:** поросята-гипотрофики, ранний неонатальный период, органы иммунной системы, врожденный иммунитет, иммуногистохимия

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00020.

**Для цитирования:** Шабунин Б. В., Некрасов А. В., Степанов Е. М., Михайлов Е. В. Морфофункциональное состояние органов иммунной системы у поросят-гипотрофиков в ранний неонатальный период // Аграрный вестник Урала. 2024. Т. 24, № 07. С. 932–943. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-06-932-943>.

**Дата поступления статьи:** 15.12.2023, **дата рецензирования:** 17.04.2024, **дата принятия:** 03.05.2024.

## Morphofunctional state of the immune system organs in hypotrophic piglets in the early neonatal period

B. V. Shabunin, A. V. Nekrasov, E. M. Stepanov, E. V. Mikhaylov✉

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

✉E-mail: voronezh81@rambler.ru

**Abstract.** The purpose of the study was to study the state of the immune system organs in hypotrophic piglets in the early neonatal period in an industrial pig breeding complex. **Methods.** The experiment was conducted in 2023 in a large industrial pig farm in the Voronezh region on piglets of the wounded neonatal period received from sows 3-4 farrowing. The sows were kept at optimal microclimate parameters, taking into account their physiological state, and fed with SK-1 nutritionally balanced feed. At the initial stage of the experiment, the piglets obtained during farrowing underwent clinical examination and weighing. Animals under 800 g are counted as hypotrophic piglets ( $n = 30$ ), animals over 800 g are normotrophic, respectively ( $n = 30$ ). After the groups were formed, animals were forced to be slaughtered before taking colostrum ( $n = 5$ ) and biological material was taken from each group (thymus, lymph nodes (inguinal), spleen for immunohistochemical studies. **Results.** The level of mitotic activity in the thymus of normotrophic piglets was 9.4 % higher ( $p < 0.05$ ) than in piglets with body weight deficiency. In the spleen, the level of mitotic activity had no significant differences and was approximately the same in all animals participating in the experiment. In lymph nodes, the mitotic activity of cells in normotrophics was 12.7 % higher ( $p < 0.05$ ). A study of positively expressed CD-3 cells in the spleen revealed significant differences, so, in normotrophic piglets, the number of cells positively stained with this marker was significantly higher than in piglets with a body weight deficiency by 10.2 % ( $p < 0.05$ ). The number of CD-3 cells in the thymus differed by 5.6 %, and in the lymph nodes by 2.4 % between the groups, but there were no significant differences. The cellular expression of “immature” forms of B lymphocytes (PAX-5) in the lymph nodes of normotrophics was significantly higher by 12.9 % ( $p < 0.05$ ) compared with hypotrophic piglets. The scientific novelty lies in the fact that for the first time a comprehensive immunohistochemical study of the organs of the immune system of piglets in the early neonatal period was carried out using monoclonal antibodies CD-3, Ki-67 and PAX-5. As a result of the experiment, it was revealed that piglets with body weight deficiency have a “depression” of the immune system, which manifests itself in hypoplasia of T-lymphocytes in the spleen, “maturing” B-lymphocytes in the lymph nodes and low mitotic potential in the thymus and lymph nodes.

**Keywords:** hypotrophic piglets, early neonatal period, organs of the immune system, innate immunity, immunohistochemistry

**Acknowledgements.** The research was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 23-26-00020.

**For citation:** Shabunin B. V., Nekrasov A. V., Stepanov E. M., Mikhaylov E. V. Morphofunctional state of the immune system organs in hypotrophic piglets in the early neonatal period. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2024; 24 (07): 932–943. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-06-932-943>. (In Russ.)

**Date of paper submission:** 15.12.2023, **date of review:** 17.04.2024, **date of acceptance:** 03.05.2024.

### Постановка проблемы (Introduction)

Врожденный иммунитет играет ключевую роль в защите организма новорожденных животных от инфекционных агентов. Исследования последних лет позволяют предположить, что недостаточный вес при рождении может быть связан с «депрессивным» состоянием врожденного иммунитета у этих животных. Следствием такого «депрессивного» состояния иммунной системы является дезорганизация функционального состояния органов иммуногенеза, что может приводить к увеличению восприимчивости к инфекционным заболеваниям.

Эта проблема не только снижает выживаемость и развитие поросят, но и повышает риски экономических потерь в свиноводстве. Важность этого аспекта заставляет ученых и ветеринаров искать новые подходы к коррекции и улучшению состояния иммунитета у таких животных.

Ослабление реализации потенциала врожденного иммунитета у новорожденных поросят с дефицитом массы тела является значимым фактором, препятствующим их нормальному развитию и сопротивляемости заболеваниям. Этот дефицит может возникать в результате недостаточного питания

или стресса на ранних этапах внутриутробного развития, что ведет к снижению функциональности и количества клеток врожденного иммунитета, таких как макрофаги, нейтрофилы и натуральные киллеры.

Различные исследования показывают, что уменьшенный объем жировой и мышечной ткани затрагивает уровни производства цитокинов и антител, снижая общую иммунную реактивность организма. При современных способах содержания свиней специалистами делается упор не на физиологически обоснованный подход к содержанию, кормлению и случке продуктивных животных, а применение ускоренного технологического цикла, при котором свиноматки быстро набирают вес, приходят в охоту и приносят большое количество поросят. Однако при подобном типе производства у животных увеличивается процент патологий заразной и незаразной этиологии, дающих осложнения как на общую резистентность организма, так и на понижение репродуктивной способности свиноматок. Одним из синдромов, регистрируемых у поросят-сосунков постнатального периода, полученных от свиноматок с репродуктивной патологией, является постнатальная гипотрофия (диагноз регистрируется у 40 % поросят), которая приносит колоссальные убытки. Гипотрофия является одним из факторов высокого риска неблагоприятных перинатальных исходов, частота которых, по данным различных авторов, составляет от 4 до 40 % [1].

Новорожденные гипотрофики характеризуются функциональной недоразвитостью органов и тканей, что приводит к снижению их реактивности и возникновению патологий обмена веществ и токсикоза. Стоит отметить и снижение концентрации гемоглобина и содержания эритроцитов, а также развитие нарушений нейроэндокринной регуляции. Кроме того, иммунобиологическая реактивность организма у гипотрофиков также снижается, что приводит к неспособности молодых организмов адаптироваться к изменяющимся внешним раздражителям. Все эти факторы в совокупности влияют на общее состояние гипотрофиков и могут иметь отрицательные последствия для их здоровья [2; 3].

Развитие иммунных нарушений, согласно представлениям общей иммунологии, может быть обусловлено влиянием «редких» субпопуляций лимфоцитов, таких как дубль-позитивные Т-клетки CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> лимфоциты [3]. Исследования, проведенные командой ученых под руководством Т. Ито, с использованием иммуногистохимии и поточной цитометрии, показали значительное снижение уровня CD3<sup>+</sup> Т-клеток в различных органах, таких как тимус, лимфоузлы и селезенка, у поросят с иммунодефицитом. Более того, было обнаружено значительное уменьшение числа циркулирующих CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и практически полное отсут-

ствии CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов или В-лимфоцитов в крови [4].

Важно отметить, что эти результаты подчеркивают роль дубль-позитивных Т-клеток в поддержании нормального функционирования иммунной системы. Образование и развитие этих клеток происходит в тимусе, где они дифференцируются и приобретают функциональные характеристики. CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> лимфоциты представляют собой промежуточный этап в развитии Т-клеток и могут быть ключевым звеном в поддержании баланса между различными видами иммунных клеток.

Поросята-гипотрофики подвержены развитию иммунодефицитных состояний, вследствие чего они более восприимчивы к действию патогенов и имеют больший риск выбытия. Так, Л. Ю. Сашнина показала, что при гипотрофии у поросят отмечается снижение общей неспецифической резистентности и гуморального звена иммунитета [5]. О. С. Гусева также указывала на анемичное состояние поросят при гипотрофии, было отмечено снижение концентрации гемоглобина, гематокрита, среднего содержания гемоглобина в эритроците [6].

В большинстве работ по изучению естественной резистентности приводятся физиологические нормативы отдельных ее показателей. Однако имеющиеся величины иммунологических показателей у разных видов животных условны и значительно отличаются в связи с возрастными и физиологическими особенностями [7–9].

В последние годы большое внимание уделяется иммунологическим исследованиям сельскохозяйственных животных, однако работ, отражающих состояние органов иммунной системы у поросят в ранний постнатальный период, недостаточно [10]. В работе Sinkora M. было продемонстрировано, что иммунная система новорожденных функционально отличается от иммунной системы взрослых животных. Это обусловлено тем, что во время внутриутробного развития антигенная стимуляция организма минимальна, что приводит к отсутствию или очень редкому появлению эффекторных/Т-клеток памяти у новорожденных поросят [11]. Также было показано, что пул В-лимфоцитов после рождения остается низкодифференцированным и в основном состоит из CD-21 и CD-2 лимфоцитов [12].

Получение новых данных о функциональном состоянии иммунных органов у поросят позволит глубже изучить механизм развития и патогенеза иммунодефицитных состояний при гипотрофии у поросят. Оптимальной методикой для данной задачи является иммуногистохимическое исследование, которое позволяет определить нарушение лимфопоза, перераспределение клеток и изменение регуляторного потенциала лимфоидных тканей у поросят в критический период [13].

В отечественной и западной литературе практически отсутствуют данные о морфофункциональном состоянии органов иммунитета при гипотрофии у поросят.

Цель настоящего исследования – изучить морфофункциональное состояние органов иммунной системы у поросят-гипотрофиков в ранний неонатальный период.

#### **Методология и методы исследования (Methods)**

В 2023 году в крупном промышленном свиноводческом хозяйстве Воронежской области был проведен эксперимент на поросятах раннего неонатального периода, полученных от свиноматок 3-4-го опороса. Животных содержали при оптимальных параметрах микроклимата с учетом их физиологического состояния, а также кормили комбикормом СК-1, сбалансированным по питательным веществам. На первом этапе эксперимента поросята, рожденные во время опороса, прошли клинический осмотр и взвешивание. Для проведения исследования были сформированы две группы животных: нормотрофики и гипотрофики. Из каждой группы был взят биологический материал (тимус, лимфатические узлы (паховые), селезенка) для дальнейших исследований, включая классический метод окрашивания (гематоксилин и эозин) и иммуногистохимические анализы. Органы были зафиксированы в 10-процентном нейтральном забуференном формалине, подвергнуты дегидратации в спиртах различной концентрации и вложены в гистологический парафин Histomix (Biovitrum, Россия) для последующего изучения. Для проведения исследований использовались срезы, изготовленные из парафиновых блоков на микротоме МПС-2. Толщина срезов составляла 3–4 мкм. Затем срезы помещались на стекла, окрашивались гематоксилином и эозином. Материал для иммуногистохимического исследования фиксировали 10-процентным нейтральным забуференным формалином HISTOSAFE 10 % в течение 24 часов, после чего проводили стандартную обработку. Для подготовки образцов тканей использовали парафиновую среду «Гистомикс». Срезы толщиной 4 мкм наносили на стекла с высокой адгезией и высушивали при температуре 37 °С в течение 18 часов. Эксперименты проводились вручную с использованием системы визуализации NovoLink polymer (Novo Castra, Великобритания), где контролем служила неиммунизированная сыворотка. Изучались маркеры PAX-5, Ki-67 и CD-3. CD-3 – это маркер, который характерен для Т-лимфоцитов, а Ki-67 является индикатором уровня клеточного деления. PAX-5 кодирует белок-специфический активатор линии В-клеток (BSAP), который проявляется на ранних этапах дифференцировки В-клеток.

Для анализа данных использовалась программа TopView и морфометрический стандарт. Микроскоп 400x применялся для подсчета клеток в 30

полях зрения. Для проведения анализа данных использовался пакет для анализа данных в MS Office Excel 2013.

#### **Результаты (Results)**

При гистологическом исследовании (рис. 1) селезенки поросят-гипотрофиков были выявлены очаги миелопоэза, паренхима состояла по большей части из красной пульпы. Она была представлена эритроцитами, макрофагами. Белая пульпа была представлена мелкими первичными фолликулами с нечеткими границами. Граница красной и белой пульпы стерты, соединительнотканый остов скудный.

У поросят-нормотрофиков аналогично поросятам-гипотрофикам большую площадь паренхимы занимала красная пульпа, однако прослеживалась четкая зональность между пульпами. В красной пульпе клеточный состав был представлен эритроцитами и макрофагами, которые в свою очередь были нагружены включениями пигмента гемосидерина. Объемная доля белой пульпы значительно возрастала.

Тимус у поросят-нормотрофиков был представлен дольками, разделенными соединительной тканью. Граница медуллы и кортекса была хорошо различима, корковое вещество представлено тимоцитами, которые располагались вплотную друг к другу. Мозговое вещество занимало 40 % площади которое представлено тимоцитами и тельцами гассала с начальными признаками кератинизации.

У поросят-гипотрофиков также орган был представлен разделенными соединительной тканью дольками, между которыми располагались сосуды с умеренным кровенаполнением. Диффузно отмечено стирание коркового и мозгового слоев. Сосуды умеренно кровенаполнены, тельца гассала без признаков кератинизации, по 2-3 в мозговой зоне.

Лимфатические узлы у поросят-нормотрофиков были покрыты соединительнотканной капсулой, трабекулы пронизывали паренхиму до коркового слоя. Корковое вещество располагалось ближе к центру органа, в то время как мозговое было больше представлено на периферии. Границы между корковым веществом и медуллой прослеживаются нечетко, первичные лимфоидные фолликулы располагались диффузно. Медулла была представлена синусоидами и мозговыми тяжами, в синусоидах были видны скопления клетки с включениями пигмента гемосидерина.

У поросят-гипотрофиков также лимфатические узлы были представлены корковым и мозговым веществом с инверсированным расположением. Границы были слегка размыты, герминативные центры визуализировались лишь первичные, по периферии также присутствовали отложения пигмента гемосидерина.

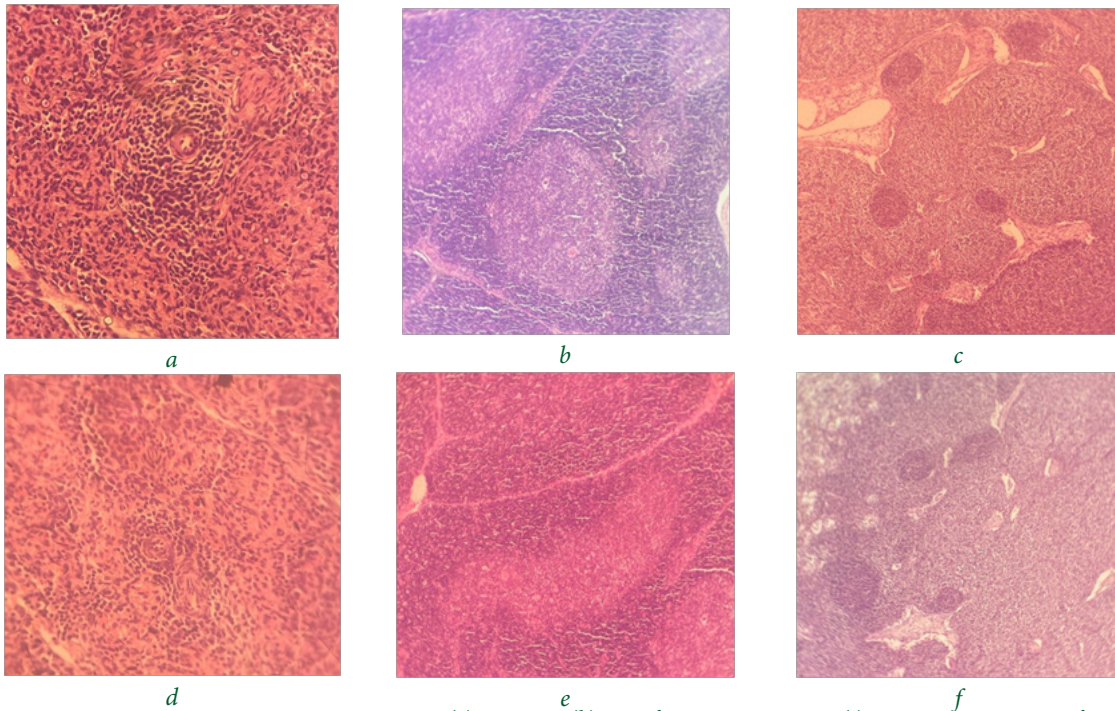


Рис. 1. Гистологическое строение селезенки (a), тимуса (b), лимфатических узлов (c) поросят-нормотрофиков; a – ув. 400x, b – ув. 200x, c – ув. 100x. Гистологическое строение селезенки (d), тимуса (e) и лимфатических узлов (f) поросят-гипотрофиков; d – ув. 400x, e – ув. 200x, f – ув. 100x. Окраска – гематоксилин и эозин

Fig. 1. Histological structure of the spleen (a), thymus (b), lymph nodes (c) of normotrophic piglets; a – zoom 400x, b – zoom 200x, c – zoom 100x. Histological structure of the spleen (d), thymus (e) and lymph nodes (f) of hypotrophic piglets; d – zoom 400x, e – zoom 200x, f – zoom 100x. Color – hematoxylin and eosin

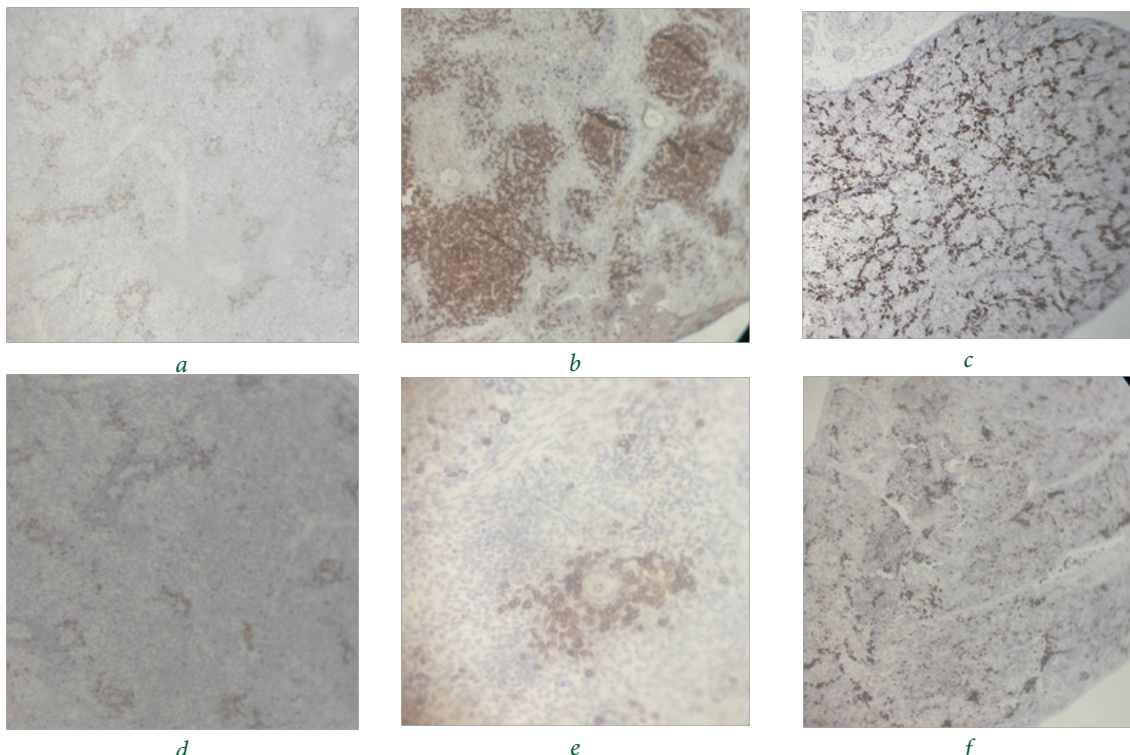


Рис. 2. a – распределение PAX-5 позитивных клеток в селезенке поросят-нормотрофиков; b – распределение CD-3+ клеток в селезенке поросят-нормотрофиков. c – митотическая активность в селезенке поросят-нормотрофиков; a, b, c – ув. 400x; d – PAX-5+ лимфоциты в селезенке поросят-гипотрофиков; e – группирование CD-3 в селезенке поросят-гипотрофиков, отмечено снижение положительно окрашенных клеток; f – митотическая активность в селезенке поросят-гипотрофиков; d, f – ув. 100x, e – ув. 400x

Fig. 2. a – distribution of PAX-5 positive cells in the spleen of normophytic piglets; b – distribution of CD-3+ cells in the spleen of normotrophic piglets; c – mitotic activity in the spleen of normophytic piglets; a, b, c – zoom 400x; d – PAX-5+ lymphocytes in the spleen of hypotrophic piglets; e – grouping of CD-3 in the spleen of hypotrophic piglets, a decrease in positively colored cells was noted; f – mitotic activity in the spleen of hypotrophic piglets; d, f – zoom 100x, e – zoom 400x

При иммуногистохимическом исследовании селезенки поросят с дефицитом массы тела экспрессия CD-3 не имела четкой зональности (рис. 2) и определялась как в красной, так и в белой пульпе. Клетки с ядерной экспрессией PAX-5 выявлялись в области белой пульпы и располагались преимущественно вокруг пульпарных артерий. Относительная площадь PAX-5 позитивных клеток была вариабельна и составляла от 5 до 35 % от общего числа клеток. Обнаруженные единичные клетки в области красной пульпы, вероятно, являются клетками реактивного окружения. CD-3 позитивные клетки экспрессировались как в белой пульпе, где их было большинство, так и в красной, где они расположены в виде тяжей по 20–50 клеток.

В селезенке поросят-нормотрофиков экспрессия PAX-5 определялась как в красной, так и в белой пульпе, визуализировалось около 60 % клеток. Клетки с ядерной экспрессией (Ki-67) обнаруживались в области белой пульпы и располагались преимущественно вокруг пульпарных артерий, относительная площадь PAX-5-позитивных клеток была вариабельна и составляла от 5 до 35 % от общего числа клеток.

CD-3 позитивные клетки видны как в белой пульпе, где их было большинство, так и в красной, где они расположены цепочками по 20–50 клеток.

Паховые лимфатические узлы поросят-нормотрофиков имели типичное строение. Предше-

ственники В-лимфоцитов располагались строго в герминативных центрах лимфоидных фолликулов (рис. 3), также видны были единичные PAX-5 позитивные клетки, расположенные вокруг в мантии. В синусах органа позитивных PAX-5 клеток не визуализировалось. Яркая экспрессия CD-3 выявлена большей частью в клетках мантии и маргинальной зоне, в герминагенном центре видны единичные клетки, расположенные большей частью на границе центра размножения и мантии. Как и во всех исследованных лимфоидных органах, наибольший процент клеток с умеренной и яркой ядерной экспрессией имел свою зональность. Так, наибольшее количество Ki-67 позитивных клеток было выявлено в герминативных центрах, а в области мантии, маргинальной зоны и синусах концентрация данных клеток не превышала 50 %.

У поросят-гипотрофиков лимфатические узлы имели типичное гистологическое строение. Более 50 % Ki-67 положительных клеток визуализировалось в герминативных центрах, в то время как в мантийной и краевой зоне концентрация клеток была скудной. Экспрессия CD-3 отмечалась по большей части в мантийной и маргинальной зонах. В герминативных центрах Т-лимфоциты были единичными, располагались на границе центра. Предшественники В-лимфоцитов располагались строго в герминативных центрах лимфоидных фолликулов.

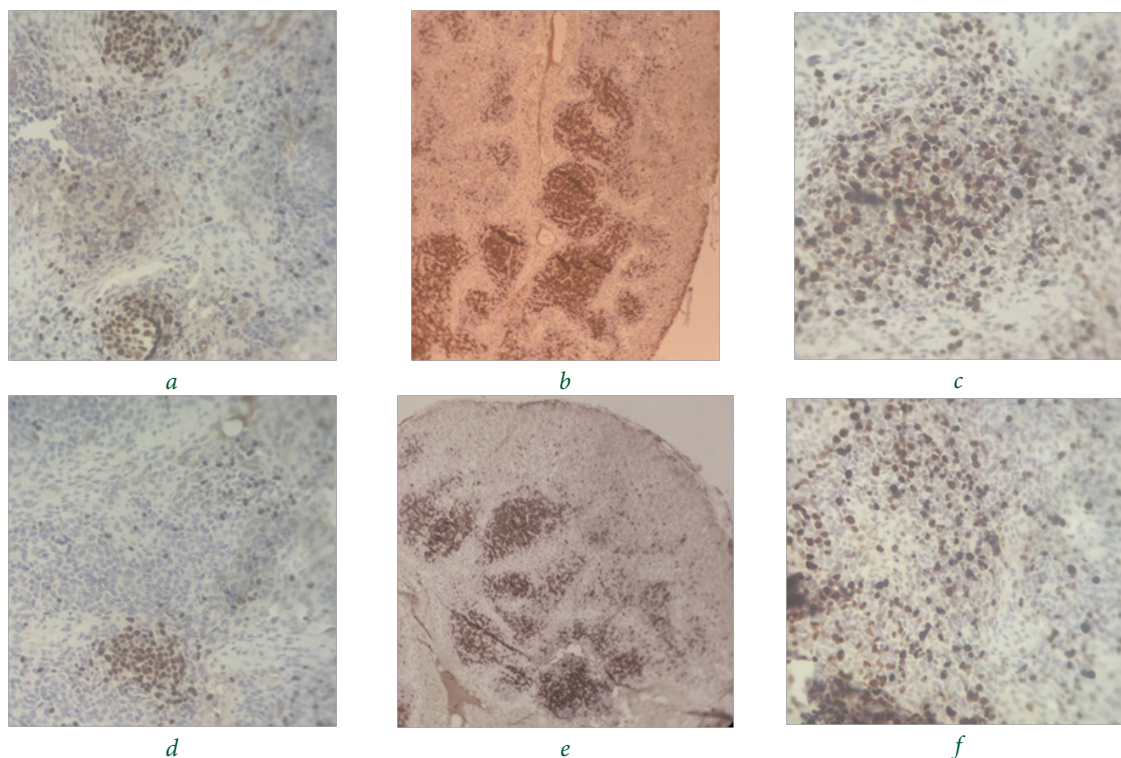


Рис. 3. Распределение PAX-5 (a), CD-3 (b) и Ki-67 (c) положительных клеток в лимфоузлах поросят-нормотрофиков; a, c – ув. 400x; b – ув. 100x. Цитоплазматическая экспрессия PAX-5 (d), CD-3 (e) и Ki-67 (f) в лимфоузлах у поросят-гипотрофиков; d, f – ув. 400x, e – ув. 100x

Fig. 3. Distribution of PAX-5 (a), CD-3 (b) and Ki-67 (c) positive cells in lymph nodes of normotrophic piglets; a, c – zoom 400x; b – zoom 100x. Cytoplasmic expression of PAX-5 (d), CD-3 (e) and Ki-67 (f) in lymph nodes in hypotrophic piglets; d, f – zoom 400x, e – zoom 100x

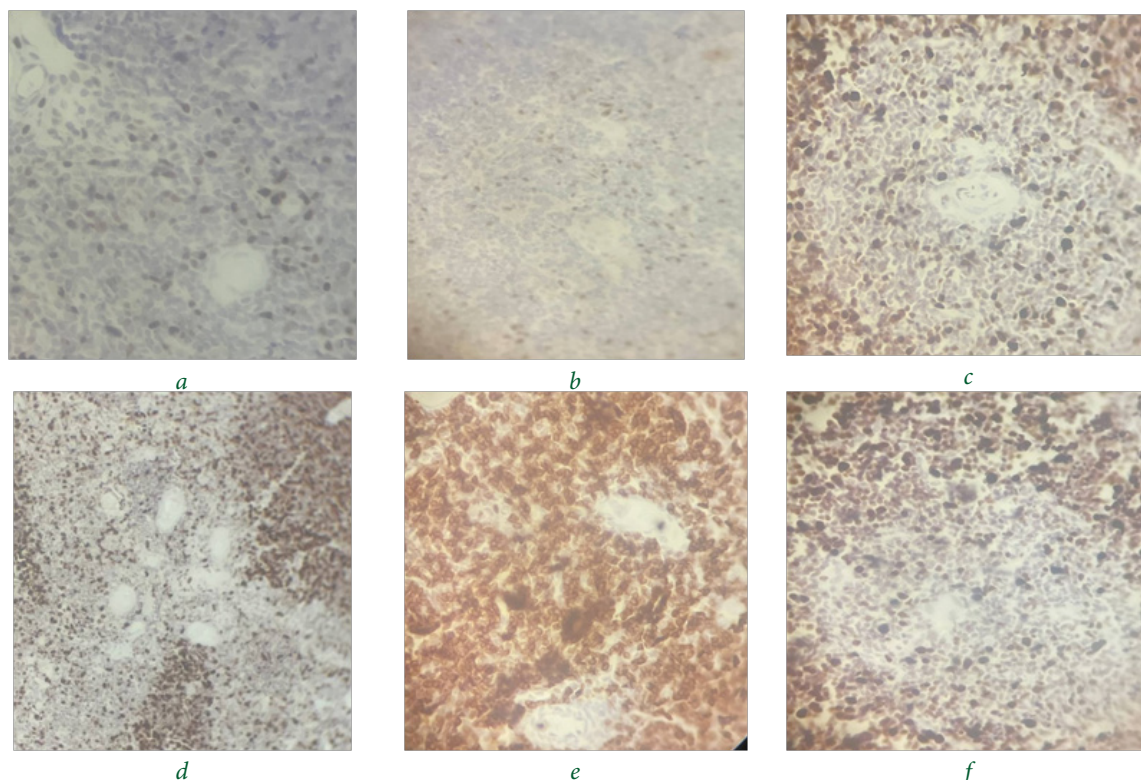


Рис. 4. а – положительная экспрессия PAX-5 в тимусе поросят-нормотрофиков; б – «группировка» положительно экспрессированных PAX-5 клеток в тимусе поросят-нормотрофиков; с – экспрессия Ki-67 в тимусе поросят-гипотрофиков, отмечено снижение положительно окрашенных клеток; д – экспрессия Ki-67 в тимусе поросят-нормотрофиков; е – экспрессия CD-3 в тимусе поросят-гипотрофиков; ф – экспрессия CD-3 в тимусе поросят-нормотрофиков; а, б, с, д, е, ф – ув. 400х  
 Fig. 4. а – positive expression of PAX-5 in the thymus of normal piglets; б – a “grouping” of positively expressed PAX-5 cells in the thymus of normotrophic piglets; с – Ki-67 expression in the thymus of hypotrophic piglets, a decrease in positively colored cells was noted; д – expression of Ki-67 in the thymus of normotrophic piglets; е – expression of CD-3 in the thymus of hypotrophic piglets; ф – expression of CD-3 in the thymus of normotrophic piglets; а, б, с, д, е, ф – zoom. 400x

Таблица 1  
**Результаты подсчета положительно экспрессированных клеток (количество положительно окрашенных клеток в поле зрения 400х) в органах поросят**

Маркер	Тимус	Селезенка	Лимфоузлы
<b>Поросята-гипотрофики</b>			
Ki-67	85,0 ± 1,30	59,7 ± 2,43	50,1 ± 1,92
CD-3	90,6 ± 2,64	51,0 ± 1,34	24,8 ± 1,04
PAX-5	3,44 ± 1,58	22,0 ± 1,22	201,3 ± 3,04
<b>Поросята-нормотрофики</b>			
Ki-67	91,3 ± 1,74*	60,1 ± 2,71	56,5 ± 1,83*
CD-3	95,7 ± 2,43	56,2 ± 1,33*	25,4 ± 0,76
PAX-5	3,77 ± 1,39	21,3 ± 1,41	227,2 ± 13,2*

\*  $p \leq 0,05$  по отношению к поросятам-гипотрофикам.

Table 1  
**The results of counting positively expressed cells (the number of positively colored cells in the field of view is 400x) in piglets' organs**

Marker	Thymus	Spleen	Lymph nodes
<b>Hypotrophic piglets</b>			
Ki-67	85.0 ± 1.30	59.7 ± 2.43	50.1 ± 1.92
CD-3	90.6 ± 2.64	51.0 ± 1.34	24.8 ± 1.04
PAX-5	3.44 ± 1.58	22.0 ± 1.22	201.3 ± 3.04
<b>Normotrophics piglets</b>			
Ki-67	91.3 ± 1.74*	60.1 ± 2.71	56.5 ± 1.83*
CD-3	95.7 ± 2.43	56.2 ± 1.33*	25.4 ± 0.76
PAX-5	3.77 ± 1.39	21.3 ± 1.41	227.2 ± 13.2*

\*  $p \leq 0.05$  in relation to hypotrophic piglets.

При исследовании тимуса у поросят-нормотрофиков яркая экспрессия Ki-67 отмечена в корковом слое, а в мозговом веществе – скудная. В области мозгового вещества визуализировались единичные клетки, имеющие ядерную экспрессию PAX-5, в корковом слое клетки с экспрессией отсутствуют. Цитоплазматическая экспрессия CD-3 видна почти в 100 % клеток, причем как в корковом, так и в мозговом веществе. У поросят с дефицитом массы тела экспрессия CD-3 лимфоцитов отмечена почти во всех клетках кортекса и медуллы. PAX-5 позитивные клетки единичные и располагались лишь в мозговом веществе, а экспрессия Ki-67 преимущественно отмечалась в корковом слое. В мозговом позитивных клеток при визуальном анализе было лишь 10–15 % (рис. 4).

В таблице 1 представлены результаты подсчета клеток, положительно окрашенных иммуногистохимическими маркерами. Ki-67 является маркером клеточного деления, и его экспрессия характеризует уровень митотической активности в органах. Как видно из таблицы, уровень митотической активности в тимусе у поросят-нормотрофиков был выше на 9,4 % ( $p \leq 0,05$ ), чем у поросят с дефицитом массы тела. В селезенке уровень митотической активности не имел достоверных различий и был примерно одинаковым у всех животных, участвующих в эксперименте. В лимфатических узлах митотическая активность клеток у нормотрофиков была выше на 12,7 % ( $p \leq 0,05$ ). Подсчет положительно экспрессированных клеток CD-3 в селезенке выявил достоверные различия: так, у поросят-нормотрофиков количество клеток, положительно окрашенных данным маркером, было достоверно выше, чем у поросят с дефицитом массы тела, на 10,2 % ( $p \leq 0,05$ ). Количество CD-3 клеток в тимусе различалось на 5,6 %, а в лимфоузлах – на 2,4% между группами, но не имело достоверных различий. Клеточная экспрессия «незрелых» форм В-лимфоцитов (PAX-5) в лимфоузлах нормотрофиков была достоверно выше на 12,9 % ( $p \leq 0,05$ ) в сравнении с таковой у поросята-гипотрофиков.

#### **Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)**

В ходе выполнения работы были получены и проанализированы экспериментальные данные с помощью иммуногистохимического метода, который позволяет более детально оценивать потенциал врожденного иммунитета поросят в ранний неонатальный период. Полученные данные указывали на «депрессию» митотической активности в тимусе и лимфоузлах, а также гипоплазию Т-лимфоцитов в селезенке. В прошлых исследованиях было выявлено, что у поросят-нормотрофиков доля белой пульпы была на 11 % выше, чем у поросят с гипотрофией, а объемная доля красной пульпы у поросят-гипотрофиков превосходила показатели здоровых животных на 12 %. Размер фолликулов у

поросят-нормотрофиков был на 27,9 % больше, чем у поросят-гипотрофиков. Это говорит о наличии дисплазии белой пульпы у последних. Дисплазия белой пульпы указывает на нарушение функции органа, что может привести к снижению иммунного статуса у животных [14].

Показано было снижение диаметра тимической дольки у поросят-гипотрофиков на 33 % и размера тельца гассалья на 19 % [15]. При гистологическом исследовании костного мозга было замечено появление незрелых форм в кровотоке, а также нарушение дифференцировки и уменьшение количества дифференцированных клеток [16]. Истощение Т-зависимых зон разной степени выраженности также было обнаружено у поросят-гипотрофиков, а в некоторых случаях было отмечено отсутствие фолликулов с герминативными центрами.

Изменились клетки в корковом и мозговом веществе, претерпевшие деструктивные изменения (пикноз). Морфометрическое исследование выявило, что объемное содержание коркового вещества в лимфоузлах нормотрофических поросят составляет 39,83 %, что превышает показатель гипотрофических поросят на 10,4 %, а объем мозгового вещества у нормотрофиков больше на 4,3 %. Диаметр фолликулов у нормотрофических поросят больше, чем у гипотрофических животных, на 16,4 %.

Наблюдения, сделанные в процессе исследования, показали, что лимфатический узел у поросят-гипотрофиков имел гипоплазию и мономорфность лимфоидной ткани в корковом слое. Лимфоидные фолликулы едва заметны, и в них не обнаружены герминативные центры. Площадь коркового слоя составляла  $29,43 \pm 2,81$  %, а мозгового слоя –  $17,68 \pm 5,71$  % от общей площади узла [17].

Антиген Ki-67 представляет собой ядерный белок, который связан с клеточной пролиферацией и транскрипцией рибосомальной РНК. Антиген Ki-67, обнаруженный первоначально в иммуногистохимических исследованиях, является важным маркером для оценки клеточного роста. Этот белок локализован в ядре и связан с репликацией ДНК, что делает его присутствие показателем клеточной пролиферации. Характер его экспрессии изменяется во время клеточного цикла: он минимальный в G0-фазе и нарастает при входе клетки в G1-фазу, достигая пика во время митоза.

Он экспрессируется в ядрах клеток и играет роль как в интерфазных, так и в митотических клетках, и его клеточное распределение резко меняется в ходе клеточного цикла [18]. В тимусе пролиферируют в основном молодые Т-клетки в корковом веществе, в то время как в медуллярной зоне митотическое деление отмечается у редких тимоцитов и/или эпителиальных или стромальных клеток. Ki-67 в селезенке экспрессируется как в красной, так и в белой пульпе, что связано с гемопоэтической функцией



органа. В красной пульпе он экспрессируется в эритроблотах и мегакариоблотах, а в белой – в миелоидных клетках, что связано с функцией экстрамедуллярного кроветворения, которое более выражено у молодых организмов [19; 20]. Герминативные центры в лимфоузлах также выполняют функцию лимфопоэза, при этом в этих же центрах располагаются В-клетки. При антигенной стимуляции происходят гиперплазия В-клеток в фолликулах лимфоузлов и их последующая миграция в ткани [21]. В селезенке Т-клетки анализируют антигены, которые им переносят из красной пульпы специализированные лейкоциты. В белой пульпе naive Т-клетки селезенки и центральные Т-клетки памяти активируются в ответ на родственный антиген и Т-зависимые реакции герминативного центра В-клеток, что приводит к выработке антител [22]. Поэтому гиперплазия Т- и В-клеток в селезенке и лимфатических узлах будет указывать на стимуляцию иммунной системы антигенами.

В ходе анализа данных других исследований видно, что распределение позитивно окрашенных клеток маркерами Ki-67, CD-3, PAX-5 в селезенке, лимфатических узлах и тимусе как у гипотрофиков, так и у нормотрофиков не отличается. Похожие данные о распределении клеток были получены в других исследованиях [22–24]. В исследованиях T. E. S. De Oliveira, et al. было показано снижение уровня В-лимфоцитов и индекса пролиферации клеток в лимфоузлах и селезенке при воздействии иммуносупрессивных факторов [25; 26].

С учетом вышеизложенного можно сделать заключение о том, что реализация потенциала врожденного иммунитета у поросят с дефицитом массы тела находится в «депрессивном» состоянии, это приводит к дезорганизации функционального состояния органов иммуногенеза, что, в свою очередь, будет отражаться в сниженном потенциале первоначальной защиты животных от технологических стресс-факторов непрерывного производства.

#### Библиографический список

1. Демидович А. Лечение поросят с врожденной гипотрофией // Животноводство России. 2019. № 11. С. 23–24.
2. Фармакокоррекция гипотрофии и рахита молодняка свиней: монография / А. В. Савинков, М. П. Семенов, О. С. Гусева, А. И. Рязанцева. Кинель: Самарский государственный университет, 2020. 222 С.
3. Семенов М. П., Кузьмина Е. В., Варивода А. Ю. Профилактическая эффективность препарата полисилар при антенатальной гипотрофии поросят // Вестник агропромышленного комплекса Ставрополья. 2015. № 2 (18). С. 104–108.
4. Балацкая Н. В., Еремеева Е. А., Слепова О. С. [и др.] Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 5. С. 461–466.
5. Ito T., et al. Generation of recombination activating gene 1 in newborn piglets with deficiency: a model of severe combined immunodeficiency with T- and B-cell deficiency // PLoS One. 2014. Vol. 9, No. 12. Article number e113833. DOI: 10.1371/journal.pone.0113833.
6. Шахов А. Г., Сашнина Л. Ю., Тараканова К. В. [и др.] Влияние стимулятора на иммунный статус, продуктивность и сохранность поросят, отстающих в росте // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена «Знак Почета» Государственная академия ветеринарной медицины. 2021. Т. 57, № 2. С. 133–137. DOI: 10.52368/2078-0109-2021-57-2-133-137.
7. Гусева О. С., Савинков А. В., Семенов М. П. Влияние пробиотических препаратов различных серий на морфологические показатели крови поросят при гипотрофии в период отъема // Ветеринарная патология. 2013. № 1. С. 104–106.
8. Сиразиев Р. З. Гипотрофия поросят в промышленном свиноводстве. Часть 1 // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии имени В. Р. Филиппова. 2021. № 4 (65). С. 84–94.
9. Сидельникова В. И., Черницкий А. Е., Золотарев А. И., Рецкий М. И. Индивидуальная реактивность гранулоцитарной системы новорожденных телят и ее роль в патогенезе воспалительных заболеваний органов дыхания и желудочно-кишечного тракта // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50, № 4. С. 486–494.
10. Терехов В. И., Скориков А. В., Псиола В. Н. Динамика изменений иммунных и гематологических показателей у новорожденных поросят // Ветеринарная патология. 2007. № 2 (21). С. 63–66.
11. Миронова Л. П., Бутенков А. И., Гуркин А. В. Иммунологический статус поросят с гипотрофией различной степени тяжести // Ветеринария Кубани. 2008. № 3. С. 13–14.
12. Шахов А. Г., Шабунин С. В., Сашнина Л. Ю. [и др.] Состояние врожденного иммунитета у нормотрофных поросят в раннем постнатальном периоде // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2019. № 5. С. 65–69. DOI: 10.30850/vrsn/2019/5/65-69.

13. Sinkora M., Butler J. E. Ontogenesis of the pig immune system // *Evolutionary and Comparative Immunology*. 2009. Vol. 33, No. 3. Pp. 273–283. DOI: 10.1016/j.dci.2008.07.011.
14. Sinkora M., Butler J. E., Holtmeier W., Sinkorova J. Development of lymphocytes in embryonic piglets: facts and surprises // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2005. Vol. 108, No. 1-2. Pp. 177–184. DOI: 10.1016/j.vetimm.2005.08.013.
15. Степанова Х. [и др.] Раннее постнатальное развитие иммунной системы у поросят: перераспределение подмножеств Т-лимфоцитов // *Клеточная иммунология*. 2007. Т. 249, № 2. С. 73–79.
16. Михайлов Е. В., Толкачев И. С., Шабунин Б. В. [и др.] Архитектоника селезенки новорожденных поросят-гипотрофиков // *Ученые записки учреждения образования Витебская ордена «Знак Почета» Государственная академия ветеринарной медицины*. 2020. Т. 56, № 4. С. 45–49.
17. Шахов А. Г., Сашнина Л. Ю., Михайлов Е. В. [и др.] Морфофункциональное состояние тимуса у новорожденных поросят-гипотрофиков // *Ветеринарный фармакологический вестник*. 2020. № 1 (10). С. 127–139. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.1.127.
18. Михайлов Е. В., Шабунин Б. В., Хохлова Н. А. [и др.] Морфо-функциональное состояние лимфатических узлов поросят-гипотрофиков // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2020. № 3. С. 214–217. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.3.214.
19. Sun X., Kaufman P. D. Ki-67: more than a proliferation marker // *Chromosoma*. 2018. Vol. 127. Pp. 175–186. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8.
20. Nann D., Fend F. Synoptic diagnostics of myeloproliferative neoplasms: morphology and molecular genetics // *Cancers*. 2021. Vol. 13, No. 14. Article number 3528. DOI: 10.3390/cancers13143528.
21. Cenariu D., et al. Extramedullary hematopoiesis of the liver and spleen // *Journal of Clinical Medicine*. 2021. Vol. 10, No. 24. Article number 5831. DOI: 10.3390/jcm10245831.
22. Zhang Y., et al. Recycling of memory B-cells between germinal center and lymph node subcapsular sinus supports affinity maturation to antigenic drift // *Nature Communications*. 2022. Vol. 13, No. 1. Article number 2460. DOI: 10.1038/s41467-022-29978-y.
23. Lewis S. M., Williams A., Eisenbarth S. C. Structure and function of the immune system in the spleen // *Science Immunology*. 2019. Vol. 4, No. 33. Article number eaau6085. DOI: 10.1126/sciimmunol.aau6085.
24. Mikhailov E., et al. Cytomorphological features of the bone marrow of hypotrophic piglets PSVIII-6 // *Journal of Animal Science*. 2020. Vol. 98. No. Supplement\_4. P. 256. DOI: 10.1093/jas/skaa278.462.
25. Kaur H., Singh O., Pathak D. Histochemical and immunohistochemical studies of pig spleen (*Sus scrofa*) // *Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*. 2022. Vol. 18, No. 1. Pp. 23–27. DOI: 10.21887/ijvsbt.18.1.5.
26. Uychich-Vrhovnik I., et al. The effect of feeds naturally contaminated with fusarium mycotoxins on the thymus of suckling pigs // *Acta Veterinaria Hungarica*. 2020. Vol. 68, No. 2. Pp. 186–192. DOI: 10.1556/004.2020.00030.
27. De Oliveira T. E. S., et al. Seneca Valley virus induces immunosuppression in suckling pigs by selective apoptosis of B lymphocytes // *Microbial Pathogenesis*. 2021. Vol. 158. Article number 105022. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105022.

#### Об авторах:

**Борис Викторович Шабунин**, старший лаборант лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем, Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия; ORCID 0000-0002-2234-3851, AuthorID 1077849.

*E-mail: bv.shabunin@gmail.com*

**Артем Валерьевич Некрасов**, старший лаборант лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем, Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия; ORCID 0000-0002-5957-1583, AuthorID 1120121.

*E-mail: Artem20011111@yandex.ru*

**Егор Максимович Степанов**, младший научный сотрудник, лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики, Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия; ORCID 0000-0002-5887-8284, AuthorID 1099761

**Евгений Владимирович Михайлов**, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом экспериментальной фармакологии и моделирования живых систем, Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия; ORCID 0000-0001-5457-1325, AuthorID 683649. *E-mail: voronezh81@rambler.ru*

## References

1. Demidovich A. Treatment of piglets with congenital hypotrophy. *Animal Husbandry of Russia*. 2019; 11: 23–24. (In Russ.)
2. Savinkov A. V., Semenenko M. P., Guseva O. S., Ryazantseva A. I. *Kinel Pharmacocorrection of Hypotrophy and Rickets of Young Pigs: monograph*. Samara State University, 2020. 222 p. (In Russ.)
3. Semenenko M. P., Kuzminova E. V., Varivoda A. Yu. Prophylactic effectiveness of the preparation Policilar on antenatl malnutrition of pigs. *Agricultural Bulletin of Stavropol Region*. 2015; 18: 104–108. (In Russ.)
4. Balatskaya N. V., Ereemeva E. A., Slepova O. S. The content of double-positive CD3+CD4+ and CD8+ lymphocytes in the peripheral blood of patients with age-related macular degeneration. *Medical Immunology*. 2015; 7: 461–466. (In Russ.)
5. Ito T., et al. Generation of recombination activating gene 1 in newborn piglets with deficiency: a model of severe combined immunodeficiency with T- and B-cell deficiency. *PLoS One*. 2014; 9 (12): e113833. DOI: 10.1371/journal.pone.0113833.
6. Shakhov A. G., Sashnina L. Yu., Tarakanova K. V. The effect of the stimulus on the immune status, productivity and safety of piglets lagging behind in growth. *Transactions of the Educational Establishment "Vitebsk the Order of "the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine"*. 2021; 57: 133–137. DOI: 10.52368/2078-0109-2021-57-2-133-137. (In Russ.)
7. Guseva O. S., Savinkov A. V., Semenenko M. P. The effect of probiotic drugs of various series on the morphological parameters of piglets' blood in hypotrophy during weaning. *Veterinary Pathology*. 2013; 1: 104–106. (In Russ.)
8. Siraziev R. Z. Hypotrophy of piglets in industrial pig farming. Part 1. *Bulletin of the Buryat State Agricultural Academy named after V. R. Filippov*. 2021; 4: 484–494. (In Russ.)
9. Sidelnikova V. I., Chernitskiy A. E., Zolotarev A. I., Retskiy M. I. Individual reactivity of the granulocytic system of newborn calves and its role in the pathogenesis of inflammatory diseases of the respiratory and gastrointestinal tract. *Agricultural Biology*. 2015; 4: 486–494. (In Russ.)
10. Terekhov V. I., Skorikov A. V., Psiola V. N. Dynamics of changes in immune and hematological parameters in newborn piglets. *Veterinary Pathology*. 2007; 2: 63–66. (In Russ.)
11. Mironova L. P., Butenkov A. I., Gurkin A. V. Immunological status of piglets with hypotrophy of varying severity. *Veterinary Medicine of Kuban*. 2008; 3: 13–14. (In Russ.)
12. Shakhov A. G., Shabunin S. V., Sashnina L. Yu. The state of innate immunity in normotrophic piglets in the early postnatal period. *Bulletin of the Russian Agricultural Science*. 2019; 5: 65–69. DOI: 10.30850/vrsn/2019/5/65-69. (In Russ.)
13. Sinkora M. J., Butler E. Ontogenesis of the pig immune system. *Evolutionary and Comparative Immunology*. 2009; 33 (3): 273–283. DOI: 10.1016/j.dci.2008.07.011.
14. Sinkora M., Butler J. E., W. Holtmaleer W. Development of lymphocytes in embryonic piglets: facts and surprises. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2005; 108: 177–184.
15. Stepanova Kh., et al. Early postnatal development of the immune system in piglets: redistribution of subsets of T lymphocytes. *Cellular Immunology*. 2007; 2: 73–79. (In Russ.)
16. Mikhaylov E. V., Tolkachev I. S., Shabunin B. V. Architectonics of the spleen of newborn piglets-hypotrophics. *Transactions of the Educational Establishment "Vitebsk the Order of "the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine"*. 2020; 4: 45–49. (In Russ.)
17. Shakhov A. G., Sashnina L. Yu., Mikhaylov E. V. Morphofunctional state of the thymus in newborn hypotrophic piglets. *Veterinary Pharmacological Bulletin*. 2020; 1: 127–139. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.1.127. (In Russ.)
18. Mikhaylov E. V., Shabunin B. V., Khokhlova N. A. Morpho-functional state of the lymph nodes of hypotrophic piglets. *Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine*. 2020; 3: 214–217. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.3.214. (In Russ.)
19. Sun X., Kaufman P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018; 127: 175–186. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8.
20. Nann D., Fend F. Synoptic diagnostics of myeloproliferative neoplasms: morphology and molecular genetics. *Cancers*. 2021; 13 (14): 3528. DOI: 10.3390/cancers13143528.
21. Cenariu D., et al. Extramedullary hematopoiesis of the liver and spleen. *Journal of Clinical Medicine*. 2021; 10 (24): 5831. DOI: 10.3390/jcm10245831.
22. Zhang Y., et al. Recycling of memory B cells between germinal center and lymph node subcapsular sinus supports affinity maturation to antigenic drift. *Nature Communications*. 2022; 13 (1): 2460. DOI: 10.1038/

s41467-022-29978-y.

23. Lewis S. M., Williams A., Eisenbarth S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. *Science Immunology*. 2019; 4 (33): eaau6085. DOI: 10.1126/sciimmunol.aau6085

24. Mikhailov E., et al. Cytomorphological features of the bone marrow of hypotrophic piglets PSVIII-6. *Journal of Animal Science*. 2020; 98(4): 256. DOI: 10.1093/jas/skaa278.462.

25. Kaur H., Singh O., Pathak D. Histochemical and immunohistochemical studies of pig spleen (*Sus scrofa*). *Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*. 2022; 18 (1): 23–27. DOI: 10.21887/ijvsbt.18.1.5.

26. Uychich-Vrhovnik I., et al. The effect of feeds naturally contaminated with fusarium mycotoxins on the thymus of suckling pigs. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2020; 68 (2): 186–192. DOI: 10.1556/004.2020.00030.

27. De Oliveira T. E. S., et al. Seneca Valley virus induces immunosuppression in suckling pigs by selective apoptosis of B lymphocytes. *Microbial Pathogenesis*. 2021; 158: 105022. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105022.

#### **Authors' information:**

**Boris V. Shabunin**, senior laboratory assistant at the laboratory of preclinical research and modeling of biological systems, All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia; ORCID 0000-0002-2234-3851, AuthorID 1077849. *E-mail: bv.shabunin@gmail.com*

**Artem V. Nekrasov**, senior laboratory assistant at the laboratory of preclinical research and modeling of biological systems, All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia; ORCID 0000-0002-5957-1583, AuthorID 1120121. *E-mail: Artem200111111@yandex.ru*

**Egor M. Stepanov**, junior researcher, laboratory of innovative drugs of recombinant proteomics, All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia; ORCID 0000-0002-5887-8284, AuthorID 1099761

**Evgeniy V. Mikhaylov**, candidate of veterinary sciences, leading researcher, head of the department of experimental pharmacology and modeling of living systems, All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia; ORCID 0000-0001-5457-1325, AuthorID 683649.

*E-mail: voronezh81@rambler.ru*