

УДК 619:617.636.087.72:636.2

Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Василевич И.Б., научный сотрудник²
Волотовский И.Д., доктор биологических наук, академик²
Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент³
Борисик Р.Н., ассистент⁴
Руколь В.М., доктор ветеринарных наук, профессор⁴
Стрельченя И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент⁵

¹БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

³РУП «Опытная научная станция по птицеводству», г. Заславль, Республика Беларусь

⁴УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

⁵РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ТЕРАПИИ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН ПАЛЬЦЕВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Резюме

Изучено влияние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крупного рогатого скота (МСК ЖТ КРС) на микрофлору, обуславливающую гнойно-некротические поражения пальцев у коров.

Полученные результаты клинических исследований свидетельствуют о том, что введение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в схему лечения инфицированных ран пальцев наиболее эффективно уменьшает количество микроорганизмов в патологических очагах.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, микрофлора, трансплантация клеток, раны пальцев и копытец крупного рогатого скота.

Summary

The effect of mesenchymal stem cells of bovine adipose tissue on the microflora causing purulent necrotic lesions of the fingers in cows has been studied.

The obtained results of clinical studies indicate that the introduction of mesenchymal adipose tissue stem cells into the treatment regimen for infected finger wounds most effectively reduces the number of microorganisms in pathological foci.

Keywords: mesenchymal stem cells, microflora, cell transplantation, wounds of fingers and hooves in cattle.

Поступила в редакцию 25.04.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в Республике Беларусь уже практически сформировано новое крупное товарное агропромышленное производство. Преобразования в АПК предполагают создание крупных агропромышленных агрокомбинатов. Для успешной и эффективной работы на предприятиях молочного направления (фермах и комплексах) необходимо учитывать физиологические особенности крупного рогатого скота при различных системах содержания [4, 8, 12].

Применение новых технологий содержания крупного рогатого скота молоч-

ного направления в помещениях с беспривязным боксовым содержанием при механизации основных производственных процессов приводит к увеличению количества животных с клиническими признаками хромоты и распространению болезней конечностей, в частности повреждений копытец. Различные изменения со стороны рога копытец влияют не только на здоровье крупного рогатого скота, но и на его поведение. Для облегчения и усиления работы по профилактике и лечению болезней конечностей КРС разработаны обязательные требования, которые нашли отражение в республиканском регламенте

«Организационно-технологические требования при производстве молока на молочных комплексах промышленного типа», одобренном Постановлением коллегии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 4 июня 2018 г. № 16 [12, 13].

В Республике Беларусь, согласно последним исследованиям, гнойные и гнойно-некротические поражения конечностей КРС наблюдаются у 14–60 % животных от общего поголовья. Возникновение патологий конечностей происходит в зависимости от породы, возраста животных, времени года, условий и системы содержания [1, 2, 4, 10, 13]. По мнению Dolcheck K.A. et al., заболевания копытцев встречаются даже в высокоразвитых странах. В частности, сообщается о том, что 90 % молочных тёлочек в доильных залах имеют заболевания копытцев, спровоцированные передвижением животных с пастбищ на твёрдые покрытия доильных площадок [21, 22].

Лечение болезней копытцев крупного рогатого скота начинается с санации и терапии, направленной на заживление гнойно-некротического очага поражения (расчистка копытцевого рога, использование антибактериальных, пробиотических препаратов и др.), снятие воспалительной реакции и болевого синдрома, а также повышение резистентности организма (стимулирующая, заместительная, симптоматическая терапия) [2, 4, 17, 18]. Однако при недостаточной эффективности первоначального этапа лечения развиваются системные осложнения, так как в ране накапливаются продукты некроза, сгустки фибрина, являющиеся питательной средой для микроорганизмов, в борьбе с которыми требуется применение антибактериальных препаратов. Как известно, широкое применение антибиотиков сопровождается распространением резистентных к антибиотикам микроорганизмов, что остается одной из самых непростых и актуальных проблем ветеринарной медицины [10, 12, 20, 25].

Новые методы терапии должны быть направлены на увеличение эффективности лечения, снижение случаев рецидивов болезней, сокращение сроков выздоровления, уменьшение стоимости лечения, фармакологической нагрузки на организм

и сохранение качества мяса и молока животных, а также снижение периода каренции [18, 19, 23].

Все большую популярность в ветеринарной практике набирает клеточная терапия. Высокий терапевтический потенциал МСК ЖТ в лечении гнойно-некротических поражений нижнего отдела конечностей крупного рогатого скота основывается на способности МСК обуславливать антибактериальный, противовоспалительный и регенеративный эффект [6, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 18, 19, 23].

Использование клеточных технологий может являться одним из наиболее перспективных подходов в решении проблем лечения хирургических болезней крупного рогатого скота, в том числе пальцев и копытцев животных. Эффективность и безопасность применения МСК подтверждена многочисленными литературными данными и работами белорусских ученых, разработавших на данный момент более 15 клеточных технологий лечения различных болезней животных и человека [3, 5, 8, 10, 11].

Клеточная технология на основе МСК может являться одним из перспективных подходов в терапии и профилактике болезней незаразной этиологии, а также инфицированных ран [3, 6, 8, 14, 18].

Цель настоящих исследований – провести оценку клеточной технологии с применением мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при лечении инфицированных ран в области пальцев крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения испытаний мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крупного рогатого скота сотрудники ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» предоставили культуру мезенхимальных стволовых клеток с аналитическим паспортом. МСК ЖТ КРС представляли собой стерильную бесцветную опалесцирующую жидкость со взвесью клеток на физиологическом растворе.

В условиях животноводческих хозяйств республики проведена сравнительная оценка клеточной и стандартной терапии по эффективности действия на микроорганизмы, присутствующие в инфицированных ранах в области пальцев.

Лабораторные методы включали в себя качественное и количественное изучение микрофлоры в области пальцев в динамике (до и после лечения).

Численность микроорганизмов (количественный состав) в ране проводили методом определения численности бактерий в 1 г ткани с последующей микроскопией. Первичное выделение культур микроорганизмов, находящихся на поверхности раны, проводили классическими методами, используя метод микроскопии препаратов-отпечатков из места локализации патологического процесса, окрашенных по Романовскому-Гимза, посевы на селективные среды, а идентификацию микроорганизмов проводили на автоматической системе, обеспечивающей идентификацию микроорганизмов, Vitek 2-compat с использованием программного обеспечения Windows. Для изготовления препаратов-отпечатков рану очищали стерильным ватно-марлевым тампоном и стерильным предметным стеклом прикасались к месту исследования. Препарат высушивали и фиксировали путем погружения в метиловый спирт при экспозиции 15 мин. После окрашивания исследовали методом световой микроскопии, используя инвертированный микроскоп Nikon ECLIPSE TS 100 (Япония).

Для определения качественного состава микробных возбудителей было сформировано 2 группы, опытная и контрольная, по 10 коров в каждой с инфицированными ранами в дистальной области конечностей.

Животным контрольной группы проводилась терапия инфицированных ран в области пальцев по стандартной схеме, применяемой в хозяйстве, с использованием антибактериальной, симптоматической и заместительной терапии.

Материал от больных животных с соблюдением правил асептики и антисептики был отобран одноразовым стерильным зондом с тампоном в пробирке. При взятии пробы пробирку открывали, тампон пропитывали экссудатом из патологического очага и помещали в пробирку. Полученный материал высевали на кровяной агар, мясо-пептонный агар (МПА), агар Сабуро, среда Эндо, мясо-пептонный бульон (МПБ).

Перед лечением коров опытной и контрольной групп нами была проведена механическая очистка пальцев и функциональная расчистка копытец, а далее – санация раневого очага по принципу асептики и антисептики. Рану осушали стерильными салфетками. В дальнейшем проведена хирургическая обработка раны и наложение защитной бинтовой влагоустойчивой фиксирующей повязки. В опытной группе было исключено дополнительное лечение с применением антибактериальных средств.

В опытной группе коров дополнительно в область локализации инфицированных ран вводили мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани. Клеточный препарат вводили инъекционно в виде суспензии на физиологическом растворе в область свода кожи межпальцевой щели, как можно ближе к области раневого дефекта, в дозе 4,0 мл с концентрацией клеток $2,5 \times 10^6$. Препарат применялся однократно.

Все животные, участвующие в опыте, содержались в одинаковых условиях, и за ними велось клиническое наблюдение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При бактериологическом исследовании смывов отмечен рост микроорганизмов на средах МПБ и МПА, кровяном агаре, среде Эндо, при этом на агаре Сабуро рост микроорганизмов отсутствовал.

При микроскопическом исследовании препаратов-отпечатков, взятых с поверхности патологического процесса после асептики и антисептики пораженного участка до применяемого лечения у животных опытной и контрольной групп, обнаруживались различные микроорганизмы в ассоциации, преимущественно короткие, длиной 2–3 и диаметром 0,5–0,8 мкм, грамтрицательные палочки, не образующие спор и капсул, а также шаровидные микроорганизмы диаметром 1,0–1,5 мкм, располагающиеся одиночно, попарно и гроздьями, которые спор не образуют, однако образуют капсулу, по Граму окрашиваются положительно.

При исследовании навески гомогената под микроскопом было обнаружено от 3 до 5 бактерий, значит, в 1 г ткани биоптата раневого дефекта содержалось более 10^5 – 10^6 бактерий. На 14-е сутки при повторном изготовлении препаратов-отпе-

чатков у коров, которым вводились стволовые клетки, количество микробов значительно уменьшилось, что подтвердилось исследованием биоптата тканей. При осмотре под микроскопом в навеске биоптата отсутствовали бактерии, из чего следует, что в 1 г ткани содержалось 10^5 бактерий или меньше, тогда как у животных контрольной группы в ране на 14-е сутки было более 10^5 бактерий.

После выделения чистых культур микроорганизмов их идентификацию провели на автоматической системе Vitek 2-compact.

На плотных питательных средах (кровяной агар, МПА) наблюдали характерный рост колоний размером 1,0–4,0 мм округлой, слегка выпуклой формы с ровными краями и влажной глянцевой поверхностью. Цвет колоний был эмалево-белый и золотистый. На МПБ наблюдался характерный рост с помутнением среды, обильным осадком и серовато-белой пленкой. Таким образом, на МПА изолирован эпидермальный (*Staphylococcus epidermidis*) и золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) (рисунок 1).



Рисунок 1 – Культуральные свойства микроорганизмов рода *Staphylococcus* на МПА



Рисунок 2 – Культуральные свойства микроорганизмов рода *Escherichia*

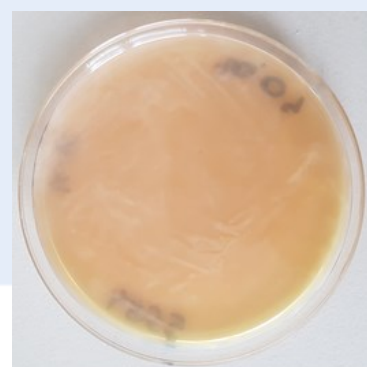


Рисунок 3 – Культуральные свойства микроорганизмов рода *Proteus*

При бактериологическом исследовании одновременно со стафилококками выделяли и кишечную палочку (*Escherichia coli*).

При микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму, обнаруживали грамотрицательные единично располагающиеся палочки. На МПА через 24 ч появлялись сочные круглые, с ровными краями и гладкой поверхностью (S-формы) серо-белого цвета колонии, на среде Эндо – малиновые круглые, гладкие, с металлическим блеском колонии диаметром 2,0–3,0 мм со слегка приподнятой в центре поверхностью (рисунок 2).

На МПБ – интенсивное помутнение среды и наличие незначительного осадка, легко разбивающегося при встряхивании (*E. coli*).

При культивировании на МПА и МПБ обнаруживали микроорганизмы, которые давали рост, присутствовал неприятный гнилостный запах. На МПА наблюдался рост микроорганизмов без образования отдельных колоний с наличием вуалеобразного налета (рисунок 3).

Обобщенные и проанализированные данные, полученные при изучении микроорганизмов из инфицированных ран области пальцев крупного рогатого скота, представлены в таблице.

Таблица – Результаты выделения микрофлоры от коров с инфицированными ранами в области пальцев

Вид микроорганизма	Количество выделенных культур	Процент выделяемости, %
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14	70
<i>Proteus vulgaris</i>	12	60
<i>Escherichia coli</i>	16	80
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	90

Из данных таблицы видно, что при инфицированных ранах в дистальных отделах конечностей у коров наиболее часто выявляются микроорганизмы *Staphylococcus aureus* (90 %), *Escherichia coli* (80 %), *Staphylococcus epidermidis* (70 %), *Proteus vulgaris* (60 %). Другие виды микроорганизмов составляли менее 6 % в отобранном экссудате.

При проведении клинических исследований нами было установлено, что в результате лечения животных опытной группы с применением мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, начиная с третьих суток, отмечено улучшение общего состояния. При осмотре раневого дефекта было установлено уменьшение отечности ткани и снижение болезненности. К 7–10-м суткам размеры раневого дефекта значительно уменьшились, раны заполнились грануляционной тканью, а по краям раны наблюдали рост эпидермального ободка или образование струпа. Животные уверенно опирались на пораженную конечность. Защитная повязка не накладывалась. На 13–14-е сутки у 3 коров при визуальном осмотре поверхность раны была заполнена здоровой грануляционной тканью, у 7 животных на месте инфицированных ран наблюдалось образование струпа. Полное клиническое выздоровление наступило в среднем на 15–17-е сутки.

В результате лечения животных контрольной группы при осмотре через 5–7 дней после начала лечения общее состояние было удовлетворительным. У всех животных сохранялась болезненность и отечность, 3 коровы двигались неохотно и практически не наступали на пораженную конечность. Поверхность раны немного подсохла, сохранялась кровоточивость. К 7–10-м суткам размеры раневого дефекта уменьшились незначительно, раны медленно заполнялись грануляционной тканью, рост эпидермального ободка по краям раны происходил медленно. К 13–14-м суткам большая часть раны заполнена грануляционной тканью и частично покрыта струпом. Местные изменения характеризовались уменьшением болезненности и отечности

тканей. На 15–17-е сутки при визуальном осмотре поверхность раны была заполнена грануляционной тканью и покрыта струпом. Полное клиническое выздоровление у коров наступило в среднем на 20–23-и сутки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественная оценка микрофлоры из инфицированных ран в области пальцев крупного рогатого скота опытной и контрольной групп показала, что до начала терапии в раневых очагах обнаруживалось более 10^5 – 10^6 бактерий. На 10-е сутки у коров опытной группы в смывах препаратов-отпечатков микроорганизмы отсутствовали, что подтверждалось исследованием биоптата тканей под микроскопом, тогда как у животных контрольной группы в ране на 10-е сутки по-прежнему обнаруживалось не менее 10^5 бактерий. Таким образом, было установлено, что применение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крупного рогатого скота в комплексной схеме лечения более эффективно уменьшает количество микроорганизмов в патологических очагах.

При клиническом исследовании было установлено, что применение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при лечении крупного рогатого скота с инфицированными ранами позволяет сократить сроки лечения животных в среднем на 5–6 суток.

В результате данного исследования установлено, в частности, что применение мезенхимальных стволовых клеток может быть альтернативой использованию антибиотиков в животноводстве, которые вызывают известные негативные последствия, связанные прежде всего с появлением устойчивых штаммов патогенных микроорганизмов, встречающихся как у животных, так и человека. Изложенные в данной статье результаты также представляют собой опыт применения МСК в лечении заболеваний дистального отдела конечностей крупного рогатого скота и будут использованы при разработке схем лечения животных с инфицированными ранами.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Ветеринарная ортопедия: учебник для среднего профессионального образования / А. А. Стекольников [и др.]. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : Юрайт, 2019. – 292 с.*

2. Волотко, И. И. Профилактика и лечение эндогенного кормового травматизма у коров / И. И. Волотко, А. И. Безин, Н. И. Бутакова // Известия ОГАУ. – 2014. – № 6 (50). – С. 34–42.
3. Волотовский, И. Д. Стволовые клетки: перспективы развития клеточных технологий / И. Д. Волотовский, Е. С. Лобанок, Е. Н. Лойко // Наука и инновации. – 2011. – № 1 (95). – С. 17.
4. Елисеев, А. Н. Болезни конечностей у коров в условиях молочных комплексов, профилактика, лечение / А. Н. Елисеев, С. М. Коломийцев, А. И. Бледнов // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 9. – С. 124–132.
5. Клеточные технологии в лечении пациентов с рецессией десны / С. П. Рубникович [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2019. – 199 с.
6. Клинические возможности применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани при лечении пациентов с трофическими язвами нижних конечностей / Е. В. Баранов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. VIII. – № 2. – С. 78–83.
7. Кривенко, С. И. Опыт и перспективы клинического применения мезенхимальных стволовых клеток / С. И. Кривенко, А. Л. Усс, Н. И. Дедюля // Актуальные вопросы гематологии: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гомель, 15-16 сент. 2011 г. / Гомел. гос. мед. ун-т. – Гомель, 2011. – С. 51–54.
8. Корочкин, Л. И. Стволовые клетки в биологии и медицине / Л. И. Корочкин // Вестн. эстет. медицины. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 9–18.
9. Локальная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и фибробластов кожи: особенности регенерации кожного покрова и сравнительная оценка показателей заживления экспериментальных раневых дефектов / Е. В. Баранов [и др.] // Воен. медицина. – 2017. – № 2. – С. 79–86.
10. Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике некробактериоза, пальцевого дерматита и болезней копыт крупного рогатого скота незаразной этиологии / Д. А. Хузин [и др.]; Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – М. : Минсельхоз России, 2017. – 41 с.
11. Морфологические признаки эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в комплексном лечении длительно незаживающих инфицированных ран в эксперименте / В. Я. Третьяк [и др.] // Военная медицина. – 2012. – № 1. – С. 122–124.
12. Организационно-технологические требования при производстве молока на молочных комплексах промышленного типа : одобрены Постановлением коллегии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 4 июня 2018 г. № 16.
13. Организация сельскохозяйственного производства : учеб. пособие / Н. С. Яковчик, Н. Н. Котковец, П. И. Малихтарович ; под общ. ред. проф. Н. С. Яковчика. – Минск : ИВЦ Минфина, 2016. – 598 с.
14. Особенности регенерации кожного покрова при применении мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани у лабораторных животных с дефектом мягких тканей / Х. А. Сахаб [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – № 2. – С. 134–139.
15. Петренко, А. Ю. Трансплантация стволовых клеток – перспективное направление терапии 21 века. 2. Стволовые кроветворные клетки из разных источников / А. Ю. Петренко, В. И. Грищенко // Междунар. мед. журн. – 2003. – Т. 9, № 1. – С. 123–129.
16. Петренко, А. Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А. Ю. Петренко, Ю. А. Хуанов, Э. Н. Иванов. – Луганск : Пресс-Экспресс, 2011. – 368 с.
17. Руколь, В. М. Болезни конечностей у крупного рогатого скота в условиях интенсификации молочного скотоводства : монография / В. М. Руколь, В. А. Журба. – Витебск : ВГАВМ, 2022. – 368 с.
18. Руколь, В. М. Диагностика и профилактика болезней конечностей крупного рогатого скота / В. М. Руколь, В. А. Журба. – Витебск : ВГАВМ, 2021. – 178 с.
19. Сахаб, Хайдар А. Противовоспалительный эффект мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани при лечении инфицированных ран в эксперименте / Хайдар А. Сахаб, С. И. Третьяк, Е. В. Баранов // Медицинский журнал. – 2012. – С. 77–81.
20. Хузин, Д. А. Болезни пальцев и копыт у коров их профилактика и лечение / Д. А. Хузин, Т. Р. Гайнутдинов, Ф. А. Хусниев // Ветеринарный врач. – 2014. – № 5. – С. 24–28.
21. Johann Kofler Pathogenesis and Treatment of Toe Lesions in Cattle Including «Nonhealing» Toe Lesions // Vet. Vet. Clin. Food Anim. – 2017. – V. 33. – С. 301–328.
22. Estimating the value of infectious or noninfectious foot disorder prevention strategies within dairy farms, as influenced by foot disorder incidence rates and prevention effectiveness / K.A. Dolecheck [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2019 Jan, Volume 102, – Issue 1. – P. 731–741.
23. Fortier, L. A. Stem cells in veterinary medicine / L. A. Fortier, A. J. Travis // Stem Cell Res. Ther. – 2011. – V. 2. – P. 9.
24. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species / A.B.T. Hill [et al.] // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – V. 10. – P. 44.
25. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon / E. E. Godwin [et al.] // Equine Vet. J. – 2012. – V. 44. – P. 25–32.