

Василий Сергеевич Власенко^{1✉}, Иван Николаевич Кошкин²

^{1,2}Омский аграрный научный центр, Омск, Россия

¹vvs-76@list.ru

²in.koshkin@omgau.org

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ МОРСКИХ СВИНОК, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ КОНЪЮГАТАМИ ПОСЛЕ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ *Mycobacterium smegmatis*

Цель исследования – оценить функциональное состояние аэробных и анаэробных бактерицидных систем нейтрофилов у морских свинок, обработанных экспериментальными конъюгатами антигенов БЦЖ с бетулиновой и бетулоновой кислотой после инфицирования *Mycobacterium smegmatis*. Проведен эксперимент на 20 морских свинках, разделенных на 4 группы по 5 животных в каждой. Особей 1–3-й групп инфицировали *M. smegmatis* подкожно в дозе 5 мг/мл, затем через 14 сут животным 2-й группы вводили конъюгат антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой подкожно в дозе 0,5 мл и 3-й группы – конъюгат антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой подкожно в той же дозе. Контрольную группу составили интактные морские свинки. На 14-е, 28-е и 42-е сут от начала эксперимента производили отбор проб крови для постановки реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) и оценки функционального состояния нейтрофилов. В результате проведенных исследований установлено, что инфицирование животных *M. smegmatis* усиливает деятельность внутриклеточных бактерицидных компонентов нейтрофилов, на что указывало достоверное увеличение среднего цитохимического коэффициента (СЦК) катионных белков с 14-х по 28-е сут на 30–53 % и СЦК миелопероксидазы на 16–62,5 % в течение всего срока эксперимента. Оба экспериментальных конъюгата оказывали дополнительное стимулирующее влияние на работу внутриклеточных антибактериальных компонентов фагоцитов, способствуя быстрой элиминации микобактерий через 14 сут после введения препаратов, что подтверждалось результатами РНИФ. Конъюгат антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой в отличие от препарата с бетулиновой кислотой проявлял более выраженное воздействие на ферментную активность миелопероксидазы как через 14 сут, так и через 28 сут после его введения. Таким образом, полученные положительные результаты позволяют предположить возможное использование экспериментальных препаратов в области ветеринарии для профилактики и лечения микобактериозов, вызванных быстрорастущими нетуберкулезными микобактериями.

Ключевые слова: морские свинки, нетуберкулезные микобактерии, нейтрофилы, катионные белки, миелопероксидаза, бетулоновая кислота, бетулиновая кислота

Для цитирования: Власенко В.С., Кошкин И.Н. Функциональное состояние нейтрофилов морских свинок, иммунизированных экспериментальными конъюгатами после сенсibilизации *Mycobacterium smegmatis* // Вестник КрасГАУ. 2025. № 12. С. 139–148. DOI: 10.36718/1819-4036-2025-12-139-148.

Vasily Sergeyevich Vlasenko^{1✉}, Ivan Nikolaevich Koshkin²

^{1,2}Omsk Agrarian Scientific Center, Omsk, Russia

¹vvs-76@list.ru

²in.koshkin@omgau.org

NEUTROPHILS FUNCTIONAL STATE IN GUINEA PIGS IMMUNIZED WITH EXPERIMENTAL CONJUGATES AFTER SENSITIZATION WITH *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*

The aim of the study is to evaluate the functional state of the aerobic and anaerobic bactericidal systems of neutrophils in guinea pigs treated with experimental conjugates of BCG antigens with betulinic and betulonic acids after infection with *Mycobacterium smegmatis*. The experiment was conducted on 20 guinea pigs, divided into 4 groups of 5 animals each. Individuals of groups 1–3 were infected with *M. smegmatis* subcutaneously at a dose of 5 mg/ml. Then, 14 days later, animals of group 2 were administered a conjugate of BCG antigens with betulinic acid subcutaneously at a dose of 0.5 ml, and animals of group 3 were administered a conjugate of BCG antigens with betulonic acid subcutaneously at the same dose. The control group consisted of intact guinea pigs. On the 14th, 28th and 42nd days from the start of the experiment, blood samples were taken to perform an indirect immunofluorescence reaction (IIFR) and assess the functional state of neutrophils. The studies revealed that infection of animals with *M. smegmatis* enhances the activity of intracellular bactericidal components of neutrophils, as evidenced by a significant increase in the average cytochemical coefficient (ACC) of cationic proteins from days 14 to 28 by 30–53 % and the ACC of myeloperoxidase by 16–62.5 % throughout the entire experiment. Both experimental conjugates exerted an additional stimulating effect on the function of intracellular antibacterial components of phagocytes, promoting the rapid elimination of mycobacteria 14 days after drug administration, as confirmed by the results of the IIFR. The BCG antigen conjugate with betulonic acid, compared to the betulinic acid-only preparation, exhibited a more pronounced effect on myeloperoxidase enzymatic activity both 14 and 28 days after administration. Thus, the positive results suggest the potential use of these experimental preparations in veterinary medicine for the prevention and treatment of mycobacterioses caused by rapidly growing non-tuberculous mycobacteria.

Keywords: guinea pigs, non-tuberculous mycobacteria, neutrophils, cationic proteins, myeloperoxidase, betulonic acid, betulinic acid

For citation: Vlasenko VS, Koshkin IN. Neutrophils functional state in guinea pigs immunized with experimental conjugates after sensitization with *Mycobacterium smegmatis*. *Bulletin of KSAU*. 2025;(12):139-148. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2025-12-139-148.

Введение. Род *Mycobacterium*, помимо наиболее известных строгих внутриклеточных патогенов человека и животных – *M. tuberculosis* и *M. bovis*, также представлен облигатными и условно-патогенными микобактериями, объединенными в группу нетуберкулезных микобактерий (НТМ), имеющую широкое распространение в окружающей среде (воде, почве, пыли и т. д.) и способную вызывать инфекции у людей и других млекопитающих [1, 2].

В микробиоте животных можно выявить несколько видов НТМ, относящихся к группе быстрорастущих, которые вызывают развитие заболеваний на фоне нарушения иммунных функций организма [3]. Несмотря на то, что заражение животных НТМ, как правило, не ассоциируется с проявлением клинических признаков, некоторыми учеными было описано наличие гранулематозных поражений. В частности *M. fortuitum* вызывает патологию такого рода в коже, легких, лимфатических узлах и суставах, являясь преобладающим видом, выделенным у крупного рогатого скота из туберкулезоподобных поражений [4–6], *M. smegmatis* – в тканях молочной

железы крупного рогатого скота [7], а *M. phlei* – в лимфатических узлах в виде пиогранулематозной реакции [8].

Многочисленные данные также свидетельствуют, что быстрорастущие микобактерии чаще других видов вызывают перекрестные реакции у не больного туберкулезом скота при диагностическом тестировании с помощью наиболее распространенного метода – внутрикожной туберкулиновой пробы. В частности на территории России ветеринарными лабораториями НТМ этого типа выделены в 59,5 % случаев от крупного рогатого скота, имеющего неспецифические реакции на введение аллергена [9]. Аналогичные данные получены учеными Сибирского региона [10], Республики Дагестан [11, 12], которыми установлено доминирование *M. phlei*, *M. smegmatis* и *M. fortuitum* в общей структуре изолированных культур.

Отмечается, что быстрорастущие штаммы НТМ, выделенные от домашних и диких животных, в определенной степени устойчивы к большинству антибиотиков, рекомендованных для лечения людей, а инфекции, вызванные этим

типом микобактерий, очень трудно поддаются лечению и часто рецидивируют [13, 14]. Все это указывает на необходимость разработки эффективных вакцин и лекарственных препаратов.

В настоящее время, несмотря на широкое распространение НТМ, вакцины против этих микроорганизмов отсутствуют. Однако для разработки иммунобиологических препаратов для лечения или профилактики микобактериозов можно внедрить те же самые стратегии, которые рассматриваются в отношении патогенных микобактерий [15].

К неоднозначному утверждению приходят разные исследователи, обратившиеся к вопросу использования с этой целью бациллы Кальметта-Герена. Одни отмечают потенциал вакцины БЦЖ в плане перекрестно-защитного профилактического и иммунотерапевтического эффекта против некоторых значимых видов НТМ [16, 17], другие, напротив, указывают на отсутствие и даже снижение эффективности в случае ее введения сенсibilизированным животным [18, 19]. Вместе с этим отмечается, что негативное влияние микобактерий окружающей среды на последующую иммунизацию отсутствовало в тех случаях, когда применяли инактивированные противотуберкулезные препараты [20].

Ранее были сконструированы специфические иммуномодуляторы, полученные из культуры вакцинного штамма БЦЖ, разрушенной ультразвуком, а затем конъюгированной с бетулином и его производными: бетулиновой и бетулоновой кислотой. Экспериментальные конъюгаты продемонстрировали выраженную защитную эффективность против возбудителя бычьего туберкулеза [21], а также способствовали ускоренному выведению микобактерий из организма морских свинок, сенсibilизированных *Mycobacterium scrofulaceum* (2-й группы по Раньону), за счет стимуляции иммунной функции нейтрофильных гранулоцитов [22].

Цель исследования – оценить функциональное состояние аэробных и анаэробных бактерицидных систем нейтрофилов у морских свинок, обработанных экспериментальными конъюгатами антигенов БЦЖ с бетулиновой и бетулоновой кислотой после инфицирования быстрорастущими микобактериями (4-й группы по Раньону).

Объекты и методы. Объектом исследования являлись морские свинки, подобранные по принципу аналогов (масса – 0,4–0,5 кг, возраст – 4–5 мес.). Экспериментальная работа с животными

осуществлялась согласно требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. и одобрена локальным независимым этическим комитетом ФГБНУ «Омский АНЦ» по уходу и использованию лабораторных животных.

Для заражения использовали 14–21-суточную культуру из Биоресурсной коллекции патогенных микроорганизмов *Mycobacterium smegmatis* (быстрорастущие микобактерии, 4-я группа по классификации Раньона), которую инокулировали подкожно в область паха слева в дозе 5 мг/мл.

Получение антигенных комплексов из выращенного на жидкой питательной среде вакцинного штамма БЦЖ, а также их последующую конъюгацию с бетулиновой и бетулоновой кислотой осуществляли по методике, описанной в работе [23]. Синтез производных бетулина проведен на кафедре органической и экологической химии Института химии ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет» профессором, доктором химических наук И.В. Кулаковым.

Для эксперимента было отобрано 20 морских свинок, разделенных на 4 группы по 5 голов в каждой. Животным 1–3-й группы была инокулирована культура *M. smegmatis*, затем через 14 сут особям 2-й группы был введен конъюгат антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой подкожно в область паха справа в дозе 0,5 мл и 3-й группы – конъюгат антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой по той же схеме. Еще 5 интактных морских свинок служили в качестве контроля.

Отбор проб крови производили из ретроорбитального венозного сплетения с помощью микропипетки на 14-е, 28- и 42-е сут после введения *Mycobacterium smegmatis* для оценки состояния аэробных (миелопероксидаза) и анаэробных (катионные белки) бактерицидных систем нейтрофилов, а также выявления антигена в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) в соответствии с методическими рекомендациями [24].

Для математической обработки цифрового материала были применены стандартные методы вариационной статистики, которые включали определение средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической ($m \pm$). Межгрупповые сравнения осуществлялись с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с постхоками Тьюки. Оценку достоверности различий (p) между средними величинами контрольной и опытной групп проводили с по-

мощью t-критерия Стьюдента и критерия Тьюки и при уровне значимости $p \leq 0,05$ их считали статистически достоверными.

Результаты и их обсуждение. Цитохимические параметры у интактных морских свинок характеризовались наличием ($21,80 \pm 1,62$) % нейтрофилов с высокой насыщенностью гранул цитоплазмы миелопероксидазой; ($10,80 \pm 2,58$) % – со средней и ($9,00 \pm 1,18$) % фагоцитов с низкой плотностью гранул (табл. 1). Аналогичные показатели, классифицирующие фагоциты по содержанию катионных белков, составили ($30,60 \pm 3,23$) %, ($13,20 \pm 2,59$) и ($7,80 \pm 2,82$) % соответственно. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) катионных белков был несколько выше, чем СЦК миелопероксидазы (соответственно ($1,26 \pm 0,06$) и ($0,96 \pm 0,09$) у.е.) за счет большей численности клеток с высокой и средней плотностью гранул.

Инфицирование морских свинок НТМ сопровождалось усилением деятельности антимикробных компонентов нейтрофилов к 14-м сут от начала эксперимента, на это указывало достоверное повышение во всех опытных группах числа нейтрофилов с высокой насыщенностью гранул миелопероксидазой, а также катионными белками. Так, в 1-й опытной группе количество таких клеток с миелопероксидазой и катионными белками относительно контроля возрастало соответственно в 1,79 и 1,5 раза, во 2-й – в 1,86 и 1,59 раза и 3-й – в 1,71 и 1,7 раза.

Вследствие этих изменений также происходило увеличение СЦК миелопероксидазы в среднем в 1,58–1,62 раза ($p < 0,01$) в 1–3-й группах относительно контрольной группы, а также СЦК катионных белков – в 1,58–1,62 раза ($p < 0,05$) в группах инфицированных животных по сравнению с интактными.

Таблица 1

Ферментная активность миелопероксидазы и содержание катионных белков нейтрофилов у морских свинок на 14-е сут после сенсibilизации НТМ, $M \pm m$
Myeloperoxidase enzyme activity and cationic protein content of neutrophils in guinea pigs on the 14th day after sensitization with NTM, $M \pm m$

Группа животных	Насыщенность цитоплазмы гранулами, %			СЦК, у.е.
	высокая	средняя	низкая	
Миелопероксидаза				
Контрольная	$21,80 \pm 1,62$	$10,80 \pm 2,58$	$9,00 \pm 1,18$	$0,96 \pm 0,09$
1-я опытная	$39,00 \pm 3,14^{**A}$	$15,20 \pm 2,39$	$8,60 \pm 2,09$	$1,56 \pm 0,08^{**A}$
2-я опытная	$40,60 \pm 2,66^{***A}$	$12,20 \pm 1,28$	$6,40 \pm 1,36$	$1,52 \pm 0,10^{**A}$
3-я опытная	$37,40 \pm 3,81^{**A}$	$15,20 \pm 1,02$	$12,40 \pm 1,50$	$1,55 \pm 0,11^{**A}$
Катионные белки				
Контрольная	$30,60 \pm 3,23$	$13,20 \pm 2,59$	$7,80 \pm 2,82$	$1,26 \pm 0,06$
1-я опытная	$46,00 \pm 5,83^*$	$19,80 \pm 2,20$	$9,60 \pm 2,31$	$1,87 \pm 0,16^{**A}$
2-я опытная	$48,60 \pm 5,91^*$	$17,20 \pm 3,26$	$12,60 \pm 3,03$	$1,93 \pm 0,11^{**A}$
3-я опытная	$52,00 \pm 7,05^*$	$11,80 \pm 2,44$	$5,20 \pm 0,37$	$1,85 \pm 0,18^{*A}$

Примечание: *различия относительно контрольной группы достоверны на уровне $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента; А – достоверность к значениям контрольной группы ($p_1 < 0,05$) по критерию Тьюки.

Однофакторный дисперсионный анализ параметров функционального состояния нейтрофилов у морских свинок на 14-е сут после инфицирования НТМ указывал на неоднородность между группами средних величин фагоцитов, имеющих высокую насыщенность цитоплазмы гранулами миелопероксидазой ($p < 0,01$), а также СЦК миелопероксидазы ($p < 0,001$) и СЦК катионных белков ($p < 0,01$). В частности значения высокоактивных клеток с миелопероксидазой были выше на 71–86 % ($p_1 < 0,01$), СЦК миелоперокси-

дазы – на 58–62,5 % ($p_1 < 0,01$), СЦК катионных белков – на 47–53 % ($p_1 < 0,05$) во всех опытных группах по сравнению с интактными животными.

При постановке РНИФ в мазках крови у 100 % морских свинок 1–3-й групп на 14-е сут после инокуляции *M. smegmatis* был обнаружен микобактериозный антиген с помощью гомологичных сывороток, полученных от зараженных животных, тогда как у всех интактных особей реакция была отрицательной.

К 28-м сутк после инокуляции НТМ (1-я группа) активность антимикробных компонентов нейтрофилов сохранялась на более высоком уровне по сравнению с контрольной группой (табл. 2). В частности увеличивалось число высокоактивных клеток с миелопероксидазой и катионными белками соответственно в 1,33 ($p < 0,05$) и 1,44 раза ($p < 0,01$) относительно интактных морских свинок. Также в этой группе наблюдалось достоверное повышение СЦК соответственно в 1,21 и 1,3 раза.

В случае введения через 14 сут после инфицирования НТМ экспериментального конъюгата с бетулоновой кислотой (3-я группа) также наблюдали усиление функционального состояния ней-

трофилов. Это происходило за счет увеличения численности клеток с высокой насыщенностью гранул миелопероксидазой и катионными белками соответственно в 1,33 ($p < 0,01$) и 1,39 раза ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. Повышению также подверглись СЦК миелопероксидазы в 1,25 раза ($p < 0,01$) и СЦК катионных белков в 1,36 раза ($p < 0,05$).

При введении конъюгата с бетулиновой кислотой (2-я группа) наблюдалось только усиление деятельности катионных белков, где также относительно группы интактных морских свинок увеличивался процент нейтрофилов с высокой активностью гранул в 1,42 раза ($p < 0,05$), а также СЦК в 1,45 раза ($p < 0,01$).

Таблица 2

Ферментная активность миелопероксидазы и содержание катионных белков нейтрофилов у морских свинок на 28-е сут после сенсibilизации НТМ (14-е сут после введения конъюгата), $M \pm m$
Myeloperoxidase enzyme activity and cationic protein content of neutrophils in guinea pigs on the 28th day after sensitization with NTM (14th day after administration of the conjugate), $M \pm m$

Группа животных	Насыщенность цитоплазмы гранулами, %			СЦК, у.е.
	высокая	средняя	низкая	
Миелопероксидаза				
Контрольная	23,20 ± 1,98	12,80 ± 1,16	8,60 ± 0,98	1,04 ± 0,04
1-я опытная	31,00 ± 1,67 ^{*A}	13,00 ± 1,26	7,60 ± 1,33	1,26 ± 0,06 ^{*A}
2-я опытная	25,60 ± 2,34	13,60 ± 0,98	12,00 ± 1,30	1,16 ± 0,07
3-я опытная	31,00 ± 1,09 ^{**A}	15,40 ± 0,60	6,20 ± 1,39 ^C	1,30 ± 0,03 ^{**A}
Катионные белки				
Контрольная	28,60 ± 1,36	13,00 ± 2,47	7,40 ± 2,64	1,19 ± 0,06
1-я опытная	41,20 ± 1,83 ^{**}	12,00 ± 1,70	7,80 ± 3,35	1,55 ± 0,10 [*]
2-я опытная	40,60 ± 3,99 [*]	15,40 ± 1,72	16,40 ± 2,99	1,69 ± 0,08 ^{**A}
3-я опытная	39,80 ± 4,61 [*]	18,00 ± 3,29	6,40 ± 1,96	1,62 ± 0,16 [*]

Примечание: *различия относительно контрольной группы достоверны на уровне $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по *t*-критерию Стьюдента; A – достоверность к значениям контрольной группы ($p_1 < 0,05$); C – к значениям 2-й опытной группы ($p_3 < 0,05$) по критерию Тьюки.

Сравнение межгрупповых значений с помощью дисперсионного анализа через 28 сут после инфицирования НТМ (14 суток после введения экспериментальных конъюгатов) морских свинок выявило неоднородность в содержании клеток с высокой насыщенностью цитоплазмы гранулами с миелопероксидазой и катионными белками и их СЦК ($p < 0,05$), а также с низкой плотностью гранул с миелопероксидазой ($p < 0,05$). Так, относительно контрольной группы повышалось число клеток с высокой ферментной активностью на 32,5 % ($p_1 < 0,05$) у инфицированных животных, не подвергнутых обработке препаратом (1-я группа), а также иммунизированных конъюгатом

антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой (3-я группа). Также в этих же группах были выше значения СЦК на 21 и 25 % соответственно ($p_1 < 0,05$). Что касается катионных белков, то относительно контроля отмечен только значимый рост СЦК у особей, обработанных конъюгатом антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой (2-я группа) на 42 % ($p_1 < 0,05$). Помимо этого относительно 2-й группы обнаружено снижение числа фагоцитов с низкой насыщенностью цитоплазмы гранулами с миелопероксидазой на 48,5 % ($p_3 < 0,05$).

Серологическими исследованиями был зафиксирован положительный результат в 100 % случаев только в группе животных, инфициро-

ванных *M. smegmatis* без последующей обработки экспериментальным препаратом (1-я группа).

На 42-е сут после сенсibilизации НТМ (табл. 3) происходило снижение анаэробного метаболизма нейтрофилов у животных, не подвергнутых обработке препаратом (1-я группа), о чем свидетельствовало восстановление активности катионных белков до значений, характер-

ных для интактных морских свинок. Так, количество клеток с высокой плотностью гранул находилось приблизительно на одном уровне ((33,40 ± 1,50) %, (30,20 ± 3,06) %), а со средней насыщенностью – было идентичным ((10,20 ± 2,06) %, (10,20 ± 0,66) %). СЦК также не имел статистически достоверной разницы.

Таблица 3

Ферментная активность миелопероксидазы и содержание катионных белков нейтрофилов у морских свинок на 42-е сут после сенсibilизации НТМ (28-е сут после введения конъюгата), М±m

Myeloperoxidase enzyme activity and cationic protein content of neutrophils in guinea pigs on the 42th day after sensitization with NTM (28th day after administration of the conjugate), M±m

Группа животных	Насыщенность цитоплазмы гранулами, %			СЦК, у.е.
	высокая	средняя	низкая	
Миелопероксидаза				
Контрольная	24,80 ± 1,83	9,40 ± 1,57	9,00 ± 1,14	1,02 ± 0,04
1-я опытная	25,60 ± 1,80	14,40 ± 0,93*	13,60 ± 2,84	1,18 ± 0,03*
2-я опытная	34,60 ± 1,53**AB	11,40 ± 0,51	6,00 ± 0,31*	1,32 ± 0,04**A
3-я опытная	40,20 ± 2,35**AB	19,20 ± 2,06**AC	5,20 ± 1,71 ^B	1,64 ± 0,05***ABC
Катионные белки				
Контрольная	30,20 ± 3,06	10,20 ± 0,66	7,60 ± 1,91	1,18 ± 0,08
1-я опытная	33,40 ± 1,50	10,20 ± 2,06	5,80 ± 1,56	1,26 ± 0,06
2-я опытная	54,20 ± 1,20***AB	11,00 ± 1,67	7,80 ± 1,91	1,92 ± 0,03***AB
3-я опытная	58,40 ± 2,75***AB	6,20 ± 1,50*	6,80 ± 1,39	1,94 ± 0,06***AB

Примечание: *различия относительно контрольной группы достоверны на уровне $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по *t*-критерию Стьюдента; А – достоверность к значениям контрольной группы ($p_1 < 0,05$); В – к значениям 1-й опытной группы ($p_2 < 0,05$); С – к значениям 2-й опытной группы ($p_3 < 0,05$) по критерию Тьюки.

По сравнению с предыдущими сроками исследования ферментная активность миелопероксидазы к 42-м сут существенно снижалась, но, тем не менее, по-прежнему была достоверно повышена в 1,53 раза ($p < 0,05$) относительно контрольной группы за счет нейтрофилов со средней насыщенностью цитоплазмы гранулами. Помимо этого уровень СЦК также был более высоким и в среднем был выше на 1,15 раза ($p < 0,05$) относительно интактных животных.

У особей, подвергнутых введению конъюгата антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой (2-я группа), также как и препарата с бетулоновой кислотой (3-я группа), отмечена гиперреактивность антимикробных бактерицидных систем фагоцитов. Можно выделить увеличение числа высокоактивных клеток с миелопероксидазой во 2-й группе в 1,39 раза ($p < 0,01$) и в 3-й – в 1,62 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактными животными, а также с катионными белками соответственно в 1,79 ($p < 0,001$) и 1,93 раза

($p < 0,001$) относительно контрольной группы. Вследствие этих изменений также был увеличен среднегрупповой уровень СЦК миелопероксидазы в 1,29 ($p < 0,01$) и 1,60 раза ($p < 0,001$) и катионных белков в 1,63 ($p < 0,001$) и 1,64 раза ($p < 0,001$).

Дисперсионный анализ выявил неоднородность всех без исключения параметров ферментной активности миелопероксидазы ($p < 0,05$ и ниже), а также содержания клеток в высокой насыщенностью цитоплазмы гранулами с катионными белками и их СЦК ($p < 0,001$). Относительно контрольной группы число клеток с высокой активностью миелопероксидазы и катионных белков были выше на 39,5 ($p_1 < 0,05$) и 79,5 % ($p_1 < 0,001$) соответственно во 2-й группе, на 62 ($p_1 < 0,001$) и 93 % ($p_1 < 0,001$) – в 3-й группе, а их уровни СЦК возрастали на 29,5 ($p_1 < 0,001$) и 63 % ($p_1 < 0,001$) во 2-й группе, на 61 ($p_1 < 0,001$) и 64,5 % ($p_1 < 0,001$) – в 3-й группе. Также увеличивалось количество нейтрофи-

лов со средней насыщенностью цитоплазмы гранулами миелопероксидазы у иммунизированных конъюгатом антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой (3-я группа) на 103,5 % ($p_1 < 0,001$) по сравнению с интактными особями и на 68,5 % ($p_3 < 0,01$) по сравнению с животными, обработанными конъюгатом антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой (2-я группа).

Число высокоактивных фагоцитов с миелопероксидазой и катионными белками также было выше соответственно на 35 ($p_2 < 0,05$) и 62 % ($p_2 < 0,001$) во 2-й группе и на 57 ($p_2 < 0,001$) и 75 % ($p_2 < 0,001$) по сравнению с 1-й группой. Также увеличивался уровень СЦК катионных белков на 52,5 ($p_2 < 0,001$) во 2-й группе и на 54 % ($p_2 < 0,001$) в 3-й группе, тогда как СЦК миелопероксидазы возрастал на 39 % ($p_2 < 0,001$) только в 3-й группе. Кроме этого достоверная разница установлена между величинами СЦК катионных белков 2-й и 3-й группы ($p_3 < 0,001$).

По результатам исследований мазков крови в РНИФ на 42-е сут после инокуляции быстрорастущих микобактерий антиген-антительные комплексы были обнаружены у 60 % морских свинок, инфицированных *M. smegmatis* без последующей обработки экспериментальными конъюгатами.

Обобщая полученные результаты, необходимо отметить, что нейтрофилы, по-видимому, играют определяющую роль в защите организма морских свинок от *Mycobacterium smegmatis*, о чем свидетельствует выраженная активизация кислороднезависимой (катионные белки) и кислородзависимой (миелопероксидаза) бактерицидных систем на 14-е сут после их инокуляции. На это также указывают другие ученые, занимавшиеся изучением взаимодействия фагоцитов с этим микроорганизмом [25, 26].

При инфицировании морских свинок повышенная деятельность катионных белков прослеживалась до 28-х сут, а миелопероксидазы –

сохранялась до 42-х сут, несмотря на снижение интенсивности по сравнению с более ранним периодом, что могло быть связано с неполной элиминацией микобактерий. Результаты серологических исследований подтверждали наличие антигена в крови в этот срок у 60 % животных. Аналогичные результаты были получены в другом эксперименте [27], в котором из нескольких видов НТМ только *M. smegmatis* проявлял устойчивость к фагоцитозу на 42-е сут после его инокуляции.

Введение экспериментальных конъюгатов оказывало стимулирующий эффект на деятельность внутриклеточных антимикробных компонентов нейтрофилов, способствуя ускоренной элиминации быстрорастущих микобактерий из организма животных через 14 сут после иммунизации, на что указывало отсутствие антигена в крови. Сходные результаты ранее нами были также получены при сенсibilизации морских свинок скотохромагенными микобактериями *M. scrofulaceum* [22]. Следует отметить, что антигенный комплекс, конъюгированный с бетулоновой кислотой, в отличие от аналогичного препарата с бетулиновой кислотой, индуцировал более выраженную активизацию ферментной активности миелопероксидазы.

Заключение. На основании полученных результатов можно прийти к заключению, что инфицирование морских свинок *Mycobacterium smegmatis* сопровождается усилением деятельности катионных белков нейтрофилов, наблюдаемом в течение 28 сут, и более продолжительной активизацией внутриклеточной миелопероксидазы – 42 сут. Введение экспериментальных препаратов стимулирует работу бактерицидных компонентов фагоцитов, способствуя элиминации быстрорастущих микобактерий в течение 14 сут. Конъюгат антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой индуцировал более выраженную активность миелопероксидазы.

Список источников

1. Honda J.R., Viridi R., Chan E.D. Global environmental nontuberculous mycobacteria and their contemporaneous man-made and natural niches // *Front Microbiol.* 2018. Vol. 9. Article: 2029. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02029.
2. Pavlik I., Ulmann V., Hubelova D., et al. Nontuberculous mycobacteria as saprozoites: a review // *Microorganisms.* 2022. Vol. 10. N 7. Article: 1345. DOI: 10.3390/microorganisms10071345.
3. Biet F., Boschiroli M.L. Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance // *Res. Vet. Sci.* 2014. Vol. 97. P. S69–S77. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.08.007.
4. Nuru A., Zewude A., Mohammed T., et al. Nontuberculosis mycobacteria are the major causes of tuberculosis like lesions in cattle slaughtered at Bahir Dar Abattoir, northwestern Ethiopia // *BMC Vet Res.* 2017. Vol. 13. N 1. Article: 237. DOI: 10.1186/s12917-017-1168-3.

5. Kuria J.K.N., Akwalu S.K., Muema L.M. The etiology and public health significance of mycobacteriosis of cattle in Kenya // *Int. J. Mycobacteriol.* 2018. Vol. 7, N 3. P. 251–256. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_80_18.
6. Tingan T.K., Mensah G.I., Agyekum E.B., et al. Non-tuberculous mycobacteria, not *Mycobacterium bovis*, are a significant cause of TB-like lesions observed in slaughtered cattle in Ghana // *IJID Reg.* 2022. Vol. 3. P. 8–14. DOI: 10.1016/j.ijregi.2022.02.004.
7. Supré K., Roupie V., Ribbens S., et al. Short communication: *Mycolicibacterium smegmatis*, basonym *Mycobacterium smegmatis*, causing pyogranulomatous mastitis and its cross-reactivity in bovine (para) tuberculosis testing // *J. Dairy Sci.* 2019. Vol. 102. N 9. P. 8405–8409. DOI: 10.3168/jds.2019-16610.
8. Hernández-Jarguín A.M., Martínez-Burnes J., Molina-Salinas G.M., et al. Isolation and histopathological changes associated with non-tuberculous mycobacteria in lymph nodes condemned at a bovine slaughterhouse // *Vet. Sci.* 2020. Vol. 7, N 4. Article: 172. DOI: 10.3390/vetsci7040172.
9. Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г., и др. Обоснование создания комплексных аллергенов для дифференциальной диагностики туберкулеза // *Ветеринария и кормление.* 2018. № 5. С. 10–12. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-5-3.
10. Денгис Н.А., Боганец Н.С. Лабораторная диагностика туберкулеза. Омск: Омский АНЦ, 2022. 178 с. EDN: ZGLGNL.
11. Баратов М.О. Распространение нетуберкулезных микобактерий в объектах эпизоотологического надзора в Республике Дагестан // *Ветеринария сегодня.* 2023. Т. 12, № 2. С. 140–146. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-140-146.
12. Баратов М.О., Семененко М.П. Нетуберкулезные микобактерии: сенсibiliзирующая роль и патоморфологические изменения в организме зараженных животных // *Ветеринария Кубани.* 2024. № 4. С. 13–16. DOI: 10.33861/2071-8020-2024-4-13-16.
13. Reil I., Špičić S., Barbić L., et al. Antimicrobial resistance in rapidly growing nontuberculous mycobacteria among domestic and wild animals emphasizing the zoonotic potential // *Microorganisms.* 2023. Vol. 11, N 10. Article: 2520. DOI: 10.3390/microorganisms11102520.
14. Baldwin S.L., Larsen S.E., Ordway D., et al. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019. Vol. 13, N 2. Article: e0007083. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007083.
15. Rampacci E., Stefanetti V., Passamonti F., et al. Preclinical models of nontuberculous mycobacteria infection for early drug discovery and vaccine research // *Pathogens.* 2020. Vol. 9, N 8. Article: 641. DOI: 10.3390/pathogens9080641.
16. Abate G., Hamzabegovic F., Eickhoff C.S., et al. BCG vaccination induces *M. avium* and *M. abscessus* cross-protective immunity // *Front Immunol.* 2019. Vol. 10. Article: 234. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00234.
17. Fritschi N., Curtis N., Ritz N. Bacille Calmette Guérin (BCG) and new TB vaccines: Specific, cross-mycobacterial and off-target effects // *Paediatr. Respir. Rev.* 2020. Vol. 36. P. 57–64. DOI: 10.1016/j.prrv.2020.08.004.
18. Buddle B.M., Wards B.J., Aldwell F.E., et al. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis // *Vaccine.* 2002. Vol. 20. P. 1126–1133. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00436-4.
19. Poyntz H.C., Stylianou E., Griffiths K.L., et al. Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* // *Tuberculosis (Edinb).* 2014. Vol. 94, N 3. P. 226–237. DOI: 10.1016/j.tube.2013.12.006.
20. Brandt L., Feino Cunha J., Weinreich Olsen A., et al. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis // *Infect. Immun.* 2002. Vol. 70, N 2. P. 672–678. DOI: 10.1128/IAI.70.2.672-678.2002.
21. Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Pleshakova V.I., et al. Morphology of lymphoid tissue in the lungs of guinea pigs infected with *Mycobacterium bovis* against the background of vaccine immunity and the action of betulin and its derivatives // *Vaccines (Basel).* 2022. Vol. 10 (12). Article: 2084. DOI: 10.3390/vaccines10122084.
22. Кошкин И.Н., Власенко В.С., Денгис Н.А. Изучение иммунотерапевтических свойств конъюгата антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой на морских свинках, инфицированных *Mycobacterium*

- scrofulaceum* // Ветеринария сегодня. 2024. Т. 13, № 2. С. 183–188. DOI: 10.1134/S1068162021040142.
23. Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Kulakov I.V. The effect of experimental BCG antigen-betulin-derived conjugates on the guinea pig immunological response // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2021. Vol. 47, N 4. P. 837–844. DOI: 10.1134/S1068162021040142.
 24. Денгис Н.А., Кособоков Е.А., Власенко В.С., и др. Дифференциальная диагностика, профилактика и контроль микобактериальных инфекций у животных. Омск: Омский АНЦ, 2023. 20 с. EDN: HEXDVE.
 25. Miralda I., Klaes C.K., Graham J.E., et al. Human neutrophil granule exocytosis in response to *Mycobacterium smegmatis* // Pathogens. 2020. Vol. 9, N 2. Article: 123. DOI: 10.3390/pathogens9020123.
 26. Parker H.A., Forrester L., Kaldor C.D., et al. Antimicrobial activity of neutrophils against mycobacteria // Front. Immunol. 2021. Vol. 12. Article: 782495. DOI: 10.3389/fimmu.2021.782495.
 27. Власенко В.С., Кособоков Е.А., Денгис Н.А., и др. Изучение иммунотерапевтических свойств иммуномодулятора КИМ-М2 на морских свинках, инфицированных нетуберкулезными микобактериями // Вестник КрасГАУ. 2022. № 5. С. 91–97. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-5-91-97.

References

1. Honda JR, Viridi R, Chan ED. Global environmental nontuberculous mycobacteria and their contemporaneous man-made and natural niches. *Front Microbiol.* 2018;9:2029. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02029.
2. Pavlik I, Ulmann V, Hubelova D, et al. Nontuberculous mycobacteria as saprozoites: a review. *Microorganisms.* 2022;10(7):1345. DOI: 10.3390/microorganisms10071345.
3. Biet F, Boschirolu ML. Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Res. Vet. Sci.* 2014; 97:S69–77. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.08.007.
4. Nuru A, Zewude A, Mohammed T, et al. Nontuberculosis mycobacteria are the major causes of tuberculosis like lesions in cattle slaughtered at Bahir Dar Abattoir, northwestern Ethiopia. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):237. DOI: 10.1186/s12917-017-1168-3.
5. Kuria JKN, Akwalu SK, Muema LM. The etiology and public health significance of mycobacteriosis of cattle in Kenya. *Int. J. Mycobacteriol.* 2018;7(3):251-6. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_80_18.
6. Tingan TK, Mensah GI, Agyekum EB, et al. Non-tuberculous mycobacteria, not *Mycobacterium bovis*, are a significant cause of TB-like lesions observed in slaughtered cattle in Ghana. *IJID Reg.* 2022;3:8-14. DOI: 10.1016/j.ijregi.2022.02.004.
7. Supré K, Roupie V, Ribbens S, et al. Short communication: *Mycolicibacterium smegmatis*, basonym *Mycobacterium smegmatis*, causing pyogranulomatous mastitis and its cross-reactivity in bovine (para) tuberculosis testing. *J. Dairy Sci.* 2019;102(9):8405-9. DOI: 10.3168/jds.2019-16610.
8. Hernández-Jarguín AM, Martínez-Burnes J, Molina-Salinas GM, et al. Isolation and histopathological changes associated with non-tuberculous mycobacteria in lymph nodes condemned at a bovine slaughterhouse. *Vet. Sci.* 2020;7(4):172. DOI: 10.3390/vetsci7040172.
9. Naymanov AH, Ustinova GI, Tolstenko NG, et al. Justification for the creation of complex allergens for differential diagnosis of tuberculosis. *Veterinaria i kormlenie.* 2018;5:10-2. (In Russ.). DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-5-3.
10. Dengis NA, Boganec NS. *Laboratornaya diagnostika tuberkuleza.* Омск: Омский АНЦ; 2022. 178 p. (In Russ.). EDN: ZGLGNL.
11. Baratov MO. Nontuberculous mycobacterium occurrence in biological material and environmental samples covered by epidemiological surveillance in the Republic of Dagestan. *Veterinary Science Today.* 2023;12(2):140-6. (In Russ.). DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-140-146.
12. Baratov MO, Semenenko MP. Non-tuberculous mycobacteria: sensitizing role and pathomorphological changes in the organism of infected animals. *Veterinaria Kubani.* 2024;4:13-6. (In Russ.). DOI: 10.33861/2071-8020-2024-4-13-16.
13. Reil I, Špičić S, Barbić L, et al. Antimicrobial resistance in rapidly growing nontuberculous mycobacteria among domestic and wild animals emphasizing the zoonotic potential. *Microorganisms.* 2023;11(10):2520. DOI: 10.3390/microorganisms11102520.

14. Baldwin SL, Larsen SE, Ordway D, et al. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019;13(2):e0007083. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007083.
15. Rampacci E, Stefanetti V, Passamonti F, et al. Preclinical models of nontuberculous mycobacteria infection for early drug discovery and vaccine research. *Pathogens.* 2020;9(8):641. DOI: 10.3390/pathogens9080641.
16. Abate G, Hamzabegovic F, Eickhoff CS, et al. BCG vaccination induces *M. avium* and *M. abscessus* cross-protective immunity. *Front Immunol.* 2019;10:234. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00234.
17. Fritschi N, Curtis N, Ritz N. Bacille Calmette Guérin (BCG) and new TB vaccines: Specific, cross-mycobacterial and off-target effects. *Paediatr. Respir. Rev.* 2020;36:57-64. DOI: 10.1016/j.prrv.2020.08.004.
18. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, et al. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine.* 2002;20:1126-33. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00436-4.
19. Poyntz HC, Stylianou E, Griffiths KL, et al. Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2014;94(3):226-37. DOI: 10.1016/j.tube.2013.12.006.
20. Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, et al. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* 2002;70(2):672-8. DOI: 10.1128/IAI.70.2.672-678.2002.
21. Koshkin IN, Vlasenko VS, Pleshakova VI, et al. Morphology of lymphoid tissue in the lungs of guinea pigs infected with *Mycobacterium bovis* against the background of vaccine immunity and the action of betulin and its derivatives. *Vaccines (Basel).* 2022;10(12):2084. DOI: 10.3390/vaccines10122084.
22. Koshkin IN, Vlasenko VS, Dengis NA. Studying immunotherapeutic properties of the conjugate based on BCG antigens with betulonic acid in guinea pigs infected with *Mycobacterium scrofulaceum*. *Veterinary Science Today.* 2024;13(2):183–188. (In Russ.). DOI: 10.29326/2304-196X-2024-13-2-183-188.
23. Koshkin IN, Vlasenko VS, Kulakov IV. The effect of experimental BCG antigen-betulin-derived conjugates on the guinea pig immunological response. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2021;47(4):837-44. DOI: 10.1134/S1068162021040142.
24. Dengis NA, Kosobokov EA, Vlasenko VS, et al. *Differencial'naya diagnostika, profilaktika i kontrol' mikobakterial'nyh infekcij u zhivotnyh.* Omsk: Omskij ANC; 2023. 20 p. (In Russ.). EDN: HEXDVE.
25. Miralda I, Klaes CK, Graham JE, et al. Human neutrophil granule exocytosis in response to *Mycobacterium smegmatis*. *Pathogens.* 2020;9(2):123. DOI: 10.3390/pathogens9020123.
26. Parker HA, Forrester L, Kaldor CD, et al. Antimicrobial activity of neutrophils against mycobacteria. *Front. Immunol.* 20210;12:782495. DOI: 10.3389/fimmu.2021.782495.
27. Vlasenko VS, Kosobokov EA, Dengis NA, et al. Studying immunotherapeutic properties of the immunomodulator KIM-M2 in guinea pigs infected with nontuberculous mycobacteria. *Bulliten of KSAU.* 2022;5:91-97. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-5-91-97.

Статья принята к публикации 03.10.2025 / The article accepted for publication 03.10.2025.

Информация об авторах:

Василий Сергеевич Власенко, главный научный сотрудник лаборатории эпизоотологии и мер борьбы с туберкулезом, доктор биологических наук, профессор

Иван Николаевич Кошкин, старший научный сотрудник лаборатории эпизоотологии и мер борьбы с туберкулезом, кандидат ветеринарных наук

Information about the authors:

Vasily Sergeevich Vlasenko, Chief Researcher, Laboratory of Epizootology and Tuberculosis Control, Doctor of Biological Sciences, Professor

Ivan Nikolaevich Koshkin, Senior Researcher, Laboratory of Epizootology and Tuberculosis Control, Candidate of Veterinary Sciences