Ветеринарный фармакологический вестник входит в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (по состоянию на 10.06.2024 года)

Наименование издания	ISSN	Научные специальности и соответствующие им отрасли науки, по которым присуждаются ученые степени	Дата включения издания в Перечень
Ветеринарный фармакологический вестник	2541—8203	4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки), 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (ветеринарные науки)	с 01.02.2022
		1.5.4. Биохимия (ветеринарные науки), 1.5.5. Физиология человека и животных (ветеринарные науки), 3.1.22. Инфекционные болезни (ветеринарные науки), 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология (ветеринарные науки), 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология (биологические науки), 4.2.2. Санитария, гигиена, экология, ветеринарно-санитарная экспертиза и биобезопасность (ветеринарные науки), 4.2.2. Санитария, гигиена, экология, ветеринарно-санитарная экспертиза и биобезопасность (биологические науки), 4.2.4. Частная зоотехния, кормление, технологии приготовления кормов и производства продукции животноводства (сельскохозяйственные науки), 4.2.4. Частная зоотехния, кормление, технологии приготовления кормов и производства продукции животноводства (биологические науки), 4.2.5. Разведение, селекция, генетика и биотехнология животных (сельскохозяйственные науки), 4.2.5. Разведение, селекция, генетика и биотехнология животных (биологические науки), 4.2.6. Рыбное хозяйство, аквакультура и промышленное рыболовство (сельскохозяйственные науки), 4.2.6. Рыбное хозяйство, аквакультура и промышленное рыболовство (биологические науки)	с 13.10.2022

Журнал включен в утвержденный ВАК Перечень изданий с 28.02.2020 года, выпускаемых в Российской Федерации, ISSN 2541-8203.

Журнал постатейно размещен в научной электронной библиотеке elibrary.ru и зарегистрирован в наукометрической базе РИНЦ (Российский индекс научного цитирования) по договору № 75-01 / 2015К от 19 января 2015 г.

Журнал входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Адрес редакции: 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114б
Тел./факс +7 (473) 253-92-81
http://www.nivipat.ru E-mail: vetfarm.journal@yandex.ru

BULLETIN OF VETERINARY PHARMACOLOGY

Scientific-Practical Journal of Theoretical and Experimental Studies in the Field of Veterinary Pharmacology and Toxicology

FOUNDER AND PUBLISHER

Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy"

Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) PE No. FS77—69340 dtd. April 6, 2017

Editorial opinion may not coincide with the authors' views. The authors of the materials are responsible for the credibility of facts. The manuscripts are not returned. For a full or partial citing, reprint, reproduction by any means the reference to the source is obligatory.

ISSN 2541-8203

Bulletin of Veterinary Pharmacology is included in the list of peer-reviewed scientific periodicals, in which the main scientific results of dissertations for the degree of Candidate of Sciences, for the degree of Doctor of Sciences must be published (as of June 10, 2024)

Periodical name	ISSN	Scientific specialties and corresponding branches of science, in which scientific degrees are awarded	Date of inclusion of the periodical in the List
Bulletin of Veterinary Pharmacology	2541—8203	4.2.3. Infectious diseases and animal immunology (Biological Sciences), 4.2.3. Infectious diseases and animal immunology (Veterinary Sciences)	Since February 01, 2022
		1.5.4. Biochemistry (Veterinary Sciences), 1.5.5. Physiology of humans and animals (Veterinary Sciences), 3.1.22. Infectious diseases (Veterinary Sciences), 4.2.1. Animal pathology, morphology, physiology, pharmacology and toxicology (Veterinary Sciences), 4.2.1. Animal pathology, morphology, physiology, pharmacology and toxicology (Biological Sciences), 4.2.2. Sanitation, hygiene, ecology, veterinary and sanitary examination and biosafety (Veterinary Sciences), 4.2.2. Sanitation, hygiene, ecology, veterinary and sanitary examination and biosafety (Biological Sciences), 4.2.4. Special zootechnics, feeding, technologies for preparing feeds and producing livestock products (Agricultural Sciences), 4.2.4. Special zootechnics, feeding, technologies for preparing feeds and producing livestock products (Biological Sciences), 4.2.5. Animal breeding, selection, genetics and biotechnology (Agricultural Sciences), 4.2.5. Animal breeding, selection, genetics and biotechnology (Biological Sciences), 4.2.6. Fish breeding, aquaculture and industrial fishing (Agricultural Sciences), 4.2.6. Fish breeding, aquaculture and industrial fishing (Biological Sciences)	Since October 13, 2022

The journal is included in the List of publications issued in the Russian Federation from February 28, 2020, approved by the Higher Attestation Commission, ISSN 2541—8203.

The articles of the journal are represented in the scientific electronic library (called elibrary.ru) and the journal is registered in the scientometric database of RSCI (Russian Science Citation Index) under the agreement No. 75-01 / 2015K dtd. January 19, 2015.

The journal is included in the List of major peer-reviewed scientific journals and publications recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Federation for the publication of the main scientific results of dissertations in candidacy for the Doctor's and Candidate's science degrees.

The address of the editorial office: 394087 Lomonosova 114b, Voronezh, Russia Tel./fax + 7 (473) 253-92-81

http://www.nivipat.ru E-mail: vetfarm.journal@yandex.ru

ВЕТЕРИНАРНЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

Научно-практический журнал теоретических и экспериментальных исследований в области ветеринарной фармакологии и токсикологии

Издается с июня 2017 года

Периодичность выпуска — 4 номера в год

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-69340 от 6 апреля 2017 г.

№ 1 (30) • 2025

СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ, ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОБИОХИМИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

BULLETIN OF VETERINARY PHARMACOLOGY

Scientific-Practical Journal of Theoretical and Experimental Studies in the Field of Veterinary Pharmacology and Toxicology

Established in June, 2017

Published 4 times a year

Registration certificate of the PE № FS77-69340 dtd. April 6, 2017

No. 1 (30) • 2025

AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION, DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

PATHOPHYSIOLOGY, PATHOBIOCHEMISTRY AND EXPERIMENTAL THERAPY

Персоналия
УДК 619 (092)

К 50-ЛЕТИЮ ДОКТОРА ВЕТЕРИНАРНЫХ НАУК В. И. МИХАЛЕВА

Сергей Викторович Шабунин, Павел Андреевич Паршин, Виталий Иванович Зимников✉

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, vnivipat@mail.ru✉

Михалеву Виталию Ивановичу — доктору ветеринарных наук, заведующему сектором болезней органов воспроизводства крупного рогатого скота, отдела экспериментальной терапии Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии в 2025 году исполнилось 50 лет со дня рождения.

Михалев Виталий Иванович, родился 5 января 1975 года в селе Нижнедевицк Нижнедевицкого района Воронежской области в семье служащих. В 1992 году поступил и в 1997 году окончил с отличием Воронежский государственный аграрный университет имени К. Д. Глинки ветеринарный факультет по специальности ветеринарный врач. С 1997 по 2000 год проходил обучение в очной аспирантуре Всероссийского НИВИ патологии, фармакологии и терапии. В 2001 году Виталий Иванович защитил кандидатскую диссертацию по специальности ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных на тему «Применение дифура для терапии и профилактики острого послеродового эндометрита у коров».

В 2002 году Виталий Иванович принят на должность старшего научного сотрудника, лаборатории болезней органов размножения и молочной железы у сельскохозяйственных животных, а в 2004 году становится ведущим научный сотрудником той же лаборатории.

В 2007 году В. И. Михалев защитил докторскую диссертацию по двум специальностям на тему «Послеродовая субинволюция матки у коров, ее морфофункциональное состояние и разработка эффективных методов терапии и профилактики». С 2008 по 2016 годы возглавлял лабораторию патологии воспроизводства отдела общей патологии и терапии.

С 2016 года по настоящее время является главным научным сотрудником, сектора болезней органов воспроизводства крупного рогатого скота, отдела экспериментальной терапии.

Под научным руководством В. И. Михалева защищены шесть кандидатских диссертаций. Михалев В. И. является активным участником работы диссертационных и ученого советов института.

Виталий Иванович внес весомый вклад в теорию и практику борьбы с заболеваниями органов воспроизводства и подготовку научных кадров по ветеринарному акушерству и биотехнике репродукции животных. Его научная деятельность посвяще-

на проведению фундаментальных исследований по изучению и разработке новых средств и способов фармакотерапии и фармакопрофилактики патологий органов воспроизводства, способствующих максимальному использованию репродуктивного потенциала животных. Исследованиями ученого раскрыта возможность использования средств неспецифической патогенетической терапии при субинволюции матки коров. Ученым научно обоснован состав и разработаны многочисленные препараты для лечения послеродового и хронического эндометрита у коров, которые нашли широкое применение на территории России и стран СНГ. Виталий Иванович является одним из основоположников изучения проблемы эмбриопатии у крупного рогатого скота.

В последнее время его внимание приковано к изучению методологии коррекции общего и локального иммунобиологического гомеостаза с целью профилактики эмбриопатии у коров.

Выполнены большие научные работы в области физиологии и патологии органов воспроизводства и разработке средств и методов их профилактики и терапии. На протяжении многих лет является руководителем Государственных и ведомственных научно-исследовательских работ.

В. И. Михалев опубликовал более 300 научных и учебно-методических работ, получил более 35 авторских свидетельств и патентов на изобретения, участвовал в разработке более 10 методических рекомендаций, указаний и наставлений, внедренных в сельскохозяйственное производство на государственном уровне. Под его руководством выполнено и защищено 6 кандидатских диссертации.

Ученый ведет активную научно-общественную работу. Он является членом, диссертационных советов по защите докторских и кандидатских диссертаций, членом ученого совета института. Он участвует в пропаганде научно-технических знаний, работе семинаров и совещаний с зооветеринарными специалистами, многочисленных международных научных конференций.

Виталий Иванович награжден почетными грамотами. Целеустремленность, широкий кругозор мышления, скромность в общении снискали ему глубокое уважение у коллег.

Personalia
UDC 619 (092)

ON THE OCCASION OF THE 50th ANNIVERSARY SINCE THE BIRTH OF DOCTOR OF VETERINARY SCIENCES V. I. MIKHALEV

Sergey Viktorovich Shabunin, Pavel Andreevich Parshin, Vitaliy Ivanovich Zimnikov✉

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, vnivipat@mail.ru✉

Vitaliy Ivanovich Mikhalev, Doctor of Veterinary Sciences, Head of the Sector of Diseases of Reproductive Organs of Cattle, Department of Experimental Therapy of All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, has celebrated his 50th birthday in 2025.

Mikhalev Vitaliy Ivanovich was born on January 5, 1975 in Nizhnedevitsk village, Nizhnedevitskiy district, Voronezh region, in the family of employees. In 1992, he entered, and in 1997, graduated with honors from Voronezh State Agrarian University named after K. D. Glinka, Veterinary Faculty, specializing in veterinary medicine. From 1997 to 2000, he studied at full-time postgraduate school at All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy. In 2001, Vitaliy Ivanovich defended his Candidate thesis (specialty — veterinary obstetrics and biotechnics of animal reproduction) on the topic Use of Difur for the Therapy and Prevention of Acute Postpartum Endometritis in Cows.

In 2002, Vitaliy Ivanovich was accepted to the position of a Senior Scientific Associate of the Laboratory of Reproductive Organs and Mammary Gland Diseases in Farm Animals, and in 2004, he became a Principal Scientific Associate in the same laboratory.

In 2007, V. I. Mikhalev defended his Doctoral thesis in two specialties on the topic Postpartum Uterine Subinvolution in Cows, its Morphofunctional State and the Development of Effective Methods for its Therapy and Prevention. From 2008 to 2016, he was the Head of the Laboratory of Pathology of Reproduction of the Department of General Pathology and Therapy.

From 2016 to the present, he is the Chief Scientific Associate of the Sector of Diseases of the Reproductive Organs of Cattle, Department of Experimental Therapy.

Six Candidate theses have been defended under the scientific supervision of V. I. Mikhalev. V. I. Mikhalev is an active participant in the work of the Thesis (Dissertation) and Academic Councils of the Institute.

Vitaliy Ivanovich made a significant contribution to the theory and practice of combating diseases of the reproductive organs and training scientific personnel in veterinary obstetrics and biotechnics of animal reproduction. His scientific activity is devoted to conducting fundamental research on the study and development of new means and methods of pharmacotherapy and pharmacoprophylaxis of pathologies of the reproductive organs, contributing to the maximum use of the reproductive potential of animals. The scientist's research revealed the possibility of using non-specific pathogenetic therapy for uterine subinvolution in cows.

The researcher scientifically substantiated the composition and designed numerous drugs for the treatment of postpartum and chronic endometritis in cows, which have found a wide application in Russia and the CIS countries. Vitaliy Ivanovich is one of the founders of studying the problem of embryopathy in cattle.

Recently, his attention has been focused on the study of the methodology of correction of general and local immunobiological homeostasis for the purpose of preventing embryopathy in cows.

Great scientific works have been carried out in the field of physiology and pathology of reproductive organs and the design and development of means and methods for their prevention and therapy. For many years, he has been the Head of state and departmental research works.

V. I. Mikhalev published more than 300 scientific and educational-methodological works, received more than 35 inventor's certificates and patents for inventions, participated in the development of more than 10 methodological recommendations, instructions and guidelines introduced into agricultural production at the state level. Under his supervision, 6 candidate theses were completed and defended.

The scientist is actively involved in research and social work. He is a member of dissertation councils for the defense of doctoral and candidate theses, a member of the academic council of the Institute. He participates in the promotion of scientific and technical knowledge, the work of seminars and meetings with zooveterinary specialists, and numerous international scientific conferences.

Vitaliy Ivanovich was awarded with certificates of honour. Purposefulness, broad outlook of thinking, modesty in communication earned him a deep respect from colleagues.

Научная статья
УДК 619:615.281.9:615.9

ИЗУЧЕНИЕ ПОДОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МАСТИТА

Анатолий Викторович Галкин✉, Галина Анатольевна Востроилова, Нина Алексеевна Хохлова, Анастасия Андреевна Корчагина, Галина Германовна Чусова, Борис Викторович Шабунин

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Воронеж, Россия, agalkin702@gmail.com✉

Аннотация. В связи с риском возникновения резистентности микроорганизмов к наиболее часто применяемым антибиотикам актуальным является поиск новых комбинаций, включающих разные группы антибактериальных средств, взаимоусиливающих друг друга. При этом, возникает необходимость изучения токсического влияния на организм животных новых лекарственных препаратов. Целью настоящей работы являлось изучение токсикометрических параметров препарата на основе цефалоспорина и фторхинолона в подостром опыте. Данные, полученные в ходе эксперимента, свидетельствуют о том, что при многократном (14 дней) подкожном введении препарата в дозах 100,0 и 500,0 мг/кг, он не оказывал отрицательного воздействия на клинический статус, состояние внутренних органов, морфологические и биохимические показатели крови животных. Изменения, которые были вызваны дозой 500,0 мг/кг, имели обратимый характер, так как в течение 10 дней после отмены препарата морфологические и биохимические показатели крови у опытных животных восстанавливались до физиологических значений.
Ключевые слова: цефтиофур, марбофлоксацин, преднизолон, подострая токсичность, мастит, морфо-биохимические и гистологические исследования, лабораторные животные

ВВЕДЕНИЕ

На начальных этапах разработки ветеринарных препаратов данные, полученные в ходе доклинических исследований, становятся крайне важными для принятия решений, связанных с безопасностью и эффективностью новых лекарственных средств [1]. При постановке длительных (субхронических и хронических) токсикологических экспериментов основные задачи состоят в выявлении органов-мишеней и определении наличия негативного влияния многократного введения исследуемого вещества на клинический статус животных, а также установление степени обратимости повреждений при их наличии [2]. В таких исследованиях основной тест-системой для опытов являются лабораторные животные — крысы и мыши. Субхронический опыт позволяет определить динамику патологических изменений и установить степень их проявления на различных уровнях организации в животном организме [3, 4]. Изучение литературных источников по лечению маститов у крупного рогатого скота, позволило выявить положительные результаты снижения случаев рецидивирующего мастита, при применении препаратов, содержащих фторхинолон и/или цефалоспорин. Все это дает основание предполагать перспективность применения композиции из фторхинолонов и цефалоспоринов для лечения маститов у коров [5—7]. В исследуемом препарате содержится марбофлоксацин, цефтиофур и преднизолон. Литературные данные [8, 9] по исследованию подострой токсичности марбофлоксацина в форме инъекционного препарата показывают, что марбофлоксацин не влияет на клинический статус белых крыс, морфо-биохимические показатели крови и не вызывает изменений в морфологии печени и почек. В открытых литературных источниках присутствуют данные об исследовании цефтиофура при хроническом введении (90 дней), где наблюдалось токсическое влияние цефтиофура на крысах при пероральном введении

в высоких дозах: отмечали желудочно-кишечные расстройства, снижение количества эритроцитов, уровня глюкозы и электролитов в сыворотке крови [10, 11]. При изучении токсичности в хроническом опыте на крысах, которым задавался преднизолон орально, токсический эффект характеризовался снижением прироста массы тела, аппетита, количества лейкоцитов, относительной массы тимуса, селезенки и надпочечников [12].

Целью исследования являлось изучение токсикометрических параметров препарата на основе цефтиофура, марбофлоксацина и преднизолона в подостром опыте на лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования подострой токсичности препарата проведены на половозрелых конвенциональных нелинейных белых крысах, разведения вивария ФГБНУ «ВНИВИПФиТ». Содержание, кормление и манипуляции с животными проводили в соответствии с установленными нормами и «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012) [13].

При выборе доз препарата руководствовались данными, полученными при изучении параметров его токсичности в остром опыте, в результате которого было установлено, что LD_{50} превышает 5000,0 мг/кг и является максимально возможной для введения в соответствии с ГОСТ 32644—2014. Животным I группы (контроль) ($n = 10$) препарат не вводили, крысам II и III групп (по $n = 10$) вводили подкожно препарат в дозе 100,0 и 500 мг/кг (1/50 и 1/10 от максимальной дозы 5000 мг/кг), соответственно, 1 раз в сутки в течение 14 дней.

Общетоксическое действие препарата оценивали по динамике массы тела животных (1 раз в неделю), морфологическим показателям и состоянию системы гомеостаза пробы крови отбирали спустя 24 часа после последнего введения препарата и спустя 10 дней восстановительного периода.

Вегетативный статус оценивали по состоянию слизистых, шерстного покрова, ширины глазных щелей, наличию саливации, диареи, опрятности животных. Морфологический состав крови определяли, используя стандартные методики подсчета клеток, гематологические показатели — на анализаторе «ABX Micros 60». Фракции белка определяли электрофорезом в агарозном геле, концентрацию общего белка, общих липидов, билирубина наборами фирмы «Витал» (Санкт-Петербург), концентрацию мочевины, холестерина, глюкозы, креатинина, активность аспартат- и аланинаминотрасфераз, — на биохимическом анализаторе «Hitachi-902».

Макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов проводили после эвтаназии части животных из каждой группы эксперимента на 15-й день опыта и через 10 дней восстановительного периода. При проведении гистологических исследований органы фиксировали в 10 % забуференном формалине, затем подвергали дегидратации в спиртах возрастающей крепости, после чего образцы заливали в гистологический парафин. Далее изготавливали гистосрезы толщиной 3—5 мкм, которые расплавляли в водяной бане и помещали на высокоадгезивные стекла. Препараты окрашивали гематоксилином-эозином. Изучение препаратов проводили на микроскопе Биомед-3 со встроенной камерой.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью компьютерного пакета программ Statistica 8.0 и представлена в виде средней арифметической и ошибки средней арифметической ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента при многократном (14 дней) подкожном введении препарата в дозах 100,0 и 500,0 мг/кг гибели животных и симптомов интоксикации не было установлено. Оценка клинического состояния показала, что аппетит, частота дыхательных движений и сердечных сокращений всех подопытных животных, как в период применения препарата, так и в течение восстановительного периода, оставались в пределах референсных значений; также не было выявлено функциональных нарушений пищеварительной и мочевыделительной систем.

В группе II за период ежедневного введения исследуемого препарата среднесуточный прирост массы тела достоверно не изменился относительно исходных данных. За 10 дней восстановительного периода прирост массы тела в среднем по группе составил 7,1 % относительно исходной массы тела. В группе III наблюдали потерю массы дела животными в период ежедневного введения исследуемого препарата. К 14-м суткам эксперимента средняя масса тела крыс в группе снизилась на 9,4 % относительно исходной в начале опыта. Однако в течение восстановительного периода крысы прибавляли в весе, и к окончанию эксперимента прирост массы тела в среднем по группе составил 1,1 %

относительно исходных данных. Таким образом, можно отметить различия в динамике массы тела крыс, связанные с уровнем дозирования. Кроме того, животные группы III были менее активными, менее охотно потребляли корм в период введения исследуемого препарата (табл. 1).

Таблица 1

Масса тела (г) белых крыс и ее среднесуточный прирост в ходе эксперимента

Показатели	Группа животных		
	I (контроль)	II (1/50 $ЛД_{50}$)	III (1/10 $ЛД_{50}$)
Начало опыта	280,4 ± 2,22	237,0 ± 1,72	255,4 ± 2,19
14 день	281,6 ± 3,52	237,5 ± 3,38	231,5 ± 4,67
Среднесуточный прирост/убыль массы тела за 14 дней, г	0,07	0,04	–1,71
% к началу опыта	100,4	100,2	90,6
24 день	281,6 ± 12,02	253,8 ± 3,03	258,1 ± 1,02
Среднесуточный прирост массы тела за 24 дня, г	0,05	0,70	0,11
% к началу опыта	100,4	107,1	101,1

В течение эксперимента разницы в потреблении воды подопытными животными не было зафиксировано. Измерения ректальной температуры, проведенные с помощью электронного медицинского термометра, показали отсутствие различий у крыс опытной и контрольной групп. При визуальной оценке влияния исследуемого препарата на функциональное состояние центральной нервной системы, можно отметить, что в период его 14-дневного введения опытные крысы группы II сохраняли двигательную активность, сравнимую с активностью у контрольных животных. В группе III двигательная активность была несколько снижена относительно контрольных животных. При этом все подопытные крысы адекватно реагировали на внешние раздражители.

Макро- и микроскопическое исследование органов животных, получавших исследуемый препарат, не выявило патологических изменений.

Результаты морфометрического анализа показали отсутствие достоверных отличий в массовых коэффициентах (МК) внутренних органов крыс, которым применяли препарат подкожно в дозах 100,0 и 500,0 мг/кг, за исключением надпочечников. Их МК в обеих группах достоверно были повышены на 50,0 %. Однако по истечению срока восстановительного периода, данные показатели у опытных животных достигали значений, аналогичных таковым в группе контроля.

При исследовании проб крови животных II и III групп на 14 день опыта не было отмечено достоверных изменений в морфологическом составе крови по сравнению с таковыми показателями у животных контрольной группы, кроме количества лейкоцитов, которое в группе II было ниже на 17,2 %. Однако после отмены препарата этот показатель достоверно не отличался от контроля.

Анализ результатов, полученных при изучении биохимического статуса подопытных животных, показал ряд изменений некоторых показателей относительно таковых у животных контрольной группы. Так, в группах II и III было зафиксировано снижение общего белка крови на 6,0 и 10,9 % ($p < 0,05$), соответственно. Так же у крыс, которым применяли препарат в дозе 500 мг/кг, отмечали достоверное повышение активности аланинаминотрансферазы (АлАт) на 40,0 % ($p < 0,05$). При этом у крыс II группы наблюдалась тенденция к повышению активности АлАт (21,1 %), но данные изменения были статистически недостоверны относительно значений в группе контроля.

При исследовании крови подопытных крыс через 10 дней восстановительного периода значимых и статистически достоверных изменений в опытных группах относительно контрольной установлено не было.

При проведении гистологических исследований установлено, что (рис. 1) во всех образцах

ткани печени имеют типичную морфологическую структуру.

Крупные сосуды запустевшие, мелкие — умеренно кровенаполены. Балочное строение сохранено. Гепатоциты полигональной формы с центрально-расположенным ядром. Цитоплазма окрашена равномерно.

При проведении гистологических исследований почек крыс во всех группах наблюдалось (рис. 2) отсутствие каких-либо патологических изменений, почки имели типичное строение. Проксимальные и дистальные канальцы имели сохранную эпителиальную выстилку. Капиллярная сеть клубочков кровенаполнена, капсула сохранена.

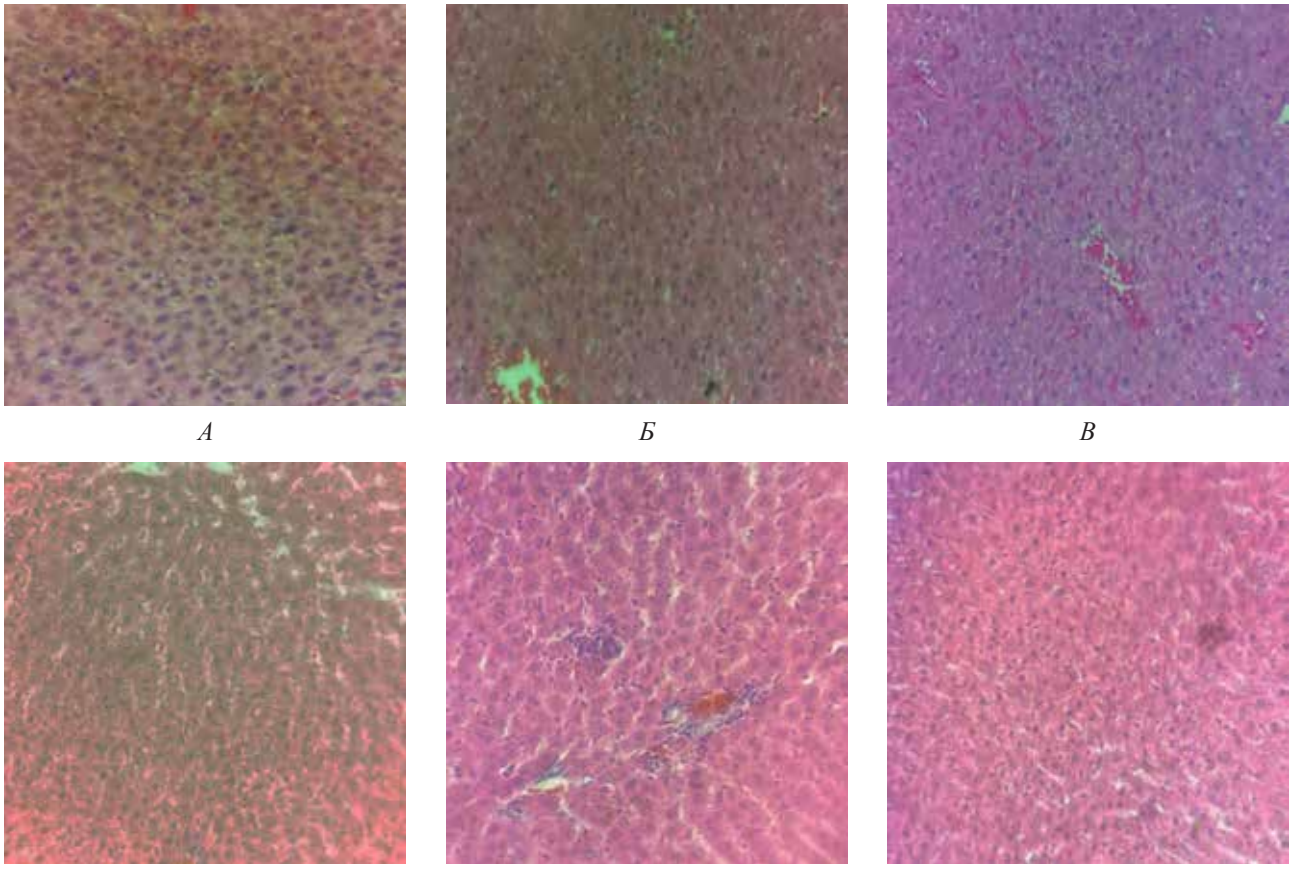


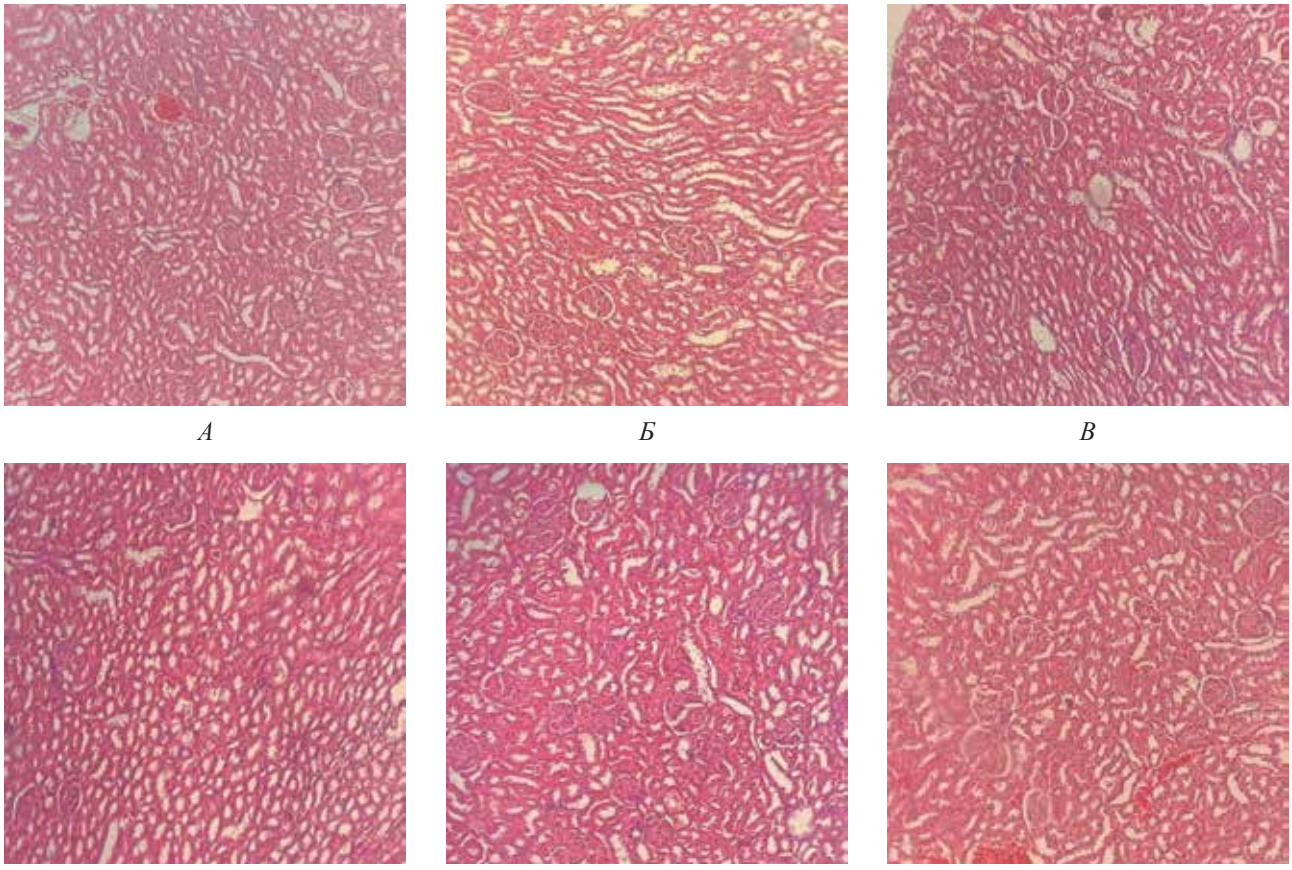
Рис. 1. Архитектоника печени крыс:

А — контроль (группа I) в начале опыта; *Б* — группа II на 14 день введения; *В* — группа III на 14 день введения; *Г* — группа II через 10 дней введения; *Д* — группа III через 10дней введения; *Е* — контроль (группа I) в конце опыта. Ув. 400х. Окраска гематоксилин-эозин

По результатам проведенных гистологических исследований установлено, что выраженного гепато- и нефротоксического действия препарата в дозах 100 и 500 мкг/кг, как через 14 дней введения, так и после 10 дней восстановительного периода, не наблюдалось. При исследовании других органов (сердце, селезенка, кишечник, тимус) не было установлено каких-либо патологических изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При многократном подкожном введении препарата на основе цефтиофура, марбофлоксацина и преднизолона в течение 14 дней в дозах 100,0 и 500,0 мг/кг было установлено, что препарат не оказывает отрицательного воздействия на клинический статус, морфологические и биохимические показатели крови подопытных животных. Введение подопытным животным исследуемого препарата в дозе 500,0 мг/кг вызвало некоторые изменения морфологических и биохимических показателей крови, которые имели обратимый характер, и по истечении восстановительного периода восстанавливались до физиологических значений. Гистологическими методами токсического влияния исследуемого препарата на органы и ткани не установлено.



А *Б* *В*

Г *Д* *Е*

Рис. 2. Архитектоника почек крыс:

А — контроль (группа I) в начале опыта; *Б* — группа II на 14 день введения; *В* — группа III на 14 день введения; *Г* — группа II через 10 дней введения; *Д* — группа III через 10дней введения; *Е* — контроль (группа I) в конце опыта. Ув. 400х. Окраска гематоксилин-эозин

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Кузнецов Ю. Е.* Изучение субхронической токсичности препарата «Празимид-комплекс» с последующим некропсическим анализом // *Кузнецов Ю. Е.*, *Белова Л. М.*, Гаврилова [и др.] // АПК: инновационные технологии. 2023. № 4 (63) С. 97—108. DOI 10.35524/2687—0436_2023_04_97

2. *Семененко М. П.* Оценка субхронической токсичности фитоглинола на этапе доклинического исследования / М. П. Семененко, О. В. Ланец, Е. В. Кузьминова [и др.] // Ветеринарный фармакологический вестник. 2020. № 4 (13). С. 38—44. DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.4.38

3. *Михайлов Е. В.* Архитектоника печени белых крыс после применения препарата МТ-6 в подостром опыте / Е. В. Михайлов, Б. В. Шабунин, Ю. О. Пономарева [и др.] // Ветеринарный фармакологический вестник 2020. № 4 (13) С. 61—64. DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.4.61

4. *Ческидова Л. В.* Экспериментальное исследование подострой токсичности препарата Lp на крысах // Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана. 2014. № 2. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/eksperimentalnoe-issledovanie-podostroy-toksichnosti-preparata-lp-na-krysah (дата обращения: 20. 01 2025 г.).

5. *Alfonseca-Silva E.* Successful treatment of recurrent subclinical mastitis in cows caused by enrofloxacin-resistant bacteria with sequential intramammary infusions of enrofloxacin HCl-2H_2O and Ceftiofur HCl: a clinical trial/ E. Alfonseca-Silva, J. C. Cruz-Villa, L. Gutiérrez, H. Sumano // J Vet Sci. 2021. 22(6): e78. DOI 10.4142/jvs.2021.22.e78

6. *Cengiz M.* The *in vitro* activity of danofloxacin plus ceftiofur combination: implications for antimicrobial efficacy and resistance prevention / M. Cengiz, P. Sahinturk, G. Hepbostanci [et al.] // Vet Res Forum. — 2022 Jun; 13(2): 149—153. DOI: 10.30466/vrf.2020.113272.2696

7. *Cassier P.* Cephalosporin and fluoroquinolone combinations are highly associated with CTX—M β-lactamase-producing Escherichia coli: a case–control study in a French teaching hospital / *Cassier P.*, *Lallechère S.*, *Aho S.* [et al.] // CMI First published:1746—51. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03349.x

8. *Михайлов Е. В.* Структурная организация почек белых крыс в подостром опыте после применения пре-

парата МТ-6 / Е. В. Михайлов, Б. В. Шабунин, Ю. О. Пономарева, Т. И. Ермакова, Е. М. Степанов, В. С. Болотова, Д. С. Степанов, М. С. Богданова // Ветеринарный фармакологический вестник. 2021. № 1(14). С. 10—15. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2021.1.10

9. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA/MRL/079/96-FINAL March 1996. Committee for veterinary medicinal products. Marbofloxacin. — Electronic resource. — www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/marbofloxacin-summaryreport-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (accessed on March 2021).

10. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) Committee for veterinary medicinal products. Ceftiofur. Summary report (2) EMEA/MRL/498/98-FINAL. Electronic resource. — www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report /ceftiofur -summaryreport-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (Report dated July 1999.)

11. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) Committee for veterinary medicinal products. Ceftiofur. Summary report (3) EMEA/MRL/835/02-FINAL www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report /ceftiofur -summaryreport-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf /(April 2002.)

12. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. Committee for veterinary medicinal products. Prednisolone (as free alcohol). Summary report. EMEA/MRL/629/99-FINAL. — Electronic resource. — www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/ Prednisolone — summaryreport-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (Report dated July 1999.).

13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств /под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунатян и др. / Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России. Часть 1. — М., ЗАО «Гриф и К»,2012. — 944 с. — ISBN 978-5-8125-1466-3.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. В. Галкин — аспирант;
Г. А. Востроилова — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;
Н. А. Хохлова — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
А. А. Корчагина — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
Г. Г. Чусова — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник;
Б. В. Шабунин — младший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 20.01.2025.

Original article
UDC 619:615.281.9:615.9

SUBACUTE TOXICITY STUDY OF A COMPLEX DRUG FOR THE TREATMENT OF MASTITIS

Anatoliy Viktorovich Galkin✉, Galina Anatolyevna Vostroilova, Nina Alekseevna Khokhlova, Anastasiya Andreevna Korchagina, Galina Germanovna Chusova, Boris Viktorovich Shabunin

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, agalkin702@gmail.com✉

Abstract. Due to the risk of developing resistance in microorganisms to the most commonly used antibiotics, it is important to search for new combinations that include different groups of mutually reinforcing antibacterial agents. At the same time, there is a need to study the toxic effects of new drugs on animals. The objective of this work was to study the toxicometric parameters of a drug based on a cephalosporin and a fluoroquinolone in a subacute experiment. The data obtained during the experiment indicate that with repeated (14 days) subcutaneous administration of the drug at doses of 100.0 and 500.0 mg/kg, it did not have a negative effect on the clinical status, the state of internal organs, the blood morphological and biochemical indicators of animals. The changes that were caused by a dose of 500.0 mg/kg were reversible, since within 10 days after the drug withdrawal, the blood morphological and biochemical indicators in the experimental animals were restored to physiological values.
Keywords: ceftiofur, marbofloxacin, prednisolone, subacute toxicity, mastitis, morphobiochemical and histological studies, laboratory animals

INTRODUCTION

At the initial stages of veterinary drug design, the data obtained during preclinical studies become extremely important for decision-making related to the safety and efficacy of new drugs [1]. When setting up long-term (subchronic and chronic) toxicological experiments, the main tasks are to identify target organs and determine the presence of a negative effect of repeated administration of the test substance on the clinical status of animals, as well as to establish the degree of damage reversibility, if any [2]. In such studies, the main test system for experiments are laboratory animals (rats and mice). Subchronic experiment allows to determine the dynamics of pathological changes and establish the degree of their manifestation at various levels of organization in the animal organism [3, 4]. A study of literary sources on the treatment of bovine mastitis revealed positive results in reducing the incidence of recurrent mastitis when using drugs containing fluoroquinolone and/or cephalosporin. All this gives grounds to assume the prospects of using a composition of fluoroquinolones and cephalosporins for the treatment of mastitis in cows [5—7]. The studied drug contains marbofloxacin, ceftiofur and prednisolone. Literature data [8, 9] on the subacute toxicity study of marbofloxacin in the form of an injectable drug show that marbofloxacin does not affect the clinical status of white rats, blood morphobiochemical indicators and does not cause changes in the morphology of the liver and kidneys. Open literature sources contain the data on a study of ceftiofur in case of chronic administration (90 days), where the toxic effect of ceftiofur on rats was observed with oral administration at high doses. There were noted gastrointestinal disorders, a decrease in the number of erythrocytes, glucose and electrolyte levels in the blood serum [10, 11]. In a study of toxicity in a chronic experiment on rats given prednisolone orally, the toxic effect was characterized by a decrease in body weight gain, appetite, the number of leukocytes, and the relative weight of the thymus, spleen and adrenal glands [12].

The objective of the study was to examine the toxicometric indicators of a drug based on ceftiofur, marbofloxacin and prednisolone in a subacute experiment on laboratory animals.

MATERIAL AND METHODS

Subacute toxicity studies of the drug were conducted on sexually mature conventional nonlinear white rats in the vivarium of FSBSI "ARVRIPP&T". Keeping, feeding and manipulation of animals were carried out in accordance with the established standards and the Guidelines for the Conduct of Preclinical Studies of Medicines (2012) [13].

When selecting the doses of the drug, we were guided by the data obtained in the study of its toxicity parameters in an acute experiment, as a result of which it has been established that LD_{50} exceeds 5000.0 mg/kg and is the maximum possible for administration in accordance with GOST 32644—2014. The animals of group I (control) (n = 10) were not administered the drug; the rats of groups II and III (n = 10 each) were administered the drug subcutaneously at a dose of 100.0 and 500 mg/kg (1/50 and 1/10 of the maximum dose of 5000 mg/kg), respectively, once a day for 14 days.

The general toxic effect of the drug was assessed by the dynamics of the animals' body weight (once a week), morphological indicators and the state of the homeostasis system. Blood samples were taken 24 hours after the last administration of the drug and after a 10-day recovery period.

The vegetative status was assessed by the state of the mucous membranes, fur, width of the palpebral fissure, presence of salivation, diarrhea and neatness of the animals.

The blood morphological composition was determined using standard cell counting methods, and hematological indicators were determined using an ABX Micros 60 analyzer. Protein fractions were determined by agarose gel electrophoresis, the concentration of total protein, total lipids, and bilirubin using Vital kits (St. Petersburg), and the concentration of urea, cholesterol, glucose, creatinine, and the activity of aspartate and alanine aminotransferases were determined using a Hitachi-902 biochemical analyzer.

Macroscopic and histological examination of internal organs was performed after euthanasia of some animals from each experimental group on day 15 of the experiment and after a 10-day recovery period.

For histological studies, the organs were fixed in a 10 % buffered formalin, then dehydrated in alcohols of increasing strength, after which the samples were embedded in histological paraffin. Then, 3—5 μm thick histosections were prepared, which were melted in a water bath and placed on highly adhesive glasses. The preparations were stained with hematoxylin and eosin. The preparations were studied using a Biomed-3 microscope with a built-in camera.

Statistical processing of the obtained data was carried out using the Statistica 8.0 computer software package and is presented as the arithmetic mean and the error of the arithmetic mean (M ± m). The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

During the experiment with multiple (14 days) subcutaneous administration of the drug at doses of 100.0 and 500.0 mg/kg, no deaths of animals or symptoms of intoxication were observed. Assessment of the clinical condition showed that appetite, respiratory rate and heart rate of all experimental animals, both during the period of drug administration and during the recovery period, remained within the reference values; functional disorders of the digestive and urinary systems were also not detected.

In group II, during the period of daily administration of the test drug, the average daily body weight gain did not change significantly relative to the initial data. Over 10 days of the recovery period, the average body weight gain in the group was 7.1 % relative to the initial body weight. In group III, weight loss was observed in animals during the period of daily administration of the test drug. By day 14 of the experiment, the average body weight of the rats in the group decreased by 9.4 % relative to the initial value at the beginning of the experiment. However, during the recovery period, the rats gained weight, and by the end of the experiment, the average body weight increase in the group was 1.1 % relative to the initial data.

Thus, the differences in the dynamics of rat body weight associated with the dosage level can be noted. In addition, the animals of group III were less active and less willing to consume food during the period of administration of the studied drug (Table 1).

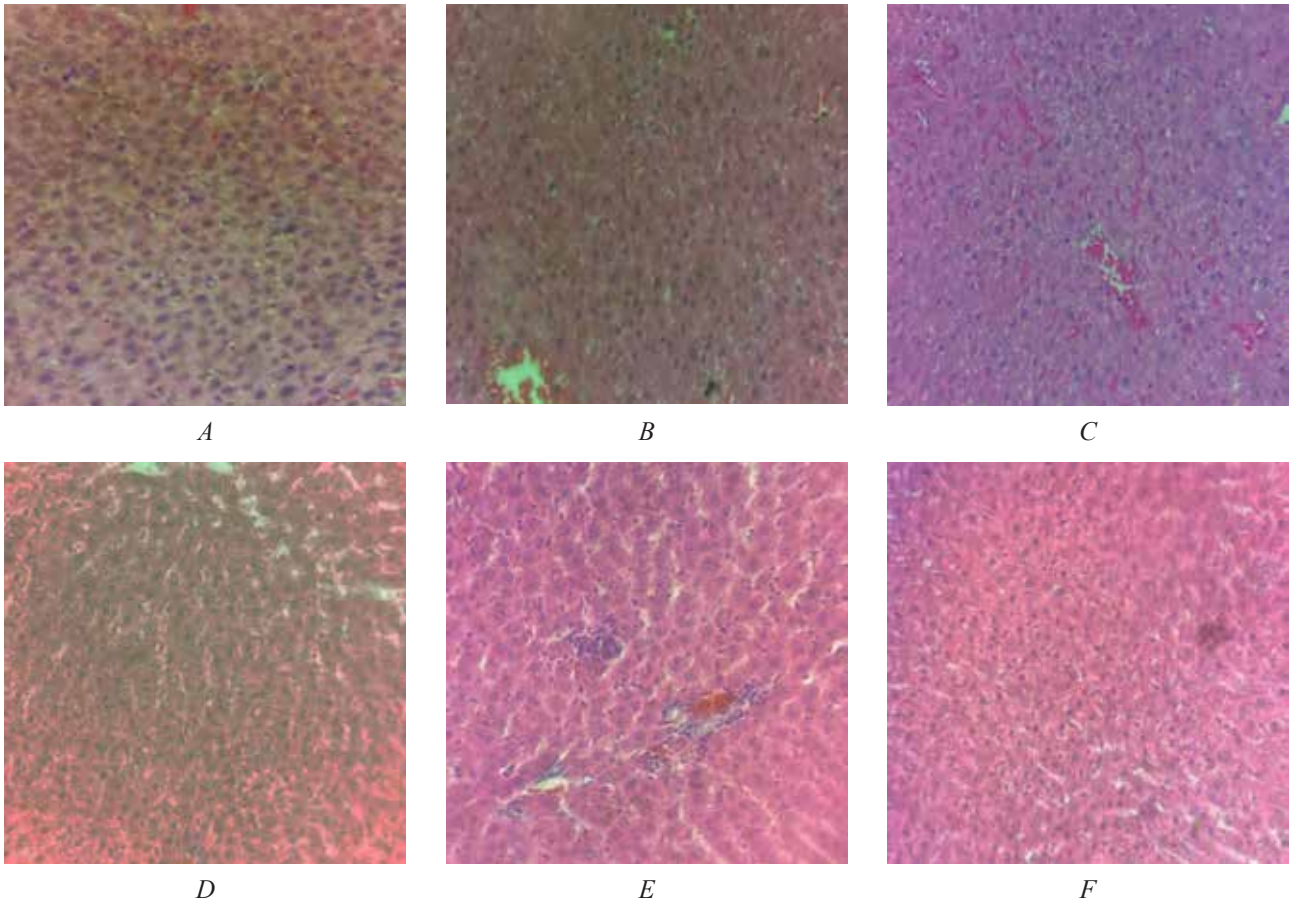
During the experiment, no differences in water consumption by the experimental animals were recorded. Rectal temperature measurements taken with an electronic medical thermometer showed no differences in the rats of the experimental and control groups. When visually assessing the effect of the test drug on the functional state of the central nervous system, it can be noted that during its 14-day administration, the experimental rats of group II maintained motor activity comparable to that of the control animals. In group III, motor activity was slightly reduced relative to the control animals. At the same time, all experimental rats responded adequately to external stimuli.

Macro- and microscopic examination of the organs of animals receiving the test drug did not reveal any pathological changes.

Table 1

Body weight (g) of white rats and its average daily weight gain during the experiment

Indicators	Group of animals		
	I (control)	II (1/50 LD_{50})	III (1/10 LD_{50})
Experiment onset	280.4 ± 2,22	237.0 ± 1.72	255.4 ± 2.19
Day 14	281.6 ± 3,52	237.5 ± 3.38	231.5 ± 4.67
Average daily weight gain/loss of body weight for 14 days, g	0.07	0.04	–1.71
% by the experiment onset	100.4	100.2	90.6
Day 24	281.6 ± 12.02	253.8 ± 3.03	258.1 ± 1.02
Average daily body weight gain for 24 days, g	0.05	0.70	0.11
% by the experiment onset	100.4	107.1	101.1



A *B* *C*

D *E* *F*

Fig. 1. Architecture of rat liver:

A — control (group I) at the experiment onset, *B* — group II on day 14 of administration, *C* — group III on day 14 of administration, *D* — group II after 10 days of administration, *E* — group III after 10 days of administration, *F* — control (group I) at the end of the experiment. Magnification 400x. Hematoxylin and eosin staining

The results of the morphometric analysis showed no reliable differences in the mass coefficients (MC) of the internal organs of rats that were given the drug subcutaneously at doses of 100.0 and 500.0 mg/kg,

with the exception of the adrenal glands. Their MC in both groups were significantly increased by 50.0 %. However, after the expiration of the recovery period, these indicators in the experimental animals reached the values similar to those in the control group.

When examining blood samples from the animals in groups II and III on day 14 of the experiment, no reliable changes were noted in the blood morphological composition, compared to such indicators in the animals in the control group, except for the number of leukocytes, which was by 17.2 % lower in group II. However, after the drug was discontinued, this indicator did not significantly differ from the control.

The analysis of the results obtained in studying the biochemical status of the experimental animals showed a number of changes in some indicators relative to those in the animals of the control group. Thus, in groups II and III, there was recorded a decrease in total blood protein by 6.0 and 10.9 % ($p < 0.05$), respectively. In the rats who were given the drug at a dose of 500 mg/kg, there was also noted a reliable increase in alanine aminotransferase (ALT) activity by 40.0 % ($p < 0.05$). At the same time, in the rats of group II, a tendency towards an increase in ALT activity (21.1 %) was observed, but these changes were statistically insignificant relative to the values in the control group.

When examining the blood of experimental rats after a 10-day recovery period, there were found no significant and statistically reliable changes in the experimental groups relative to the control.

Histological studies have shown that (Fig. 1) all liver tissue samples have a typical morphological structure. Large vessels are empty, small ones are moderately blood-filled. The beam structure is preserved. Hepatocytes are polygonal in shape with a centrally located nucleus. The cytoplasm is evenly stained.

During histological examination of the rat kidneys in all groups (Fig. 2), the absence of any pathological changes was observed, the kidneys had a typical structure. The proximal and distal tubules had an intact epithelial lining. The capillary network of the glomeruli was filled with blood, the capsule was preserved.

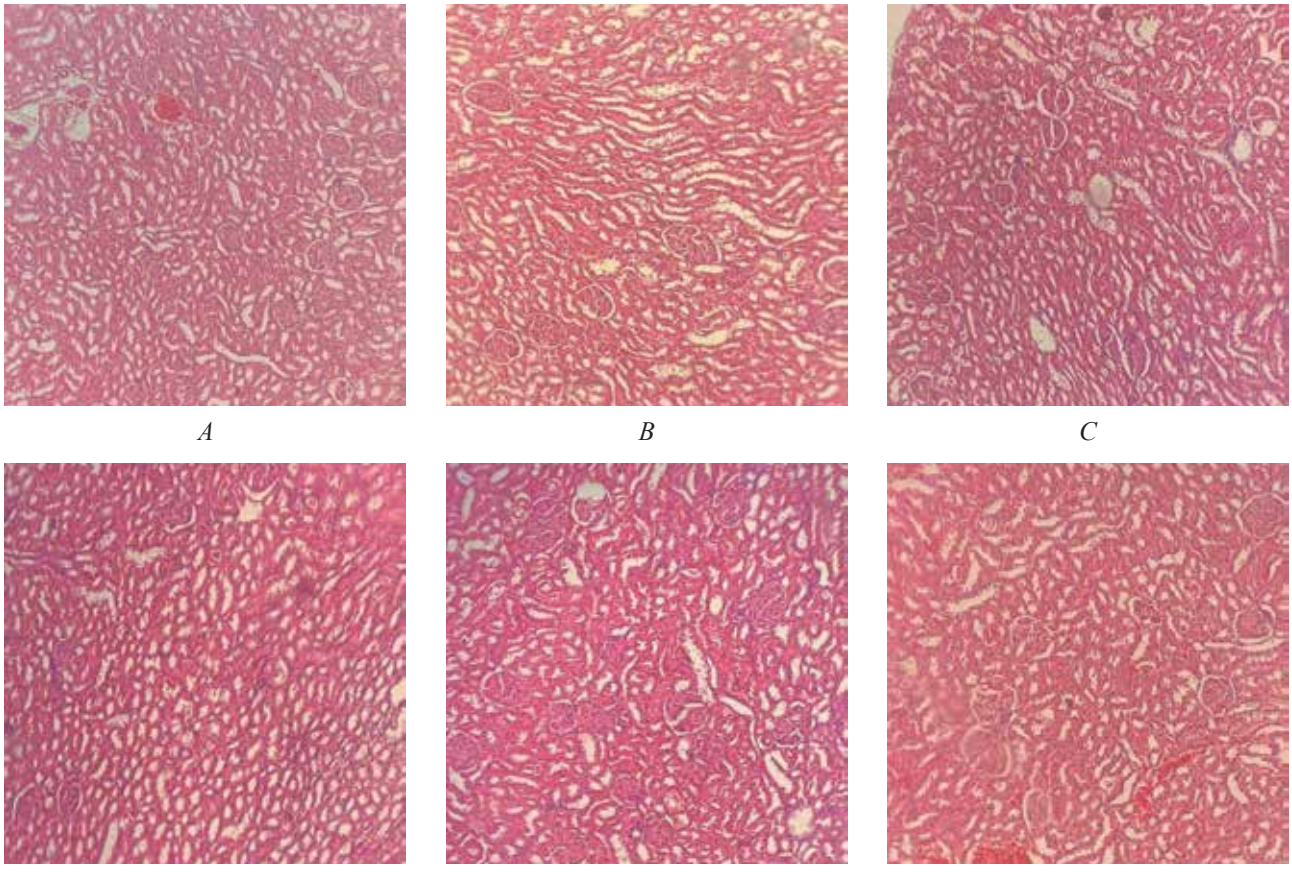


Fig. 2. Architecture of rat kidneys:

A — control (group I) at the experiment onset, *B* — group II on day 14 of administration, *C* — group III on day 14 of administration, *D* — group II after 10 days of administration, *E* — group III after 10 days of administration, *F* — control (group I) at the end of the experiment. Magnification 400x. Hematoxylin and eosin staining

The results of the histological studies showed that there was no pronounced hepato- and nephrotoxic effect of the drug at doses of 100 and 500 mcg/kg, either after 14 days of administration or after a 10-day recovery period. No pathological changes were found in the examination of other organs (heart, spleen, intestines, thymus).

CONCLUSION

With repeated subcutaneous administration of the drug based on ceftiofur, marbofloxacin and prednisolone for 14 days at doses of 100.0 and 500.0 mg/kg, it was found that the drug did not have a negative effect on the clinical status, the blood morphological and biochemical indicators of the experimental animals. The administration of the test drug to the experimental animals at a dose of 500.0 mg/kg caused some changes in the blood morphological and biochemical indicators, which were reversible and were restored to physiological values after the recovery period. Histological methods did not establish any toxic effect of the test drug on organs and tissues.

REFERENCES

1. *Kuznetsov, Yu. E.* Study of subchronic toxicity of the drug "Prazimid-complex" with subsequent necropsy analysis // Kuznetsov Yu. E., *Belova L. M.*, Gavrilova [et al.] // APK: innovatsionnye tekhnologii (AIC: innovative technologies). 2023. No. 4 (63) P. 97—108. DOI 10.35524/2687—0436_2023_04_97

2. *Semenenko M. P.* The assessment of subchronic toxicity of phytoglinol at the stage of preclinical study / M. P. Semenenko, O. V. Lanets, E. V. Kuzminova [et al.] // Bulletin of Veterinary Pharmacology. 2020. No. 4 (13). P. 38—44. DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.4.38

3. *Mikhaylov E. V.* Liver architectonics of white rats after the application of the drug MT-6 in a subacute experiment / E. V. Mikhaylov, B. V. Shabunin, Yu. O. Ponomareva [et al.] // Bulletin of Veterinary Pharmacology 2020. No. 4 (13) P. 61—64. DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.4.61

4. *Cheskidova L. V.* Experimental study of the subacute toxicity of the drug Lp in rats // Uchenye zapiski KGAVM im. N. E. Baumana (Transactions of KSAVM named after N. E. Bauman). 2014. No. 2. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/eksperimentalnoe-issledovanie-podostroy-toksichnosti-preparata-lp-na-krysah (date of access: 20. 01 2025).

5. *Alfonseca-Silva E.* Successful treatment of recurrent subclinical mastitis in cows caused by enrofloxacin-resistant bacteria with sequential intramammary infusions of enrofloxacin HCl-2H_2O and Ceftiofur HCl: a clinical trial/ E. Alfonseca-Silva, J. C. Cruz-Villa, L. Gutiérrez, H. Sumano // J Vet Sci. 2021. 22(6): e78. DOI 10.4142/jvs.2021.22.e78

6. *Cengiz M.* The *in vitro* activity of danofloxacin plus ceftiofur combination: implications for antimicrobial efficacy and resistance prevention / M. Cengiz, P. Sahinturk, G. Hepbostanci [et al.] // Vet Res Forum. — 2022 Jun; 13(2): 149—153. DOI: 10.30466/vrf.2020.113272.2696

7. *Cassier P.* Cephalosporin and fluoroquinolone combinations are highly associated with CTX—M β-lactamase-producing Escherichia coli: a case–control study in a French teaching hospital / *Cassier P.*, *Lallechère S.*, *Aho S.* [et al.] // CMI First published:1746—51. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03349.x

8. *Mikhaylov E. V.* Structural organization of white rats' kidneys in a subacute experiment after the use of the drug MT-6 / E. V. Mikhaylov, B. V. Shabunin, Yu. O. Ponomareva, T. I. Ermakova, E. M. Stepanov, V. S. Bolotova, D. S. Stepanov, M. S. Bogdanova // Bulletin of Veterinary Pharmacology. 2021. No. 1 (14). P. 10—15. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2021.1.10

9. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA/MRL/079/96-FINAL March 1996. Committee for veterinary medicinal products. Marbofloxacin. — Electronic resource. — www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/marbofloxacin-summaryreport-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (accessed on March 2021).

10. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) Committee for veterinary medicinal products. Ceftiofur. Summary report (2) EMEA/MRL/498/98-FINAL. Electronic resource. — www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report /ceftiofur -summaryreport-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (Report dated July 1999.)

11. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) Committee for veterinary medicinal products. Ceftiofur. Summary report (3) EMEA/MRL/835/02-FINAL www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report /ceftiofur-summaryreport-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf /(April 2002.)

12. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. Committee for veterinary medicinal products. Prednisolone (as free alcohol). Summary report. EMEA/MRL/629/99-FINAL. — Electronic resource. — www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/ Prednisolone — summaryreport-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (Report dated July 1999.).

13. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products / edited by A. N. Mironov, N. D. Bunatyan et al. / Scientific Center for Expertise of Medical Products of the Ministry of Health and Social Development of Russia. Part 1. — M., ZAO "Grif i K", 2012. — 944 p. — ISBN 978-5-8125-1466-3.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. V. Galkin — Postgraduate Student;
G. A. Vostroilova — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;
N. A. Khokhlova — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
A. A. Korchagina — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
G. G. Chusova — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate;
B. V. Shabunin — Junior Scientific Associate.

The article was submitted 20.01.2025.

Научная статья
УДК 615.03

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ КЕТАМИН И ИЗОФЛУРАН С ДЕКСМЕДЕТОМИДИНОМ И БЕЗ НЕГО НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ *MACACA FASCICULARIS*

Вера Сергеевна Соколова, Марина Николаевна Макарова, Татьяна Геннадьевна Бармина, Мария Игоревна Гутрова, Дмитрий Юрьевич Акимов✉

НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмоловский, Россия, akimov.du@doclinika.ru✉

Аннотация. Для проведения исследований на яванских макаках (*Macaca fascicularis*) часто приходится прибегать к анестезии животных. При этом препаратами выбора часто становятся кетамин, медетомидин, дексмедетомидин и изофлуран, как в комбинации, так и отдельно, которые отличаются своей быстрой реверсией анестезии. Однако в инструкции по применению данных препаратов нет данных о дозировании для яванских макак. Кроме того, в имеющихся литературных источниках отсутствуют сведения по влиянию анестетиков на физиологические параметры животных, тогда как в доклинических исследованиях важно уметь дифференцировать влияние препаратов для наркотизации от действия исследуемого вещества. Целью настоящего исследования стало изучение влияния кетамин-изофлурановой анестезии в комбинации с дексмедетомидином и без на основные физиологические показатели у яванских макак. Исследование было одобрено локальной комиссией по биоэтике. В экспериментальной работе было задействовано 10 самцов и 10 самок *Macaca fascicularis* в возрасте от 3 до 7 лет. Для реализации принципов «3Rs», а именно reduce — сокращение, применялся перекрестный дизайн с периодом отмывки не менее 7 дней. Анестезия: первоначально животным медленно внутривенно вводили кетамин в дозе 10 мг/кг, через 10 минут использовали масочную подачу изофлурана со скоростью потока 1 л/мин и концентрацией 1 % в воздушной смеси с 40—93 % кислорода. Не ранее, чем через 7 дней, переходили к исследованию другой схемы анестезии: медленно внутривенно вводили кетамин в дозе 10 мг/кг, затем дексмедетомидин в дозе 50 мкг/кг и на 7-й минуте от введения кетамина использовали масочную подачу изофлурана со скоростью потока 1 л/мин и концентрацией 1 % в воздушной смеси с 40—93 % кислорода. В схеме анестезии с использованием дексмедетомидина для реверсии анестезии использовали атипамизол внутримышечно в дозе 0,4 мг/кг. На основании проведенного исследования мы можем заключить, что кетамин-изофлурановая анестезия с применением дексмедетомидина и без него могут быть широко применена для наркотизации яванских макак. При этом применение дексмедетомидина в комбинации с кетамином и изофлураном приводит к более быстрой потере рефлексов, выраженной хирургической стадии анестезии на фоне стабильного артериального давления и удлинения интервалов R-R ср. и P-Q.

Ключевые слова: анестезия, анальгезия, кетамин, изофлуран, дексмедетомидин, яванские макаки, *Macaca fascicularis*

Яванская макака *(Macaca fascicularis)* является предпочтительной животной моделью в биомедицинских исследованиях и исследованиях безопасности лекарств из-за ее близкой геномной и физиологической связи с человеком [1].

Несмотря на то, что яванских макак можно приучить к ряду экспериментальных манипуляций, процедуры, вызывающие боль, требуют применения анестезиологического обеспечения [2]. Из наиболее часто используемых препаратов для наркотизации обезьян стоит отметить кетамин, дексмедетомидин и изофлуран [3—6].

Для обеспечения животного анестезией, соответствующей степени тяжести процедуры, следует понимать механизм действия каждого из препаратов.

Кетамин — это быстродействующий общий анестетик, вызывающий состояние анестезии, характеризующейся глубокой анальгезией, нормальными глоточно-гортанными рефлексами, нормаль-

ным или слегка повышенным тонусом скелетных мышц, стимуляцией сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а иногда и кратковременным и незначительным угнетением дыхания. Кетамин взаимодействует с N-метил-D-аспартатными (NMDA), опиоидными, моноаминергическими и мускариновыми рецепторами, а также чувствительными к напряжению Ca^{2+}-ионными каналами. В отличие от других средств для общей анестезии, кетамин не взаимодействует с рецепторами ГАМК [7—9]. При сочетании кетамина с дексмедетомидином или изофлураном может повыситься риск или тяжесть угнетения ЦНС. В инструкции по применению Кетамин-ЭНДОФАРМ® (Московский эндокринный завод, ФГУП, Россия) для кошек, собак и лошадей рекомендуется комбинировать препарат с агонистами альфа-2-адренорецепторов.

Дексмедетомидин активирует альфа-2-адренорецепторы и вызывает снижение симпатического тонуса с ослаблением нейроэндокринных и гемодинамических реакций на анестезию и хирургическое вмешательство, а также снижает потребность в анестетиках и опиоидах, вызывает седативный эффект и обезболивание.

Дексмедетомидин является специфическим и избирательным агонистом альфа-2-адренорецепторов. Связываясь с пресинаптическими альфа-2-адренорецепторами, он подавляет высвобождение норадреналина и, следовательно, прекращает распространение болевых сигналов. Активация постсинаптических альфа-2-адренорецепторов подавляет симпатическую активность, снижает кровяное давление и частоту сердечных сокращений [10]. При сочетании дексмедетомидина с изофлураном может повыситься риск или тяжесть угнетения ЦНС.

Медетомидин — это синтетическое соединение, используемое в качестве хирургического анестетика и анальгетика. Медетомидин, как и дексмедетомидин, является агонистом альфа-2-адренорецепторов и представляет собой рацемическую смесь двух оптических изомеров: левомедетомидина и дексмедетомидина. Поскольку дексмедетомидин считается единственным активным изомером, медетомидин обычно используют в двойной дозе от вводимого дексмедетомидина, чтобы добиться такого же уровня седативного эффекта и обезболивания [11, 12].

Изофлуран — это ингаляционный анестетик, применяемый для вводного и поддерживающего наркоза. Он вызывает миорелаксацию и снижает чувствительность к боли, изменяя возбудимость тканей. Изофлуран вызывает снижение проводимости синапсов за счет уменьшения времени открытия каналов щелевых контактов и увеличения времени их закрытия. Изофлуран также активирует кальций-зависимую АТФазу в саркоплазматическом ретикулуме, повышая текучесть липидной мембраны. Изофлуран также связывается с рецептором ГАМК, калиевым каналом с большой проводимостью, активируемым Ca^{2+}, глутаматным рецептором и глициновым рецептором [13].

Ранее нами уже были проведены исследования по изучению влияния изофлурана на яванских макак [14], однако не было опыта применения кетамина и высокоселективных агонистов альфа-2-адренорецепторов.

На этапе планирования эксперимента нами был проведен пилотный эксперимент с целью установления фармакологического эффекта кетамина, медетомидина и дексмедетомидина. Кетамин вводили 1 самцу и 1 самке внутривенно (в/в) в I день в дозе 8 мг/кг, во II день — 10 мг/кг и в III день — 15 мг/кг. Было установлено, что кетамин не вызывает общей анестезии у яванских макак, приводя к диссоциативной анестезии. Медетомидин и дексмедетомидин вводили разным животным внутримышечно (в/м) в первый день 50 мкг/кг, во II день — 100 мкг/кг и в III день — 250 мкг/кг. Введение препаратов не привело к каким-либо значимым фармакологическим эффектам, в том числе общей анестезии, сну или миорелаксации. Наступало состояние легкой седации при использовании дозы 250 мкг/кг.

Было установлено, что в монорежиме данные препараты не вызывали общей анестезии. Исходя из полученных данных, было принято решение по комбинированию кетамина с изофлураном, а также с дексмедетомидином и изофлураном. Сдерживающим фактором применения комбинаций является отсутствие в инструкции по применению кетамина, дексмедетомидина и изофлурана данных о дозировании для яванских макак. Кроме того, в имеющихся литературных данных отсутствуют сведения по влиянию анестетиков на физиологические параметры животных, тогда как в доклинических исследованиях важно уметь дифференцировать влияние препаратов для наркотизации от действия исследуемого вещества.

Ввиду обозначенных факторов **целью** настоящего исследования стало изучение влияния кетамин-изофлурановой анестезии в комбинации с дексмедетомидином и без на основные физиологические показатели у яванских макак.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование было одобрено локальной комиссией по биоэтике № 1.46/24 от 13.09.2024 г. В экспериментальной работе было задействовано 10 самцов и 10 самок *Macaca fascicularis* в возрасте от 3 до 7-ми лет. Применялся перекрестный дизайн с периодом отмывки не менее 7 дней. Средняя масса тела (M ± m) в группе самцов — 6,1 ± 1,1 кг, самок — 3,9 ± 0,7 кг. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. N33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований», а также Директивой Европейского сообщества (86/609/EEC), Хельсинкской декларацией и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [4, 5]. Животные клинически здоровы, свободны от амебиаза, лямблиоза, сальмонеллеза, шигеллеза, эшерихиоза, кампилобактериоза, иерсиниоза, включая *Yersinia pestis, Y. pseudotuberculosis*, лептоспироза, листериоза, гепатитов типа A, B, C; вируса обезьяньего иммунодефицита (SIV), Т-клеточного лейкоза обезьян (STLV), обезьяньего ретровируса типа D (SRV) и туберкулеза [15].

Анестезия. Первоначально 10 самцам и 10 самкам медленно внутривенно вводили кетамин в дозе 10 мг/кг, через 10 минут использовали масочную подачу изофлурана со скоростью потока 1 л/мин и концентрацией 1 % в воздушной смеси с 40—93 % кислорода. Не ранее чем через 7 дней переходили к исследованию другой схемы анестезии: медленно внутривенно вводили кетамин в дозе 10 мг/кг, затем в/м дексмедетомидин в дозе 50 мкг/кг и на 7-й минуте от введения кетамина использовали масочную подачу изофлурана со скоростью потока 1 л/мин и концентрацией 1 % в воздушной смеси с 40—93 % кислорода. В схеме анестезии с использованием дексмедетомидина для реверсии анестезии использовали в/м атипамизол в дозе 0,4 мг/кг.

После введения кетамина регистрировались рефлексы (пальпебральный, педальный, роговичный, тонус нижней челюсти, спонтанные движения). Для регистрации рефлексов использовали бальную систему, где 3 балла — нормальная реакция, 2 балла — незначительное изменение, 1 балл — слабовыраженная реакция на раздражитель, 0 — отсутствие рефлексов.

Для оценки влияния анестезии на физиологические параметры температуру тела (до и во время анестезии), сатурацию (SpO_2) и артериальное давление (АД) измеряли с использованием монитора пациента Comen Star 8000 D, ЭКГ и ЧСС — с помощью электрокардиографа «Поли-Спектр-8/Е» (ООО «Нейрософт»), частоту дыхательных движений (ЧДД) оценивали визуально (до и во время анестезии).

Для контроля уровня глюкозы использовали глюкометр Акку-Чек, кровь отбирали из капилляров пальца до анестезии и на 30 минуте после введения кетамина.

Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данные были оценены на соответствие нормальному закону распределения (критерий Шапиро — Уилка) и условиям однородности групповых дисперсий (тест Брауна — Форсайта).

Результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения (M ± SD). Для оценки влияния степени анестезии на физиологические показатели использовали однофакторный дисперсионный анализ, при отсутствии однородности дисперсий использовали статистику Брауна — Форсайта со скорректированными значениями степеней свободы.

При выявлении статистически значимого влияния фактора степени анестезии было проведено апостериорное сравнение групп критерием Тьюкки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные данные о влиянии кетамин-изофлуранового (КИ) и кетамин-дексмедетомидин-изофлуранового наркоза (КДИ) на физиологические параметры яванских макак представлены на рисунках 1—4 и в таблице 1.

Время угасания рефлексов является важным фактором для начала проведения хирургического вмешательства. Скорость угасания одних рефлексов может быть не одномоментной среди самцов и самок и в зависимости от анестезиологического агента (рис. 1—4).

Из рисунков 1 и 2 следует, что у самцов яванских макак угасание большинства рефлексов на КИ анестезии наступает, начиная с 10 минуты после введения кетамина, тогда как у самок — с первой минуты введения кетамина (педальный рефлекс). Роговичный рефлекс как у самцов, так и у самок, угасает последним на 25-й и 17-й минуте соответственно.

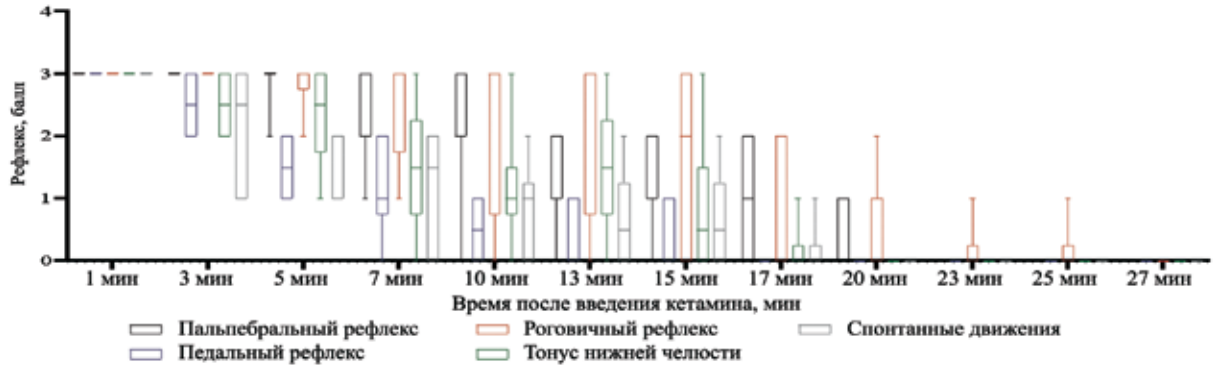


Рис. 1. Угасание рефлексов у самцов яванских макак при использовании кетамин-изофлурановой анестезии

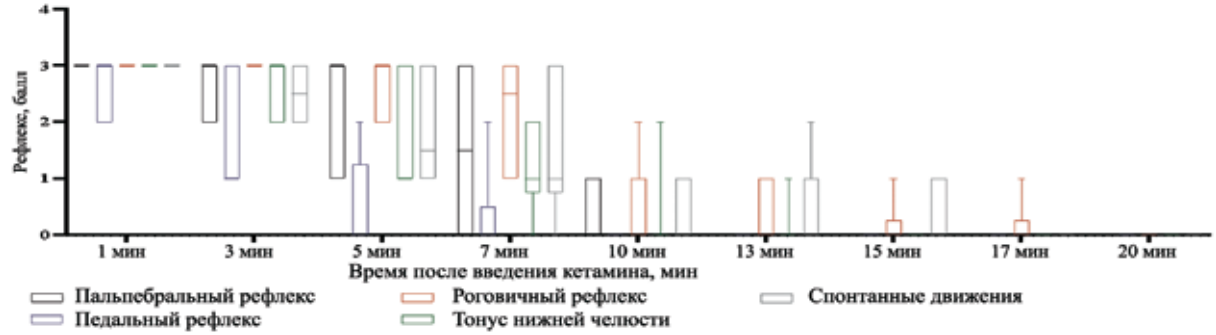


Рис. 2. Угасание рефлексов у самок яванских макак при использовании кетамин-изофлурановой анестезии

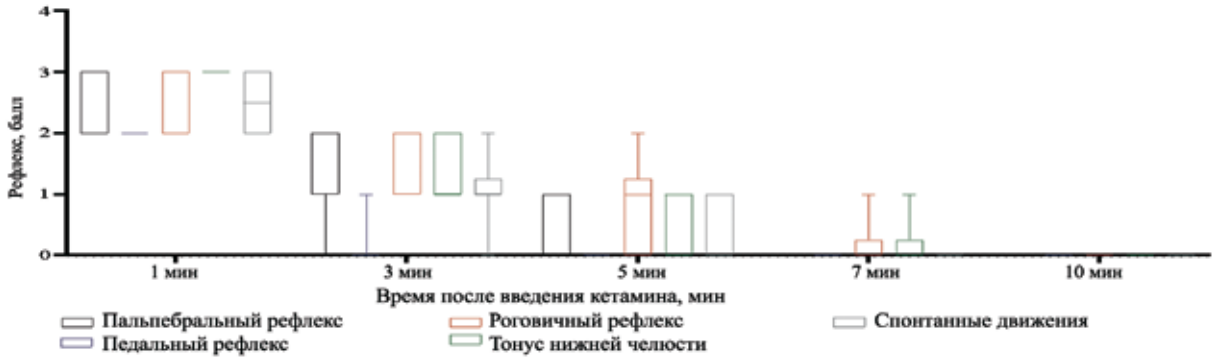


Рис. 3. Угасание рефлексов у самцов яванских макак при использовании кетамин-дексмедетомидин-изофлурановой анестезии

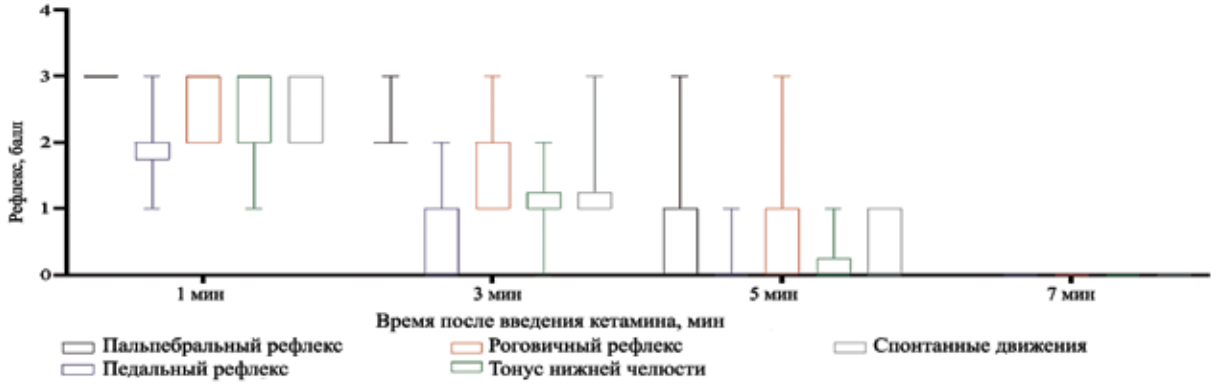


Рис. 4. Угасание рефлексов у самок яванских макак при использовании кетамин-дексмедетомидин-изофлурановой анестезии

На основании данного этапа работы можно утверждать, что анестезия у самок яванских макак наступает раньше, чем у самцов, кроме того включение дексмедетомидина в схему кетамин-изофлуранового наркоза приводит к более быстрой потере рефлексов до хирургической стадии анестезии.

Таблица 1

Физиологические параметры яванских макак под анестезией

Показатель		Самцы		Самки	
		КИ	КДИ	КИ	КДИ
Скорость наступления анестезии, мин		20—27	7—10	15—20	5—7
Длительность анестезии, мин.		Все время подачи изофлурана (60 минут)			
Длительность реверсии, мин		8—14	7—8	10—15	5—8
Температура тела, °С		38,1 ± 0,2 ↓	38,9 ± 0,1 ↓	38,5 ± 0,1 ↓	38,7 ± 0,1 ↓
ЧДД, вдохов/мин		36,0 ± 4,0 ↓	40,3 ± 3,1 ↓	39,5 ± 3,2 ↓	46,5 ± 4,4 ↓
Сатурация (SpO_2), %		99,5 ± 0,3	96,8 ± 0,6	98,8 ± 0,6	97,5 ± 1,2
Уровень глюкозы, ммоль/л		4,1 ± 0,1	4,9 ± 0,2	3,1 ± 0,1	5,5 ± 0,3[4*]
АД, мм рт. ст.	систолическое	84,0 ± 1,7	116,8 ± 1,8[4*]	78,5 ± 6,5	113,0 ± 3,3[4*]
	диастолическое	30,0 ± 1,9	74,5 ± 1,8[4*]	35,0 ± 5,3	68,5 ± 4,2[4*]
ЧСС, ударов/мин		163,5 ± 7,7	114,5 ± 5,8[3*]	188,5 ± 10,1	113,8 ± 4,8[4*]
ЭКГ, мс	R-R ср.	366,3 ± 14,1	477,0 ± 28,6[2*]	352,4 ± 8,1	562,2 ± 25,6[4*, #]
	P	48,0 ± 0,8	49,0 ± 0,8	47,3 ± 3,1	49,5 ± 0,9
	P-Q	82,0 ± 0,8	91,4 ± 1,6	65,0 ± 5,3[2#]	91,5 ± 1,9[4*]
	QRS	72,4 ± 1,9	67,5 ± 1,5	64,2 ± 1,7[#]	63,6 ± 2,3
	Q-T	284,1 ± 24,3	240,5 ± 7,9	203,8 ± 7,7[2#]	253,7 ± 2,8
	Q-Tc	370,7 ± 4,8	354,2 ± 3,3	355,6 ± 6,7	341,8 ± 9,3

↓ снижение показателя по сравнению с данными до анестезии

[*] при наличии статистической значимости между группами животных одного пола, при этом

[2*] $P < 0,01$

[3*] $P < 0,001$

[4*] $P < 0,0001$

[#] при наличии статистической значимости внутри группы между самцами и самками, при этом

[#] $P < 0,05$

[2#] $P < 0,01$

Из рисунков 3 и 4 видно, что у самцов и самок яванских макак угасание большинства рефлексов на КДИ анестезии наступает с первой минуты введения кетамина. Роговичный рефлекс так же как и тонус нижней челюсти, у самцов может сохраняться до 7 минуты, тогда как у самок угасание наступает относительно равномерно на 5 минуте.

Согласно данным, представленным в таблице 1, длительность анестезии в обеих схемах составляла не менее 60 минут и прогнозируемо продолжалась бы все время подачи газовоздушной смеси. В группе с применением КИ длительность реверсии анестезии после отключения подачи изофлурана достигала 15 минут, а в группе КДИ — 8 минут

после прекращения подачи изофлурана и в/м введения атипамизола. Температура тела и ЧДД у животных во всех группах снижались по отношению к показателям до анестезии и укладывались в референсные интервалы, опубликованные нами ранее [16]. Схожие изменения наблюдались при введении медетомидина, золазепама и тилетамина у *Macaca fascicularis*, что было описано Fahlman A. et al. (2006) [17]. Сатурация находилась в пределах клинической нормы. У самок отмечено статистически значимое увеличение уровня глюкозы в группе КДИ по отношению к самкам, для анестезии которых использовали КИ, данное изменение не имело клинической значимости. КИ более сильно угнетает систолическое и диастолическое артериальное давление по сравнению с комбинацией КДИ, при $p < 0{,}0001$.

Комбинация КДИ действует более кардиодепрессивно на сердечно-сосудистую систему, нежели КИ, что выражается в статистически значимом урежении ЧСС и удлинении интервалов R-R ср и P-Q.

Использование КИ позволяет обеспечивать контролируемую анестезию для проведения процедур легкой и умеренной степени тяжести, а использование КДИ — в том числе и для процедур, характеризующихся тяжелой степенью тяжести. Следует учитывать более выраженное кардиодепрессивное действие КДИ по сравнению с КИ при интерпретации результатов ЭКГ у яванских макак.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования мы можем заключить, что кетамин и изофлуран в комбинации с дексмедетомидином и без него могут быть применены для наркотизации яванских макак, при этом кетамин-изофлурановую анестезию следует использовать для манипуляций, характеризующихся легкой и умеренной степенью тяжести, а в комбинации с дексмедетомидином — тяжелой степенью.

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы:

— использование дексмедетомидина в комбинации с кетамином и изофлураном имеет более выраженный анестезирующий эффект;

— оба протокола анестезиологического обеспечения позволяют поддерживать хорошо контролируемую терморегуляцию животного;

— со стороны дыхательной системы не отмечается клинически значимых отклонений при использовании обеих схем анестезии;

— оба протокола анестезии не приводят к значимым отклонениям в работе сердечно-сосудистой системы, что подтверждается результатами исследований артериального давления, частоты сердечных сокращений и электрокардиографии.

Полученные данные могут быть применены в сфере экспериментальной фармакологии и токсикологии, связанной с использованием яванских макак (*Macaca fascicularis*), и помогут дифференцировать изменения, вызванные исследуемым лекарственным средством, от влияния анестезии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Weinbauer G.*, *Mecklenburg L.* Does Geographical Origin of Long-Tailed Macaques (*Macaca fascicularis*) Matter in Drug Safety Assessment?: A Literature Review and Proposed Conclusion // Toxicologic pathology. — 2022. — V. 50. — № . 5. — P. 552—559. DOI: 10.1177/01926233221095443

2. *Соколова В. С.* и др. Приучение яванских макак к экспериментальным процедурам // Технологии живых систем. — 2024. — Т. 21, № 4. — С. 102—111. — DOI 10.18127/j20700997—202404—11

3. *Marion B. M.*, *Ghering J. M.*, *Dixon B. C.* et al. Comparison of Alfaxalone-Midazolam, Tiletamine-Zolazepam, and KetamineAcepromazine Anesthesia during Plethysmography in Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*) and Rhesus Macaques (Macaca mulatta) // Comparative medicine. — 2022. — V. — 72. № 4. — P. 248—256. DOI:10.30802/AALAS-CM-22—000010

4. *Бондарева Е. Д.* и др. Рекомендуемые способы поения лабораторных животных. Технические особенности. Обеспечение благополучия и здоровья лабораторных животных // Лабораторные животные для научных исследований. — 2022. — № 2. — С. 71—78. DOI: 10.29296/2618723X-2022-02-08

5. *Брук С.* Трудности, связанные с тренингами опасных приматов при островном содержании / С. Брук // Научные исследования в зоологических парках. — 2021. — № 36. — С. 137—142.

6. *Гапонов Н. В.* The effect of biologically active supplements on blood hematological parameters of male rhesus macaques / Н. В. Гапонов, Г. Л. Яговенко, А. Н. Степанова // Kormoproizvodstvo. — 2020. — No. 9.2020. — DOI 10.25685/krm.2020.9.2020.006

7. *Волков С. Г.* и др. Нейропротекция кетамином // Современные проблемы науки и образования. — 2022. — № 3. — С. 152. DOI: 10.17513/spno.31809

8. *Хохлова Н. А.* и др. Влияние препарата интерферона лямбда на белковосинтетическую функцию печени крыс в условиях индуцированной иммуносупрессии // Journal of Agriculture and Environment. — 2024. — № 1 (41). — DOI: 10.23649/JAE.2024.41.13

9. *Гурова С. В.* и др. Современные аспекты в области анестезии мелких лабораторных животных // Юж-

но-Российский онкологический журнал. — 2022. — Т. 3. — № 3. — С. 55—64. DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-3-7

10. *Царьков А. В.* и др. Дексмедетомидин в анестезии плановой эндоваскулярной реваскуляризации миокарда // Уральский медицинский журнал. — 2022. — Т. 21. — № 1. — С. 72—76. DOI: 10.52420/2071-5943-2022-21-1-72-76

11. *Siegenthaler J.*, *Pleyers T.*, *Raillard M.* et al.. Effect of Medetomidine, Dexmedetomidine, and Their Reversal with Atipamezole on the Nociceptive Withdrawal Reflex in Beagles // Animals: an open access journal from MDPI. — 2020. — V. 10. — № . 7. — P. 1240. DOI: 10.3390/ani10071240

12. *Руденко П. А.* и др. Референсные интервалы базовых эхокардиографических параметров у физиологически здоровых домашних кошек // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2023. — № 4 (25). — С. 27—38. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.27

13. *Садоведов К. П.* и др. Влияние различных способов общей анестезии на показатели внешнего дыхания при проведении кесарева сечения у собак // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. — 2023. — № 2. — С. 72—75. DOI: 10.52419/issn2782-6252.2023.2.72

14. *Акимов Д. Ю.* и др. Характеристика влияния двух видов комбинированной анестезии на основные физиологические параметры яванских макак // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2024. — Т. 1. — № 11. — С. 47—57. DOI: 1036871/vet.zoo.bio.202411104

15. *Акимов Д. Ю.* и др. Риск-ориентированный подход к проведению мониторинга здоровья обезьян // Лабораторные животные для научных исследований. — 2021. — № 2. — С. 69—82. DOI: 10.29296/2618723X-2021-02-09

16. *Акимов Д. Ю.* и др. Референсные значения показателей частоты дыхательных движений у разных видов животных // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2024. — № 2 (27). — С. 21—38. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2024.2.21

17. *Fahlman A.*, *Bosi E. J.*, *Nyman G.* Reversible anesthesia of Southeast Asian primates with medetomidine, zolazepam, and tiletamine // Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians. — 2006. — V. 37. — № 4. — P. 558—561. DOI: 10.1638/05-044.1

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

В. С. Соколова — ветеринарный врач, участок лабораторные приматы;
М. Н. Макарова — доктор медицинских наук, директор;
Т. Г. Бармина — зоотехник;
М. И. Гутрова — лаборант-исследователь, участок лабораторные приматы;
Д. Ю. Акимов — главный ветеринарный врач.

Статья поступила в редакцию 03.02.2025.

Original article
UDC 615.03

EFFECT OF KETAMINE AND ISOFLURANE COMBINATION WITH AND WITHOUT DEXMEDETOMIDINE ON PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF *MACACA FASCICULARIS*

Vera Sergeevna Sokolova, Marina Nikolaevna Makarova, Tatyana Gennadyevna Barmina, Mariya Igorevna Gutrova, Dmitriy Yuryevich Akimov✉

Research and Production Association "HOME OF PHARMACY",
Leningrad region, Vsevolozhsk district, Kuzmolovskiy s., Russia, akimov.du@doclinika.ru✉

Abstract. To conduct studies on cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), it is often necessary to resort to anesthesia of animals. In this case, the drugs of choice are often ketamine, medetomidine, dexmedetomidine and isoflurane, both in combination and separately, which are distinguished by their rapid reversal of anesthesia. However, the instructions for use of these drugs do not provide the data on dosing for cynomolgus macaques. In addition, the available literature does not contain information on the effect of anesthetics on the physiological parameters of animals, while in preclinical studies it is important to be able to differentiate the effect of drugs for anesthesia from the effect of the test substance. The objective of this research was to study the effect of ketamine-isoflurane anesthesia in combination with and without dexmedetomidine on the main physiological parameters in cynomolgus macaques. The study was approved by the local bioethics commission. The experimental work involved 10 male and 10 female *Macaca fascicularis* aged 3 to 7 years. To implement the 3Rs principles, namely reduce, a crossover design with a washout period of at least 7 days was used. Anesthesia. Initially, the animals were slowly injected intravenously with ketamine at a dose of 10 mg/kg; in 10 minutes, isoflurane was used by mask at a flow rate of 1 L/min and a concentration of 1 % in an air mixture with 40—93 % oxygen. No earlier than 7 days later, we switched to the study of another anesthesia scheme: ketamine was slowly injected intravenously at a dose of 10 mg/kg, then dexmedetomidine at a dose of 50 mcg/kg and at the 7th minute from the ketamine administration, isoflurane was used by mask at a flow rate of 1 L/min and a concentration of 1 % in an air mixture with 40—93 % oxygen. In the anesthesia scheme using dexmedetomidine, atipamisole was used intramuscularly at a dose of 0.4 mg/kg for anesthesia reversal. Based on the study, we can conclude that ketamine-isoflurane anesthesia with and without dexmedetomidine can be widely used for anesthesia of cynomolgus macaques. At the same time, the use of dexmedetomidine in combination with ketamine and isoflurane leads to a more rapid loss of reflexes, a pronounced surgical stage of anesthesia against the background of stable arterial pressure and prolongation of R-R av. and P-Q intervals.
Keywords: anesthesia, analgesia, ketamine, isoflurane, dexmedetomidine, cynomolgus macaques, *Macaca fascicularis*

The cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) is a preferred animal model in biomedical and drug safety research due to its close genomic and physiological relationship to humans [1].

Although cynomolgus macaques can be trained to perform a range of experimental manipulations, procedures that induce pain require anesthesia [2]. The most commonly used drugs for anesthesia of monkeys include ketamine, dexmedetomidine and isoflurane [3—6].

To provide an animal with anesthesia appropriate to the severity of the procedure, it is important to understand the mechanism of action of each drug.

Ketamine is a rapid-acting general anesthetic that produces a state of anesthesia characterized by profound analgesia, normal pharyngeal reflexes, normal to mildly increased skeletal muscle tone, stimulation of the cardiovascular and respiratory systems, and sometimes brief and mild respiratory depression. Ketamine interacts with N-methyl-D-aspartate (NMDA), opioid, monoaminergic, and muscarinic receptors, as well as voltage-sensitive Ca_2^+ ion channels. Unlike other general anesthetics, ketamine does not interact with GABA receptors [7—9]. The risk or severity of CNS depression may be increased when ketamine is combined with dexmedetomidine or isoflurane. The instructions for

use of Ketamine-ENDOPHARM® (Moscow Endocrine Plant, FSUE, Russia) for cats, dogs and horses recommend combining the drug with alpha-2-adrenergic receptor agonists.

Dexmedetomidine activates alpha-2-adrenergic receptors and causes a decrease in sympathetic tone with weakening of neuroendocrine and hemodynamic responses to anesthesia and surgery, and also reduces the need for anesthetics and opioids, causes sedation and analgesia. Dexmedetomidine is a specific and selective alpha-2-adrenergic receptor agonist. By binding to presynaptic alpha-2-adrenergic receptors, it inhibits the release of norepinephrine and, therefore, stops the propagation of pain signals. Activation of postsynaptic alpha-2-adrenergic receptors inhibits sympathetic activity, reduces blood pressure and heart rate [10]. When dexmedetomidine is combined with isoflurane, the risk or severity of CNS depression may increase.

Medetomidine is a synthetic compound used as a surgical anesthetic and analgesic. Medetomidine, like dexmedetomidine, is an alpha-2-adrenergic receptor agonist and is a racemic mixture of two optical isomers: levometomidine and dexmedetomidine. Since dexmedetomidine is considered the only active isomer, medetomidine is usually used at a double dose of the administered dexmedetomidine to achieve the same level of sedation and analgesia [11, 12].

Isoflurane is an inhalational anesthetic used for induction and maintenance of anesthesia. It induces muscle relaxation and reduces pain sensitivity by altering tissue excitability. Isoflurane causes a decrease in synaptic conductivity by decreasing the opening time of gap junction channels and increasing their closing time. Isoflurane also activates calcium-dependent ATPase in the sarcoplasmic reticulum, increasing lipid membrane fluidity. Isoflurane also binds to the GABA receptor, the large-conductance potassium channel activated by Ca_2^+, the glutamate receptor and the glycine receptor [13]. We have previously conducted studies on the effects of isoflurane on cynomolgus macaques [14], but there was no experience with ketamine and highly selective alpha-2-adrenergic receptor agonists.

At the planning stage of the experiment, we conducted a pilot experiment to establish the pharmacological effect of ketamine, medetomidine and dexmedetomidine. Ketamine was administered to 1 male and 1 female intravenously (IV) on day 1 at a dose of 8 mg/kg, on day 2 — at 10 mg/kg, and on day 3 — at 15 mg/kg. It has been found that ketamine does not cause general anesthesia in cynomolgus macaques, leading to dissociative anesthesia. Medetomidine and dexmedetomidine were administered to different animals intramuscularly (IM) on day 1 at 50 μg/kg, on day 2 — at 100 μg/kg, and on day 3 — at 250 μg/kg. The administration of the drugs did not lead to any significant pharmacological effects, including general anesthesia, sleep or muscle relaxation. Mild sedation was induced at a dose of 250 mcg/kg.

It had been found that these drugs did not cause general anesthesia when used alone. Based on the data obtained, a decision was made to combine ketamine with isoflurane, as well as with dexmedetomidine and isoflurane. A limiting factor in the use of combinations is the lack of dosing data for cynomolgus macaques in the instructions for use of ketamine, dexmedetomidine and isoflurane. In addition, the available literature does not contain information on the effect of anesthetics on the physiological parameters of animals, while in preclinical studies it is important to be able to differentiate the effect of drugs for anesthesia from the effect of the test substance.

In view of the above factors, **the objective** of this research was to study the effect of ketamine-isoflurane anesthesia in combination with and without dexmedetomidine on the main physiological indicators in cynomolgus macaques.

MATERIAL AND METHODS

The study was approved by the local bioethics commission No. 1.46/24 dtd. September 13, 2024. The experimental work involved 10 male and 10 female *Macaca fascicularis* aged 3 to 7 years. A crossover design with a washout period of at least 7 days was used. The average body weight (M ± m) in the male group was 6.1 ± 1.1 kg, females — 3.9 ± 0.7 kg. The animals were kept under standard conditions in accordance with the recommendations of the Board of the Eurasian Economic Commission dtd. November 14, 2023 No. 33 On the Guidelines for Working with Laboratory (Experimental) Animals during Preclinical (Non-Clinical) Studies, as well as the European Community Directive (86/609 / EEC), the Helsinki Declaration and the Rules for Conducting Work Using Experimental Animals [4, 5]. The animals were clinically healthy, free from amebiasis, giardiasis, salmonellosis, shigellosis, escherichiosis, campylobacteriosis, yersiniosis, including *Yersinia pestis, Y. pseudotuberculosis*, leptospirosis, listeriosis, hepatitis types A, B, C; simian immunodeficiency virus (SIV), simian T-cell leukemia virus (STLV), simian retrovirus type D (SRV/D) and tuberculosis [15].

Anesthesia. Initially, 10 males and 10 females were slowly injected intravenously with ketamine at a dose of 10 mg/kg; in 10 minutes, isoflurane was adminis-

tered by mask at a flow rate of 1 L/min and a concentration of 1 % in an air mixture with 40—93 % oxygen. No earlier than 7 days later, they switched to studying another anesthesia scheme: ketamine was slowly injected intravenously at a dose of 10 mg/kg, then dexmedetomidine at a dose of 50 mcg/kg intramuscularly, and at the 7th minute from the administration of ketamine, isoflurane was administered by mask at a flow rate of 1 L/min and a concentration of 1 % in an air mixture with 40—93 % oxygen. In the anesthesia regimen using dexmedetomidine, atipamisole was used intramuscularly at a dose of 0.4 mg/kg to reverse anesthesia.

After the introduction of ketamine, the reflexes (palpebral, pedal, corneal, lower jaw tone, spontaneous movements) were recorded. To record reflexes, a point system was used, where 3 points was a normal reaction, 2 points — an insignificant change, 1 point — a weak reaction to the stimulus, 0 — no reflexes.

To assess the effect of anesthesia on physiological parameters, body temperature (before and during anesthesia), saturation (SpO_2) and blood pressure (BP) were measured using a Comen Star 8000 D patient monitor, ECG and HR — using a Poli-Spectrum-8/E electrocardiograph (Neurosoft LLC), respiratory rate (RR) was assessed visually (before and during anesthesia).

To monitor glucose levels, an Accu-Chek glucometer was used. Blood was collected from finger capillaries before anesthesia and 30 minutes after ketamine administration. The obtained data were processed using GraphPad Prism software. The data were assessed for compliance with the normal distribution law (Shapiro — Wilk test) and conditions for homogeneity of group variances (Brown — Forsythe test).

The results are presented as the mean and standard deviation (M ± SD). To assess the effect of the degree of anesthesia on physiological indicators, one-way ANOVA was used; in the absence of homogeneity of variances, the Brown — Forsythe statistics with adjusted values of the degrees of freedom were used. When a statistically significant effect of the degree of anesthesia factor was detected, a posteriori comparison of the groups was performed using the Tukey criterion.

SRUDY RESULTS

The obtained data on the effect of ketamine-isoflurane (KI) and ketamine-dexmedetomidine-isoflurane (KDI) anesthesia on the physiological parameters of cynomolgus macaques are presented in Fig. 1—4 and Table 1.

The time of reflex extinction is an important factor for the initiation of surgical intervention. The rate of extinction of some reflexes may not be the same in males and females and may vary depending on the anesthetic agent, Fig. 1—4.

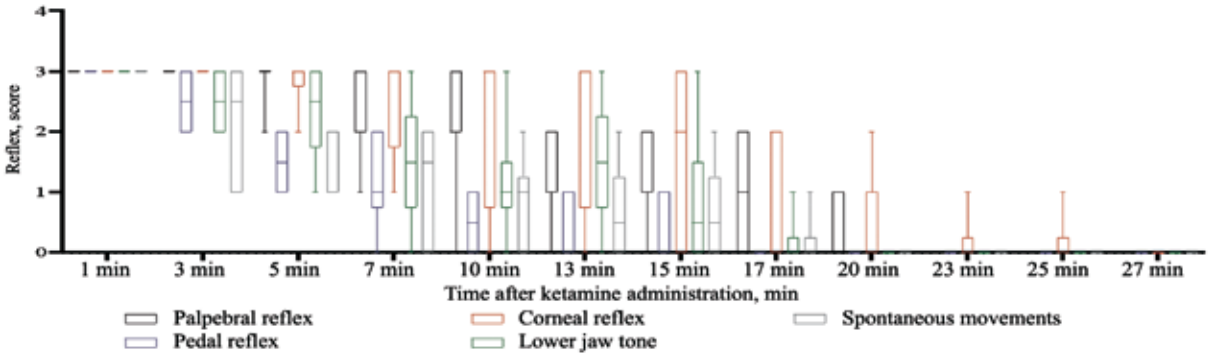


Fig. 1. Extinction of reflexes in male cynomolgus macaques using ketamine-isoflurane anesthesia

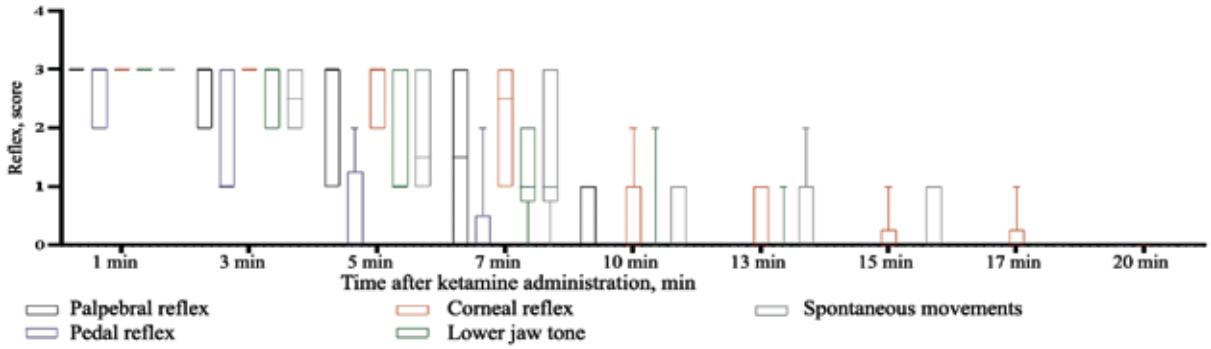


Fig. 2. Extinction of reflexes in female cynomolgus macaques using ketamine-isoflurane anesthesia

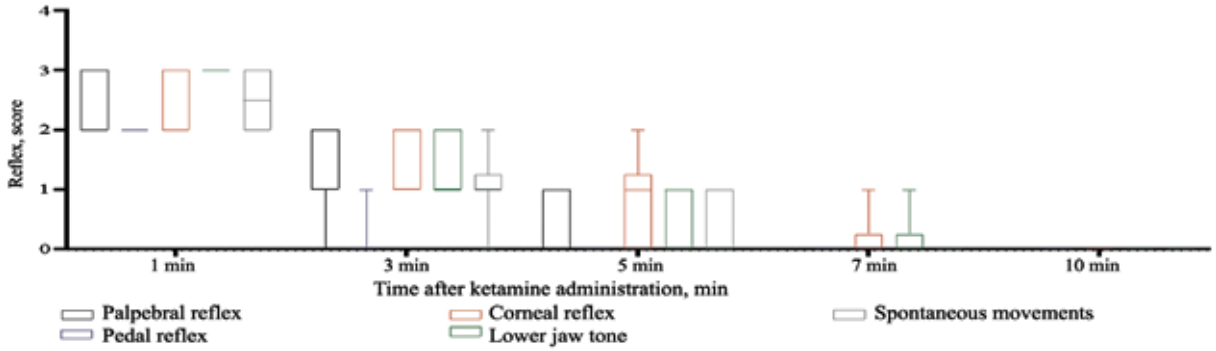


Fig. 3. Extinction of reflexes in male cynomolgus macaques using ketamine-dexmedetomidine-isoflurane anesthesia

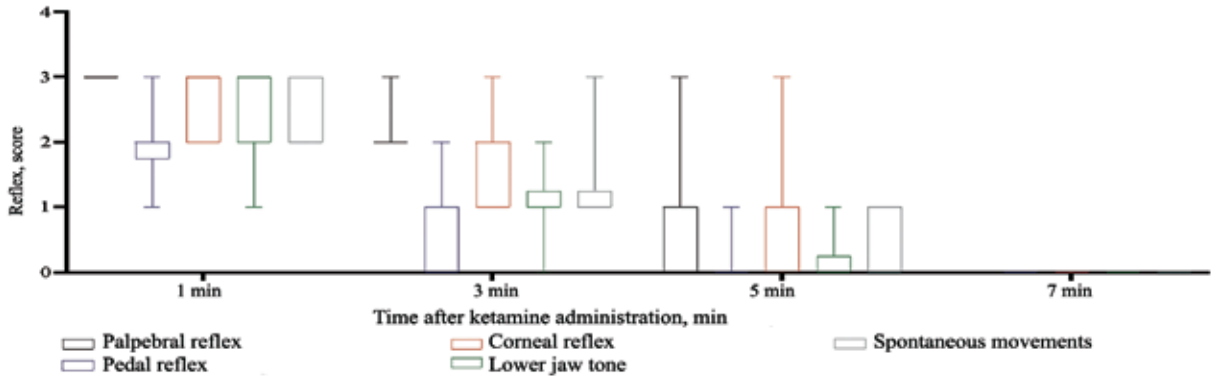


Fig. 4. Extinction of reflexes in female cynomolgus macaques using ketamine-dexmedetomidine-isoflurane anesthesia

It follows from Fig. 1 and 2 that in male cynomolgus macaques, the extinction of most reflexes to KI anesthesia occurs starting from the 10th minute after the administration of ketamine, while in females — from the first minute of ketamine administration (pedal reflex). The corneal reflex in both males and females is the last to fade, at the 25th and 17th minutes, respectively.

Fig. 3 and 4 show that in male and female cynomolgus macaques, the extinction of most reflexes to the KDI of anesthesia occurs from the first minute of ketamine administration. The corneal reflex, as well as the tone of the lower jaw, can persist in males for up to the 7th minute, while in females, extinction occurs relatively uniformly at the 5th minute.

Based on this stage of the work, it can be argued that anesthesia in female cynomolgus macaques occurs earlier than in males, in addition, the inclusion of dexmedetomidine in the ketamine-isoflurane anesthesia scheme leads to a more rapid loss of reflexes before the surgical stage of anesthesia.

According to the data presented in Table 1, the duration of anesthesia in both schemes was not less than 60 minutes and would have been predicted to last the entire time of gas-air mixture supply. In the group using KI, the duration of anesthesia reversal after switching off isoflurane supply reached 15 minutes, and in the KDI group — 8 minutes after stopping isoflurane supply and intramuscular administration of atipamesole. Body temperature and respiratory rate in the animals in all groups decreased in relation to the indicators before anesthesia and were within the reference intervals published by us earlier [16]. Similar changes were observed upon administration of medetomidine, zolazepam and tiletamine in *Macaca fascicularis*, which was described by *Fahlman A.* et al. (2006) [17]. Saturation was within the clinical norm. In females, a statistically significant increase in glucose level was noted in the KDI group in relation to females anesthetized with KI, this change had no clinical significance. KI suppresses systolic and diastolic blood pressure more strongly than the combination of KDI, with $p < 0.0001$. The combination of KDI has a more cardiodepressive effect on the cardiovascular system than KI, which is expressed in a statistically significant decrease in heart rate and an increase in the R-R av. and P-Q intervals.

Table 1

Physiological parameters of cynomolgus macaques under anesthesia

Indicator		Males		Females	
		KI	KDI	KI	KDI
Rate of anesthesia onset, min		20—27	7—10	15—20	5—7
Duration of anesthesia, min		The entire duration of isoflurane administration (60 min.)			
Duration of reversal, min		8—14	7—8	10—15	5—8
Body temperature, °C		38.1 ± 0.2 ↓	38.9 ± 0.1 ↓	38.5 ± 0.1 ↓	38.7 ± 0.1 ↓
Respiratory rate, breaths/min		36.0 ± 4.0 ↓	40.3 ± 3.1 ↓	39.5 ± 3.2 ↓	46.5 ± 4.4 ↓
Saturation (SpO_2), %		99.5 ± 0.3	96.8 ± 0.6	98.8 ± 0.6	97.5 ± 1.2
Glucose level, mmol/L		4.1 ± 0.1	4.9 ± 0.2	3.1 ± 0.1	$5.5 \pm 0.3^{4*}$
BP, mm Hg,	systolic	84.0 ± 1.7	$116.8 \pm 1.8^{4*}$	78.5 ± 6.5	$113.0 \pm 3.3^{4*}$
	diastolic	30.0 ± 1.9	$74.5 \pm 1.8^{4*}$	35.0 ± 5.3	$68.5 \pm 4.2^{4*}$
Heart rate, beats/min		163.5 ± 7.7	$114.5 \pm 5.8^{3*}$	188.5 ± 10.1	$113.8 \pm 4.8^{4*}$
ECG, ms	R-R av.	366.3 ± 14.1	$477.0 \pm 28.6^{2*}$	352.4 ± 8.1	$562.2 \pm 25.6^{4*, \#}$
	P	48.0 ± 0.8	49.0 ± 0.8	47.3 ± 3.1	49.5 ± 0.9
	P-Q	82.0 ± 0.8	91.4 ± 1.6	$65.0 \pm 5.3^{2\#}$	$91.5 \pm 1.9^{4*}$
	QRS	72.4 ± 1.9	67.5 ± 1.5	$64.2 \pm 1.7^{\#}$	63.6 ± 2.3
	Q-T	284.1 ± 24.3	240.5 ± 7.9	$203.8 \pm 7.7^{2\#}$	253.7 ± 2.8
	Q-T av.	370.7 ± 4.8	354.2 ± 3.3	355.6 ± 6.7	341.8 ± 9.3

↓ decrease in the indicator, compared to the data before anesthesia

* if there is statistical significance between groups of animals of the same gender, where

^{2*} $P < 0.01$

^{3*} $P < 0.001$

^{4*} $P < 0.0001$

$^{\#}$ if there is statistical significance within the group between males and females, where

$^{\#}$ $P < 0.05$

$^{2\#}$ $P < 0.01$

The use of KI allows for controlled anesthesia for mild to moderate procedures, while the use of KDI allows for procedures characterized by severe degree. The more pronounced cardiodepressive effect of KDI, compared to KI, should be taken into account when interpreting ECG results in cynomolgus macaques.

CONCLUSION

Based on the conducted study, we can conclude that ketamine and isoflurane in combination with dexmedetomidine and without it can be used to anesthetize cynomolgus macaques, while ketamine-isoflurane anesthesia should be used for manipulations characterized by mild and moderate severity, and in combination with dexmedetomidine — a severe one.

The analysis of the obtained data allows us to draw the following conclusions.

— The use of dexmedetomidine in combination with ketamine and isoflurane has a more pronounced anesthetic effect.

— Both protocols of anesthetic management allow maintaining well-controlled thermoregulation of the animal.

— No clinically significant deviations are observed from the respiratory system when using both anesthesia schemes.

— Both anesthesia protocols do not lead to significant deviations in the functioning of the cardiovascular system, which is confirmed by the results of studies of blood pressure, heart rate and electro-

cardiography. The obtained data can be applied in the field of experimental pharmacology and toxicology associated with the use of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) and will help to differentiate changes caused by the studied drug from the effects of anesthesia.

REFERENCES

1. *Weinbauer G., Mecklenburg L.* Does Geographical Origin of Long-Tailed Macaques (*Macaca fascicularis*) Matter in Drug Safety Assessment?: A Literature Review and Proposed Conclusion // Toxicologic pathology. — 2022. — V. 50. — No. 5. — P. 552—559. DOI: 10.1177/01926233221095443

2. *Sokolova V. S.* et al. Habituation of cynomolgus macaques to experimental procedures // Tekhnologii zhivykh sistem (Technologies of living systems). — 2024. — Vol. 21, No. 4. — P. 102—111. — DOI 10.18127/j20700997—202404—11

3. *Marion B. M., Ghering J. M., Dixon B. C.* et al. Comparison of Alfaxalone-Midazolam, Tiletamine-Zolazepam, and Ketamine Acepromazine Anesthesia during Plethysmography in Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*) and Rhesus Macaques (Macaca mulatta) // Comparative medicine. — 2022. — V. — 72. No. 4. — P. 248—256. DOI:10.30802/AALAS-CM-22—000010

4. *Bondareva E. D.* et al. Recommended methods of watering laboratory animals. Technical features. Ensuring the welfare and health of laboratory animals // Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy (Laboratory animals for research). — 2022. — No. 2. — P. 71—78. DOI: 10.29296/2618723X-2022-02-08

5. *Bruk S.* Difficulties associated with training dangerous primates when kept on islands / S. Bruk // Scientific research in zoological parks. — 2021. — No. 36. — P. 137—142.

6. *Gaponov N. V.* Effect of biologically active supplements on blood hematological parameters of male rhesus macaques / N. V. Gaponov, G. L. Yagovenko, A. N. Stepanova // Kormoproizvodstvo. — 2020. — No. 9.2020. — DOI 10.25685 / krm.2020.9.2020.006

7. *Volkov S. G.* et al. Neuroprotection with ketamine // Modern problems of science and education. — 2022. — No. 3. — P. 152. DOI: 10.17513 / spno.31809

8. *Khokhlova N. A.* et al. The effect of the drug interferon lambda on the protein-synthetic function of the rat liver under conditions of induced immunosuppression // Journal of Agriculture and Environment. — 2024. — No. 1 (41). — DOI: 10.23649/JAE.2024.41.13

9. *Gurova S. V.* et al. Modern aspects in the field of anesthesia of small laboratory animals // Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal (South-Russian journal of oncology). — 2022. — Vol. 3. — No. 3. — P. 55—64. DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-3-7

10. *Tsarkov A. V.* et al. Dexmedetomidine in anesthesia of planned endovascular myocardial revascularization // Uralskiy meditsinskiy zhurnal (Ural medical journal). — 2022. — Vol. 21. — No. 1. — P. 72—76. DOI: 10.52420/2071-5943-2022-21-1-72-76

11. *Siegenthaler J., Pleyers T., Raillard M. et al.* Effect of Medetomidine, Dexmedetomidine, and Their Reversal with Atipamezole on the Nociceptive Withdrawal Reflex in Beagles // Animals: an open access journal from MDPI. — 2020. — V. 10. — No. 7. — P. 1240. DOI: 10.3390/ani10071240

12. *Rudenko P. A.* et al. Reference intervals for basic echocardiographic parameters in physiologically healthy domestic cats // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2023. — No. 4 (25). — P. 27—38. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.27

13. *Sadovedov K. P.* et al. Effect of various methods of general anesthesia on external respiration indicators during cesarean section in dogs // Normativno-pravovoe regulirovanie v veterinarii (Normative-Legal Regulatory Issues in Veterinary Medicine). — 2023. — No. 2. — P. 72—75. DOI: 10.52419/issn2782-6252.2023.2.72

14. *Akimov D. Yu.* et al. Characteristics of the effect of two types of combined anesthesia on the main physiological parameters of cynomolgus macaques // Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya (Veterinary science, zootechnics and biotechnology). — 2024. — Vol. 1. — No. 11. — P. 47—57. DOI: 1036871/vet.zoo.bio.202411104

15. *Akimov D. Yu.* et al. Risk-oriented approach to monitoring the health of monkeys // Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy (Laboratory animals for research). — 2021. — No. 2. — P. 69—82. DOI: 10.29296/2618723X-2021-02-09

16. *Akimov D. Yu.* et al. Reference values of respiratory rate indicators in different animal species // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2024. — No. 2 (27). — P. 21—38. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2024.2.21

17. *Fahlman A., Bosi E. J., Nyman G.* Reversible anesthesia of Southeast Asian primates with medetomidine, zolazepam, and tiletamine // Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians. — 2006. — V. 37. — No. 4. — P. 558—561. DOI: 10.1638/05-044.1

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

V. S. Sokolova — Veterinarian, Laboratory Primates Section;
M. N. Makarova — Doctor of Medical Sciences, Director;
T. G. Barmina — Zootechnician;
M. I. Gutrova — Laboratory Research Assistant, Laboratory Primates Section;
D. Yu. Akimov — Chief Veterinarian.

The article was submitted 03.02.2025.

Научная статья
УДК 636:612.155:546.57:636.2

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КОРОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СУБКЛИНИЧЕСКОГО МАСТИТА РАСТВОРОМ С НАНОЧАСТИЧАМИ СЕРЕБРА

Ольга Борисовна Павленко[*✉], **Валерий Юрьевич Сулин**[**], **Виталий Иванович Зимников**[***], **Алла Витальевна Мартынова**[****], **Владислав Анатольевич Фальков**[*****]

[*, **, ***, ****]*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, kobra_64.64@mail.ru*✉
[*****]*Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия*

Аннотация. В статье приведены данные исследования морфологического состава крови коров, больных субклиническим маститом, под влиянием раствора с наночастицами серебра. Для обработки полученных результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ и методы вариационной статистики. В результате проведенных исследований было установлено, что однократное введение раствора наносеребра в соотношении 1 : 4 на теплом стерильном изотоническом растворе натрия хлорида с соблюдением правил асептики, в дозе 5,0 мл не достаточно для выздоровления животных.
Ключевые слова: коровы, субклинический мастит, морфология крови, терапия, раствор с наночастицами серебра

Повышение поголовья крупного рогатого скота и его продуктивности является основной задачей животноводства страны. Молочная продуктивность коров значительно возросла за последние годы, что сделало молочную железу еще более подверженной заболеванию маститом, особенно субклиническому течению, которое у коров регистрируется повсеместно [1, 2].

Из-за отсутствия клинических признаков субклинический мастит своевременно не диагностируют, а длительное течение болезни приводит к атрофии пораженных долей вымени. В результате животные теряют хозяйственную ценность, что приводит к преждевременной выбраковке коров [3].

Основной причиной субклинического мастита является разнообразная условно патогенная и патогенная микрофлора. В последние годы отмечается снижение эффективности этиотропных средств при терапии мастита у коров, связанное с развитием антибиотикорезистентности у микроорганизмов. Применяемые и новые разрабатываемые способы и средства лечения маститов у лактирующих коров содержат антибиотики, сульфаниламиды, нитрофураны и их сочетания, что на сегодняшний день является недопустимым, т. к. антибиотики длительное время выделяются с секретом леченых долей и могут попадать в общий удой, вызывать у потребителей молока дисбактериозы, аллергические реакции, снижать качество изготавливаемой продукции из молока [4].

Одним из перспективных направлений клинической фармакологии является применение препаратов, содержащих наночастицы серебра. В последнее десятилетие наблюдается экспоненциальный рост в фундаментальных и прикладных областях науки, связанный с синтезом наночастиц (НЧ) благородных металлов, изучением их свойств и практическим применением. НЧ серебра обладают редким сочетанием ценных физико-химических качеств [5].

Для того, чтобы определить, как влияют препараты, содержащие частицы наносеребра, необходимо изучить состав крови, т. к. она является внутренней средой для всех органов и тканей, наиболее

полно отражает разнообразные процессы, происходящие в организме. Уровень обменных процессов, протекающих в организме и физиологическое состояние коров влияют на морфологический состав крови, ее физико-химические свойства, а также на продуктивность животного [6].

Исходя из актуальности темы, целью нашей работы стало изучение морфологических показателей крови здоровых и больных субклиническим маститом коров при лечении раствором с наночастицами серебра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследований являлись здоровые и больные субклиническим маститом коровы черно-пестрой масти голштинской и голштино-фризской пород в возрасте от 2 до 5 лет, с массой тела в среднем 600,0 кг, принадлежащие КХ «Речное» Хлевенского района Липецкой области.

Диагностику состояния молочной железы осуществляли по общепринятой методике. Для выявления субклинического мастита у коров использовали диагностикум Kenotest согласно инструкции.

Для проведения эксперимента было отобрано 18 животных. У 6 коров, при постановке реакции с диагностикумом были следы образования геля, прилипания к плашке, нитевидное строение, цвет самой пробы желтый с красными включениями (±) — сомнительная реакция, у 6 коров — гель имел плотную консистенцию, желтого цвета (+) — положительная реакция и 6 клинически здоровых животных. Коров распределили на две группы: первая (±) и вторая (+) опытные. Коровам первой и второй опытных групп интрацистернально вводили 1,0 мл разведенного раствора восстановленного наносеребра 1 : 4 на теплом стерильном изотоническом растворе натрия хлорида (4,0 мл) с соблюдением правил асептики, в дозе 5,0 мл один раз. Животные третьей группы служили контролем.

Оценка влияния применения раствора с наночастицами серебра на морфологический статус крови коров проведена до введения и через восемь суток по окончании применения препарата. Морфологический анализ крови проводили на гематологическом анализаторе «URIT-3020» (URIT-Китай) в соответствии с «Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследования крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях» (1981) [7]. Статистический анализ включал расчет средних значений (M, mean), медианы, среднего квадратического отклонения (SD, *standard deviation*, стандартного отклонения), ошибки средней величины (SE, *standard error)*, коэффициента вариации (КВ, CV).

Величину среднеквадратичного отклонения (СКО, *SD — standard deviation*) рассчитывали по формуле:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (1)$$

где x_i — i показатель; $\bar{x}$ — среднее арифметическое; n — количество проб.

Коэффициент вариации (КВ, *CV*) рассчитывали по формуле:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где *SD* — среднее квадратическое отклонение, $\bar{x}$ — среднее арифметическое.

Ошибку среднего (*SE — standard error*) рассчитывали по формуле:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}, \quad (3)$$

где *SD* — среднее квадратическое отклонение; *n* — количество проб.

Для определения статистически значимых различий между анализируемыми показателями использовали результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Апостериорные сравнения проведены с использованием непараметрического критерий U Манна — Уитни между несвязанными выборками и критерия *W* Вилкоксона между связанными выборками [8—10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что в контрольной группе клинически здоровых коров анализируемые гематологические показатели крови были в пределах референсных диапазонов (табл. 1).

Через 8 суток при анализе крови здоровых коров большинство анализируемых гематологических показателей крови, за исключением процентного содержания эозинофилов, количества лейкоцитов и тромбоцитов в среднем изменилось менее чем на 6,5 % по сравнению с результатами исходного (первого) анализа (табл. 1, рис. 1).

По результатам однофакторного дисперсионного анализа достоверных различий между первой и второй пробами крови контрольной группы животных не установлено.

Таблица 1

Гематологические показатели здоровых коров

	Эозинофилы, EOS, %	Нейтрофилы, GRA, %	Лимфоциты, LIM, %	Лейкоциты, WBC, $\cdot 10^9$/л	Эритроциты, RBC, $\cdot 10^{12}$/л	Гемоглобин, HGB, г%	Гематокрит, HCT, %	средний объем эритроцита, MCV, фл	содержание Hg в эритроците MCHC	Тромбоциты, PLT, $\cdot 10^9$/л	СОЭ, мм/ч
до опыта											
среднее	3,0	35,33	61,33	9,45	6,36	9,08	27,88	44,95	32,60	377,83	0,62
медиана	3	34	62,5	9,16	6,44	8,95	27,38	45,1	32,5	384	0,6
СКО	0,632	5,046	5,354	1,136	0,512	0,578	2,148	1,540	0,434	115,533	0.075
ошибка	0,258	2,060	2,186	0,464	0,209	0,236	0,877	0,629	0,177	47,166	0,031
КВ	**21,08**	14,28	8,73	12,03	8,05	6,36	7,71	3,43	1,30	**30,58**	12,21
мин	2	30	54	7,96	5,48	8,4	25,54	42,4	32,1	203	0,5
макс	4	42	67	10,81	6,84	10	31,3	46,8	33,1	518	0,7
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
через 8 суток											
среднее	3,83	35,67	60,50	9,84	6,11	8,52	27,12	45,48	31,40	388,75	0,63
медиана	3,5	34	61,5	9,995	6,235	8,45	26,95	45,425	31	387,25	0,6
СКО	1,472	6,314	5,992	1,058	0,270	0,337	1,376	1,439	1,183	70,556	0,052
ошибка	0,601	2,578	2,446	0,432	0,110	0,138	0,562	0,588	0,483	28,804	0,021
КВ	**38,399**	17,703	9,904	10,755	4,425	3,959	5,074	3,165	3,768	18,150	8,154
мин	2	27	54	8,51	5,68	8,2	24,96	43,1	30,3	277	0,6
макс	6	44	70	10,95	6,35	9	28,8	47,5	33,4	464	0,7
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
норма	3,0—8,0	15,0—65,0	45,0—75,0	4,0—12,0	5,0—10,0	8,0—15,0	24,0—46,0	40,0—60,0	30,0—36,0	100—800	0,6—0,8

* $P < 0{,}01$ — степень достоверности в контрольной группе животных

Среди коров, 2-х опытных групп, исходно (до введения препарата) имели достоверное различие дисперсий ($p = 0{,}0004$, Fфакт. = = 26,18 < Fкрит. = 21,04 для $p = 0{,}001$) и средних значений (критерий Манна — Уитни Uфакт. = = 0 < Uкрит. = 2 для $p = 0{,}01$) по количеству лейкоцитов: $9{,}44 \pm 0{,}236 \cdot 10^9$/л у коров 1 группы и $14{,}04 \pm 0{,}888 \cdot 10^9$/л у коров 2 группы (табл. 2).

При сравнении полученных гематологических показателей крови коров до и после введения препарата у коров 1-й опытной группы установлено достоверное увеличение на 21,7 % относительного количества эозинофилов с $2{,}88 \pm 0{,}398$ % до $3{,}50 \pm 0{,}378$ % ($p < 0{,}01$, табл. 3, рис. 2). Оценка динамики изменения количества эозинофилов в течение воспалительного процесса имеет прогностическое значение. Эозинопения (снижение количества эозинофилов в крови менее 1,0 %) часто наблюдается в начале воспаления. Эозинофилия (рост числа эозинофилов > 5 %) соответствует началу выздоровления и находиться в рамках референсных значений [11].

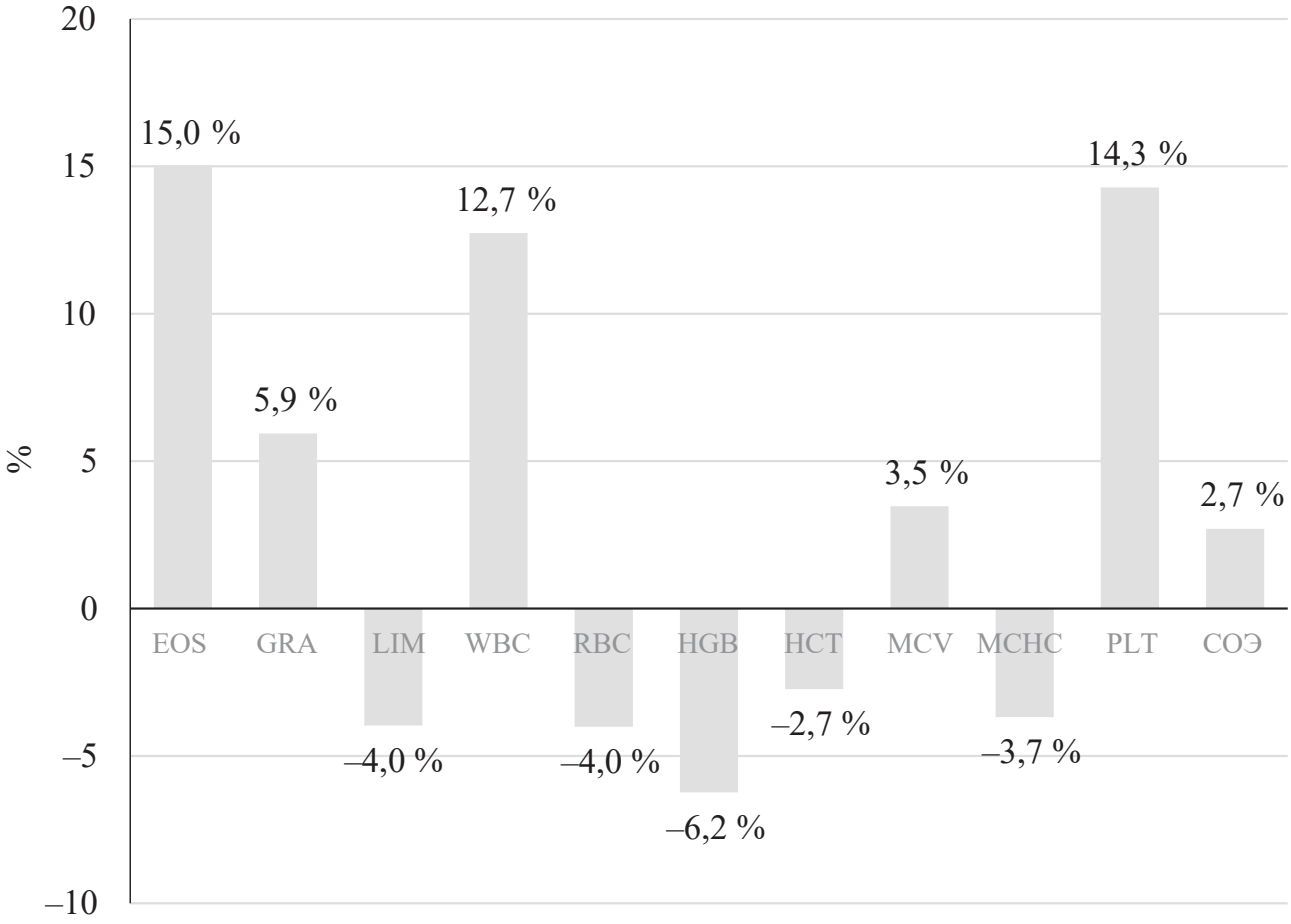


Рис. 1. Относительное изменение гематологических показателей здоровых коров (в % от первого забора крови):

EOS — эозинофилы; *GRA* — нейтрофилы; *LIM* — лимфоциты; *WBC* — лейкоциты; *RBC* — эритроциты; *HGB* — гемоглобин; *HCT* — гематокрит; *MCV* — средний объем эритроцита; MCHC — содержание Hb в эритроците; *PLT* — тромбоциты; *СОЭ* — скорость оседания эритроцитов

Таблица 2

Гематологические показатели больных коров до введения препарата

	Эозинофилы, EOS, %	Нейтрофилы, GRA, %	Лимфоциты, LIM, %	Лейкоциты, WBC, $\cdot 10^9$/л	Эритроциты, RBC, 10^{12}/л	Гемоглобин, HGB, г%	Гематокрит, HCT, %	средний объем эритроцита, MCV, фл	содержание Hg в эритроците MCHC	Тромбоциты, PLT, $\cdot 10^9$/л	СОЭ, мм/ч
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
первая опытная группа											
среднее	2,88	31,50	65,63	**9,44***	6,12	**9,33**	**28,62**	46,85	32,59	**416,00**	0,59
медиана	3	30,5	68	9,26	6,21	9,3	28,41	45,75	32,4	391	0,6
СКО	1,126	7,131	7,070	0,666	0,378	0,729	2,101	3,786	1,328	94,467	0,099
ошибка	0,398	2,521	2,500	0,236	0,134	0,258	0,743	1,338	0,470	33,399	0,035
КВ	39,17	22,64	10,77	7,06	6,18	7,81	7,34	8,08	4,08	22,71	16,87

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
мин	1	23	54	8,48	5,68	8	25,64	43,9	31,2	297	0,5
макс	4	43	73	10,61	6,6	10,2	31,64	55,7	35,2	543	0,8
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
вторая опытная группа											
среднее	3,00	31,00	66,75	**14,04***	6,16	**8,68**	**26,72**	43,70	32,43	**380,50**	0,70
медиана	3.0	31,5	66	14,74	6,01	8,5	26,69	44,4	32,5	356	0,7
СКО	0,82	18,815	19,738	1,777	0,596	0,350	0,735	4,976	0,957	191,98	0,082
ошибка	0,408	9,407	9,869	0,888	0,298	0,175	0,368	2,488	0,478	95,984	0,041
КВ	27,22	60,69	29,57	12,65	9,66	4,04	2,75	11,39	2,95	50,45	11,66
мин	2	10	46	11,42	5,62	8,5	25,96	37	31,2	191	0,6
макс	4	51	89	15,26	7,01	9,2	27,53	49	33,5	619	0,8
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
норма	3,0—8,0	15,0—65,0	45,0—75,0	4,0—12,0	5,0—10,0	8,0—15,0	24,0—46,0	40,0—60,0	30,0—36,0	100—800	0,6—0,8

* $P < 0{,}01$ — степень достоверности в опытных группах животных

Таблица 3

Гематологические показатели больных коров после введения препарата

	Эозинофилы, EOS, %	Нейтрофилы, GRA, %	Лимфоциты, LIM, %	Лейкоциты, WBC, $\cdot 10^9$/л	Эритроциты, RBC, $\cdot 10^{12}$/л	Гемоглобин, HGB, г%	Гематокрит, HCT, %	средний объем эритроцита, MCV, фл	содержание Hg в эритроците MCHC	Тромбоциты, PLT, $\cdot 10^9$/л	СОЭ, мм/ч
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
первая опытная группа											
среднее	3,50	32,13	64,38	**7,76***	**5,97**	**8,70**	28,31	47,49	30,79	**356,0**	0,58
медиана	4	33	62,5	8,335	5,855	8,6	27,815	46,5	30,65	350,5	0,6
СКО	1,069	6,578	6,523	1,081	0,549	0,707	2,931	3,556	1,219	18,11	0,071
ошибка	0,378	2,326	2,306	0,382	0,194	0,250	1,036	1,257	0,431	6,403	0,025
КВ	30,54	20,476	10,133	13,94	9,191	8,128	10,354	7,489	3,961	5,087	12,30
мин	2	20	58	5,8	5,36	7,8	24,32	44,9	29,3	335	0,5
макс	5	39	76	8,67	6,97	9,8	33,39	55,8	32,5	394	0,7
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
вторая опытная группа											
среднее	3,25	33,75	63,00	**13,74***	**5,93**	**8,58**	26,14	44,38	32,80	**360,3**	
медиана	3,5	36,5	60	13,55	5,79	8,2	25,93	44,65	32,5	302,5	0,55
СКО	1,71	14,71	16,23	3,09	0,55	1,03	2,10	5,18	1,76	146,7	0,13
ошибка	0,854	7,353	8,114	1,545	0,275	0,517	1,051	2,590	0,878	73,32	0,065
КВ	52,55	43,57	25,76	22,48	9,26	12,06	8,04	11,68	5,36	40,71	23,47
мин	1	14	47	10,34	5,43	7,8	23,86	37,8	31	259	0,4
макс	5	48	85	17,53	6,71	10,1	28,85	50,4	35,2	577	0,7
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
норма	3,0—8,0	15,0—65,0	45,0—75,0	4,0—12,0	5,0—10,0	8,0—15,0	24,0—46,0	40,0—60,0	30,0—36,0	100—800	0,6—0,8

* $P < 0{,}01$ — степень достоверности в опытных группах животных

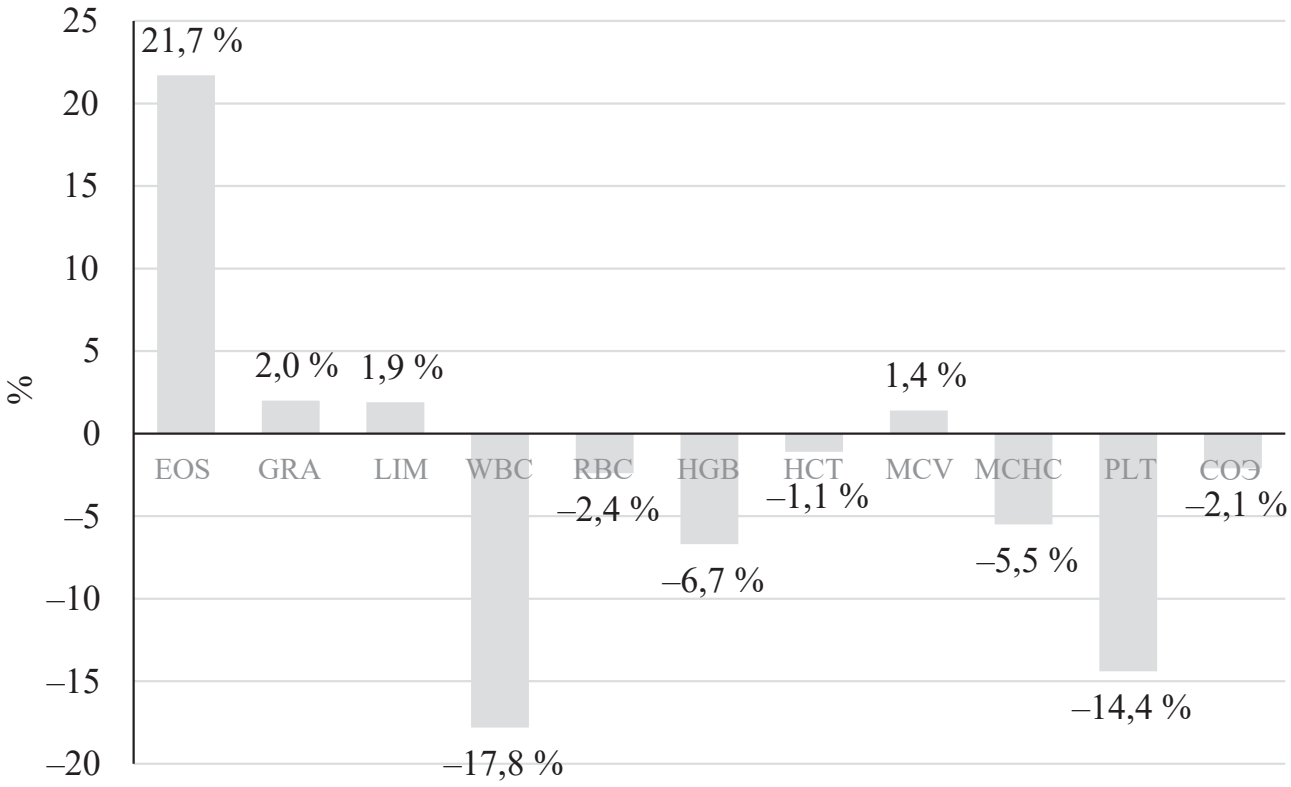


Рис. 2. Относительное изменение гематологических показателей больных коров первой опытной группы (в %, до введения препаратов):

EOS — эозинофилы; *GRA* — нейтрофилы; *LIM* — лимфоциты; *WBC* — лейкоциты; *RBC* — эритроциты; *HGB* — гемоглобин; *HCT* — гематокрит; *MCV* — средний объем эритроцита; МСНС — содержание Hb в эритроците; *PLT* — тромбоциты; *СОЭ* — скорость оседания эритроцитов

Также у коров 1-й опытной группы установлено достоверное снижение на 17,9 % среднего количества лейкоцитов с $9,44 \pm 0,236 \cdot 10^9$/л до $7,76 \pm 0,382 \cdot 10^9$/л, однако эти изменения находились в пределах нормы ($p < 0,01$, табл. 3, рис. 2).

При сравнительном анализе показателей крови у коров до и после введения препарата у коров 1-й опытной группы установлено достоверное снижение на 14,4 % среднего количества тромбоцитов с $416,00 \pm 33,39 \cdot 10^9$/л до $356,00 \pm 6,403 \cdot 10^9$/л ($p < 0,05$, табл. 3, рис. 2). Все эти изменения говорят о влиянии раствора с наночастичами серебра на морфологию крови, однако они не выходили за рамки референсных значений. У коров 2-й опытной группы после введения препарата изменение гематологических показателей было не достоверно (табл. 3).

Через 8 суток была проведена диагностика состояния молочной железы, которую проводили по общепринятой методике. Установлено, что у 4 коров первой группы реакция с диагностикумом Kenotest была отрицательной, у 2 — осталась сомнительной, а у 4 коров второй группы субклиническая форма мастита перешла в клинически выраженный мастит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам анализа крови можно сделать заключение о том, что однократное введение раствора с наночастицами серебра не оказывало влияние на гематологические показатели крови коров второй группы, т. к. у них субклинический мастит переходил в клиническую форму, таким образом, не достаточно однократного введения препарата до полного выздоровления, необходимы дополнительные введения препарата.

Применяя однофакторный дисперсионный анализ, достоверных различий в пробах крови здоровых коров не установил, можно сделать заключение об однородности контрольной выборки.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Биохимические показатели крови и молока при маститах у коров голштинизированной породы / В. Д. Кочарян, К. А. Баканова, М. А. Ушаков, Ж. Ш. Ушакова // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. — 2022. — № 25—1. — С. 256—261.

2. Динамика показателей морфобиохимического статуса больных субклиническим маститом коров при применении препарата АМСФ / В. И. Зимников, Н. Т. Климов, В. И. Моргунова [и др.] // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 3(12). — С. 81—88.

3. Иммунологические аспекты борьбы с маститом коров / В. Слободяник, Н. Климов, Л. Ческидова, Е. В. Зверев. — Воронеж: Издательство Истоки, 2020. — 222 с.

4. Fair RJ, *Tor Y.* Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect Medicin Chem 2014;6:25—64. Perspect Medicin Chem. 2014;6:25—64.

5. *Ходарев Д. В.* Ветеринарные препараты на основе коллоидного серебра, стабилизированного биологически активными веществами / Д. В. Ходарев, Ю. А. Крутяков, А. И. Климов // Евразийский союз ученых. — 2014. — № 7—2(7). — С. 75—77.

6. *Жданова И. Н.* Влияние фитобактериального комплекса БЦЛ на морфобиохимический статус коров при клинической форме мастита / И. Н. Жданова // Вестник Пермского научного центра УрО РАН. — 2018. — № 3. — С. 51—57.

7. Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследования крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях: метод. указания / под общ. ред. В. Т. Самохина. — Москва: МСХ СССР, ВАСХНИЛ, 1981. — 85 с.

8. *Янцев А. В.* Выбор статистических критериев, 2012. — 141 с.

9. *Жильцов И.* Основы медицинской статистики. Дизайн биомедицинских исследований: практическое руководство / И. Жильцов, В. Семенов, С. Зенькова; И. В. Жильцов, В. М. Семенов, С. К. Зенькова. — 2-е издание, переработанное и дополненное. — Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 2014. — 153 с.

10. ГОСТ Р ИСО 3534—1—2019. Статистические методы. — Москва, Стандартинформ. — 2019. — 66 с.

11. *Перегончий А. Р.* Морфобиохимический статус крови коров при терапии субклинического мастита комплексной мазью «Уберосепт» совместно с иммуномодуляторами / А. Р. Перегончий, О. Б. Павленко, В. И. Зимников // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. — 2023. — № 4. — С. 84—90.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

О. Б. Павленко — доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник;
В. Ю. Сулин — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник;
В. И. Зимников — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
А. В. Мартынова — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник;
В. А. Фальков — аспирант.

Статья поступила в редакцию 04.02.2025.

Original article
UDC 636:612.155:546.57:636.2

DYNAMICS OF BLOOD MORPHOLOGICAL INDICATORS IN COWS WHEN TREATING SUBCLINICAL MASTITIS WITH A SOLUTION WITH SILVER NANOPARTICLES

Olga Borisovna Pavlenko[*]✉, Valeriy Yuryevich Sulin[*], Vitaliy Ivanovich Zimnikov[*], Alla Vitalyevna Martynova[*], Vladislav Anatolyevich Falkov[**]

[*]All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, kobra_64.64@mail.ru✉
[**]Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia

Abstract. The article presents the research data on the blood morphological composition of cows with subclinical mastitis under the effect of a solution with silver nanoparticles. To process the obtained results, one-way variance analysis and methods of variation statistics were used. As a result of the studies, it had been found that a single administration of a nanosilver solution in a ratio of 1 : 4 in a warm sterile isotonic sodium chloride solution in compliance with the rules of asepsis, at a dose of 5.0 ml was not enough for the recovery of animals.
Keywords: cows, subclinical mastitis, blood morphology, therapy, solution with silver nanoparticles

Increasing the cattle stock and their productivity is the main task of the country's livestock industry. The milk productivity of cows has increased significantly in recent years, which has made the mammary gland even more susceptible to mastitis, especially the subclinical course, which is recorded in cows everywhere [1, 2].

Due to the lack of clinical signs, subclinical mastitis is not timely diagnosed, and the long course of the disease leads to atrophy of the affected udder lobes. As a result, animals lose economic value, which leads to premature culling of cows [3].

The main cause of subclinical mastitis is a variety of opportunistic and pathogenic microflora. In recent years, there has been a decrease in the efficacy of etiotropic agents in the treatment of mastitis in cows, associated with the development of antibiotic resistance in microorganisms. The methods and means of treating mastitis in lactating cows that are currently in use and being developed/designed contain antibiotics, sulfonamides, nitrofurans and their combinations, which is currently unacceptable, since antibiotics are excreted with the secretion of treated lobes for a long time and can get into the total milk yield, cause dysbacteriosis, allergic reactions in milk consumers and reduce the quality of manufactured milk products [4].

One of the promising areas of clinical pharmacology is the use of drugs containing silver nanoparticles. In the last decade, there has been exponential growth in fundamental and applied areas of science associated with the synthesis of nanoparticles (NP) of noble metals, the study of their properties and practical application. Silver nanoparticles have a rare combination of valuable physical and chemical properties [5]. In order to determine the effect of drugs containing nanosilver particles, it is necessary to study the blood composition, since it is the internal environment for all organs and tissues, most fully reflecting the various processes occurring in the body. The level of metabolic processes occurring in the body and the physiological state of cows affect the blood morphological composition, its physical and chemical properties, as well as the productivity of the animal [6]. Based on the relevance of the topic, the objective of our work was to study the blood morphological indicators of healthy cows and cows with subclinical mastitis treated with a solution with silver nanoparticles.

MATERIAL AND METHODS

The study material was Black-Motley Holstein and Holstein-Friesian healthy cows and cows with subclinical mastitis aged 2 to 5 years, with an average body

weight of 600.0 kg, belonging to the farm Rechnoe in Khlevenskiy district of Lipetsk region.

The diagnosis of the mammary gland condition was carried out according to the generally accepted method. To detect subclinical bovine mastitis, the Kenotest diagnosticum was used according to the instructions.

For the experiment, 18 animals were selected. In 6 cows, when setting up a reaction with the diagnosticum, there were traces of gel formation, adhesion to the plate, thread-like structure, the color of the sample itself was yellow with red inclusions (±) — a questionable reaction, in 6 cows — the gel had a dense consistency, yellow (+) — a positive reaction, and 6 clinically healthy animals. The cows were divided into two groups: the first (±) and the second (+) experimental ones. The cows of the first and second experimental groups were intracisternally injected with 1.0 ml of a diluted solution of reduced nanosilver 1 : 4 in a warm sterile isotonic sodium chloride solution (4.0 ml) in compliance with the rules of asepsis, at a dose of 5.0 ml once.

The animals of the third group served as a control. The effect of using a solution with silver nanoparticles on the blood morphological status of cows was assessed before the administration and eight days after the end of drug administration. Morphological analysis of blood was performed on a URIT-3020 hematology analyzer (URIT-China) in accordance with the Guidelines for the Use of Unified Biochemical Methods for Studying Blood, Urine and Milk in Veterinary Laboratories (1981) [7]. Statistical analysis included calculation of mean values (M, mean), mean, standard deviation (SD), standard error (SE) and coefficient of variation (CV).

The value of the standard deviation (*SD*) was calculated using the formula:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (1)$$

where x_i is the i indicator, $\bar{x}$ is the arithmetic mean; n is the number of samples. The coefficient of variation (*CV*) was calculated using the formula:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

where *SD* is the standard deviation; $\bar{x}$ is the arithmetic mean.

The standard error (*SE*) was calculated using the formula:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}, \quad (3)$$

where *SD* is the standard deviation; n is the number of samples.

To determine statistically significant differences between the analyzed indicators, the results of the one-way analysis of variance (ANOVA) were used. Post-hoc comparisons were performed using the nonparametric Mann — Whitney U test between unrelated samples and the Wilcoxon W test between related samples [8—10].

STUDY RESULTS

It was established that in the control group of clinically healthy cows, the analyzed hematological indicators of blood were within the reference ranges (Table 1).

Table 1

Hematological indicators of healthy cows

	Eosinophils, EOS, %	Neutrophils, GRA, %	Lymphocytes, LIM, %	Leukocytes, WBC, $\cdot 10^9$/L	Erythrocytes, RBC, $\cdot 10^{12}$/L	Hemoglobin, HGB, g%	Hematocrit, HCT, %	Mean cell volume, MCV, fl	Mean cell hemoglobin content, MCHC	Platelets, PLT, $\cdot 10^9$/L	ESR, mm/h
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
before experiment											
mean	3.0	35.33	61.33	9.45	6.36	9.08	27.88	44.95	32.60	377.83	0.62
median	3	34	62.5	9.16	6.44	8.95	27.38	45.1	32.5	384	0.6
SD	0.632	5.046	5.354	1.136	0.512	0.578	2.148	1.540	0.434	115.533	0.075
error	0.258	2.060	2.186	0.464	0.209	0.236	0.877	0.629	0.177	47.166	0.031

Table 1 (the end)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CV	**21.08**	14.28	8.73	12.03	8.05	6.36	7.71	3.43	1.30	**30.58**	12.21
min	2	30	54	7.96	5.48	8.4	25.54	42.4	32.1	203	0.5
max	4	42	67	10.81	6.84	10	31.3	46.8	33.1	518	0.7
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
in 8 days											
mean	3.83	35.67	60.50	9.84	6.11	8.52	27.12	45.48	31.40	388.75	0.63
median	3.5	34	61.5	9.995	6.235	8.45	26.95	45.425	31	387.25	0.6
SD	1.472	6.314	5.992	1.058	0.270	0.337	1.376	1.439	1.183	70.556	0.052
error	0.601	2.578	2.446	0.432	0.110	0.138	0.562	0.588	0.483	28.804	0.021
CV	**38.399**	17.703	9.904	10.755	4.425	3.959	5.074	3.165	3.768	18.150	8.154
min	2	27	54	8.51	5.68	8.2	24.96	43.1	30.3	277	0.6
max	6	44	70	10.95	6.35	9	28.8	47.5	33.4	464	0.7
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
norm	3.0—8.0	15.0—65.0	45.0—75.0	4.0—12.0	5.0—10.0	8.0—15.0	24.0—46.0	40.0—60.0	30.0—36.0	100—800	0.6—0.8

* $P < 0.01$ — degree of reliability in the control group of animals

In 8 days, when analyzing the blood of healthy cows, most of the analyzed hematological indicators of blood, with the exception of the percentage of eosinophils, the number of leukocytes and platelets changed on average by less than 6.5 %, compared to the results of the initial (first) analysis (Table 1, Fig. 1).

According to the results of the one-way ANOVA, no reliable differences were found between the first and second blood samples of the control group of animals.

Among the cows of the 2 experimental groups, initially (before the administration of the drug) there was a reliable difference in variances ($p = 0.0004$, Ffact. = 26.18 < Fcrit. = 21.04 for $p = 0.001$) and mean values (Mann — Whitney test Ufact. = 0 < Ucrit. = 2 for $p = 0.01$) for the number of leukocytes: $9.44 \pm 0.236 \cdot 10^9$/L in the cows of group 1 and $14.04 \pm 0.888 \cdot 10^9$/L in the cows of group 2 (Table 2).

When comparing the obtained hematological indicators of the cows' blood before and after drug administration, there was detected a reliable increase by 21.7 % in the relative eosinophil count from 2.88 ± 0.398 % to 3.50 ± 0.378 % ($p < 0.01$, Table 3, Fig. 2) in the cows of the 1st experimental group. Evaluation of the dynamics of changes in the number of eosinophils during the inflammatory process has prognostic value. Eosinopenia (a decrease in the number of eosinophils in the blood by less than 1.0 %) is often observed at the onset of inflammation. Eosinophilia (an increase in the number of eosinophils > 5 %) orresponds to the onset of recovery and is within the reference values [11].

In the cows of the 1st experimental group, a reliable decrease by 17.9 % in the mean leukocyte count was also found from $9.44 \pm 0.236 \cdot 10^9$/L to $7.76 \pm 0.382 \cdot 10^9$/L, however, these changes were within the normal range ($p < 0.01$, Table 3, Fig. 2).

A comparative analysis of the blood indicators in cows before and after drug administration revealed a reliable decrease by 14.4 % in the mean platelet count in the cows of the 1st experimental group, from $416.00 \pm 33.39 \cdot 10^9$/L to $356.00 \pm 6.403 \cdot 10^9$/L ($p < 0.05$, Table 3, Fig. 2). All these changes indicate the effect of a solution with silver nanoparticles on blood morphology, but they did not go beyond the reference values.

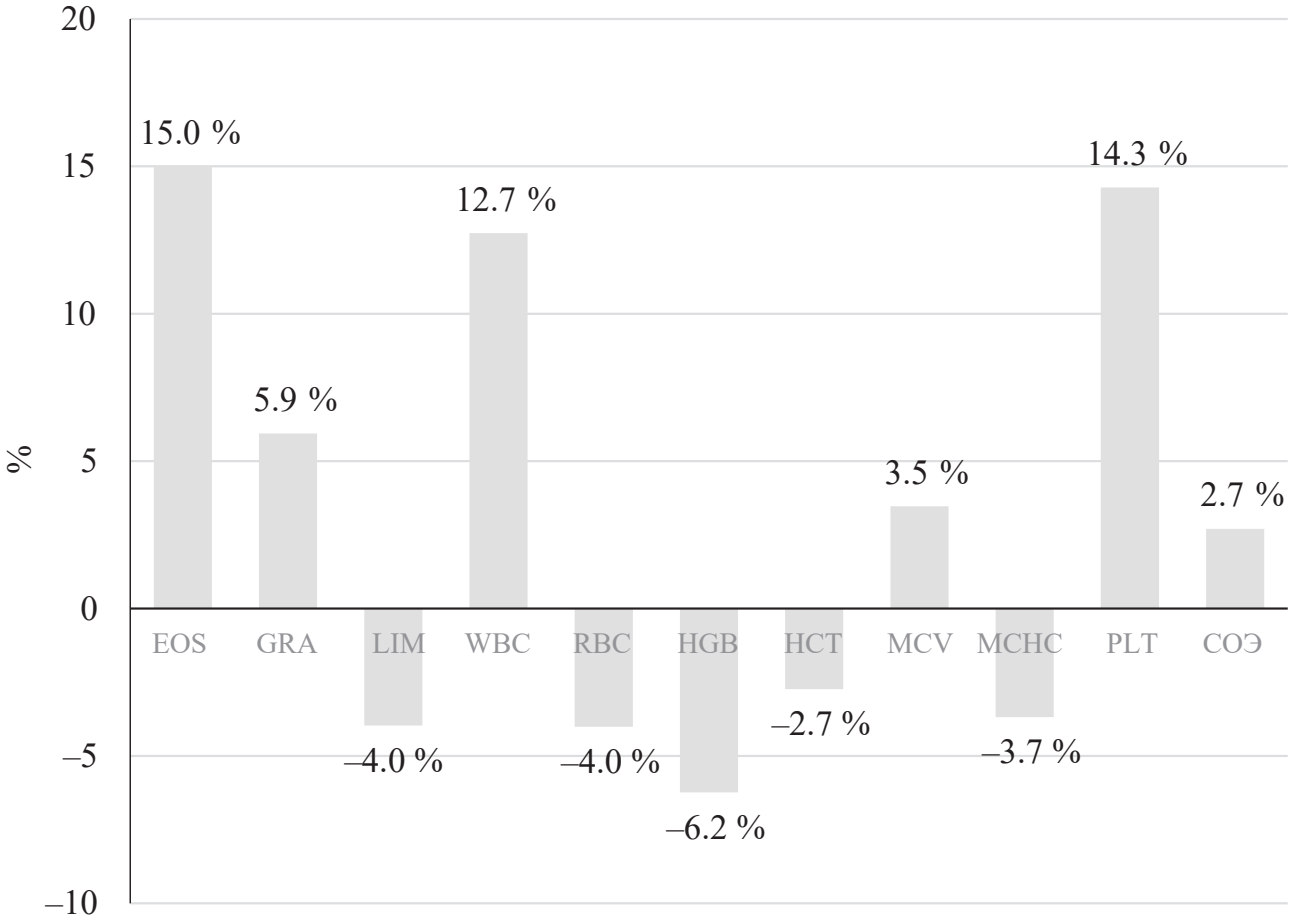


Fig. 1. Relative change in hematological indicators of healthy cows (% from the first blood sampling):
EOS — eosinophils; *GRA* — neutrophils; *LIM* — lymphocytes; *WBC* — leukocytes; *RBC* — erythrocytes; *HGB* — hemoglobin; *HCT* — hematocrit; *MCV* — mean cell volume; MCHC — mean cell hemoglobin content; *PLT* — platelets; *ESR* — erythrocyte sedimentation rate

Table 2

Hematological indicators of sick cows before administration of the drug

	Eosinophils, EOS, %	Neutrophils, GRA, %	Lymphocytes, LIM, %	Leukocytes, WBC, $\cdot 10^9$/L	Erythrocytes, RBC, 10^{12}/L	Hemoglobin, HGB, g%	Hematocrit, HCT, %	Mean cell volume, MCV, fl	Mean cell hemoglobin content, MCHC	Platelets, PLT, $\cdot 10^9$/L	ESR, mm/h
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
first experimental group											
mean	2.88	31.50	65.63	**9.44***	6.12	**9.33**	**28.62**	46.85	32.59	**416.00**	0.59
median	3	30.5	68	9.26	6.21	9.3	28.41	45.75	32.4	391	0.6
SD	1.126	7.131	7.070	0.666	0.378	0.729	2.101	3.786	1.328	94.467	0.099
error	0.398	2.521	2.500	0.236	0.134	0.258	0.743	1.338	0.470	33.399	0.035
CV	39.17	22.64	10.77	7.06	6.18	7.81	7.34	8.08	4.08	22.71	16.87

Table 2 (the end)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
min	1	23	54	8.48	5.68	8	25.64	43.9	31.2	297	0.5
max	4	43	73	10.61	6.6	10.2	31.64	55.7	35.2	543	0.8
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
second experimental group											
mean	3.00	31.00	66.75	**14.04***	6.16	**8.68**	**26.72**	43.70	32.43	**380.50**	0.70
median	3.0	31.5	66	14.74	6.01	8.5	26.69	44.4	32.5	356	0.7
SD	0.82	18.815	19.738	1.777	0.596	0.350	0.735	4.976	0.957	191.98	0.082
error	0.408	9.407	9.869	0.888	0.298	0.175	0.368	2.488	0.478	95.984	0.041
CV	27.22	60.69	29.57	12.65	9.66	4.04	2.75	11.39	2.95	50.45	11.66
min	2	10	46	11.42	5.62	8.5	25.96	37	31.2	191	0.6
max	4	51	89	15.26	7.01	9.2	27.53	49	33.5	619	0.8
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
norm	3.0—8.0	15.0—65.0	45.0—75.0	4.0—12.0	5.0—10.0	8.0—15.0	24.0—46.0	40.0—60.0	30.0—36.0	100—800	0.6—0.8

Notes: $^{*}P < 0.01$ — degree of reliability in the experimental groups of animals

Table 3

Hematological indicators of sick cows after drug administration

	Eosinophils, EOS, %	Neutrophils, GRA, %	Lympho-cytes, LIM, %	Leukocytes, WBC, $\cdot 10^9$/L	Erythrocytes, RBC, $\cdot 10^{12}$/L	Hemoglobin, HGB, g%	Hematocrit, HCT, %	Mean cell volume, MCV, fl	Mean cell hemoglobin content, MCHC	Platelets, PLT, $\cdot 10^9$/L	ESR, mm/h
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
first experimental group											
mean	3.50	32.13	64.38	**7.76***	**5.97**	**8.70**	28.31	47.49	30.79	**356.0**	0.58
median	4	33	62.5	8.335	5.855	8.6	27.815	46.5	30.65	350.5	0.6
SD	1.069	6.578	6.523	1.081	0.549	0.707	2.931	3.556	1.219	18.11	0.071
error	0.378	2.326	2.306	0.382	0.194	0.250	1.036	1.257	0.431	6.403	0.025
CV	30.54	20.476	10.133	13.94	9.191	8.128	10.354	7.489	3.961	5.087	12.30
min	2	20	58	5.8	5.36	7.8	24.32	44.9	29.3	335	0.5
max	5	39	76	8.67	6.97	9.8	33.39	55.8	32.5	394	0.7
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Table 3 (the end)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
second experimental group											
mean	3.25	33.75	63.00	**13.74***	**5.93**	**8.58**	26.14	44.38	32.80	**360.3**	
median	3.5	36.5	60	13.55	5.79	8.2	25.93	44.65	32.5	302.5	0.55
SD	1.71	14.71	16.23	3.09	0.55	1.03	2.10	5.18	1.76	146.7	0.13
error	0.854	7.353	8.114	1.545	0.275	0.517	1.051	2.590	0.878	73.32	0.065
CV	52.55	43.57	25.76	22.48	9.26	12.06	8.04	11.68	5.36	40.71	23.47
min	1	14	47	10.34	5.43	7.8	23.86	37.8	31	259	0.4
max	5	48	85	17.53	6.71	10.1	28.85	50.4	35.2	577	0.7
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
norm	3.0—8.0	15.0—65.0	45.0—75.0	4.0—12.0	5.0—10.0	8.0—15.0	24.0—46.0	40.0—60.0	30.0—36.0	100—800	0.6—0.8

* $P < 0.01$ — degree of reliability in the experimental groups of animals

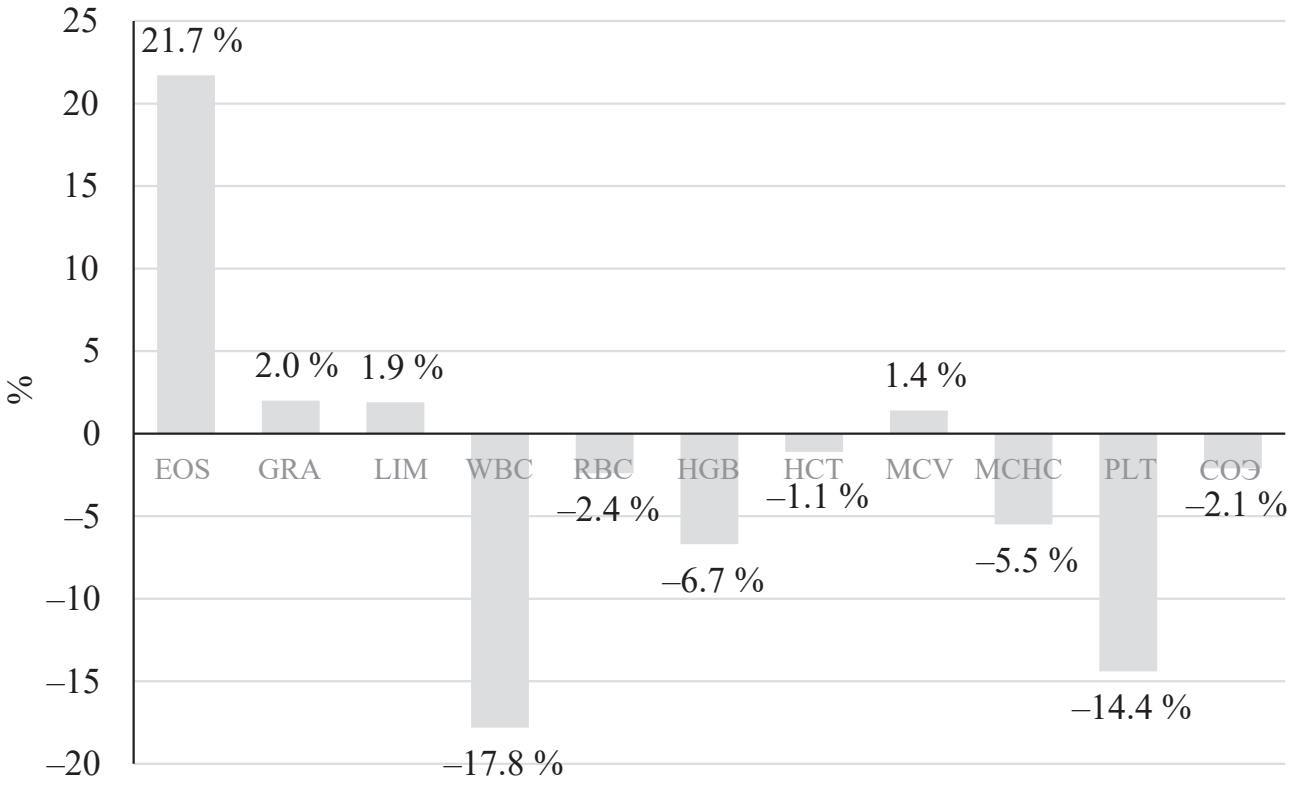


Fig. 2. Relative change in hematological indicators of sick cows of the first experimental group (%, before drug administration):

EOS — eosinophils; *GRA* — neutrophils; *LIM* — lymphocytes; *WBC* — leukocytes; *RBC* — erythrocytes; *HGB* — hemoglobin; *HCT* — hematocrit; *MCV* — mean cell volume; MCHC — mean cell hemoglobin content; *PLT* — platelets; *ESR* — erythrocyte sedimentation rate

In the cows of the 2nd experimental group, after the administration of the drug, the change in hematological indicators was not reliable (Table 3).

In 8 days, diagnostics of the mammary gland condition was carried out using the generally accepted method. It was found that in 4 cows of the first group, the reaction with the Kenotest diagnosticum was negative, in 2 cows it remained questionable, and in 4 cows of the second group, the subclinical form of mastitis turned into a clinically expressed mastitis.

CONCLUSION

Based on the results of the blood test, it can be concluded that a single administration of a solution with silver nanoparticles did not affect the hematological indicators of blood of the cows of the second group, since their subclinical mastitis turned into a clinical form, thus, a single drug administration was not enough until complete recovery, additional administrations of the drug were necessary.

Using one-way analysis of variance (ANOVA), no significant differences were found in the blood samples of healthy cows, and it can be concluded that the control sample is homogeneous.

REFERENCES

1. Blood biochemical indicators and milk in case of mastitis in Holsteinized cows / V. D. Kocharyan, K. A. Bakanova, M. A. Ushakov, Zh. Sh. Ushakova // Aktualnye problemy intensivnogo razvitiya zhivotnovodstva (Actual problems of intensive development of animal husbandry). — 2022. — No. 25—1. — P. 256—261.

2. The dynamics of morphobiochemical status indicators in cows with subclinical mastitis when using AMSF drug / V. I. Zimnikov, N. T. Klimov, V. I. Morgunova [et al.] // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2020. — No. 3 (12). — P. 81—88.

3. Immunological aspects of combating bovine mastitis / V. Slobodyanik, N. Klimov, L. Cheskidova, E. V. Zverev. — Voronezh: Istoki Publishing House, 2020. — 222 p.

4. *Fair RJ, Tor Y.* Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect Medicin Chem 2014;6:25—64. Perspect Medicin Chem. 2014;6:25—64.

5. *Khodarev D. V.* Veterinary drugs based on colloidal silver stabilized by biologically active substances / D. V. Khodarev, Yu. A. Krutyakov, A. I. Klimov // Evraziyskiy soyuz uchenykh (Eurasian Union of Scientists). — 2014. — No. 7—2 (7). — P. 75—77.

6. *Zhdanova I. N.* Effect of the BTsL phytobacterial complex on the morphobiochemical status of cows with clinical mastitis / I. N. Zhdanova // Vestnik Permskogo nauchnogo tsentra UrO RAN (Bulletin of Perm Research Center of the Ural Branch of the RAS). — 2018. — No. 3. — P. 51—57.

7. Guidelines for the use of unified biochemical methods for studying blood, urine and milk in veterinary laboratories: method. instructions / edited by V. T. Samokhin. — Moscow: USSR Ministry of Agriculture, VASKhNIL, 1981. — 85 p.

8. *Yantsev A. V.* Choice of statistical criteria, 2012. — 141 p.

9. *Zhiltsov I.* Fundamentals of medical statistics. Design of biomedical research: a practical guide / I. Zhiltsov, V. Semenov, S. Zenkova; I. V. Zhiltsov, V. M. Semenov, S. K. Zenkova. — 2nd edition, revised and supplemented. — Vitebsk: Vitebskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet (Vitebsk State Medical University), 2014. — 153 p.

10. GOST R ISO 3534—1—2019. Statistical methods. — Moscow, Standartinform. — 2019. — 66 p.

11. *Peregonchiy A. R.* Morphobiochemical status of cows' blood during the treatment of subclinical mastitis with the complex ointment "Uberosept" together with immunomodulators / A. R. Peregonchiy, O. B. Pavlenko, V. I. Zimnikov // Normativno-pravovoe regulirovanie v veterinarii (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine). — 2023. — No. 4. — P. 84—90.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

O. B. Pavlenko — Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Chief Scientific Associate;
V. Yu. Sulin — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate;
V. I. Zimnikov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
A. V. Martynova — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate;
V. A. Falkov — Postgraduate Student.

The article was submitted 04.02.2025.

Научная статья
УДК 619:615.862:618.19—002:636.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОЙ СХЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ МАСТИТА У КОРОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРЕПАРАТА «ДИОМАСТ-КРС» И ЛИПОТОНА

Галина Анатольевна Востроилова[*], Василина Александровна Грицюк[**], Лилия Валерьевна Ческидова[***], Виталий Иванович Зимников[****], Анастасия Андреевна Корчагина[*****]✉

[, ***, ****, *****]Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия*
[**]Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия
[*]https://orcid.org/0000-0001-7457-3774
[**]https://orcid.org/0000-0002-2960-038x
[***]https://orcid.org/0000-0003-0196-1754,
[****]https://orcid.org/0000-0002-6371-7143
[*****]a.a.korch@mail.ru✉, https://orcid.org/0000-0002-8561-417x

Аннотация. В статье представлены результаты изучения эффективности схемы лечения мастита у коров, включающей применение комплексного препарата «Диомаст-КРС» и Липотона. Для проведения экспериментальных исследований было отобрано 49 коров, больных маститом, которые по принципу аналогов были распределены в 2 группы. Животным первой группы применяли Диомаст-КРС согласно инструкции, второй группе дополнительно внутримышечно вводили Липотон в дозе 0,02 мл/кг двукратно с интервалом 48 часов. Установлено, что наилучший терапевтический эффект получен при совместном применении Липотона и Диомаста-КРС, который при гнойно-катаральной форме мастита составил 92,3 %, при катаральной — 91,7 %, что выше показателей базового варианта на 7,7—9,9 %, при этом излечено 93,3 и 92,3 % долей вымени соответственно. Контаминация молока микрофлорой снизилась при введении Диомаста-КРС в 4 раза, а при дополнительном использовании Липотона — в 6 раз и при этом бактерионосительство было ниже в 1,5 раза. Терапия больных маститом коров при применении Липотона сопровождалась более ранним купированием воспалительного процесса в молочной железе, выраженной активизацией гуморального и клеточного звена естественной резистентности, интенсивным снижением процессов пероксидации липидов и активизацией ферментативного и неферментативного звена антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: мастит, комплексная терапия, Липотон, Диомаст-КРС, коровы

Воспаление молочной железы остается одной из актуальных проблем молочного скотоводства во всем мире. Развитие мастита связано с инфицированием вымени различными патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: *Staph. aureus, Staph. haemoliticus, Str. agalactiae, Str. uberis, Str. dysgalactiae, E. coli, Ent. faecium* и др. В связи с этим этиотропная терапия по-прежнему остается базовой, а лечение мастита лактирующих коров обычно заключается в интрацистернальном или парентеральном введении антимикробных лекарственных средств [1].

Лечение мастита осложняется тем, что у бактерий существуют адаптивные механизмы, которые не ограничиваются только антибиотикорезистентностью, это и персистенция микроорганизмов в тканях молочной железы, и способность образовывать биопленки в вымени, и внутриклеточная локализация патогенов, например, в макрофагах, что позволяет им избегать иммунной системы [2, 3].

В развитии воспаления и создании условий для проникновения и размножения микрофлоры в молочной железе огромная роль принадлежит иммунитету. При мастите у коров происходят существенные изменения не только факторов локальной защиты молочной железы, но и отмечается снижение резистентности всего организма животного. Иммунная недостаточность серьезно осложняет патогенез основного патологического процесса, поэтому применение средств иммунокоррекции при лечении больных маститом коров наряду с интрацистернальным введением этиотропных препаратов повышает эффективность антимикробной терапии [4].

На сегодняшний день пероксидное окисление липидов (ПОЛ) рассматривается как один из доминирующих метаболических процессов, обеспечивающих регуляцию функциональной деятельности физиологических систем организма, и как индуктор оксидативного стресса и свободнорадикальной патологии. Истощение различных звеньев антиоксидантной системы приводит к свободнорадикальному окислению и накоплению в организме токсических продуктов пероксидации, которые способны оказывать негативное влияние на клеточный и гуморальный иммунитет [5].

В связи с этим, для решения проблемы мастита необходимы дальнейшие исследования по усовершенствованию способов лечения, включающих кроме этиотропной терапии применение иммуномодулирующих препаратов и средств коррекции про- и антиоксидантных процессов [6].

Одним из комплексных препаратов для лечения мастита является «Диомаст-КРС», состоящий из двух компонентов. Компонент 1 содержит смесь рекомбинантных бычьих цитокинов суммарной активностью не менее $1 \cdot 10^4$ ТЦД50/мл, витамин А 7500 МЕ/мл и вспомогательные вещества, а компонент 2 — диоксидин 10 мг/мл, витамин А 7500 МЕ/мл и вспомогательные вещества [7]. Бычьи рекомбинантные цитокины проявляют иммуностимулирующую активность, действуют как индукторы клеточного и гуморального иммунитета, повышают резистентность организма к воздействию любых инфекционных факторов.

Витамин А участвует в обмене веществ, повышает общую резистентность, улучшает рост и развитие эпителиальной ткани и увеличивает устойчивость к негативным воздействиям внешней среды. Диоксидин является антибактериальным химиотерапевтическим средством широкого спектра действия.

Однако, для наиболее полноценной терапии маститов, помимо средств этиотропной терапии и иммуностимуляторов, в схему лечения желательно включать средства для коррекции про- и антиоксидантных процессов, дисбаланс которых лежит в основе патогенеза болезни.

Известно средство, созданное на основе криотехнологий — липотон, который обладает уникальным спектром биологической активности и высокой эффективностью. Препарат в качестве действующего вещества содержит 5 мг/мл липофильной фракции, полученной криофракционированием из тканей плаценты, и содержит комплекс биологически активных веществ: гексозы, фосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин, сфингомиелин и другие), триглицериды, ненасыщенные жирные кислоты, витамины, микроэлементы. Полисахариды и триглицериды, входящие в состав Липотона, обеспечивают ткани питанием и энергией, улучшая углеводный и липидный обмены. Фосфолипиды, являясь важным структурным звеном клеточных мембран и мембран органелл, регулируют проницаемость биомембран, активность мембраносвязанных ферментов, нормализуя процессы окислительного фосфорилирования в клеточном метаболизме. Входящие в состав препарата естественные антиоксиданты — витамины А и Е предотвращают образование свободных радикалов, повреждающих ткани организма [8].

Препарат обладает иммуностимулирующим действием, нормализует показатели клеточного и гуморального иммунитета, обладает гепатопротекторным и мембранопротекторным действием, оказывает противовоспалительное действие, стимулирует ферментную систему, обладает адаптогенным и стресс-протекторным действием, повышает неспецифическую резистентность организма.

Целью данного исследования стало определение эффективности схемы лечения мастита коров с применением комплексного препарата «Диомаст-КРС» в сочетании с Липотоном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Испытания проведены в условиях хозяйства Воронежской области на коровах больных маститом, которые после постановки диагноза были разделены на две группы. Животные первой группы (n = 24) служили контролем, им в соответствии с инструкцией двукратно внутримышечно вводили компонент 1 препарата «Диомаст-КРС» в дозе

10 мл с интервалом 24 часа и интрацистернально в пораженную четверть вымени компонент 2 препарата «Диомаст-КРС» в дозе 10 мл два раза в день в течение 3 дней. Коровам второй группы (n = 25) аналогично применяли Диомаст-КРС и дополнительно внутримышечно вводили Липотон в дозе 0,02 мл/кг двукратно с интервалом 48 часов.

Состояние молочной железы оценивали на основании клинических признаков и реакции секрета вымени с диагностическим реактивом Масттест до лечения, сразу после окончания введения препаратов и через 5 дней после окончания лечения. До и через 5 дней после окончания терапии у коров брали образцы венозной крови для изучения естественной резистентности, активности пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ), а также молока — для проведения микробиологических исследований согласно установленных методик [9, 10, 11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эффективность лечения больных гнойно-катаральным и катаральным маститом коров представлена в таблице 1.

Таблица 1

Эффективность терапии мастита у коров

Способ лечения	Подвергнуто лечению		Выздоровело		Излечено	
	коров	долей	коров	%	долей	%
Гнойно-катаральный мастит						
Диомаст-КРС	13	14	11	84,6	12	85,7
Диомаст-КРС + Липотон	13	15	12	92,3	14	93,3
Катаральный мастит						
Диомаст-КРС	11	11	9	81,8	9	81,8
Диомаст-КРС + Липотон	12	13	11	91,7	12	92,3

Из представленных в таблице 1 данных следует, что при применении базового варианта при гнойно-катаральной форме мастита выздоровело 84,6 % животных, при катаральной — 81,8 %, при этом излечено 85,7 и 81,8 % долей вымени соответственно. Наилучший терапевтический эффект получен при совместном применении Липотона и Диомаста-КРС, который при гнойно-катаральной форме мастита составил 92,3 %, при катаральной — 91,7 %, что выше базового варианта на 7,7—9,9 %, при этом излечено 93,3 и 92,3 % долей вымени соответственно.

Результаты изучения видового состава выделенной микрофлоры из секрета молочной железы коров, больных маститом, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Видовой состав микрофлоры до и после лечения

№ пробы	Диомаст-КРС		№ пробы	Диомаст-КРС + Липотон	
	до лечения	после лечения		до лечения	после лечения
1	2	3	4	5	6
1	*Staph. aureus* *Ent. faecium*	— Ent. faecium	7	*Staph. aureus* *Staph. epidermidis*	— —
2	*Staph. aureus* *E. coli*	— E. coli	8	*Staph. aureus* *Ent. faecium*	— Ent. faecium

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6
3	*Staph. aureus* *E. coli*	*Staph. aureus* —	9	*Staph. aureus* *E. coli*	— —
4	*Str. agalactiae* *E. coli*	— —	10	*Staph. aureus* *Ent. faecium*	— Ent. faecium
5	*Str. agalactiae* *E. coli*	— —	11	*Str. agalactiae* *E. coli*	— —
6	*Str. agalactiae* *Staph. epidermidis*	— —	12	*Staph. aureus* *Staph. epidermidis*	— —

Из представленных в таблице 2 данных следует, что из секрета молочной железы больных маститом коров первой группы (Диомаст-КРС) до лечения изолировали *E. coli* в 66,7 % случаев, *Staph. aureus* и *Str. agalactiae* — в 50,0 %, *Staph. epidermidis* и *Ent. faecium* — в 16,7 %. Из проб молока коров второй группы (Диомаст-КРС + Липотон) выделяли *Staph. aureus* в 83,3 % случаев, *E. coli, Staph. epidermidis* и *Ent. faecium* — в 33,3 %, *Str. agalactiae* — в 16,7 %.

После лечения у животных первой группы контаминация молока микрофлорой снизилась в 4 раза, а второй группы — в 6 раз, при этом бактерионосительство по сравнению с базовым вариантом было ниже в 1,5 раза.

Результаты изучения показателей клеточного и гуморального звеньев естественной резистентности при лечении мастита у коров представлены в таблице 3.

Таблица 3

Изменение иммунологических показателей крови коров

Показатели	До лечения	После лечения	
		Диомаст-КРС	Диомаст-КРС + Липотон
Общие иммуноглобулины, г/л	21,20 ± 1,10	25,90 ± 1,50*	32,50 ± 1,80**
ЦИК, г/л	0,40 ± 0,03	0,28 ± 0,02*	0,20 ± 0,01**
БАСК, %	72,30 ± 2,40	78,20 ± 4,10	87,20 ± 3,20**
ЛАСК, мкг/мл	1,67 ± 0,21	1,78 ± 0,15	2,18 ± 0,12*
ФАЛ, %	73,40 ± 3,40	78,60 ± 5,60	82,70 ± 4,90
ФЧ	3,80 ± 0,21	4,30 ± 0,25	4,80 ± 0,18**
ФИ	2,80 ± 0,15	3,30 ± 0,18*	3,90 ± 0,21**

* $P < 0,05$—0,01;
** $P < 0,005$—0,001 — относительно показателей до лечения

Из представленных в таблице 3 данных следует, что у животных обеих групп после лечения установлена аналогичная динамика изменения иммунологических показателей крови: снижение концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и повышение уровня общих иммуноглобулинов, бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК), лизоцимной активности сыворотки кро-

ви (ЛАСК), фагоцитарной активности лейкоцитов (ФАЛ), фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ). Однако у животных второй группы изменения носили более выраженный характер. После лечения в их крови установлено уменьшение концентрации циркулирующих иммунных комплексов в 2,0 раза ($P < 0,001$) и повышение уровня общих иммуноглобулинов в 1,5 раза ($P < 0,001$), БАСК — на 20,6 % ($P < 0,005$), ЛАСК — на 30,5 % ($P < 0,05$), ФАЛ — на 12,7 %, ФЧ — на 39,3 % ($P < 0,002$) и ФИ — на 26,3 % ($P < 0,005$). У коров, которым дополнительно вводили Липотон, по сравнению с животными первой группы содержание циркулирующих иммунных комплексов было ниже на 28,6 % ($P < 0,005$), а уровень общих иммуноглобулинов выше на 25,5 % ($P < 0,02$), БАСК — на 11,5 %, ЛАСК — на 22,5 % ($P < 0,05$), ФАЛ — на 5,2 %, ФЧ — на 18,2 % ($P < 0,05$) и ФИ — на 11,6 % ($P < 0,005$).

Следовательно, терапия больных маститом коров с помощью Липотона и Диомаста-КРС способствовала купированию воспалительного процесса в молочной железе и обеспечила максимальную активизацию гуморального и клеточного звена естественной резистентности.

Результаты изучения изменений показателей оксидантного и антиоксидантного статуса коров при лечении мастита представлены в таблице 4.

Таблица 4

Изменение показателей оксидантного и антиоксидантного статуса коров до и после лечения мастита

Показатели	До лечения	После лечения	
		Диомаст-КРС	Диомаст-КРС + Липотон
МДА, мкмоль/л	2,50 ± 0,10	2,20 ± 0,12*	2,00 ± 0,09**
СМП, усл.ед.	1,27 ± 0,07	1,11 ± 0,05	0,92 ± 0,03**
ИЭИ, усл.ед.	22,90 ± 1,30	18,20 ± 1,10*	13,5 ± 0,60**
ГПО, ммоль G-SH / л·мин	11,70 ± 1,30	13,80 ± 1,40	15,30 ± 1,10*
Каталаза, ммоль H_2O_2 / л·мин	48,10 ± 2,70	58,40 ± 3,70*	62,60 ± 1,40**
Витамин А, мкмоль/л	1,11 ± 0,06	1,39 ± 0,11*	1,61 ± 0,09**
Витамин С, мкмоль/л	20,38 ± 1,03	23,24 ± 1,92	28,7 ± 2,12**

* $P < 0,05$—$0,02$;
** $P < 0,005$—$0,001$ — относительно показателей до лечения

Из представленных в таблице 4 данных следует, что у животных обеих групп после лечения установлены изменения оксидантного и антиоксидантного статуса: снижение концентрации малонового диальдегида (МДА), средне-молекулярных пептидов (СМП), индекса эндогенной интоксикации (ИЭИ) и повышение содержания в крови глутатионпероксидазы (ГПО), каталазы, витаминов А и С. При этом у животных второй группы изменения носили более выраженный характер. После лечения в их крови установлено уменьшение уровня МДА на 20,0 % ($P < 0,005$), СМП — на 27,6 % ($P < 0,002$) и ИЭИ — на 41,0 % ($P < 0,001$), повышение концентрации показателей ферментативного звена антиоксидантной защиты: ГПО и каталазы на 30,8 % ($P < 0,05$) и 30,1 % ($P < 0,002$) соответственно, и неферментативного звена антиоксидантной защиты: витамина А и витамина С — на 45,0 % ($P < 0,002$) и 40,8 % ($P < 0,005$) соответственно. По сравнению с животными первой группы в крови коров второй группы содержание МДА было ниже на 9,1 %, СМП — на 17,1 % ($P < 0,01$) и ИЭИ — на 25,8 % ($P < 0,005$), а уровень ГПО выше на 10,9 %, каталазы — на 7,2 %, витамина А — на 15,8 % и витамина С — на 23,5 % ($P < 0,05$). Следовательно, терапия больных маститом коров с помощью Липотона и Диомаста-КРС сопровождается более интенсивным снижением процессов пероксидации липидов и активизацией ферментативного и неферментативного звена антиоксидантной защиты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, совместное применение препарата «Диомаст-КРС» и Липотона позволило повысить эффективность терапии мастита у коров и снизить контаминацию молока микрофлорой за счет активизации естественной резистентности и антиоксидантной защиты организма. При использовании комплексной схемы в крови коров установлено повышение показателей гуморального и клеточного звена неспецифического иммунитета (общих иммуноглобулинов, бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности лейкоцитов, фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа). Дополнительное введение коровам Липотона обеспечило снижение концентрации продуктов ПОЛ и эндогенной интоксикации, способствовало усилению активности антиоксидантных ферментов и поддержанию неферментативного звена антиоксидантной системы.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Манжурина О. А.* Микрофлора молока клинически здоровых и больных маститом коров / О. А. Манжурина, Н. Т. Климов, Ю. С. Пархоменко, В. И. Зимников, И. С. Перепелкина, Е. В. Семенова // Ветеринария. — 2020. — № 3. — С. 38—40.

2. *Пудовкин Д. Н.* Новое в генезе мастита коров // Молочное и мясное скотоводство. — 2020. — № 3. — С. 43—45.

3. *Bakkeren E.* Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence / E. Bakkeren, M. Diard, W. D. Hardt // Nature Reviews Microbiology. — 2020. — Т. 18. — № 9. — С. 479—490.

4. *Rainard P.* Immune defenses of the mammary gland epithelium of dairy ruminants / P. Rainard, F. B. Gilbert, P. Germon // Frontiers in immunology. — 2022. — Т. 13. — С. 1031785.

5. *Зимников В. И.* Оксидантный и антиоксидантный статус коров при лечении мастита с использованием препарата «АМСФ» / В. И. Зимников, Н. Т. Климов, О. Б. Павленко, Л. В. Ческидова, Т. Г. Ермолова // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». — 2021. — Т. 57. — № 3. — С. 82—85.

6. *Зимников В. И.* Показатели естественной резистентности при лечении препаратом «АМСФ» больных катаральным маститом коров / В. И. Зимников, Н. Т. Климов, О. Б. Павленко, Л. Ю. Сашнина, Л. В. Ческидова, Г. Г. Чусова // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». — 2022. — Т. 58. — № 1. — С. 88—92.

7. *Грицюк В. А.* Исследование мутагенных свойств препарата «Диомаст-КРС-КРС» при многократном воздействии / В. А. Грицюк, П. А. Паршин, Г. А. Востроилова, И. Т. Шапошников, А. А. Корчагина, Н. А. Хохлова, Д. И. Шабанов // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». — 2023. — Т. 59. — № 1. — С. 80—83.

8. *Шабунин С. В.* Токсикологическая характеристика липотона / С. В. Шабунин, Г. А. Востроилова // Аграрная наука. — 2005. — № 3. — С. 29—30.

9. Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма / М. И. Рецкий, С. В. Шабунин, Г. Н. Близнецова [и др.]. — Воронеж: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Российской академии сельскохозяйственных наук, 2010. — 70 с.

10. Методические рекомендации по оценке и коррекции иммунного статуса животных / А. Г. Шахов, Ю. Н. Масьянов, М. И. Рецкий [и др.]. — Воронеж: Издательство Истоки, 2005. — 115 с.

11. Методические рекомендации по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных / А. Г. Шахов, Ю. Н. Бригадиров, А. И. Ануфриев [и др.]. — Воронеж: Издательство Истоки, 2005. — 62 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Г. А. Востроилова — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;
В. А. Грицюк — доктор ветеринарных наук, зам. директора;
Л. В. Ческидова — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;
В. И. Зимников — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
А. А. Корчагина — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 11.02.2025.

Original article
UDC 619:615.862:618.19—002:636.2

EFFICACY OF A COMBINATION THERAPEUTIC REGIMEN FOR BOVINE MASTITIS USING THE DRUG "DIOMAST-KRS" AND LIPOTON

Galina Anatolyevna Vostroilova[*], Vasilina Aleksandrovna Gritsyuk[**], Liliya Valeryevna Cheskidova[***], Vitaliy Ivanovich Zimnikov[****], Anastasiya Andreevna Korchagina[*****]✉

[*, ***, ****, *****]*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, a.a.korch@mail.ru*✉
[**]*All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russia*

Abstract. The article presents the results of studying the efficacy of the therapeutic regimen for bovine mastitis, including the use of the complex drug "Diomast-KRS" and Lipoton. For experimental studies, 49 cows with mastitis were selected, which were divided into 2 groups according to the principle of analogues. The animals of the first group were given "Diomast-KRS" according to the instructions, the second group was additionally administered Lipoton intramuscularly at a dose of 0.02 ml/kg twice with an interval of 48 hours. It had been found that the best therapeutic effect was obtained with the combined use of Lipoton and "Diomast-KRS", which was 92.3 % for purulent-catarrhal mastitis, 91.7 % — for catarrhal mastitis, which was by 7.7—9.9 % higher than the baseline values, while 93.3 and 92.3 % of the udder lobes were cured, respectively. Milk contamination with microflora decreased by 4 times with the introduction of "Diomast-KRS", and by 6 times with the additional use of Lipoton, while the bacterial carriage was by 1.5 times lower. Therapy of cows with mastitis using Lipoton was accompanied by earlier relief of the inflammatory process in the mammary gland, pronounced activation of the humoral and cellular links of natural resistance, an intensive decrease in lipid peroxidation processes and activation of the enzymatic and non-enzymatic links of antioxidant protection.
Keywords: mastitis, combination therapy, Lipoton, "Diomast-KRS", cows

Inflammation of the mammary gland remains one of the topical issues of dairy cattle breeding worldwide. The development of mastitis is associated with infection of the udder with various pathogenic and opportunistic microorganisms: *Staph. aureus, Staph. haemoliticus, Str. agalactiae, Str. uberis, Str. dysgalactiae, E. coli, Ent. faecium,* etc. In this regard, etiotropic therapy remains basic, and treatment of mastitis in lactating cows usually consists of intracisternal or parenteral administration of antimicrobial drugs [1].

Treatment of mastitis is complicated by the fact that bacteria have adaptive mechanisms that are not limited to antibiotic resistance alone, but also include the persistence of microorganisms in mammary gland tissue, the ability to form biofilms in the udder, and the intracellular localization of pathogens, for example, in macrophages, which allows them to avoid the immune system [2, 3].

Immunity plays a huge role in the development of inflammation and the creation of conditions for the penetration and proliferation of microflora in the mammary gland. In case of bovine mastitis, significant changes occur not only in the factors of local protection of the mammary gland, but also a decrease in the resistance of the entire animal's body.

Immune deficiency seriously complicates the pathogenesis of the main pathological process, therefore, the use of immunocorrection agents in the treatment of cows with mastitis along with intracisternal administration of etiotropic drugs increases the efficacy of antimicrobial therapy [4].

Today, lipid peroxidation (LPO) is considered one of the dominant metabolic processes that regulate the functional activity of the physiological systems of the body, and as an inducer of oxidative stress and free radical pathology. Depletion of various links of the antioxidant system leads to free radical oxidation and accumulation of toxic peroxidation products in the body, which can have a negative effect on cellular and humoral immunity [5].

In this regard, to solve the problem of mastitis, further research is needed to improve treatment methods, including, in addition to etiotropic therapy, the use of immunomodulatory drugs and means of correcting pro- and antioxidant processes [6].

One of the complex drugs for the treatment of mastitis is "Diomast-KRS", consisting of two components. Component 1 contains a mixture of recombinant bovine cytokines with a total activity of at least $1 \cdot 10^4$ TCD50/ml, vitamin A — 7500 IU/ml and excipients, and component 2 contains dioxidine 10 mg/ml, vitamin A — 7500 IU/ml and excipients [7].

Recombinant bovine cytokines exhibit immunostimulating activity, act as inducers of cellular and humoral immunity, and increase the body's resistance to the effects of any infectious factors. Vitamin A is involved in metabolism, increases overall resistance, improves the growth and development of epithelial tissue and increases resistance to negative environmental effects. Dioxidine is a broad-spectrum antibacterial chemotherapeutic agent.

However, for the most complete treatment of mastitis, in addition to etiotropic therapy and immunostimulants, it is desirable to include agents for the correction of pro- and antioxidant processes, the imbalance of which underlies the pathogenesis of the disease, in the therapeutic regimen.

There is a remedy designed on the basis of cryotechnology — Lipoton, which has a unique spectrum of biological activity and high efficacy. The drug contains 5 mg/ml of lipophilic fraction as an active substance obtained by cryofractionation from placental tissues, and contains a complex of biologically active substances: hexoses, phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, sphingomyelin and others), triglycerides, unsaturated fatty acids, vitamins, trace elements.

Polysaccharides and triglycerides included in Lipoton provide tissues with nutrition and energy, improving carbohydrate and lipid metabolism. Phospholipids, being an important structural link of cell membranes and organelle membranes, regulate the permeability of biomembranes, the activity of membrane-bound enzymes, normalizing the processes of oxidative phosphorylation in cellular metabolism. Natural antioxidants included in the drug (vitamins A and E) prevent the formation of free radicals that damage body tissues [8].

The drug has an immunostimulating effect, normalizes the indicators of cellular and humoral immunity, has a hepatoprotective and membrane-protective effect, has an anti-inflammatory effect, stimulates the enzyme system, has an adaptogenic and stress-protective effect, increases the non-specific resistance of the body.

The objective of this study was to determine the efficacy of the therapeutic regimen for bovine mastitis using the complex drug "Diomast-KRS" in combination with Lipoton.

MATERIAL AND METHODS

The tests were conducted in the conditions of a farm in Voronezh region on cows with mastitis, who were divided into two groups after diagnosis. The animals of the first group ($n = 24$) served as a control, they were twice intramuscularly injected (in accordance with the instructions) with component 1 of the drug "Diomast-KRS" at a dose of 10 ml with an interval of 24 hours, and they were intracisternally injected into the affected quarter of the udder with component 2 of the drug "Diomast-KRS" at a dose of 10 ml twice a day for 3 days.

The cows of the second group ($n = 25$) were similarly given "Diomast-KRS" and additionally intramuscularly injected with Lipoton at a dose of 0.02 ml/kg twice with an interval of 48 hours.

The condition of the mammary gland was assessed based on clinical signs and the reaction of udder secretion with the diagnostic reagent Masttest before treatment, immediately after the end of drug administration and 5 days after the end of treatment. Before and 5 days after the end of therapy, venous blood samples were taken from cows to study natural resistance, lipid peroxidation (LPO) activity and antioxidant protection (AOP), as well as milk — to conduct microbiological studies according to established methods [9—11].

STUDY RESULTS

The treatment efficacy of cows with purulent-catarrhal and catarrhal mastitis is presented in Table 1.

It follows from the data presented in Table 1 that when using the basic variant, 84.6 % of animals recovered from purulent-catarrhal mastitis, and 81.8 % — from catarrhal mastitis, while 85.7 and 81.8 % of udder lobes were cured, respectively. The best therapeutic effect was obtained with the combined use of Lipoton and "Diomast-KRS", which was 92.3 % for purulent-catarrhal mastitis and 91.7 % — for catarrhal mastitis, which was by 7.7—9.9 % higher than the basic variant, while 93.3 and 92.3 % of udder lobes were cured, respectively.

The results of the study of the species composition of the isolated microflora from the secretion of the mammary gland of cows with mastitis are presented in Table 2.

Table 1

Efficacy of bovine mastitis therapy

Method of treatment	Undergoing treatment		Recovered		Cured	
	cows	lobes	cows	%	lobes	%
Purulent-catarrhal mastitis						
"Diomast-KRS"	13	14	11	84.6	12	85.7
"Diomast-KRS" + Lipoton	13	15	12	92.3	14	93.3
Catarrhal mastitis						
"Diomast-KRS"	11	11	9	81.8	9	81.8
"Diomast-KRS" + Lipoton	12	13	11	91.7	12	92.3

Table 2

Species composition of microflora before and after treatment

Sample No.	«Diomast-KRS»		Sample No.	«Diomast-KRS» + Lipoton	
	before treatment	after treatment		before treatment	after treatment
1	*Staph. aureus* *Ent. faecium*	— Ent. faecium	7	*Staph. aureus* *Staph. epidermidis*	— —
2	*Staph. aureus* *E. coli*	— E. coli	8	*Staph. aureus* *Ent. faecium*	— Ent. faecium
3	*Staph. aureus* *E. coli*	*Staph. aureus* —	9	*Staph. aureus* *E. coli*	— —
4	*Str. agalactiae* *E. coli*	— —	10	*Staph. aureus* *Ent. faecium*	— Ent. faecium
5	*Str. agalactiae* *E. coli*	— —	11	*Str. agalactiae* *E. coli*	— —
6	*Str. agalactiae* *Staph. epidermidis*	— —	12	*Staph. aureus* *Staph. epidermidis*	— —

From the data presented in Table 2 it follows that *E. coli* was isolated from the mammary gland secretion of the cows with mastitis of the first group ("Diomast-KRS") before treatment in 66.7 % of cases, *Staph. aureus* and *Str. agalactiae* — in 50.0 %, *Staph. epidermidis* and *Ent. faecium* — in 16.7 %. From milk samples of the cows of the second group ("Diomast-KRS" + Lipoton), *Staph. aureus* was isolated in 83.3 % of cases, *E. coli, Staph. epidermidis* and *Ent. faecium* — in 33.3 %, *Str. agalactiae* — in 16.7 %.

After treatment, contamination of milk with microflora in the animals of the first group decreased by 4 times, and in the second group — by 6 times, while the bacterial carriage was by 1.5 times lower than in the basic variant.

The results of the study of the indicators of cellular and humoral links of natural resistance in the treatment of bovine mastitis are presented in Table 3.

The data presented in Table 3 show that similar dynamics of changes in immunological blood indicators

were established in the animals of both groups after treatment: a decrease in the concentration of circulating immune complexes (CIC) and an increase in the level of total immunoglobulins, serum bactericidal activity (SBA), serum lysozyme activity (SLA), leukocyte phagocytic activity (LPA), phagocytic index (PhI) and phagocytic number (PhN). However, in the animals of the second group, the changes were more pronounced. After treatment, a 2.0-fold decrease in the concentration of circulating immune complexes ($P < 0.001$) and a 1.5-fold increase in the level of total immunoglobulins ($P < 0.001$) were detected in their blood, as well as SBA — by 20.6 % ($P < 0.005$), SLA — by 30.5 % ($P < 0.05$), LPA — by 12.7 %, PhN — by 39.3 % ($P < 0.002$) and PhI — by 26.3 % ($P < 0.005$). In the cows additionally administered Lipoton, compared to the animals of the first group, the content of circulating immune complexes was lower by 28.6 % ($P < 0.005$), and the level of total immunoglobulins was higher by 25.5 % ($P < 0.02$), SBA — by 11.5 %, SLA — by 22.5 % ($P < 0.05$), LPA — by 5.2 %, PhN — by 18.2 % ($P < 0.05$) and PhI — by 11.6 % ($P < 0.005$).

Table 3

Changes in immunological blood indicators of cows

Indicators	Before treatment	After treatment	
		«Diomast-KRS»	«Diomast-KRS» + Lipoton
Total immunoglobulins, g/L	21.20 ± 1.10	25.90 ± 1.50*	32.50 ± 1.80**
CIC, g/L	0.40 ± 0.03	0.28 ± 0.02*	0.20 ± 0.01**
SBA, %	72.30 ± 2.40	78.20 ± 4.10	87.20 ± 3.20**
SLA, mcg/ml	1.67 ± 0.21	1.78 ± 0.15	2.18 ± 0.12*
LPA, %	73.40 ± 3.40	78.60 ± 5.60	82.70 ± 4.90
PhN	3.80 ± 0.21	4.30 ± 0.25	4.80 ± 0.18**
PhI	2.80 ± 0.15	3.30 ± 0.18*	3.90 ± 0.21**

* $P < 0.05$—0.01;
** $P < 0.005$—0.001 — relative to the values before treatment

Therefore, therapy of cows with mastitis using Lipoton and "Diomast-KRS" contributed to the relief of the inflammatory process in the mammary gland and ensured maximum activation of the humoral and cellular links of natural resistance.

The results of the study of changes in the oxidant and antioxidant status of cows during treatment of mastitis are presented in Table 4.

From the data presented in Table 4 it follows that in the animals of both groups after treatment, there were detected the changes in the oxidant and antioxidant status: a decrease in the concentration of malondialdehyde (MDA), medium molecular peptides (MMP), endogenous intoxication index (EII) and an increase in the blood content of glutathione peroxidase (GPO), catalase, vitamins A and C. At the same time, in the animals of the second group the changes were more pronounced. After treatment, there was found a decrease in the level of MDA by 20.0 % ($P < 0.005$), MMP — by 27.6 % ($P < 0.002$) and EII — by 41.0 % ($P < 0.001$) in their blood, an increase in the concentration of indicators of the enzymatic link of antioxidant protection: GPO and catalase — by 30.8 % ($P < 0.05$) and 30.1 % ($P < 0.002$), respectively, and the non-enzymatic link of antioxidant protection: vitamin A and vitamin C — by 45.0 % ($P < 0.002$) and 40.8 % ($P < 0.005$), respectively.

Compared to the animals of the first group, the blood of the cows of the second group contained MDA lower by 9.1 %, MMP — lower by 17.1 % ($P < 0.01$) and EII — lower by 25.8 % ($P < 0.005$), while the level of GPO was by 10.9 % higher, catalase — by 7.2 % higher, vitamin A — by 15.8 % higher, and vitamin C — by 23.5 % higher ($P < 0.05$).

Table 4

Changes in oxidant and antioxidant status of cows before and after treatment of mastitis

Indicators	Before treatment	After treatment	
		«Diomast-KRS»	«Diomast-KRS» + Lipoton
MDA, μmol/L	2.50 ± 0.10	2.20 ± 0.12*	2.00 ± 0.09**
MMP, c. u.	1.27 ± 0.07	1.11 ± 0.05	0.92 ± 0.03**
EII, c. u.	22.90 ± 1.30	18.20 ± 1.10*	13.5 ± 0.60**
GPO, mmol G-SH / L·min	11.70 ± 1.30	13.80 ± 1.40	15.30 ± 1.10*
Catalase, mmol H_2O_2 / L·min	48.10 ± 2.70	58.40 ± 3.70*	62.60 ± 1.40**
Vitamin A, μmol/L	1.11 ± 0.06	1.39 ± 0.11*	1.61 ± 0.09**
Vitamin C, μmol/L	20.38 ± 1.03	23.24 ± 1.92	28.7 ± 2.12**

* $P < 0.05$—0.02

** $P < 0.005$—0.001 — relative to the values before treatment

Therefore, the therapy of cows with mastitis using Lipoton and "Diomast-KRS" is accompanied by a more intensive reduction in lipid peroxidation processes and activation of the enzymatic and non-enzymatic links of antioxidant protection.

CONCLUSION

Thus, the combined use of the drug "Diomast-KRS" and Lipoton made it possible to increase the efficacy of mastitis therapy in cows and reduce milk contamination with microflora due to the activation of natural resistance and antioxidant protection of the body. When using the complex scheme, an increase in the indicators of humoral and cellular links of non-specific immunity (total immunoglobulins, serum bactericidal and lysozyme activity, leukocyte phagocytic activity, phagocytic index and phagocytic number) was found in the blood of cows. Additional administration of Lipoton to cows ensured a decrease in the concentration of lipid peroxidation products and endogenous intoxication, contributed to an increase in the activity of antioxidant enzymes and the maintenance of the non-enzymatic link of the antioxidant system.

REFERENCES

1. *Manzhurina O. A.* Microflora of milk of clinically healthy cows and cows with mastitis / O. A. Manzhurina, N. T. Klimov, Yu. S. Parkhomenko, V. I. Zimnikov, I. S. Perepelkina, E. V. Semenova // Veterinariya (Veterinary Medicine). — 2020. — No. 3. — P. 38—40.

2. *Pudovkin D. N.* New in the genesis of bovine mastitis // Molochnoe i myasnoe skotovodstvo (Dairy and beef cattle breeding). — 2020. — No. 3. — P. 43—45.

3. *Bakkeren E.* Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence / E. Bakkeren, M. Diard, W. D. Hardt // Nature Reviews Microbiology. — 2020. — V. 18. — No. 9. — P. 479—490.

4. *Rainard P.* Immune defenses of the mammary gland epithelium of dairy ruminants / P. Rainard, F. B. Gilbert, P. Germon // Frontiers in immunology. — 2022. — V. 13. — P. 1031785.

5. *Zimnikov V. I.* Oxidant and antioxidant status of cows during the treatment of mastitis using the drug "AMSF" / V. I. Zimnikov, N. T. Klimov, O. B. Pavlenko, L. V. Cheskidova, T. G. Ermolova // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya "Vitebskaya ordena 'Znak pocheta' gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny" (Transactions of the educational institution Vitebsk Order "Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine). — 2021. — Vol. 57. — No. 3. — P. 82—85.

6. *Zimnikov V. I.* Natural resistance indicators during treatment with the drug "AMSF" of cows with catarrhal mastitis / V. I. Zimnikov, N. T. Klimov, O. B. Pavlenko, L. Yu. Sashnina, L. V. Cheskidova, G. G. Chusova // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya "Vitebskaya ordena 'Znak pocheta' gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny" (Transactions of the educational institution Vitebsk Order "Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine). — 2022. — V. 58. — No. 1. — P. 88—92.

7. *Gritsyuk V. A.* Study of the mutagenic properties of the drug "Diomast-KRS" with repeated exposure / V. A. Grit-

syuk, P. A. Parshin, G. A. Vostroilova, I. T. Shaposhnikov, A. A. Korchagina, N. A. Khokhlova, D. I. Shabanov // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya "Vitebskaya ordena 'Znak pocheta' gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny" (Transactions of the educational institution Vitebsk Order "Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine). — 2023. — Vol. 59. — No. 1. — P. 80—83.

8. *Shabunin S. V.* Toxicological characteristics of lipoton / S. V. Shabunin, G. A. Vostroilova // Agrarnaya nauka (Agrarian science). — 2005. — No. 3. — P. 29—30.

9. Methodological provisions for the study of free radical oxidation processes and the antioxidant defense system of the body / M. I. Retskiy, S. V. Shabunin, G. N. Bliznetsova [et al.]. — Voronezh: State Scientific Institution All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 2010. — 70 p.

10. Methodological recommendations for assessing and correcting the immune status of animals / A. G. Shakhov, Yu. N. Masyanov, M. I. Retskiy [et al.]. — Voronezh: Istoki Publishing House, 2005. — 115 p.

11. Methodological recommendations for assessing and correcting non-specific resistance of animals / A. G. Shakhov, Yu. N. Brigadirov, A. I. Anufriev [et al.]. — Voronezh: Istoki Publishing House, 2005. — 62 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

G. A. Vostroilova — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;
V. A. Gritsyuk — Doctor of Veterinary Sciences, Deputy Director;
L. V. Cheskidova — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;
V. I. Zimnikov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
A. A. Korchagina — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate.

The article was submitted 11.02.2025.

Научная статья
УДК 619.616.1/.9:615

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ДИСПЛАЗИИ ТАЗОБЕДРЕННЫХ СУСТАВОВ КАТЕГОРИИ С1 У СОБАК

Марина Петровна Семененко[*]✉, Диана Петровна Винокурова[**], Ксения Андреевна Железнякова[***], Валентин Юрьевич Бородин[****]

[, ***, ****]Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии, Краснодар, Россия, sever291@mail.ru✉*
[**]Кубанский ГАУ имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия
[*]https://orcid.org/0000-0001-8266-5900
[**]https://orcid.org0000-0003-4268-8854
[***]https://orcid.org/0000-0002-9407-0768
[****]https://orcid.org/0000-0001-8266-5900

Аннотация. Целью исследований стала оценка терапевтической эффективности препарата картисилан при дисплазии тазобедренного сустава у беспородных собак (n = 8) среднего размера (12—24 кг) в возрасте от 1 до 4 лет с диагнозом «дисплазия тазобедренного сустава» в стадии С1. При клиническом обследовании животных были выявлены признаки хромоты различной тяжести, неполная опора на конечность со стороны пораженного сустава, дискомфорт при пальпации, болезненность и беспокойство. У некоторых собак ситуация была осложнена длительно протекающим хроническим воспалительным процессом в области пораженного сустава, проявляемым отеками.

Проведенные исследования показали, что пероральное применение препарата собакам с различной стадией заболевания в дозе 0,5 г/кг массы животного 1 раз в день на протяжении 60 дней позволяет снизить воспаление в зоне поражения сустава, стимулировать репаративные процессы в костной и хрящевой ткани, нивелировать клинические признаки заболевания, а также улучшить качество жизни животных.

Ключевые слова: дисплазия тазобедренного сустава, собаки, рентгенография, кровь, биохимические исследования, картисилан, терапевтическая эффективность

Одним из проявлений нарушения обмена веществ и патологии опорно-двигательного аппарата у хищников является наследственно обусловленное заболевание — дисплазия тазобедренного сустава (ДТБС). Отсутствие контроля за распространением генетических заболеваний в популяциях собак различных пород ведет не только к ухудшению экстерьерных показателей, но и к распространению в породе таких пороков развития. При этом частота возникновения данной патологии у собак при отсутствии профилактики или иных мер борьбы может достигать 60—70 % в популяции [8, 9]. Если рассматривать породную предрасположенность заболевания, то наибольшая частота встречаемости ДТБС диагностируется у среднеазиатской, восточно-европейской и немецкой овчарки — от 30 до 40 % [1].

Среди домашних животных к дисплазии суставов больше предрасположены собаки, нежели кошки. Так, у кошек до года частота встречаемости заболевания варьирует в пределах 7,7 % случаев, а у собак — в 92,3 % случаев соответственно. В возрастной период 12—24 месяца заболевание диагностируется уже у 44 % кошек, тогда как собаки в этом возрасте болеют в 56 % случаев. При этом у собак поражение тазовых конечностей выявляется значительно чаще, чем у кошек, что связано с разницей в весе животных и большими нагрузками [5].

Широкое распространение данной патологии, приводящее к значительному снижению качества жизни собак, отсутствие надежных способов профилактики и превентивных мер, а также отсутствие неоперативных подходов терапии, указывает на ак-

туальность данного исследования, цель которого — поиск доступной медикаментозной поддержки при лечении данной патологии.

Распределение по классификации основано на рентгенологических снимках, где рассматривается анатомически верное положение всех элементов сустава. При учете состояния каждого сустава в отдельности, итоговый результат общего состояния животного выводится по самому деформированному [2, 4—7].

Дисплазия суставов конечностей значительно сказывается на возможностях использования собак для службы и дрессировки. Плохо сформированные суставные поверхности, нарушение в анатомическом и физиологическом расположении последних снижают качество и продолжительность жизни животного. В связи с тем, что большинство патологий, связанных с опорно-двигательным аппаратом, имеют хроническое течение и могут приводить к ухудшению, или даже потере двигательной активности у собак, их лечение является одним из актуальных вопросов современной ветеринарии.

Однако оперативное лечение проводится редко из-за высокой стоимости и длительного послеоперационного и реабилитационного периода. А эффективных консервативных методов, основанных на использовании фармакологических средств, к сожалению, нет, как и возможности профилактики заболевания у будущего потомства. Поэтому разработка препаратов, способных предотвращать или нивелировать осложнения, связанные с ДТБС, является актуальным направлением ветеринарной фармакологической науки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыт по оценке терапевтической эффективности препарата картисилан при дисплазии тазобедренных суставов у собак проведен в условиях ветеринарной клиники приюта «Краснодог» (г. Краснодар).

Картисилан представляет собой комплексный препарат мультимодального действия, оказывающий стимулирующее действие на остеогенез, активизацию остеобластов, синтез органического матрикса и процессы кальцификации кости, сопровождающиеся нарушением двигательной функции и здоровья животных, способный оказать максимальный эффект при одновременном потенцированном действии. Его состав представлен композицией таких биологически активных веществ и компонентов, как кальция глицерофосфат, холекальциферол, дигидрокверцетин, хондроитина сульфат натрия, глюкозамина гидрохлорид, метилсульфонилметан и ортокремниевая кислота. Разработан картисилан в отделе фармакологии ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии».

В эксперимент были включены беспородные собаки (n = 8) среднего размера (12—24 кг) в возрасте от 1 до 4 лет с диагнозом «дисплазия тазобедренного сустава» в стадии С1. При клиническом обследовании животных были выявлены признаки хромоты различной тяжести, неполная опора на конечность со стороны пораженного сустава, дискомфорт при пальпации, болезненность и беспокойство. У некоторых собак ситуация была осложнена длительно протекающим хроническим воспалительным процессом в области пораженного сустава, проявляемым отеками. После установления диагноза всем животным был назначен препарат картисилан, задаваемый перорально в составе мясных болюсов в дозе 0,5 г/кг массы животного 1 раз в день на протяжении 60 дней.

Для отслеживания динамики лечения и результатов эксперимента собакам была проведена рентгенография тазобедренных суставов в прямой и боковой укладке вентро-дорсальной проекции. При проведении рентгенологического исследования животное укладывали на спине с вытянутыми параллельно тазовыми конечностями. Предварительно собаку седировали медетомидином в дозе 40 мкг/кг. Рентгенодиагностика выполнялась на аппарате Diagnostic X-RAY UNIT (производитель Южная Корея).

Кроме этого, в ходе эксперимента регулярно учитывалось общее состояние животных, особенности поведения, координация движений, интенсивность и характер двигательной активности, тонус скелетных мышц, наличие и степень хромоты, а также проводился биохимический анализ крови до и после применения препарата на автоматизированном анализаторе Vitalab Flexor (производитель Нидерланды).

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с помощью программного пакета *Statistica 10.0* с определением: M — среднее арифметическое; m — ошибка среднего арифметического; уровень достоверности различий показателей по группам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При физикальном обследовании собак во всех случаях была установлена хромота на поражен-

ную сторону, неуклюжее передвижение, подволакивание задних лап, хрусты при сгибании и разгибании коленных суставов, неестественное сидячее или стоячее положение, болезненность — от незначительной до средней, проявляемая поскуливанием или агрессией при прикосновении к больной конечности.

При изучении рентгеновских снимков (рис. 1, 2) установлено недоразвитие суставной впадины тазовой кости, признаки ацетобулярной дисплазии (недостаточная глубина впадины). Края суставной впадины плохо охватывают головку бедренной кости из-за ее смещения. Визуализируется утолщение капсулы сустава и костная пролиферация по краям суставной впадины, обусловленная хроническим процессом.

Рис. 1. Рентгеновский снимок тазобедренных суставов во фронтальной проекции собаки (Джек, 3 года) до эксперимента

Признаки развития дисплазии тазобедренных суставов билатерально, недостаточная погруженность головок бедренных костей в вертлужные впадины таза билатерально, изменение геометрии и конфигурации головок бедренных костей и вертлужных впадин таза билатерально.

При оценке биохимических показателей крови животных (табл. 1) до проведения фармакотерапии значимых нарушений гомеостатической составляющей организма собак установлено не было.

Практически все показатели, отражающие основные обменные процессы, находились в пределах референсных значений, за исключением общего белка, концентрация которого превышала верхние границы видовой нормы на 18,0 %. Подобный сдвиг может быть обусловлен длительно протекающими воспалительными процессами в зоне пораженных суставов и связан с увеличением γ-глобулиновой фракции как фактора интенсификации иммунобиологической реактивности организма животных с усиленной выработкой антител.

Рис. 2. Рентгеновский снимок тазобедренных суставов во фронтальной проекции собаки (Дина, 2 года) до эксперимента

Однако терапия картисиланом оказала позитивные изменения в ряде биохимических констант крови. Регистрируемая гиперпротеинемия к 60 дню исследований достоверно снизилась на 25,4 %, что на фоне увеличения уровней мочевины и креатинина может указывать на снижение воспалительных реакций в зоне первичной альтерации и активизацию белкового метаболизма.

Активность щелочной фосфатазы возросла в 1,6 раза ($p \leq 0{,}05$), при этом ее увеличение происходило в рамках нормальных значений, что исключает развитие патологии со стороны гепатобилиарной системы. Напротив, подобный сдвиг в более высокой степени обусловлен повышением «костного» изофермента, чем общей активности ЩФ, что подтверждается его прямой корреляцией с показателем общего кальция, уровень которого за период эксперимента вырос на 13,6 %. Корреляционные связи такого типа указывают на восстановление клеточного матрикса костной ткани и эффективность проводимой терапии у собак препаратом картисилан. Другие биохимические показатели, в частности уровни билирубина, глюкозы и холестерина регистрировались в пределах нормы.

Таблица 1

Динамика биохимических показателей крови собак (M ± m; n = 8)

Показатель	До лечения	Через 60 дней применения препарата	Границы референсных пределов
Общий белок, г/л	83,8 ± 4,26	62,5 ± 3,17*	55,0—71,0
Мочевина, ммоль/л	6,3 ± 0,34	8,3 ± 0,72	3,5—9,2
Креатинин, мкмоль/л	68,5 ± 5,18	77,5 ± 6,22	55,0—114,0
Глюкоза, ммоль/л	3,4 ± 0,19	3,8 ± 0,46	3,3—5,6
Холестерин, ммоль/л	4,6 ± 0,35	5,13 ± 0,37	2,8—6,9
Амилаза, ЕД/л	886,7 ± 14,22	835,0 ± 9,54	300,0—1500,0
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	55,7 ± 3,71	89,3 ± 2,06*	10—100,0
Общий билирубин, мкмоль/л	7,9 ± 0,68	8,0 ± 0,91	1,7—10,6
Прямой билирубин, мкмоль/л	1,60 ± 0,50	1,82 ± 0,32	0—2,5
Кальций общий, ммоль/л	2,2 ± 0,34	2,5 ± 0,09	2,3—3,3
Фосфор неорганический, ммоль/л	1,93 ± 0,75	1,83 ± 0,24	1,1—3,0
Хлориды, ммоль/л	110,7 ± 5,14	117,1 ± 4,62	107—126

* степень достоверности $p \leq 0,05$ по отношению к контролю

При клиническом наблюдении в процессе лечения и по его итогам у животных установлено снижение хромоты, восстановление опоры на конечность, отсутствие болезненности при пальпации. У собак увеличилась общая активность, регистрируемая по таким показателям, как способность вставать из положения лежа, ходить и бегать, спускаться по наклонной поверхности. Улучшилась подвижность и функциональность суставов, произошло изменение углов сгибания и разгибания, снижение мышечной атрофии, а также увеличение периметра задних конечностей. На рентгеновских снимках, сделанных на 60 день терапии, признаков прогрессирования диспластических изменений не выявлено. Установлена выраженная конгруэнтность суставной впадины таза с головкой бедренной кости, позволяющая более равномерно распределять нагрузку на тазобедренный сустав, наблюдается сужение суставной щели, а также восстановление суставного хряща и вертлужной губы за счет формирования новой суставной поверхности.

Боковая проекция бедренной кости, в частности ее проксимальный эпифиз имеет отчетливые очертания и закругленные концы. Суставное пространство более узкое и глубокое.

Описанные выше изменения связаны с действием компонентов препарата, которое улучшает обмен веществ, в частности способствует усвоению фосфора клетками организма, стимулирует кроветворение, повышая эритропоэз, усиливает рост тканей, а также плотность костей и регулирует минерализацию костной ткани.

Так же улучшается процесс мобилизации кальция из костной ткани и синтез коллагена, что необходимо для создания оптимальных условий восстановления скелета. С последними фактами мы связываем временное нарушение соотношения кальция и фосфора.

Препарат также оказывает хондропротекторное действие, усиливает обменные процессы в гиалиновом и волокнистом хрящах, одновременно ингибирует ферменты, вызывающие деградацию суставного хряща, стимулирует выработку хондроцитами протеогликанов. Способствует снижению выброса в синовиальную жидкость медиаторов воспаления и болевых факторов, подавляет секрецию лейкотриенов и простагландинов. Содействует восстановлению суставной сумки и хрящевых поверхностей суставов, нормализует продукцию суставной жидкости.

ВЫВОДЫ

Таким образом, данные, полученные в настоящем исследовании, подтверждают терапевтическую эффективность картисилана при дисплазии тазобедренного сустава у собак. Препарат позволяет снизить воспаление в зоне пораженного сустава, стимулировать репаративные процессы в костной и хрящевой ткани, нивелировать клинические признаки заболевания, а также улучшить качество жизни животных.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ:

1. Заболевания суставов и опорно-двигательной системы у овчарок разных пород / П. И. Уколов, К. Ю. Карушева, О. Г. Шараськина, Т. Ш. Кузнецова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2017. — № 2. — С. 95—98.

2. *Митин В. Н.* Рентгенологическая диагностика дисплазии тазобедренных суставов у собак / В. Н. Митин, Ю. И. Филлипов, В. А. Лукьяновский [и др.] // — 2000. — М.: «Аквариум ЛТД» — С. 32.

3. *Оперативная хирургия у животных* / Б. С. Семенов, В. Н. Виденин, А. Ю. Нечаев [и др.]. — 3-е изд., доп. — Санкт-Петербург: Лань, 2023. — 704 с. Текст: непосредственный. ISBN 978_5_507_46284_1

4. *Оробец В. А.* Определение дисплазии тазобедренных суставов у собак с использованием компьютерной рентгенографии / В. А. Оробец, И. И. Летов, Д. Ю. Деркачев // Ветеринария Кубани. — 2012. — № 5. — С. 10—13.

5. *Поносов С. В.* Частота встречаемости дисплазии суставов у мелких домашних животных / С. В. Поносов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2020. — № 4 (84). — С. 221—224. EDN SQNNMW.

6. *Резекция* головки бедренной кости как способ лечения дисплазии тазобедренных суставов / М. В. Инжуватова, К. О. Новикова, Т. Е. Власова [и др.] // Международный студенческий научный вестник. — 2016. — № 4—3. — С. 351—352.

7. *Семернев Е. В.* Стандартные методы диагностики, лечения и профилактики дисплазии тазобедренного сустава. Морфологические изменения костной ткани при дисплазии / Е. В. Семернев // Молодежь и наука. — 2016. — № 2. — С. 68.

8. *Тимофеева О. А.* Селекция против дисплазии тазобедренного сустава / О. А. Тимофеева // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. — 2020. — № 1(60). — С. 194—198. EDN OQGHMI.

9. *Тимофеева О. А.* Роль селекции в снижении частоты проявления дисплазии тазобедренных суставов у собак / О. А. Тимофеева // Вестник аграрной науки. — 2020. — № 1(82). — С. 169—178. http://dx.doi.org/10.15217/48484

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

М. П. Семененко — доктор ветеринарных наук, доцент, заведующая отделом;
Д. П. Винокурова — кандидат ветеринарных наук, доцент;
К. А. Железнякова — кандидат экономических наук, старший научный сотрудник;
В. Ю. Бородин — аспирант.

Статья поступила в редакцию 15.01.2025.

Original article
UDC 619.616.1/.9:615

EFFICACY OF DRUG THERAPY IN CASE OF CATEGORY C1 HIP DYSPLASIA IN DOGS

Marina Petrovna Semenenko[*]✉, Diana Petrovna Vinokurova[**], Kseniya Andreevna Zheleznyakova[***], Valentin Yuryevich Borodin[****]

[, ***, ****]Krasnodar Research Center for Zootechnics and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia, sever291@mail.ru✉*
[**]Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia,
[*]https://orcid.org/0000-0001-8266-5900
[**]https://orcid.org0000-0003-4268-8854
[***]https://orcid.org/0000-0002-9407-0768
[****]https://orcid.org/0000-0001-8266-5900

Abstract. The objective of the research was to assess the therapeutic efficacy of the drug kartisilan in case of hip dysplasia in mongrel dogs (n = 8) of medium size (12—24 kg) aged 1 to 4 years with a diagnosis of hip dysplasia at stage C1. Clinical examination of the animals revealed signs of lameness of varying severity, incomplete support on the limb on the side of the affected joint, discomfort upon palpation, soreness and anxiety. In some dogs, the situation was complicated by a long-term chronic inflammatory process in the area of the affected joint, manifested by edema.

The conducted studies have shown that peroral administration of the drug to dogs with various stages of the disease at a dose of 0.5 g/kg of animal weight once a day for 60 days helps to reduce inflammation in the affected joint area, stimulate reparative processes in bone and cartilage tissue, eliminate clinical signs of the disease, and improve the life quality of animals.

Keywords: hip dysplasia, dogs, X-ray radiography, blood, biochemical studies, kartisilan, therapeutic efficacy

One of the manifestations of metabolic disorders and musculoskeletal pathology in predators is a hereditary disease — hip dysplasia (HD). The lack of control over the spread of genetic diseases in populations of dogs of various breeds leads not only to a deterioration in exterior indicators, but also to the spread of such developmental defects in the breed. At the same time, the incidence of this pathology in dogs in the absence of prevention or other control measures can reach 60—70 % in the population [8, 9]. If we consider the breed predisposition to the disease, the highest incidence of HD is diagnosed in Central Asian, East European and German Shepherds dogs — from 30 to 40 % [1].

Among domestic animals, dogs are more prone to joint dysplasia than cats. Thus, in cats under one year of age, the frequency of occurrence of the disease varies within 7.7 % of cases, and in dogs — in 92.3 % of cases, respectively. In the age period of 12—24 months, the disease is diagnosed in 44 % of cats, while dogs at this age are sick in 56 % of cases. At the same time, in dogs, pelvic limb lesions are detected much more often than in cats, which is associated with the difference in the weight of animals and greater loads [5].

The widespread prevalence of this pathology, leading to a significant decrease in the life quality of dogs, the lack of reliable methods of prevention and preventive measures, as well as the lack of non-surgical approaches to therapy, indicate the relevance of this study, the objective of which is to find available drug support in the treatment of this pathology.

The classification is based on X-ray images, which examine the anatomically correct position of all joint elements. Taking into account the condition of each joint separately, the final result of the general condition of the animal is derived from the most deformed one [2, 4—7].

Dysplasia of the limb joints significantly affects the possibilities of using dogs for service and training. Poorly formed articular surfaces, disruption of the anatomical and physiological location of the latter reduce the animal's life quality and duration. Due to the fact that most pathologies associated with the mus-

culoskeletal system are chronic and can lead to deterioration or even loss of motor activity in dogs, their treatment is one of the pressing issues of modern veterinary medicine.

However, surgical treatment is rarely performed due to the high cost and long postoperative and rehabilitation period. Unfortunately, there are no effective conservative methods based on the use of pharmacological agents, as well as the possibility of preventing the disease in future offspring. Therefore, the design of drugs that can prevent or mitigate complications associated with hip dysplasia is a relevant area of veterinary pharmacological science.

MATERIAL AND METHODS

The experiment on assessing the therapeutic efficacy of the drug kartisilan in case of hip dysplasia in dogs was carried out at the veterinary clinic of Krasnodog shelter (Krasnodar).

Kartisilan is a complex drug with multimodal action, which has a stimulating effect on osteogenesis, activation of osteoblasts, synthesis of organic matrix and bone calcification processes, accompanied by impaired motor function and health of animals, capable of providing the maximum effect with simultaneous potentiated action. Its composition is represented by a composition of such biologically active substances and components as calcium glycerophosphate, cholecalciferol, dihydroquercetin, sodium chondroitin sulfate, glucosamine hydrochloride, methylsulfonylmethane and orthosilicic acid. Kartisilan was designed at the Department of Pharmacology of FSBSI "Krasnodar Research Center for Zootechnics and Veterinary Medicine".

The experiment included mongrel dogs (n = 8) of medium size (12—24 kg) aged 1 to 4 years with a diagnosis of hip dysplasia at stage C1. Clinical examination of the animals revealed signs of lameness of varying severity, incomplete support on the limb on the side of the affected joint, discomfort during palpation, soreness and anxiety. In some dogs, the situation was complicated by a long-term chronic inflammatory process in the area of the affected joint, manifested by edema. After establishing the diagnosis, all animals were prescribed the drug kartisilan, administered perorally as part of meat boluses at a dose of 0.5 g/kg of animal weight once a day for 60 days.

To monitor the dynamics of treatment and the results of the experiment, the dogs underwent radiography of the hip joints in the direct and lateral position of the ventrodorsal projection. During the X-ray examination, the animal was laid on its back with the pelvic limbs extended parallel. The dog was preliminarily sedated with medetomidine at a dose of 40 mcg/kg. X-ray diagnostics was performed on the Diagnostic X-RAY UNIT (manufacturer South Korea).

In addition, during the experiment, the general condition of the animals, behavioral features, coordination of movements, intensity and nature of motor activity, skeletal muscle tone, the presence and degree of lameness were regularly taken into account, and a biochemical blood test was performed before and after the use of the drug on an automated analyzer Vitalab Flexor (manufacturer Netherlands).

The obtained data were subjected to statistical processing using the Statistica 10.0 software package with the definition: M — arithmetic mean; m — error of the arithmetic mean; level of reliability of differences in indicators by groups.

STUDY RESULTS

During physical examination of dogs, lameness on the affected side, awkward movement, dragging of the hind legs, crunching when bending and straightening the knee joints, unnatural sitting or standing position, pain (from minor to moderate), manifested by whining or aggression when touching the sore limb, were detected in all cases.

When studying X-ray images (Fig. 1, 2), underdevelopment of the acetabulum of the pelvic bone and signs of acetabular dysplasia (insufficient acetabulum depth) were detected. The edges of the acetabulum poorly cover the head of the femur due to its displacement. Thickening of the joint capsule and bone proliferation along the edges of the acetabulum caused by the chronic process are visualized. Signs of development of hip dysplasia bilaterally, insufficient immersion of the femoral heads in the acetabulum of the pelvis bilaterally, change in geometry and configuration of the femoral heads and acetabulum of the pelvis bilaterally.

When assessing the blood biochemical indicators in the animals (Table 1) before pharmacotherapy, no significant disturbances in the homeostatic component of the dogs' body were detected.

Almost all the indicators reflecting the main metabolic processes were within the reference values, with the exception of total protein, the concentration of which exceeded the upper limits of the species norm by 18.0 %. Such a shift may be due to long-term inflammatory processes in the area of the affected joints and is associated with an increase in the γ-globulin fraction as a factor in the intensification of the immunobiological reactivity of the animal organism with increased production of antibodies.

Fig. 1. X-ray of the hip joints in the frontal projection of the dog (Jack, 3 years old) before the experiment

Fig. 2. X-ray of the hip joints in the frontal projection of the dog (Dina, 2 years old) before the experiment

Table 1

Dynamics of the blood biochemical indicators in dogs (M ± m; n = 8)

Indicator	Before treatment	In 60 days of using the drug	Reference limits
Total protein, g/L	83.8 ± 4.26	62.5 ± 3.17*	55.0—71.0
Urea, mmol/L	6.3 ± 0.34	8.3 ± 0.72	3.5—9.2
Creatinine, μmol/L	68.5 ± 5.18	77.5 ± 6.22	55.0—114.0
Glucose, mmol/L	3.4 ± 0.19	3.8 ± 0.46	3.3—5.6
Cholesterol, mmol/L	4.6 ± 0.35	5.13 ± 0.37	2.8—6.9
Amylase, U/L	886.7 ± 14.22	835.0 ± 9.54	300.0—1500.0
Alkaline phosphatase, U/L	55.7 ± 3.71	89.3 ± 2.06*	10—100.0
Total bilirubin, μmol/L	7.9 ± 0.68	8.0 ± 0.91	1.7—10.6
Direct bilirubin, μmol/L	1.60 ± 0.50	1.82 ± 0.32	0—2.5
Total calcium, mmol/L	2.2 ± 0.34	2.5 ± 0.09	2.3—3.3
Inorganic phosphorus, mmol/L	1.93 ± 0.75	1.83 ± 0.24	1.1—3.0
Chlorides, mmol/L	110.7 ± 5.14	117.1 ± 4.62	107—126

* confidence level $p \leq 0.05$ in relation to the control

However, kartisilan therapy had positive changes in a number of biochemical blood constants. The recorded hyperproteinemia by day 60 of the study significantly decreased by 25.4 %, which against the background of an increase in the levels of urea and creatinine, may indicate a decrease in inflammatory reactions in the primary alteration zone and activation of protein metabolism.

The alkaline phosphatase activity increased by 1.6 times ($p \leq 0.05$), while its increase occurred within the normal values, which excluded the development of pathology from the hepatobiliary system. On the contrary, such a shift is to a greater extent due to an increase in the "bone" isoenzyme than the total activity of ALP, which is confirmed by its direct correlation with the total calcium indicator, the level of which increased by 13.6 % during the experiment. Correlations of this type indicate the restoration of the cellular matrix of bone tissue and the efficacy of the therapy in dogs with the drug kartisilan. Other biochemical indicators, in particular the levels of bilirubin, glucose and cholesterol were recorded within the normal range.

Clinical observation during the treatment and its results revealed a decrease in lameness, restoration of support on the limb and the absence of pain during palpation in animals. The dogs showed an increase in general activity, recorded by such indicators as the ability to get up from a lying position, walk and run, and go down an inclined surface. Joint mobility and functionality improved, flexion and extension angles changed, muscle atrophy decreased and the perimeter of the hind limbs increased. X-ray images taken on day 60 of therapy showed no signs of progression of dysplastic changes. A pronounced congruence of the acetabulum with the femoral head was established, allowing for a more uniform distribution of the load on the hip joint, a narrowing of the joint space was observed, as well as restoration of the articular cartilage and acetabular labrum due to the formation of a new articular surface. The lateral projection of the femur, in particular its proximal epiphysis, has distinct outlines and rounded ends. The joint space is narrower and deeper.

The above changes are associated with the action of the components of the drug, which improves metabolism, in particular promotes the absorption of phosphorus by the body's cells, stimulates hematopoiesis, increasing erythropoiesis, enhances tissue growth, as well as bone density and regulates bone mineralization. The process of calcium mobilization from bone tissue and collagen synthesis also improves, which is necessary to create optimal conditions for skeletal restoration. We associate the latter facts with a temporary violation of the calcium and phosphorus ratio.

The drug also has a chondroprotective effect, enhances metabolic processes in hyaline and fibrous cartilage, simultaneously inhibits enzymes that cause degradation of articular cartilage, stimulates the production of proteoglycans by chondrocytes. It helps to reduce the release of inflammatory mediators and pain factors into the synovial fluid, suppresses the secretion of leukotrienes and prostaglandins. It helps to restore the joint capsule and cartilaginous surfaces of the joints, normalizes the production of synovial fluid.

CONCLUSION

Thus, the data obtained in this study confirm the therapeutic efficacy of kartisilan in case of hip dysplasia in dogs. The drug helps to reduce inflammation in the area of the affected joint, stimulate reparative processes in bone and cartilaginous tissue, eliminate clinical signs of the disease and improve the life quality of animals.

REFERENCES

1. Diseases of the joints and musculoskeletal system in shepherd dogs of different breeds / P. I. Ukolov, K. Yu. Karusheva, O. G. Sharaskina, T. Sh. Kuznetsova // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine). — 2017. — No. 2. — P. 95—98.

2. *Mitin V. N.* X-ray diagnosis of hip dysplasia in dogs / V. N. Mitin, Yu. I. Fillipov, V. A. Lukyanovskiy [etc.] // — 2000. — M.: "Aquarium LTD" — P. 32.

3. Operative surgery in animals / B. S. Semenov, V. N. Videnin, A. Yu. Nechaev [et al.]. — 3rd ed., suppl. — St. Petersburg: Lan, 2023. — 704 p. ISBN 978_5_507_46284_1

4. *Orobets V. A.* Detection of hip dysplasia in dogs using computed radiography / V. A. Orobets, I. I. Letov, D. Yu. Derkachev // Veterinariya Kubani (Veterinary science of Kuban). — 2012. — No. 5. — P. 10—13.

5. *Ponosov S. V.* Frequency of occurrence of joint dysplasia in small domestic animals / S. V. Ponosov // Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Bulletin of Orenburg State Agrarian University). — 2020. — No. 4(84). — P. 221—224. EDN SQNNMW.

6. Resection of the femoral head as a method for treating hip dysplasia / M. V. Inzhuvatova, K. O. Novikova, T. E. Vlasova [et al.] // Mezhdunarodnyy studencheskiy nauchnyy vestnik (International Student Scientific Bulletin). — 2016. — No. 4—3. — P. 351—352.

7. *Semernev E. V.* Standard methods for diagnosis, treatment and prevention of hip dysplasia. Morphological changes in bone tissue in case of dysplasia / E. V. Semernev // Molodezh i nauka (Youth and Science). — 2016. — No. 2. — P. 68.

8. *Timofeeva O. A.* Selection against hip dysplasia / O. A. Timofeeva // Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Bulletin of Michurinsk State Agrarian University). — 2020. — No. 1(60). — P. 194—198. EDN OQGHMI.

9. *Timofeeva O. A.* Role of selection in reducing the incidence of hip dysplasia in dogs / O. A. Timofeeva // Vestnik agrarnoy nauki (Bulletin of Agrarian Science). — 2020. — No. 1(82). — P. 169—178. http://dx.doi.org/10.15217/48484

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS
M. P. Semenenko — Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor, Head of the Department;
D. P. Vinokurova — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;
K. A. Zheleznyakova — Candidate of Economic Sciences, Senior Scientific Associate;
V. Yu. Borodin — Postgraduate Student.

The article was submitted 15.01.2025.

СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ, ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

Научная статья
УДК 619:612.62:636.4

МИКРОБИОТА ТЕЧКОВОЙ СЛИЗИ СВИНОМАТОК ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

Андрей Викторович Филатов[*✉], **Даниил Николаевич Иванов**[**]

[*, **]*Вятский государственный агротехнологический университет, Киров, Россия*
[*]*Институт агробиотехнологий имени А. В. Журавского Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, Россия, fav6819@yandex.ru*✉
[*]*https://orcid.org/0000-0003-4557-844X*
[**]*https://orcid.org/0009-0009-5946-5404*

Аннотация. Микробиоценоз влагалища оказывает ведущее влияние на репродуктивное здоровье маточного поголовья. Цель данного исследования заключалась в представлении характеристики микробиоты течковой слизи свиноматок в стадию возбуждение полового цикла на фоне использования пробиотического средства ЛикваФид. Объектом исследования являлись поместные свиноматки F1 в стадию возбуждения полового цикла и полученная от них течковая слизь. Взятие течковой слизи проводили у животных опытной и контрольной групп. Свиноматки опытной группы с момента постановки на опорос и в течение всего периода лактации получали пробиотическое средство ЛикваФид из расчета 50 г на 1 т питьевой воды, а свиноматки контрольной группы — питьевую воду без пробиотика. Полимеразную цепную реакцию осуществляли на амплификаторе ДТ Lite-4 в режиме, рекомендованном производителем для набора «Фемофлор».

Анализ образцов течковой слизи свидетельствует о наличии биологического разнообразия микробного сообщества в нем у всего маточного поголовья находящегося в стадии возбуждения полового цикла. Путем изучения состава микробиоты течковой слизи выявили, что использование свиноматкам ЛикваФид сопровождается увеличением в ней численного представительства нормофлоры рода *Lactobacillus spp.*, облигатно-анаэробных бактерий рода *Prevotella spp., Porphyromonas spp., Lachnobacterium spp., Clostridium spp., Eubacterium spp., Sneathia spp., Leptotrichia spp., Fusobacterium spp.* и факультативно-анаэробные микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae,* рода *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.*

Ключевые слова: свиноводство, маточное поголовье, течковая слизь, микробиота, ЛикваФид, ПЦР в реальном времени

В последние годы наблюдается рост числа публикуемых статей, связанных с молекулярно-генетическими исследованиями микробиома у свиней. Что касается свиноматок, то исследования микробиома в основном сосредоточены на желудочно-кишечном тракте, а оценка репродуктивной системы носит ограниченный характер.

Микробиота влагалища у здоровых свиноматок, определяемая культуральными методами, включает ассоциацию аэробных и анаэробных бактерий, таких как *Streptococcus* spp., *E.coli*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. и *Actinobacillus* spp. [1, 2].

При оценке микробиоценоза влагалища у коммерческих свинок, основанной на выявлении и идентификации микробной ДНК, превалирующим выявлялся тип *Firmicutes* основные сообщества которого принадлежат *Clostridium, Streptococcus, Lactobacillus, Bacillus* и неклассифицированному роду *Fusobacteriaceae* [3]. В микробиоте влагалища Черной свиньи Чеджу *Bacteroidetes* доминировал на уровне типа, в отличие от предыдущих сообщениях по другим породам свиней [4]. Основные представители микробной среды влагалища на уровне рода относились к *Clostridium, Bacteroides, Prevotella,*

Campylobacter, Streptococcus, Peptostreptococcus, Lactobacillus, Escherichia, Bacillus, Peptoniphilus.

В литературе имеются предположения о существовании связи между микробным сообществом, присутствующем в кишечнике, и в репродуктивном тракте [5]. Наиболее распространенными типом в желудочно-кишечном тракте свиноматок были *Firmicutes, Bacteroidetes u Spirochaetes*, а во влагалище — *Firmicutes, Proteobacteria* и *Bacteroidetes*. Проксимальная микробиота толстой кишки и влагалища имеет общие черты родов *Clostridium, Lactobacillus* и *Clostridiales* [6]. Кишечная и вагинальная микробиота играют важную роль в восстановлении половой цикличности у свиноматок. Увеличение численности в образцах фекалий рода *Lactobacillus spp.* и *Prevotella spp.* связаны с проявлением феномена течки у маточного поголовья свиней, которые регулируют биосинтез эстрогена в организме [4, 7].

Введение свиньям пробиотиков напрямую влияет на состав микробного сообщества желудочно-кишечного тракта, особенно в проксимальном отделе толстой кишки, где медленнее время транзита содержимого, что способствует лучшей колонизации микроорганизмами [8, 9]. Также в исследованиях показано, что использование во время супоросности и в период лактации маточному поголовью свиней пробиотического средства на основе апатогенных бактерий рода *Bacillus* способствует коррекции микробного сообщества во влагалище за счет восстановления количественного состава представителей индигенной нормофлоры и снижения качественного и количественного состава патогенной и условно-патогенной микрофлоры. На этом фоне у животных отмечается снижение риска проявления воспалительных процессов в репродуктивных органах, что благоприятно отражается на жизнеспособности приплода, восстановлении половой цикличности и эффективности осеменения [10]. Следовательно, изменение в микробиоценозе на одном участке тела имеет потенциальное воздействие на другой или другие участки с преобразованием там микробного сообщества.

Цель работы — дать характеристику микробиоты течковой слизи свиноматок в стадию возбуждение полового цикла на фоне использования пробиотического средства ЛикваФид.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены в молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ» и крупном свиноводческом комплексе. Объектом исследования являлись поместные свиноматки F1 в стадию возбуждения полового цикла и полученная от них течковая слизь. В ходе проведения эксперимента взятие биологического материала проводилось от свиноматок, произвольно выбранных из опытной и контрольной группы по 6 животных в каждой. Различая между группами состояло в том, что животные опытной группы с момента постановки на опорос (5 дней) и в течение всего периода лактации (28 дней) получали пробиотическое средство ЛикваФид из расчета 50 г на 1 т питьевой воды, а свиноматки контрольной группы — питьевую воду без пробиотика.

Детектирование конкретных микроорганизмов в содержимом течковой слизи свиноматок проводили с помощью высокочувствительного метода количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR). Анализ проводился с использованием амплификатора ДТ Lite-4, произведенного компанией ООО «НПО ДНК-Технология». Детекция амплифицированной ДНК осуществлялась с помощью флуоресцентных зондов, включенных в состав набора реагентов «Фемофлор», также разработанного ООО «НПО ДНК-Технология».

Полученные данные амплификации обработаны методом вариационной статистики на достоверность различия сравниваемых показателей в программе Microsoft Excel с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Молекулярно-генетическая характеристика течковой слизи свиноматок показана в таблице 1. Анализ образцов репродуктивного материала свидетельствует о наличии биологического разнообразия микробного сообщества в нем у всего маточного поголовья находящегося в стадии возбуждения полового цикла, среди которого были идентифицированы как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы.

Общая микробная масса между исследуемыми группами животных не имела достоверных различий. Вместе с тем, общее количество бактерий в подопытной группе составило $10^{5,71}$, что на $10^{5,42}$ больше, чем в контрольной группе. По-видимому, такая концентрация геномов по результатам исследования микробиоценоза характерна для нормального течения послеотъемного периода у свиноматок. Во всех образцах содержимого, подвергавшегося исследованию, нами не были выявлены

возбудители микоплазменной урогенитальной инфекции, а также бактерии *Atopobium vaginae*, которые часто ассоциируются с развитием у женщин бактериального вагиноза [11].

Таблица 1

Концентрация геномов $1 \cdot 10^X$/г в течковой слизи свиноматок (n = 6)

Группа микроорганизмов	Группа		Разница между группами	Достоверность (P)
	опытная	контрольная		
Общая микробная масса	5,71 ± 4,91	5,39 ± 5,03	5,42	н/д
Нормофлора				
Lactobacillus spp.	4,41 ± 3,34	4,08 ± 3,58	4,14	0,01
Факультативно-анаэробные микроорганизмы				
сем. *Enterobacteriaceae*	4,23 ± 3,44	3,78 ± 3,50	4,04	0,02
Streptococcus spp.	4,32 ± 3,78	3,13 ± 2,92	4,30	0,008
Staphylococcus spp.	3,33 ± 2,02	2,82 ± 2,62	3,17	0,006
Облигатно-анаэробные микроорганизмы				
Prevotella spp. и Porphyromonas spp.	5,35 ± 4,48	4,38 ± 3,70	5,31	0,001
Eubacterium spp.	4,98 ± 4,31	4,39 ± 3,91	4,85	0,009
Sneathia spp. + Leptotrichia spp. + Fusobacterium spp.	4,48 ± 3,96	3,03 ± 2,52	4,47	0,01
Megasphaera spp. + Veillonella spp. + Dialister spp.	4,55 ± 3,93	4,83 ± 4,62	–4,46	н/д
Lachnobacterium spp.и Clostridium spp.	5,15 ± 4,27	4,92 ± 4,56	4,77	н/д
Mobiluncus spp. + Corynebacterium spp.	4,47 ± 3,16	3,96 ± 3,54	4,31	0,0002
Peptostreptococcus spp.	4,10 ± 3,78	4,22 ± 3,69	–3,58	н/д
Atopobium vaginae	< п.д.о	< п.д.о	—	—
Дрожжеподобные грибы				
Candida spp.	3,67 ± 3,22	2,64 ± 2,44	3,63	0,03
Микоплазмы (качественный анализ)				
Mycoplasma + Ureaplasma	< п.д.о.	< п.д.о.	—	—

Численность рода *Lactobacillus spp*. в образцах течковой слизи свиноматок опытной группы была выше на $10^{4,14}$ ($P < 0,01$) по сравнению со сверстницами контрольной группы. В гуманной медицине широко известна роль лактобацилл в обеспечении барьерной функции, продукции антибиотикоподобных веществ, молочной кислоты и перекиси водорода, что значительно снижает водородный показатель и препятствует размножению условно-патогенных микроорганизмов во влагалище [12]. Также установлена эстрогензависимая способность данных молочнокислых бактерий к адгезии на эпителиальных клетках влагалища, когда непосредственно перед овуляцией уровень эстрогенов достигает максимума способствуя увеличению численности лактобацилл [13]. Это позволяет в нашем эксперименте косвенно предполагать о лучшем восстановлении репродуктивной функции у свиноматок при использовании им в период лактации пробиотического комплекса ЛикваФид.

На сегодняшний день большинство сравнительных исследований показывают, что млекопитающие со схожим образом жизни и эволюционной историей содержат схожие микробиомы на идентичных участках тела, как по содержащимся в них бактериальным таксонам, так и по функциям, которые они обеспечивают [14, 15]. Одним важным исключением из этой закономерности является микробиом влагалища, где люди демонстрируют поразительные различия в составе сообщества по сравнению с другими млекопитающими [16, 17, 18]. В частности, в микробиоме влагалища человека преобладают *Lactobacillus* spp., которые обычно составляют более 70 % резидентных бактерий у женщин по сравнению с менее 1 % у других млекопитающих [19, 20]. По результатам исследований микробиома влагалища у крупного рогатого скота представители лактобациллярной микрофлоры не выявлялись традиционными микробиологическими методами [21] и реакцией ПЦР в реальном времени [22]. В нашем исследовании несмотря на индентификацию рода *Lactobacillus spp.* в течковой слизи у свиноматок их количество в структуре микробиома опытной и контрольной группы составило всего 3,98 и 4,85 %. Следовательно, лактобациллы не является доминирующими микроорганизмами в биотопе здоровых свиноматок.

Наиболее многочисленными в микробном сообществе течковой слизи свиноматок идентифицировали представителей облигатно-анаэробных микроорганизмов. В биологическом материале, полученном от маточного поголовья после применения ЛикваФид, регистрировали большее количество бактерий рода *Prevotella spp. и Porphyromonas spp.* на $10^{5,31}$ ($P < 0,01$), *Lachnobacterium spp.и Clostridium spp.* — на $10^{4,77}$, *Eubacterium spp.* — на $10^{4,85}$ ($P < 0,001$), *Sneathia spp., Leptotrichia spp., Fusobacterium spp.* — на $10^{4,47}$ ($P < 0,01$), *Mobiluncus spp., Corynebacterium spp.* — на $10^{4,31}$ ($P < 0,001$) и меньшую численность *Megasphaera spp., Veillonella spp., Dialister spp.* — на $10^{4,46}$ и *Peptostreptococcus spp.* — на $10^{3,58}$ по сравнению с контрольными сверстницами. В структуре микробного сообщества отмечались значительные различия между группами по данным бактериям. Так, в опытной группе бактероиды составили 35,13 %, эубактерии — 14,77 % и фузобактерии — 4,73 % тогда как в интактной группе — 9,71, 9,84 и 0,43 %, соответственно. В контрольной группе наиболее представительными были клостридии 33,98 %, лактат-утилизирующие бактерии 27,36 % и пептострептококки 6,73 %. Эти бактерии в опытной группе составляли 22,21, 5,58 и 1,99 %, соответственно.

Присутствие лактобацилл может не быть обязательным условием для здоровой среды во влагалище, поскольку у некоторых женщин неизменно низкое содержание лактобацилл и pH влагалища выше 4,5, но они не испытывают негативных симптомов, связанных с бактериальным вагинозом [23].

Это объяснение также может иметь отношение к здоровью свиноматки, где позитивную роль в физиологическом микробиоценозе играют представители облигатно-анаэробных микроорганизмов. Наличие в микробиоме влагалища родов *Campylobacter, Bacteroides, Porphyromonas, Lachnospiraceae, Prevotella* и *Phascolarctobacterium* позволило дифференцировать свиноматок с высокой и низкой производительностью опороса, что указывает на то, что они могут служить потенциальными биомаркерами [7]. Анализируются образцы влагалища свиноматок на уровне рода, было обнаружено, что *Bacillus* и *Paenibacillus* были относительно более многочисленны у здоровых свиноматок, в то время как *Escherichia-Shigella* и *Bacteroides* были относительно более многочисленны у свиноматок, пораженных эндометритом [24].

Факультативно-анаэробные микроорганизмы были наиболее многочисленными в опытной группе. У животных данной группы количество бактерий сем. *Enterobacteriaceae* было больше на $10^{4,04}$ ($P < 0,05$), рода *Streptococcus spp.* на $10^{4,30}$ ($P < 0,001$) и *Staphylococcus spp.* на $10^{3,37}$ ($P < 0,01$), чем у контрольных свиноматок. В структуре микробиоценоза течковой слизи представители данных микроорганизмов имели не высокое содержание и имели не значительное различие между исследуемыми группами. Так, в опытной и контрольной группе энтеробактерии составляли 2,63 и 2,43 %, стрептококки — 3,30 и 0,54 %, стафилококки — 0,33 и 0,27 %.

В группе животных при применении ЛикваФид количество дрожжеподобных грибов рода *Candida spp.* было больше на $10^{3,63}$ ($P < 0,05$) по сравнению с интактными свиноматками. В структуре микробного сообщества данные микроорганизмы составили 0,72 и 0,18 %, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробиом течковой слизи свиноматок полученной в стадию возбуждения полового цикла представлен широким спектром биологического разнообразия микробного сообщества. Общая

микробная масса в биологическом материале составляет $10^{5,39}$—$10^{5,71}$ в грамме. Применение пробиотического средства ЛикваФид не сопровождается достоверными различиями в концентрации геномов общей бактериальной массы ДНК. При сравнительной оценке с использованием тест-системы выявлено, что на фоне применения пробиотика в течковой слизи отмечается увеличение численного состава представителей нормофлоры рода *Lactobacillus spp.,* облигатно-анаэробных бактерий рода *Prevotella spp., Porphyromonas spp., Lachnobacterium spp., Clostridium spp., Eubacterium spp., Sneathia spp., Leptotrichia spp., Fusobacterium spp.* и факультативно-анаэробные микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae, рода Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.*

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Maes D, Verdonck M, de Kruif A (1999) Vaginal microecology and vulval discharge in swine. In: Heidt PJ, Carter PB, Rusch V, van der Waaij D (eds) Old Herborn University seminar monograph 12: vaginal flora in health and disease. Herborn Litterae, Herborn-Dill, Germany, pp 39—50. http://www.old-herborn-university.de/publications/books/OHUni_book_12_article_4.pdf.

2. Bara M, McGowan M, O'Boyle D, Cameron R (1993) A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stages of the reproductive cycle. Aust Vet J 70:256—259. https://doi.org 10.1111/j.1751—0813.1993.tb08043.x

3. *Luque A. T.* et al. Vaginal bacterial diversity from healthy gilts and pregnant sows subjected to natural mating or artificial insemination //Research in Veterinary Science. — 2021. — Т. 140. — С. 26—37. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.023

4. *Bugenyi A. W.*, Lee, MR., Choi, YJ. et al. Oropharyngeal, proximal colonic, and vaginal microbiomes of healthy Korean native black pig gilts. BMC Microbiol 23, 3 (2023). https://doi.org/10.1186/s12866-022-02743-3

5. *Qi X.*; Yun, C.; Pang, Y.; Qiao, J. The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system. Gut Microbes 2021, 13, 1894070. https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1894070

6. *Zhang J.*; Liu, M.; Ke, S.; Huang, X.; Fang, S.; He, M.; Fu, H.; Chen, C.; Huang, L. Gut and Vagina Microbiota Associated with Estrus Return of Weaning Sows and Its Correlation with the Changes in Serum Metabolites. Front. Microbiol. 2021, 12, 690091. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.690091

7. Sanglard LP, Schmitz-Esser S, Gray KA, Linhares DCL, Yeoman CJ, Dekkers JCM, Niederwerder MC, Serão NVL. Vaginal microbiota diverges in sows with low and high reproductive performance after porcine reproductive and respiratory syndrome vaccination. Sci Rep. 2020; 20:3046. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59955-8

8. *Филатов А. В.* Анализ изменений микробиома толстого отдела кишечника свиноматок и поросят / А. В. Филатов, Д. Н. Иванов, А. Ф. Сапожников // Аграрная наука. — 2024. — № 11. — С. 46—50. — https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-388-11-46-50. — EDN KHZXWN

9. *Филатов А. В.* Микробиом кишечника поросят в период доращивания при использовании пробиотика «ЛикваФид» / А. В. Филатов, А. В. Якимов, А. И. Бахтеева // Свиноводство. — 2023. — № 1. — С. 56—59. — https://doi.org 10.37925/0039-713X-2023-1-56-59. — EDN ASMLEX

10. Роль коррекции микробиоты половых путей свиноматок в реализации репродуктивного потенциала / Ю. Н. Бригадиров, В. Н. Коцарев, И. Т. Шапошников [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2018. — № 2. — С. 56—58. — EDN USTVNS.

11. Association of Atopobium vaginae, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis / *Ferris M. J.* [et al.] // BMC Infect. Dis. — 2004. — Vol. 13. — P. 4—5.

12. *Кира Е. Ф.* Бактериальный вагиноз. — М.: МИА, 2012. — 472 с. [Kira EF. Bacterial'nyi vaginoz. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo; 2012.

13. *Eschenbach D. A.*, Thwin, S. S., Patton, D. L., Hooton, T. M., Stapleton, A. E., Agnew, K., et al. (2000). Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. Clin. Infect. Dis. 30, 901—907. https://doi.org 10.1086/313818

14. *Ley R. E.*, Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., et al. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. Science 320, 1647—1651. https://doi.org 10.1126/Science.1155725

15. *Delsuc F.*, Metcalf, J. L., Wegener Parfrey, L., Song, S. J., Gonzalez, A., and Knight, R. (2014). Convergence of gut microbiomes in myrmecophagous mammals. Mol. Ecol. 23, 1301—1317. https://doi.org 10.1111/mec.12501

16. *Spear G. T.*, Kersh, E., Guenthner, P., Vishwanathan, S. A., Gilbert, D., Zariffard, M. R., et al. (2012). Longitudinal assessment of pigtailed macaque lower genital tract microbiota by 454-sequencing reveals dissimilarity to the genital microbiota of healthy humans. AIDS Res. Hum. Retroviruses 28, 1244—1249. https://doi.org 10.1089/aid.2011.0382

17. *Swartz J. D.*, Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R. W., et al. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. Front. Vet. Sci. 1:19. https://doi.org 10.3389/fvets.2014.00019

18. *Yildirim S.*, Yeoman, C. J., Janga, S. C., Thomas, S. M., Ho, M., Leigh, S. R., et al. (2014). Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal Lactobacillus dominance. Int. Soc. Microbial. Ecol. 8, 2431—2444. https://doi.org 10.1038/ismej.2014.90

19. *Mirmonsef P.*, Hotton, A. L., Gilbert, D., Gioia, C. J., Maric, D., Hope, T. J., et al. (2016). Glycogen levels in undiluted genital fluid and their relationship to Vaginal pH, Estrogen, and Progesterone. PLoS ONE11: e153553. https://doi.org 10.1371/journal.pone.0153553

20. *Spear G. T.*, French, A. L., Gilbert, D., Zariffard, M. R., Mirmonsef, P., Sullivan, T. H., et al. (2014). Human alpha-amylase present in lower genital tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by Lactobacillus. J. Infect. Dis. 210, 1019—1028. https://doi.org 10.1093/infdis/jiu231

21. *Варганов А. И.* Профилактика симптоматического и искусственно-приобретенного бесплодия у коров и телок: диссертация … доктора ветеринарных наук: 16.00.07. — Киров, 1987. — 436 с.

22. *Николаев С. В.* Характеристика влагалищного микробиома у коров при нормальном и патологическом течении послеродового периода / С. В. Николаев, Е. А. Бессолицына // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2024. — № 12. — С. 77—87.

23. *Ravel J.*, Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., et al. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 4680—4687. https://doi.org /10.1073/Pnas.1002611107

24. Wang J, Li C, Nesengani LT, Gong Y, Zhang S, *Lu W.* Characterization of vaginal microbiota of endometritis and healthy sows using high-throughput pyrosequencing of 16S rRNA gene. Microb Pathog. 2017;111:325—330. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.030

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. В. Филатов — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры разведения, кормления и частной зоотехнии, ведущий научный сотрудник;

Д. Н. Иванов — аспирант.

Статья поступила в редакцию 29.01.2025.

AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION, DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

Original article
UDC 619:612.62:636.4

MICROBIOTA OF SOWS' ESTRUS MUCUS AFTER THE USE OF A PROBIOTIC PREPARATION

Andrey Viktorovich Filatov[*]✉, **Daniil Nikolaevich Ivanov**[**]

[*, **]*Vyatka State Agrotechnological University, Kirov, Russia*
[*]*Institute of Agrobiotechnologies named after A. V. Zhuravskiy of Komi Research Center of the Ural Branch of the RAS, Syktyvkar, Russia, fav6819@yandex.ru*✉
[*]*https://orcid.org/0000-0003-4557-844X*
[**]*https://orcid.org/0009-0009-5946-5404*

Abstract. Vaginal microbiocenosis has a leading effect on the reproductive health of the breeding stock. The objective of this study was to present the characteristics of the estrus mucus microbiota of sows at the stage of sexual cycle arousal against the background of the use of the probiotic agent LikvaFid. The object of the study was F1 sows at the stage of sexual cycle arousal and the estrus mucus obtained from them. Estrus mucus was collected from the animals of the experimental and control groups. The sows of the experimental group received the probiotic agent LikvaFid at a rate of 50 g per 1 ton of drinking water from the moment of farrowing and throughout the lactation period, and the sows of the control group received drinking water without the probiotic. The polymerase chain reaction was carried out on a DT Lite-4 amplifier in the mode recommended by the manufacturer for the Femoflor kit.

The analysis of the estrus mucus samples indicates the presence of biological diversity of the microbial community in it in the entire breeding stock at the stage of sexual cycle arousal. By studying the composition of the microbiota of estrus mucus, it has been revealed that the use of LikvaFid in sows is accompanied by an increase in the numerical representation of the normoflora of the genus *Lactobacillus spp.*, obligate anaerobic bacteria of the genus *Prevotella spp*., *Porphyromonas spp*., *Lachnobacterium spp*., *Clostridium spp*., *Eubacterium spp*., *Sneathia spp*., *Leptotrichia spp*., *Fusobacterium spp*. and facultative anaerobic microorganisms of the family *Enterobacteriaceae*, the genus *Streptococcus spp*. and *Staphylococcus spp*.

Keywords: pig breeding, sows, estrus mucus, microbiota, LikvaFid, real-time PCR

In recent years, there has been an increase in the number of published articles related to molecular genetic studies of the microbiome in pigs. In sows, microbiome studies have mainly focused on the gastrointestinal tract, and the assessment of the reproductive system is limited.

The vaginal microbiota of healthy sows, as determined by culture methods, includes an association of aerobic and anaerobic bacteria such as *Streptococcus spp., E. coli, Staphylococcus spp., Corynebacterium spp., Micrococcus spp*. and *Actinobacillus spp.* [1, 2]. In the assessment of the vaginal microbiocenosis of commercial gilts based on the detection and identification of microbial DNA, the phylum *Firmicutes* was found to be predominant, with major communities belonging to *Clostridium, Streptococcus, Lactobacillus, Bacillus* and an unclassified genus *Fusobacteriaceae* [3]. In the vaginal microbiota of the Jeju Black pig, *Bacteroidetes* was dominant at the phylum level, in contrast to previous reports for other pig breeds [4]. The main representatives of the vaginal microbial environment at the genus level were *Clostridium, Bacteroides, Prevotella, Campylobacter, Streptococcus, Peptostreptococcus, Lactobacillus, Escherichia, Bacillus, Peptoniphilus*.

There are suggestions in the literature about the existence of a connection between the microbial community present in the intestine and in the reproductive tract [5]. The most common phyla in the gastrointestinal tract of sows were *Firmicutes, Bacteroidetes* and *Spirochaetes*, and in the vagina — *Firmicutes,*

Proteobacteria and *Bacteroidetes*. The proximal microbiota of the colon and vagina have common features of the genera *Clostridium, Lactobacillus* and *Clostridiales* [6]. Intestinal and vaginal microbiota play an important role in the restoration of sexual cycles in sows. An increase in the number of *Lactobacillus spp.* and *Prevotella spp*. in fecal samples is associated with the manifestation of the estrus phenomenon in breeding pigs, which regulate estrogen biosynthesis in the body [4, 7].

The administration of probiotics to pigs directly affects the composition of the microbial community of the gastrointestinal tract, especially in the proximal colon, where the transit time of the contents is slower, which promotes better colonization by microorganisms [8, 9]. The studies have also shown that the use of a probiotic agent based on apathogenic bacteria of the genus *Bacillus* in the breeding stock of pigs during gestation and lactation helps to correct the microbial community in the vagina by restoring the quantitative composition of representatives of the indigenous normal flora and reducing the qualitative and quantitative composition of pathogenic and opportunistic microflora. Against this background, animals have a reduced risk of the inflammatory processes development in the reproductive organs, which has a beneficial effect on the viability of the offspring, restoration of the sexual cycle and the efficacy of insemination [10].

Consequently, a change in the microbiocenosis in one area of the body has a potential effect on another or other areas with the transformation of the microbial community there.

The objective of the work is to characterize the microbiota of the estrus mucus of sows at the stage of sexual cycle arousal against the background of the use of the probiotic agent LikvaFid.

MATERIAL AND METHODS

The studies were conducted at the Molecular and Genetic Laboratory of BIOTROF LLC and a large pig breeding complex. The object of the study was local F1 sows at the stage of sexual cycle arousal and the estrus mucus obtained from them. During the experiment, biological material was obtained from sows randomly selected from the experimental and control groups of 6 animals each. The difference between the groups was that the animals of the experimental group received the probiotic agent LikvaFid from the moment of farrowing (5 days) and throughout the lactation period (28 days) at a rate of 50 g per 1 ton of drinking water, and the sows of the control group — drinking water without a probiotic.

The detection of specific microorganisms in the contents of the estrus mucus of sows was carried out using a highly sensitive quantitative polymerase chain reaction in real time (qPCR). The analysis was carried out using the DT Lite-4 amplifier, manufactured by R&D enterprise DNA-Technology LLC. The detection of amplified DNA was carried out using fluorescent probes included in the Femoflor reagent kit, also developed by R&D enterprise DNA-Technology LLC.

The obtained amplification data were processed by the method of variation statistics for the reliability of the difference of the compared indicators in the Microsoft Excel program using the Student criterion.

STUDY RESULTS

The molecular genetic characteristics of the estrus mucus of sows are shown in Table 1. The analysis of reproductive material samples indicates the presence of biological diversity of the microbial community in it in the entire breeding stock at the stage of sexual cycle arousal, among which both aerobic and anaerobic microorganisms were identified.

The total microbial mass between the studied groups of animals did not differ significantly. At the same time, the total number of bacteria in the experimental group was $10^{5.71}$, which was by $10^{5.42}$ more than in the control group. Apparently, such a concentration of genomes, according to the results of the microbiocenosis study, is characteristic of the normal course of the post-weaning period in sows. In all samples of the contents subjected to the study, we did not detect pathogens of mycoplasma urogenital infection, as well as *Atopobium vaginae* bacteria, which are often associated with the bacterial vaginosis development in women [11].

The number of the genus *Lactobacillus spp.* in samples of estrus mucus of the sows in the experimental group was by $10^{4.14}$ ($P < 0.01$) higher, compared to the peers in the control group. In human medicine, the role of lactobacilli in providing a barrier function, producing antibiotic-like substances, lactic acid and hydrogen peroxide, which significantly reduces the pH and prevents the proliferation of opportunistic microorganisms in the vagina, is widely known [12]. The estrogen-dependent ability of these lactic acid bacteria to adhere to vaginal epithelial cells has also been established, when immediately before ovulation the estrogen level reaches a maximum, contributing to an increase in the number of lactobacilli [13]. This allows us to indirectly assume in our experiment a better restoration of reproductive function in sows when using the probiotic complex LikvaFid during lactation. To

date, most comparative studies show that mammals with a similar lifestyle and evolutionary history contain similar microbiomes in identical areas of the body, both in terms of the bacterial taxa they contain and the functions they provide [14, 15].

One important exception to this pattern is the vaginal microbiome, where humans exhibit striking differences in community composition, compared to other mammals [16—18]. In particular, the human vaginal microbiome is dominated by *Lactobacillus spp.*, which typically comprise more than 70 % of resident bacteria in women, compared to less than 1 % in other mammals [19, 20]. In studies of the vaginal microbiome in cattle, lactobacillary microflora were not detected by traditional microbiological methods [21] and real-time PCR [22].

In our study, although *Lactobacillus spp.* were identified in the estrus mucus of sows, their abundance in the microbiome structure of the experimental and control groups was only 3.98 and 4.85 %. Therefore, lactobacilli are not the dominant microorganisms in the biotope of healthy sows.

Table 1

Concentration of $1 \cdot 10^X$/g genomes in estrus mucus of sows (n = 6)

Group of microorganisms	Group		Difference between groups	Reliability (P)
	Experimental	Control		
Total microbial mass	5.71 ± 4.91	5.39 ± 5.03	5.42	n/d
Normoflora				
Lactobacillus spp.	4.41 ± 3.34	4.08 ± 3.58	4.14	0.01
Facultative anaerobic microorganisms				
сем. *Enterobacteriaceae*	4.23 ± 3.44	3.78 ± 3.50	4.04	0.02
Streptococcus spp.	4.32 ± 3.78	3.13 ± 2.92	4.30	0.008
Staphylococcus spp.	3.33 ± 2.02	2.82 ± 2.62	3.17	0.006
Obligate anaerobic microorganisms				
Prevotella spp. и Porphyromonas spp.	5.35 ± 4.48	4.38 ± 3.70	5.31	0.001
Eubacterium spp.	4.98 ± 4.31	4.39 ± 3.91	4.85	0.009
Sneathia spp. + Leptotrichia spp. + Fusobacterium spp.	4.48 ± 3.96	3.03 ± 2.52	4.47	0.01
Megasphaera spp. + Veillonella spp. + Dialister spp.	4.55 ± 3.93	4.83 ± 4.62	–4.46	n/d
Lachnobacterium spp.и Clostridium spp.	5.15 ± 4.27	4.92 ± 4.56	4.77	n/d
Mobiluncus spp. + Corynebacterium spp.	4.47 ± 3.16	3.96 ± 3.54	4.31	0.0002
Peptostreptococcus spp.	4.10 ± 3.78	4.22 ± 3.69	–3.58	n/d
Atopobium vaginae	< p.d.o.	< p.d.o.	—	—
Yeast-like fungi				
Candida spp.	3.67 ± 3.22	2.64 ± 2.44	3.63	0.03
Mycoplasma (qualitative analysis)				
Mycoplasma + Ureaplasma	< p.d.o.	< p.d.o.	—	—

Among the most numerous in the microbial community of sow estrus mucus, there were identified the representatives of obligate anaerobic microorganisms. In the biological material obtained from the breeding stock after the use of LikvaFid, there was recorded a greater number of bacteria of the genus *Prevotella spp.* and *Porphyromonas spp.* by $10^{5.31}$ ($P < 0.01$), *Lachnobacterium spp.* and *Clostridium spp.* — by $10^{4.77}$, *Eubacterium spp.* — by $10^{4.85}$ ($P < 0.001$), *Sneathia spp., Leptotrichia spp., Fusobacterium spp.* — by $10^{4.47}$ ($P < 0.01$), *Mobiluncus spp., Corynebacterium spp*. — by $10^{4.31}$ ($P < 0.001$) and lower numbers of *Megasphaera spp., Veillonella spp., Dialister spp*. — by $10^{4.46}$ and *Peptostreptococcus spp.* — by $10^{3.58}$, compared to the control peers. In the structure of the microbial community, significant differences were noted between the groups for these bacteria. Thus, in the experimental group, bacteroides accounted for 35.13 %, eubacteria — 14.77 % and fusobacteria — 4.73 %, while in the intact group — 9.71, 9.84 and 0.43 %, respectively. In the control group, the most representative were clostridia 33.98 %, lactate-utilizing bacteria — 27.36 % and peptostreptococci — 6.73 %. These bacteria in the experimental group accounted for 22.21, 5.58 and 1.99 %, respectively.

The presence of lactobacilli may not be a prerequisite for a healthy vaginal environment, as some women have consistently low lactobacilli counts and vaginal pH above 4.5, but do not experience the negative symptoms associated with bacterial vaginosis [23]. This explanation may also be relevant to sow health, where obligate anaerobic microorganisms play a positive role in the physiological microbiocenosis. The presence of the genera *Campylobacter, Bacteroides, Porphyromonas, Lachnospiraceae, Prevotella* and *Phascolarctobacterium* in the vaginal microbiome allowed differentiation between sows with high and low farrowing performance, indicating that they may serve as potential biomarkers [7]. When vaginal samples from sows were analyzed at the genus level, it was detected that *Bacillus* and *Paenibacillus* were relatively more abundant in healthy sows, while *Escherichia-Shigella* and *Bacteroides* were relatively more abundant in the sows affected by endometritis [24].

Facultative anaerobic microorganisms were the most numerous in the experimental group. In the animals of this group, the number of bacteria of the family *Enterobacteriaceae* was greater by $10^{4.04}$ ($P < 0.05$), *Streptococcus spp*. — by $10^{4.30}$ ($P < 0.001$) and *Staphylococcus spp.* — by $10^{3.37}$ ($P < 0.01$) more than in the control sows. In the structure of the microbiocenosis of estrus mucus, representatives of these microorganisms had a low content and had insignificant differences between the studied groups. Thus, in the experimental and control groups, enterobacteria accounted for 2.63 and 2.43 %, streptococci — 3.30 and 0.54 %, staphylococci — 0.33 and 0.27 %. In the group of the animals administered LikvaFid, the number of yeast-like fungi of the genus *Candida spp.* was by $10^{3.63}$ ($P < 0.05$) higher, compared to the intact sows. In the structure of the microbial community, these microorganisms constituted 0.72 and 0.18 %, respectively.

CONCLUSION

The microbiome of the estrus mucus of sows obtained at the stage of sexual cycle arousal is represented by a wide range of biological diversity of the microbial community. The total microbial mass in the biological material is $10^{5.39}$—$10^{5.71}$ per gram. The use of the probiotic LikvaFid is not accompanied by reliable differences in the concentration of genomes of the total bacterial DNA mass. A comparative assessment using the test system revealed that against the background of the use of the probiotic, an increase in the number of representatives of the normoflora of the genus *Lactobacillus spp*., obligate anaerobic bacteria of the genus *Prevotella spp., Porphyromonas spp., Lachnobacterium spp., Clostridium spp., Eubacterium spp., Sneathia spp., Leptotrichia spp., Fusobacterium spp.* and facultative anaerobic microorganisms of the *Enterobacteriaceae family, Streptococcus spp. and Staphylococcus spp.* is noted in the estrus mucus.

REFERENCES

1. *Maes D, Verdonck M, de Kruif A* (1999) Vaginal microecology and vulval discharge in swine. In: Heidt PJ, Carter PB, Rusch V, van der Waaij D (eds) Old Herborn University seminar monograph 12: vaginal flora in health and disease. Herborn Litterae, Herborn-Dill, Germany, pp 39—50. http://www.old-herborn-university.de/publications/books/OHUni_book_12_article_4.pdf.

2. *Bara M, McGowan M, O'Boyle D, Cameron R* (1993) A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stages of the reproductive cycle. Aust Vet J 70:256—259. https://doi.org 10.1111/j.1751—0813.1993.tb08043.x

3. *Luque A. T. et al.* Vaginal bacterial diversity from healthy gilts and pregnant sows subjected to natural mating or artificial insemination //Research in Veterinary Science. — 2021. — V. 140. — P. 26—37. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.023

4. *Bugenyi A. W., Lee, MR., Choi, YJ. et al.* Oropharyngeal, proximal colonic, and vaginal microbiomes of healthy Korean native black pig gilts. BMC Microbiol 23, 3 (2023). https://doi.org/10.1186/s12866-022-02743-3

5. *Qi X.; Yun, C.; Pang, Y.; Qiao, J.* The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system. Gut Microbes 2021, 13, 1894070. https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1894070

6. *Zhang J.; Liu, M.; Ke, S.; Huang, X.; Fang, S.; He, M.; Fu, H.; Chen, C.; Huang, L.* Gut and Vagina Microbiota Associated with Estrus Return of Weaning Sows and Its Correlation with the Changes in Serum Metabolites. Front. Microbiol. 2021, 12, 690091. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.690091

7. *Sanglard LP, Schmitz-Esser S, Gray KA, Linhares DCL, Yeoman CJ, Dekkers JCM, Niederwerder MC, Serão NVL.* Vaginal microbiota diverges in sows with low and high reproductive performance after porcine reproductive and respiratory syndrome vaccination. Sci Rep. 2020; 20:3046. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59955-8

8. *Filatov A. V.* Analysis of changes in the microbiome of the large intestine of sows and piglets / A. V. Filatov, D. N. Ivanov, A. F. Sapozhnikov // Agrarnaya nauka (Agrarian science). — 2024. — No. 11. — P. 46—50. — https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-388-11-46-50. — EDN KHZXWN

9. *Filatov A. V.* Intestinal microbiome of piglets during the rearing period using the probiotic "LikvaFid" / A. V. Filatov, A. V. Yakimov, A. I. Bakhteeva // Svinovodstvo (Pig breeding). — 2023. — No. 1. — P. 56—59. — https://doi.org 10.37925/0039—713X-2023-1-56-59. — EDN ASMLEX

10. Role of correction of the microbiota of the genital tract of sows in the implementation of reproductive potential / Yu.N. Brigadirov, V. N. Kotsarev, I. T. Shaposhnikov [et al.] // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii (Normative-legal regulatory issues). — 2018. — No. 2. — P. 56—58. — EDN USTVNS.

11. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis / *Ferris M. J.* [et al.] // BMC Infect. Dis. — 2004. — Vol. 13. — P. 4—5.

12. *Kira E. F.* Bacterial vaginosis. — M.: MIA, 2012. — 472 p. [*Kira E. F.* Bakterialnyy vaginos. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo] 2012.

13. *Eschenbach D. A., Thwin, S. S., Patton, D. L., Hooton, T. M., Stapleton, A. E., Agnew, K., et al.* (2000). Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. Clin. Infect. Dis. 30, 901—907. https://doi.org 10.1086/313818

14. *Ley R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., et al.* (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. Science 320, 1647—1651. https://doi.org 10.1126/Science.1155725

15. *Delsuc F., Metcalf, J. L., Wegener Parfrey, L., Song, S. J., Gonzalez, A., and Knight, R.* (2014). Convergence of gut microbiomes in myrmecophagous mammals. Mol. Ecol. 23, 1301—1317. https://doi.org 10.1111/mec.12501

16. *Spear G. T., Kersh, E., Guenthner, P., Vishwanathan, S. A., Gilbert, D., Zariffard, M. R., et al.* (2012). Longitudinal assessment of pigtailed macaque lower genital tract microbiota by 454-sequencing reveals dissimilarity to the genital microbiota of healthy humans. AIDS Res. Hum. Retroviruses 28, 1244—1249. https://doi.org 10.1089/aid.2011.0382

17. *Swartz J. D., Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R. W., et al.* (2014). Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. Front. Vet. Sci. 1:19. https://doi.org 10.3389/fvets.2014.00019

18. *Yildirim S., Yeoman, C. J., Janga, S. C., Thomas, S. M., Ho, M., Leigh, S. R., et al.* (2014). Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal Lactobacillus dominance. Int. Soc. Microbial. Ecol. 8, 2431—2444. https://doi.org 10.1038/ismej.2014.90

19. *Mirmonsef P., Hotton, A. L., Gilbert, D., Gioia, C. J., Maric, D., Hope, T. J., et al.* (2016). Glycogen levels in undiluted genital fluid and their relationship to Vaginal pH, Estrogen, and Progesterone. PLoS ONE11: e153553. https://doi.org 10.1371/journal.pone.0153553

20. *Spear G. T., French, A. L., Gilbert, D., Zariffard, M. R., Mirmonsef, P., Sullivan, T. H., et al.* (2014). Human alpha-amylase present in lower genital tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by Lactobacillus. J. Infect. Dis. 210, 1019—1028. https://doi.org 10.1093/infdis/jiu231

21. *Varganov A. I.* Prevention of symptomatic and artificially acquired infertility in cows and heifers: thesis … Doctor of Veterinary Sciences: 16.00.07. — Kirov, 1987. — 436 p.

22. *Nikolaev S. V.* Characteristics of the vaginal microbiome in cows during the normal and pathological course of the postpartum period / S. V. Nikolaev, E. A. Bessolitsyna // Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya (Veterinary science, zootechnics and biotechnology). — 2024. — No. 12. — P. 77—87.

23. *Ravel J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., et al.* (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 4680—4687. https://doi.org /10.1073/Pnas.1002611107

24. *Wang J, Li C, Nesengani LT, Gong Y, Zhang S, Lu W.* Characterization of vaginal microbiota of endometritis and healthy sows using high-throughput pyrosequencing of 16S rRNA gene. Microb Pathog. 2017;111:325—330. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.030

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. V. Filatov — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Principal Scientific Associate;
D. N. Ivanov — Postgraduate Student.

The article was submitted 29.01.2025.

Научная статья
УДК 619[612.017:618.07:615.03]:636.4

ИММУННЫЙ СТАТУС СВИНОМАТОК ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ ПОСЛЕРОДОВЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПРОБИОТИКОМ «ПЕНТАПРОЛ» И ВЛИЯНИЕ ЕГО НА ИММУНИТЕТ У ПОРОСЯТ

Алексей Гаврилович Шахов[*]✉, Лариса Юрьевна Сашнина[**], Владимир Николаевич Коцарев[***], Ольга Алексеевна Манжурина[****], Ирина Владимировна Волкова[*****], Евгения Дмитриевна Боярина[******]

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, vnivipat@mail.ru✉
[*]https://orcid.org/0000-0002-6177-8858
[**]https://orcid.org/0000-0001-6477-6156
[***]https://orcid.org/0000-0002-9114-7176
[****]https://orcid.org/0000-0003-0147-8965
[*****]https://orcid.org/0000-0003-3911-7129
[******]https://orcid.org/0009-0007-1032-6089

Аннотация. В условиях промышленного свиноводческого комплекса изучено влияние профилактики послеродовых болезней у свиноматок пробиотиком «Пентапрол» на их иммунный статус и выращиваемых под ними поросят. Установлено, что применение препарата свиноматкам за 5 дней до опороса и в течение первой недели лактации, сопровождается повышением иммунного статуса у них и выращиваемых под ними поросят, проявляющимся активацией естественной гуморальной и клеточной защиты, специфического клеточного иммунитета, при увеличении у свиноматок содержания цитокинов, индуцирующих клеточный и гуморальный иммунитет, и снижении у поросят антигенной нагрузки на клетки-продуценты про- и противовоспалительных медиаторов.

Ключевые слова: свиноматки, поросята, пробиотик «Пентапрол», иммунный статус, цитокиновый профиль

У свиноматок с риском развития послеродовой патологии во вторую половину супоросности по сравнению с клинически здоровыми животными снижены лизоцимная и комплементарная активность сыворотки крови, содержание общих иммуноглобулинов, поглотительная функция фагоцитов и их функциональный резерв, но повышены уровень мелкодисперсных циркулирующих иммунных комплексов и их патогенность, что свидетельствует об угнетении гуморальной и клеточной защиты. Кроме того у них регистрируют количественный и качественный дисбаланс цитокинов [1].

Для повышения иммунного статуса организма рекомендованы фармакологические препараты природного, модифицированного или синтетического происхождения, адаптогены, стресс-корректоры, антиоксиданты, витамины, обладающие иммуностимулирующими свойствами [2—6].

Стимулирующее влияние на иммунную систему оказывают и пробиотики [7—10].

Пробиотический препарат «Пентапрол», содержащий живые культуры лактобацилл, лактококка, энтерококка фециум и бифидобактерий, разработан ООО «Биона» и предназначен для стабилизации микрофлоры кишечника, повышения продуктивности и сохранности свиней и сельскохозяйственной птицы.

Целью исследования является изучение неспецифической гуморальной и клеточной защиты, клеточного иммунитета и цитокинового профиля у свиноматок при профилактике послеродовых болезней пробиотиком «Пентапрол» и влияния ее на иммунный статус поросят.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в промышленном свиноводческом хозяйстве, в котором 25—30 % свиноматок ежегодно переболевает послеродовым эндометритом и/или метрит-мастит-агалактией. Для опыта было подобрано две группы свиноматок за 5 суток до опороса (после перевода в цех опороса). Животным опытной группы (n = 214) до опороса и в течение 7 дней после него с питьевой водой через медикатор ежедневно назначали пробиотик «Пентапрол» по 10 мл. Свиноматкам контрольной группы (n = 212) препарат не назначали.

От 5 свиноматок контрольной и опытной групп до применения препарата и спустя 10 дней после его назначения и от 5 поросят в 26-дневном возрасте, выращиваемых под свиноматками обеих групп, взяты пробы крови для иммунологических исследований, которые проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке и коррекции иммунного статуса животных» [11].

Уровень цитокинов: интерлейкина-1β (ИЛ-1β), интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-10 (ИЛ-10), фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), интерферона-γ (ИФН-γ) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с последующим учетом результатов на спектрофотометре «Униплан-ТМ» в соответствии с утвержденными наставлениями к диагностическим наборам. Для оценки баланса про- и противовоспалительных медиаторов вычислены индексы: общее соотношение про- и противовоспалительных цитокинов (ОЦИ) и медиаторов, продуцируемых Th-1 и Th-2 клетками (ЦИ Th-1/ Th-2) [12].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica, версия 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гуморальное звено неспецифической защиты у свиноматок контрольной и опытной групп в период лактации характеризовалось незначительным снижением по сравнению с фоном лизоцимной активности сыворотки крови на 6,7 и 2,5 % (табл. 1), обусловленным расходом фермента на инактивацию бактериальных патогенов, и повышением активности комплемента, играющего важную роль в обеспечении устойчивости организма к инфекционным агентам, на 5,2 и 42,9 % (p < 0,02) соответственно.

Таблица 1

Показатели неспецифической гуморальной и клеточной защиты у свиноматок

Показатели	Группы		
	фон	контрольная	опытная
ЛАСК, мкг/мл	2,40 ± 0,15	2,24 ± 0,08	2,34 ± 0,14
КАСК, % гем.	7,7 ± 0,49	8,1 ± 0,85	11,0 ± 0,89*+
Общие Ig, мг/мл	43,0 ± 2,83	48,2 ± 1,09	48,6 ± 1,192
ЦИК 3,0 % мг/мл	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
ЦИК 7,0 % мг/мл	0,18 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,25 ± 0,04
С7/С3	2,37 ± 0,37	2,67 ± 0,43	2,53 ± 0,59
ФАН, %	78,0 ± 0,63	78,0 ± 1,74	80,4 ± 0,98
ФИ	5,15 ± 0,14	4,89 ± 0,14	5,11 ± 0,19
ФЧ	4,02 ± 0,09	3,80 ± 0,11	4,11 ± 0,19
сп-НСТ, %	13,2 ± 2,06	15,6 ± 2,32	16,0 ± 1,116*
ст-НСТ, %	27,6 ± 2,32	34,0 ± 2,09	37,6 ± 2,71
ПР	2,27 ± 0,29	2,35 ± 0,31	2,40 ± 0,164

* p < 0,05—0,01 — к фону

\+ p < 0,05—0,001 — к контролю

При этом их значения у животных, получавших «Пентапрол», были выше на 4,5 и 35,8 % ($p < 0,05$) соответственно. Увеличение концентрации общих иммуноглобулинов у свиноматок контрольной и опытной групп на 12,1 и 13,0 % свидетельствовало о повышении гуморальной защиты при отсутствии разницы в их значениях.

При определении содержания циркулирующих иммунных комплексов, участвующих в формировании иммунного ответа, отмечено увеличение по сравнению с фоном у свиноматок обеих групп содержания крупных (3,0 %) ЦИК на 37,5 % и мелкодисперсных (7,0 %) ЦИК — на 55,6 и 38,9 %, а также их патогенности (С7/С3) на 12,7 и 6,8 %, что указывает на повышение антигенной нагрузки. При этом у животных, получавших «Пентапрол», были меньше количество мелкодисперсных ЦИК на 7,4 % и коэффициент патогенности — на 5,2 %, вследствие более выраженной гуморальной защиты.

У свиноматок опытной группы была выше и неспецифическая клеточная защита (табл. 1), о чем свидетельствуют превышение по сравнению с контролем ФАН на 3,1 %, поглотительной функции фагоцитов: ФИ — на 4,5 % и ФЧ — на 8,2 %, метаболической активности — стимулированного НСТ-теста, рассматриваемого как критерий готовности нейтрофилов к завершенному фагоцитозу, — на 10,6 %, а также тенденция к незначительному увеличению спонтанного НСТ-теста, свидетельствующего об усилении цитотоксичности фагоцитов (на 2,6 %) и функционального резерва нейтрофилов (на 2,1 %).

У свиноматок опытной группы в период лактации по сравнению с фоном количество лейкоцитов уменьшилось на 9,6 %, и было ниже аналогичного показателя контроля на 8,2 %.

При этом установлено увеличение абсолютного содержания лимфоцитов на 7,8 %, являющихся одним из основных показателей клеточного иммунитета и участвующих во всех иммунологических реакциях, и было выше контрольного значения на 12,3 % (табл. 2).

Таблица 2

Клеточный иммунитет и цитокиновый профиль у свиноматок

Показатели	Группы		
	фон	контрольная	опытная
1	2	3	4
Лейкоциты, 10^9/л	17,2 ± 1,55	17,1 ± 1,15	15,7 ± 0,77
Лимфоциты, %	40,8 ± 2,06	39,4 ± 1,08	48,2 ± 0,66*
Лимфоциты, 10^9/л	7,02 ± 0,35	6,74 ± 0,18	7,57 ± 0,10+
Т-лимфоциты, %	51,0 ± 1,53	40,7 ± 0,67*	53,3 ± 2,39+
Т-лимфоциты, 10^9/л	3,58 ± 0,11	2,74 ± 0,05	4,03 ± 0,18+
Ттфч, %	20,7 ± 1,76	17,3 ± 0,67	23,8 ± 0,75+
Ттфр, %	30,3 ± 1,86	23,3 ± 0,67*	29,5 ± 1,71+
Ттфр/Ттфч, ед.	1,5 ± 0,21	1,33 ± 0,09	1,27 ± 0,03
В-лимфоциты, %	20,3 ± 1,33	19,0 ± 0,58	20,8 ± 1,44
В-лимфоциты, 10^9/л	1,42 ± 0,09	0,52 ± 0,02*	0,83 ± 0,06*+
ИЛ-1β, пг/мл	2,81 ± 0,219	3,05 ± 0,105	3,09 ± 0,077
ИЛ-2, пг/мл	4,99 ± 0,151	5,15 ± 0,010	5,54 ± 0,378
ИЛ-4, пг/мл	1,56 ± 0,039	1,64 ± 0,020	1,87 ± 0,161
ИЛ-10, пг/мл	5,09 ± 0,894	3,33 ± 0,103	3,93 ± 0,690

Окончание табл. 2

1	2	3	4
ФНО-α, пг/мл	1,48 ± 0,221	1,71 ± 0,174	1,52 ± 0,250
ИФН-γ, пг/мл	12,08 ± 0,157	12,65 ± 0,546	13,96 ± 1,886
ОЦИ	3,21	4,54	4,16
ЦИ (ИЛ1-β/ИЛ-2)	2,79	3,92	3,62

* $p < 0,01$—0,001 — к фону
\+ $p < 0,02$—0,001 — к контролю

При незначительном снижении (на 3,4 %) относительного количества лимфоцитов у животных контрольной группы по сравнению с фоном их значение у свиноматок, получавших пробиотик «Пентапрол», существенно (на 18,1 %, $p < 0,01$) увеличилось и превышало контрольный показатель на 22,3 %.

Относительное количество Т-лимфоцитов у животных контрольной группы снизилось на 20,2 % ($p < 0,001$), что указывало на нарушение дифференцировки тимоцитов в зрелые клетки, а в опытной — увеличилось на 4,5 % и превышало контроль на 31,0 % ($p < 0,001$). У поросят опытной группы абсолютное содержание Т-лимфоцитов также повысилось 12,6 % и было выше аналогичного показателя животных контроля на 47,1 %. Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии препарата на лимфопоэз животных.

У свиноматок контрольной и опытной групп имели место отличия и в уровне субпопуляций Т-лимфоцитов. Относительное количество теофиллинчувствительных Т-клеток (Ттфч), обладающих супресссивной активностью, в контроле по сравнению с фоном снизилось на 16,4 %, а у животных, получавших пробиотик «Пентапрол», увеличилось на 15,0 % и превышало контрольный показатель на 37,6 % ($p < 0,001$).

Относительное число теофиллинрезистентных Т-клеток (Ттфр), продуцирующих набор провоспалительных цитокинов и стимулирующих действие цитотоксических Т-клеток и макрофагов, у свиноматок контрольной группы снизилось на 23,1 % ($p < 0,01$), а в опытной — практически не изменилось и превышало контрольный показатель на 26,6 % ($p < 0,02$).

Иммунорегуляторный индекс (Ттфр/Ттфч) у животных контрольной и опытной групп снизился на 11,3 и 15,3 % соответственно, что, по-видимому, связано с необходимостью сдерживания развития иммунных реакций, вызванных вакцинацией свиноматок и попавшими из среды обитания в организм животных микроорганизмами. При этом его значение у свиноматок, получавших пробиотик, было меньше на 4,5 %, что указывало на повышение у них супрессивной активности Т-лимфоцитов.

Относительное и абсолютное количество В-лимфоцитов, играющих важную роль в реализации иммунного ответа и выработке специфических антител, у животных контрольной группы снизилось на 6,4 и 63,4 % ($p < 0,001$), а в опытной — относительное содержание имело тенденцию к повышению на 2,5 %, а абсолютное — уменьшилось на 41,5 % ($p < 0,01$), в результате чего превышали контрольные показатели на 9,5 и 59,6 % ($p < 0,01$).

При изучении цитокинового профиля у свиноматок контрольной и опытной групп установлено повышение по сравнению с фоном содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-1β на 8,5 и 10,0 %, ИЛ-2 — на 3,2 и 11,0 %, ФНО-α — на 15,5 и 2,7 % и ИФН-γ — на 4,7 и 15,6 %, при этом у последних уровень ИЛ-1β не отличался, ФНО-α был меньше на 11,1 %, а ИЛ-2 и ИФН-γ, стимулирующих клеточный иммунитет, — больше чем в контроле на 7,6 и 10,4 % (табл. 3).

Из противовоспалительных медиаторов, индуцирующих гуморальный иммунитет, у свиноматок контрольной и опытной групп повысился уровень ИЛ-4 на 5,1 и 19,9 % и уменьшилось содержание ИЛ-10 на 34,6 и 22,8 %, при этом их значения у последних превышали контрольные величины на 14,0 и 18,0 % соответственно.

Общее соотношение про- и противовоспалительных цитокинов, как и отношение медиаторов, продуцирующих Th-1 и Th-2 лимфоцитами, повысились по сравнению с фоном на 41,4 и 29,6 %

и на 40,5 и 29,7 % соответственно, при этом их значения у свиноматок, получавших пробиотик «Пентапрол», были меньше, чем в контроле на 8,4 и 7,7 %, что свидетельствует о более выраженном у них гуморальном иммунитете.

Повышение неспецифической гуморальной и клеточной защиты, специфического клеточного иммунитета и содержания цитокинов, индуцирующих клеточный и гуморальный иммунитет, у свиноматок под влиянием пробиотика «Пентапрол» положительно сказалось на иммунном статусе выращиваемых под ними поросят.

У них по сравнению с контролем были выше лизоцимная и комплементарная активность сыворотки крови на 27,4 и 22,6 % и содержание общих иммуноглобулинов — на 42,1 % ($p < 0,01$), что характеризует более высокий уровень гуморальной защиты (табл. 4).

Таблица 4

Показатели неспецифической гуморальной и клеточной защиты у поросят

Показатели	Возраст (дни), группы	
	26	
	контрольная	опытная
ЛАСК, мкг/мл	2,59 ± 0,37	3,30 ± 0,13
КАСК, % гем.	8,4 ± 1,60	10,3 ± 0,48
Общие Ig, мг/мл	12,1 ± 0,61	17,2 ± 1,21*
ЦИК 3,0 % мг/мл	0,08 ± 0,04	0,03 ± 0,01
ЦИК 7,0 % мг/мл	0,17 ± 0,04	0,07 ± 0,01
С7/С3	3,48 ± 1,09	2,26 ± 0,22
ФАН, %	74,8 ± 1,16	77,6 ± 0,49
ФИ	5,38 ± 0,14	5,58 ± 0,09
ФЧ	4,02 ± 0,06	4,34 ± 0,09*
сп-НСТ, %	12,4 ± 0,75	13,2 ± 0,80
ст-НСТ, %	28,0 ± 0,89	32,4 ± 1,60*
ПР	2,31 ± 0,20	2,39 ± 0,21

* $p < 0,05$—$0,001$ — к контролю

Об этом же свидетельствуют меньшие концентрации мелких и крупных ЦИК в 2,4 и 2,7 раза и коэффициент их патогенности (С7/С3) — на 35,1 %.

У поросят опытной группы по сравнению с контролем были выше количество активных циркулирующих фагоцитов на 3,7 %, поглотительная функция: ФИ и ФЧ — на 3,7 и 8,0 % ($p < 0,02$), метаболическая активность: стимулированный и спонтанный НСТ-тест — на 6,5 и 15,7 % ($p < 0,05$) соответственно, а также функциональный резерв клеток — на 3,5 %, что свидетельствует о более высоком уровне клеточной неспецифической резистентности.

У них превышало количество лейкоцитов на 6,6 %, абсолютное и относительное содержание лимфоцитов на 14,5 и 7,1 %, что указывает на более высокий уровень клеточной защиты (табл. 5).

У поросят опытной группы было выше и относительное содержание Т-лимфоцитов на 5,5 %, что свидетельствует об увеличении активности дифференцировки тимоцитов в зрелые клетки.

У подопытных поросят имели место отличия и в уровне субпопуляций Т-лимфоцитов. Так, относительное содержание теофиллинчувствительных Т-лимфоцитов (Т-супрессоры), подавляющих иммунный ответ и отвечающих за иммуносупрес-

сию, у поросят, выращиваемых под свиноматками опытной группы, превышало контрольный показатель на 7,2 %, что более существенно сдерживало развитие иммунных реакций, вызванных вакцинацией и микроорганизмами, попавшими в организм из среды обитания животных.

Таблица 5

Клеточный иммунитет и цитокиновый профиль у поросят

Показатели	Возраст (дни), группы	
	26	
	контрольная	опытная
Лейкоциты, 10^9/л	15,1 ± 1,47	16,1 ± 0,893
Лимфоциты, %	50,4 ± 2,159	54,0 ± 0,316
Лимфоциты, 10^9/л	7,61 ± 0,33	8,69 ± 0,05
Т-лимфоциты, %	41,7 ± 1,20	44,0 ± 1,47
Т-лимфоциты, 10^9/л	3,17 ± 0,09	3,82 ± 0,13
Ттфч%	18,0 ± 1,00	19,3 ± 1,11
Ттфр%	23,7 ± 0,33	24,6 ± 0,48
Ттфр/Ттфч, ед.	1,33 ± 0,07	1,30 ± 0,07
В-лимфоциты, %	19,3 ± 0,88	24,3 ± 0,63*
В-лимфоциты, 10^9/л	1,47 ± 0,07	2,11 ± 0,05*
ИЛ-1β, пг/мл	3,32 ± 0,211	2,72 ± 0,012*
ИЛ-2, пг/мл	5,45 ± 0,079	5,17 ± 0,104
ИЛ-4, пг/мл	1,71 ± 0,038	1,53 ± 0,033*
ИЛ-10, пг/мл	4,10 ± 0,413	3,98 ± 0,184
ФНО-α, пг/мл	1,73 ± 0,205	1,58 ± 0,46
ИФН-γ, пг/мл	12,64 ± 0,364	12,13 ± 0,197
ОЦИ	3,98	3,92
ЦИ (ИЛ1-β/ИЛ-2)	3,41	3,43

* $p < 0,002$ — к контролю

У них незначительно (на 3,8 %) превышало и относительное содержание теофиллинрезистентных Т-лимфоцитов (Т-хелперы), обеспечивающих формирование гуморального и клеточного иммунитета и активацию макрофагов.

Отношение теофиллинрезистентных Т-лимфоцитов к теофиллинчувствительным клеткам у поросят обеих групп было практически одинаковым.

Абсолютное и относительное содержание В-лимфоцитов, участвующих в реализации гуморального иммунного ответа, у поросят опытной группы превышало контрольные показатели на 43,5 % ($p < 0,001$) и 25,9 % ($p < 0,02$) соответственно.

При изучении цитокинового профиля у поросят опытной группы установлено меньшее по сравнению с контролем содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1β на 18,1 % ($p < 0,05$), ИЛ-2 — на 5,1 %, ФНО-α — на 8,7 % и ИФН-γ — на 4,0 %, также как и противовоспалительных медиаторов

ИЛ-4 — на 10,5 % ($p < 0,05$) и ИЛ-10 — на 2,9 %, что свидетельствует о меньшей антигенной нагрузке на клетки-продуценты указанных медиаторов. Общее соотношение про- и противовоспалительных цитокинов и медиаторов, продуцирующих Th-1 и Th-2 лимфоцитами, у подопытных поросят практически не отличались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение пробиотика «Пентапрол» свиноматкам за 5 дней до опороса и в первую неделю лактации сопровождалось повышением иммунного статуса у них и выращиваемых под ними поросят, проявляющимся активацией естественной гуморальной и клеточной защиты, клеточного иммунитета. При этом отмечено увеличении содержания цитокинов, индуцирующих клеточный и гуморальный иммунитет, у свиноматок и при снижении антигенной нагрузки на клетки-продуценты про- и противовоспалительных медиаторов у поросят.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Шахов А. Г.* Неспецифическая гуморальная и клеточная защита в разные периоды репродуктивного цикла у свиноматок с послеродовой патологией / А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, Ю. Ю. Владимирова, Г. В. Никоненко, А. В. Елецких // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. — 2023. — Т. 59, № 1. — С. 51—56.

2. *Петрянкин Ф. П.* Иммуностимуляторы в практике ветеринарной медицины / Ф. П. Петрянкин, В. Г. Семенов, Н. Г. Иванов // Чебоксары: Издательско-полиграфическая компания «Новое время»; Чебоксары, 2015. — 272 с.

3. *Прудников С. И.* Пролонгированный Вестин для профилактики и терапии при инфекционных болезнях поросят / С. И. Прудников, А. А. Духовский, Г. М. Прудникова, А. Н. Шкрылев, Г. М. Левагина // Ветеринария. — 2008. — № 6. — С. 18—21.

4. *Старостина Н. С.* Иммунный статус и сохранность поросят-сосунов при введении соединений селена в организм их матерей / Н. С. Старостина, А. В. Остапчук // Нива Поволжья. — 2013. — № 2 (27). — С. 118—123.

5. *Востроилова Г. А.* Изучение эффективности аминоселетона при технологическом стрессе на свиноводческих комплексах / Г. А. Востроилова, Н. А. Хохлова, П. А. Паршин, Л. В. Ческидова, И. В. Брюхова, Л. Ю. Сашнина, Ю. А. Кантарович, С. С. Карташов // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2018. — № 2 (3). — С. 37—41.

6. *Шахов А. Г.* Влияние комплексного препарата на основе интерферонов на иммунный статус свиноматок и его эффективность при профилактике послеродовых болезней / А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, М. Ю. Жепйнес, Ю. Ю. Владимирова, Н. В. Карманова //Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 2 (11). — С. 49—60. DOI: 10.17238 /issn2541-8203.2020.2.49

7. *Красочко П. А.* Влияние бесклеточного пробиотического препарата «Бацинил» на иммунную систему телят при терапии респираторных заболеваний / П. А. Красочко, И. А. Красочко, Ю. В. Санжаровская // Ветеринарный врач. — 2011. — № 4. — С. 11—14.

8. *Ардатская М. Д.* Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микроэкологических нарушений кишечника / М. Д. Ардатская // Медицинский совет. — 2015. — № 13. С. 94—99.

9. *Бондаренко В. М.* Оценка микробиоты и пробиотических штаммов с позиций новых научных технологий / В. М. Бондаренко, О. В. Рыбальченко // Фарматека. — 2016. — № 11. — С. 21—33.

10. *Раскина К. В.* Современные бактериологические препараты: влияние на микробиоту кишечника и роль в лечении заболеваний / К. В. Раскина, Е. Ю. Мартынова, И. Р. Фатхутдинов, Ю. Е. Потешкин // Русский медицинский журнал. — 2018. — Т. 26, № 52. — С. 86—91.

11. Методические рекомендации по оценке и коррекции иммунного статуса животных / А. Г. Шахов, Ю. Н. Масьянов, М. И. Рецкий и др. — Воронеж: Истоки, 2005. —115 с.

12. *Маркелова Е. В.* Патогенетическая роль нарушений в системе цитокинов при инфекционно-воспалительных заболеваниях/ Е. В. Маркелова, А. В. Костюшко, В. Е. Красников // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2008. —№ 3. — С. 24—29

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. Г. Шахов — член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник;
Л. Ю. Сашнина — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;
В. Н. Коцарев — доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник;
О. А. Манжурина — кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник;
И. В. Волкова — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;
Е. Д. Боярина — старший лаборант.

Статья поступила в редакцию 31.01.2025.

Original article
UDC 619[612.017:618.07:615.03]:636.4

IMMUNE STATUS OF SOWS DURING PREVENTION OF POSTPARTUM DISEASES WITH THE PROBIOTIC "PENTAPROL" AND ITS EFFECT ON THE IMMUNITY IN PIGLETS

Aleksey Gavrilovich Shakhov[*]✉, Larisa Yuryevna Sashnina[**], Vladimir Nikolaevich Kotsarev[***], Olga Alekseevna Manzhurina[****], Irina Vladimirovna Volkova[*****], Evgeniya Dmitrievna Boyarina[******]

[, **, ***, ****, *****, ******]All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, vnivipat@mail.ru✉*
[*]https://orcid.org/0000-0002-6177-8858
[**]https://orcid.org/0000-0001-6477-6156
[***]https://orcid.org/0000-0002-9114-7176
[****]https://orcid.org/0000-0003-0147-8965
[*****]https://orcid.org/0000-0003-3911-7129
[******]https://orcid.org/0009-0007-1032-6089

Abstract. In the conditions of an industrial pig breeding complex the effect of postpartum diseases prevention in sows with the probiotic "Pentaprol" on their immune status and the piglets reared under them was studied. It has been established that the use of the drug to sows 5 days before farrowing and during the first week of lactation is accompanied by an increase in the immune status of them and the piglets reared under them, manifested by activation of natural humoral and cellular protection, specific cellular immunity, with an increase in the content of cytokines inducing cellular and humoral immunity in sows, and a decrease in the antigen load on cells producing pro- and anti-inflammatory mediators in piglets.
Keywords: sows, piglets, probiotic "Pentaprol", immune status, cytokine profile

In sows at risk of postpartum pathology development in the second half of gestation, compared to clinically healthy animals, the lysozyme and complementary activity of the blood serum, the content of total immunoglobulins, the absorptive function of phagocytes and their functional reserve are reduced, but the level of finely dispersed circulating immune complexes and their pathogenicity are increased, which indicates the suppression of humoral and cellular protection. In addition, they have a quantitative and qualitative imbalance of cytokines [1].

To improve the immune status of the body, pharmacological drugs of natural, modified or synthetic origin, adaptogens, stress correctors, antioxidants, vitamins with immunostimulating properties are recommended [2—6].

The probiotics also have a stimulating effect on the immune system [7—10].

The probiotic drug "Pentaprol", containing live cultures of lactobacilli, lactococcus, enterococcus fecium and bifidobacteria, was designed by Biona LLC and is intended to stabilize intestinal microflora, increase productivity and safety of pigs and poultry.

The objective of the study is to investigate non-specific humoral and cellular protection, cellular immunity and cytokine profile in sows during prevention of postpartum diseases with the probiotic "Pentaprol" and its effect on the immune status of piglets.

MATERIAL AND METHODS

The studies were conducted at an industrial pig breeding farm, where 25—30 % of sows annually suffer from postpartum endometritis and/or mastitis-metritis-agalactia. For the experiment, two groups of sows were selected 5 days before farrowing (after transfer to the farrowing area). The animals of the experimental group (n = 214) were given 10 ml of the probiotic "Pentaprol" daily with drinking water through a medicator before farrowing and for 7 days after it. The sows of the control group (n = 212) were not given the drug.

Blood samples were taken from 5 sows of the control and experimental groups before the use of the drug

and 10 days after its administration, and from 5 piglets aged 26 days, reared under sows of both groups, for immunological studies, which were carried out in accordance with the Methodological Recommendations for the Assessment and Correction of the Immune Status of Animals [11].

The level of cytokines: interleukin-1β (IL-1β), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with subsequent recording of the results on a Uniplan-TM spectrophotometer in accordance with the approved instructions for diagnostic kits. To assess the balance of pro- and anti-inflammatory mediators, the indices were calculated: the total ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines (TrPC) and mediators produced by Th-1 and Th-2 cells (Th-1/Th-2 CP) [12].

Statistical processing of the obtained results was performed using the Statistica software package, version 6.0.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

The humoral link of non-specific protection in the sows of the control and experimental groups during lactation was characterized by a slight decrease in the serum lysozyme activity by 6.7 and 2.5 % (Table 1), compared to the baseline, due to the consumption of the enzyme for the inactivation of bacterial pathogens, and an increase in the activity of complement, which plays an important role in ensuring the body's resistance to infectious agents, by 5.2 and 42.9 % ($p < 0.02$), respectively. At the same time, their values in the animals receiving "Pentaprol" were higher by 4.5 and 35.8 % ($p < 0.05$), respectively.

The increase in the concentration of total immunoglobulins in the sows of the control and experimental groups by 12.1 and 13.0 % indicated an increase in humoral protection with no difference in their values.

When determining the content of circulating immune complexes involved in the formation of the immune response, an increase was noted in comparison with the baseline in the sows of both groups in the content of large (3.0 %) CIC by 37.5 % and fine (7.0 %) CIC — by 55.6 and 38.9 %, as well as their pathogenicity (C7/C3) by 12.7 and 6.8 %, indicating an increase in the antigen load. At the same time, in the animals receiving "Pentaprol", the number of finely dispersed CIC was lower by 7.4 % and the pathogenicity coefficient was lower by 5.2 %, due to a more pronounced humoral protection.

Table 1

Indicators of non-specific humoral and cellular protection in sows

Indicators	Groups		
	baseline	control	experimental
SLA, μg/ml	2.40 ± 0.15	2.24 ± 0.08	2.34 ± 0.14
SCA, % hem.	7.7 ± 0.49	8.1 ± 0.85	11.0 ± 0.89*+
Total Ig, mg/ml	43.0 ± 2.83	48.2 ± 1.09	48.6 ± 1.192
CIC3.0 % mg/ml	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
CIC7.0 % mg/ml	0.18 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.25 ± 0.04
C7/C3	2.37 ± 0.37	2.67 ± 0.43	2.53 ± 0.59
PAN, %	78.0 ± 0.63	78.0 ± 1.74	80.4 ± 0.98
PhI	5.15 ± 0.14	4.89 ± 0.14	5.11 ± 0.19
PhN	4.02 ± 0.09	3.80 ± 0.11	4.11 ± 0.19
spNBT, %	13.2 ± 2.06	15.6 ± 2.32	16.0 ± 1.116*
stNBT, %	27.6 ± 2.32	34.0 ± 2.09	37.6 ± 2.71
RI	2.27 ± 0.29	2.35 ± 0.31	2.40 ± 0.164

* $p < 0.05$—0.01 — to the baseline
\+ $p < 0.05$—0.001 — to the control

The sows of the experimental group also had higher non-specific cellular protection (Table 1), as evidenced by the excess of PAN by 3.1 %, compared to the control, the absorptive function of phagocytes: PhI — by 4.5 % and PhN — by 8.2 %, metabolic activity — stimulated NBT-test, considered as a criterion of neutrophil readiness for complete phagocytosis — by 10.6 %, as well as a tendency to a slight increase in the spontaneous NBT-test, indicating an increase in the cytotoxicity of phagocytes (by 2.6 %) and the functional reserve of neutrophils (by 2.1 %).

In the sows of the experimental group during the lactation period, compared to the baseline, the number of leukocytes decreased by 9.6 %, and was lower than the similar indicator of the control by 8.2 %.

At the same time, an increase in the absolute content of lymphocytes by 7.8 % has been established, which is one of the main indicators of cellular immunity and participates in all immunological reactions, and is higher than the control value by 12.3 % (Table 2).

With a slight decrease (by 3.4 %) in the relative number of lymphocytes in the animals of the control group, compared to the baseline, their value in the sows receiving the probiotic "Pentaprol" significantly (by 18.1 %, $p < 0.01$) increased and exceeded the control indicator by 22.3 %.

Table 2

Cellular immunity and cytokine profile in sows

Indicators	Groups		
	baseline	control	experimental
Leukocytes, 10^9/L	17.2 ± 1.55	17.1 ± 1.15	15.7 ± 0.77
Lymphocytes, %	40.8 ± 2.06	39.4 ± 1.08	48.2 ± 0.66*
Lymphocytes, 10^9/L	7.02 ± 0.35	6.74 ± 0.18	7.57 ± 0.10+
T-lymphocytes, %	51.0 ± 1.53	40.7 ± 0.67*	53.3 ± 2.39+
T-lymphocytes, 10^9/L	3.58 ± 0.11	2.74 ± 0.05	4.03 ± 0.18+
Ttps, %	20.7 ± 1.76	17.3 ± 0.67	23.8 ± 0.75+
Ttpr, %	30.3 ± 1.86	23.3 ± 0.67*	29.5 ± 1.71+
Ttpr/Ttps, units	1.5 ± 0.21	1.33 ± 0.09	1.27 ± 0.03
B-lymphocytes, %	20.3 ± 1.33	19.0 ± 0.58	20.8 ± 1.44
B-lymphocytes, 10^9/L	1.42 ± 0.09	0.52 ± 0.02*	0.83 ± 0.06*+
IL-1β, pg/ml	2.81 ± 0.219	3.05 ± 0.105	3.09 ± 0.077
IL-2, pg/ml	4.99 ± 0.151	5.15 ± 0.010	5.54 ± 0.378
IL-4, pg/ml	1.56 ± 0.039	1.64 ± 0.020	1.87 ± 0.161
IL-10, pg/ml	5.09 ± 0.894	3.33 ± 0.103	3.93 ± 0.690
TNF-α, pg/ml	1.48 ± 0.221	1.71 ± 0.174	1.52 ± 0.250
IFN-γ, pg/ml	12.08 ± 0.157	12.65 ± 0.546	13.96 ± 1.886
TrPC	3.21	4.54	4.16
CP (IL1-β/IL-2)	2.79	3.92	3.62

* $p < 0.01$—0.001 — to the baseline
\+ $p < 0.02$—0.001 — to the control

The relative number of T-lymphocytes in the animals of the control group decreased by 20.2 % ($p < 0.001$), which indicated a violation of the differentiation of thymocytes into mature cells, and in the experimental group, it increased by 4.5 % and exceeded the control by 31.0 % ($p < 0.001$). In the piglets of the experimental group, the absolute content of T-lymphocytes also increased by 12.6 % and was higher than the same indicator in the control animals by 47.1 %. The results obtained indicate a positive effect of the drug on the lymphopoiesis of animals.

The sows of the control and experimental groups also had differences in the level of T-lymphocyte subpopulations. The relative number of theophylline-sensitive T-cells (Ttps), possessing suppressive activity, in the control, compared to the baseline, decreased by 16.4 %; and in the animals receiving the probiotic "Pentaprol", it increased by 15.0 % and exceeded the control indicator by 37.6 % ($p < 0.001$).

The relative number of theophylline-resistant T-cells (Ttpr), producing a set of proinflammatory cytokines and stimulating the action of cytotoxic T-cells and macrophages, in the sows of the control group decreased by 23.1 % ($p < 0.01$), and in the experimental group it remained virtually unchanged and exceeded the control indicator by 26.6 % ($p < 0.02$).

The immunoregulatory index (Ttpr/Ttps) in the animals of the control and experimental groups decreased by 11.3 and 15.3 %, respectively, which was apparently due to the need to restrain the development of immune reactions caused by vaccination of sows and microorganisms that entered the animal's body from the environment. At the same time, its value in the sows receiving the probiotic was by 4.5 % lower, indicating an increase in their suppressive activity of T-lymphocytes.

The relative and absolute number of B-lymphocytes, which play an important role in the implementation of the immune response and the production of specific antibodies, in the animals of the control group, decreased by 6.4 and 63.4 % ($p < 0.001$), while in the experimental group, the relative content tended to increase by 2.5 %, and the absolute content decreased by 41.5 % ($p < 0.01$), as a result of which they exceeded the control indicators by 9.5 and 59.6 % ($p < 0.01$).

When studying the cytokine profile in the sows of the control and experimental groups, an increase in the content of proinflammatory cytokines IL-1β by 8.5 and 10.0 %, IL-2 — by 3.2 and 11.0 %, TNF-α — by 15.5 and 2.7 %, and IFN-γ — by 4.7 and 15.6 % was found, compared to the baseline, while in the latter, the level of IL-1β did not differ, TNF-α was lower by 11.1 %, and IL-2 and IFN-γ, which stimulate cellular immunity, were higher than in the control by 7.6 and 10.4 % (Table 3).

Out of the anti-inflammatory mediators inducing humoral immunity, the level of IL-4 in the sows of the control and experimental groups increased by 5.1 and 19.9 %, and the content of IL-10 decreased by 34.6 and 22.8 %, while their values in the latter exceeded the control values by 14.0 and 18.0 %, respectively.

The overall ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as the ratio of mediators produced by Th-1 and Th-2 lymphocytes, increased by 41.4 and 29.6 % and by 40.5 and 29.7 %, respectively, compared to the baseline, while their values in the sows receiving the probiotic "Pentaprol" were lower than in the control by 8.4 and 7.7 %, which indicated a more pronounced humoral immunity in them.

An increase in non-specific humoral and cellular protection, specific cellular immunity and the content of cytokines inducing cellular and humoral immunity in the sows under the effect of the probiotic "Pentaprol" had a positive effect on the immune status of piglets reared under them. Compared to the control group, they had higher serum lysozyme and complement activity by 27.4 and 22.6 %, and the content of total immunoglobulins by 42.1 % ($p < 0.01$), which characterized a higher level of humoral protection (Table 4).

Table 4

Indicators of non-specific humoral and cellular protection in piglets

Indicators	Age (days), groups	
	26	
	control	experimental
1	2	3
SLA, μg/ml	2.59 ± 0.37	3.30 ± 0.13
SCA, % hem.	8.4 ± 1.60	10.3 ± 0.48

Table 4 (the end)

1	2	3
Total Ig, mg/ml	12.1 ± 0.61	17.2 ± 1.21*
CIC3.0 % mg/ml	0.08 ± 0.04	0.03 ± 0.01
CIC7.0 % mg/ml	0.17 ± 0.04	0.07 ± 0.01
C7/C3	3.48 ± 1.09	2.26 ± 0.22
PAN, %	74.8 ± 1.16	77.6 ± 0.49
PhI	5.38 ± 0.14	5.58 ± 0.09
PhN	4.02 ± 0.06	4.34 ± 0.09*
spNBT, %	12.4 ± 0.75	13.2 ± 0.80
stNBT, %	28.0 ± 0.89	32.4 ± 1.60*
RI	2.31 ± 0.20	2.39 ± 0.21

* $p < 0.05$—0.001 — to the control

This is also evidenced by lower concentrations of small and large CIC by 2.4 and 2.7 times and the coefficient of their pathogenicity (C7/C3) — by 35.1 %.

In the piglets of the experimental group, compared to the control, the number of active circulating phagocytes was higher by 3.7 %, the absorption function: PhI and PhN — by 3.7 and 8.0 % ($p < 0.02$); metabolic activity: stimulated and spontaneous NBT-test — by 6.5 and 15.7 % ($p < 0.05$), respectively, as well as the functional reserve of cells — by 3.5 %, which indicated a higher level of cellular nonspecific resistance.

They had a 6.6 % higher leukocyte count, and a 14.5 and 7.1 % higher absolute and relative lymphocyte count, indicating a higher level of cellular protection (Table 5).

Table 5

Cellular immunity and cytokine profile in piglets

Indicators	Age (days), groups	
	26	
	control	experimental
1	2	3
Leukocytes, 10^9/L	15.1 ± 1.47	16.1 ± 0.893
Lymphocytes, %	50.4 ± 2.159	54.0 ± 0.316
Lymphocytes, 10^9/L	7.61 ± 0.33	8.69 ± 0.05
T-lymphocytes, %	41.7 ± 1.20	44.0 ± 1.47
T-lymphocytes, 10^9/L	3.17 ± 0.09	3.82 ± 0.13
Ttps, %	18.0 ± 1.00	19.3 ± 1.11
Ttpr, %	23.7 ± 0.33	24.6 ± 0.48

Table 5 (the end)

1	2	3
Ttpr/Ttps, units	1.33 ± 0.07	1.30 ± 0.07
B-lymphocytes, %	19.3 ± 0.88	24.3 ± 0.63*
B-lymphocytes, 10^9/L	1.47 ± 0.07	2.11 ± 0.05*
IL-1β, pg/ml	3.32 ± 0.211	2.72 ± 0.012*
IL-2, pg/ml	5.45 ± 0.079	5.17 ± 0.104
IL-4, pg/ml	1.71 ± 0.038	1.53 ± 0.033*
IL-10, pg/ml	4.10 ± 0.413	3.98 ± 0.184
TNF-α, pg/ml	1.73 ± 0.205	1.58 ± 0.46
IFN-γ, pg/ml	12.64 ± 0.364	12.13 ± 0.197
TrPC	3.98	3.92
CP (IL1-β/IL-2)	3.41	3.43

* $p < 0.002$ — to the control

The piglets of the experimental group also had a 5.5 % higher relative T-lymphocyte count, indicating an increase in the activity of thymocyte differentiation into mature cells.

The experimental piglets also had differences in the level of T-lymphocyte subpopulations. Thus, the relative content of theophylline-sensitive T-lymphocytes (T-suppressors), which suppress the immune response and are responsible for immunosuppression, in the piglets reared under the sows of the experimental group exceeded the control indicator by 7.2 %, which more significantly inhibited the development of immune reactions caused by vaccination and microorganisms that entered the body from the animals' habitat.

They also had slightly (by 3.8 %) higher relative content of theophylline-resistant T-lymphocytes (T-helpers), which ensured the formation of humoral and cellular immunity and the activation of macrophages. The ratio of theophylline-resistant T-lymphocytes to theophylline-sensitive cells in the piglets of both groups was almost identical.

The absolute and relative content of B-lymphocytes involved in the implementation of the humoral immune response in the piglets of the experimental group exceeded the control values by 43.5 % ($p < 0.001$) and 25.9 % ($p < 0.02$), respectively.

When studying the cytokine profile in the piglets of the experimental group, a lower content of proinflammatory cytokines IL-1β by 18.1 % ($p < 0.05$), IL-2 — by 5.1 %, TNF-α — by 8.7 % and IFN-γ — by 4.0 % was found, compared to the control, as well as anti-inflammatory mediators: IL-4 — by 10.5 % ($p < 0.05$) and IL-10 — by 2.9 %, which indicated a lower antigen load on the cells producing these mediators. The overall ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines and mediators produced by Th-1 and Th-2 lymphocytes in the experimental piglets was virtually unchanged.

CONCLUSION

The use of the probiotic "Pentaprol" to sows 5 days before farrowing and in the first week of lactation was accompanied by an increase in the immune status of them and the piglets reared under them, manifested by the activation of natural humoral and cellular protection, cellular immunity. At the same time, an increase in the content of cytokines inducing cellular and humoral immunity was noted in sows, and a decrease in the antigen load on the cells producing pro- and anti-inflammatory mediators in piglets.

REFERENCES

1. *Shakhov A. G.* Non-specific humoral and cellular protection in different periods of the reproductive cycle in the sows with postpartum pathology / A. G. Shakhov, L. Yu. Vladimirova, G. V. Nikonenko, A. V. Eletskikh // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya Vitebskaya ordena Znak

pocheta gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny (Transactions of the educational establishment Vitebsk Order of the Badge of Honor State Academy of Veterinary Medicine). — 2023. — Vol. 59, No. 1. — P. 51—56.

2. *Petryankin F. P.* Immunostimulants in the practice of veterinary medicine / F. P. Petryankin, V. G. Semenov, N. G. Ivanov // Cheboksary: Publishing and printing company "New Time"; Cheboksary, 2015. — 272 p.

3. *Prudnikov S. I.* Prolonged Vestin for the prevention and therapy of infectious diseases in piglets / S. I. Prudnikov, A. A. Dukhovskiy, G. M. Prudnikova, A. N. Shkrylev, G. M. Levagina // Veterinariya (Veterinary Science). — 2008. — No. 6. — P. 18—21.

4. *Starostina N. S.* Immune status and safety of suckling piglets when introducing selenium compounds into the body of their mothers / N. S. Starostina, A. V. Ostapchuk // Niva Povolzhya. — 2013. — No. 2 (27). — P. 118—123.

5. *Vostroilova G. A.* Study of the efficacy of aminoseleton under technological stress at pig breeding complexes / G. A. Vostroilova, N. A. Khokhlova, P. A. Parshin, L. V. Cheskidova, I. V. Bryukhova, L. Yu. Sashnina, Yu.A. Kantarovich, S. S. Kartashov // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2018. — No. 2 (3). — P. 37—41.

6. *Shakhov A. G.* The effect of the complex drug based on interferons on the immune status of sows and its efficacy in the prevention of postpartum diseases / A. G. Shakhov, L. Yu. Sashnina, M. Yu. Zheynes, Yu.Yu. Vladimirova, N. V. Karmanova // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2020. — No. 2 (11). — P. 49—60. DOI: 10.17238 /issn2541-8203.2020.2.49

7. *Krasochko P. A.* Effect of the cell-free probiotic preparation "Bacinil" on the immune system of calves in the treatment of respiratory diseases / P. A. Krasochko, I. A. Krasochko, Yu.V. Sanzharovskaya // Veterinarnyy vrach (Veterinarian). — 2011. — No. 4. — P. 11—14.

8. *Ardatskaya M. D.* Probiotics, prebiotics and metabiotics in the correction of microecological disorders of the intestine / M. D. Ardatskaya // Meditsinskiy sovet (Medical Council). — 2015. — No. 13. P. 94—99.

9. *Bondarenko V. M.* Assessment of microbiota and probiotic strains from the standpoint of new scientific technologies / V. M. Bondarenko, O. V. Rybalchenko // Farmateka. — 2016. — No. 11. — P. 21—33.

10. *Raskina K. V.* Modern bacteriological preparations: effect on intestinal microbiota and role in treatment of diseases / K. V. Raskina, E. Yu. Martynova, I. R. Fatkhutdinov, Yu.E. Poteshkin // Russkiy meditsinskiy zhurnal (Russian Medical Journal). — 2018. — Vol. 26, No. 52. — P. 86—91.

11. Methodological recommendations for the assessment and correction of the immune status of animals / A. G. Shakhov, Yu.N. Masyanov, M. I. Retskiy et al. — Voronezh: Istoki, 2005. — 115 p.

12. *Markelova E. V.* Pathogenetic role of disturbances in the cytokine system in case of infectious and inflammatory diseases / E. V. Markelova, A. V. Kostyushko, V. E. Krasnikov // Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal (Pacific Medical Journal). — 2008. — No.3. — P. 24—29

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. G. Shakhov — Corresponding Member of the RAS, Chief Scientific Associate;
L. Yu. Sashnina — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;
V. N. Kotsarev — Doctor of Veterinary Sciences, Principal Scientific Associate;
O. A. Manzhurina — Candidate of Veterinary Sciences, Principal Scientific Associate;
I. V. Volkova — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientific Associate;
E. D. Boyarina — Senior Laboratory Assistant.

The article was submitted 31.01.2025.

Научная статья
УДК 595.384.12:639.51

ВЛИЯНИЕ АММОНИЙНОГО АЗОТА НА ГЕПАТОПАНКРЕАС ГИГАНТСКОЙ ПРЕСНОВОДНОЙ КРЕВЕТКИ В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Вера Ивановна Егорова[*✉], **Виктор Николаевич Крючков**[**], **Ирина Владимировна Волкова**[***]

[*, **, ***]*Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия, lekaego@mail.ru*✉
[*]*https://orcid.org/0000-0002-7688-723x*
[**]*https://orcid.org/0000-0001-8749-6069*
[***]*https://orcid.org/0000-0001-8945-6669*

Аннотация. В статье представлены результаты исследования влияния аммонийного азота на гепатопанкреас гигантской пресноводной креветки (Macrobrachium rosenbergii), проведенного на научно-производственной базе малого инновационного предприятия «Эко-тропик» в сотрудничестве с Астраханским государственным техническим университетом. В установках замкнутого водоснабжения (УЗВ) поддержание оптимальных условий для содержания культивируемых организмов достигается за счет четкого балансирования плотности посадки, объема корма и мощности биофильтра. Основными процессами в биофильтре являются окисление аммонийного азота до нитрата. С одной стороны, эти процессы способствуют снижению pH, что уменьшает токсичность аммиака при его накоплении в воде, с другой стороны — низкий уровень pH негативно сказывается на здоровье креветок, поэтому требуется постоянно контролировать кислотность среды и при необходимости нейтрализовать избыток кислоты. Это может привести к увеличению содержания аммиака по сравнению с его ионизированной формой. Предполагается, что аммонийный азот проникает в организм осмотически через жабры, а затем через резорбцию достигает гепатопанкреаса, нарушая его энергетические и метаболические функции. Результаты исследования продемонстрировали, что стресс, вызванный повышением уровня аммонийного азота и аммиака в воде, приводит к повреждению структуры гепатопанкреаса у M. rosenbergii. Выявлено, что наиболее оптимальными для креветок являются значения pH в диапазоне 7,5—8,0. В то время как слабокислая среда (pH 6,4—5,0) негативно влияет на питание, выживаемость и рост личинок и постличинок по сравнению с нейтральной средой, личинки M. rosenbergii проявили высокую чувствительность к кислой среде (pH 5,4—0,2), что сопровождалось повреждением структуры гепатопанкреаса, исключающим возможность восстановления организма до нормального состояния. Таким образом, знание уровней толерантности креветок к экстремальным условиям среды может способствовать более эффективному и рентабельному культивированию этого вида.

Ключевые слова: УЗВ, культивирование, аммонийный азот, гигантская пресноводная креветка, гепатопанкреас, гистопатологическое исследование

Гидрохимические параметры воды во многом определяют протекание основных жизненных процессов в организмах гидробионтов, культивируемых в аквакультуре. Значимые отклонения от принятых технологических показателей воды неизбежно сказываются на росте и выживаемости рыб либо других объектов выращивания [1].

Повышение уровня содержания аммиачного азота в воде является одной из самых распространенных проблем при интенсивном ведении аквакультуры. Аммиак, главным образом в форме ионизированного NH_4^+ и неионизированного NH_3, является распространенным загрязнителем в среде

аквакультуры как в прудах, так и в установках замкнутого водоснабжения [2].

При интенсификации биотехнологических процессов в прудах, заключающейся в повышении плотности посадки, применении удобрений и кормов, создаются условия для накопления в воде органических загрязнителей, в том числе и соединений азота. Следовательно, ненадлежащее управление аквакультурой ведет к ухудшению качества водной среды, вызывая множество проблем [3, 4].

Что касается культивирования рыбы и нерыбных объектов в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ), то там основным источником накопления аммиачного азота в воде являются сами гидробионты.

Многие водные животные выделяют аммиак в процессе своей жизнедеятельности. Так, большинство рыб выделяют аммиак как основной конечный продукт катаболизма белков [5], который непосредственно выделяется из крови в воду через жабры. Ракообразные, как и рыбы, также являются аммонотеликами, главный конечный продукт их азотистого обмена — аммиак [6, 7].

Технологическая норма содержания неионизированного аммиака в воде установок УЗВ составляет 0,05 мг/л, допустимая концентрация иона аммония, которая допустима для длительного культивирования ракообразных, не превышает 4,0 мг/л [7].

Аммиак может вызывать хронические и острые токсические эффекты даже при относительно низкой концентрации [8]. Высокая концентрация аммиака в воде ведет к снижению адаптационных возможностей гидробионтов, негативно влияет на рост и набор массы, а также вызывает гибель рыб и/или ракообразных, таким образом, наносит экономический ущерб аквакультуре [9, 10].

Пресноводная креветка *Macrobrachium rosenbergii* является одним из видов, относящихся к десятиногим ракам *Decapoda*, имеющих высокую ценность для аквакультуры из-за растущего на них спроса на рынке. Это обстоятельство, а также ряд биологических особенностей и потребительских свойств делают этот объект привлекательным, в том числе и для товарного выращивания в климатической зоне юга России [11—13].

Товарное производство креветки в условиях умеренного климата предполагает содержание производителей и накопление молоди (для последующего выращивания) в УЗВ. Соответственно, нарушения в работе установок замкнутого водоснабжения создают риски для успешного культивирования, вследствие токсичности аммонийного азота, который способен накапливаться в воде при неудовлетворительной работе биофильтра. Повышенное содержание аммиака в воде приводит к накоплению эндогенного аммиака и поглощению экзогенного аммиака организмом гидробионтов, ингибируя его выведение, и, таким образом, приводя к выработке избыточного количества активного кислорода, который инициирует или усиливает альтерацию органов и тканей [14].

Водные беспозвоночные — это наиболее восприимчивые к аммиаку гидробионты. Однако токсическое действие аммиака на них изучено недостаточно. В литературе показано наиболее выраженное влияние на репродуктивную способность, рост и выживаемость беспозвоночных, также отмечено то, что различные ткани обладают разным потенциалом реагирования на аммиачный стресс [15]. Вместе с тем, работы по морфологии внутренних органов у представителей *Decapoda* немногочисленны [16].

Интерес к изучению толерантности пресноводных креветок рода *Macrobrachium* к повышенному содержанию соединений азота обусловлен проблемами их промышленного культивирования. К сожалению, мы имеем не только положительный опыт содержания тропических ракообразных в замкнутых системах, были аварийные ситуации, когда массовую гибель креветок удавалось предотвратить только экстренной пересадкой в свободные емкости с меньшей плотностью. Целью данного исследования было выявление влияния стрессоров, связанных с повышенным содержанием аммония в воде, на гистологические особенности гепатопанкреаса гигантской пресноводной креветки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Креветки *Macrobrachium rosenbergii* длиной 90,34 ± 7,12 мм содержались в УЗВ научно-производственной базы малого инновационного предприятия «Эко-тропик», созданного при участии Астраханского государственного технического университета.

В лабораторию кафедры гидробиологии и общей экологии Астраханского технического университета креветки транспортировались в пластиковых емкостях (40 л) при постоянной аэрации. Креветки содержались в лаборатории в аквариумах объемом 250 л, кормление — два раза в день кормами животного и растительного происхождения.

Для моделирования воздействия ионов аммония и аммиака на креветок был приготовлен рас-

твор хлорида аммония (NH_4Cl), который вносили в аквариумы с подопытными гидробионтами для создания в воде концентраций 2,0 и 5,0 мг/л, которую ежедневно корректировали [14]. Было сформировано две экспериментальные группы по 30 креветок в каждой. Длительность экспозиции — 10 суток. Температуру воды в течение эксперимента поддерживали на уровне ≈26,0 °С во всех аквариумах. Во время опыта креветок кормили тем же кормом, который использовался в период адаптации; ежедневный рацион составлял 3 % от массы тела два раза в день (08:00 и 15:00) и корректировался по поедаемости.

Показатели воды (температура, содержание кислорода, pH) контролировались с использованием портативных анализаторов. Общий уровень аммиака определяли калориметрически с помощью фотометра для аквакультуры HI-83303-02. Уровень неионизированного аммиака в воде (NH_3) был определен с использованием программы www.uzv.su/ru/building/technology/programmi.

Для гистологического исследования у 10 креветок из каждой группы были взяты образцы гепатопанкреаса. Обездвиживание и анестезия креветок осуществлялась путем помещения их в холодную воду (10—12 °С). Образцы органов фиксировались в растворе Буэна. Затем фиксированные ткани обезвоживали в спирте возрастающих концентраций, очищали ксилолом и заливали в парафин. Срезы толщиной 5—7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином для общего гистопатологического исследования [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ

В течение всего эксперимента основные жизненно важные параметры водной среды не выходили за пределы значений, которые являются оптимальными для гигантских пресноводных креветок (табл. 1).

Необходимый уровень NH_4^+ устанавливали путем внесения в воду соответствующего количества хлорида аммония. Концентрация аммиака в воде — расчетная.

Значения контролируемых параметров воды позволяют утверждать, что описанные далее изменения в гепатопанкреасе креветок явились следствием влияния аммонийного азота.

Таблица 1

Основные гидрохимические показатели при проведении эксперимента

Показатель	Группа 1	Группа 2
Температура воды, °С	26,2 ± 0,31	26,0 ± 0,25
Кислород, мг/л	7,4 ± 0,50	7,4 ± 0,46
pH	7,9 ± 0,14	8,0 ± 0,09
Азот аммония, мг/л	2,2 ± 0,25	5,1 ± 0,28
Аммиак, мг/л	0,12 ± 0,03	0,40 ± 0,01

В печени (гепатопанкреасе) десятиногих раков, в отличие от позвоночных, протекают не только синтетические (метаболические) процессы, но и осуществляется полостное пищеварение, таким образом, гепатопанкреас креветок в полной мере может считаться пищеварительной железой. Кроме того, в канальцах гепатопанкреаса осуществляется всасывание образовавшихся низкомолекулярных соединений, т. е. по сути, эта железа выполняет ряд функций кишечника [18].

Гепатопанкреас располагается в головогруди, каудальнее расположен желудок. Проходя через кардиальный желудок, пища подвергается механическому перевариванию, далее поступает в пилорический отдел, где сортируется. Частично переваренная пища, приобретшая полужидкую консистенцию, направляются в отстойник и пресс, далее в фильтр, где отстаивается, затем поступает в гепатопанкреас, и уже в канальцах гепатопанкреаса подвергается дальнейшему перевариванию, высокомолекулярные вещества расщепляются. Часть веществ всасывается и/или запасается, часть выбрасывается в среднюю кишку. Та часть пищи, которая не переваривается, поступает непосредственно в заднюю кишку [18].

Гепатопанкреас креветок разделен на две доли соответственно билатеральной симметрии тела, морфологически образован многочисленными

трубочками, которые и составляют основу органа. Клетки печени представлены четырьмя видами [19]: всасывающие, фибриллярные, пузыревидные и отсутствующие у взрослых креветок эмбриональные клетки (ими образованы дистальные концы печеночных трубочек) [18].

Строение гепатопанкреаса гигантской пресноводной креветки, содержавшейся в нормальных условиях, показано на рисунке 1А.

Как показал морфологический анализ, состояние гепатопанкреаса по данным световой микроскопии в контрольной группе креветок было нормальным, структура тканей была ясно выраженной, клетки с четкими межклеточными границами. Железисто-трубчатая структура была хорошо организована. Были отмечены структурированные образования из столбчатых клеток, среди которых можно было дифференцировать В-клетки с характерной крупной вакуолью, а также лишенные вакуолей F-клетки. Соединительная ткань интегрирована с канальцами гепатопанкреаса. Сами канальцы были нормальной звездообразной формы, характерной для данного вида декапод, клетки канальцев с признаками умеренной секреции.

Первыми признаками альтерации в гепатопанкреасе, которые выявлялись при воздействии аммонийного азота уже в концентрации 2,0 мг/л, было появление просветов между клетками канальцев, по-видимому, за счет нарушения контактов между ними. Межканальцевая соединительная ткань начала исчезать, в клетках самих канальцев были обнаружены признаки кариопикноза и кариорексиса. Вакуоли стали крупнее, их количество возросло (рис. 1Б).

Нарастание патологии имело место при продолжительном воздействии аммонийного азота и при увеличении его концентрации. Наблюдалось дальнейшее разрушение соединительной ткани, исчезала щеточная кайма. Клетки канальцев подвергались все более выраженной деструкции. Отмечалась резко выраженная вакуолизация. Звездообразная характерная структура канальцев гепатопанкреаса была нарушена (рис. 1В). Кариорексис сменился кариолизисом. В конечном итоге гепатопанкреатические канальцы и столбчатые клетки распались, таким образом, архитектоника гепатопанкреаса была полностью разрушена (рис. 1Г).

Природа и степень токсичности аммиака зависят от нескольких факторов, включая химическую форму аммония, pH и температуру воды, продолжительность воздействия и стадию развития гидробионтов, подвергшихся воздействию [1]. Неионизированный аммиак (NH_3) представляет повышенную токсичность для гидробионтов, и становится еще более токсичным при повышении температуры воды и pH. Эти молекулы (ионизированный и неионизированный аммиак) могут превращаться друг в друга под влиянием pH и температуры [20, 21].

В установках УЗВ гарантированное поддержание оптимальных условий содержания культивируемых животных основывается на четко сбалансированном соотношении плотности посадки, количества вносимого корма и мощности используемого биофильтра.

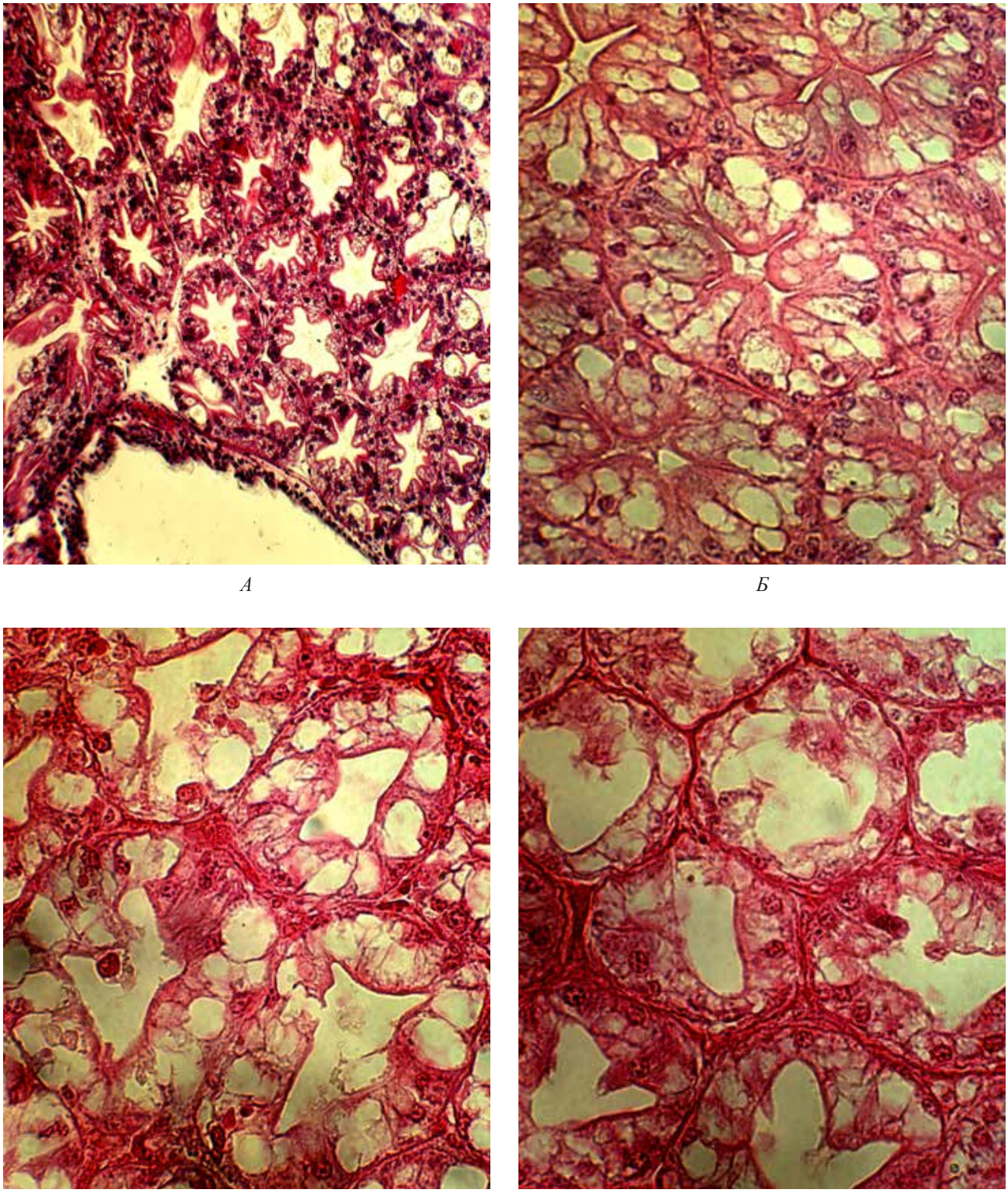
Как известно, основные процессы, протекающие в биофильтре — это окисление аммонийного азота до нитрата:

$$NH_4^{(+)} + 1{,}86O_2 + 1{,}98HCO_3^{(-)} = 0{,}02206C_5H_7NO_2 + 0{,}980NO_3^{(-)} + 1{,}041H_2O + 1{,}88H_2CO_3$$

Нитраты в биофильтре не утилизируются, они постепенно накапливаются. Проблема нитратов, в частности, решается путем частичной подмены воды, вернее, добавлением свежей воды, восполняющей потери в УЗВ на испарение и в связи с чисткой бассейнов [22].

Загрязнения от креветок состоят из общего аммония и аммиака ($NH_4^+ + NH_3$), растворенных в воде, и азота, еще пока зафиксированного в органических веществах. Процесс аммонификации, осуществляющийся в биофильтре, стремится уменьшить pH воды в результате накопления CO_2. Аммиак в растворе превращается в аммоний, присоединив к себе ион водорода, аммоний превращается в аммиак, отдав ион водорода. Чем больше в воде свободных ионов водорода (т. е. чем ниже pH), тем больше в ней будет аммония и меньше аммиака, и наоборот. Поскольку токсичность аммония (NH_4^+) намного ниже, чем у аммиака (NH_3), то, следовательно, при относительно высоком pH (7,5—8,0) проблема аммиачного отравления существенно выше, чем в слабокислой среде.

Вместе с тем, при содержании креветок, особенно молоди, мы вынуждены корректировать pH при подкислении воды. Собственный опыт промышленного выращивания молоди креветки в УЗВ, а также результаты исследований, опубликованные Hon Jung Liew с соавторами [23], свидетельствуют, что наиболее благоприятными для креветок являются значения pH воды в диапазоне 7,5—8,0, тогда как снижение pH воды является одним из наиболее важных факторов, влияющих на жизненные показатели молоди *M. rosenbergii*.



А *Б*

В *Г*

Рис. 1. Гистологическая структура гепатопанкреаса M. rosenbergii при воздействии аммонийного азота. Гематоксилин-эозин.

А — Гепатопанкреас M. rosenbergii в контрольной группе, имеющий нормальный внешний вид со звездообразным просветом канальцев. Увеличение 22 × 10; *Б* — Вакуолизация клеток канальцев, уменьшение просветов канальцев с сохранением звездообразной структуры. Увеличение 22 × 40; *В* — Вакуолизация клеток канальцев гепатопанкреаса. Исчезновение звездообразной структуры. Увеличение 22 × 40; *Г* — Деструкция гепатопанкреатических канальцев. Увеличение 22 × 40

Воздействие слабокислого pH (6,4 ± 0,5) отрицательно сказывалось на питании, выживании и росте личинок и постличинок креветок по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, личинки *M. rosenbergii* оказались высокочувствительными к кислому pH (5,4 ± 0,2), ни одна личинка не выжила после 48 часов воздействия [23].

Таким образом, процессы, протекающие в биофильтре, понижают pH, и тем самым снижая токсичность аммиака в случае его накопления в воде. С другой стороны, низкая pH воды неблагоприятна для креветок, поэтому необходимо постоянно контролировать активную реакцию среды и в случае необходимости убирать излишнюю кислотность. При этом происходит сдвиг в сторону увеличения содержания аммиака по отношению к его ионизированной форме.

Являясь основным органом, который осуществляет процессы биотрансформации и детоксикации веществ эндогенного и экзогенного происхождения, а также центром, регулирующим у ракообразных многие биологические процессы, гепатопанкреатическая система играет незаменимую роль в секреции, всасывании, пищеварении и иммунитете [24]. Результаты данного исследования показали, что при воздействии стресс-фактора в виде повышения содержания в воде аммонийного азота и аммиака, происходит повреждение структуры гепатопанкреаса у *M. rosenbergii*.

Одним из возможных механизмов повреждения гепатопанкреаса может быть окислительный стресс, который инициируется внешним воздействием [16]. Токсические вещества даже в низких концентрациях могут инициировать окислительное повреждение тканей, оказывать разрушительное воздействие на ткани гепатопанкреаса у креветок рода *Macrobrachium*. Окислительное повреждение также приводит к перекисному окислению липидов, повреждению ДНК, далее к клеточному апоптозу и гибели клеток, соответственно возникает некроз, приводящий к необратимому повреждению ткани.

Благодаря своей растворимости в жирах и незаряженной природе NH_3 может легко диффундировать через клеточные мембраны в кровь и ткани, и, вероятно, это одна из причин его гораздо большей токсичности относительно иона аммония. Когда содержание аммиака в водной среде слишком велико, это ведет к накоплению эндогенного аммиака и поглощению экзогенного аммиака организмом, ингибируя выведение и, таким образом, приводя к выработке избыточного количества активного кислорода [14]. Как следствие, развивается альтерация тканей, окислительный стресс, воспаление [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают на то, что постоянное воздействие высоких концентраций аммония приводит к повреждению тканей гепатопанкреаса гигантской пресноводной креветки, характер которого исключает восстановление организма до нормального уровня.

Полагаем, что аммонийный азот мог попасть в организм осмотически через жабры, посредством резорбции проникнуть в гепатопанкреас, нарушив энергетическую и метаболическую функцию последнего.

Знание уровней толерантности выращиваемых креветок к экстремальным показателям среды должно помочь более эффективному и рентабельному культивированию данного объекта и требует дальнейшего изучения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ortiz. I. Evaluation of acute toxicity of ammonia in Genetically Improved Farmed Tilapia / I. Ortiz, R. Bastos, E. Lanna [et al.] // Aquaculture Reports. — 2022. — v. 27. — P. 101—325.

2. Чалов. В. В. Показатели водной среды и аммонийный азот в системе замкнутого водообеспечения при содержании объектов аквакультуры / В. В. Чалов, Е. Н. Пономарева // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. — 2010. — № 1. — С. 92—95.

3. Мирзахалилов. М. М. Гидрохимическjt состояние прудов рыбоводных хозяйств и сезонные изменения их / М. М. Мирзахалилов // International Scientific Journal of Biruni. — 2022. — v. 1, i. 2. — С. 108—113.

4. *Mirghaed A. T.* Effects of dietary 1,8-cineole supplementation on serum stress and antioxidant markers of common carp (Cyprinus carpio) acutely exposed to ambient ammonia / A. T. Mirghaed, S. Fayaz, S. M. Hoseini // Aquaculture. — 2019. — v. 509. — P. 8—15.

5. *Miramontes E.* Skeletal muscle and the effects of ammonia toxicity in fish, mammalian, and avian species: a comparative review based on molecular research / E. Miramontes, P. Mozdziak, J. N. Petitte [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2020. — v. 21. — P. 4641.

6. Жигин. А. В. Интенсивность дыхания и азотистого обмена у австралийского красноклешневого рака при содержании в искусственных условиях / А. В. Жигин, Д. В. Тырин, В. А. Арыстангалиева [и др.] // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. — 2017. — № 2 (31). — С. 45—49.

7. *Тырин Д. В.* Интенсивность дыхания и азотистого обмена креветки Penaeus vannamei при содержании

в искусственных условиях / Д. В. Тырин, Д. М. Загорская, Н. П. Ковачева [и др.] //Труды ВНИРО. — 2019. — Т. 175. — С. 167—174.

8. *Mercante C. T.* J. Potential toxic effect of ammonia in reservoirs with tilapiculture in cages / C. T. J. Mercante, G. S. David, C. J. Rodrigues [et al.] // Int. J. Fish. Aquat. Stud. — 2018. — v. 6. — P. 256—261.

9. *Boyd C. E.* General relationship between water quality and aquaculture performance in ponds / C. E. Boyd // Fish Diseases: Prevention and Control Strategies, 2017. — P. 147—166.

10. *Zhang Y.* — L. High concentrations of environmental ammonia induced changes in large-scale loach (Paramisgurnus dabryanus) immunity / Y. — L. Zhang, Z. — H. Shang, G. — Y. Wang [et al.] // Ecol. Evol. — 2021. — v. 11. — P. 8614—8622.

11. *Суханова М. Э.* Возможности выращивания гигантской пресноводной креветки в Каспийском регионе / М. Э. Суханова, Н. Е. Сальников // Тез. докл. междунар. конф. «Каспий — настоящее и будущее», Астрахань, 16—17 ноября 1995. — Астрахань, 1995. — С. 208—209.

12. *Хмелева Н. Н.* Пресноводные креветки / Н. Н. Хмелева, В. Ф. Кулеш, Ю. Г. Гигиняк. — Москва: Агропромиздат, 1994. — 129 с.

13. *Хорошко А. И.* Новые направления прудовой аквакультуры в южных регионах России / А. И. Хорошко, В. Н. Крючков // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. — 2010. — № 2. — С. 51—55.

14. *Benli A.* Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.): effects on gill, liver and kidney histology / A. Benli, G. Koksal, A. Ozkul // Chemosphere. — 2008. — v. 72, i. 9. — P. 1355—1358.

15. *Zhang T.* — X. A review of the toxic effects of ammonia on invertebrates in aquatic environments / Tian-Xu Zhang, Ming-RuiLi, Chen Liu, [et al.] // Environmental Pollution. — 2023. — v. 336. — P. 122—374.

16. *Lin W.* Distinct vulnerability to oxidative stress determines the ammonia sensitivity of crayfish (Procambarus clarkii) at different developmental stages / W. Lin, H. Luo, J. Wu [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 2022. — v. 242. — P. 113—894.

17. *Ромейс Б.* Микроскопическая техника / Б. Ромейс. — М.: Иностранная литература, 1953. — 720 с.

18. *Vogt G.* Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans // J. Morphol. — 2019. — v. 280 (9). — P. 1405—1444.

19. *Вельш У.* Введение в цитологию и гистологию животных // У. Вельш, Ф. Шторх. — М.: Мир, 1976. — 257 с.

20. *Duan Y.* Toxic effects of ammonia and thermal stress on the intestinal microbiota and transcriptomic and metabolomic responses of Litopenaeus vannamei / Y. Duan, D. Xiong, Y. Wang [et al.] // Sci. Total Environ. — 2021. — v.754. — P. 141867.

21. *Kathyayani S. A.* Effect of ammonia stress on immune variables of Pacific white shrimp Penaeus vannamei under varying levels of pH and susceptibility to white spot syndrome virus / S. A. Kathyayani, M. Poornima, S. Sukumaran [et al.] // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 2019. — v. 184. — P. 109626.

22. *Спотт С.* Содержание рыбы в замкнутых системах. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. — 192 с.

23. *Liew H. J.* Low water pH depressed growth and early development of giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii larvae / H. J. Liew, S. Rahmah, P. W. Tang [et al.] // Heliyon. — 2022. — v. 8. — e09989.

24. *Jamshidizadeh S.* Response of Pacific white leg shrimp (Litopenaeus vannamei) on exposure to aflatoxin in feed / S. Jamshidizadeh, N. Amrollahi Biuki, M. Yousefzadi [et al.] // Aquac. Res. — 2019. — v. 50. — P. 1973—1984.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

В. И. Егорова — канд. биол. наук, доцент кафедры «Гидробиология и общая экология» института рыбного хозяйства, биологии и природопользования;

В. Н. Крючков — д-р биол. наук, профессор кафедры «Гидробиология и общая экология» института рыбного хозяйства, биологии и природопользования;

И. В. Волкова — д-р биол. наук, профессор кафедры «Гидробиология и общая экология» института рыбного хозяйства, биологии и природопользования.

Статья поступила в редакцию 24.01.2025.

Original article
UDC 595.384.12:639.51

EFFECT OF AMMONIUM NITROGEN ON THE HEPATOPANCREAS OF GIANT FRESHWATER PRAWNS UNDER FARMING CONDITIONS

Vera Ivanovna Egorova[*]✉, Viktor Nikolaevich Kryuchkov[**], Irina Vladimirovna Volkova[***]

[, **, ***]Astrakhan State Technical University, Astrakhan, Russia, lekaego@mail.ru✉*
[*]https://orcid.org/0000-0002-7688-723x
[**]https://orcid.org/0000-0001-8749-6069
[***]https://orcid.org/0000-0001-8945-6669

Abstract. The article presents the results of a study of the effect of ammonium nitrogen on the hepatopancreas of giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii), conducted at the research and production base of the small innovative enterprise "Eco-tropic" in cooperation with Astrakhan State Technical University. In the recirculating aquaculture systems (RAS), maintaining optimal conditions for keeping farmed organisms is achieved through precise balancing of stocking density, feed volume and biofilter capacity. The main processes in the biofilter are the oxidation of ammonium nitrogen to nitrate. On the one hand, these processes contribute to a decrease in pH, which reduces the toxicity of ammonia when it accumulates in water. On the other hand, a low pH level negatively affects the health of prawn, so it is necessary to constantly monitor the acidity of the environment and, if necessary, neutralize excess acid. This can lead to an increase in the ammonia content, compared to its ionized form. It is assumed that ammonium nitrogen enters the body osmotically through the gills and then reaches the hepatopancreas through resorption, disrupting its energy and metabolic functions. The results of the study have demonstrated that stress caused by an increase in the level of ammonium nitrogen and ammonia in water leads to damage to the hepatopancreas structure in M. rosenbergii. It has been found that the most optimal pH values for prawn are in the range of 7.5—8.0. While a slightly acidic environment (pH 6.4—5.0) negatively affects the nutrition, survival and growth of larvae and postlarvae, compared to a neutral environment, M. rosenbergii larvae showed high sensitivity to an acidic environment (pH 5.4—0.2), which was accompanied by damage to the hepatopancreas structure, excluding the possibility of restoring the body to a normal state. Thus, knowledge of tolerance levels of prawn to extreme environmental conditions may contribute to more efficient and cost-effective farming of this species.

Keywords: RAS, farming (cultivation), ammonia nitrogen, giant freshwater prawn, hepatopancreas, histopathological examination

Hydrochemical parameters of water largely determine the course of the main life processes in the bodies of hydrobionts farmed in aquaculture. Significant deviations from the accepted technological indicators of water inevitably affect the growth and survival of fish or other objects of farming [1].

An increase in the level of ammonia nitrogen in water is one of the most common problems in intensive aquaculture. Ammonia, mainly in the form of ionized NH_4^+ and non-ionized NH_3, is a common pollutant in the aquaculture environment both in ponds and in recirculating aquaculture systems [2].

With the intensification of biotechnological processes in ponds, consisting of increasing the stocking density, using fertilizers and feed, conditions are created for the accumulation of organic pollutants in water, including nitrogen compounds. Consequently, improper aquaculture management leads to deterioration of the quality of the aquatic environment, causing many problems [3, 4].

As for the farming of fish and non-fish objects in recirculating aquaculture systems (RAS), the main source of accumulation of ammonia nitrogen in water are the aquatic organisms themselves.

Many aquatic animals excrete ammonia during their life processes. Thus, most fish excrete ammonia as the main end product of protein catabolism [5], which is directly released from the blood into the water through the gills.

Crustaceans, like fish, are also ammonotelic, the main end product of their nitrogen metabolism is ammonia [6, 7].

The technological standard for the content of non-ionized ammonia in the water of RAS installations is 0.05 mg/L, the permissible concentration of ammonium ion, which is acceptable for long-term farming of crustaceans, does not exceed 4.0 mg/L [7].

Ammonia can cause chronic and acute toxic effects even at relatively low concentrations [8]. High concentrations of ammonia in water lead to a decrease in the adaptive capacity of aquatic organisms, negatively affect growth and weight gain, and also cause the death of fish and/or crustaceans, thus, causing economic damage to aquaculture [9, 10].

The freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* is one of the species belonging to the decapod crustaceans *Decapoda*, which are of high value for aquaculture due to the growing demand for them at the market. This circumstance, as well as a number of biological features and consumer properties, make this object attractive, including for commercial farming in the climatic zone of the south of Russia [11—13].

Commercial production of prawn in temperate climates involves keeping producers and accumulating juveniles (for subsequent rearing) in the RAS. Disruptions in the operation of the RAS create risks for successful faming due to the toxicity of ammonium nitrogen, which can accumulate in water if the biofilter is not working properly. Increased ammonia content in water leads to the accumulation of endogenous ammonia and the absorption of exogenous ammonia by the body of aquatic organisms, inhibiting its excretion and, thus, leading to the production of excess of active oxygen, which initiates or enhances the alteration of organs and tissues [14].

Aquatic invertebrates are the aquatic organisms most susceptible to ammonia. However, the toxic effect of ammonia on them has not been sufficiently studied. The literature shows the most pronounced effect on reproductive capacity, growth and survival of invertebrates, and it is also noted that different tissues have different potential for responding to ammonia stress [15]. However, there are few studies on the morphology of internal organs in representatives of *Decapoda* [16].

The interest in studying the tolerance of freshwater prawn of the genus *Macrobrachium* to elevated nitrogen compounds is due to the problems of their industrial farming. Unfortunately, we have not only positive experience of keeping tropical crustaceans in closed systems, there were emergency situations when mass death of prawns could be prevented only by emergency transplantation into free containers with a lower density. The objective of this study was to identify the effect of stressors associated with elevated ammonium content in water on the histological features of the hepatopancreas of giant freshwater prawn.

MATERIAL AND METHODS

Prawns *Macrobrachium rosenbergii* of 90.34 ± 7.12 mm in length were kept in the RAS of the scientific and production base of the small innovative enterprise "Eco-tropic", founded with the participation of Astrakhan State Technical University.

The prawns were transported to the laboratory of the Department of Hydrobiology and General Ecology of Astrakhan Technical University in plastic containers (40 L) with constant aeration. The prawns were kept in the laboratory in 250 L aquariums, fed twice a day with animal and plant food.

To simulate the effect of ammonium and ammonia ions on the prawn, a solution of ammonium chloride (NH_4Cl) was prepared, which was added to the aquariums with the experimental aquatic organisms to create concentrations of 2.0 and 5.0 mg/L in the water, which was adjusted daily [14]. Two experimental groups of 30 prawns each were formed. The exposure duration was 10 days. The water temperature during the experiment was maintained at ≈26.0 °C in all aquariums. During the experiment, the prawns were fed the same food that was used during the adaptation period. The daily diet was 3 % of body weight twice a day (08.00 AM and 03.00 PM) and was adjusted according to consumption.

Water indicators (temperature, oxygen content, pH) were monitored using portable analyzers. Total ammonia level was determined calorimetrically using a HI-83303-02 aquaculture photometer. The level of unionized ammonia in water (NH_3) was determined using the program www.uzv.su/ru/building/technology/programmi.

For histological examination, hepatopancreas samples were taken from 10 prawns from each group. Immobilization and anesthesia of prawns were carried out by placing them in cold water (10—12 °C).

Organ samples were fixed in Bouin's solution. Then, fixed tissues were dehydrated in alcohol of increasing concentrations, cleared with xylene and embedded in paraffin. Sections of 5—7 μm were stained with hematoxylin and eosin for general histopathological examination [17].

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

During the entire experiment, the main vital parameters of the aquatic environment did not go beyond the values that were optimal for giant freshwater prawns (Table 1).

Table 1

Main hydrochemical indicators during the experiment

Indicator	Group 1	Group 2
Water temperature, °C	26.2 ± 0.31	26.0 ± 0.25
Oxygen, mg/L	7.4 ± 0.50	7.4 ± 0.46
pH	7.9 ± 0.14	8.0 ± 0.09
Ammonium nitrogen, mg/L	2.2 ± 0.25	5.1 ± 0.28
Ammonia, mg/L	0.12 ± 0.03	0.40 ± 0.01

The required level of NH_4^+ was established by adding the appropriate amount of ammonium chloride to the water. The concentration of ammonia in the water is calculated.

The values of the controlled water parameters allow us to state that the changes in the prawn hepatopancreas described below were a consequence of the effect of ammonium nitrogen.

In the liver (hepatopancreas) of decapod crustaceans, unlike vertebrates, not only synthetic (metabolic) processes occur, but also cavity digestion is carried out, thus, the hepatopancreas of prawns can be fully considered a digestive gland. In addition, the absorption of formed low-molecular compounds occurs in the tubules of the hepatopancreas, i. e., in fact, this gland performs a number of intestinal functions [18].

The hepatopancreas is located in the cephalothorax, with the stomach located caudally. Passing through the cardiac stomach, food undergoes mechanical digestion, then enters the pyloric section, where it is sorted. Partially digested food, having acquired a semi-liquid consistency, is sent to a settling tank and press, then to a filter, where it settles, then enters the hepatopancreas, and already in the tubules of the hepatopancreas it undergoes further digestion, high-molecular substances are broken down. Some substances are absorbed and/or stored, some are thrown into the midgut. The part of the food that is not digested goes directly to the hindgut [18].

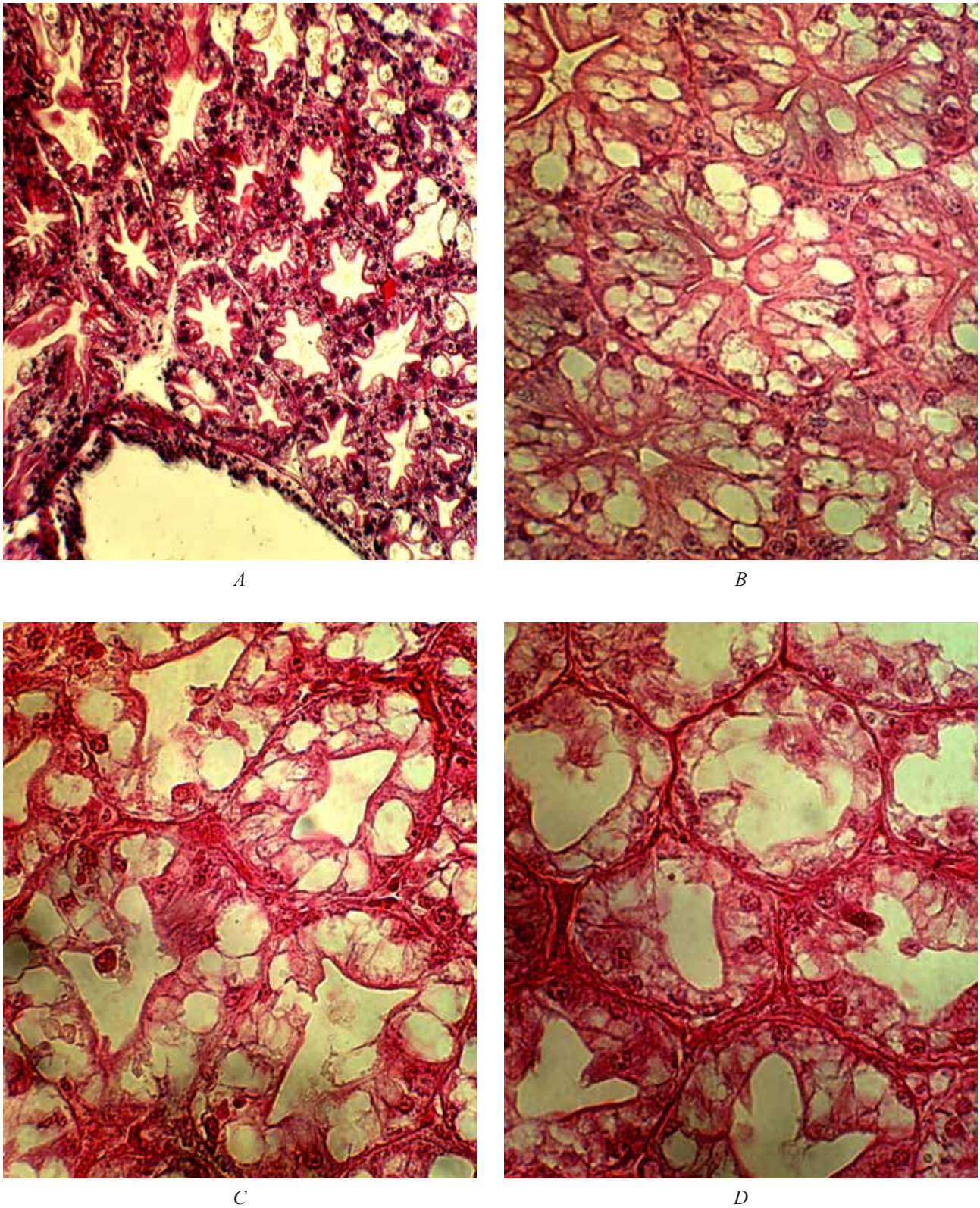
The hepatopancreas of a prawn is divided into two lobes in accordance with the bilateral symmetry of the body, and is morphologically formed by numerous tubules, which form the basis of the organ. Liver cells are represented by four types [19]: absorptive, fibrillar, bladder-like, and embryonic cells, which are absent in adult prawn (they form the distal ends of the liver tubules) [18].

The structure of the hepatopancreas of a giant freshwater prawn kept under normal conditions is shown in Fig. 1A.

As shown by morphological analysis, the state of the hepatopancreas according to light microscopy in the control group of prawns was normal, the tissue structure was clearly expressed, the cells with distinct intercellular boundaries. The glandular-tubular structure was well organized. Structured formations of columnar cells were noted, among which it was possible to differentiate B-cells with a typical large vacuole, as well as F-cells devoid of vacuoles.

Connective tissue was integrated with the tubules of the hepatopancreas. The tubules themselves were of a normal star-shaped form, typical of this species of decapods, the cells of the tubules with signs of moderate secretion.

The first signs of alteration in the hepatopancreas, which were revealed when exposed to ammonium nitrogen already at a concentration of 2.0 mg/L, were the appearance of lumens between the cells of the tubules, apparently due to the disruption of contacts between them. The intertubular connective tissue began to disappear, and signs of karyopyknosis and karyorrhexis were found in the cells of the tubules themselves. The vacuoles became larger and their number increased (Fig. 1B).



A *B*

C *D*

Fig. 1. Histological structure of the hepatopancreas of M. rosenbergii under the effect of ammonium nitrogen. Hematoxylin and eosin.

A — Hepatopancreas of *M. rosenbergii* in the control group, having a normal appearance with a star-shaped lumen of the tubules. Magnification 22 × 10; *B* — Vacuolization of tubular cells, reduction of the lumen of the tubules with preservation of the star-shaped structure. Magnification 22 × 40; *C* — Vacuolization of hepatopancreatic tubular cells. Disappearance of the star-shaped structure. Magnification 22 × 40; *D* — Destruction of hepatopancreatic tubules. Magnification 22 × 40

The pathology increased with prolonged exposure to ammonium nitrogen and with increasing concentrations. Further destruction of connective tissue was observed, and the brush border disappeared. The tubular cells were subject to increasingly pronounced destruction. Pronounced vacuolization was noted. The typical star-shaped structure of the hepatopancreatic tubules was disrupted (Fig. 1C). Karyorrhexis was replaced by karyolysis. Ultimately, the hepatopancreatic tubules and columnar cells disintegrated, thus, completely destroying the architecture of the hepatopancreas (Fig. 1D).

The nature and degree of ammonia toxicity depend on several factors, including the chemical form of ammonium, pH and water temperature, duration of exposure, and the developmental stage of the aquatic organisms under the exposure [1]. Unionized ammonia (NH_3) is highly toxic to aquatic organisms and becomes even more toxic with increasing water temperature and pH. These molecules (ionized and unionized ammonia) can convert into each other under the effect of pH and temperature [20, 21].

In the RAS installations, guaranteed maintenance of optimal conditions for keeping farmed prawns is based on a strictly balanced ratio of stocking density, amount of feed introduced and capacity of the biofilter used.

As it is known, the main processes occurring in the biofilter are the oxidation of ammonium nitrogen to nitrate:

$$NH_4^{(+)} + 1{,}86O_2 + 1{,}98HCO_3^{(-)} = 0{,}02206C_5H_7NO_2 + \\ + 0{,}980NO_3^{(-)}) + 1{,}041H_2O + 1{,}88H_2CO_3$$

Nitrates are not utilized in the biofilter, they gradually accumulate. The problem of nitrates, in particular, is solved by partial water replacement, or rather, by adding fresh water, replenishing losses in the RAS due to evaporation and in connection with the cleaning of pools [22].

Prawn pollution consists of total ammonium and ammonia ($NH_4^+ + NH_3$), dissolved in water, and nitrogen, still fixed in organic matter. The ammonification process, carried out in the biofilter, tends to reduce the pH of the water as a result of the accumulation of CO_2. Ammonia in the solution turns into ammonium, having attached a hydrogen ion to itself, ammonium turns into ammonia, having given up a hydrogen ion. The more free hydrogen ions in the water (i. e., the lower the pH), the more ammonium and less ammonia there will be in it, and vice versa. Since the toxicity of ammonium (NH_4^+) is much lower than that of ammonia (NH_3), then, consequently, at a relatively high pH (7.5—8.0) the problem of ammonia poisoning is significantly higher than in a slightly acidic environment.

However, when keeping prawns, especially juveniles, we have to adjust the pH by acidifying the water. Our own experience in industrial farming of juvenile prawn in the RAS, as well as the results of studies published by Hon Jung Liew et al. [23], indicate that the most favorable pH values for prawn are in the range of 7.5—8.0, while a decrease in water pH is one of the most important factors affecting the vital indicators of juvenile *M. rosenbergii*. Exposure to slightly acidic pH (6.4 ± 0.5) had a negative effect on the nutrition, survival and growth of prawn larvae and postlarvae, compared to neutral pH. In addition, *M. rosenbergii* larvae were highly sensitive to acidic pH (5.4 ± 0.2), and not a single larva survived in 48 hours of exposure [23].

Thus, the processes occurring in the biofilter lower the pH, thereby reducing the toxicity of ammonia in case of its accumulation in the water. On the other hand, low pH of water is unfavorable for prawns, so it is necessary to constantly monitor the active reaction of the environment and, if necessary, remove excess acidity. In this case, a shift occurs towards increasing the content of ammonia in relation to its ionized form.

Being the main organ that carries out the processes of biotransformation and detoxification of substances of endogenous and exogenous origin, as well as the center that regulates many biological processes in crustaceans, the hepatopancreatic system plays an irreplaceable role in secretion, absorption, digestion and immunity [24]. The results of this study showed that under the effect of a stress factor in the form of an increase in the content of ammonium nitrogen and ammonia in water, damage to the structure of the hepatopancreas occurs in *M. rosenbergii*.

One of the possible mechanisms of damage to the hepatopancreas may be oxidative stress, which is initiated by external effects [16]. Toxic substances, even in low concentrations, can initiate oxidative tissue damage, have a destructive effect on the tissues of the hepatopancreas in prawns of the genus *Macrobrachium*. Oxidative damage also leads to lipid peroxidation, DNA damage, then to cellular apoptosis and cell death, and thus necrosis occurs, leading to irreversible tissue damage.

Due to its lipid solubility and uncharged nature, NH_3 can easily diffuse through cell membranes into the blood and tissues, and this is probably one of the reasons for its much higher toxicity, compared to ammonium ion. When the ammonia content in the aquatic environment is too high, it leads to the accumulation of endogenous ammonia and the uptake of exog-

enous ammonia by the body, inhibiting excretion and thus leading to the production of excessive amounts of active oxygen [14]. As a consequence, tissue alteration, oxidative stress and inflammation develop [10].

CONCLUSION

The results obtained indicate that chronic exposure to high concentrations of ammonium leads to tissue damage in the hepatopancreas of giant freshwater prawn, the nature of which excludes the restoration of the body to normal levels.

We believe that ammonium nitrogen could enter the body osmotically through the gills, penetrate into the hepatopancreas by resorption, disrupting the energy and metabolic function of the latter.

Knowledge of the tolerance levels of farmed prawns to extreme environmental indicators should help to more effectively and profitably farm this object and requires further study.

REFERENCES

1. *Ortiz. I.* Evaluation of acute toxicity of ammonia in Genetically Improved Farmed Tilapia / I. Ortiz, R. Bastos, E. Lanna [et al.] // Aquaculture Reports. — 2022. — V. 27. — P. 101—325.

2. *Chalov. V. V.* Indicators of the aquatic environment and ammonium nitrogen in the recirculating aquaculture system for maintaining aquaculture objects / V. V. Chalov, E. N. Ponomareva // Vestnik AGTU. Ser. Rybnoe khozyaystvo (Bulletin of ASTU. Series: Fisheries). — 2010. — No. 1. — P. 92—95.

3. *Mirzakhalilov. M. M.* Hydrochemical state of fish farm ponds and their seasonal changes / M. M. Mirzakhalilov // International Scientific Journal of Biruni. — 2022. — V. 1, Issue. 2. — P. 108—113.

4. *Mirghaed A. T.* Effects of dietary 1,8-cineole supplementation on serum stress and antioxidant markers of common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to ambient ammonia / A. T. Mirghaed, S. Fayaz, S. M. Hoseini // Aquaculture. — 2019. — V. 509. — P. 8—15.

5. *Miramontes E.* Skeletal muscle and the effects of ammonia toxicity in fish, mammalian, and avian species: a comparative review based on molecular research / E. Miramontes, P. Mozdziak, J. N. Petitte [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2020. — V. 21. — P. 4641.

6. *Zhigin. A. V.* Respiration rate and nitrogen metabolism in Australian red-claw crayfish kept in artificial conditions / A. V. Zhigin, D. V. Tyrin, V. A. Arystangalieva [et al.] // Teoreticheskie i prikladnye problemy agropromyshlennogo kompleksa (Theoretical and applied problems of the agro-industrial complex). — 2017. — No. 2 (31). — P. 45—49.

7. *Tyrin D. V.* Respiration rate and nitrogen metabolism of the prawn *Penaeus vannamei* kept in artificial conditions / D. V. Tyrin, D. M. Zagorskaya, N. P. Kovacheva [et al.] // Trudy VNIRO (Proceedings of ARRIF&O). — 2019. — Vol. 175. — P. 167—174.

8. *Mercante C. T. J.* Potential toxic effect of ammonia in reservoirs with tilapiculture in cages / C. T. J. Mercante, G. S. David, C. J. Rodrigues [et al.] // Int. J. Fish. Aquat. Stud. — 2018. — V. 6. — P. 256—261.

9. *Boyd C. E.* General relationship between water quality and aquaculture performance in ponds / C. E. Boyd // Fish Diseases: Prevention and Control Strategies, 2017. — P. 147—166.

10. *Zhang Y. — L.* High concentrations of environmental ammonia induced changes in large-scale loach (Paramisgurnus dabryanus) immunity / Y. — L. Zhang, Z. — H. Shang, G. — Y. Wang [et al.] // Ecol. Evol. — 2021. — V. 11. — P. 8614—8622.

11. *Sukhanova M. E.* Potential for Growing Giant Freshwater Prawns in the Caspian Region / M. E. Sukhanova, N. E. Salnikov // Abstract of the report of the international conf. “The Caspian Sea — Present and Future”, Astrakhan, November 16—17, 1995. — Astrakhan, 1995. — P. 208—209.

12. *Khmeleva N. N.* Freshwater Prawns / N. N. Khmeleva, V. F. Kulesh, Yu. G. Giginyak. — Moscow: Agropromizdat, 1994. — 129 p.

13. *Khoroshko A. I.* New Directions of Pond Aquaculture in the Southern Regions of Russia / A. I. Khoroshko, V. N. Kryuchkov // Teoreticheskie i prikladnye problemy agropromyshlennogo kompleksa (Theoretical and applied problems of the agroindustrial complex). — 2010. — No. 2. — P. 51—55.

14. *Benli A.* Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.): effects on gill, liver and kidney histology / A. Benli, G. Koksal, A. Ozkul // Chemosphere. — 2008. — V. 72, Issue 9. — P. 1355—1358.

15. *Zhang T. — X.* A review of the toxic effects of ammonia on invertebrates in aquatic environments / Tian-Xu Zhang, Ming-RuiLi, Chen Liu, [et al.] // Environmental Pollution. — 2023. — V. 336. — P. 122—374.

16. *Lin W.* Distinct vulnerability to oxidative stress determines the ammonia sensitivity of crayfish (Procambarus clarkii) at different developmental stages / W. Lin, H. Luo, J. Wu [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 2022. — V. 242. — P. 113—894.

17. *Romeis B.* Microscopic technique / B. Romeis. — M.: Inostrannaya literatura (Foreign literature), 1953. — 720 p.

18. *Vogt G.* Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans // J. Morphol. — 2019. — V. 280 (9). — P. 1405—1444.

19. *Welsh U.* Introduction to animal cytology and histology // U. Welsh, F. Storch. — M.: Mir, 1976. — 257 p.

20. *Duan Y.* Toxic effects of ammonia and thermal stress on the intestinal microbiota and transcriptomic and metabolomic responses of Litopenaeus vannamei / Y. Duan, D. Xiong, Y. Wang [et al.] // Sci. Total Environ. — 2021. — V.754. — P. 141867.

21. *Kathyayani S. A.* Effect of ammonia stress on immune variables of Pacific white shrimp Penaeus vannamei under varying levels of pH and susceptibility to white spot syndrome virus / S. A. Kathyayani, M. Poornima, S. Sukumaran [et al.] // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 2019. — V. 184. — P. 109626.

22. *Spott S.* Fish maintenance in closed systems. — M.: Legkaya i pishchevaya promyshlennost (Light and food industry), 1983. — 192 p.

23. *Liew H. J.* Low water pH depressed growth and early development of giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii larvae / H. J. Liew, S. Rahmah, P. W. Tang [et al.] // Heliyon. — 2022. — V. 8. — e09989.

24. *Jamshidizadeh S.* Response of Pacific white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on exposure to aflatoxin in feed / S. Jamshidizadeh, N. Amrollahi Biuki, M. Yousefzadi [et al.] // Aquac. Res. — 2019. — V. 50. — P. 1973—1984.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

V. I. Egorova — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Hydrobiology and General Ecology;

V. N. Kryuchkov — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Hydrobiology and General Ecology;

I. V. Volkova — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Hydrobiology and General Ecology.

The article was submitted 24.01.2025.

Научная статья
УДК 616:[615:577.21:591.1]:636.4

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА ПРОСТИМУЛ НА СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПОРОСЯТ ПРИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Евгений Владимирович Михайлов[*]✉, Павел Андреевич Паршин[*], Виктор Алексеевич Шутиков[*], Борис Викторович Шабунин[*], Николай Алексеевич Стрельников[*], Дмитрий Игоревич Шабанов[*], Дмитрий Александрович Саврасов[**], Татьяна Игоревна Ермакова[*], Владимир Анатольевич Прокулевич[***]

[*]*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, voronezh81@rambler.ru*✉
[**]*Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия*
[***]*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Аннотация. В статье приведены результаты исследований по изучению влияния комплексного препарата Простимул, содержащего в своем составе рекомбинантный цитокин первого типа в и витамины А, Е и С, на ферментативное звено антиоксидантной защиты, а также относительный уровень экспрессии генов антиоксидантного статуса поросят на фоне технологического стресса, обусловленного отъемом их от свиноматок. Препарат Простимул применяли поросятам опытной группы (n = 15) на 15—16 день жизни внутримышечно в дозе 1,0 см^3 на 10 кг живой массы двукратно с интервалом 48 часов. По результатам исследований установлено, что препарат Простимул оказывал антиоксидантный эффект за счет содержания в составе витаминов, обладающих антирадикальной активностью в отношении продуктов перекисного окисления. Антиоксидантная система организма поросят опытной группы обеспечивала более эффективную защиту по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: поросята, Простимул, антиоксидантная система, ферменты, экспрессия генов, технологический стресс, отъемный стресс

Технологический стресс в животноводстве является серьезной проблемой, которая снижает темпы развития отрасли и наносит ощутимый экономический ущерб сельскому хозяйству. Считается, что стресс-реакция неизбежно связана с активацией процессов свободнорадикального окисления и накоплением в организме большого количества побочных продуктов, как правило, на фоне депрессивного состояния системы антиоксидантной защиты. Эти продукты представляют собой токсичные соединения с высокой реакционной способностью. Именно их воздействие на клетки и ткани животного в настоящее время рассматривается как пусковой механизм в развитии многих патологий [1]. На фоне выраженного физиологического истощения под воздействием стресс-факторов на организм продуктивных животных необходимо проведение фармакологической коррекции, направленной на устранение последствий свободнорадикальных реакций, окислительного дисбаланса в организме [2]. Применение крупному рогатому скоту при технологическом стрессе для коррекции стрессовых состояний препаратов, в состав которых входили витамины, способствовало нормализации уровня кортизола в крови, тем самым, обеспечивая антистрессовый эффект. Препараты влияли на активность антиоксидантных ферментов и количество глутатиона в крови, что в конечном итоге приводило к снижению в крови количества диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и флуоресцирующих оснований Шиффа [3]. По данным проведенных нами ранее исследований, было установлено, что применение препарата Простимул поросятам, находящимся под сви-

номаткой, оказывало положительное влияние на антиоксидантный статус, что положительно сказывалось на адаптивных способностях организма поросят [4]. Подводя итог вышесказанному, стоит отметить, что изучение влияния комплексных препаратов на основе интерферонов и витаминов на систему антиоксидантной защиты при технологическом стрессе остается актуальным.

Целью проведенных исследований являлась оценка влияния препарата Простимул на систему антиоксидантной защиты организма поросят при технологическом стрессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для эксперимента по оценке влияния препарата Простимул, на ферментативное звено иммунной системы, относительный уровень экспрессии генов антиоксидантного статуса поросят в критический период выращивания (отъем и перевод на доращивание), в промышленном свиноводческом хозяйстве Воронежской области были подобраны животные в возрасте 15—16 дней в количестве 30 голов.

Работа была выполнена в соответствии с требованиями действующих международных и российских законодательных актов о гуманном обращении с животными, используемыми в научных целях, а также комиссии института по биоэтике.

В 15—16-дневном возрасте от поросят (n = 30) перед переводом в группу доращивания была взята кровь для фонового исследования. После чего животные были разделены на две группы по 15 голов в каждой: опытная и контрольная.

На 15—16 день жизни животным опытной группы (n = 15) применяли Простимул внутримышечно в дозе 1,0 см^3 на 10 кг живой массы двукратно с интервалом 48 часов. Поросятам контрольной группы (n = 15) препарат не применяли.

После определения фоновых показателей от животных каждой группы пробы крови для лабораторных исследований были отобраны трехкратно: через 12 часов после второго введения препарата Простимул, сразу же после перевода на доращивание (при переводе) и через 48 часов после перевода (после перевода).

Исследование показателей ферментативного звена антиоксидантной защиты (активность глутатионпероксидазы, кататалазы и супероксиддисмутазы) проведено в соответствии с «Методическими положениями по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма» [5].

Полимеразную цепную реакцию осуществляли на приборах Bio-Rad CFX 96 (Bio-rad, США), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и DTLite 4S1 (ДНК-Технология, Россия) с готовой коммерчески доступной смесью для PCR5X qPCRmix-HS LowROX (Евроген, Россия). Выделение тотальной РНК осуществлено набором «РНК-Экстран» (Синтол, Россия) по утвержденной инструкции. Оценку качества выделенной РНК проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле. Исследование проводили посредством ПЦР-анализа с добавлением красителя SYBR Green. Для оценки экспрессии изучаемых генов использовалась панели специфичных праймеров для исследования уровней экспрессии генов, ответственных за иммунитет и обмен веществ (табл. 1).

При проведении статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica v6.1. Для оценки достоверности результатов был применен критерий Стьюдента.

Таблица 1

Праймеры, используемые при постановке ПЦР в реальном времени

№	Название	Последовательность нуклеотидов
1	SOD1f SOD1r	GAGACCTGGGCAATGTGACT CTGCCCAAGTCATCTGGTTT
2	GPX1f GPX1r	CAGGTACAGCCGTCGCTTTC AAAATCCCGAGAGTAGCACTGTAAC
3	CATf CATr	CTTGGAACATTGTACCCGCT GTCCAGAAGAGCCTGAATGC

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенного исследования установлено, что применение препарата Простимул индуцирует повышение активности глутатионпероксидазы (ГПО) — селеносодержащего фермента, катализирующего превращение пероксида водорода и органических гидропероксидов до гидросоединений (рис. 1). Так, в обеих исследуемых группах перед переводом на доращивание отмечается увеличение ее активности: в 3,5 раза в опытной группе, в 2,2 — в контрольной группе относительно фонового исследования, что обусловлено подготовкой животных к отъему. Далее по ходу опыта происходило постепенное снижение активности фермента. После перевода на доращивание активность ГПО в опытной группе была выше на 69,6 % ($p < 0,05$) относительно группы контроля.

При исследовании активности каталазы (КФ 1.11.1.6), препятствующей накоплению в клетках перекиси водорода, было отмечено резкое снижение активности данного фермента в опытной группе через 12 часов после последнего применения препарата Простимул на 40,1 % ($p < 0,05$) относительно показателей фона. В то же время в контрольной группе данный показатель снизился лишь на 4,2 % (рис. 2). Перед отъемом в опытной группе регистрировали увеличение активности каталазы на 22,1 % ($p < 0,05$). После перевода на доращивание активность каталазы в опытной и контрольной группе не имела достоверных различий. После применения препарата Простимул наблюдалось снижение активности каталазы в сыворотке крови, что может указывать на повышенный расход фермента при нейтрализации накопленных первичных продуктов пероксидации вследствие технологического стресса.

Исследование супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1), занимающей центральное место в системе ферментной антиоксидантной защиты организма (рис. 3), показало увеличение ее активности в контрольной и опытной группах до перевода на 7,2 и 17,8 %, соответственно, относительно фона. При переводе на доращивание активность СОД в обеих группах снизилась на 4,5 и 12,7 %. После перевода на доращивание в контрольной группе отмечали повышение активности фермента на 16,1 % относительно показателей до перевода.

В то же время в опытной группе увеличение составило 2,2 % относительно показателей до перевода. При этом после перевода на доращивание разница между контролем и опытом составила 23,4 % ($p < 0,05$).

Биомаркерами для оценки окислительного статуса свиней являются антиоксидантные ферменты, такие как ГПО, которая способна восстанавливать перекись водорода и органические гидропероксиды, помогая контролировать активные формы кислорода (АФК) [6, 7].

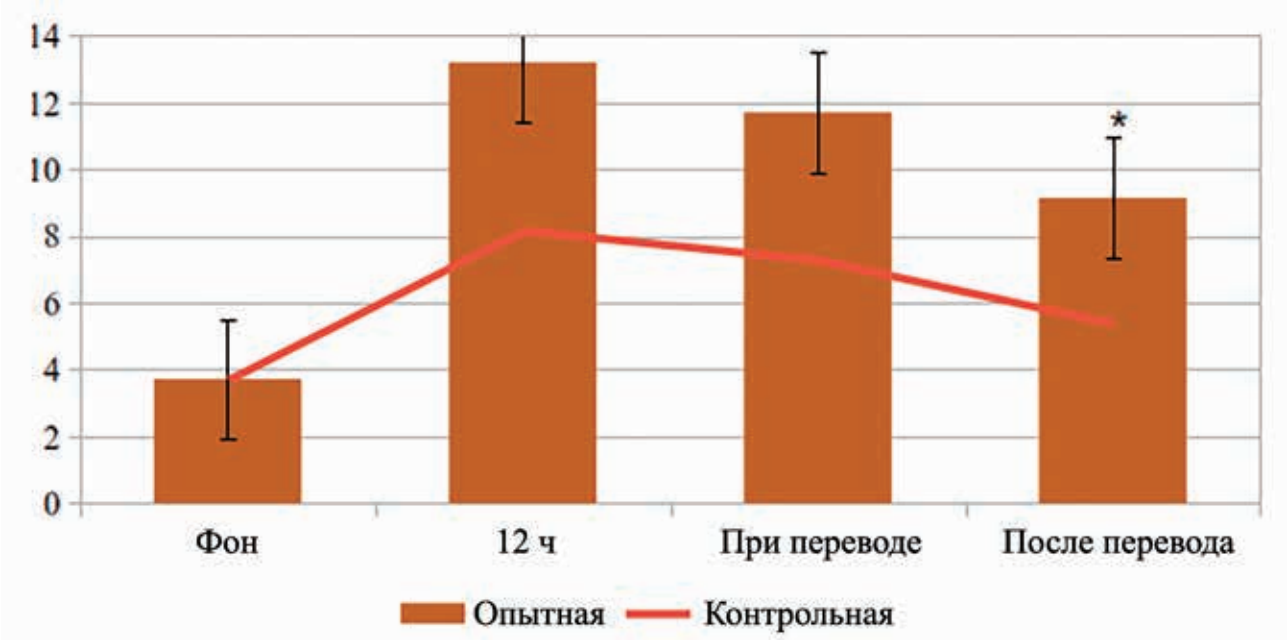


Рис. 1. Динамика активности ГПО у поросят в течение опыта, мкмоль восст глут./л·мин

$M \pm m$ (среднее арифметическое ± ошибка среднего арифметического)

* статистически значимые различия при $p < 0,05$ относительно контрольной группы

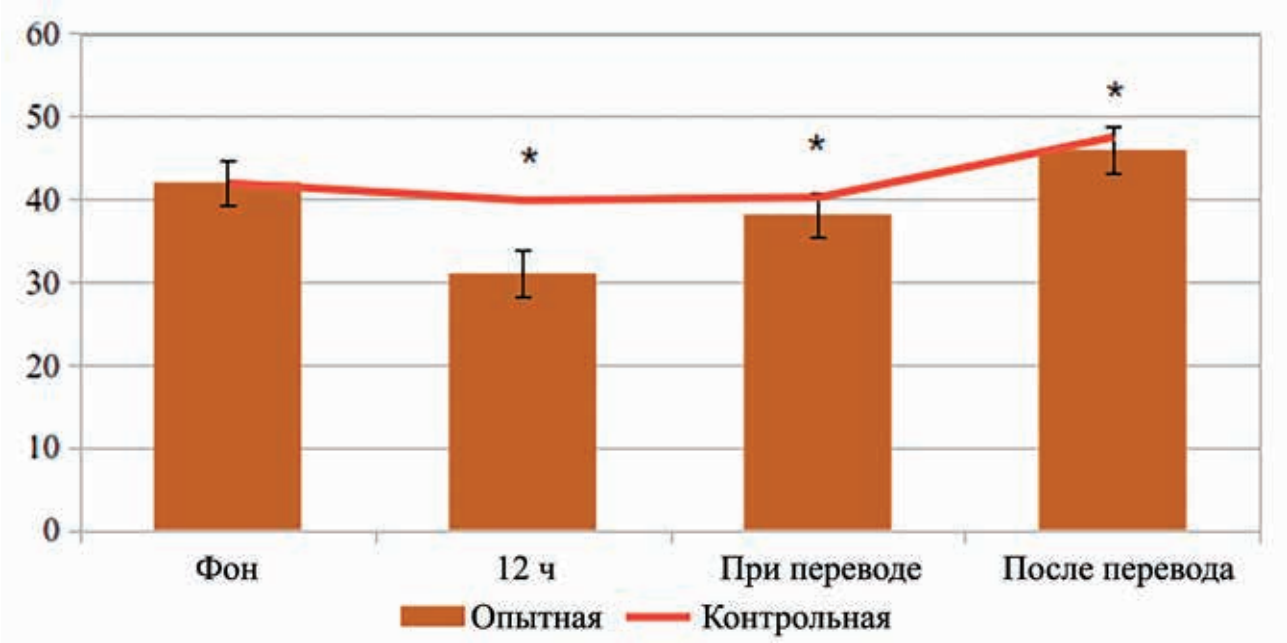


Рис. 2. Динамика активности каталазы у поросят в течение опыта, мкмоль вост. перекиси/л·мин

M ± *m* (среднее арифметическое ± ошибка среднего арифметического)

* статистически значимые различия при $p < 0,05$ относительно контрольной группы

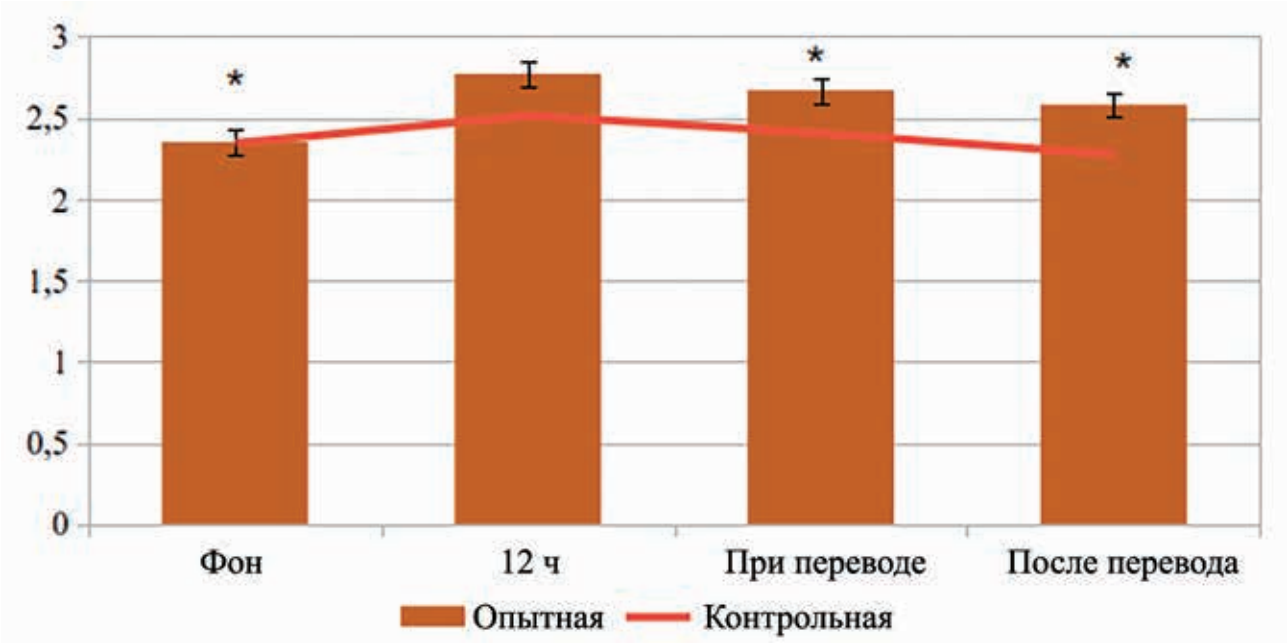


Рис. 3. Динамика активности СОД у поросят исследуемых групп в течение опыта, ед.акт./мг Hb

M ± *m* (среднее арифметическое ± ошибка среднего арифметического)

* статистически значимые различия при $p < 0,05$ относительно контрольной группы

Активность ГПО используется в качестве индикатора антиоксидантного статуса, СОД является важным ферментом, который катализирует дисмутацию супероксида в кислород и пероксид водорода, а каталаза катализирует превращение пероксида водорода в воду и кислород.

Активность и экспрессия этих ферментов обычно используется в качестве антиоксидантных биомаркеров, поскольку они являются первым ответом на окислительный вызов, являясь превентивным типом антиоксидантной сетевой системы [8].

При фоновых исследованиях уровня экспрессии генов антиоксидантного статуса наиболее активно экспрессировался ген глутатионпероксидазы 1 (GPx1): он был в 15,5 раз активнее каталазы (CAT) и в 26,1 раза больше уровня экспрессии супероксиддисмутазы 1 (SOD1) (рис. 4).

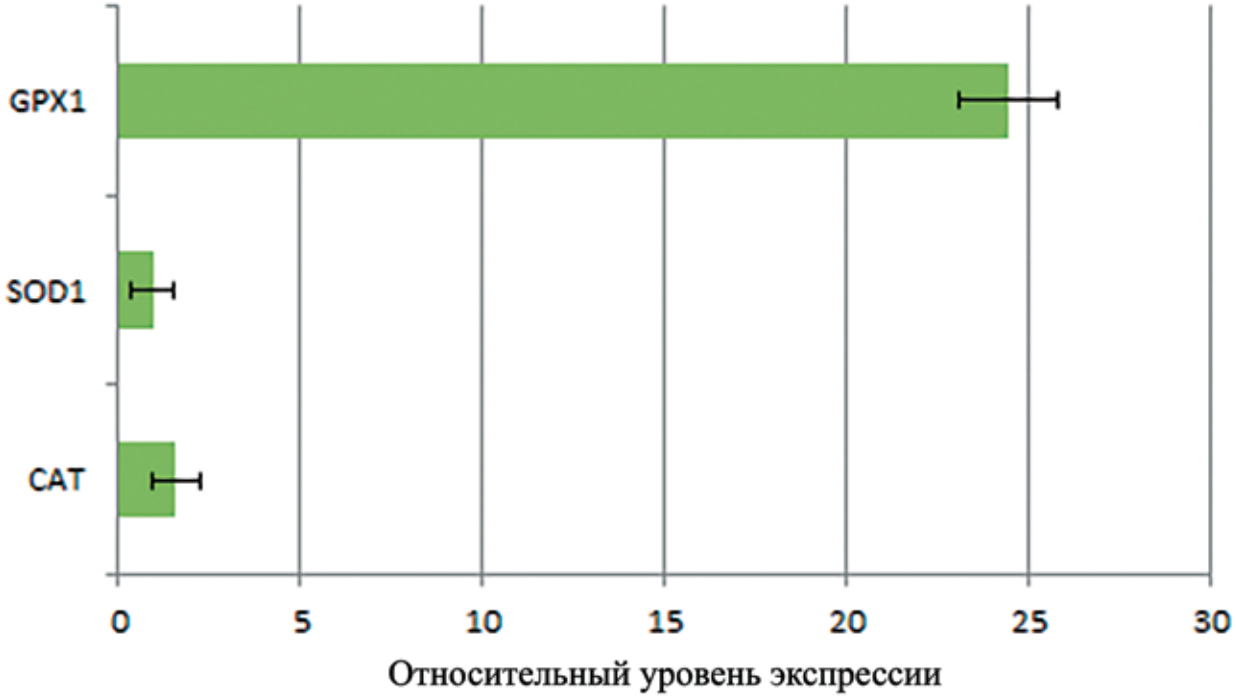


Рис. 4. Экспрессия генов антиоксидантного статуса поросят при фоновом исследовании

Через 12 часов после повторного применения препарата Простимул отмечено, что экспрессия гена CAT в опытной группе имела тенденцию к снижению на 83,1 %, в сравнении с группой контроля. Через 48 часов после повторного применения препарата Простимул в опытной группе по сравнению с контролем активность гена CAT также наблюдалась тенденция к снижению в 3,2 раза относительно контрольной группы. Активность гена SOD1 через 12 часов после применения препарата Простимул не претерпела значительных изменений, при этом уровень его экспрессии через 48 часов достоверно повысился на 67,4 % ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. Относительно остальных генов наблюдалась тенденция к повышению активности гена GPx1 в опытной группе через 12 часов после применения препарата на 81,6 % в сравнении с контролем, а через 48 часов после применения активность гена GPx1 достоверно снизилась на 35,7 % ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой (рис. 5—7). Через 48 часов после повторного применения препарата Простимул дисбаланс в системе антиоксидантной защиты сохранялся, однако на первую «роль» вместо гена GPX1 вышел ген SOD1, который в свою очередь ингибирует запрограммированную клеточную гибель, что на наш взгляд связано с индуцированием защитно-приспособительных и компенсаторных реакций организма [7, 9].

Подобные изменения на наш взгляд могут свидетельствовать об общем нарушении окислительного баланса на фоне стресс-фактора, такого как перегруппировка животных, когда экспрессия одних генов снижается, что лишает организм возможности нейтрализовать АФК, в результате чего развивается окислительный стресс при подавлении антиоксидантной защиты, а экспрессия других генов повышается (в случае с GPX1) в рамках компенсаторной реакции для купирования деструктивного действия АФК и сохранения антиоксидантной системы в корректно функционирующем состоянии [10—12].

Препарат Простимул способствует данному ингибированию негативных процессов АФК и поддержанию антиоксидантной защиты на должном уровне за счет антирадикальной активности, кото-

рую обеспечивает комплекс витаминов А, Е и С, входящих в его состав. Возможно, рекомбинантные цитокины типа I, входящие в его состав, также оказывают модулирующее действие на антиоксидантную систему, поскольку в нескольких исследованиях показана индукция экзогенными интерферономи экспрессии белков антиоксидантной защиты [13, 14].

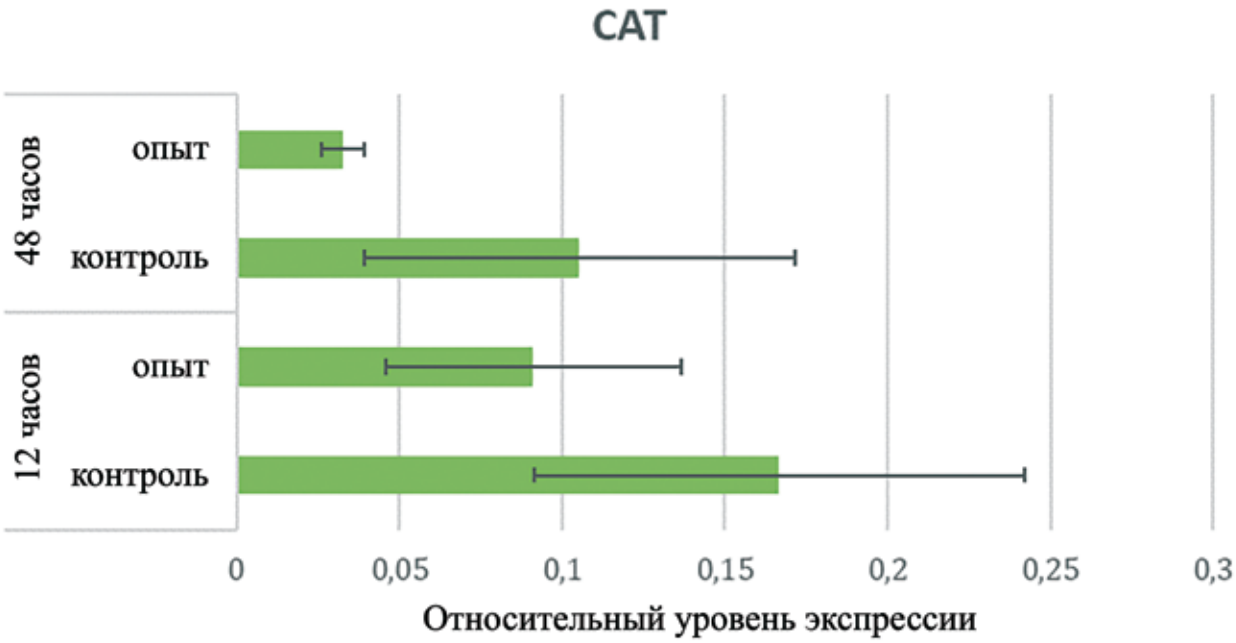


Рис. 5. Экспрессия гена CAT после применения препарата Простимул

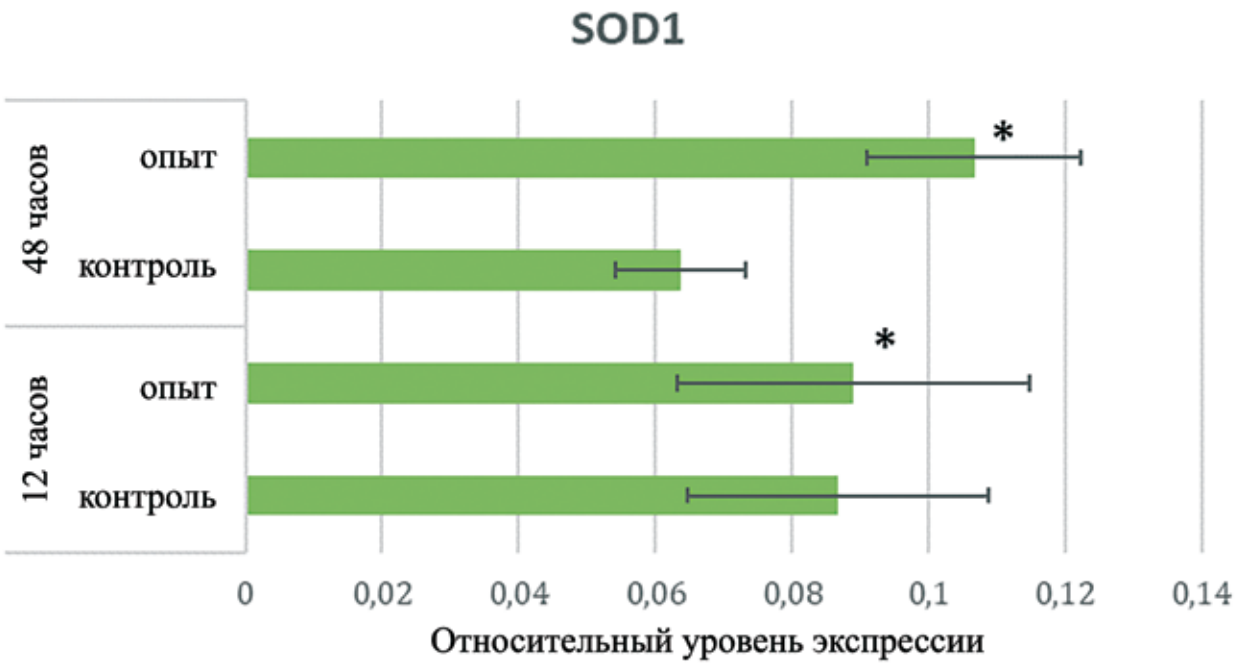


Рис. 6. Экспрессия гена SOD1 после применений препарата Простимул

* статистически значимые различия при $p < 0,05$ относительно контрольной группы через 48 ч эксперимента

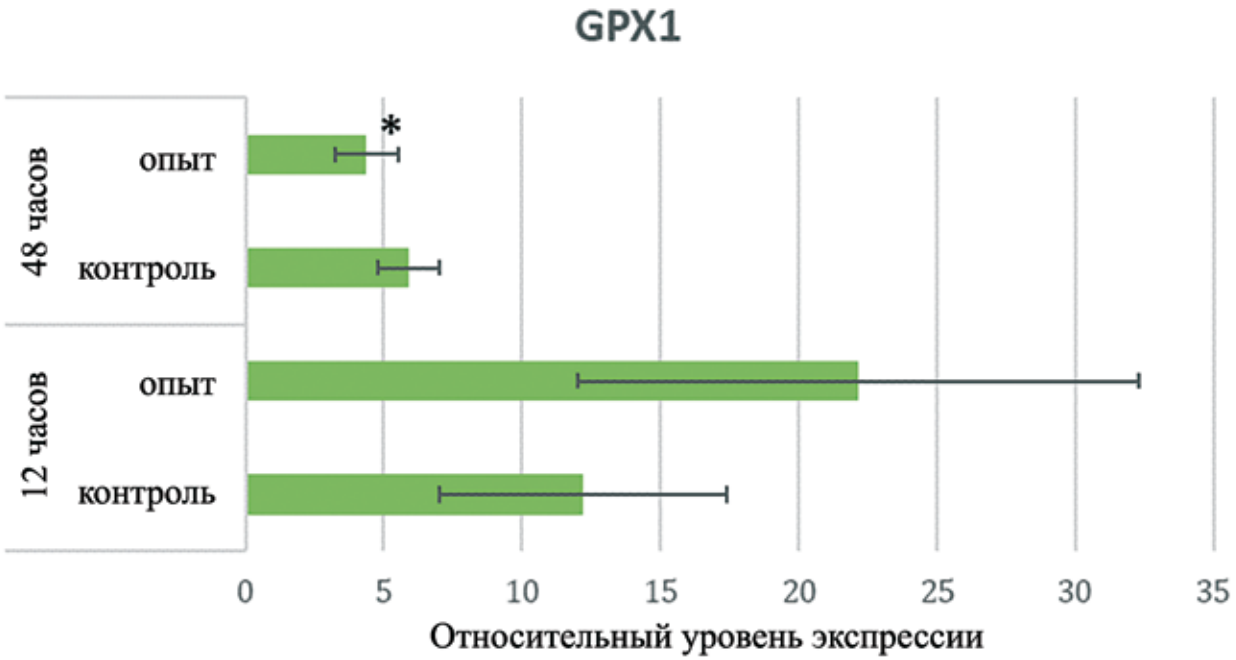


Рис. 7. Экспрессия гена GPX1 после применения препарата Простимул

* статистически значимые различия при $p < 0,05$ относительно контрольной группы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перевод на доращивание является технологическим стресс-фактором, который способствует истощению ферментативного звена системы АОЗ и развитию оксидативного стресса у животных. Полученные нами данные показывают, что препарат Простимул оказывает антиоксидантный эффект за счет содержания в составе витаминов, обладающих антирадикальной активностью в отношении продуктов перекисного окисления. Антиоксидантная система поросят опытной группы обеспечивала более эффективную защиту по сравнению с контрольной группой. Возможно, для восстановления антиоксидантного статуса требуется больше времени и дальнейшие исследования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Киреев И. В.*, *Оробец В. А.* Фармакологическая профилактика технологического стресса у овец // АВУ. 2018. № 1 (168).

2. *Ланец О. В.*, *Гринь В. А.*, *Семененко М. П.*, *Кузьминова Е. В.* Фармакокоррекция метаболического и антиоксидантного профиля коров в ранний послеотельный период // Известия НВ АУК. 2021. № 3 (63).

3. Киреев Иван Валентинович, Оробец Владимир Александрович Состояние системы антиоксидантной защиты коров в условиях технологического стресса // Ветеринарная патология. 2017. № 2 (60).

4. Влияние комплексного препарата «Простимул» на функциональную группу лимфоцитов и эндокринную систему поросят-гипотрофиков в неонатальный период / Е. В. Михайлов, Д. А. Саврасов, В. А. Шутиков [и др.] // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. — 2024. — № 4(52). — С. 613—621. — DOI 10.36871/vet.san.hyg.ecol.202404018. — EDN DRPIIQ

5. Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма / М. И. Рецкий, С. В. Шабунин, Г. Н. Близнецова [и др.]. — Воронеж: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Российской академии сельскохозяйственных наук, 2010. — 70 с.

6. *Dalto D. B.*, *Lapointe J.*, *Matte J. J.* Assessment of antioxidative and selenium status by selenodependent glutathione peroxidase activity in different blood fractions using a pig model: issues for clinical nutrition and research // Journal of animal physiology and animal nutrition. — 2018. — Т. 102. — № . 1. — С. 184—193.

7. *Guevara R. D.* et al. Physiology, gene expression, and behavior as potential indicators of oxidative stress in piglets // BMC Veterinary Research. — 2024. — v. 20. — p. 471.

8. *Marrocco I.*, *Altieri F.*, *Peluso I.* Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans //Oxidative medicine and cellular longevity. — 2017. — Т. 2017. — № . 1. — С. 6501046.

9. *Nathan C.*, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species // Nature Reviews Immunology. — 2013. — T. 13. — № 5. — p. 349—361

10. *Lee S. I.*, *Kang K. S.* Function of capric acid in cyclophosphamide-induced intestinal inflammation, oxidative stress, and barrier function in pigs // Scientific reports. — 2017. — T. 7. — № . 1. — p. 16530;

11. *Bhattacharyya A.* et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases // Physiological reviews. — 2014. — T. 94. — № . 2. — p. 329—354.

12. *Yin J.* et al. Birth oxidative stress and the development of an antioxidant system in newborn piglets // Free radical research. — 2013. — T. 47. — № . 12. — p. 1027—1035.

13. *Chen X.*, *Choi I. Y.*, *Chang T. S.*, *Noh Y. H.*, *Shin C. Y.*, *Wu C. F.*, *Ko K. H.*, *Kim W. K.*. Pretreatment with interferon-gamma protects microglia from oxidative stress via up-regulation of Mn-SOD // Free Radic. Biol. Med. — 2009. — 46(8). — p. 1204—1210.

14. *Damiano S.*, *Sasso A.*, De *Felice B.*, *Terrazzano G.*, *Bresciamorra V.*, *Carotenuto A.*, *Orefice N. S.*, *Orefice G.*, *Vacca G.*, *Belfiore A.*, *Santillo M.*, *Mondola P.* The IFN-β 1b effect on Cu Zn superoxide dismutase (SOD1) in peripheral mononuclear blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients and in neuroblastoma SK-N-BE cells // Brain Research Bulletin. — 2015. — Vol. 118. — P. 1—6.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. В. Михайлов — кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем;

П. А. Паршин — доктор ветеринарных наук, профессор, директор ФГБНУ «ВНИВИПФиТ»;

В. А. Шутиков — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики;

Б. В. Шабунин — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем;

Н. А. Стрельников — младший научный сотрудник лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики;

Д. И. Шабанов — научный сотрудник лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем;

Д. А. Саврасов — заведующий кафедрой терапии и фармакологии, кандидат ветеринарных наук, доцент;

Т. И. Ермакова — кандидат биологических наук;

В. А. Прокулевич — доктор биологических наук, профессор.

Статья поступила в редакцию 28.01.2025.

Original article
UDC 616:[615:577.21:591.1]:636.4

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF THE DRUG PROSTIMUL ON THE ANTIOXIDANT PROTECTION SYSTEM OF PIGLETS UNDER TECHNOLOGICAL STRESS

Evgeniy Vladimirovich Mikhaylov[*]✉, Pavel Andreevich Parshin[**], Viktor Alekseevich Shutikov[*], Boris Viktorovich Shabunin[*], Nikolay Alekseevich Strelnikov[*], Dmitriy Igorevich Shabanov[*], Dmitriy Aleksandrovich Savrasov[**], Tatyana Igorevna Ermakova[*], Vladimir Anatolyevich Prokulevich[***]

[*]All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, voronezh81@rambler.ru✉
[**]Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia
[***]Belarusian State University, Minsk, Belarus

Abstract. The article presents the results of studies on the effect of the complex drug Prostimul containing recombinant type I cytokine B and vitamins A, E and C on the enzymatic link of antioxidant protection, as well as the relative level of expression of genes of the antioxidant status of piglets against the background of technological stress caused by weaning them from sows. The drug Prostimul was administered to the piglets of the experimental group (n = 15) on day 15—16 of life intramuscularly at a dose of 1.0 cm^3 per 10 kg of live weight twice with an interval of 48 hours. According to the results of the studies, it was established that the drug Prostimul had an antioxidant effect due to the content of vitamins with antiradical activity against peroxidation products. The antioxidant system of the body of the piglets of the experimental group provided more effective protection, compared to the control group.
Keywords: piglets, Prostimul, antioxidant system, enzymes, gene expression, technological stress, weaning stress

Technological stress in animal husbandry is a serious problem that reduces the rate of the industry development and causes significant economic damage to agriculture. It is believed that the stress reaction is inevitably associated with the activation of free radical oxidation processes and the accumulation of a large number of by-products in the body, usually against the background of a depressive state of the antioxidant defense system. These products are toxic compounds with a high reactivity. It is their effect on animal cells and tissues that is currently considered a trigger in the development of many pathologies [1]. Against the background of a pronounced physiological exhaustion under the effect of stress factors on the body of productive animals, it is necessary to carry out pharmacological correction aimed at eliminating the effects of free radical reactions, oxidative imbalance in the body [2]. The use of drugs containing vitamins in cattle under technological stress to correct stress conditions contributed to the normalization of cortisol levels in the blood, thereby providing an anti-stress effect. The drugs affected the activity of antioxidant enzymes and the amount of glutathione in the blood, which ultimately led to a decrease in the amount of diene conjugates, malondialdehyde and fluorescent Schiff bases in the blood [3]. According to our previous studies, it was found that the use of Prostimul in piglets under sow had a positive effect on the antioxidant status, which had a positive effect on the adaptive abilities of the piglets' body [4]. To summarize the above, it is worth noting that the study of the effect of complex drugs based on interferons and vitamins on the antioxidant defense system under technological stress remains relevant.

The objective of the studies was to assess the effect of Prostimul on the antioxidant defense system of piglets under technological stress.

MATERIAL AND METHODS

For the experiment to assess the effect of the drug Prostimul on the enzymatic link of the immune system, the relative level of expression of genes of the an-

tioxidant status of piglets during the critical period of rearing (weaning and transfer to rearing), 30 animals aged 15—16 days were selected at an industrial pig breeding farm in Voronezh region.

The work was carried out in accordance with the requirements of current international and Russian legislative acts on the humane treatment of animals used for scientific purposes, as well as the Institute's commission on bioethics.

At the age of 15—16 days, blood was taken from piglets (n = 30) for baseline testing before being transferred to the rearing group. After that, the animals were divided into two groups of 15 animals each (experimental and control).

On day 15—16 of life, the animals in the experimental group (n = 15) were given Prostimul intramuscularly at a dose of 1.0 cm^3 per 10 kg of live weight twice with an interval of 48 hours. The piglets in the control group (n = 15) were not given the drug.

After determining the baseline indicators, blood samples for laboratory tests were taken from the animals of each group three times: 12 hours after the second administration of Prostimul, immediately after transfer to rearing (upon transfer) and 48 hours after transfer (after transfer).

The study of the indicators of the enzymatic link of antioxidant protection (activity of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase) was carried out in accordance with the Methodological Provisions for the Study of Free Radical Oxidation Processes and the Antioxidant Defense System of the Body [5].

Polymerase chain reaction was performed on Bio-Rad CFX 96 (Bio-rad, USA), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia) and DTLite 4S1 (DNA-Technology, Russia) devices with a ready-to-use commercially available PCR mixture 5X qPCRmix-HS LowROX (Evrogen, Russia). Total RNA was isolated using the RNA-Extran kit (Synthol, Russia) according to the approved instructions. The quality of the isolated RNA was assessed using electrophoresis in a 2 % agarose gel. The study was carried out using PCR analysis with the addition of SYBR Green dye. To assess the expression of the studied genes, a panel of specific primers was used to study the expression levels of genes responsible for immunity and metabolism (Table 1).

Table 1

Primers used in real-time PCR

No.	Name	Nucleotide sequence
1	SOD1f SOD1r	GAGACCTGGGCAATGTGACT CTGCCCAAGTCATCTGGTTT
2	GPX1f GPX1r	CAGGTACAGCCGTCGCTTTC AAAATCCCGAGAGTAGCACTGTAAC
3	CATf CATr	CTTGGAACATTGTACCCGCT GTCCAGAAGAGCCTGAATGC

The statistical data processing was performed using the Statistica v6.1 software package. The Student's t-test was used to assess the reliability of the results.

STUDY RESULTS

The study has shown that the use of Prostimul induces an increase in the activity of glutathione peroxidase (GPO), a selenium-containing enzyme that catalyzes the conversion of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides to hydrocompounds (Fig. 1). Thus, in both study groups, before transfer to rearing, an increase in its activity was noted: by 3.5 times in the experimental group, by 2.2 times in the control group relative to the baseline study, which was due to the preparation of animals for weaning. Then, in the course of the experiment, there was a gradual decrease in enzyme activity. After transfer to rearing, GPO activity in the experimental group was by 69.6 % higher ($p < 0.05$), relative to the control group.

When studying the activity of catalase (KF 1.11.1.6), which prevents the accumulation of hydrogen peroxide in cells, a sharp decrease in the activity of this enzyme was noted in the experimental group 12 hours after the last use of Prostimul by 40.1 % ($p < 0.05$) relative to the baseline values.

At the same time, in the control group this indicator decreased by only 4.2 % (Fig. 2). Before weaning, an increase in catalase activity by 22.1 % ($p < 0.05$) was recorded in the experimental group. After transfer to rearing, catalase activity in the experimental and

control groups did not differ significantly. After using Prostimul, a decrease in catalase activity in the blood serum was observed, which may indicate an increased consumption of the enzyme during the neutralization of accumulated primary peroxidation products due to technological stress.

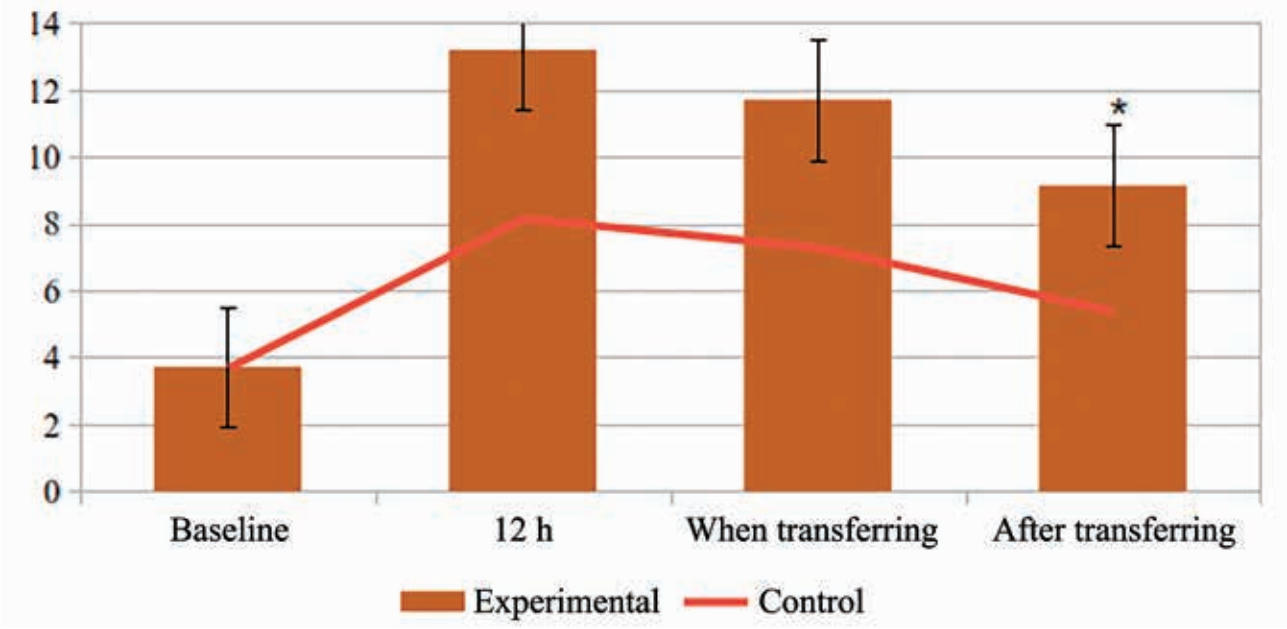


Fig. 1. Dynamics of GPO activity in piglets during the experiment, μmol reduced glut./L·min
$M \pm m$ (arithmetic mean ± error of the arithmetic mean)
* statistically significant differences at $p < 0.05$ relative to the control group

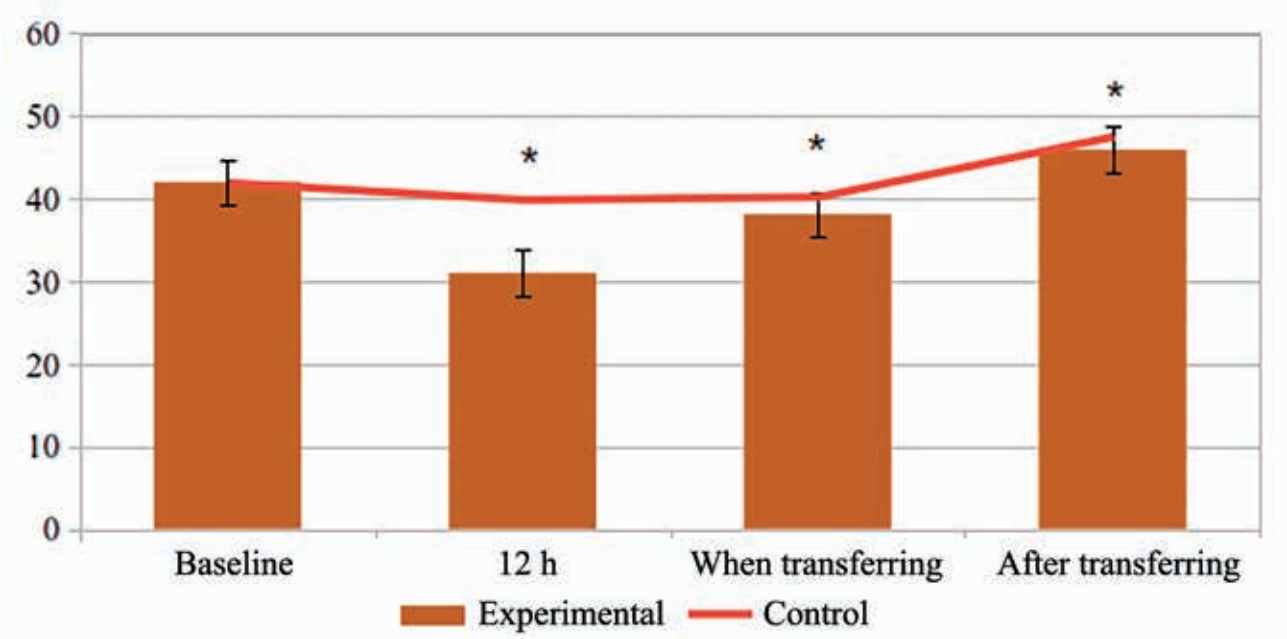


Fig. 2. Dynamics of catalase activity in piglets during the experiment, μmol of reduced peroxide/L·min
$M \pm m$ (arithmetic mean ± error of the arithmetic mean)
* statistically significant differences at $p < 0.05$ relative to the control group

The study of superoxide dismutase (SOD) (KF 1.15.1.1), which occupies a central place in the enzymatic antioxidant defense system of the body (Fig. 3), showed an increase in its activity in the control and experimental groups before the transfer by 7.2 and 17.8 %, respectively, relative to the baseline. When

transferred to rearing, SOD activity in both groups decreased by 4.5 and 12.7 %. After transfer to rearing, an increase in enzyme activity by 16.1 % was noted in the control group relative to the values before the transfer.

At the same time, in the experimental group, the increase was 2.2 % relative to the values before the transfer. Moreover, after the transfer to rearing, the difference between the control and the experiment was 23.4 % ($p < 0.05$).

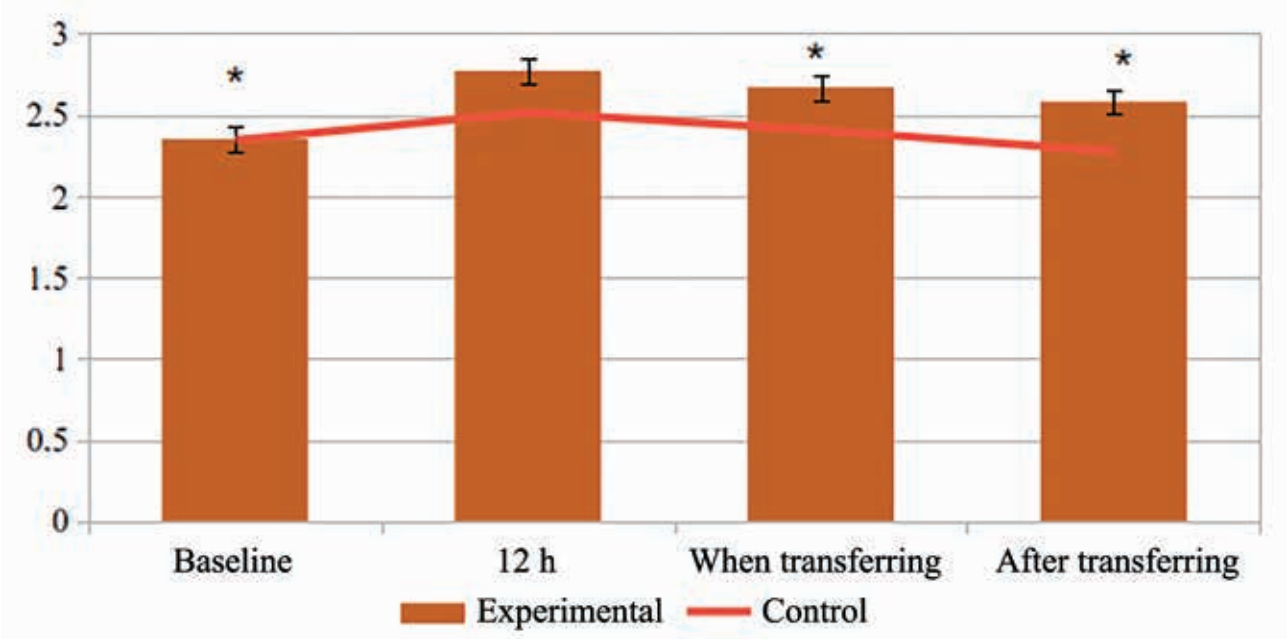


Fig. 3. Dynamics of SOD activity in piglets of the studied groups during the experiment, act. units/mg Hb
$M \pm m$ (arithmetic mean ± error of the arithmetic mean)
* statistically significant differences at $p < 0.05$ relative to the control group

Biomarkers for assessing the oxidative status of pigs include antioxidant enzymes such as GPO, which is capable of reducing hydrogen peroxide and organic hydroperoxides, helping to control reactive oxygen species (ROS) [6, 7]. GPO activity is used as an indicator of antioxidant status, SOD is an important enzyme that catalyzes the dismutation of superperoxide into oxygen and hydrogen peroxide, and catalase catalyzes the conversion of hydrogen peroxide into water and oxygen. The activity and expression of these enzymes are commonly used as antioxidant biomarkers, since they are the first response to oxidative challenge, being a preventive type of antioxidant network system [8].

In baseline studies of the expression level of antioxidant status genes, the most actively expressed gene was glutathione peroxidase 1 (GPx1): it was by 15.5 times more active than catalase (CAT) and by 26.1 times higher than the expression level of superoxide dismutase 1 (SOD1) (Fig. 4).

Twelve hours after repeated administration of Prostimul, it was noted that the expression of the CAT gene in the experimental group tended to decrease by 83.1 %, compared to the control group. Forty-eight hours after repeated administration of Prostimul, the activity of the CAT gene in the experimental group also tended to decrease by 3.2 times, compared to the control group.

The activity of the SOD1 gene did not change significantly 12 hours after administration of Prostimul, while its expression level significantly increased by 67.4 % ($p < 0.05$), compared to the control group in 48 hours. Regarding the remaining genes, there was a tendency for the activity of the GPx1 gene to increase in the experimental group by 81.6 % 12 hours after administration of the drug, compared to the control, and in 48 hours after administration, the activity of the GPx1 gene significantly decreased by 35.7 % ($p < 0.05$), compared to the control group (Fig. 5—7). 48 hours after repeated use of the drug Prostimul, the imbalance in the antioxidant defense system remained, but the SOD1 gene took over the first "role" instead of the GPX1 gene, which in turn inhibited programmed cell death, which in our opinion was associated with the induction of protective-adaptive and compensatory reactions of the body [7, 9].

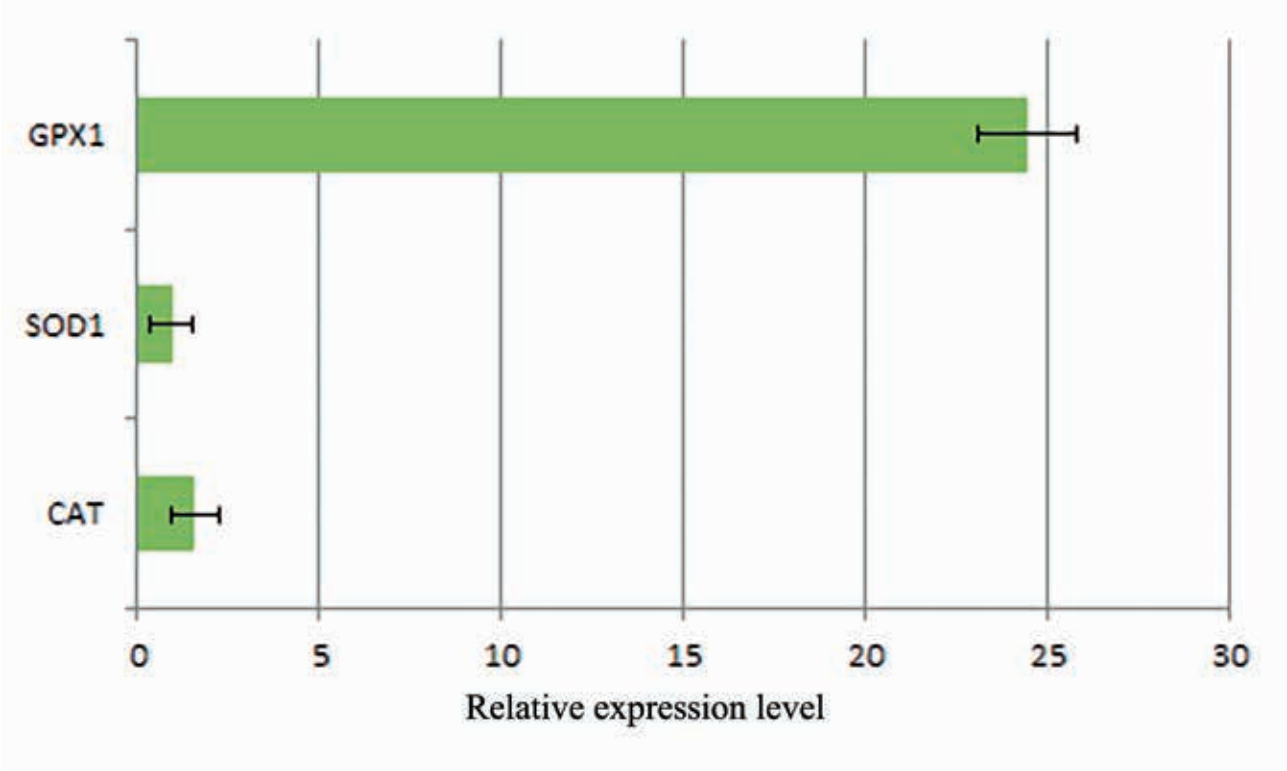


Fig. 4. Expression of genes of antioxidant status in piglets during baseline study

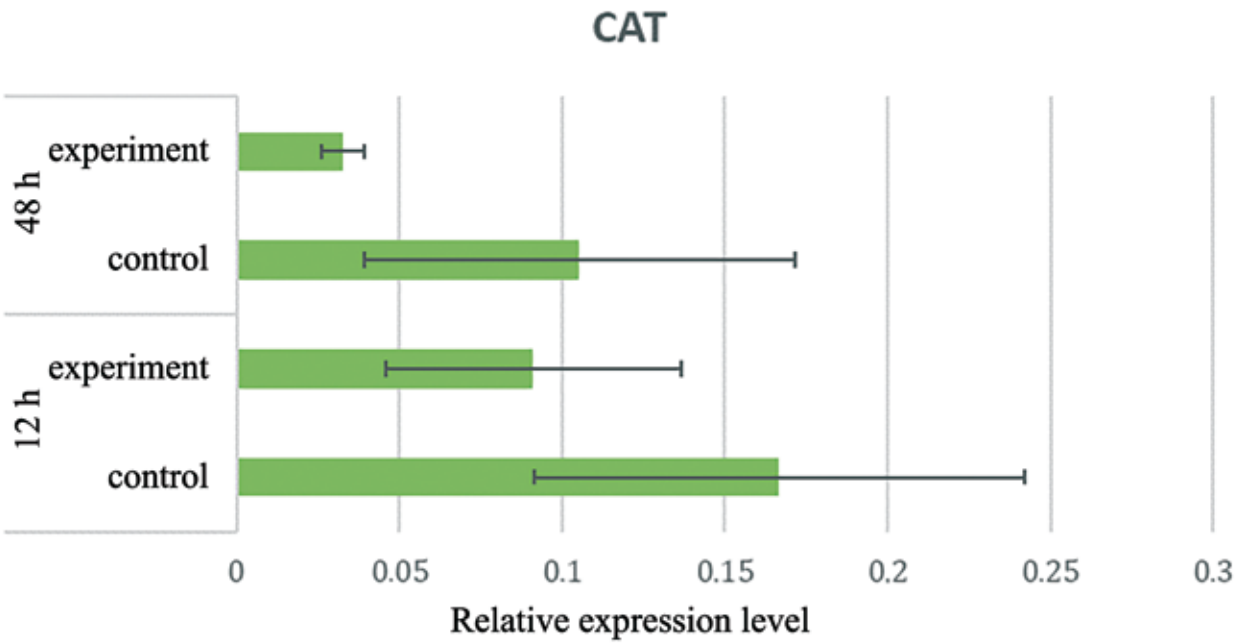


Fig. 5. Expression of the CAT gene after the use of the drug Prostimul

In our opinion, such changes may indicate a general disturbance of the oxidative balance against the background of a stress factor, such as the rearrangement of animals, when the expression of some genes decreases, which deprives the body of the ability to neutralize ROS, resulting in oxidative stress when antioxidant defense is suppressed, and the expression of other genes increases (in the case of GPX1) as part of

a compensatory reaction to stop the destructive effect of ROS and maintain the antioxidant system in a properly functioning state [10—12]. The drug Prostimul contributes to this inhibition of negative ROS processes and maintaining antioxidant protection at the proper level due to the antiradical activity provided by the complex of vitamins A, E and C included in its composition. Perhaps, the recombinant type I cytokines included in its composition also have a modulating effect on the antioxidant system, since several studies have shown the induction of expression of antioxidant defense proteins by exogenous interferons [13, 14].

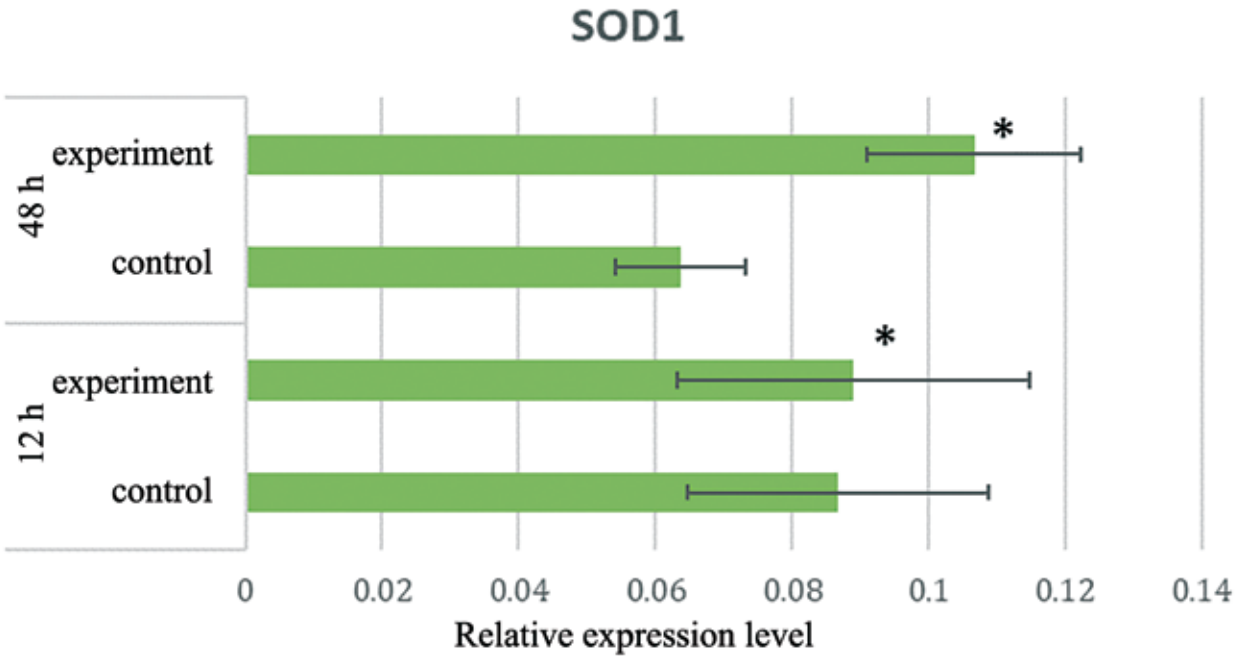


Fig. 6. Expression of the SOD1 gene after the use of the drug Prostimul

* statistically significant differences at $p < 0.05$ relative to the control group in 48 hours of the experiment

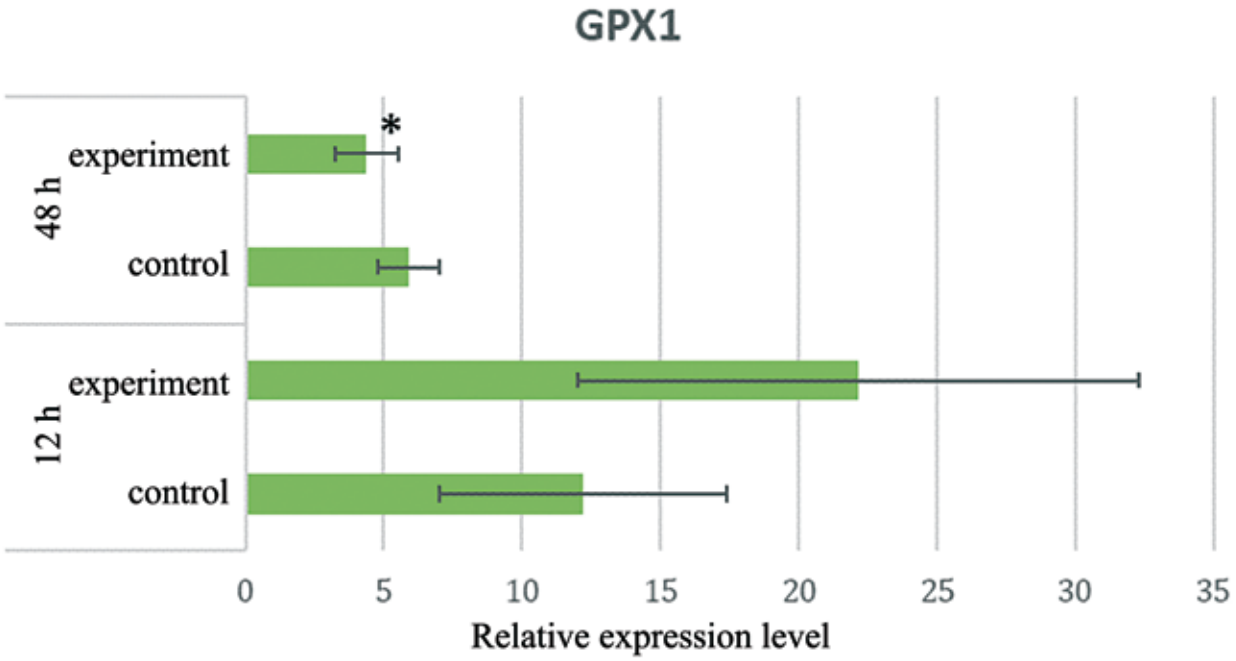


Fig. 7. Expression of the GPX1 gene after the use of the drug Prostimul

* statistically significant differences at $p < 0.05$ relative to the control group

CONCLUSION

Transfer to rearing is a technological stress factor that contributes to the depletion of the enzymatic link of the antioxidant protection system and the development of oxidative stress in animals. The data we obtained show that the drug Prostimul has an antioxidant effect due to the content of vitamins in the composition that have antiradical activity with respect to peroxidation products. The antioxidant system of piglets in the experimental group provided more effective protection, compared to the control group. Perhaps, more time and further studies are required to restore the antioxidant status.

REFERENCES

1. *Kireev I. V., Orobets V. A.* Pharmacological prevention of technological stress in sheep // AVU. 2018. No. 1 (168).

2. *Lanets O. V., Grin V. A., Semenenko M. P., Kuzminova E. V.* Pharmacocorrection of the metabolic and antioxidant profile of cows in the early post-calving period // Izvestia NV AUK. 2021. No. 3 (63).

3. *Kireev I. V., Orobets V. A.* State of the antioxidant defense system of cows under technological stress // Veterinarnaya patologiya (Veterinary pathology). 2017. No. 2 (60).

4. Effect of the complex drug Prostimul on the functional group of lymphocytes and the endocrine system of hypotrophic piglets in the neonatal period / E. V. Mikhaylov, D. A. Savrasov, V. A. Shutikov [et al.] // Rossiyskiy zhurnal Problemy veterinarnoy sanitarii, gigieny i ekologii (Russian Journal of Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology). — 2024. — No. 4 (52). — P. 613—621. — DOI 10.36871 / vet.san.hyg.ecol.202404018. — EDN DRPIIQ

5. Methodological provisions for the study of free radical oxidation processes and the antioxidant defense system of the body / M. I. Retskiy, S. V. Shabunin, G. N. Bliznetsova [et al.]. — Voronezh: State Scientific Institution All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 2010. — 70 p.

6. *Dalto D. B., Lapointe J., Matte J. J.* Assessment of antioxidative and selenium status by selenodependent glutathione peroxidase activity in different blood fractions using a pig model: issues for clinical nutrition and research //Journal of animal physiology and animal nutrition. — 2018. — V. 102. — No. 1. — P. 184—193.

7. *Guevara R. D. et al.* Physiology, gene expression, and behavior as potential indicators of oxidative stress in piglets // BMC Veterinary Research. — 2024. — v. 20. — p. 471.

8. *Marrocco I., Altieri F., Peluso I.* Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans // Oxidative medicine and cellular longevity. — 2017. — V. 2017. — No. 1. — C. 6501046.

9. *Nathan C., Cunningham-Bussel A.* Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species // Nature Reviews Immunology. — 2013. — V. 13. — No. 5. — p. 349—361

10. *Lee S. I., Kang K. S.* Function of capric acid in cyclophosphamide-induced intestinal inflammation, oxidative stress, and barrier function in pigs // Scientific reports. — 2017. — V. 7. — No. 1. — p. 16530;

11. *Bhattacharyya A. et al.* Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases // Physiological reviews. — 2014. — V. 94. — No. 2. — p. 329—354.

12. *Yin J. et al.* Birth oxidative stress and the development of an antioxidant system in newborn piglets // Free radical research. — 2013. — V. 47. — No. 12. — p. 1027—1035.

13. *Chen X., Choi I. Y., Chang T. S., Noh Y. H., Shin C. Y., Wu C. F., Ko K. H., Kim W. K.*. Pretreatment with interferon-gamma protects microglia from oxidative stress via up-regulation of Mn-SOD // Free Radic. Biol. Med. — 2009. — 46(8). — p. 1204—1210.

14. *Damiano S., Sasso A., De Felice B., Terrazzano G., Bresciamorra V., Carotenuto A., Orefice N. S., Orefice G., Vacca G., Belfiore A., Santillo M., Mondola P.* The IFN-β 1b effect on Cu Zn superoxide dismutase (SOD1) in peripheral mononuclear blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients and in neuroblastoma SK-N-BE cells // Brain Research Bulletin. — 2015. — Vol. 118. — P. 1—6.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

E. V. Mikhaylov — Candidate of Veterinary Sciences, Principal Scientific Associate, Head of the Department of Experimental Pharmacology and Functioning of Living Systems;

P. A. Parshin — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of FSBSI "ARVRIPP&T";

V. A. Shutikov — Postgraduate Student, Junior Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics;

B. V. Shabunin — Postgraduate Student, Junior Scientific Associate of the Laboratory of Preclinical Studies and Simulation of Biological Systems;

N. A. Strelnikov — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics;

D. I. Shabanov — Scientific Associate of the Laboratory of Preclinical Studies and Simulation of Biological Systems;

D. A. Savrasov — Head of the Department of Therapy and Pharmacology, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;

T. I. Ermakova — Candidate of Biological Sciences;

V. A. Prokulevich — Doctor of Biological Sciences, Professor.

The article was submitted 06.02.2025.

Научная статья
УДК 619:[618.2:612.111:611.013]:636.2

ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ БЕРЕМЕННЫХ КОРОВ ПРИ РАЗВИТИИ ЭМБРИОПАТИЙ

Виталий Иванович Михалев[*]✉, Валерий Юрьевич Сулин[*], Галина Германовна Чусова[*], Олег Юрьевич Черных[**], Галина Николаевна Близнецова[*]

[*]Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, mikhalevvit@yandex.ru✉
[**]Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория, Кропоткин, Краснодарский край, Россия

Аннотация. В статье представлены материалы изучения функционального состояния эритроцитов беременных коров при развитии у них нарушений эмбриогенеза, проявляющихся в форме синдрома задержки развития плода. Установлено, при развитии эмбриопатий у молочных коров в 60—75 дней беременности среднее содержание гемоглобина в эритроцитах составляет 16,0 пг и менее, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах — 32,3 г/л и менее, ширина распределения эритроцитов — 25,9 % и более, уровень гемолиза эритроцитов в 0,45 % растворе NaCI — 92,2 % и более. В 135—150 дней гестации при развитии эмбриопатий среднее содержание гемоглобина в эритроцитах находится на уровне 17,1 пг и менее, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах — 33,5 г/л и менее, ширина распределения эритроцитов — 27,6 % и более. В 200—210 дней осложненное течение беременности, сопровождающее гипоксией плода, характеризуется снижением среднего содержания гемоглобина в эритроцитах до 17,7 пг и менее, средней концентрации гемоглобина в эритроцитах до 33,5 г/л и ниже, при повышении ширины распределения эритроцитов до 28,5 % и более и уровня гемолиза эритроцитов в 0,45 % растворе NaCI до 98,1 % и более. Установленные различия функциональных свойств эритроцитов являются одними из предрасполагающих факторов развития эмбриопатий у коров.

Ключевые слова: коровы, беременность, эмбриопатии, эритроциты, функциональное состояние

Среди эмбриопатий, приносящих значительные экономические потери для молочного животноводства, значительный удельный вес приходится на синдром задержки развития плода, регистрирующийся у 24,8—36,9 % беременных животных [1, 2].

В основе развития нарушений раннего эмбриогенеза находится дисбаланс половых гормонов, проявляющийся гипопрогестеронемией, что приводит к снижению интенсивности процессов кровоснабжения развивающегося эмбриона и задержке его развития [3, 4].

Немаловажное значение на характер течения гестации оказывает состояние гомеостаза беременного животного, в том числе структурно-функциональные свойства эритроцитов. В последнее время этим форменным элементам уделяется все больше внимания, поскольку эритроциты являются наиболее объективным показателем, характеризующим реакцию организма на неблагоприятные воздействия патогенных факторов [5, 6].

Свойства эритроцитов определяются состоянием их плазмолеммы, являющейся основным элементом, участвующим во всех процессах их жизнедеятельности. Плазмолемма обеспечивает внутриклеточный гомеостаз эритроцитов. Благодаря плазмолемме эритроциты сохраняют свою целостность и форму, обладают возможностью к обратимой деформации при прохождении через капилляры и поры венозных синусов селезенки [7, 8, 9].

Учитывая многогранность свойств эритроцитов, их значение для обеспечения процессов жизнедеятельности, изучение показателей их функционального состояния является актуальным и требует всестороннего изучения.

Цель исследований — изучить показатели функционального состояния эритроцитов беременных коров при развитии у них эмбриопатий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования выполнены на 48 коровах голштинской породы крупного рогатого скота двух хозяйств Воронежской и Орловской областей. Коровы в 2 месяца беременности были разделены на две группы: физиологическое течение беременности ($n = 28$) и синдром задержки развития плода ($n = 20$). Диагностика задержки развития плода проведена в соответствии с разработанными критериями [10].

От всех животных, включенных в опыт, отобраны пробы крови для проведения лабораторных исследований: среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, ширина распределения эритроцитов, уровень гемолиза эритроцитов в 0,45 % растворе натрия хлорида (NaCl). Лабораторные исследования проведены в 60—75, 135—150 и 200—210 дней беременности на гематологическом анализаторе «ABX Micros 60». Исследование структурно-функциональных свойств эритроцитов проведено с помощью цифрового автоматического метода интегральных эритрограмм, апробированного в лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем ФГБНУ «ВНИВИПФиТ».

Полученный цифровой материал подвергали статистической обработке с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$. Для определения статистической значимости межгрупповых различий и для оценки влияния сроков гестации на осмотическую резистентность эритроцитов крови стельных коров проводили двухфакторный дисперсионный анализ (MANOVA — Multivariate Analysis of Variance).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах является одним из показателей, свидетельствующих о развитии анемий. Снижение данного показателя характерно для гипохромных и микроцитарных анемий. Установлено (рис. 1), что у коров с синдромом задержки развития плода в 60—75 дней беременности среднее содержание гемоглобина в эритроцитах на 8,5 % ниже ($P < 0,05$), чем при физиологической гестации, в 135—150 дней — на 9,5 %, в 200—210 дней — на 11,5 % ($P < 0,05$). Между содержанием гемоглобина в эритроцитах и развитием синдрома задержки плода установлена положительная корреляционная связь — $r = +0,88$ ($P < 0,01$). Коэффициент детерминации составляет 0,77.

Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах характеризует насыщение эритроцитов гемоглобином, что является одним из показателей, свидетельствующим об обеспечении развивающегося зародыша питательными веществами и кислородом. Установлено (рис. 2), что средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах в 60—75 дней гестации при осложненном ее течении находится на уровне 32,3 г/л, что на 6,4 % меньше, чем при физиологическом течении беременности, в 135—150 дней — на 7,5 %, в 200—210 дней — на 7,4 %. Снижение концентрации гемоглобина в эритроцитах при беременности является одним из факторов, способствующих развитию синдрома задержки с явлениями гипоксии. Коэффициент корреляции составляет +0,93 ($P < 0,01$), коэффициент детерминации — 0,86.

Ширина распределения эритроцитов является показателем количества аномальных по размеру клеток. При патологическом течении беременности в форме синдрома задержки развития плода в 60—75 дней ширина распределения эритроцитов в 1,3 раза ($P < 0,01$) больше по сравнению с физиологической гестацией (рис. 3), в 135—150 дней — в 1,3 раза ($P < 0,05$), в 200—210 дней — в 1,4 раза ($P < 0,001$). Увеличение ширины распределения эритроцитов на ранних сроках гестации может свидетельствовать о снижении кровоснабжения развивающегося плода и развитии синдрома задержки. Между шириной распределения эритроцитов и развитием синдрома задержки плода установлена отрицательная корреляционная связь — $r = –0,89$ ($P < 0,001$). Коэффициент детерминации составляет 0,79.

Одним из интегрированных показателей, характеризующих функциональные свойства эритроцитов, является уровень их гемолиза в 0,45 % растворе натрия хлорида, который меняется при различном характере течения беременности (рис. 4). Повышение уровня гемолиза эритроцитов наблюдается на ранних этапах эмбриогенеза при осложненном течении гестации. Если уровень гемолиза эритроцитов в 0,45 % растворе NaCl в 60—75 дней беременности составляется 92,2 % и выше, то животное имеет высокую степень вероятности развития осложненной гестации в форме синдрома задержки плода. В 135—150 дней беременности данный показатель не имеет существенных различий между группами. В 200—210 дней беременности для осложненного ее течения характерно повышение уровня гемолиза эритроцитов в 0,45 % растворе NaCl до 98,1 % и более (коэффициент корреляции $r = –0,74$, детерминации — 0,54).

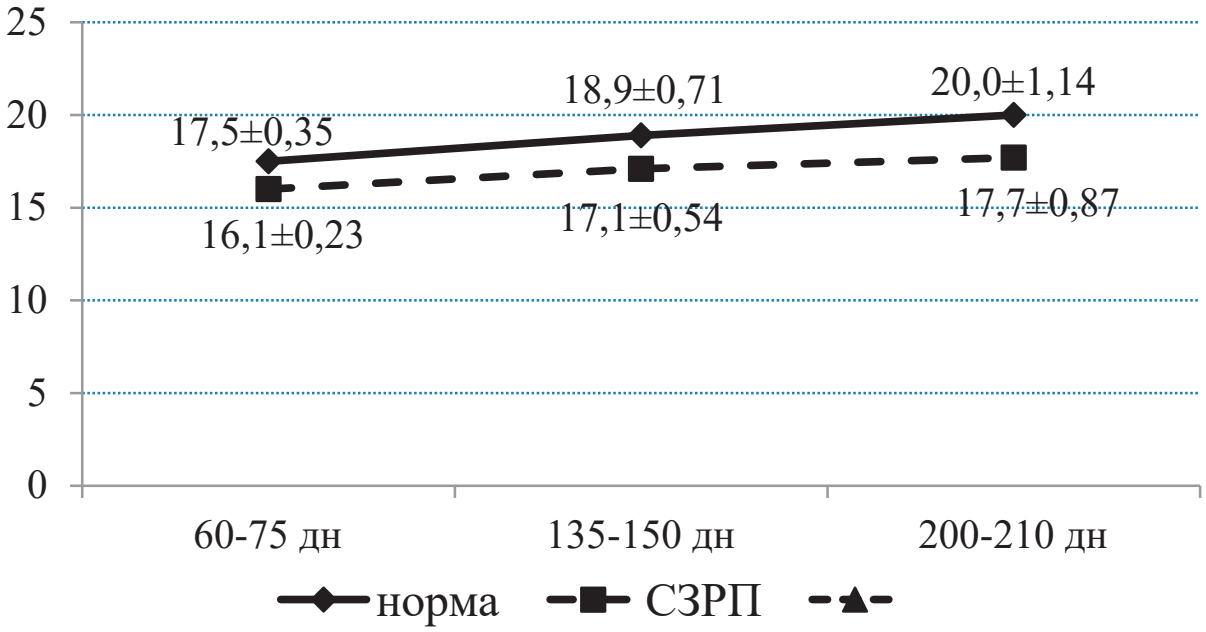


Рис. 1. Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах коров при различном характере течения беременности, пг

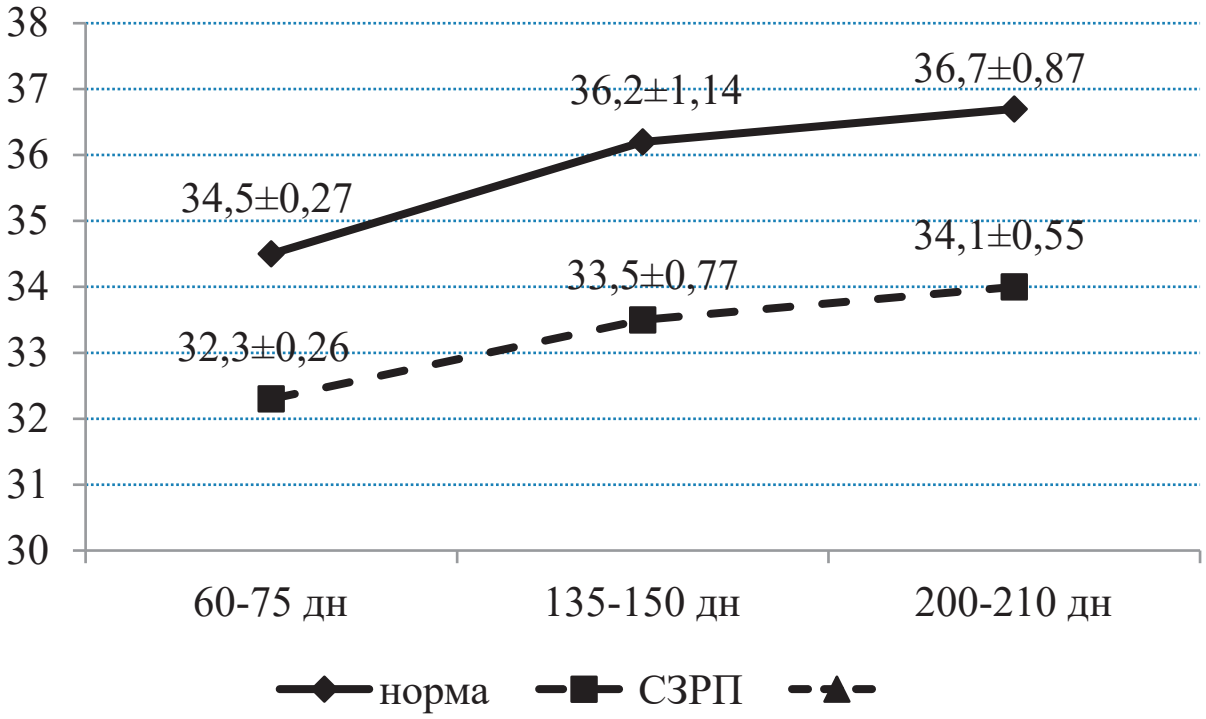


Рис. 2. Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах коров при различном характере течения беременности, г/л

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, маркерами развития эмбриопатий у молочных коров в 60—75 дней беременности могут служить: среднее содержание гемоглобина в эритроцитах 16,0 пг и менее, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах — 32,3 г/л и менее, ширина распределения эритроцитов — 25,9 % и более, уровень гемолиза эритроцитов в 0,45 % растворе NaCl — 92,2 % и более. Изменения функциональных свойств эритроцитов в первые два месяца беременности являются одним из пусковых механизмов развития эмбриопатий.

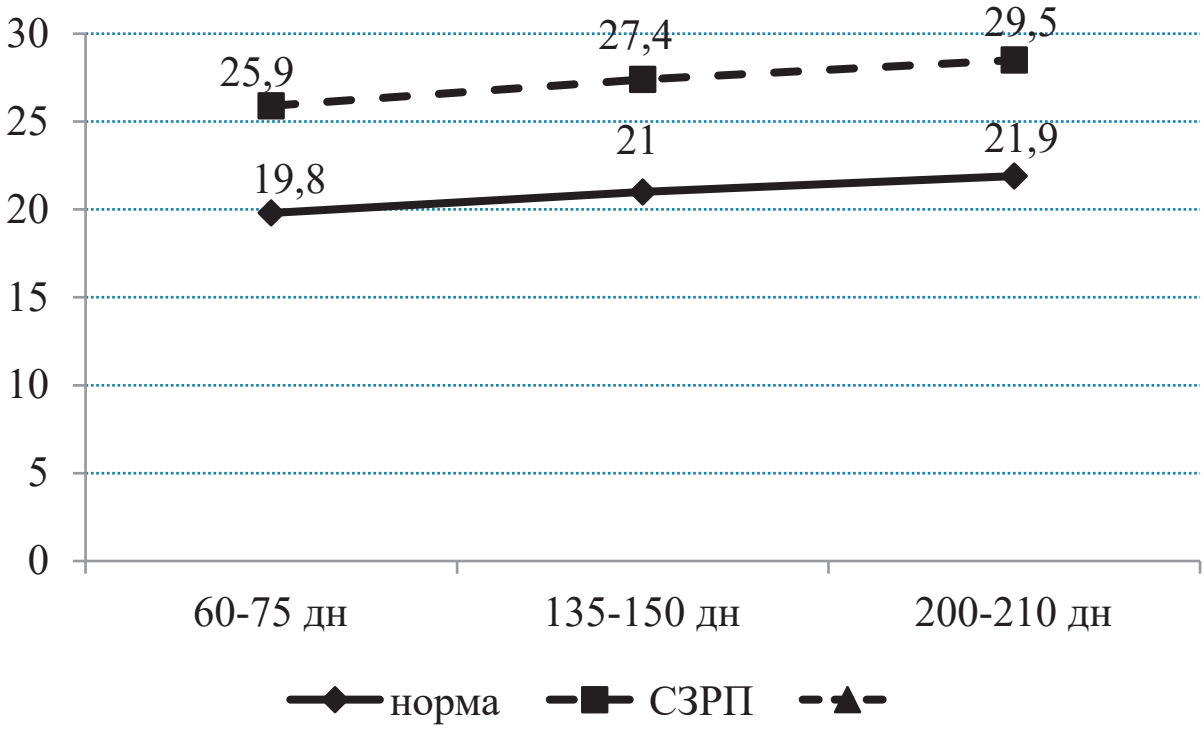


Рис. 3. Ширина распределения эритроцитов в крови коров при различном характере течения беременности, %

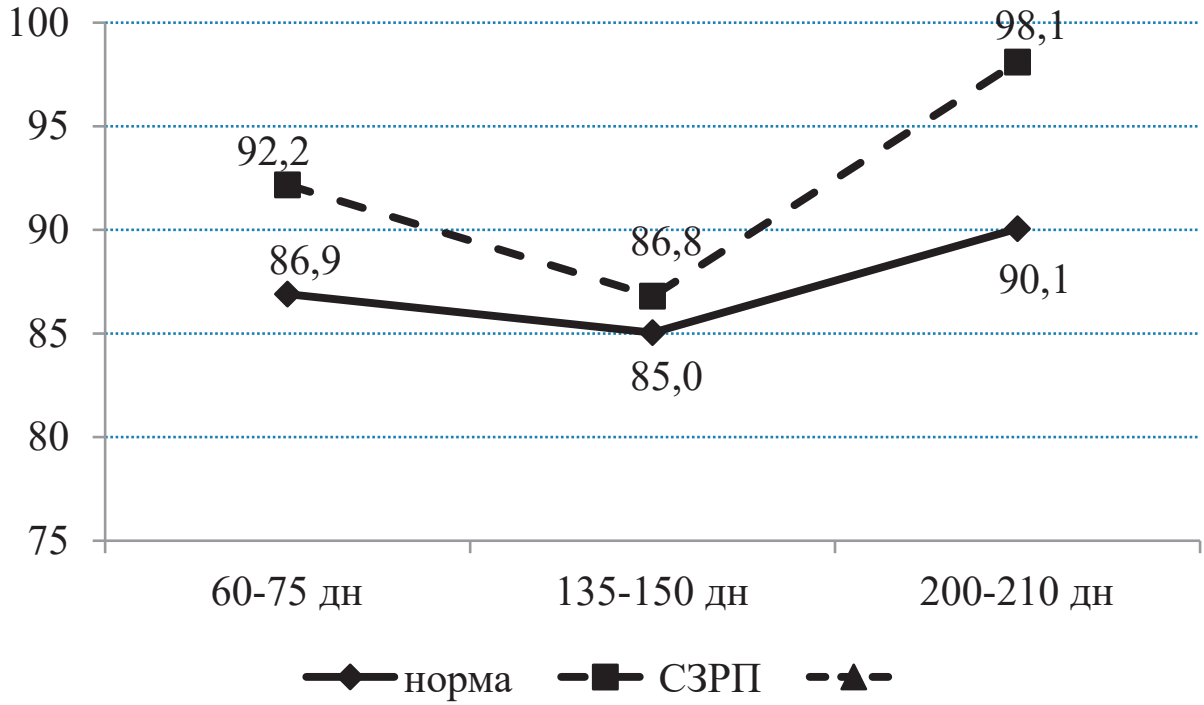


Рис. 4. Уровень гемолиза эритроцитов крови в 0,45 % растворе NaCl при различном характере течения беременности у коров, %

В 135—150 дней гестации, осложненной синдромом задержки развития плода, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах составляет 17,1 пг и менее, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах — 33,5 г/л и менее, ширина распределения эритроцитов — 27,6 % и более. В 200—210 дней осложненное течение беременности характеризуется снижением среднего содержания гемоглобина в эритроцитах до 17,7 пг и менее, средней концентрации гемоглобина в эритроцитах до

33,5 г/л и ниже, при повышении ширины распределения эритроцитов до 28,5 % и более, уровня гемолиза эритроцитов в 0,45 % растворе NaCI до 98,1 % и более, что приводит к снижению интенсивности роста плода и развитию внутриутробной гипоксии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Нежданов А. Г.* К вопросу внутриутробной гибели и задержки развития зародышей у молочных коров / А. Г. Нежданов, В. И. Михалев, Г. П. Дюльгер, Е. Г. Лозовая // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2014. — № 3. — С. 120—124.

2. *Бутко В. А.* Клинико-эхографические маркеры диагностики нарушений раннего эмбриогенеза у коров / В. А. Бутко, Е. Г. Лозовая, В. И. Михалев // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 2 (11). — С. 177—190.

3. *Brooks K.* Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon-tau and cortisol / K. Brooks, G. Burns, T. E. Spencer // J. Anim. Sei. Biotechnol. — 2014. — 5 (1): 53. DOI 10.1186/2049-1891-5-53

4. *Spencer T. E.* The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants / T. E. Spencer, N. Forde, P. Lonergan // J. of Dairy Sci. — 2015. — 99:5941—5950. DOI 10.3168/jds.2015—10070

5. *Образцова В. В.* Исследование спектров светопоглощения водных растворов гемоглобина новорожденных свиней / В. В. Образцова, А. В. Вели, В. Ю. Сулин и др. // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2022. — № 1 (18). — С. 148—161. DOI 10.17238/issn2541—8203.2022.1.148

6. *Сыромятников М. Ю.* Роль фактора HIF-1A в развитии гипоксии плода / М. Ю. Сыромятников, Е. В. Михайлов, Н. В. Пасько и др. // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 3 (12). — С. 196—206. DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.3.196

7. *Andolfo I.* New insights on hereditary erythrocyte membrane defects / I. Andolfo, R. Russo, A. Gambale, A. Iolascon // Haematologica. — 2016. — Oct. 18; 101 (11). — P. 1284—1294. DOI 10.3324/haematol.2016.142463

8. *Lew V. L.* On the Mechanism of human red blood cell longevity: roles of calcium, the sodium pump, PIEZO1, and gardos channels / V. L. Lew, T. Tiffert // Frontiers in Physiology. — 2017. — Dec 12; 8. DOI 10.3389/fphys.2017.00977

9. *Боронихина Т. В.* Плазмолемма эритроцитов и ее изменения в течение жизни клеток / Т. В. Боронихина, Т. А. Ломановская, А. Н. Яцковский // Журнал анатомии и гистопатологии. — 2021. — № 10 (2). С. 62—72. DOI 10.18499/2225-7357-2021-10-2-62-72

10. Ультразвуковая диагностика беременности и задержки развития эмбриона и плода у коров / А. Г. Нежданов, В. И. Михалев, Н. Т. Климов и др. // Методическое пособие. — Воронеж, 2013. — 19 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

В. И. Михалев — доктор ветеринарных наук, заведующий сектором;
В. Ю. Сулин — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник;
Г. Г. Чусова — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией;
О. Ю. Черных — доктор ветеринарных наук, директор лаборатории;
Г. Н. Близнецова — доктор биологических наук, заведующая лабораторией.

Статья поступила в редакцию 03.02.2025.

Original article
UDC 619:[618.2:612.111:611.013]:636.2

INDICATORS OF THE FUNCTIONAL STATE OF ERYTHROCYTES OF PREGNANT COWS DURING THE DEVELOPMENT OF EMBRYOPATHIES

Vitaliy Ivanovich Mikhalev[*]✉, Valeriy Yuryevich Sulin[*], Galina Germanovna Chusova[*], Oleg Yuryevich Chernykh[**], Galina Nikolaevna Bliznetsova[*]

[*]All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, mikhalev-vit@yandex.ru✉
[**]Kropotkin Regional Veterinary Laboratory, Kropotkin, Krasnodar kray, Russia

Abstract. The article presents the material on the study of the functional state of erythrocytes of pregnant cows during the development of embryogenesis disorders, manifested in the form of fetal intrauterine growth restriction syndrome. It has been established that during the development of embryopathies in dairy cows at 60—75 days of gestation, the mean cell hemoglobin is 16.0 pg or less, the mean cell hemoglobin concentration is 32.3 g/L or less, the RBC distribution width is 25.9 % or more, the erythrocyte hemolysis level in a 0.45 % NaCI solution is 92.2 % or more. At 135—150 days of gestation, in case of the embryopathies development, the mean cell hemoglobin is at the level of 17.1 pg or less, the mean cell hemoglobin concentration is 33.5 g/L or less, the RBC distribution width is 27.6 % or more. At 200—210 days, complicated pregnancy (gestation) accompanied by fetal hypoxia is characterized by a decrease in the mean cell hemoglobin to 17.7 pg or less, the mean cell hemoglobin concentration — to 33.5 g/L and below, with an increase in the RBC distribution width to 28.5 % or more and the level of erythrocyte hemolysis in a 0.45 % NaCI solution — to 98.1 % or more. The established differences in the functional properties of erythrocytes are one of the predisposing factors for the development of embryopathies in cows.

Keywords: cows, gestation, embryopathies, erythrocytes, functional state

Among embryopathies that cause significant economic losses for dairy farming, a significant proportion falls on the intrauterine growth restriction syndrome (IUGRS), registered in 24.8—36.9 % of pregnant animals [1, 2].

The basis for the development of the early embryogenesis disorders is an imbalance of reproductive hormones, manifested by hypoprogesteronemia, which leads to a decrease in the intensity of the blood supply processes of the developing embryo and a restriction in its development [3, 4].

The state of homeostasis of a pregnant animal, including the structural and functional properties of erythrocytes, has an important effect on the nature of the gestation course. Recently, more and more attention has been paid to these formed elements, since erythrocytes are the most objective indicator characterizing the body's response to the adverse effects of pathogenic factors [5, 6].

The properties of erythrocytes are determined by the state of their plasma membrane, which is the main element involved in all processes of their vital activity. The plasma membrane ensures intracellular homeostasis of erythrocytes. Thanks to the plasma membrane, erythrocytes retain their integrity and shape, and have the ability to reversibly deform when passing through the capillaries and pores of the venous sinuses of the spleen [7—9].

Considering the versatility of the properties of erythrocytes, their importance for ensuring vital processes, the study of indicators of their functional state is relevant and requires comprehensive study.

The objective of the research is to study the indicators of the functional state of erythrocytes of pregnant cows during the development of embryopathies in them.

MATERIAL AND METHODS

The research was conducted on 48 Holstein cows from two farms in Voronezh and Orel regions. The cows were divided into two groups at 2 months of gestation: physiological gestation (n = 28) and fetal in-

trauterine growth restriction syndrome (n = 20). Fetal growth restriction was diagnosed according to the developed criteria [10].

Blood samples for laboratory tests were obtained from all animals included in the experiment: the mean cell hemoglobin, the mean cell hemoglobin concentration, the erythrocyte/RBC distribution width, the erythrocyte hemolysis level in a 0.45 % sodium chloride (NaCl) solution. Laboratory studies were conducted at 60—75, 135—150 and 200—210 days of gestation using the hematology analyzer ABX Micros 60. The study of the structural and functional properties of erythrocytes was conducted using the digital automatic method of integral erythrograms, tested at the Laboratory of Preclinical Studies and Simulation of Biological Systems of FSBSI "ARVRIPP&T".

The obtained digital material was subjected to statistical processing using the Statistica 6.0 software package. The differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. To determine the statistical significance of intergroup differences and to assess the effect of gestation periods on the osmotic resistance of erythrocytes in pregnant cows, a two-factor analysis of variance (MANOVA — Multivariate Analysis of Variance) was performed.

STUDY RESULTS

The mean cell hemoglobin is one of the indicators indicating the anemia development. A decrease in this indicator is characteristic of hypochromic and microcytic anemia. It has been established (Fig. 1) that in the cows with fetal intrauterine growth restriction syndrome at 60—75 days of gestation, the mean cell hemoglobin is by 8.5 % lower ($P < 0.05$) than during physiological gestation, at 135—150 days — by 9.5 %, at 200—210 days — by 11.5 % ($P < 0.05$). A positive correlation was established between the mean cell hemoglobin and the development of fetal intrauterine growth restriction syndrome — r = +0.88 ($P < 0.01$). The coefficient of determination is 0.77.

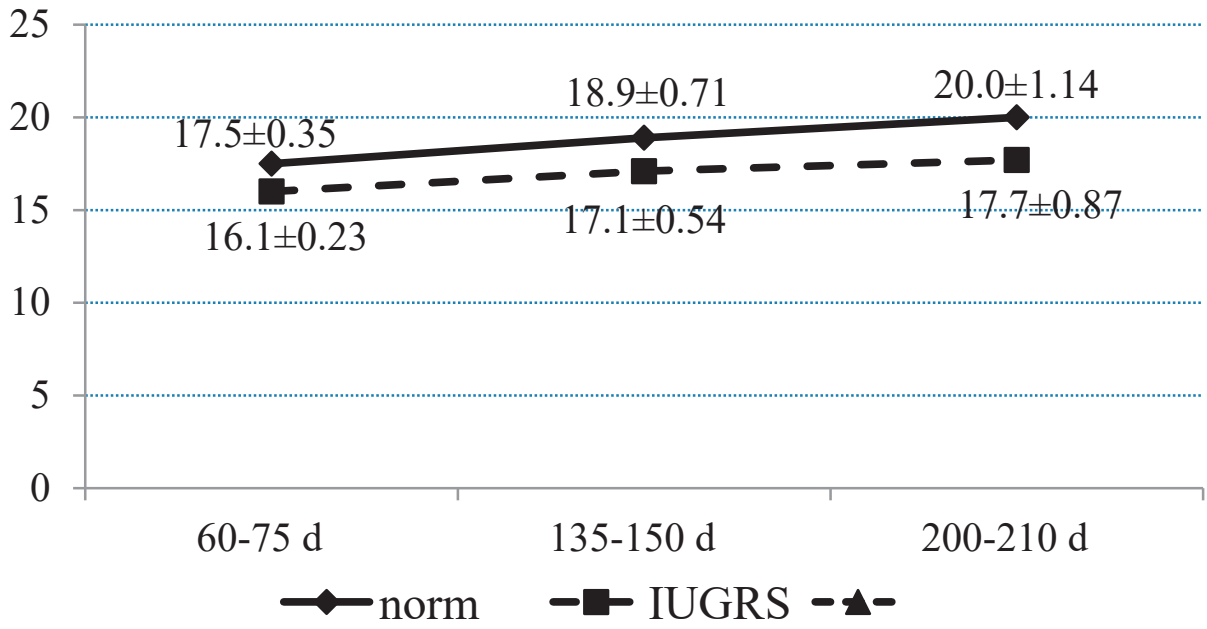


Fig. 1. Mean cell hemoglobin in cows in case of various types of gestation course, pg

The mean cell hemoglobin concentration characterizes the saturation of erythrocytes with hemoglobin, which is one of the indicators indicating the provision of the developing embryo with nutrients and oxygen. It has been established (Fig. 2) that the mean cell hemoglobin concentration at 60—75 days of gestation with a complicated course is at the level of 32.3 g/L, which is by 6.4 % less than in case of a physiological gestation course, at 135—150 days — by 7.5 %, at 200—210 days — by 7.4 %. A decrease in the cell hemoglobin concentration during gestation is one of the factors contributing to the development of fetal intrauterine growth restriction syndrome with hypoxia. The correlation coefficient is +0.93 ($P < 0.01$), the coefficient of determination is 0.86.

The RBC distribution width is an indicator of the number of abnormally sized cells. In case of pathological gestation in the form of fetal intrauterine growth restriction syndrome, the RBC distribution width is by 1.3 times ($P < 0.01$) greater at 60—75 days, com-

pared to a physiological gestation (Fig. 3), by 1.3 times ($P < 0.05$) greater at 135—150 days, and by 1.4 times ($P < 0.001$) greater at 200—210 days.

An increase in the RBC distribution width at the early stages of gestation may indicate a decrease in the blood supply to the developing fetus and the development of intrauterine growth restriction syndrome. A negative correlation was found between the RBC distribution width and the development of intrauterine growth restriction syndrome — $r = –0.89$ ($P < 0.001$). The coefficient of determination was 0.79.

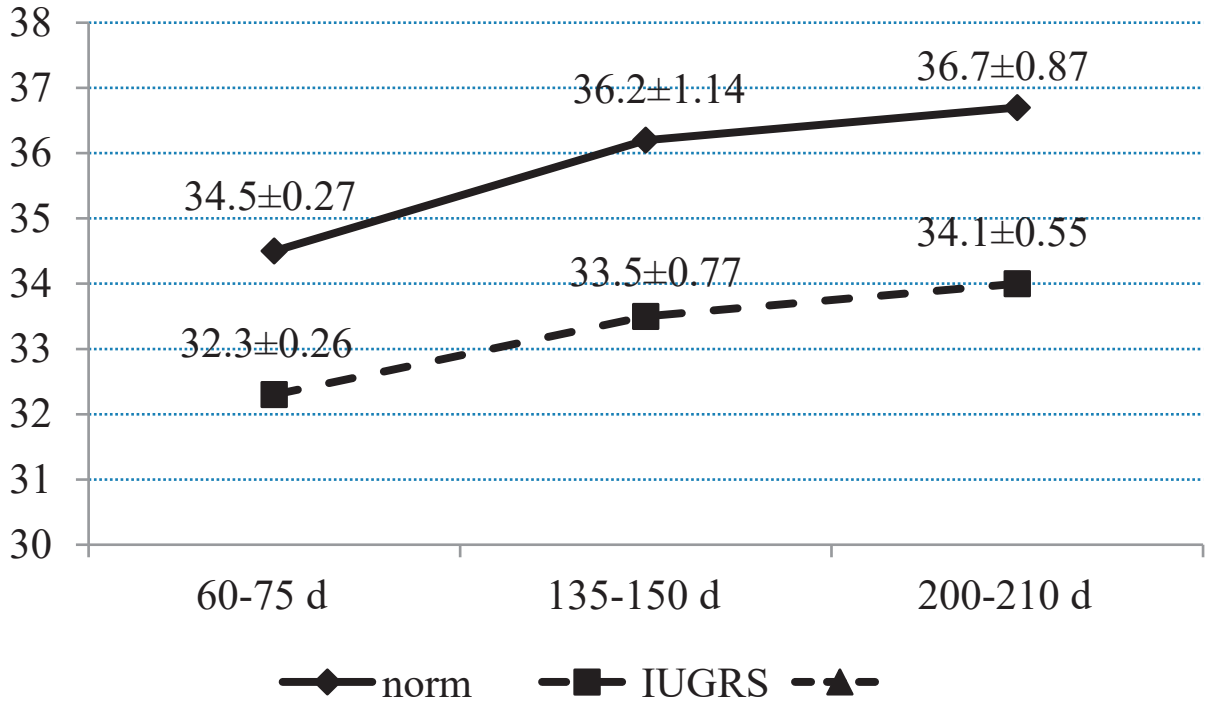


Fig. 2. Mean cell hemoglobin concentration in cows in case of various types of gestation course, g/L

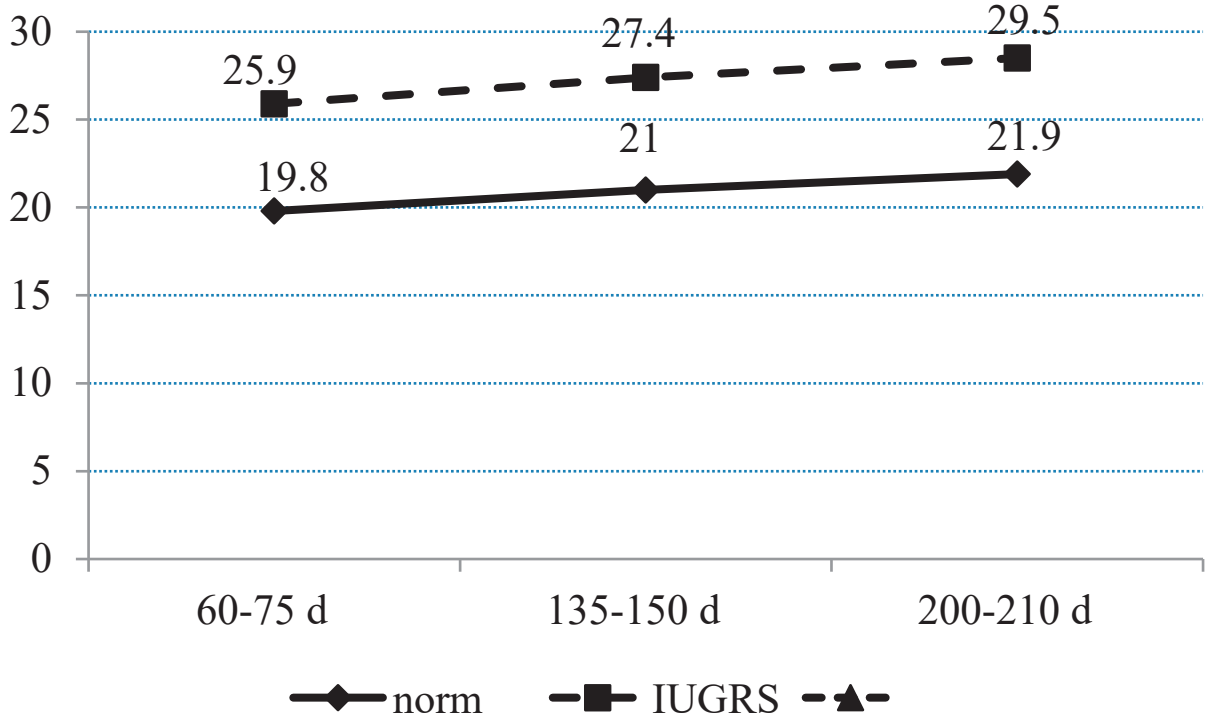


Fig. 3. RBC distribution width in cows in case of various types of gestation course, %

One of the integrated indicators characterizing the functional properties of erythrocytes is the level of their hemolysis in a 0.45 % sodium chloride solution, which changes in case of various types of gestation course (Fig. 4). An increase in the erythrocyte hemolysis level is observed at the early stages of embryogenesis in case of a complicated course of gestation. If the erythrocyte hemolysis level in a 0.45 % NaCl solution at 60—75 days of gestation is 92.2 % or higher, then the animal has a high probability of a complicated gestation development in the form of fetal intrauterine growth restriction syndrome. At 135—150 days of gestation, this indicator does not have significant differences between the groups. At 200—210 days of gestation, complicated gestation is characterized by an increase in the level of erythrocyte hemolysis in a 0.45 % NaCl solution to 98.1 % or more (correlation coefficient $r = –0.74$, determination — 0.54).

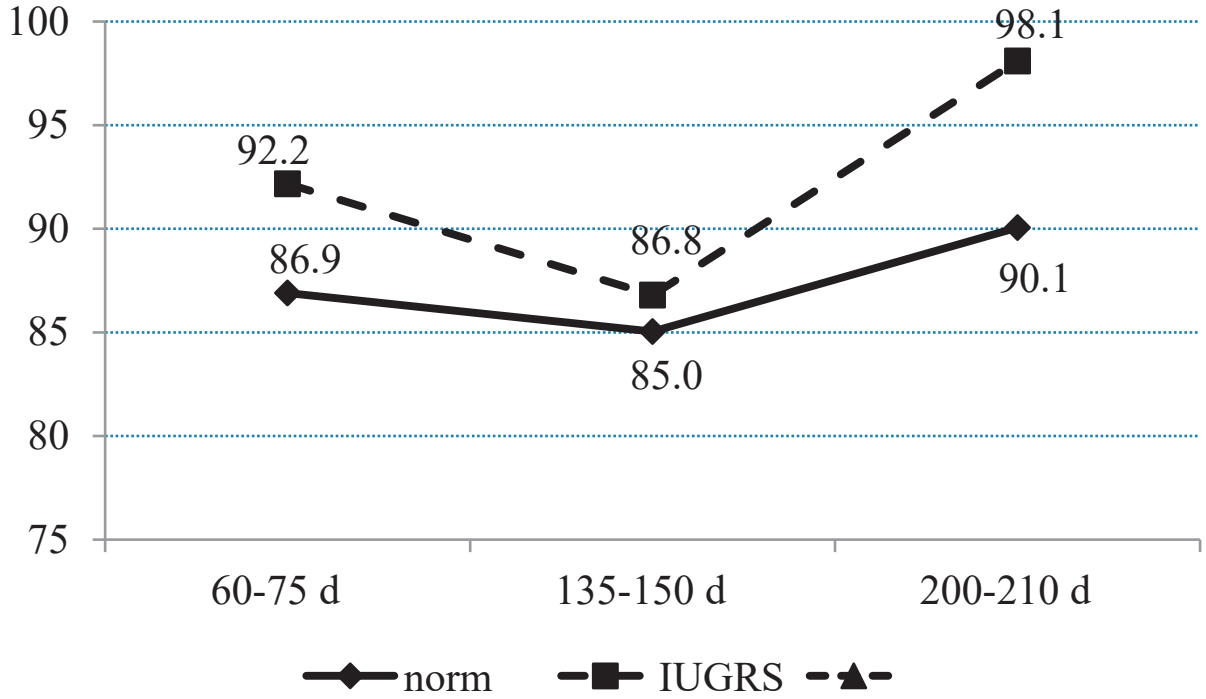


Fig. 4. Erythrocyte hemolysis level in a 0.45 % NaCl solution in cows in case of various types of gestation course, %

CONCLUSION

Thus, the markers of embryopathy development in dairy cows at 60—75 days of gestation can be the mean cell hemoglobin of 16.0 pg or less, the mean cell hemoglobin concentration of 32.3 g/L or less, the erythrocyte distribution width of 25.9 % or more, the erythrocyte hemolysis level in a 0.45 % NaCI solution of 92.2 % or more.

The changes in the functional properties of erythrocytes in the first two months of gestation are one of the triggers for embryopathy development. At 135—150 days of gestation complicated by fetal intrauterine growth restriction syndrome, the mean cell hemoglobin is 17.1 pg or less, the mean cell hemoglobin concentration is 33.5 g/L or less, and the erythrocyte distribution width is 27.6 % or more.

At 200—210 days, complicated gestation is characterized by a decrease in the mean cell hemoglobin to 17.7 pg or less, the mean cell hemoglobin concentration — to 33.5 g/L or less, with an increase in the erythrocyte distribution width to 28.5 % or more, the erythrocyte hemolysis level in a 0.45 % NaCI solution — to 98.1 % or more, which leads to a decrease in the intensity of fetal intrauterine growth and the development of intrauterine hypoxia.

REFERENCES

1. *Nezhdanov A. G.* On the issue of intrauterine death and growth restriction of embryos in dairy cows / A. G. Nezhdanov, V. I. Mikhalev, G. P. Dyulger, E. G. Lozovaya // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine). — 2014. — No. 3. — P. 120—124.

2. *Butko V. A.* Clinicoechographic diagnostic markers of early embryogenesis disorders in cows / V. A. Butko, E. G. Lozovaya, V. I. Mikhalev // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2020. — No. 2 (11). — P. 177—190.

3. *Brooks K.* Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon-tau and cortisol /

K. Brooks, G. Burns, T. E. Spencer // J. Anim. Sei. Biotechnol. — 2014. — 5 (1): 53. DOI 10.1186/2049-1891-5-53

4. *Spencer T. E.* The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants / T. E. Spencer, N. Forde, P. Lonergan // J. of Dairy Sci. — 2015. — 99:5941—5950. DOI 10.3168/jds.2015-10070

5. *Obraztsova V. V.* Study of light absorption spectra of aqueous solutions of hemoglobin of the newborn pigs / V. V. Obraztsova, A. V. Veli, V. Yu. Sulin et al. // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2022. — No. 1 (18). — P. 148—161. DOI 10.17238/issn2541—8203.2022.1.148

6. *Syromyatnikov M. Yu.* The role of HIF-1A factor in the development of fetal hypoxia / M. Yu. Syromyatnikov, E. V. Mikhaylov, N. V. Pasko et al. // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2020. — No. 3 (12). — P. 196—206. DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.3.196

7. *Andolfo I.* New insights on hereditary erythrocyte membrane defects / I. Andolfo, R. Russo, A. Gambale, A. Iolascon // Haematologica. — 2016. — Oct. 18; 101 (11). — R. 1284—1294. DOI 10.3324/haematol.2016.142463

8. *Lew V. L.* On the Mechanism of human red blood cell longevity: roles of calcium, the sodium pump, PIEZO1, and gardos channels / V. L. Lew, T. Tiffert // Frontiers in Physiology. — 2017. — Dec 12; 8. DOI 10.3389/fphys.2017.00977

9. *Boronikhina T. V.* Plasmalemma of erythrocytes and its changes during the life of cells / T. V. Boronikhina, T. A. Lomanovskaya, A. N. Yatskovskiy // Zhurnal anatomii i gistopatologii (Journal of Anatomy and Histopathology). — 2021. — No. 10 (2). P. 62—72. DOI 10.18499/2225—7357—2021—10—2—62—72

10. Ultrasound diagnostics of gestation and embryonic and fetal intrauterine growth restriction in cows / A. G. Nezhdanov, V. I. Mikhalev, N. T. Klimov et al. // Methodical manual. — Voronezh, 2013. — 19 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

V. I. Mikhalev — Doctor of Veterinary Sciences, Head of the Sector;
V. Yu. Sulin — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate;
G. G. Chusova — Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory;
O. Yu. Chernykh — Doctor of Veterinary Sciences, Director of the Laboratory;
G. N. Bliznetsova — Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory.

The article was submitted 03.02.2025.

Научная статья
УДК 575.112

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Дарья Викторовна Копылева✉, Максим Иосифович Потапович, Владимир Антонович Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, kopyleva.d@gmail.com✉

Аннотация: При сравнении аминокислотных последовательностей цитокина интерлейкин-4 (ИЛ-4) млекопитающих (человек, бык, овца, лошадь, свинья, крыса, мышь, собака, кошка) установлена идентичность ключевых аминокислотных остатков первого (Glu-9) и второго (Arg-88) кластеров, отвечающих за взаимодействие каждого видоспецифического цитокина с собственным рецептором. При этом количество совпадающих аминокислотных остатков в белковых последовательностях человека и животных не превышает 60 % и является максимальным с ИЛ-4 свиньи — 59,6 %. Наибольшая идентичность аминокислотных последовательностей ИЛ-4 (92 %) и консервативность замен характерна для относительно близких по происхождению парнокопытных (бык, овца).

Ключевые слова: интерлейкин-4; множественное выравнивание; рекомбинантный белок.

Рекомбинантные цитокины (сигнальные молекулы), полученные биотехнологическим способом, находят все большее применение в различных секторах медицины и ветеринарии. Цитокины обладают множеством биологических активностей, проявляющихся через взаимодействие со специфическими клеточными поверхностными рецепторами. В результате такого взаимодействия происходит активация путей передачи сигнала и регуляция экспрессии контролируемых генов. Так, интерлейкин-4 (ИЛ-4), относящийся к противовоспалительным цитокинам, способен регулировать выработку антител, гемопоэз, воспаление, обеспечивает развитие эффекторных Т-клеточных ответов, являясь ростовым фактором для В-клеток. Кроме того, ИЛ-4 увеличивает цитотоксическую активность лимфоцитов и моноцитов, усиливает функциональную активность миелоидных клеток. Эффекты ИЛ-4 на не гемопоэтические клетки включают усиление хемотаксиса фибробластов и адгезивность эндотелиальных клеток для Т-лимфоцитов [1—3]. ИЛ-4 необходим для индукции и сохранения иммунного ответа II типа и, в основном, продуцируется иммунными клетками, такими как Т-лимфоциты, тучные клетки, базофилы и эозинофилы [1].

Интерлейкин-4, впервые описанный в 1981 г., представляет собой секретируемый цитокин массой 17,5 кДа (включая сигнальный пептид ≈2,5 кДа). Структура человеческого ИЛ-4 в нативном состоянии стабилизирована тремя дисульфидными связями, образующими компактную глобулу, представленную четырьмя α-спиралями (A, B, C, D) [1]. В сайтах связывания человеческого ИЛ-4 со своим рецептором присутствуют 3 высококонсервативных участка — кластера. Первый кластер локализован в области Glu-9, где карбоксилат принимает три связи от рецепторных Tyr-13, Tyr-183 и Ser-70. Для формирования связи с рецептором Glu-9 должен дополнительно правильно ориентироваться в сайте связывания остатком Asn-89 интерлейкина. Второй кластер сформирован вокруг ионной пары Arg-88 со стороны молекулы ИЛ-4 и Asp-72 со стороны его рецептора и окружен алифатическими группами. Третий кластер формируют аминокислотные остатки молекулы ИЛ-4 Arg-81, Arg-85, Gln-78 и рецепторные остатки Asp-66, Asp-67, Asp-125, которые не могут формировать прочные водородные связи, так как геометрия такого взаимодействия будет существенно отличаться от стандартного донорно-акцепторного взаимодействия sp^2-типа. Отсюда следует вы-

вод, что третий кластер не участвует в стабилизации комплекса, а его задача состоит в ускорении образования комплекса за счет электростатического контроля связывания лиганда с рецептором [4]. Становится очевидна ведущая роль первого и второго кластера в формировании комплекса между интерлейкином-4 человека и его рецептором, необходимого для осуществления эффектов действия цитокина. По-видимому, похожую структурно-функциональную организацию следует ожидать и для интерлейкинов-4 других млекопитающих.

По причине системного характера действия цитокина на организм достаточно сложно определить терапевтическую роль лечебно-профилактических препаратов на основе интерлейкина-4, однако разработки в этом направлении ведутся. Так, в 2017 году группа исследователей представила экспериментальную работу с использованием инъекционного препарата на основе мышиного ИЛ-4 для лечения инфаркта миокарда в модели *in vivo* (мыши). Ученые отметили, что контролируемая разовая локальная доставка высокой дозы чистого ИЛ-4 может быть эффективной для устранения последствий инфаркта миокарда [5]. В другом эксперименте *in vivo* зарегистрировано, что ИЛ-4 может эффективно восстанавливать клеточный иммунитет при ожоговых поражениях и воздействии этанола за счет способности модулировать уровень ИЛ-6 [6]. В 2020 году группа китайских ученых заявила о возможности рассмотрения ИЛ-4 в качестве регулятора метаболизма для лечения ожирения и его осложнений [7]. Позже появились исследования, доказывающие эффективность применения ИЛ-4 как противовоспалительного агента и модулятора остеогенеза [8].

Кроме того, ИЛ-4 является одним из ключевых цитокинов в технологии создания биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) на основе дендритных клеток. БМКП находят применение в лечении онкологических и генетических заболеваний, ожогов, тяжелой сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, ревматоидных артритов и нейродегенеративных заболеваний, таких как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [9, 10].

Представленные направления исследований являются новыми и имеют важное практическое значение, как для медицины, так и для ветеринарии. Известен пример предложения использования рекомбинантного человеческого (рч) интерлейкина-2 в ветеринарных целях [11]. Предполагается, что данный цитокин человеческого типа может быть широко использован для иммунотерапии животных, преодолевая барьер белковой видоспецифичности. Учитывая лечебный потенциал рчИЛ-4 рассматривается предположение о возможном применении субстанции рчИЛ-4 для конструирования лечебно-профилактических препаратов в том числе в целях ветеринарии.

Целью настоящего исследования явилось проведение биоинформатического сравнительного анализа полипептидных последовательностей ИЛ-4 у ряда млекопитающих. По результатам исследования высказываются предположения о структурных отличиях интерлейкинов типа-4 млекопитающих различного вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аминокислотные последовательности интерлейкинов-4 взяты из базы данных GenBank, коды доступа для *Homo sapiens* (человек) — AAA59150.1; *Equus caballus* (лошадь) — AAG21896.1; *Bos taurus* (бык) — AAA30587.1; *Sus scrofa* (свинья) — CAA48407.1; *Ovis aries* (овца) — AAA31552.1; Canis lupus familiaris (собака) — AAD11563.1; *Felis catus* (кошка) — AAB42052.1; *Rattus norvegicus* (крыса серая) — CAC16091.1; *Mus musculus* (мышь домовая) — AAA39298.1.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ИЛ-4 выполняли по алгоритму ClustalW [12], и визуализировали при помощи программного пакета Jalview 2.11.2.7. Процент идентичности определяли при помощи алгоритма попарного выравнивания программного пакета Jalview 2.11.2.7 [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью проверки потенциальной возможности использования субстанций человеческого ИЛ-4 для ветеринарии провели сравнение его аминокислотных последовательностей с последовательностями интерлейкинов-4 некоторых млекопитающих (свинья, лошадь, бык, овца, собака, кошка, крыса и мышь).

Для анализа использовали только структурные части цитокинов ИЛ-4, определяющие функциональную активность белков, сигнальный пептид внеклеточной локализации в выравнивании не учитывали. В качестве референса служила последовательность аминокислот человеческого ИЛ-4.

Анализ показал, что количество позиций совпадения аминокислотных остатков в представленных полипептидных последовательностях ИЛ-4

животных относительно референсной не превышает 60 %: 55 % — с бычьим ИЛ-4; 59,8 % — со свиным; 56,6 % — с овечьим; 51,9 % — с лошадиным; 51,2 % — с кошачьим; 45,7 % — с собачьим; 43,4 % — с крысиным; 41,3 % — с мышиным. Кроме того, все проанализированные белки отличаются по длине от референсного на 6—21 аминокислотный остаток. Наиболее близкими по количеству аминокислотных остатков человеческому, оказались интерлейкины-4 грызунов (рис. 1).

Согласно данным, приведенным на рисунке 1, положения Glu-9 и Arg-88 являются идентичными для всех исследованных последовательностей. На основании высокой консервативности центральных аминокислотных остатков первых двух кластеров ИЛ-4 различных млекопитающих можно предположить, что механизм их связывания с рецептором будет аналогичен человеческому, однако у грызунов Glu-9, по-видимому, будет ориентироваться другим аминокислотным остатком.

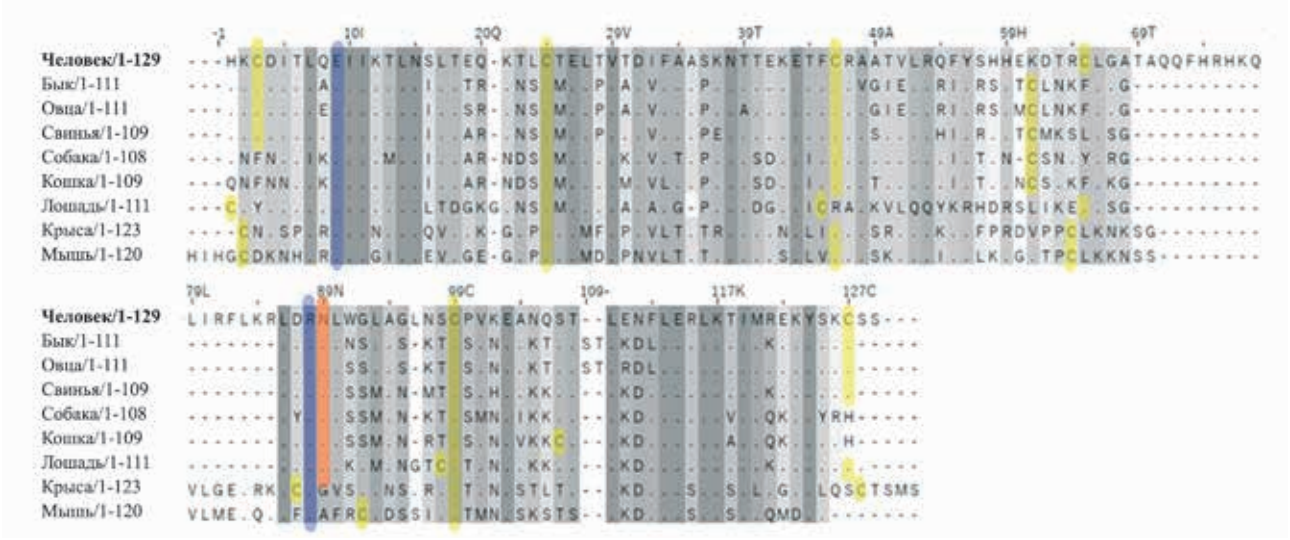


Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ИЛ-4

Аминокислотные остатки, которые совпадают с остатками человеческого ИЛ-4, обозначены точками, показаны только полиморфные остатки, знаки тире означают разрывы в выравнивании. Градиент серого цвета отражает степень консервативности замен (совпадающие аминокислотные остатки обозначены темно-серым, консервативные (идентичные по свойствам) — серым и светло-серым, неконсервативные и разрывы — белым). Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим — ключевые аминокислотные остатки первого (Glu-9) и второго (Arg-88) кластеров, красным — остаток аспарагина-89

В первичной структуре анализируемых белков расположение трех остатков цистеина (Cys-24, Cys-46, Cys-99) идентично референсному для большинства последовательностей, за исключением лошадиного ИЛ-4, где в 46 положении располагается аргинин. Известно, что в человеческом ИЛ-4 остатки Cys-46 и Cys-99 формируют дисульфидную связь, следовательно, можно предположить существование таковой и в исследуемых животных цитокинах [14]. Положения других остатков цистеина во всех проанализированных последовательностях ИЛ-4 животных не совпадают с таковыми в последовательности человеческого ИЛ-4. Кроме того, общее количество возможных дисульфидных связей варьирует в представленных белках от 2 (у кошки и собаки) до 3 у других животных.

Первичные последовательности ИЛ-4 у некоторых животных обладают относительно высокой степенью идентичности. Для быка и овцы (парнокопытные) идентичность аминокислотных последовательностей оценивается в 92 % (рис. 2, А), для кошки и собаки — 80,7 % (рис. 2, Б). С другой стороны, последовательности аминокислот в ИЛ-4 грызунов идентичны лишь на 61 % (рис. 3).

Как показано на рисунке 2, большинство аминокислотных остатков в последовательностях ИЛ-4 быка и овцы близки по физико-химическим свойствам, представляя собой полярные незаряженные (положения 19, 74), положительно заряженные (положения 94, 105) и алифатические (положение 48) аминокислоты. В положениях 39 и 60 наблюдаемая замена алифатической неполярной аминокислоты на полярную незаряженную, скорее всего, вносит несущественный вклад в изменение третичной структуры белков в виду их расположения в не имеющих упорядоченной вторичной

структуры участках молекул ИЛ-4. Следовательно, описанные замены являются в высокой степени функционально консервативными. О близком эволюционном родстве представленных молекул также свидетельствует одинаковое положение остатков цистеина. Вместе с тем, присутствие в 8 положении замены Ala-8 на отрицательно заряженный Glu-8 может повлиять на стерические отношения в первом кластере, по причине близкой локализации к ключевому Glu-9.

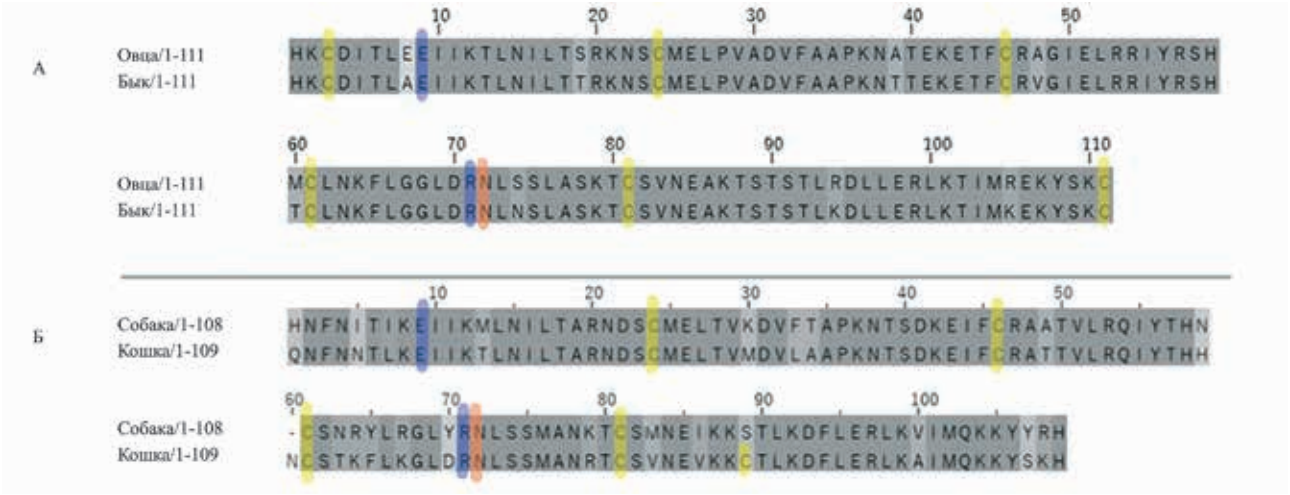


Рис. 2. Парное выравнивание аминокислотных последовательностей ИЛ-4 быка и овцы (*А*), собаки и кошки (*Б*)

Градиент серого цвета отражает степень консервативности замен (совпадающие аминокислотные остатки обозначены темно-серым, консервативные (идентичные по свойствам) — серым и светло-серым, неконсервативные и разрывы — белым). Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим — ключевые аминокислотные остатки первого (Glu-9) и второго (Arg) кластеров, красным — остаток аспарагина, участвующий в пространственной ориентации Glu-9

Сравнение аминокислотных последовательностей ИЛ-4 собаки и кошки демонстрирует большее количество консервативных и неконсервативных замен, располагающихся во всех структурных элементах белковых молекул, чем в паре парнокопытных. Так, наблюдаемая замена тирозина на аспартат в 70-м положении во втором кластере может повлечь существенные стерические несоответствия, способные привести к полной или частичной потере характерных биологических эффектов ИЛ-4 при введении животным препаратов на основе кажущихся «родственных», но не полностью идентичных интерлейкинов.

Тестирование медицинских препаратов, изучение механизмов действия отдельных веществ *in vivo* в большинстве случаев осуществляется на грызунах. Исследование субстанций ИЛ-4 не стало исключением.

Вместе с тем, только частичное совпадение положений остатков цистеина, низкое сходство аминокислотных последовательностей ИЛ-4 человека и грызунов, делает последних не самым оптимальным выбором для полноценного анализа. Например, замена одной аминокислоты Asn-89 на стерически отличные ставит вопрос о возможности эффективного взаимодействия первого кластера ИЛ-4 с его рецептором, а присутствие в 87-м положении низкоконсервативных аминокислотных замен — и второго.

Учитывая существенные отличия в количестве и характере расположения дисульфидных связей, а также низкое сходство аминокислотных последовательностей, можно сделать вывод, что использование экзогенного человеческого ИЛ-4 для терапии в ветеринарии, вероятнее всего, не будет иметь ожидаемого результата. При его применении возможно потенциальное отсутствие должного терапевтического эффекта, развитие аллергических реакций, возникновение побочных ответов организма.

Таким образом, открытый в прошлом веке человеческий ИЛ-4 до сих пор не имеет полной характеристики оказываемых им биологических эффектов, детальных закономерностей его действия и функциональной взаимосвязи с другими регуляторными молекулами в связи с тем, что анализ *in vivo* проводится на гетерологичных объектах, в большинстве своем на грызунах, где нет полного соответствия между цитокином человека и рецептором модельного животного [15].

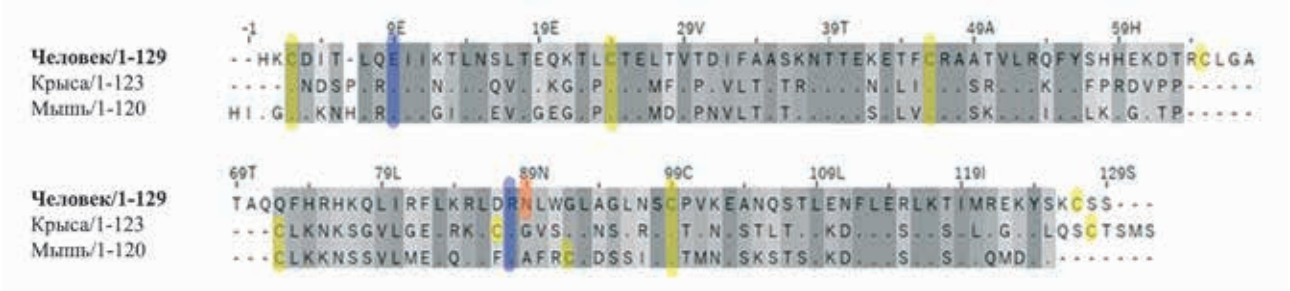


Рис. 3. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ИЛ-4 человека и грызунов

Градиент серого цвета отражает степень консервативности замен (совпадающие аминокислотные остатки обозначены темно-серым, консервативные (идентичные по свойствам) — серым и светло-серым, не консервативные и разрывы — белым). Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим — ключевые аминокислотные остатки первого (Glu-9) и второго (Arg) кластеров, красным — остаток аспарагина, участвующий в пространственной ориентации Glu-9

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аминокислотные последовательности ИЛ-4 в представленных в статье животных организмах значительно отличаются от человеческой, в связи с чем предполагается затруднение использования указанного человеческого цитокина в качестве лекарственного средства для ветеринарного применения.

Наибольшая идентичность аминокислотных последовательностей, отмечена у человеческого ИЛ-4 со свиным ИЛ-4 — почти 60 %. Однако в сравнении с человеческим ИЛ-4, у свиного присутствуют существенные отличия в длине аминокислотных цепей, сайтах связывания с рецепторами и структурами вне них, что в совокупности ставит под вопрос возможность применения человеческого ИЛ-4 даже для этой группы животных. Тем не менее, окончательное заключение, сделанное только при *in silico* анализе требует определенного подтверждения. Необходима проверка гетерологических белков по присущим им активностям на более высокоуровневых системах, в условиях *in vitro* и *in vivo,* в том числе на аллергенность, иммуногенность, стабильность, токсичность и др.

Это касается также выявленного относительно высокого сходства первичных структур молекул интерлейкинов-4 быка и овцы. Положительный результат потенциально может позволить применять один препарат на основе рекомбинантного ИЛ-4 одного из парнокопытных для лечения воспалительных реакций обоих организмов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Walter M. R.*, Crystal structure of recombinant human interleukin-4/ M. R. Walter, W. J. Cook, B. G. Zhao [et. al.] // Journal of Biological Chemistry. — 1992. — Vol. 267. — № 28. — P. 20371—20376.

2. *Sachin P. G.* IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember / P. G. Sachin, J. C. Cronk, G. T. Norris [et. al.] // *J Immunol.* — 2012. — Vol. 189. — № 9. — P. 4213—4219.

3. *Chandramohan V.*, Immunotoxin Therapy for Brain Tumors / V. Chandramohan, J. H. Sampson, I. H. Pastan [et. al.] // Translational Immunotherapy of Brain Tumors. — 2017. — P. 227—260.

4. *Hage T.*, Crystal Structure of the Interleukin-4/Receptor α Chain Complex Reveals a Mosaic Binding Interface / T. Hage, W. Sebald, P. Reinemer // Cell. — 1999. — Vol. 97. — № 2. — P. 271—281.

5. *Shintani Y.*, IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice / Y. Shintani, T. Ito, L. Fields [et al.] // Scientific Reports. — 2017. — Vol. 7. — № 1.

6. *Messingham K. A*, Interleukin-4 treatment restores cellular immunity after ethanol exposure and burn injury / K. A. Messingham, S. A. Heinrich, E. M. Schilling [et. al.] // Alcohol Clin Exp Res. — 2002. — Vol. 26. — № 4. — P. 519—26.

7. *Lin S. Y.*, Interleukin-4 Improves Metabolic Abnormalities in Leptin-Deficient and High-Fat Diet Mice / S. Y. Lin, C. P. Yang, Y. Y. Wang [et al.] // Int J Mol Sci. — 2020. — Vol. 21. — № 12. — P. 4451.

8. *Zhang Y.,* Fabrication of Interleukin-4 Encapsulated Bioactive Microdroplets for Regulating Inflammation and Promoting Osteogenesis / Y. Zhang, J. Cao, M. Jian [et al.] // Int J Nanomedicine. — 2023. — Vol. 19 — № 18. — P. 2019—2035.

9. *Большакова О. Б.,* Особенности производства и регистрации БМКП в России / О. Б. Большакова, Т. М. Кулинич, А. М. Шишкин [и др.] // Вестник РНЦРР. — 2021. — Т. 21. —№ 2. — С. 1—24.

10. *Hanna E.,* Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives / E. Hanna, C. Remuzat, P. Auquier [et. al.] // Journal of Market Access and Health Policy. — 2016. — Vol. 4. — № 1. — P. 31036.

11. *Некрасов А. А.*, Эффективность применения ронкорлейкина для профилактики вирусных (респиратор-

ных) заболеваний крупного рогатого скота / А. А. Некрасов, Н. А. Попов, А. Н. Моисеев [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. — 2012. — Т. 1 — № 13. — С. 53—57.

12. *Thompson J. D.,* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. // Gibson Nucleic Acids Res. — 1994. — Vol. 22. — № 22. — P. 4673—4680.

13. *Waterhouse A. M.,* Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench / A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin [et al.] // *Bioinformatics. — 2009.* — Vol. 25. — № 9. — P. 1189—1191.

14. *Vaz D.,* Lessons in protein structure from interleukin-4: All disulfides are not equal / D. Vaz, J. Rodrigues, N. Loureiro-Ferreira, D. Muller [et al.] // Proteins Structure Functions and Bioinformatics. — 2023.

15. *Susanne M. G.*, A Murine Interleukin-4 antagonistic mutant protein completely inhibits Interleukin-4-induced cell proliferation, differentiation, and signal transduction / M. G. Susanne, K. Steffen, S. Bernd, J. Ezernieks [et al.] // Journal of Biological Chemistry. — 1997. — Vol. 272. — № 3. — P. 1480—1483.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Д. В. Копылева — аспирант, младший научный сотрудник НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ;

М. И. Потапович — заведующий НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ;

В. А. Прокулевич — доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии биологического факультета БГУ.

Статья поступила в редакцию 11.02.2025.

Original article
UDC 575.112

BIOINFORMATICS ANALYSIS OF AMINO ACID SEQUENCES OF MAMMALIAN INTERLEUKIN-4

Darya Viktorovna Kopyleva✉, Maksim Iosifovich Potapovich, Vladimir Antonovich Prokulevich

Belarusian State University, Minsk, Belarus, kopyleva.d@gmail.com✉

Abstract. Comparison of amino acid sequences of the cytokine interleukin-4 (IL-4) of mammals (human, bull, sheep, horse, pig, rat, mouse, dog, cat) revealed identity of the key amino acid residues of the first (Glu-9) and second (Arg-88) clusters responsible for the interaction of each species-specific cytokine with its own receptor. The number of coinciding amino acid residues in the protein sequences of humans and animals does not exceed 60 % and is maximum with porcine IL-4—59.6 %. The highest identity of the amino acid sequences of IL-4 (92 %) and conservatism of substitutions are characteristic of relatively similar ungulates (bull, sheep).
Keywords: interleukin-4, multiple alignment, recombinant protein

Recombinant cytokines (signaling molecules) obtained by biotechnology are increasingly used in various sectors of medicine and veterinary science. Cytokines have many biological activities that manifest themselves through interaction with specific cell surface receptors. As a result of such interaction, signal transduction pathways are activated and the expression of controlled genes is regulated. Thus, interleukin-4 (IL-4), which belongs to anti-inflammatory cytokines, is able to regulate the production of antibodies, hematopoiesis, inflammation, ensures the development of effector T-cell responses, being a growth factor for B-cells. In addition, IL-4 increases the cytotoxic activity of lymphocytes and monocytes, enhances the functional activity of myeloid cells. The effects of IL-4 on non-hematopoietic cells include increased fibroblast chemotaxis and endothelial cell adhesion to T-lymphocytes [1, 2, 3]. IL-4 is essential for the induction and maintenance of type II immune response and is primarily produced by immune cells such as T-lymphocytes, mast cells, basophils and eosinophils [1].

First described in 1981, IL-4 is a secreted cytokine of 17.5 kDa (including a signal peptide of ≈2.5 kDa). The structure of human IL-4 in its native state is stabilized by three disulfide bonds forming a compact globule represented by four α-helices (A, B, C, D) [1]. The binding sites of human IL-4 with its receptor contain three highly conserved regions or clusters. The first cluster is localized in the Glu-9 region, where the carboxylate accepts three bonds from the receptor Tyr-13, Tyr-183 and Ser-70. To form a bond with the receptor, Glu-9 must additionally be correctly oriented in the binding site of the Asn-89 residue of interleukin. The second cluster is formed around the ion pair Arg-88 on the side of the IL-4 molecule and Asp-72 on the side of its receptor and is surrounded by aliphatic groups. The third cluster is formed by the amino acid residues of the IL-4 molecule Arg-81, Arg-85, Gln-78 and the receptor residues Asp-66, Asp-67, Asp-125, which cannot form strong hydrogen bonds, since the geometry of such interaction will differ significantly from the standard donor-acceptor interaction of the sp^2 type. It follows from this that the third cluster does not participate in the stabilization of the complex, and its task is to accelerate the formation of the complex due to electrostatic control of the binding of the ligand to the receptor [4]. The leading role of the first and second clusters in the formation of the complex between human interleukin-4 and its receptor, necessary for the implementation of the effects of the cytokine, becomes obvious. Apparently, a similar structural and functional organization should be expected for interleukins-4 of other mammals.

Due to the systemic nature of the cytokine's effect on the body, it is quite difficult to determine the therapeutic role of therapeutic and prophylactic drugs based on interleukin-4, but developments in this direction are underway. Thus, in 2017, a group of researchers presented an experimental work using an injectable drug

based on murine IL-4 for the treatment of myocardial infarction in an *in vivo* model (mice). Scientists noted that controlled one-time local delivery of a high dose of pure IL-4 can be effective in eliminating the consequences of myocardial infarction [5]. In another *in vivo* experiment, it was recorded that IL-4 can effectively restore cellular immunity in case of burn injuries and exposure to ethanol due to the ability to modulate the level of IL-6 [6]. In 2020, a group of Chinese scientists announced the possibility of considering IL-4 as a metabolic regulator for the treatment of obesity and its complications [7]. Later, there appeared the studies proving the efficacy of IL-4 as an anti-inflammatory agent and osteogenesis modulator [8].

In addition, IL-4 is one of the key cytokines in the technology of creating biomedical cell products (BMCP) based on dendritic cells. BMCP are used in the treatment of oncological and genetic diseases, burns, severe heart failure, myocardial infarction, rheumatoid arthritis and neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis, Alzheimer's disease and Parkinson's disease [9, 10].

The presented research areas are new and have important practical significance for both medicine and veterinary science. An example of a proposal to use recombinant human (rh) interleukin-2 for veterinary purposes is known [11]. It is assumed that this human-type cytokine can be widely used for animal immunotherapy, overcoming the barrier of protein species specificity. Considering the therapeutic potential of rhIL-4, an assumption about the possible use of the rhIL-4 substance for the construction of therapeutic and prophylactic drugs, including for veterinary purposes, is considered.

The objective of this study was to conduct a bioinformatics comparative analysis of IL-4 polypeptide sequences in a number of mammals. Based on the results of the study, assumptions are made about the structural differences of type-4 interleukins of mammals of various species.

MATERIAL AND METHODS

Amino acid sequences of interleukin-4 were taken from the GenBank database, accession codes for *Homo sapiens* (human) — AAA59150.1; *Equus caballus* (horse) — AAG21896.1; *Bos taurus* (bull) — AAA30587.1; *Sus scrofa* (pig) — CAA48407.1; *Ovis aries* (sheep) — AAA31552.1; *Canis lupus familiaris* (dog) — AAD11563.1; *Felis catus* (cat) — AAB42052.1; *Rattus norvegicus* (gray rat) — CAC16091.1; *Mus musculus* (house mouse) — AAA39298.1.

Multiple alignment of IL-4 amino acid sequences was performed using the ClustalW algorithm [12] and visualized using the Jalview 2.11.2.7 software package. The percentage of identity was determined using the pairwise alignment algorithm of the Jalview 2.11.2.7 software package [13].

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

In order to test the potential use of human IL-4 substances for veterinary medicine, its amino acid sequences were compared with the sequences of interleukins-4 of some mammals (pig, horse, bull, sheep, dog, cat, rat and mouse). For the analysis, only the structural parts of IL-4 cytokines that determine the functional activity of proteins were used; the signal peptide of extracellular localization was not taken into account in the alignment. The amino acid sequence of human IL-4 served as the reference.

The analysis showed that the number of positions of amino acid residue coincidence in the presented polypeptide sequences of IL-4 from animals relative to the reference does not exceed 60 %: 55 % — with a bovine IL-4; 59.8 % — with a porcine one; 56.6 % — with an ovine one; 51.9 % — with a horse one; 51.2 % — with a feline one; 45.7 % — with a canine one; 43.4 % — with a rat one; 41.3 % — with a mouse one. In addition, all analyzed proteins differ in length from the reference by 6—21 amino acid residues. The closest in the number of amino acid residues to the human one were interleukins-4 from rodents (Fig. 1).

According to the data shown in Fig. 1, the positions of Glu-9 and Arg-88 are identical for all the studied sequences. Based on the high conservation of the central amino acid residues of the first two clusters of IL-4 from different mammals, it can be assumed that the mechanism of their binding to the receptor will be similar to that in humans, but in rodents Glu-9 will apparently be guided by a different amino acid residue.

In the primary structure of the analyzed proteins, the arrangement of three cysteine residues (Cys-24, Cys-46, Cys-99) is identical to the reference for most sequences, with the exception of equine IL-4, where arginine is located at position 46. It is known that in human IL-4, the Cys-46 and Cys-99 residues form a disulfide bond, therefore, it can be assumed that such a bond exists in the studied animal cytokines [14]. The positions of other cysteine residues in all analyzed animal IL-4 sequences do not coincide with those in the human IL-4 sequence. In addition, the total number of possible disulfide bonds varies in the presented proteins from 2 (in cats and dogs) to 3 in other animals.

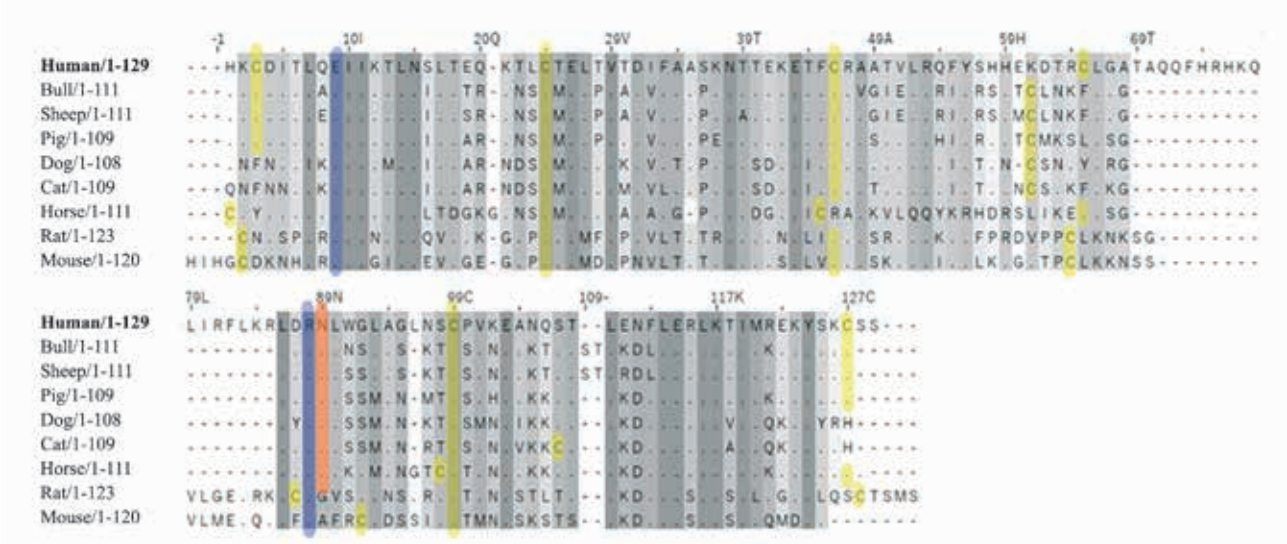


Fig. 1. Multiple alignment of IL-4 amino acid sequences

Amino acid residues that match the residues of human IL-4 are indicated by dots, only polymorphic residues are shown, dashes indicate gaps in the alignment. The gray gradient reflects the degree of conservation of substitutions (matching amino acid residues are indicated in dark gray, conservative (identical in properties) — gray and light gray, non-conservative and gaps — white). Cysteine residues are highlighted in yellow, key amino acid residues of the first (Glu-9) and second (Arg-88) clusters are highlighted in blue, and asparagine-89 residue is highlighted in red

The primary sequences of IL-4 in some animals have a relatively high degree of identity. For the bull and sheep (artiodactyls), the identity of amino acid sequences is estimated at 92 % (Fig. 2, A), for the cat and dog — 80.7 % (Fig. 2, B). On the other hand, the amino acid sequences in rodent IL-4 are only 61 % identical (Fig. 3).

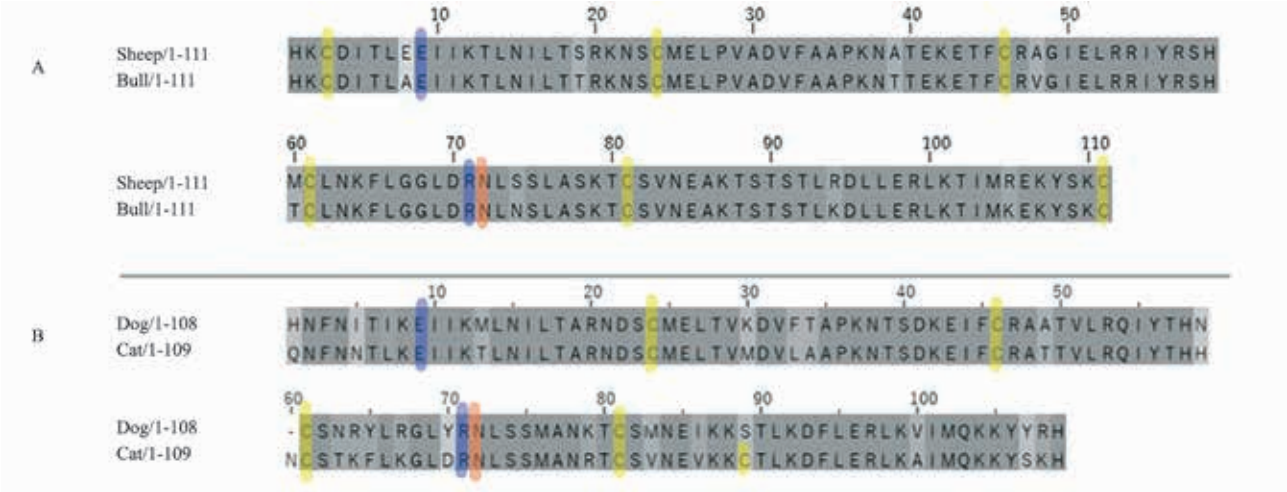


Fig. 2. Pairwise alignment of amino acid sequences of bovine and ovine IL-4 (*A*), dog and cat (*B*)

The gray gradient reflects the degree of conservation of substitutions (matching amino acid residues are shown in dark gray, conservative (identical in properties) — gray and light gray, non-conservative and gaps — white). Cysteine residues are highlighted in yellow, key amino acid residues of the first (Glu-9) and second (Arg) clusters are highlighted in blue, and the asparagine residue involved in the spatial orientation of Glu-9 is shown in red

As shown in Fig. 2, most amino acid residues in the bovine and ovine IL-4 sequences are similar in physicochemical properties, representing polar uncharged (positions 19, 74), positively charged (positions 94, 105) and aliphatic (position 48) amino acids. At positions 39 and 60, the observed substitution of an aliphatic non-polar amino acid for a polar uncharged one most likely makes an insignificant contri-

bution to the change in the tertiary structure of the proteins due to their location in regions of the IL-4 molecules that do not have an ordered secondary structure. Therefore, the described substitutions are highly functionally conservative. The close evolutionary relationship of the presented molecules is also evidenced by the identical position of cysteine residues. At the same time, the presence of a substitution of Ala-8 for negatively charged Glu-8 at position 8 may affect the steric relationships in the first cluster due to its close localization to the key Glu-9.

The comparison of the amino acid sequences of IL-4 in dogs and cats demonstrates a greater number of conservative and non-conservative substitutions located in all structural elements of protein molecules than in a pair of artiodactyls. Thus, the observed substitution of tyrosine for aspartate at position 70 in the second cluster may entail significant steric inconsistencies that can lead to a complete or partial loss of the characteristic biological effects of IL-4 when animals are administered drugs based on seemingly "related", but not completely identical interleukins.

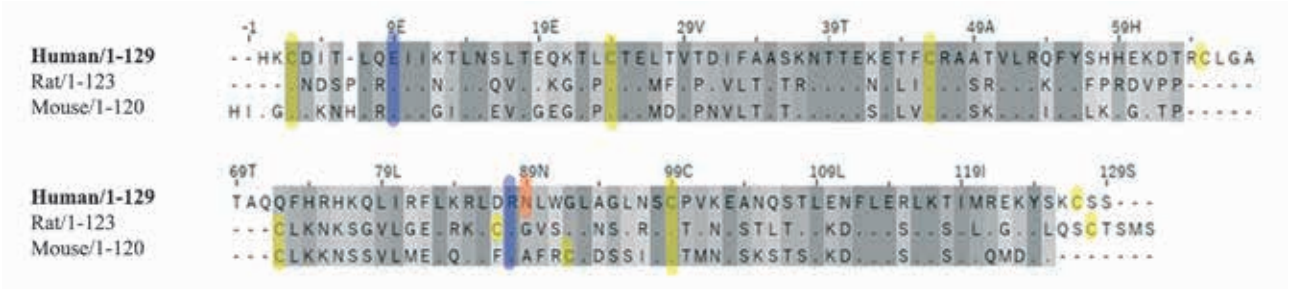


Fig. 3. Multiple alignment of amino acid sequences of human and rodent IL-4

The gray gradient reflects the degree of conservation of substitutions (matching amino acid residues are shown in dark gray, conservative (identical in properties) — gray and light gray, non-conservative and gaps — white). Cysteine residues are highlighted in yellow, key amino acid residues of the first (Glu-9) and second (Arg) clusters are highlighted in blue, and the asparagine residue involved in the spatial orientation of Glu-9 is shown in red

Testing of medical drugs, studying the mechanisms of action of individual substances *in vivo* in most cases is carried out on rodents. The study of IL-4 substances was no exception. At the same time, only partial coincidence of the positions of cysteine residues, low similarity of the amino acid sequences of IL-4 in humans and rodents makes the latter not the most optimal choice for a full analysis. For example, the replacement of one amino acid Asn-89 with sterically different ones raises the question of the possibility of effective interaction of the first IL-4 cluster with its receptor, and the presence of low-conservative amino acid substitutions in the 87th position raises the question of the second.

Considering the significant differences in the number and nature of the arrangement of disulfide bonds, as well as the low similarity of amino acid sequences, it can be concluded that the use of exogenous human IL-4 for therapy in veterinary medicine will most likely not have the expected result. When using it, there is a potential lack of the desired therapeutic effect, the development of allergic reactions and the occurrence of side effects of the body.

Thus, human IL-4, discovered in the last century, still does not have a complete description of the biological effects it exerts, detailed patterns of its action and functional relationship with other regulatory molecules due to the fact that *in vivo* analysis is carried out on heterologous objects, mostly on rodents, where there is no complete correspondence between the human cytokine and the receptor of the model animal [15].

CONCLUSION

The amino acid sequences of IL-4 in the animal organisms presented in the article differ significantly from those of humans, which suggests that it may be difficult to use this human cytokine as a veterinary drug.

The highest identity of amino acid sequences was observed between human IL-4 and porcine IL-4 — almost 60 %. However, compared to human IL-4, porcine IL-4 has significant differences in the length of amino acid chains, binding sites with receptors and structures outside them, which collectively calls into question the possibility of using human IL-4 even for this group of animals.

Nevertheless, the final conclusion made only by *in silico* analysis requires some confirmation. It is necessary to test heterologous proteins for their inherent activities in higher-level systems, *in vitro* and *in vivo*, including for allergenicity, immunogenicity, stability, toxicity, etc.

This also concerns the relatively high similarity of the primary structures of the bovine and ovine interleukin-4 molecules that was detected. A positive result could potentially allow the use of a single drug based on recombinant IL-4 from one of the ungulates to treat inflammatory reactions in both organisms.

REFERENCES

1. *Walter M. R.*, Crystal structure of recombinant human interleukin-4/ M. R. Walter, W. J. Cook, B. G. Zhao [et. al.] // Journal of Biological Chemistry. — 1992. — Vol. 267. — No. 28. — P. 20371—20376.

2. *Sachin P. G.* IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember / P. G. Sachin, J. C. Cronk, G. T. Norris [et. al.] // *J Immunol.* — 2012. — Vol. 189. — No. 9. — P. 4213—4219.

3. *Chandramohan V.*, Immunotoxin Therapy for Brain Tumors / V. Chandramohan, J. H. Sampson, I. H. Pastan [et. al.] // Translational Immunotherapy of Brain Tumors. — 2017. — P. 227—260.

4. *Hage T.*, Crystal Structure of the Interleukin-4/Receptor α Chain Complex Reveals a Mosaic Binding Interface / T. Hage, W. Sebald, P. Reinemer // Cell. — 1999. — Vol. 97. — No. 2. — P. 271—281.

5. *Shintani Y.*, IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice / Y. Shintani, T. Ito, L. Fields [et al.] // Scientific Reports. — 2017. — Vol. 7. — No. 1.

6. *Messingham K. A*, Interleukin-4 treatment restores cellular immunity after ethanol exposure and burn injury / K. A. Messingham, S. A. Heinrich, E. M. Schilling [et. al.] // Alcohol Clin Exp Res. — 2002. — Vol. 26. — No. 4. — P. 519—26.

7. *Lin S. Y.*, Interleukin-4 Improves Metabolic Abnormalities in Leptin-Deficient and High-Fat Diet Mice / S. Y. Lin, C. P. Yang, Y. Y. Wang [et al.] // Int J Mol Sci. — 2020. — Vol. 21. — No. 12. — P. 4451.

8. *Zhang Y.,* Fabrication of Interleukin-4 Encapsulated Bioactive Microdroplets for Regulating Inflammation and Promoting Osteogenesis / Y. Zhang, J. Cao, M. Jian [et al.] // Int J Nanomedicine. — 2023. — Vol. 19 — No. 18. — P. 2019—2035.

9. *Bolshakova O. B.,* Features of production and registration of BMCP in Russia / O. B. Bolshakova, T. M. Kulinich, A. M. Shishkin [et al.] // Vestnik RNTsRR. — 2021. — Vol. 21. — No. 2. — P. 1—24.

10. *Hanna E.,* Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives / E. Hanna, C. Remuzat, P. Auquier [et. al.] // Journal of Market Access and Health Policy. — 2016. — Vol. 4. — No. 1. — P. 31036.

11. *Nekrasov A. A.,* Efficacy of using roncorleukin for the prevention of viral (respiratory) diseases of cattle / A. A. Nekrasov, N. A. Popov, A. N. Moiseev [et al.] // Aktualnye voprosy veterinarnoy biologii (Current issues in veterinary biology). — 2012. — V. 1 — No. 13. — P. 53—57.

12. *Thompson J. D.,* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. // Gibson Nucleic Acids Res. — 1994. — Vol. 22. — No. 22. — P. 4673—4680.

13. *Waterhouse A. M.,* Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench / A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin [et al.] // *Bioinformatics. — 2009.* — Vol. 25. — No. 9. — P. 1189—1191.

14. *Vaz D.,* Lessons in protein structure from interleukin-4: All disulfides are not equal / D. Vaz, J. Rodrigues, N. Loureiro-Ferreira, D. Muller [et al.] // Proteins Structure Functions and Bioinformatics. — 2023.

15. *Susanne M. G.*, A Murine Interleukin-4 antagonistic mutant protein completely inhibits Interleukin-4-induced cell proliferation, differentiation, and signal transduction / M. G. Susanne, K. Steffen, S. Bernd, J. Ezernieks [et al.] // Journal of Biological Chemistry. — 1997. — Vol. 272. — No. 3. — P. 1480—1483.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

D. V. Kopylyova — Postgraduate Student, Junior Scientific Associate of the Biotechnology Research Laboratory, Department of Microbiology, Biological Faculty of BSU;

M. I. Potapovich — Head of the Biotechnology Research Laboratory, Department of Microbiology, Biological Faculty of BSU;

V. A. Prokulevich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Microbiology, Biological Faculty of BSU.

The article was submitted 28.01.2025.

Научная статья
УДК 619:[612.017:618.33]:636.2

ФОРМИРОВАНИЕ КОЛОСТРАЛЬНОГО И ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ТЕЛЯТ С ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Юрий Николаевич Бригадиров[*], Максим Сергеевич Жуков[*]✉, Иван Тихонович Шапошников[*], Ирина Владимировна Волкова[*], Олег Валериевич Якимчук[*], Петр Васильевич Мирошниченко[**], Виктория Михайловна Басанкина[**]

[*]Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, maxim.zhukoff2015@yandex.ru✉
[**]Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии, Краснодар, Россия

Аннотация. Цель данного исследования заключалась в изучении формирования колострального иммунитета и оценке эффективности вакцинации у телят с перинатальной патологией. Объектом исследования были новорожденные телят, рожденных от здоровых и больных (анемия и гепатодистрофия) коров красно-пестрой породы: группа I — клинически здоровые телята (n = 8), группа II — телята, с антенатальной гипоксией (n = 14), группа III — телята с антенатальной гепатодистрофией (n = 6). Диагноз ставили на основании анамнеза коров-матерей и результатов клинико-гемато-биохимического обследования новорожденных телят. В 30 дневном возрасте телята подвергались иммунизации вакциной «ХИПРАБОВИС 4». Биопрепарат вводили внутримышечно в область шеи в объеме — 3 мл двукратно с интервалом 21 день. На 3, 7, 14, 30, 45 и 60 день после рождения производился отбор крови для определения титра антител к вирусам парагрипп-3 (ПГ-3), инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусной диареи (ВД) и респираторно-синцитиальной инфекции (РСИ). Установлено, что на 3 день после рождения у телят из группы II, титр колостральных антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ был ниже на 63,0, 54,1, 60,9 и 16,9 % соответственно, чем у животных группы I. У телят из группы III серологические показатели крови были такими же, как и у телят из группы I. При вакцинации все животных отмечался рост уровня антител ко всем вирусным компонентам вакцины. Однако, у телят, полученных от коров с экстрагенитальной патологией, прирост антител был ниже. В группе II титр антител к вирусу ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ оказался ниже на 78,7, 15,4, 58,3 и 89,3 % соответственно, а в группе III — к вирусу ПГ-3 и ИРТ на 70,4 и 61,9 % соответственно, в сравнении с группой I.

Ключевые слова: телята, перинатальная патология, колостральный иммунитет, вакцинация

ВВЕДЕНИЕ

Иммунопрофилактика является одним из наиболее значимых мероприятий, повышающих выживаемость новорожденных телят. Известно, что они появляются на свет серонегативнымии из-за особенностей строения плаценты крупного рогатого скота, которая не позволяет передавать антитела выработанные матерью потомству. Их передача телятам осуществляется за счет иммуноглобулинов содержащихся в молозиве коров-матерей. Процесс переноса иммуноглобулинов наиболее интенсивен у телят в течение первых 24—36 часов после рождения. Данный период также важен для животноводов, так как полноценность формирования колострального иммунитета в большей степени определяет будущее развитие и сохранность здоровья теленка. Для повышения уровня колострального иммунитета у телят многие животноводы и ветеринарные специалисты прибегают к вакцинации коров в сухостойный период от наиболее распространенных инфекций таких, как парагрип-3, инфекционный ринотрахеит, вирусная

диарея и респираторно-синцитиальная инфекция. Средний период полураспада сывороточных антител к данным возбудителям у невакцинированных телят составляет 21—36 дней, а время до их серонегативного статуса 123—192 дня [1, 2]. Поэтому для минимизации вероятности развития респираторных заболеваний у телят большинство ветеринарных специалистов проводят их иммунизацию в возрасте 1—3 месяца, вакцинами «Тривак» (ФКП «Ставропольская биофабрика», Россия), «Бовишилд Голд FP5 L5» (Zoetis Inc., USA), Бовилис Виста Once SQ (Intervet Inc. USA), «ХИПРАБОВИС 4» (Laboratorios Hipra, S.A., Испания) и др. Так же исследователи указывают на то, что в настоящее время у 26,7 % новорожденных телят уровень IgG в сыворотке < 15 г/л, что свидетельствует о недостаточности колострального иммунитета [3]. Вместе с этим необходимо отметить, что 20—70 % телят рождается с наличием патологий антенатального и интранатального происхождения (антенатальная гепатодистрофия, антенатальная гипоксия, интранатальная асфиксия и др.), которые вносят большой вклад в снижение жизнеспособности новорожденных телят [4—6]. Однако на сегодняшний момент нет полного представления о состоянии иммунной системы телят, перенесших эти патологические состояния.

Целью данного исследования явилось изучение формирования колострального иммунитета и эффективности вакцинации телят с перинатальной патологией. Понимание этого, приблизит нас к разработке более эффективных стратегий контроля и профилактики болезней, включая программы вакцинации для этих животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование проводилось на сельскохозяйственном предприятии, занимающимся молочным скотоводством. В опыте было задействовано 28 новорожденных телят полученных от коров красно-пестрой породы с разным клиническим статусом во время беременности. На основании данных анамнеза коров-матерей и результатов клинико-гемато-биохимического обследования новорожденных телят было сформировано три группы животных.

Критерий включения в исследование. В группу I вошли телята (n = 8), рожденные от клинически здоровых коров, беременность и роды которых протекали физиологически. При рождении телята не имели врожденных патологий и были морфофункционально развиты. В группу II вошли телята (n = 14), рожденные от коров с сочетанной патологией (анемия и гепатодистрофия), роды которых протекали физиологически. После рождения у телят выявлялся цианоз слизистых оболочек и замедленная реакция на щипок (> 10 секунд), концентрация гемоглобина < 100 г/л., гиперферментемия (АсАТ > 30 Е/л., ГГТ > 300 Е/л и ШФ > 200 Е/л). Таким образом, на основании этих данных можно было утверждать, что эти телята имеют признаки перенесения интранатальной гипоксии, следствием которой является врожденная анемия и гепатодистрофия. В группу III вошли телята (n = 6), рожденные от коров с гепатодистрофией, роды которых протекали физиологически. После рождения у телят выявляли гепатомегалию и гиперферментемию (АсАТ > 30 Е/л., ГГТ > 300 Е/л и ШФ > 200 Е/л), что в совокупности указывало на наличие антенатальной гепатодистрофии.

Все коровы за 60 дней до отела подвергались иммунизации комбинированной 4-х валентной вакциной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи и респираторно-синцитиального вируса КРС «ХИПРАБОВИС 4» (Laboratorios Hipra, S.A., Испания) с целью повышения уровня антител в молозиве для создания напряженного колострального иммунитета у новорожденных. Вакцину вводили внутримышечно в область шеи в объеме — 3 мл двукратно с интервалом 28—30 дней. Животные находились на беспривязном содержании и получали полноценный рацион. У всех коров в результате естественного отела на свет появились телята. После того как мать облизала новорожденного теленка, его помещали в бокс на два часа, где поддерживалась температура 38,5—40,0 °С. Затем телят содержали в индивидуальных домиках, установленных на открытой площадке с твердым покрытием. Площадка была защищена от ветра с трех сторон. Необходимо отметить, что все телята через 60 минут после рождения получали 1,8—2,0 литра молозива хорошего качества. Повторное кормление проводили через 6 часов. Последующие 5 дней молозиво-молоко выпаивали по 2 л 3 раза в день из сосковой поилки. В течение последующих 65 суток им выпаивали сборное молоко. В возрасте 5—7 дней животным начинали скармливать престартерный комбикорм с переходом на стартерный на 50—56 сутки. С 9—10 дневного возраста телята имели свободный доступ к воде и их приучали к поеданию сена, а с 64—70 к поеданию силоса. В 30 дневном возрасте телята подвергались иммунизации вакциной «ХИПРАБОВИС 4». Ее вводили в дозе 3 мл дву-

кратно с интервалом в 21 день. Для изучения специфического иммунитета у телят, индуцированного приемом молозива и комбинированной вакциной «ХИПРАБОВИС 4», проводили отбор крови и исследовали ее сыворотку на наличие специфических антител к вышеуказанным возбудителям. Кровь от телят получали на 3, 7, 14, 30, 45 и 60 день после рождения из яремной вены с помощью вакуумной системы забора крови в пробирки с активатором свертываемости крови SiO_2 (Китай). Полученная сыворотка подвергалась серологическому исследованию для определения титра антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ с помощью коммерческих наборов в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

Собранные цифровые данные были подвергнуты статистическому анализу с применением программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. Были вычислены среднее арифметическое (M) и стандартная ошибка среднего (SE). Для оценки статистической значимости различий между выборками был применен непараметрический критерий Манна — Уитни. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты серологических исследований крови телят с антенатальной гепатодистрофией, показали, что уровень антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ у этих животных был таким же, как и у клинически здоровых. Однако у телят с антенатальной гипоксией, уровень антител к этим вирусам оказался ниже. Так титр антител к вирусу ПГ-3 составил 1 : 853,3 ± 196,68, к вирусу ИРТ — 1 : 58,6 ± 11,25, к вирусу ВД — 1 : 40,0 ± 8,0, а к вирусу РСИ — 1 : 13,3 ± 2,67. В то время, как у здоровых телят соответствующие показатели составили 1 : 2304,0 ± 256,0, 1 : 127,6 ± 3,23, 1 : 102,4 ± 15,68 и 1 : 16,0 ± 0,01. Таким образом, было установлено, что у телят с антенатальной гипоксией, титр колостральных антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ был ниже на 63,0, 54,1, 60,9 и 16,9 % соответственно.

Дальнейшее изучение динамики антител у телят из группы I показало, что титр колостральных антител к вирусу ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ имел тенденцию снижения. В результате к месячному возрасту, наблюдали снижение титра колостральных антител к вышеуказанным вирусам до уровня 1 : 1408,0 ± 470,3, 1 : 88,0 ± 24,0, 1 : 35,6 ± 15,6 и 1 : 4,0 ± 4,0 соответственно (рис. 1). Расчет разницы данных результатов с исходным их уровнем показал, что титр антител к вирусу ПГ-3 снизился на 38,9 %, к ИРТ — на 31,0 %, к ВД — на 65,2 % ($P < 0,05$) и к РСИ — на 75,0 % ($P < 0,05$). У телят, принесших антенатальную гипоксию, в течение первой недели жизни наблюдалось увеличение титра антител к вирусам ПГ-3, ИРТ и ВД до уровня 1 : 2800,0 ± 350,54, 1 : 192,0 ± 40,48 и 1 : 121,6 ± 55,56 соответственно. Дальнейшее наблюдение показало, что к месячному возрасту у данных телят уровень титра антител к вирусу ВД снижался до 1 : 21,3 ± 10,65. Таким образом, в сравнении с титром антител на 7 день жизни он был ниже на 82,5 % ($P < 0,05$). При этом титр антител к вирусу ПГ-3 и ИРТ к месячному возрасту телят был выше исходного уровня на 75,0 % (1 : 1493,3 ± 564,4) и 82,1 % (1 : 106,7 ± 21,3) соответственно. Также необходимо отметить, что антитела к респираторно-синцитиальной инфекции у данной группы животных уже исчезали к концу второй недели жизни после рождения. Динамика колостральных антител у телят с антенатальной гепатодистрофией, характеризовалась интенсивным снижением антител к вирусу ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ в течение первых двух недель до уровня 1 : 1040 ± 240,0, 1 : 64,0 ± 22,63, 1 : 20,0 ± 7,66 и 1 : 3,2 ± 3,2, в результате чего их значения были ниже группы сравнения на 40,9, 42,9, 85,8 и 20,0 %, соответственно. В дальнейшем до месячного возраста они оставались приблизительно на том же уровне.

Дальнейшие исследования показали, что у здоровых телят через 15 дней после вакцинации увеличивался титр антител к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД и РСИ. При этом необходимо отметить, что титр антител к вирусу ПГ-3 увеличился на 42,0 % (1 : 2000,0 ± 560,0), а к вирусу ИРТ, ВД и РСИ в 2,1 (1 : 185,6 ± 45,71), 4,1 (1 : 196,5 ± 60,0) и 8 (1 : 64,0 ± 48,27) раз соответственно. Через 9 дней после ревакцинации титр антител к вирусу ПГ-3 снижался на 60,0 % (1 : 1800,0 ± 160,0). При этом титр антител к вирусу ИРТ и ВД увеличился на 64,9 (1 : 208,0 ± 48,0) и 33,2 % (1 : 192,0 ± 36,0), а к вирусу РСИ в 3,5 раза (1 : 224,0 ± 32,0). Реакция телят, перенесших антенатальную гипоксию, на вакцинацию была аналогичной животным из группы I, но ее эффективность была ниже. Например, титр антител к вирусу ПГ-3 составил 1 : 384,0 ± 86,6, к вирусу ИРТ — 1 : 176,0 ± 48,0, к вирусу ВД— 1 : 80,0 ± 16,0, а к вирусу РСИ — 1 : 24,0 ± 13,86. Сравнение показало, что средний тир антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ у телят из группы II был ниже на 78,7, 15,4, 58,3 и 89,3 % соответствен-

но. В свою очередь у телят, перенесших антенатальную гепатодистрофию, реакция и эффективность вакцинации была лучше, чем у телят из группы II, но хуже чем у телят из группы I. Титр антител к вирусу ПГ-3 составил 1 : 533,3 ± 106,7, к вирусу ИРТ — 1 : 256,0 ± 0,001, к вирусу ВД-БС — 1 : 149,3 ± 56,4, а к вирусу РСИ — 1 : 85,3 ± 21,3. В сравнении с группой I у данных телят был достоверно ниже титр антител к вирусу ПГ-3 и РСИ на 70,4 и 61,9 % ($P < 0,05$).

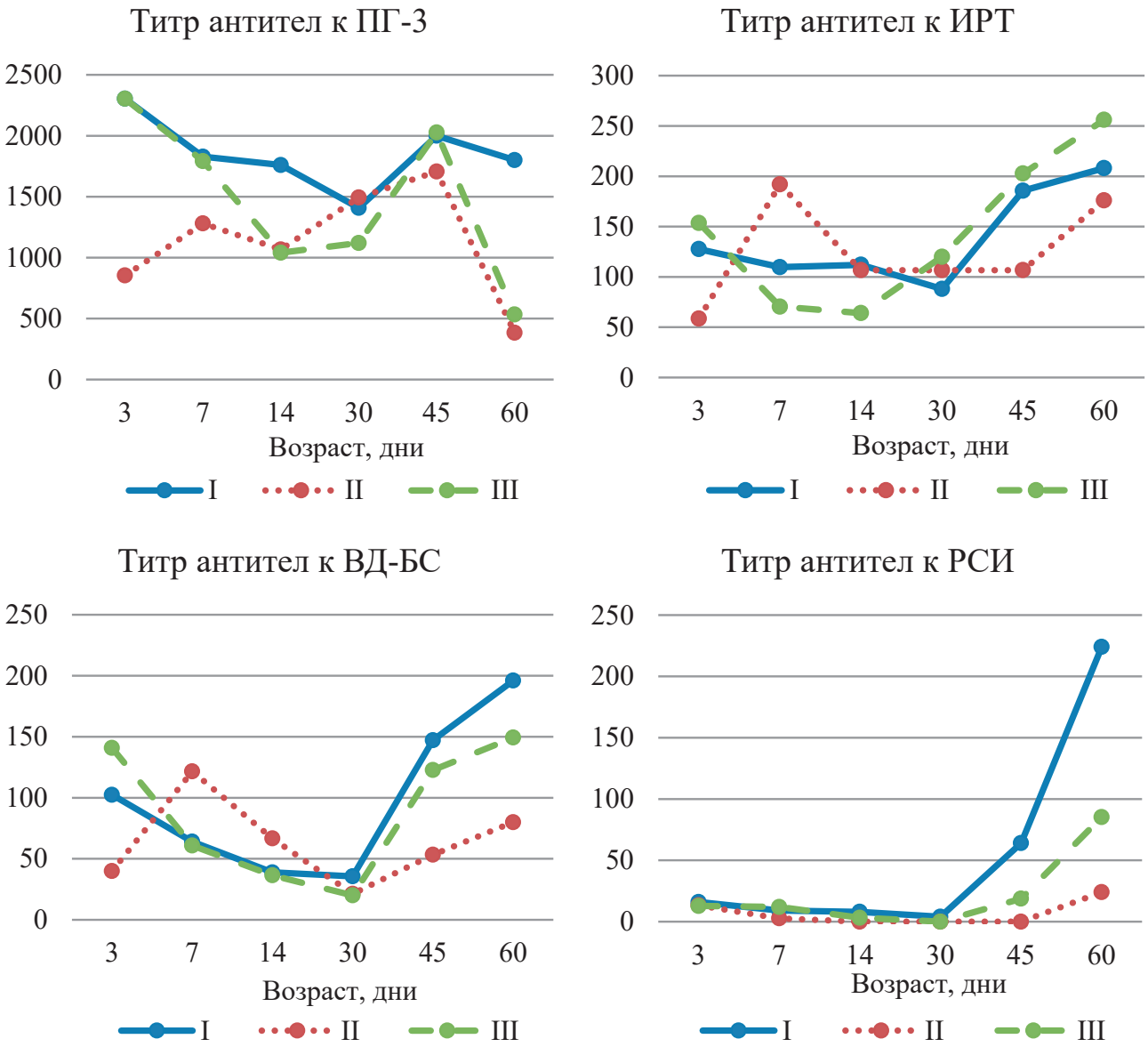


Рис. 1. Динамика специфического иммунитета у здоровых телят и перенесших перинатальную патологию

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что у телят, полученных от коров с экстрагенитальной патологией, имеются нарушения колострального иммунитета. В частности это наблюдается у телят, рожденных от коров с анемией. Ранее представленные нами данные также показали, что молозиво от таких коров менее богато иммуноглобулинами [7]. Также необходимо отметить, что зачастую телята, рожденные от таких коров, переносят антенатальную гипоксию и интранатальную асфиксию. Серией исследований доказано, что данные патологические состояния снижают абсорбцию колостральных иммуноглобулинов [8—11]. В свою очередь у телят, полученных от коров с гепатодистрофией, снижение абсорбции иммуноглобулинов не наблюдалась и была идентична уровню телят рожденных без патологий. Дальнейшее наблюдение

за периодом полураспада специфических антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ показал, что у здоровых телят он проходил около 30 дней, что согласуется с данными ряда авторов [1, 2]. Аналогичная тенденция наблюдалась и у телят, рожденных от коров с гепатодистрофией. Однако, необходимо отметить, что у телят, перенесших антенатальную гипоксию, к концу первой недели жизни наблюдалось увеличение титра антител к вирусам ПГ-3, ИРТ и ВД-БС. Подобные феномены могут наблюдаться в двух случаях. Первое, это продолжительное кормление переходным молоком, которое в течение трех дней достоверно увеличивает концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови новорожденных телят [12, 13]. Второе, это контакт с вирусами, циркулирующими внутри предприятия. Так в исследовании, проведенном научным коллективом во главе с Windeyer M. C. было показано, что первоначальный титр антител новорожденных телят, не мешает выработке антител при их заражении вирусами [14]. Таким образом, новорожденные телята, рожденные в условиях гипоксии, обладают низким уровнем колострального иммунитета, что не позволяет им эффективно защищаться от вирусных инфекций. Подтверждением этого было увеличение титра антител к вирусам ПГ-3 и ИРТ на 75,0—82,1 % в течение первого месяца жизни.

Дальнейшие исследования показали, что все группы животных, участвовавших в эксперименте, отреагировали ростом уровня антител ко всем вирусным компонентам вакцины. Однако, стоит отметить, что у телят из группы I уровень антител к вирусу ПГ-3 сначала повысился на 42,0 %, а затем снизился на 10,0 %. Это, вероятно, связано с нейтрализацией избыточного количества антител самой вакциной, как это часто происходит при вакцинации на фоне высокого уровня колостральных антител [14]. Так же было замечено, что эффективность иммунизации телят, родившихся от коров с экстрагенитальной патологией, была ниже, чем у телят от здоровых коров. Это, вероятно, связано с тем, что у телят, рожденных от коров с гипоксией и/или гепатодистрофией, часто наблюдается антенатальная гепатодистрофия [4]. В норме, в конце первой недели жизни у новорожденных телят начинается процесс становления белоксинтезирующей функции печени, который полностью завершается в 5—6 месячном возрасте. Однако, при наличии гепатодистрофии у новорожденных телят эта функция снижается [15]. Это, в свою очередь, создает риск развития вторичного иммунодефицита и снижает эффективность вакцинопрофилактики у телят. Таким образом, можно предположить, что выявленные иммунологические особенности телят с антенатальной патологией повышают вероятность возникновения у них заболеваний, в частности респираторной патологии вызываемой вирусами ПГ-3, ИРТ, ВД и РСИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали, что у телят с перинатальными патологиями существует риск нарушения формирования колострального иммунитета. Этот риск особенно высок у телят, которые перенесли гипоксию. Также было установлено, что эффективность вакцинации у телят снижается при наличии у них в анамнезе антенатальной гипоксии и гепатодистрофии. Это указывает на необходимость разработки и применения специальных подходов к вакцинации таких телят, а также на важность учета их перинатального анамнеза при планировании и проведении вакцинации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Fulton R. W.* Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination / R. W. Fulton, R. E. Briggs, M. E. Payton, A. W. Confer, J. T. Saliki, J. F. Ridpath, L. J. Burge, G. C. Duff // Vaccine. — 2004. — Vol. 2 (5—6). — P. 643—649. DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.08.033

2. *Масьянов Ю. Н.* Формирование гуморального иммунитета у телят в норме и при патологии / Ю. Н. Масьянов, А. Г. Шахов //. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. — 2012. — № 5. — С. 40—43.

3. *Shivley C. B.* Preweaned heifer management on US dairy operations: Part II. Factors associated with colostrum quality and passive transfer status of dairy heifer calves / C. B. Shivley, J. E. Lombard, N. J. Urie, D. M. Haines, R. Sargent, C. A. Kopral, T. J. Earleywine, J. D. Olson, F. B. Garry // J Dairy Sci. — 2018. — Vol. 101 (10). — P. 9185—9198. DOI: 10.3168/jds.2017-14008

4. *Шахов А. Г.* Методическое пособие по диагностике и профилактике нарушений антенатального и интранатального происхождения у телят / А. Г. Шахов, Ю. Н. Алехин, С. В. Шабунин, Л. Ю. Сашнина, Д. В. Федосов, Т. А. Ерина, О. В. Пригородова, И. Р. Сидельникова, А. В. Голубцов. — Воронеж: Изд-во «Истоки», 2013. — 92 с.

5. *Черницкий А. Е.* Профилактика респираторных заболеваний у новорожденных телят с пониженной жизнеспособностью / А. Е. Черницкий, С. В. Шабунин //

Ветеринария. — 2017. — № 9. — С. 10—16. DOI 10.30896/0042-4846.2017.20.9.10-16

6. *Востроилова Г. А.* Динамика показателей белкового обмена у телят — гипотрофиков при применении препарата рекомбинантного лямбда — интерферона / Г. А. Востроилова, Н. А. Хохлова, Е. В. Косякова, Л. Ю. Сашнина, Ю. А. Чаплыгина, Г. Г. Чусова // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2021. — № 1(14). — С. 51—64. DOI 10.17238/issn2541-8203.2021.1.51

7. *Жуков М. С.* Особенности формирования колострального иммунитета у новорожденных, полученных от коров с экстрагенитальными патологиями / *Жуков М. С. Паршин П. А.*, *Востроилова Г. А.*, *Шапошников И. Т.*, *Бригадиров Ю. Н.*, *Алехин Ю. Н.* // Международный вестник ветеринарии. —2024. — № 3. — С. 95—107. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.95

8. *Алехин Ю. Н.* Absorption of colostral immunoglobulins in calves with experimental intranal asphyxia / Ю. Н. Алехин, М. С. Жуков. Материалы VI международной научной конференции Наука России: Цели и задачи. — 2017. — № 4. — С. 41—47. DOI: 10.18411/sr-10-12-2017-66

9. *Черницкий А. Е.* Связь колострального иммунитета и биохимического статуса у новорожденных телят в первые дни жизни / А. Е. Черницкий, М. И. Рецкий, А. И. Золотарев, Л. И. Ефанова, Э. В. Братченко // Сельскохозяйственная биология. — 2013. — 6. — С. 94—99.

10. *Besser T. E.* Decreased colostral immunoglobulin absorption in calves with postnatal respiratory acidosis / T. E. Besser, O. Szenci, C. C. Gay // J Am Vet Med Assoc. — 1990. — Vol. 196. — P. 1239—1243.

11. *Boyd J. W.* Relationships between acid-base balance, serum composition and colostrum absorption in newborn calves / J. W. Boyd // Br *Vet J.* — 1989. — Vol. 145(3). — P. 249—256. DOI: 10.1016/0007-1935(89)90077-8

12. *Hare K. S.* Feeding colostrum or a 1 : 1 colostrum: whole milk mixture for 3 days after birth increases serum immunoglobulin G and apparent immunoglobulin G persistency in Holstein bulls / K. S. Hare, S. Pletts, J. Pyo, D. Haines, L. L. Guan, M. Steele // J Dairy Sci. — 2020. — Vol. 103(12). — P. 11833—11843. DOI: 10.3168/jds.2020-18558

13. *Шахов А. Г.* Методические рекомендации по оптимизации формирования колострального иммунитета у новорожденных животных / А. Г. Шахов, С. В. Шабунин, М. И. Рецкий, А. И. Золотарев, Ю. Н. Масьянов, Л. Ю. Сашнина, Г. Н. Близнецова, Ю. Н. Алехин, Ю. Н. Федоров, А. А. Частов, О. А. Скрабневская. — Воронеж: ГНУ «ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии», 2009. — 42 с.

14. *Windeyer M. C.* Association of bovine respiratory disease or vaccination with serologic response in dairy heifer calves up to three months of age / M. C. Windeyer, K. E. Leslie, S. M. Godden, D. C. Hodgins, K. D. Lissemore, S.J. LeBlanc. // Am J Vet Res. — 2015. — Vol. 76(3). — P. 239—45. DOI: 10.2460/ajvr.76.3.239

15. *Алехин Ю. Н.* Методические рекомендации по диагностике, профилактике и терапии гепатопатий у крупного рогатого скота / Ю. Н. Алехин, С. В. Шабунини, М. И. Рецкий, Г. Н. Близнецова. И. Р. Сидельникова, Д. Б. Чусов, И. А. Никулин, Б. В. Уша, И. А. Шкуратова — Воронеж: ГНУ «ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии», 2009. — 86 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ю. Н. Бригадиров — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;
М. С. Жуков — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
И. Т. Шапошников — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;
И. В. Волкова — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;
О. В. Якимчук — ветеринарный врач;
П. В. Мирошниченко — ведущий научный сотрудник;
В. М. Басанкина — старший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 27.01.2025.

Original article
UDC 619:[612.017:618.33]:636.2

FORMATION OF COLOSTRAL AND POST-VACCINATION IMMUNITY AGAINST VIRAL INFECTIONS IN THE CALVES WITH PERINATAL PATHOLOGY

Yuriy Nikolaevich Brigadirov[*], Maksim Sergeevich Zhukov[*]✉, Ivan Tikhonovich Shaposhnikov[*], Irina Vladimirovna Volkova[*], Oleg Valerievich Yakimchuk[**], Petr Vasilyevich Miroshnichenko[***], Viktoriya Mikhaylovna Basankina[***]

[*]All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, maxim.zhukoff2015@yandex.ru✉
[**]Yudanovskie Prostory, Voronezh region, Russia
[***]Krasnodar Research Center for Zootechnics and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia

Abstract. The objective of this research was to study the formation of colostral immunity and assess the efficacy of vaccination in the calves with perinatal pathology. The object of the study were the newborn calves born from healthy and sick (anemia and hepatodystrophy) Red-Motley cows: group I — clinically healthy calves (n = 8), group II — calves with antenatal hypoxia (n = 14), group III — calves with antenatal hepatodystrophy (n = 6). The diagnosis was based on the history of the mother cows and the results of clinical, hematobiochemical examination of newborn calves. At the age of 30 days, the calves were immunized with the vaccine HIPRABOVIS4. The biopreparation was administered intramuscularly in the neck area in a volume of 3 ml twice with an interval of 21 days. On days 3, 7, 14, 30, 45 and 60 after birth, blood was collected to determine the titer of antibodies to parainfluenza-3 (PI-3), infectious bovine rhinotracheitis (IBR), viral diarrhea (VD) and respiratory syncytial virus (RSV). It had been found that on day 3 after birth, the titer of colostral antibodies to PI-3, IBR, VD and RSV in the calves of group II was by 63.0, 54.1, 60.9 and 16.9 % lower, respectively, than in the animals of group I. In the calves of group III, the serological blood indicators were the same as in the calves of group I. During vaccination, all animals showed an increase in the level of antibodies to all viral components of the vaccine. However, in the calves obtained from the cows with extragenital pathology, the increase in antibodies was lower. In group II, the antibody titer to the PI-3 virus, IBR, VD and RSV was lower by 78.7, 15.4, 58.3 and 89.3 %, respectively, and in group III, it was lower to the PI-3 virus and IBR by 70.4 and 61.9 %, respectively, compared to group I.
Keywords: calves, perinatal pathology, colostral immunity, vaccination

INTRODUCTION

Immunoprophylaxis is one of the most significant measures increasing the survival rate of the newborn calves. It is known that they are born seronegative due to the structural features of bovine placenta, which does not allow the transfer of antibodies produced by the mother to the offspring. They are transferred to calves due to immunoglobulins contained in the colostrum of mother cows. The process of immunoglobulin transfer is most intense in calves during the first 24—36 hours after birth. This period is also important for livestock breeders, since the completeness of colostral immunity formation largely determines the future development and health of a calf. To increase the level of colostral immunity in calves, many livestock breeders and veterinary specialists resort to vaccinating cows during the dry period against the most common infections such as parainfluenza-3, infectious rhinotracheitis, viral diarrhea and respiratory syncytial virus. The average half-life of serum antibodies to these pathogens in unvaccinated calves is 21—36 days, and the time to their seronegative status is 123—192 days [1, 2].

Therefore, to minimize the likelihood of respiratory diseases development in calves, most veterinary specialists immunize them at the age of 1—3 months with the vaccines Trivak (FSOE Stavropol Biofactory, Russia), Bovi-Shield Gold FP5 L5 (Zoetis Inc., USA), Bovilis Vista Once SQ (Intervet Inc. USA), HIPRABOVIS4 (Laboratorios Hipra, S.A., Spain), etc.

The researchers also point out that currently 26.7 % of the newborn calves have a serum IgG level of < 15 g/L, which indicates insufficient colostral immunity [3].

At the same time, it should be noted that 20—70 % of calves are born with pathologies of antenatal and intranatal origin (antenatal hepatodystrophy, antenatal hypoxia, intranatal asphyxia, etc.), which make a significant contribution to the decrease in the viability of the newborn calves [4—6]. However, at the moment there is no complete picture of the state of the immune system of calves who have suffered from these pathological conditions.

The objective of this research was to study the formation of colostral immunity and the efficacy of vaccination of calves with perinatal pathology. Understanding this will bring us closer to the development of more effective strategies for disease control and prevention, including vaccination programs for these animals.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted at an agricultural enterprise specialized in dairy cattle breeding. The experiment involved 28 newborn calves obtained from Red-Motley cows with different clinical status during gestation. Based on the anamnesis of the mother cows and the results of the clinical and hematobiochemical examination of the newborn calves, three groups of animals were formed.

Inclusion criterion for the study. Group I included the calves (n = 8) born from the clinically healthy cows, whose gestation and birth were physiological. At birth, the calves had no congenital pathologies and were morphofunctionally developed. Group II included the calves (n = 14) born from the cows with combined pathology (anemia and hepatodystrophy), whose birth was physiological. After birth, the calves showed cyanosis of the mucous membranes and a slow reaction to a pinch (> 10 seconds), hemoglobin concentration < 100 g/L, hyperenzymemia (AST > 30 U/L, GGT > 300 U/L and ALP > 200 U/L). Thus, based on these data, it could be argued that these calves have signs of intranatal hypoxia, the consequence of which is congenital anemia and hepatodystrophy. Group III included the calves (n = 6) born from the cows with hepatodystrophy, whose calving proceeded physiologically. After birth, hepatomegaly and hyperfermentemia (AST > 30 U/L, GGT > 300 U/L and ALP > 200 U/L) were detected in the calves, which together indicated the presence of antenatal hepatodystrophy.

All cows were immunized with a combined quadrivalent vaccine HIPRABOVIS4 (Laboratorios Hipra, S.A., Spain) against infectious rhinotracheitis, parainfluenza-3, viral diarrhea and bovine respiratory syncytial virus 60 days before calving in order to increase the level of antibodies in colostrum to create intense colostral immunity in newborns.

The vaccine was administered intramuscularly in the neck area in a volume of 3 ml twice with an interval of 28—30 days. The animals were kept loose and received a complete diet. All cows gave birth to calves as a result of natural calving. After the mother licked the newborn calf, it was placed into a box for two hours, where the temperature was maintained at 38.5—40.0 °C.

Then the calves were kept in individual houses installed on an open area with a hard surface. The area was protected from the wind on three sides. It should be noted that all the calves received 1.8—2.0 liters of good quality colostrum 60 minutes after birth. Repeated feeding was carried out in 6 hours. The following 5 days, colostrum-milk was fed 2 liters 3 times a day from a nipple drinker.

During the next 65 days, they were fed collected milk. At the age of 5—7 days, the animals began to be fed pre-starter compound feed, switching to starter on day 50—56. From the age of 9—10 days, the calves had free access to water and were accustomed to eating hay, and from 64—70 days — eating silage. At the age of 30 days, the calves were immunized with the vaccine HIPRABOVIS4. It was administered at a dose of 3 ml twice with an interval of 21 days. To study the specific immunity in calves induced by the intake of colostrum and the combined vaccine HIPRABOVIS4, the blood was collected and its serum was examined for the presence of specific antibodies to the above-mentioned pathogens.

Blood from calves was obtained from the jugular vein using a vacuum blood collection system in test tubes with a blood coagulation activator SiO_2 (China) on days 3, 7, 14, 30, 45 and 60 after birth. The obtained serum was subjected to serological testing to determine the titer of antibodies to PI-3, IBR, VD and RSV using commercial kits in the hemagglutination inhibition reaction (HAIR) and the indirect hemagglutination reaction (IHAR).

The collected digital data were subjected to statistical analysis using Microsoft Office Excel 2007 software. The arithmetic mean (M) and standard error of the mean (SE) were calculated. The nonparametric Mann — Whitney test was used to assess the statistical significance of differences between samples. A significance level of 5 % was used when testing statistical hypotheses.

STUDY RESULTS

The results of serological studies of the blood of calves with antenatal hepatodystrophy showed that the level of antibodies to the PI-3, IBR, VD and RSV in these animals was the same as in clinically healthy animals. However, in the calves with antenatal hypoxia, the level of antibodies to these viruses was lower. Thus, the titer of antibodies to the PI-3 virus was 1 : 853.3 ± 196.68, to the IBR virus — 1 : 58.6 ± 11.25, to the VD virus — 1 : 40.0 ± 8.0, and to the RSV — 1 : 13.3 ± 2.67. While in healthy calves the corresponding figures were 1 : 2304.0 ± 256.0, 1 : 127.6 ± 3.23, 1 : 102.4 ± 15.68 and 1 : 16.0 ± 0.01. Thus, it was established that in the calves with antenatal hypoxia, the titer of colostral antibodies to the PI-3, IBR, VD and RSV was lower by 63.0, 54.1, 60.9 and 16.9 %, respectively.

Further study of the dynamics of antibodies in the calves from group I showed that the titer of colostral antibodies to the PI-3, IBR, VD and RSI tended to decrease. As a result, by the age of one month, a decrease in the titer of colostral antibodies to the above-mentioned viruses was observed to the level of 1 : 1408.0 ± 470.3, 1 : 88.0 ± 24.0, 1 : 35.6 ± 15.6 and 1 : 4.0 ± 4.0, respectively (Fig. 1). Calculation of the difference between these results and their initial level showed that the titer of antibodies to the PI-3 virus decreased by 38.9 %, to IBR — by 31.0 %, to VD — by 65.2 % ($P < 0.05$) and to RSV — by 75.0 % ($P < 0.05$). In the calves who experienced antenatal hypoxia, an increase in the titer of antibodies to the PI-3, IBR, and VD viruses was observed during the first week of life to a level of 1 : 2800.0 ± 350.54, 1 : 192.0 ± 40.48 and 1 : 121.6 ± 55.56, respectively. Further observation showed that by the age of one month, the level of titer of antibodies to the VD virus in these calves decreased to 1 : 21.3 ± 10.65. Thus, in comparison with the titer of antibodies on day 7 of life, it was lower by 82.5 % ($P < 0.05$). Moreover, the titer of antibodies to the PI-3 virus and IBR by the age of one month in calves was higher than the initial level by 75.0 % (1 : 1493.3 ± 564.4) and 82.1 % (1 : 106.7 ± 21.3), respectively. It should also be noted that antibodies to respiratory syncytial infection in this group of animals had already disappeared by the end of the second week of life after birth. The dynamics of colostral antibodies in the calves with antenatal hepatodystrophy was characterized by an intensive decrease in antibodies to the PI-3 virus, IBR, VD and RSV during the first two weeks to the level of 1 : 1040 ± 240.0, 1 : 64.0 ± 22.63, 1 : 20.0 ± 7.66 and 1 : 3.2 ± 3.2, as a result of which their values were lower than in the comparison group by 40.9, 42.9, 85.8 and 20.0 %, respectively. Subsequently, up to one month of age, they remained approximately at the same level.

Further studies showed that the titer of antibodies to the IBR, PI-3, VD and RSV increased in healthy calves 15 days after vaccination. It should be noted that the titer of antibodies to the PI-3 virus increased by 42.0 % (1 : 2000.0 ± 560.0), and to the IBR, VD and RSV — by 2.1 (1 : 185.6 ± 45.71), 4.1 (1 : 196.5 ± 60.0) and 8 (1 : 64.0 ± 48.27) times, respectively. Nine days after revaccination, the titer of antibodies to the PI-3 virus decreased by 60.0 % (1 : 1800.0 ± 160.0). The titer of antibodies to the IBR and VD viruses increased by 64.9 (1 : 208.0 ± 48.0) and 33.2 % (1 : 192.0 ± 36.0), and to the RSV — by 3.5 times (1 : 224.0 ± 32.0). The reaction of the calves who suffered antenatal hypoxia to vaccination was similar to that of the animals from group I, but its efficacy was lower. For example, the titer of antibodies to the PI-3 virus was 1 : 384.0 ± 86.6, to the IBR — 1 : 176.0 ± 48.0, to the VD virus — 1 : 80.0 ± 16.0, and to the RSV — 1 : 24.0 ± 13.86. The comparison showed that the average titer of antibodies to the PI-3, IBR, VD and RSV in the calves from group II was lower by 78.7, 15.4, 58.3 and 89.3 %, respectively. In turn, in the calves who had antenatal hepatodystrophy, the response and efficacy of vaccination was better than in the calves from group II, but worse than in the calves from group I. The titer of antibodies to the PI-3 virus was 1 : 533.3 ± 106.7, to the IBR — 1 : 256.0 ± 0.001, to the VD — 1 : 149.3 ± 56.4, and to the RSV — 1 : 85.3 ± 21.3. In comparison with group I, these calves had significantly lower titers of antibodies to the PI-3 virus and RSV — by 70.4 and 61.9 % ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The studies have shown that the calves born from the cows with extragenital pathology have impaired colostral immunity. In particular, this is observed in the calves born from the cows with anemia. Our previously presented data also showed that colostrum from such cows is less rich in immunoglobulins [7]. It should also be noted that the calves born from such cows often suffer from antenatal hypoxia and intranatal asphyxia. A series of studies have shown that these pathological conditions reduce the absorption of colostral immunoglobulins [8, 9, 10, 11]. In turn, in the calves obtained from the cows with hepatodystrophy, a decrease in the absorption of immunoglobulins was not observed and was identical to the level of the calves born without pathologies. Further observation of the half-life of specific antibodies to the PI-3, IBR, VD and RSV showed that in healthy calves it was about 30 days, which was

consistent with the data of a number of authors [1, 2]. A similar trend was observed in the calves born from the cows with hepatodystrophy. However, it should be noted that in the calves who suffered antenatal hypoxia, by the end of the first week of life, an increase in the titer of antibodies to the PI-3, IBR and VD viruses was observed. Similar phenomena can be observed in two cases. The first is a prolonged feeding with transitional milk, which reliably increases the concentration of immunoglobulins in the blood serum the newborn calves for three days [12, 13]. Secondly, it is a contact with viruses circulating within the enterprise. Thus, in a study conducted by a research team headed by Windeyer M. C. it has been shown that the initial antibody titer of the newborn calves does not interfere with the production of antibodies when they are infected with viruses [14]. Thus, the newborn calves born in hypoxic conditions have a low level of colostral immunity, which does not allow them to effectively protect themselves from viral infections. This was confirmed by an increase in the antibody titer to the PI-3 and IBR viruses by 75.0—82.1 % during the first month of life.

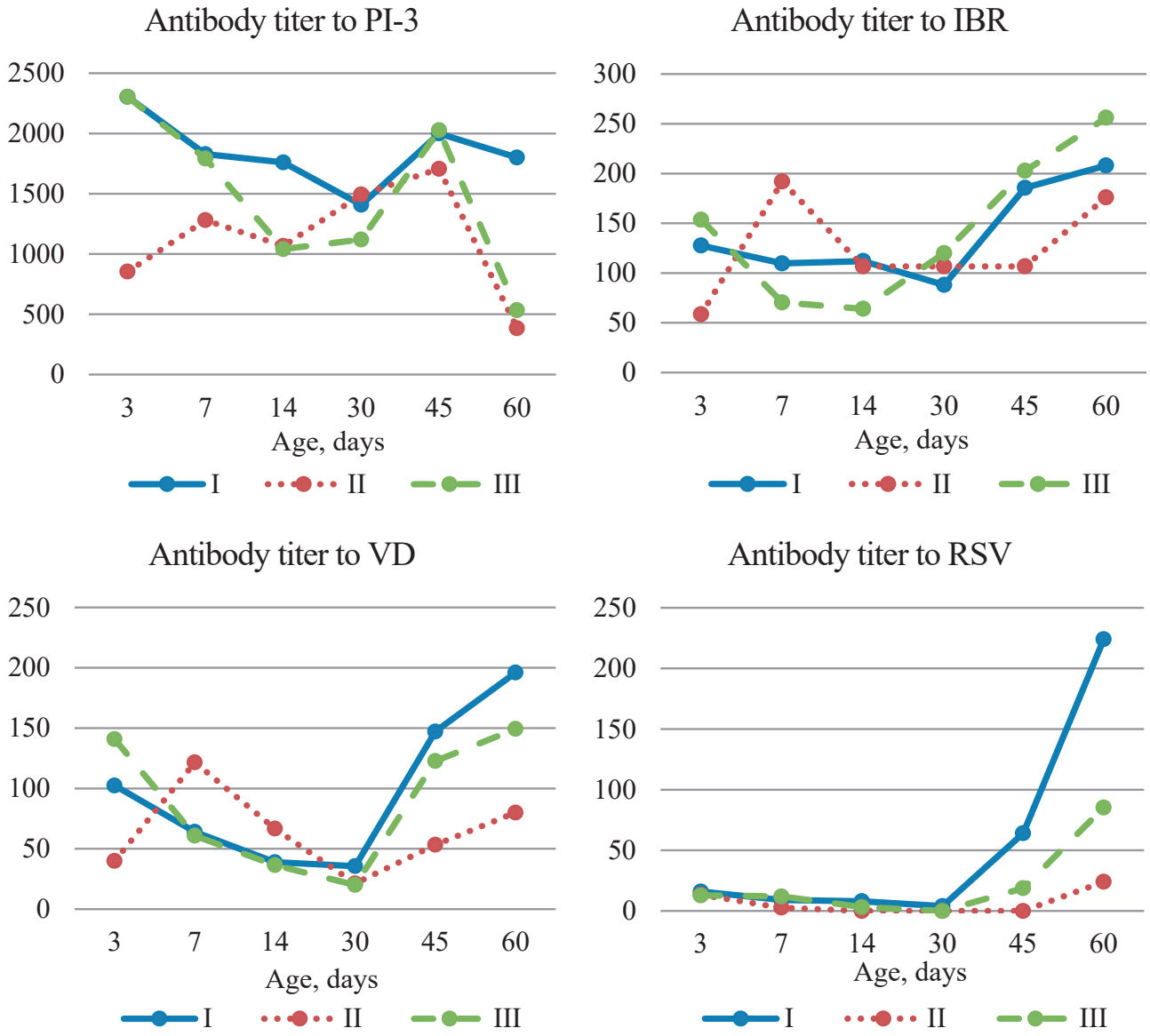


Fig. 1. Dynamics of specific immunity in healthy calves and those who have suffered perinatal pathology

Further studies showed that all groups of animals participating in the experiment responded with an increase in the level of antibodies to all viral components of the vaccine. However, it is worth noting that in the calves from Group I, the level of antibodies to the PI-3 virus first increased by 42.0 %, and then decreased by 10.0 %. This is probably due to the neutralization of excess antibodies by the vaccine itself,

as often occurs during vaccination against the background of a high level of colostral antibodies [14]. It was also noted that the immunization efficacy of the calves born from the cows with extragenital pathology was lower than that of the calves from healthy cows. This is probably due to the fact that the calves born from the cows with hypoxia and/or hepatodystrophy often have antenatal hepatodystrophy [4]. Normally, at the end of the first week of life, the newborn calves begin the process of establishing the protein-synthesizing function of the liver, which is fully completed at the age of 5—6 months. However, in the presence of hepatodystrophy in the newborn calves, this function decreases [15]. This, in turn, creates a risk of the secondary immunodeficiency development and reduces the efficacy of vaccination in calves. Thus, it can be assumed that the identified immunological features of the calves with antenatal pathology increase the likelihood of diseases development, in particular, respiratory pathology caused by the PI-3, IBR, VD and RSV.

CONCLUSION

The studies have shown that the calves with perinatal pathologies have a risk of impaired colostral immunity. This risk is especially high in the calves who have suffered hypoxia. It has also been found that the efficacy of vaccination in calves decreases if they have a history of antenatal hypoxia and hepatodystrophy. This indicates the need to develop and apply special approaches to vaccination of such calves, as well as the importance of taking into account their perinatal history when planning and implementing vaccination.

REFERENCES

1. *Fulton R. W.* Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination / R. W. Fulton, R. E. Briggs, M. E. Payton, A. W. Confer, J. T. Saliki, J. F. Ridpath, L. J. Burge, G. C. Duff // Vaccine. — 2004. — Vol. 2 (5—6). — P. 643—649. DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.08.033

2. *Masyanov Yu.N.* Formation of humoral immunity in calves under normal conditions and pathologies / Yu.N. Masyanov, A. G. Shakhov //. Doklady Rossiyskoy akademii selskokhozyaystvennykh nauk (Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences). — 2012. — No. 5. — pp. 40—43.

3. *Shivley C. B.* Preweaned heifer management on US dairy operations: Part II. Factors associated with colostrum quality and passive transfer status of dairy heifer calves / C. B. Shivley, J. E. Lombard, N. J. Urie, D. M. Haines, R. Sargent, C. A. Kopral, T. J. Earleywine, J. D. Olson, F. B. Garry // J Dairy Sci. — 2018. — Vol. 101 (10). — P. 9185—9198. DOI: 10.3168/jds.2017-14008

4. *Shakhov A. G.* Methodological manual for diagnostics and prevention of antenatal and intranatal disorders in calves / A. G. Shakhov, Yu.N. Alekhin, S. V. Shabunin, L. Yu. Sashnina, D. V. Fedosov, T. A. Erina, O. V. Prigorodova, I. R. Sidelnikova, A. V. Golubtsov. — Voronezh: Publishing house “Istoki”, 2013. — 92 p.

5. *Chernitskiy A. E.* Prevention of respiratory diseases in newborn calves with reduced viability / A. E. Chernitskiy, S. V. Shabunin // Veterinariya (Veterinary science). — 2017. — No. 9. — P. 10—16. DOI 10.30896/0042—4846.2017.20.9.10—16

6. *Vostroilova G. A.* The dynamics of protein metabolism indicators in hypotrophic calves when using recombinant interferon-lambda / G. A. Vostroilova, N. A. Khokhlova, E. V. Kosyakova, L. Yu. Sashnina, Yu.A. Chaplygina, G. G. Chusova // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2021. — No. 1 (14). — P. 51—64. DOI 10.17238/issn2541—8203.2021.1.51

7. *Zhukov M. S.* Features of the colostral immunity formation in the newborns obtained from the cows with extragenital pathologies / *Zhukov M. S. Parshin P. A.*, *Vostroilova G. A.*, *Shaposhnikov I. T.*, Brigadirov Yu.N., Alekhin Yu.N. // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii (International Bulletin of Veterinary Medicine). —2024. — No. 3. — P. 95—107. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.95

8. *Alekhin Yu.N.* Absorption of colostral immunoglobulins in the calves with experimental intranal asphyxia / Yu.N. Alekhin, M. S. Zhukov. Proceedings of the VI international scientific conference Science of Russia: Goals and Objectives. — 2017. — No. 4. — P. 41—47. DOI: 10.18411/sr-10-12-2017-66

9. *Chernitskiy A. E.* Relationship between colostral immunity and biochemical status in newborn calves in the first days of life / A. E. Chernitskiy, M. I. Retskiy, A. I. Zolotarev, L. I. Efanova, E. V. Bratchenko // Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology). — 2013. — 6. — P. 94—99.

10. *Besser T. E.* Decreased colostral immunoglobulin absorption in calves with postnatal respiratory acidosis / T. E. Besser, O. Szenci, C. C. Gay // J Am Vet Med Assoc. — 1990. — Vol. 196. — P. 1239—1243.

11. *Boyd J. W.* Relationships between acid-base balance, serum composition and colostrum absorption in newborn calves / J. W. Boyd // Br *Vet J.* — 1989. — Vol. 145(3). — P. 249—256. DOI: 10.1016/0007-1935(89)90077-8

12. *Hare K. S.* Feeding colostrum or a 1 : 1 colostrum: whole milk mixture for 3 days after birth increases serum immunoglobulin G and apparent immunoglobulin G persistency in Holstein bulls / K. S. Hare, S. Pletts, J. Pyo, D. Haines, L. L. Guan, M. Steele // J Dairy Sci. — 2020. — Vol. 103(12). — P. 11833—11843. DOI: 10.3168/jds.2020-18558

13. *Shakhov A. G.* Methodical recommendations for optimization of the colostral immunity formation in newborn animals / A. G. Shakhov, S. V. Shabunin, M. I. Retskiy, A. I. Zolotarev, Yu.N. Masyanov, L. Yu. Sashnina, G. N. Bliznetsova, Yu.N. Alekhin, Yu.N. Fedorov, A. A. Chastov, O. A. Skrabnevskaya. — Voronezh: SSI "ARVRIPP&T of the Russian Agricultural Academy", 2009. — 42 p.

14. *Windeyer M. C.* Association of bovine respiratory disease or vaccination with serologic response in dairy heifer calves up to three months of age / M. C. Windeyer, K. E. Leslie, S. M. Godden, D. C. Hodgins, K. D. Lissemore, S.J. LeBlanc. // Am J Vet Res. — 2015. — Vol. 76(3). — P. 239—45. DOI: 10.2460/ajvr.76.3.239

15. *Alekhin Yu.N.* Methodical recommendations for diagnostics, prevention and therapy of hepatopathies in cattle / Yu.N. Alekhin, S. V. Shabunini, M. I. Retskiy, G. N. Bliznetsova, I. R. Sidelnikova, D. B. Chusov, I. A. Nikulin, B. V. Usha, I. A. Shkuratova — Voronezh: SSI "ARVRIPP&T of the Russian Agricultural Academy", 2009. — 86 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yu. N. Brigadirov — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;
M. S. Zhukov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
I. T. Shaposhnikov — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;
I. V. Volkova — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientific Associate;
O. V. Yakimchuk — Veterinarian;
P. V. Miroshnichenko — Principal Scientific Associate;
V. M. Basankina — Senior Scientific Associate.

The article was submitted 27.01.2025.

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ И ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Редакция журнала «Ветеринарный фармакологический вестник» Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии приглашает научных сотрудников, преподавателей вузов, соискателей ученых степеней и практикующих специалистов для публикации результатов экспериментальных исследований, теоретических и обзорных статей, касающихся актуальных вопросов ветеринарной фармакологии.

Цель журнала «Ветеринарный фармакологический вестник» — представление основных направлений развития ветеринарной фармакологии, привлечение внимания научных работников и специалистов к актуальным проблемам, продвижение инновационных разработок.

Основные тематические направления журнала:

1. Экспериментальная фармакология.
2. Клиническая фармакология.
3. Биохимическая и молекулярная фармакология.
4. Фармация.
5. Новые лекарственные средства и препараты для терапии и профилактики болезней.
6. Средства зоогигиены, дезинфекции, дезинсекции и дератизации.
7. Лечебные премиксы и кормовые добавки.
8. Патофизиология, патобиохимия и экспериментальная терапия.

Тематическое содержание журнала может меняться в зависимости от текущих задач науки и практики.

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ

Авторам необходимо предоставить в редакцию следующие материалы:

1. Статью, оформленную в соответствии с требованиями, на почту vetfarm.journal@yandex.ru («В редакцию журнала «Ветеринарный фармакологический вестник»).

Материал, предлагаемый для публикации, должен быть тщательно **отредактирован и подписан всеми авторами**.

Статьи, направляемые в редакцию, проходят рецензирование и выносятся на рассмотрение редколлегии. При необходимости редакция связывается с авторами по телефону или электронной почте. По результатам обсуждения принимается решение о возможности включения статьи в журнал, об отказе или доработке.

Статья, направленная автору на доработку, должна быть возвращена в исправленном виде в максимально короткие сроки. К рукописи необходимо приложить письмо от авторов, содержащие ответы на все замечания. Статья, требующая повторной доработки, рассматривается как вновь поступившая. При этом датой поступления считается дата получения редакцией окончательного варианта статьи.

Плата с авторов за публикацию не взимается.

Авторское вознаграждение за размещение статей в печатной и электронной версии журнала авторам статей не выплачивается.

Материалы, поступившие в редакцию, авторам не возвращаются.

2. Сведения об авторах:

Фамилия, имя, отчество

Ученая степень

Ученое звание

Должность

Полное название организации

Адрес, телефон, e-mail

Отдельно необходимо указать лицо и его контактные данные, с которым редакция будет вести переговоры и переписку.

3. Направление от учреждения, в котором выполнена работа по форме:

В редакцию журнала
«Ветеринарный фармакологический вестник»

Прошу (просим) опубликовать в открытой печати мою (нашу) статью «_____
_____».

Материалы статьи частично или полностью не были ранее опубликованы*.

Авторы подтверждают достоверность и оригинальность материалов, изложенных в статье; дают согласие на сбор, обработку и распространение своих персональных данных в соответствии с требованиями Федерального закона № 152-ФЗ от 27 июля 2006 года «О персональных данных»; гарантируют, что не нарушают ничьих авторских прав; не включают материалы, не подлежащие к публикации в открытой печати в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

Вместе со статьей автор передает редакции на неограниченный срок следующие права: право на размещение, воспроизведение и распространение статьи любым способом; право на переработку статьи и внесение изменений в статью; право на публичное использование материалов статьи и демонстрацию их в информационных, рекламных и прочих целях.

Также авторы подтверждают, что согласны с правилами редакции по подготовке рукописи к изданию. После публикации ее цитирование возможно только со ссылкой на журнал «Ветеринарный фармакологический вестник».

_____ _____
_____ _____
подпись (подписи) автора (авторов) фамилия, имя, отчество

Подпись (подписи) _____заверяю.

_____
подпись и ФИО лица, заверившего подписи
М.П. организации
«___»_____г.

* Если были опубликованы частично, то указать название издания, год выпуска, номер, страницы.

Для ускорения публикации статьи в редакцию необходимо предоставить рецензию доктора наук, заверенную в отделе кадров по месту работы.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

Текст статьи объемом до 15 страниц предоставляется в программе Microsoft Word: шрифт — Times New Roman, кегль — 14 пт, межстрочный интервал — 1,5, абзацный отступ — 1,25, без переносов. Формат страницы — А4; поля: левое — 3 см, верхнее, правое и нижнее — 2 см.

Элементами издательского оформления статей являются:

— сведения об издании, в котором опубликована статья;

— название рубрики или раздела издания;

— тип статьи (научная статья, обзорная статьи, редакционная статья, дискуссионная статья, персоналии, редакторская заметка, рецензия на книгу, рецензия на статью, спектакль и т. п., краткое сообщение);

— индекс Универсальной десятичной классификации (УДК);

— цифровой идентификатор объекта (Digital Object Identifier — DOI); его приводят по ГОСТ Р ИСО 26324 и располагают после индекса УДК отдельной строкой слева. В конце DOI точку не ставят;

— заглавие статьи;

— подзаголовочные данные статьи;

— сведения об авторе (авторах);

— аннотация (резюме);
— ключевые слова (словосочетания);
— благодарности;
— знак охраны авторского права;
— перечень затекстовых библиографических ссылок;
— сведения о продолжении или окончании статьи;
— приложение (приложения);
— примечания;
— дата поступления рукописи в редакцию издания, дата одобрения после рецензирования, дата принятия статьи к опубликованию.

Дополнительно могут быть приведены:
— библиографическая запись на статью для дальнейшего цитирования;
— сведения о вкладе каждого автора, если статья имеет несколько авторов;
— указание об отсутствии или наличии конфликта интересов и детализация такого конфликта в случае его наличия.

Слова и словосочетания в элементах издательского оформления статьи не сокращают, кроме сведений об ученой степени и звании автора, слов и словосочетаний в библиографических ссылках и списках по ГОСТ 7.11, ГОСТ Р 7.0.12.

Основной текст статьи может быть структурирован и состоять из следующих частей:
— введение;
— текст статьи (с выделением разделов «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение» и др.);
— заключение.

Допускается деление основного текста статьи на тематические рубрики и подрубрики.

Надписи и подписи к иллюстративному материалу приводят на языке текста статьи и, как правило, повторяют на английском языке. Основной текст статьи в издании может быть только на одном языке. Смешивать в одной статье текст на двух языках не допускается.

До основного текста статьи приводят на языке текста статьи и затем повторяют на английском языке следующие элементы издательского оформления: сведения об издании, в котором опубликована статья, название рубрики или раздела, тип статьи, ее заглавие и подзаголовочные данные, основные сведения об авто-ре (авторах), аннотацию, ключевые слова, благодарности, библиографическую запись для цитирования. Имена приводят в транслитерированной форме на латинице по ГОСТ 7.79 или в той форме, в какой ее установил автор или редакция издания.

После основного текста статьи приводят на языке текста статьи и затем повторяют на английском языке следующие элементы издательского оформления: дополнительные сведения об авторе (авторах), сведения о вкладе каждого автора, указание об отсутствии или наличии конфликта интересов и детализация такого конфликта в случае его наличия, а также даты поступления рукописи в редакцию, одобрения после рецензирования, принятия статьи к опубликованию.

Основные сведения об авторе содержат:
— имя, отчество, фамилию автора (полностью);
— наименование организации (учреждения), ее подразделения, где работает или учится автор (без обозначения организационно-правовой формы юридического лица: ФГБУН, ФГБОУ ВО, ПАО, АО и т. п.);
— адрес организации (учреждения), ее подразделения, где работает или учится автор (город и страна);
— электронный адрес автора (e-mail);
— открытый идентификатор ученого (Open Researcher and Contributor ID — ORCID) (при наличии). Адрес организации (учреждения), где работает или учится автор, может быть указан в полной форме. Электронный адрес автора приводят без слова «e-mail», после электронного адреса точку не ставят. ORCID приводят в форме электронного адреса в сети Интернет. В конце ORCID точку не ставят. Наименование организации (учреждения), ее адрес, электронный адрес и ORCID автора отделяют друг от друга запятыми.

В случае, когда автор работает (учится) в нескольких организациях (учреждениях), сведения о каждом месте работы (учебы), указывают после имени автора на разных строках и связывают с именем с помощью надстрочных цифровых обозначений.

Если у статьи несколько авторов, то сведения о них приводят с учетом нижеследующих правил. Имена авторов приводят в принятой ими последовательности.

Автор, ответственный за переписку, и его электронный адрес могут быть обозначены условным изображением конверта, в электронных изданиях — также и другими средствами, реализуемыми программным обеспечением публикации издания.

Возможно приведение электронного адреса только одного автора, с которым планируется переписка, или отдельное указание автора для корреспонденции по форме: «Автор, ответственный за переписку:» («Corresponding author:»).

Дополнительные сведения об авторе (авторах) могут содержать:

— полные имена, отчества и фамилии, электронные адреса и ORCID авторов, если они не указаны на первой полосе статьи;

— ученые звания;

— ученые степени;

— другие, кроме ORCID, международные идентификационные номера авторов. Дополнительные сведения об авторе (авторах) приводят с предшествующими словами «Информация об авторе (авторах)» («Information about the author (authors)») и указывают в конце статьи после «Списка источников».

Сведения о месте работы (учебы), электронные адреса, ORCID авторов указывают после имен авторов на разных строках и связывают с именами с помощью надстрочных цифровых обозначений Индекс УДК располагается в левом верхнем углу без абзацного отступа.

Далее без абзацного отступа располагается название статьи — заглавными буквами, полужирным шрифтом, выравнивание по центру.

Фамилия, имя, отчество автора — без абзацного отступа, по центру, строчными буквами, полужирным шрифтом.

Аннотацию формируют по ГОСТ Р 7.0.99. Объем аннотации не превышает 250 слов. Перед аннотацией приводят слово «Аннотация» («Abstract»).

Ключевые слова (словосочетания) должны соответствовать теме статьи и отражать ее предметную, терминологическую область. Не используют обобщенные и многозначные слова, а также словосочетания, содержащие причастные обороты.

Количество ключевых слов (словосочетаний) не должно быть меньше 3 и больше 15 слов (словосочетаний). Их приводят, предваряя словами «Ключевые слова:» («Keywords:»), и отделяют друг от друга запятыми. После ключевых слов точку не ставят.

После ключевых слов приводят слова благодарности организациям (учреждениям), научным руководителям и другим лицам, оказавшим помощь в подготовке статьи, сведения о грантах, финансировании подготовки и публикации статьи, проектах, научно-исследовательских работах, в рамках или по результатам которых опубликована статья.

Эти сведения приводят с предшествующим словом «Благодарности:». На английском языке слова благодарности приводят после ключевых слов на английском языке с предшествующим словом «Acknowledgments:».

Текст статьи должен включать введение (без указания названия раздела), материалы и методы, результаты исследований, обсуждение и выводы (заключение).

Библиографическую запись для пристатейного библиографического списка составляют по ГОСТ 7.80, ГОСТ Р 7.0.100.. Ссылки на источники даются по тексту цифрой в квадратных скобках и указываются в порядке цитирования. В списке литературы желательно наличие как минимум 20 % иностранных источников и включение в список современных авторов.

Таблицы должны быть выполнены в Microsoft Word и содержать статистически обработанный материал. Каждая таблица должна иметь номер, тематический заголовок и ссылку в тексте.

Графики, диаграммы, рисунки и фотографии необходимо предоставлять в формате jpeg, tif или gif (с разрешением не менее 300 точек) с соответствующими подписями и пронумерованными.

Сокращения терминов, отличные от нормированных, должны приводиться только после упоминания в тексте их полного значения.

Единицы измерений даются в соответствии с Международной системой СИ по ГОСТ 8.417—2002 «Единицы величин».

ДЛЯ ЗАМЕТОК