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.

№ 2 (31) • 2025

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

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. 2 (31) • 2025

EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY

CLINICAL PHARMACOLOGY

AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION, DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

PATHOPHYSIOLOGY, PATHOBIOCHEMISTRY AND EXPERIMENTAL THERAPY

Научная статья
УДК 579.62

ДИЗАЙН РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИЭПИТОПНОГО БЕЛКА-АНТИГЕНА БЫЧЬЕГО КОРОНАВИРУСА И РОТАВИРУСА

Яна Владимировна Петруша✉, Максим Иосифович Потапович, Владимир Антонович Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, yana.petrusha@gmail.com✉

Аннотация. Путем биоинформатического анализа, разработан гибридный белок-антиген, включающий эпитопы бычьих коронавирусов и ротавирусов. Сравнение физико-химических свойств с участием специализированных программ показало, что гибридный белок стабилен *in vivo*, нетоксичен, не обладает гомологией с бычьими белками, растворим в воде. Топология блока эпитопов для Т-киллеров способствует процессингу выбранных пептидов при сохранении структуры В-эпитопов для взаимодействия с антителами против ротавирусов и коронавирусов. Полученные результаты указывают на иммуногенность разработанного белка и возможность его применения для конструирования субъединичных вакцин, применяемых в профилактических и лечебных целях.

Ключевые слова. Bovine coronavirus, Bovine rotavirus, полиэпитопный белок, рекомбинантный белок, *Bos taurus*, обратная вакцинология.

Благодарности: Кулешовой Юлии Михайловне и Романовской Татьяне Владимировне за советы по использованию Two State Melting Folding module DINAMelt

ВВЕДЕНИЕ

Развитие биоинформатики, позволяет получить качественно новые препараты для профилактики и лечения инфекционных заболеваний различной этиологии. Субъединичные вакцины имеют ряд преимуществ перед традиционными в первую очередь, по таким параметрам как безопасность и экономичность. Первым этапом на пути их создания является поиск мишеней, способных индуцировать защитный иммунный ответ против патогена. Методы обратной вакцинологии уже на начальном этапе создания препаратов нового поколения позволяют сконструировать «искусственные» белки и соответствующие им экспрессируемые в бактериях генетические структуры, способные обеспечить получение активных фармсубстанций в промышленных объемах.

В предыдущем исследовании [1] проведен биоинформатический анализ белков бычьих ротавирусов с использованием 29 компьютерных программ и нескольких баз данных с целью выявления наиболее перспективных кандидатов для вакцин. В результате анализа определено 15 эпитопов — наиболее перспективных кандидатов для получения субстанции против бычьего ротавируса. Однако в коровьих стадах часто встречаются смешанные инфекции, вызванные бычьим ротавирусом (Bovine rotavirus, BRV) и бычьим коронавирусом (Bovine coronavirus, BCoV). В исследованиях, проведенных в скотоводческих хозяйствах Европейского Союза, BCoV детектировали в ~80 % проверенных стад [2]. Чаще всего, смешанной инфекцией заболевают телята возрастом до 14 суток. В среднем, по всем возрастным группам в мире, BRV встречается у 20—30 %, а BCoV — у 10—15 % телят, при этом показано, что степень инфицированности сильно варьирует в зависимости от региона [3].

Стоящая перед скотоводством проблема массового инфицирования требует разработки новых противовирусных средств с использованием собранной информации о структурных особенностях BCoV. Главные антигены коронавирусов — структурные белки S, HE, N, M и E. Основной мишенью для нейтрализующих антител является белок пепломера S, участвующий во взаимодействии с клеткой [4, 5]. На основе описанных антигенов можно

создать рекомбинантный полиэпитопный белок, который будет вызывать у организма направленную на вирусные фрагменты иммунную реакцию. Из-за часто происходящих у телят ко-инфекций коронавирусом и ротавирусом, целесообразно также создать белок, который будет включать в себя пептиды сразу из обоих вирусов — BCoV и BRV для снижения затрат в производстве.

Таким образом, **цель настоящей работы** заключалась в разработке обогащенного эпитопами BCoV полиэпитопного белка и белка, состоящего из эпитопов BRV и BCoV.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При конструировании полиэпитопного белка против бычьего коронавируса проводили поиск форм релевантных белков-иммуногенов S (брали только встречающиеся в Европе варианты), HE, M, N, E в базах данных NCBI и UniProt, затем использовали полученные консенсусы для предсказания эпитопов для Т-клеток при помощи NetMHCIIpan [6] и NetMHCpan [7], параллельно собирали экспериментально выявленные линейные В-эпитопы группы вирусов *Betacoronavirus* 1 из IEDB (https://www.iedb.org/). Ротавирусные эпитопы получены и описаны в предыдущей работе [1].

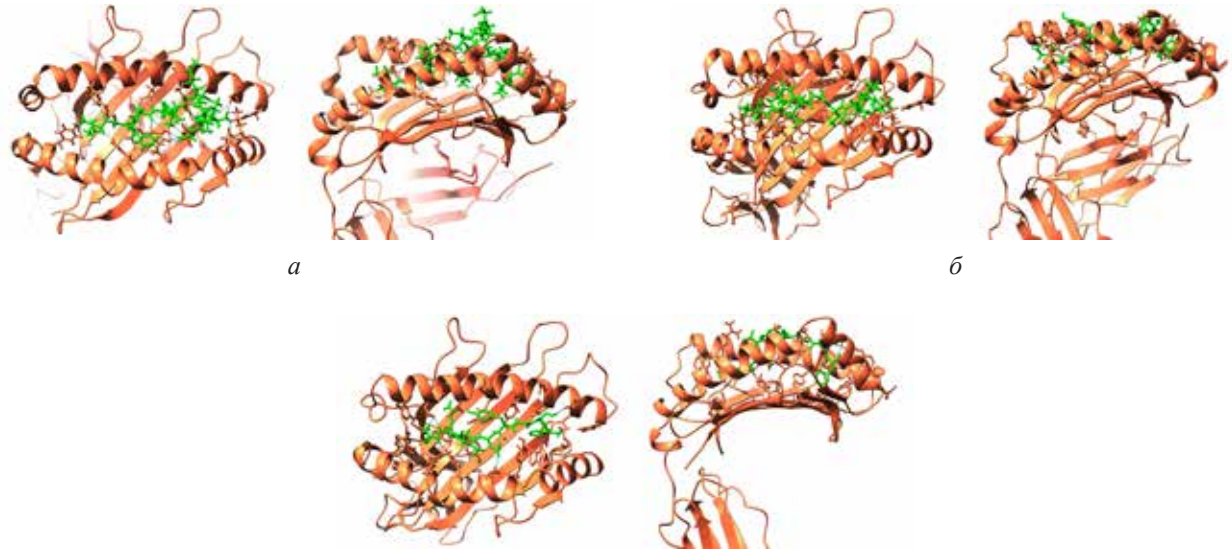
Для всех собранных эпитопов определяли степень консервативности, антигенность, гомологию с бычьим протеомом, близость расположения относительно известных посттрансляционных модификаций в целом белке. Для Т-киллерных эпитопов отдельно оценивали иммуногенность с помощью Class I Immunogenicity (IEDB) [8] и проводили докинг согласно протоколу FlexPepDock-abinitio [9] для оценки возможности образования пептидом реалистичных конформаций (близких к структурам 3pwu [10] и 2xfx [11]) с рецептором BoLA-I (Bovine Leukocyte Antigen, бычий лейкоцитарный антиген); Т-хелперные эпитопы проверяли по их способности стимулировать синтез интерлейкинов, по близости расположения к известным В-эпитопам. Т-клеточные эпитопы перепроверяли при помощи программ MixMHCpred [12], MHCFlurry [13] (BoLA-I) и MixMHCIIpred [14] (BoLA-II). В-клеточные эпитопы оценивали по длине, вторичной структуре, существованию взаимодействующих с ними моноклональных антител.

Полиэпитопный белок конструировали из отобранных эпитопов, располагая между ними полилинкеры KK и AAY. Подтверждали наличие релевантных для экспрессии и применения в качестве иммуногена свойств (антигенность, токсичность, растворимость, молекулярная масса и др.), осуществляли моделирование при помощи AlphaFold2 [15], выявляли возможные дисульфидные связи в структурах при помощи сервера Disulfide by Design [16]. Полученные белки конвертировали в гены с помощью GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific) с оптимизацией концевых участков для подбора оптимальных для гена праймеров (PrimerBLAST [17]) и мРНК (образованием шпилек проверяли при помощи DINAMelt [18]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Классифицировали 21 структуру-комплекс коронавирусных пептидов и бычьих рецепторов BoLA-I с наименьшей назначенной протоколом FlexPepDock-abinitio энергией взаимодействия. В качестве критериев использовали: число взаимодействующих с эпитопом остатков рецептора (в том числе, число консервативных остатков Y84, Y99, S/T143, K146, Y159, Y171); число образуемых между лигандом и рецептором водородных связей; аффинность лиганда, рассчитанную с помощью NetMHCpan и MHCFlurry. Помимо всего этого, также проверяли комплексы на наличие связей с концами пептида. Выделили три группы комплексов: группа наиболее стабильных и близких к экспериментальным структурам (рис. 1а—б) комплексов (1:02301—SQLVEYGSF, рис. 1в); группа комплексов, которые могут теоретически образовываться (1:00901—SAAAGVPFY, 1:01901—IEDYHTLTV, 1:02301—SRRAITTGY, 1:03101—SRRAITTGY, 3:03701—SAAAGVPFY) и группа комплексов, в которых наблюдаются дестабилизирующие нарушения (15 комплексов).

Среди всех проверенных пептидов-нонамеров показали предрасположенность к образованию стабильных комплексов с BoLA-I: SQLVEYGSF, SRRAITTGY, SAAAGVPFY, IEDYHTLTV. Это взаимодействие — первый шаг к презентации пептидов Т-киллерам, обязательный для развития иммунологического ответа на искомые антигены, поэтому данные пептиды выбрали для включения в полиэпитопные белки. Суммарно, все этапы проверки прошло 10 пептидов (табл. 1), из которых большинство связано с белком S. Большой размер (1363 а. к. против 424 а. к. HE, 230 а. к. M, 448 а. к. N и 84 а. к. E белков), вероятно, является причиной, по которой большинство прошедших проверку пептидов извлечено из данного белка, по причине увеличения числа возможных 9-меров и 15-меров при его разрезании.



а *б* *в*

Рис. 1. Модели экспериментально полученных комплексов пептидов и рецепторов BoLA-I: 2xfx (*а*), 3pwu (*б*). Модель наиболее реалистичного комплекса пептида SQLVEYGSF BCoV и BoLA-1:02301, полученная FlexPepDock-abinitio (*в*)

Таблица 1

Пептиды B. coronavirus для конструирования полиэпитопного белка

Клетка-мишень	Белок	Последовательность пептида	Начало, а. к.	Ссылка
Т-хелпер	S	LGNLGYLQSFNYRID	407	—
	S	NGNHIISLVQNAPYG	1139	—
	S	FIHFSYVPTKYVTAK	1156	—
	M	DTSGFAVYVKSKVGN	195	—
Т-киллер	S	SRRAITTGY	766	—
	S	SQLVEYGSF	839	—
	S	SAAAGVPFY	985	—
	M	IEDYHTLTV	139	—
В-клетка	S	SLCVGSGSGIDA	494	[19, с. 5—6]
	S	CNRVSSRSAIEDLLFSKVKLAD	907	[20]

Полиэпитопный белок, содержащий эпитопы коронавируса, назвали BCoV_PolyE. Он обладает оптимальными свойствами для экспрессии в *E. coli* (табл. 2): размерами в пределах 15—20 кДа, стабильностью *in vivo* в клетках бактерий и животных, гидрофильностью.

Ранее использованным подходом [5] предсказали, что белок антигенен, нетоксичен, растворим в воде, не содержит скрытых сигнальных и гидрофобных трансмембранных участков. Гомология с протеомом быков у BCoV_PolyE отсутствует, что могло бы отрицательно повлиять на его иммуногенность.

Поскольку процессинг (разрезание внутриклеточных белков на пептиды протеасомами) является ключевым этапом на пути развития цитотоксической реакции организма, оценили распределение сайтов разрезания в BCoV_PolyE. Все Т-киллерные эпитопы вырезаются целиком (рис. 2), что увеличивает шанс их взаимодействия с Т-киллерами.

Таблица 2

Предсказанные свойства полиэпитопного белка BCoV_PolyE

Размер, а. к.		159
Молекулярная масса, кДа		17 447.02
pI		9.75
ε (коэффициент молярной экстинкции), $M^{-1*}см^{-1}$		22 475
$T_{1/2}$ (время полураспада белка), ч	E. coli	> 10
	ретикулоциты	30
Индекс нестабильности		34.05
Алифатический индекс		78.62
GRAVY Grand average of hydropathicity (средняя гидропатичность)		–0.205

Рис. 2. Карта процессинга белка BCoV_PolyE in vivo. Синим текстом обозначены Т-хелперные, зеленым — Т-киллерные, фиолетовым — В-клеточные эпитопы. Стрелками обозначены сайты разрезания протеасомами

Дистальный от С-конца В-эпитоп BCoV_PolyE неупорядочен, в то время как проксимальный эпитоп принимает форму окруженной поворотами α-спирали. Более половины аминокислот В-эпитопов открыто для растворителя, что свидетельствует о том, что белок обладает благоприятной структурой для индукции гуморального иммунитета (антитела взаимодействуют только с открытыми участками белка) (рис. 3).

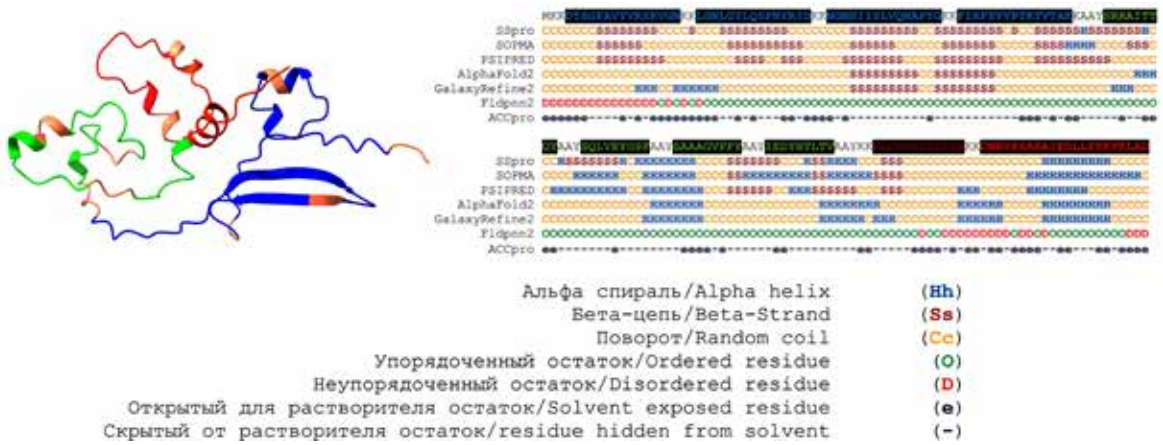


Рис. 3. Пространственная характеристика BCoV_PolyE. Синим окрашены эпитопы для Т-хелперов, зеленым — для Т-киллеров, окрашенные в порядке цветов радуги — В-клеточные эпитопы. Слева названия использованных программ. Расшифровка обозначений вторичной структуры снизу

Поскольку во взаимодействии с антителами будет участвовать целый полиэпитопный белок, важно, чтобы формируемые В-эпитопами локальные структуры в его составе были максимально похожи на форму, которую они или их близкие гомологи принимают в составе вирусов. На рисунке 4 можно увидеть, что вторичная структура В-эпитопа из BCoV близка к гомологичному участку, включаю-

щему фьюжн-пептид родственного человеческого коронавируса Human coronavirus (HCoV) OC43 (пептиды идентичны на 77,27 %). Дистальный от С-конца белка В-эпитоп S белка в составе тримера S OC43 не имеет стабильной структуры [19, с. 6, рис. 4f], и его состав на 50 % идентичен пептиду BCoV.

Цистеины С-концевого региона не могут участвовать в образовании дисульфидных связей (табл. 3, блок В-эпитопов начинается с 124 а. к.), что могло бы привести к усложнению доступа антител к В-эпитопам.

Белок конвертировали в ген с подбором оптимальных праймеров (табл. 4), затем клонировали *in silico* в pET24b (рис. 5а). Согласно расчетам DINAMelt, показано, что первые от старт-кодона 20 а. к. мРНК гена свободны в начале транскрипции (рис. 5б), обеспечивая эффективную посадку рибосомы при 37 °С.

Поскольку бычий коронавирус часто инфицирует животных совместно с бычьим ротавирусом [3], возникает необходимость осуществлять профилактику или лечение инфекций, вызванных одновременно двумя разными вирусами. Получение двух разных рекомбинантных белков является затратной производственной процедурой, поскольку необходимо независимо оптимизировать условия экспрессии, выделения и очистки для каждого полиэпитопного белка. Чтобы удешевить производство, можно включить предсказанные эпитопы двух вирусов в одну структуру.

Рис. 4. Гомолог эпитопа BCoV в составе S HCoV OC43 (6nzk [21]). Эпитоп окрашен как на рисунке 3

Таблица 3

Позиции BCoV_PolyE, между которыми возможно образование дисульфидных связей при замещении соответствующих аминокислот на цистеины

Вероятное расположение S—S связи	χ_3-угол, °	Энергия связи, ккал/моль
Y11—Q28	**88,89**	**4,39**
G17—K20	**99,66**	**5,95**
N40—Y60	**102,30**	**3,61**
Q47—K54	123,40	7,16

Оптимальные χ-углы для образования связей имеют значения около –87° или +97°. Энергия связи не должна быть меньше 2,2 ккаль/моль. **Полужирным шрифтом** выделены соответствующие этим требованиям связи

Таблица 4

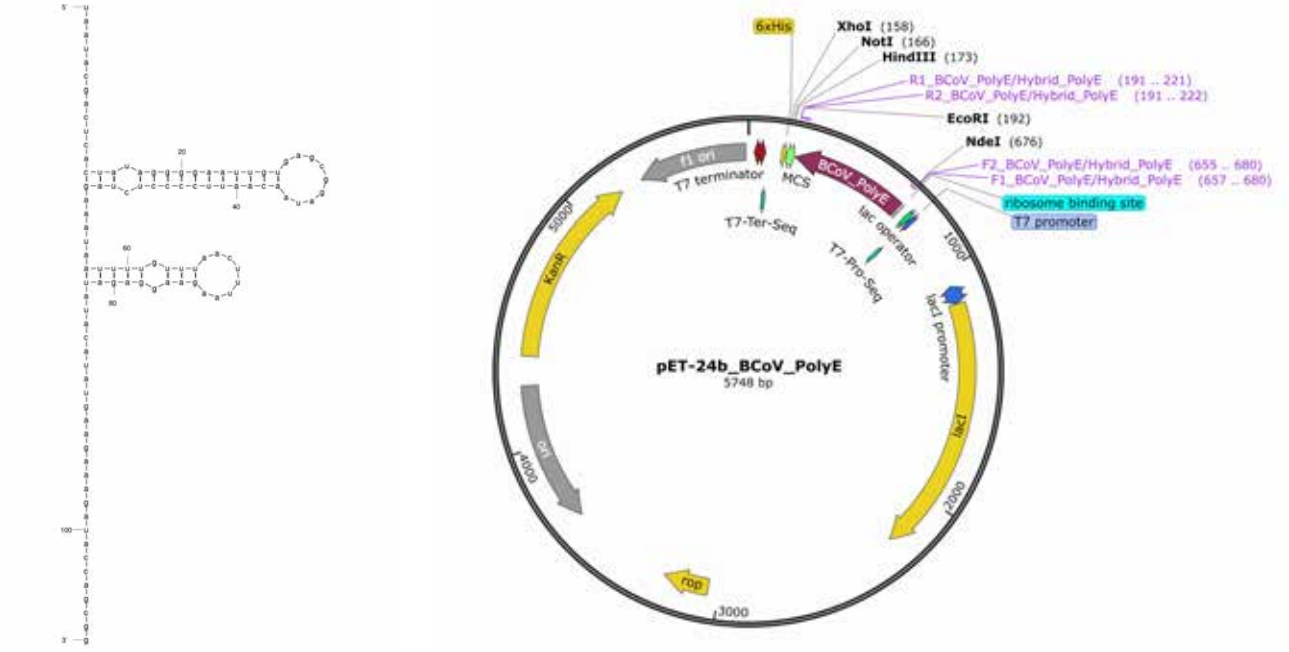
Праймеры для гена BCoV_PolyE и их свойства

Ориентация		F1	R1	F2	R2
1	2	3	4	5	6
Координаты, п. н.	Start	1	480	1	480
	Stop	21	457	23	456

Окончание табл. 4

1	2	3	4	5	6
Tm*, °C		55,2	53,5	56,6	53,8
GC**, %		47,6	37,5	43,5	36
t°max шпилек, °C		23,5	24,6	30,3	24,6
ΔGmin*** димера, ккал/моль	Гомо-	–7,82	–8,51	–7,82	8,51
	Гетеро-	–7,06		–7,06	
Размер гена, п. н.		480			

* Tm — температура плавления
** GC — содержание гуанина и цитозина
*** ΔGmin — изменение свободной энергии Гиббса. ΔGmin не должна быть ниже –9,00 ккал/моль



а *б*

Рис. 5. Вектор pET24b с геном белка BCoV_PolyE (*а*), и соответствующая ему структура мРНК (*б*). Фиолетовым текстом указаны праймеры и их позиции отжига

Гибридный белок получил название Hybrid_PolyE: в его состав вошли как все, представленные в данной статье эпитопы из BCoV_PolyE, так и BRV_PolyE [1]. Свойства Hybrid_PolyE, включающего 25 эпитопов приведены в табл. 5. По данным биоинформационного анализа гибридный рекомбинантный белок нетоксичен, негомологичен бычьим белкам, не содержит скрытых сигнальных и трансмембранных участков, обладает антигенностью и растворимостью. Фьюжин ген можно экспрессировать в бактериях.

Результаты анализа показывают, что эпитопы вырезаются из Hybrid_PolyE таким же образом, как и в разработанных моноструктурных последовательностях против коронавирусов и ротавирусов (рис. 6). При изменении локального окружения у пяти эпитопов В-клеточного блока BCoV_PolyE и BRV_PolyE сохраняется третичная и вторичная структура в составе Hybrid_PolyE (рис. 7) [1]. Можно заключить, что выработанные к данной конструкции антитела будут кросс-реагировать с вирионами BRV и BCoV.

Цистеины эпитопов в Hybrid_PolyE лежат достаточно далеко друг от друга, чтобы формирование между ними дисульфидных связей было невозможным (табл. 6, в Hybrid_PolyE блок В-эпитопов начинается с 285 а. к.).

Дисульфидные связи между В-эпитопами могут создавать препятствие взаимодействию антител с соответствующими вирусными фрагментами за счет их сближения и стабилизации данного состояния.

Таблица 5

Предсказанные свойства полиэпитопного белка Hybrid_PolyE

Размер, а. к.		397
Молекулярная масса, кДа		44 584.79
pI		9.78
ε (коэффициент молярной экстинкции), $M^{-1*}см^{-1}$		60 755
$T_{1/2}$ (время полураспада белка), ч	E. coli	> 10
	ретикулоциты	30
Индекс нестабильности		26.12
Алифатический индекс		72.85
GRAVY Grand average of hydropathicity (средняя гидропатичность)		–0.444

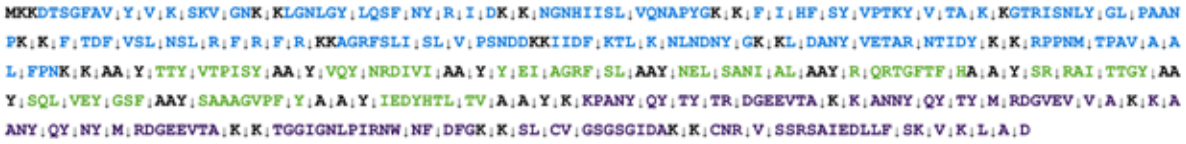


Рис. 6. Карта процессинга белка Hybrid_PolyE in vivo. Обозначения такие же как на рисунке 2

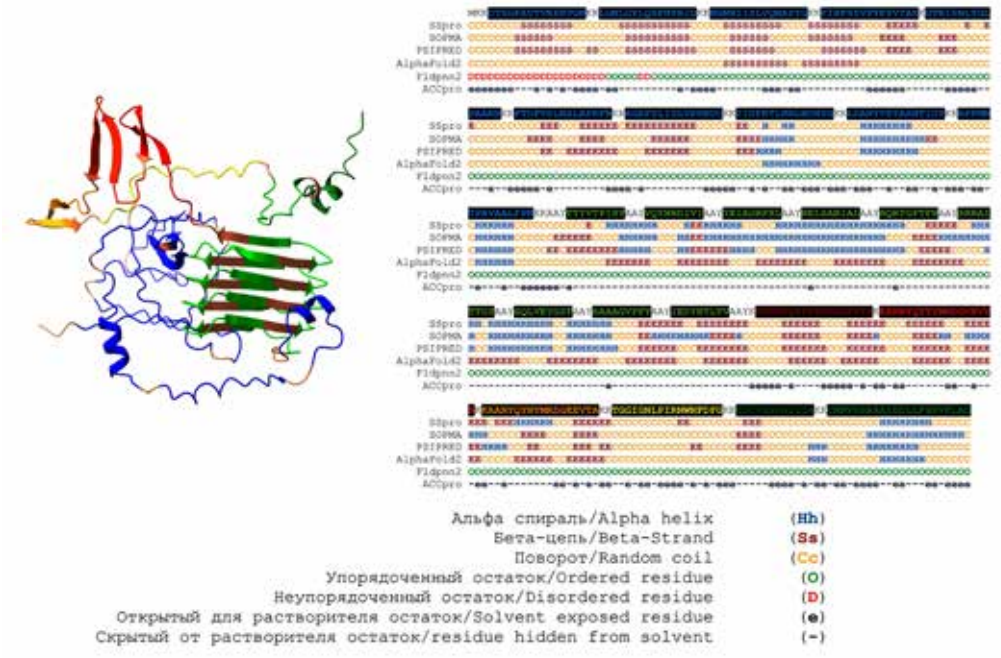


Рис. 7. Пространственная характеристика Hybrid_PolyE. Обозначения как на рисунке 3

Таблица 6

Позиции Hybrid_PolyE, между которыми возможно образование дисульфидных связей при замещении соответствующих аминокислот на цистеины

Вероятное расположение S—S связи	χ_3-угол, °	Энергия связи, ккал/моль
G39—S59	107,38	1,90
A49—K54	–115,02	4,64
G52—P115	**91,79**	**2,64**
I74—L77	106,59	1,70
A173—A197	–88,97	0,47
I218—A234	120,71	5,87
A258—P266	–106,49	1,11

Оптимальные χ-углы для образования связей имеют значения около –87° или +97°. Энергия связи не должна быть меньше 2,2 ккаль/моль. **Полужирным шрифтом** выделены соответствующие этим требованиям связи

Оптимизацию гена Hybrid_PolyE производили таким образом, что первые и последние 25 п. н. идентичны началу и концу гена коронавирусного полиэпитопного белка BCoV_PolyE, поэтому для его амплификации полимеразной цепной реакцией можно использовать ранее разработанные праймеры (табл. 4), и осуществить клонирование в pET24b по тем же сайтам рестрикции — *Nde* I и *Eco* RI (рис. 8). Ранее сделанные выводы по поводу 5′-конца мРНК BCoV_PolyE также применимы и к мРНК Hybrid_PolyE (рис. 5б).

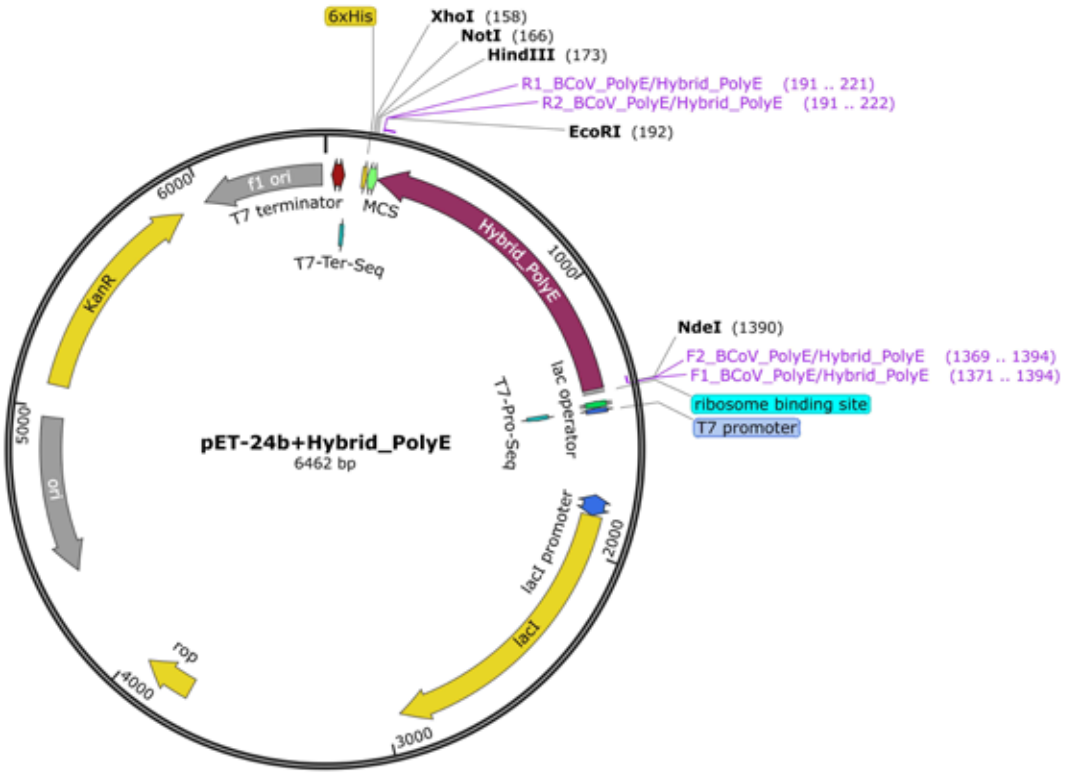


Рис. 8. Вектор pET24b с геном белка Hybrid_PolyE. Фиолетовым текстом указаны праймеры и их позиции отжига

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан дизайн последовательностей полиэпитопных белков бычьих рота- и коронавирусов, которые теоретически могут быть использованы для профилактики и лечения вызванных данными вирусами заболеваний у крупного рогатого скота, благодаря наличию участков для активации обоих компонентов адаптивного иммунитета. Присутствие специфических рота- и коронавирусных фрагментов обусловливает более эффективную стимуляцию специфического антивирусного иммунитета белком-гибридом Hybrid_PolyE. В то же время, с помощью одного биоинформационного подхода невозможно предсказать какой из разработанных конструктов будет более эффективен для борьбы с бычьим рота- и/или коронавирусом. Ответы на данные вопросы будут получены после создания реальных генетических структур и проведения экспериментальной валидации созданных полиэпитопных белков в условиях *in vivo* и *in vitro*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Петруша Я. В.* Дизайн рекомбинантного полиэпитопного белка-антигена бычьего коронавируса и ротавируса / Я. В. Петруша, М. И. Потапович, В. А. Прокулевич // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2025. — № ??.

2. *Berge A. C.* Bovine Coronavirus Prevalence and Risk Factors in Calves on Dairy Farms in Europe / A. C. Berge, G. Vertenten // Animals. — 2024. — Vol. 14. — No. 18. — P. 1—15. DOI: 10.3390/ani14182744

3. *Brunauer M.* Prevalence of Worldwide Neonatal Calf Diarrhoea Caused by Bovine Rotavirus in Combination with Bovine Coronavirus, *Escherichia coli* K99 and *Cryptosporidium* spp.: A Meta-Analysis / M. Brunauer, F. — F. Roch, B. Conrady // Animals. —2021. — Vol. 11. — No. 4. — P. 1—27. DOI: 10.3390/ani11041014.2

4. *Saif L. J.* Coronavirus immunogens / L. J. Saif // Veterinary Microbiology. — 1993. — Vol. 37. — No. 3—4. P. 285—297. DOI: 10.1016/0378-1135(93)90030-B

5. *Fusheng S.* Towards a Safer Future: Enhancing Vaccine Development to Combat Animal Coronaviruses / S. Fusheng, Y. Ruisong, D. Shijuan [et al.] // Vaccines. — 2024. — Vol. 12. — No. 3. — P. 1—31. DOI: 10.3390/vaccines12030330

6. *Nilsson J. B.* Accurate prediction of HLA class II antigen presentation across all loci using tailored data acquisition and refined machine learning / J. B. Nilsson, S. Kaabinejadian, H. Yari [et al.] // Sci. Adv. — 2023. — Vol. 9, — No. 47. — P. 1—20. DOI: 10.1126/sciadv.adj6367

7. *Reynisson B.* NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data / B. Reynisson, B. Alvarez, S. Paul [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2020. — Vol. 48. — No. W1. — P. W449—W454. DOI: 10.1093/nar/gkaa379

8. *Calis J. J. A.* Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity / J. J. A. Calis, M. Maybeno, J. A. Greenbaum [et al.] // PLOS Comput. Biol. —2013. —Vol. 9. — No. 10. — P. 1—13. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003266

9. *Raveh B.* Rosetta FlexPepDock ab-initio: Simultaneous Folding, Docking and Refinement of Peptides onto Their Receptors / B. Raveh, N. London, L. Zimmerman [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — No. 4. — P. 1—10. DOI: 10.1371/journal.pone.0018934

10. *Li X.* Two Distinct Conformations of a Rinderpest Virus Epitope Presented by Bovine Major Histocompatibility Complex Class I N*01801: a Host Strategy To Present Featured Peptides / X. Li, J. Liu, J. Qi [et al.] // J. Virol. — 2011. — Vol. 85. — No. 12. — P. 6038—6048. DOI: 10.1128/JVI.00030-11

11. *Macdonald I. K.* MHC Class I Bound to an Immunodominant *Theileria parva* Epitope Demonstrates Unconventional Presentation to T Cell Receptors / I. K. Macdonald, M. Harkiolaki, L. Hunt [et al.] // PLoS Pathog. 2010. — Vol. 6. — No. 10. — P. 1—11. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001149

12. *Tadros D. M.* Predicting MHC—I ligands across alleles and species: How far can we go? [PrePrint] / D. M. Tadros, J. Racle, D. Gfeller /. — 2024. DOI: 10.1101/2024.05.08.593183

13. *O'Donnell T. J.* MHCflurry 2.0: Improved Pan-Allele Prediction of MHC Class I-Presented Peptides by Incorporating Antigen Processing / T. J. O'Donnell, A. Rubinsteyn, U. Laserson // Cell Syst. — 2020. — Vol. 11. — No. 1. — P. 42—48. DOI: 10.1016/j.cels.2020.06.010

14. *Racle J.* Machine learning predictions of MHC—II specificities reveal alternative binding mode of class II epitopes / J. Racle, P. Guillaume, J. Schmidt [et al.] // Immunity. — 2023. — Vol. 56. — No. 6. — P. 1359—1375. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.03.009

15. *Jumper J.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [et al.] // Nature. — 2021. — Vol. 596. — No. 7873. — P. 583—589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2

16. *Craig D. B.* Disulfide by Design 2.0: a web-based tool for disulfide engineering in proteins / D. B. Craig, A. A. Dombkowski // BMC Bioinformatics. — 2013. — Vol. 14. — No. 1. — P. 1—6. DOI: 10.1186/1471-2105-14-346

17. *Ye J.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya [et al.] // BMC Bioinformatics. — 2012. — Vol. 13. — No. 1. — P. 1—11. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134

18. *Markham N. R.* DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction / N. R. Markham, M. Zuker // Nucleic Acids Res. — 2005. — Vol. 33. — No. Web Server. — P. W577—W581. DOI: 10.1093/nar/gki591

19. *Wang C.* Antigenic structure of the human coronavirus OC43 spike reveals exposed and occluded neutralizing epitopes / C. Wang, E. L. Hesketh, T. M Shamorkina [et al.] // Nat. Commun. — 2022. — Vol. 13. — No. 1. — P. 1—15. DOI: 10.1038/s41467-022-30658-0

20. *Dacon C.* Broadly neutralizing antibodies target the coronavirus fusion peptide / C. Dacon, C. Tucker, L. Peng [et al.] // Science. — 2022. — Vol. 377. — No. 6607. — P. 1—8. DOI: 10.1126/science.abq3773

21. *Tortorici M. A.* Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors / M. A. Tortorici, A. C. Walls, Y. Lang // Nature Struct. Mol. Biol. — 2019. — Vol. 26. — No. 6. — P. 481—489. DOI: 10.1038/s41594-019-0233-y

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Я. В. Петруша — аспирант, младший научный сотрудник НИЛ Биотехнологии кафедры Микробиологии биологического факультета;

М. И. Потапович — заведующий НИЛ Биотехнологии кафедры Микробиологии биологического факультета;

В. А. Прокулевич — д. б. н., профессор, главный научный сотрудник НИЛ Биотехнологии кафедры Микробиологии биологического факультета.

Статья поступила в редакцию 20.03.2025.

Original article
UDC 579.62

DESIGN OF RECOMBINANT POLYEPITOPE PROTEIN-ANTIGEN OF BOVINE CORONAVIRUS AND ROTAVIRUS

Yana Vladimirovna Petrusha✉, Maksim Iosifovich Potapovich, Vladimir Antonovich Prokulevich

Belarusian State University, Minsk, the Republic of Belarus, yana.petrusha@gmail.com✉

Abstract. Using bioinformatics analysis, a hybrid protein-antigen was designed that included epitopes of bovine coronaviruses and rotaviruses. Comparison of physicochemical properties using specialized programs has shown that the hybrid protein is stable *in vivo*, non-toxic, has no homology with bovine proteins, and is soluble in water. The topology of the epitope block for T-killers promotes the processing of the selected peptides while maintaining the structure of B-epitopes for interaction with antibodies against rotaviruses and coronaviruses. The results obtained indicate the immunogenicity of the designed protein and the possibility of its use in the construction of subunit vaccines used for prophylactic and therapeutic purposes.

Keywords: Bovine coronavirus, Bovine rotavirus, polyepitope protein, recombinant protein, *Bos taurus*, reverse vaccinology.

Acknowledgments: to Kuleshova Yu. M. and Romanovskaya T. V. for advice on the use of Two State Melting Folding module of DINAMelt

INTRODUCTION

The bioinformatics development allows to obtain qualitatively new drugs for the prevention and treatment of infectious diseases of various etiologies. Subunit vaccines have a number of advantages over traditional ones, primarily in such parameters as safety and cost-effectiveness. The first step in their design is to search for targets capable of inducing a protective immune response against the pathogen. Reverse vaccinology methods already at the initial stage of designing new-generation drugs make it possible to construct "artificial" proteins and corresponding genetic structures expressed in bacteria, capable of ensuring the production of active pharmaceutical substances in industrial quantities.

In the previous study [1], a bioinformatic analysis of bovine rotavirus proteins was carried out using 29 computer programs and several databases in order to identify the most promising candidates for vaccines. As a result of the analysis, 15 epitopes were identified — the most promising candidates for obtaining a substance against bovine rotavirus. However, mixed infections caused by bovine rotavirus (BRV) and bovine coronavirus (BCoV) are common in cow herds. In studies conducted in cattle breeding farms in the European Union, BCoV was detected in ~80 % of the tested herds [2]. Most often, calves under 14 days of age are affected by mixed infections. On average, across all age groups worldwide, BRV is found in 20—30 % of calves, and BCoV in 10—15 % of calves, while the infection rate has been shown to vary greatly depending on the region [3].

The problem of mass infection facing cattle breeding requires the design of new antiviral agents using the collected information on the structural features of BCoV. The main antigens of coronaviruses are the structural proteins S, HE, N, M and E. The main target for neutralizing antibodies is the peplomer S protein, which is involved in interaction with the cell [4, 5]. Based on the described antigens, it is possible to design a recombinant polyepitope protein that will cause an immune response in the body directed at viral fragments.

Due to the frequent co-infections of calves with coronavirus and rotavirus, it is also advisable to design a protein that will include peptides from both viruses at once (BCoV and BRV) to reduce production costs.

Thus, the objective of this work was to design a polyepitope protein enriched with BCoV epitopes and a protein consisting of BRV and BCoV epitopes.

MATERIAL AND METHODS

When constructing a polyepitope protein against bovine coronavirus, we searched for forms of relevant immunogen proteins S (only variants found in Europe were taken), HE, M, N, E in the NCBI and UniProt databases, then used the obtained consensuses to predict epitopes for T cells using NetMHCIIpan [6] and NetMHCpan [7], in parallel, we collected experimentally identified linear B-epitopes of the Betacoronavirus 1 group of viruses from the IEDB (https://www.iedb.org/). Rotavirus epitopes were obtained and described in a previous work [1].

For all collected epitopes, the degree of conservatism, antigenicity, homology with the bovine proteome, and proximity to known post-translational modifications in the whole protein were determined. For T-killer epitopes, immunogenicity was assessed separately using Class I Immunogenicity Database (IEDB) [8] and docking was performed according to the FlexPepDockabinitio protocol [9] to assess the possibility of the peptide forming realistic conformations (close to the 3pwu [10] and 2xfx [11] structures) with the BoLA-I (Bovine Leukocyte Antigen) receptor; T-helper epitopes were tested for their ability to stimulate interleukin synthesis and for their proximity to known B-epitopes. T-cell epitopes were rechecked using the MixMHCpred [12], MHCFlurry [13] (BoLA-I) and MixMHCIIpred [14] (BoLA-II) programs. B-cell epitopes were assessed for their length, secondary structure and the existence of monoclonal antibodies interacting with them.

The polyepitope protein was constructed from the selected epitopes, placing KK and AAY polylinkers between them. The presence of properties relevant for expression and use as an immunogen (antigenicity, toxicity, solubility, molecular weight, etc.) was confirmed, modeling was performed using AlphaFold2 [15], and possible disulfide bonds in the structures were identified using the Disulfide by Design server [16]. The obtained proteins were converted into genes using the GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific) with optimization of the terminal regions to select primers optimal for the gene (PrimerBLAST [17]) and mRNA (hairpin formation was checked using DINAMelt [18]).

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

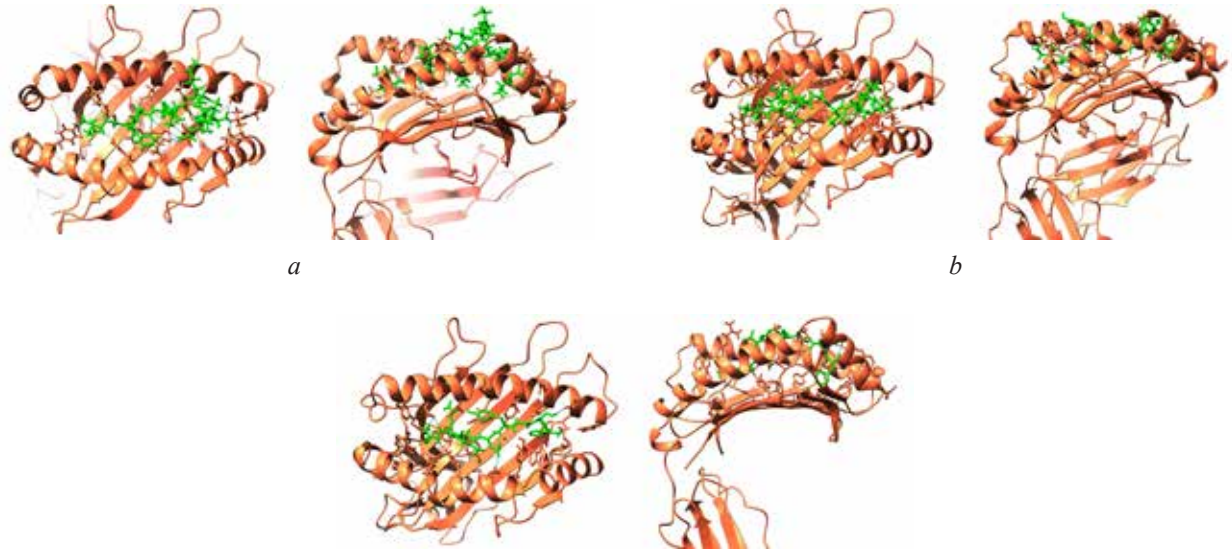
Twenty-one (21) structures-complexes of coronavirus peptides and bovine BoLA-I receptors with the lowest interaction energy assigned by the FlexPepDockabinitio protocol were classified. The following criteria were used: the number of receptor residues interacting with the epitope (including the number of conserved residues Y84, Y99, S/T143, K146, Y159, Y171); the number of hydrogen bonds formed between the ligand and the receptor; ligand affinity calculated using NetMHCpan and MHCFlurry. In addition, the complexes were also tested for bonds with the ends of the peptide. Three groups of complexes were identified: the group of the most stable complexes and those closest to the experimental structures (Fig. 1a—b) (1:02301—SQLVEYGSF, Fig. 1c); a group of complexes that can theoretically form (1:00901—SAAAGVPFY, 1:01901—IEDYHTLTV, 1:02301—SRRAITTGY, 1:03101—SRRAITTGY, 3:03701—SAAAGVPFY) and a group of complexes in which destabilizing disturbances are observed (15 complexes).

Among all the tested nonamer peptides, the following showed a predisposition to form stable complexes with BoLA-I: SQLVEYGSF, SRRAITTGY, SAAAGVPFY, IEDYHTLTV. This interaction is the first step in the presentation of peptides to T-killers, which is necessary for the development of an immunological response to the desired antigens, so these peptides were chosen for inclusion in polyepitope proteins. In total, 10 peptides have passed all stages of testing (Table 1), most of which are associated with the S protein. The large size (1363 aa versus 424 aa of HE, 230 aa of M, 448 aa of N and 84 aa of E proteins) is probably the reason why most of the tested peptides were extracted from this protein, due to an increase in the number of possible 9-mers and 15-mers when cutting it.

The polyepitope protein containing coronavirus epitopes was named BCoV_PolyE. It has optimal properties for expression in E. coli (Table 2): size within 15—20 kDa, stability *in vivo* in bacterial and animal cells, hydrophilicity. The previously used approach [5] predicted that the protein is antigenic, non-toxic, soluble in water, does not contain hidden signaling and hydrophobic transmembrane regions. BCoV_PolyE has no homology with the bovine proteome, which could negatively affect its immunogenicity.

Since processing (cutting intracellular proteins into peptides by proteasomes) is a key step in the development of the body's cytotoxic response, we assessed the distribution of cutting sites in BCoV_PolyE. All T-killer epitopes are cut out entirely (Fig. 2), which increases the chance of their interaction with T-killers.

The C-distal B-epitope of BCoV_PolyE is disordered, while the proximal epitope takes the form of an α-helix surrounded by turns. More than half of the amino acids of the B-epitopes are exposed to the solvent, indicating that the protein has a favorable structure for the induction of humoral immunity (antibodies interact only with exposed regions of the protein) (Fig. 3).



a *b* *c*

Fig. 1. Models of experimentally obtained complexes of peptides and BoLA-I receptors: 2xfx (*a*), 3pwu (*b*). Model of the most realistic complex of the SQLVEYGSF BCoV peptide and BoLA-1:02301 obtained by Flex-PepDock-abinitio (*c*)

Table 1

B. coronavirus peptides for polyepitope protein construction

Target cell	Protein	Peptide sequence	The beginning, aa	Reference
T-helper	S	LGNLGYLQSFNYRID	407	—
	S	NGNHIISLVQNAPYG	1139	—
	S	FIHFSYVPTKYVTAK	1156	—
	M	DTSGFAVYVKSKVGN	195	—
T-killer	S	SRRAITTGY	766	—
	S	SQLVEYGSF	839	—
	S	SAAAGVPFY	985	—
	M	IEDYHTLTV	139	—
B-cell	S	SLCVGSGSGIDA	494	[19, c. 5—6]
	S	CNRVSSRSAIEDLLFSKVKLAD	907	[20]

Since the entire polyepitope protein will be involved in the interaction with antibodies, it is important that the local structures formed by the B-epitopes in its composition are as similar as possible to the form that they or their close homologues take in viruses. In Fig. 4, it can be seen that the secondary structure of the B-epitope from BCoV is close to the homologous region including the fusion peptide of the related human coronavirus (HCoV) OC43 (the peptides are 77.27 % identical). The B-epitope of the S protein distal from the C-terminus in the S OC43 trimer does not have a stable structure [19, p. 6, Fig. 4f], and its composition is 50 % identical to the BCoV peptide.

Cysteines of the C-terminal region cannot participate in the formation of disulfide bonds (Table 3, the B-epitope block starts with 124 aa), which could lead to complications in the access of antibodies to B-epitopes.

Table 2

Predicted properties of the polyepitope protein BCoV_PolyE

Size, aa		159
Molecular weight, kDa		17 447.02
pI		9.75
ε (molar extinction coefficient), $M^{-1*}cm^{-1}$		22 475
$T_{1/2}$ (protein half-life), h	E. coli	> 10
	reticulocytes	30
Instability Index		34.05
Aliphatic index		78.62
GRAVY Grand average of hydropathicity (medium hydropathicity)		–0.205

Fig. 2. Map of BCoV_PolyE protein processing *in vivo*. Blue text indicates T-helper, green text indicates T-killer, and purple text indicates B-cell epitopes. Arrows indicate proteasome cleavage sites

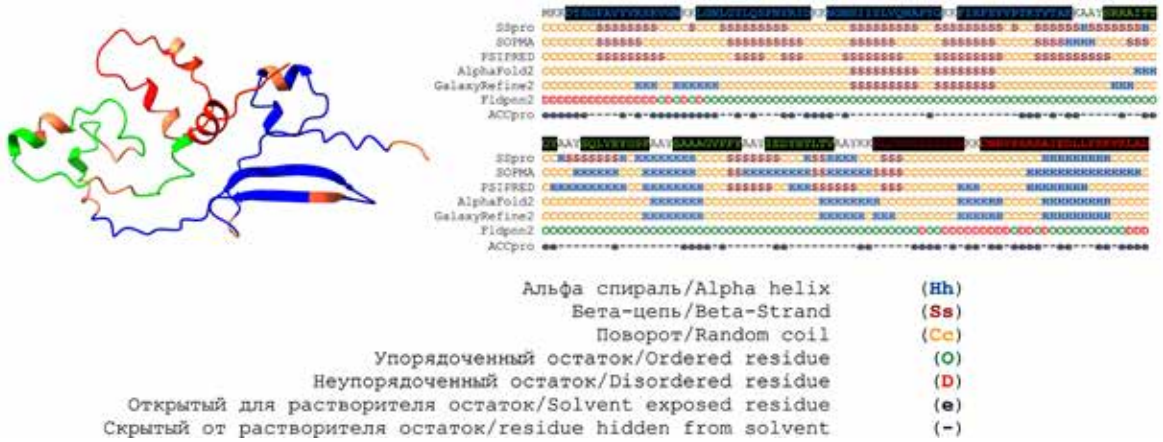


Fig. 3. Spatial characteristics of BCoV_PolyE. Epitopes for T-helpers are colored in blue, for T-killers — in green, and B-cell epitopes are colored in the order of the colors of the rainbow. The names of the programs used are on the left. Decoding the secondary structure notations is below

The protein was converted into a gene with the selection of optimal primers (Table 4), then cloned *in silico* into pET24b (Fig. 5a). According to DINAMelt calculations, it was shown that the first 20 aa from the start codon of the gene mRNA are free at the beginning of transcription (Fig. 5b), ensuring efficient ribosome landing at 37 °C.

Since bovine coronavirus often infects animals together with bovine rotavirus [3], there is a need to prevent or treat infections caused by two different viruses simultaneously. Obtaining two different recombinant proteins is a costly production procedure, since it is necessary to independently optimize the expression, isolation and purification conditions for each polyepitope protein. To reduce the cost of production, the predicted epitopes of two viruses can be included in one structure.

The fusion protein was named Hybrid_PolyE: it included all the epitopes from BCoV_PolyE and BRV_PolyE [1] presented in this article. The properties of

Hybrid_PolyE, which includes 25 epitopes, are shown in Table 5. According to bioinformatics analysis, the hybrid recombinant protein is non-toxic, non-homologous to bovine proteins, does not contain hidden signaling and transmembrane regions, and is antigenic and soluble. The fusion gene can be expressed in bacteria.

The results of the analysis show that the epitopes are excised from Hybrid_PolyE in the same manner as in the designed monostructural sequences against coronaviruses and rotaviruses (Fig. 6).

When the local environment changes, the tertiary and secondary structure of the five B-cell block epitopes BCoV_PolyE and BRV_PolyE is preserved in Hybrid_PolyE (Fig. 7) [1]. It can be concluded that the antibodies produced to this structure will cross-react with BRV and BCoV virions.

The cysteines of the epitopes in Hybrid_PolyE are located far enough from each other that the formation of disulfide bonds between them is impossible (Table 6, in Hybrid_PolyE, the block of B-epitopes starts with 285 aa). Disulfide bonds between B-epitopes can create an obstacle to the interaction of antibodies with the corresponding viral fragments due to their convergence and stabilization of this state.

Fig. 4. Homologue of BCoV epitope in S HCoV OC43 (6nzk [21]). The epitope is colored as in Fig. 3

Table 3

Positions of BCoV_PolyE between which disulfide bonds can be formed when the corresponding amino acids are replaced with cysteines

Probable location of S—S bond	χ_3-angle, °	Bond energy, kcal/mol
Y11—Q28	**88.89**	**4.39**
G17—K20	**99.66**	**5.95**
N40—Y60	**102.30**	**3.61**
Q47—K54	123.40	7.16

Optimal χ-angles for bond formation have values of about –87° or +97°. The bond energy should not be less than 2.2 kcal/mol. Bonds that meet these requirements are highlighted **in bold**.

Table 4

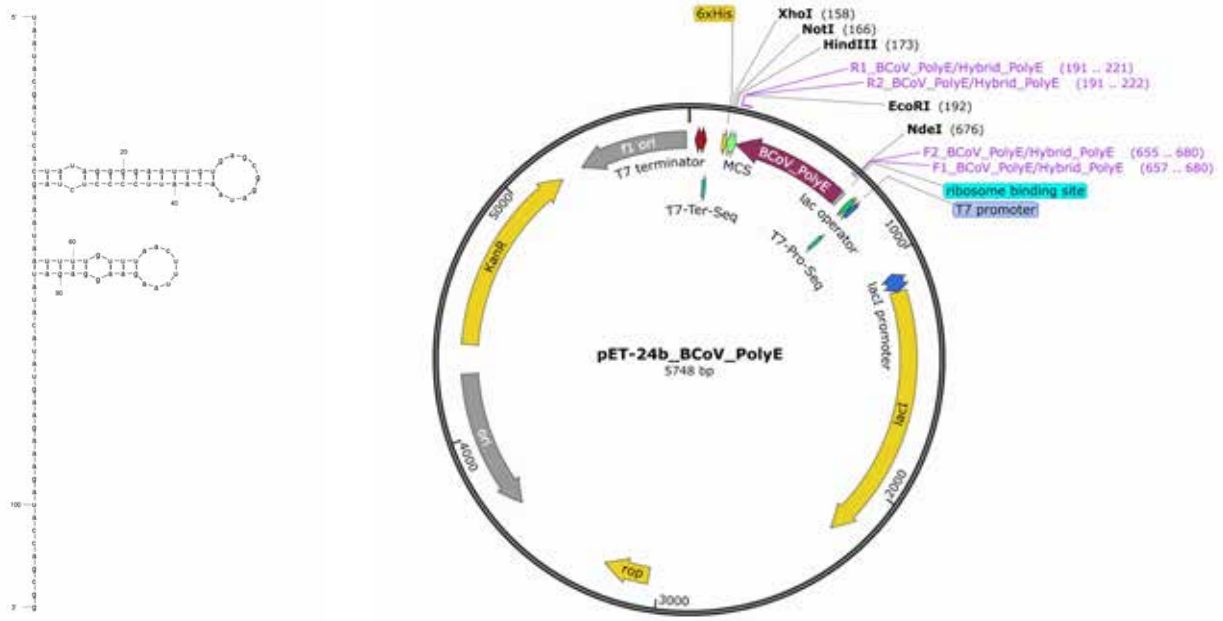
Primers for the BCoV_PolyE gene and their properties

Orientation		F1	R1	F2	R2
1	2	3	4	5	6
Coordinates, bp	Start	1	480	1	480
	Stop	21	457	23	456
Tm*, °C		55.2	53.5	56.6	53.8
GC**, %		47.6	37.5	43.5	36
t°max hairpins, °C		23.5	24.6	30.3	24.6

Table 4 (the end)

1	2	3	4	5	6
ΔGmin*** dimer, kcal/mol	Homo-	–7.82	–8.51	–7.82	8.51
	Hetero-	–7.06		–7.06	
Gene size, bp		480			

* Tm — melting point
** GC — guanine and cytosine content
*** ΔGmin — change in Gibbs free energy. ΔGmin should not be lower than –9.00 kcal/mol



a *b*

Fig. 5. Vector pET24b with the gene of the BCoV_PolyE protein (*a*), and the corresponding mRNA structure (*b*). The purple text indicates the primers and their annealing positions

Table 5

Predicted properties of the polyepitope protein Hybrid_PolyE

Size, aa		397
Molecular weight, kDa		44 584.79
pI		9.78
ε (molar extinction coefficient), $M^{-1*}cm^{-1}$		60 755
$T_{1/2}$ (protein half-life), h	E. coli	> 10
	reticulocytes	30
Instability Index		26.12
Aliphatic index		72.85
GRAVY Grand average of hydropathicity (medium hydropathicity)		–0.444

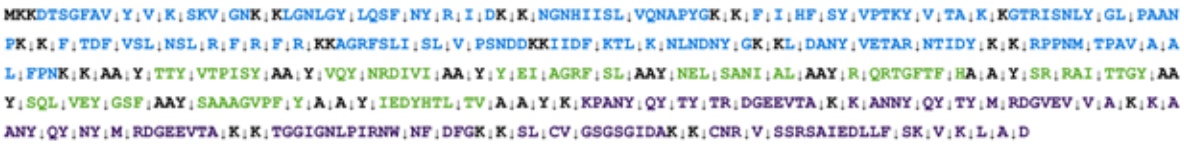


Fig. 6. Map of Hybrid_PolyE protein processing *in vivo*. The designations are the same as in Fig. 2

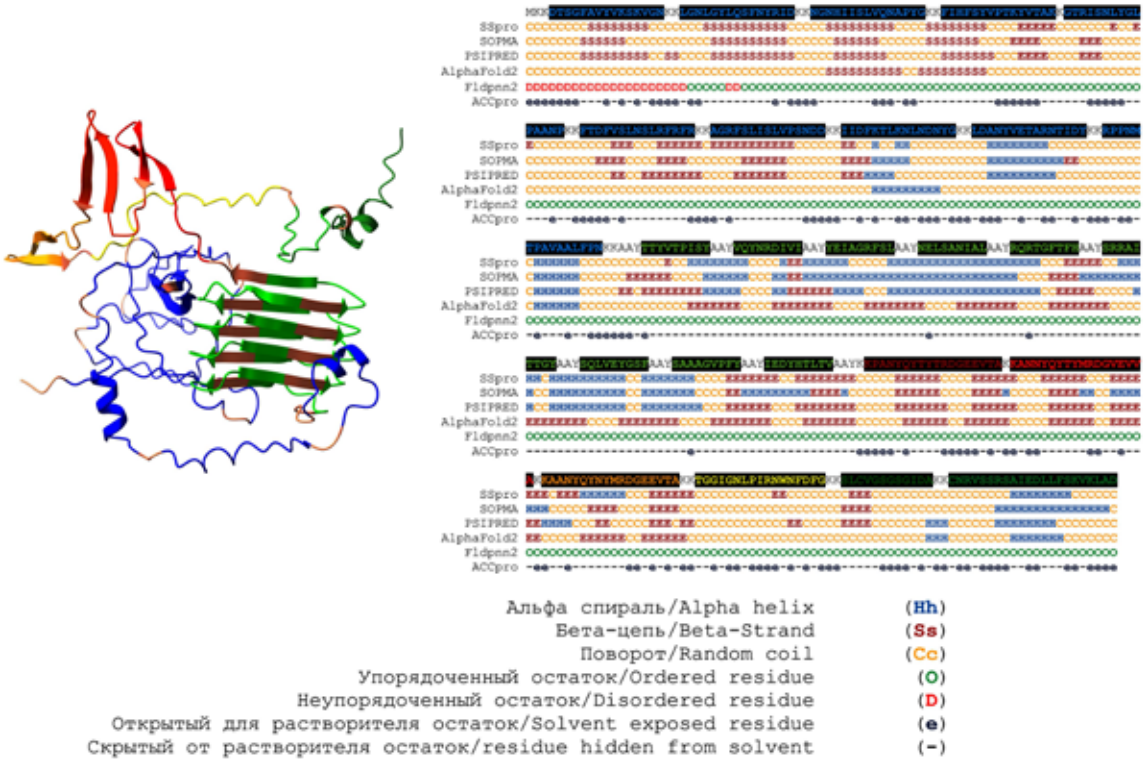


Fig. 7. Spatial characteristics of Hybrid_PolyE. The designations are the same as in Fig. 3

Table 6

Hybrid_PolyE positions between which the formation of disulfide bonds is possible when the corresponding amino acids are replaced by cysteines

Probable location of S—S bond	χ_3-angle, °	Bond energy, kcal/mol
G39—S59	107.38	1.90
A49—K54	–115.02	4.64
G52—P115	**91.79**	**2.64**
I74—L77	106.59	1.70
A173—A197	–88.97	0.47
I218—A234	120.71	5.87
A258—P266	–106.49	1.11

Optimal χ-angles for bond formation have values of about –87° or +97°. The bond energy should not be less than 2.2 kcal/mol. The bonds that meet these requirements are highlighted **in bold**.

The Hybrid_PolyE gene was optimized in such a way that the first and last 25 bp are identical to the beginning and end of the BCoV_PolyE coronavirus polyepitope protein gene, so previously designed primers can be used for its amplification by polymerase chain reaction (Table 4), and cloning can be performed in pET24b using the same restriction sites — *Nde* I and *Eco* RI (Fig. 8). Previously made conclusions regarding the 5′-end of BCoV_PolyE mRNA are also applicable to Hybrid_PolyE mRNA (Fig. 5b).

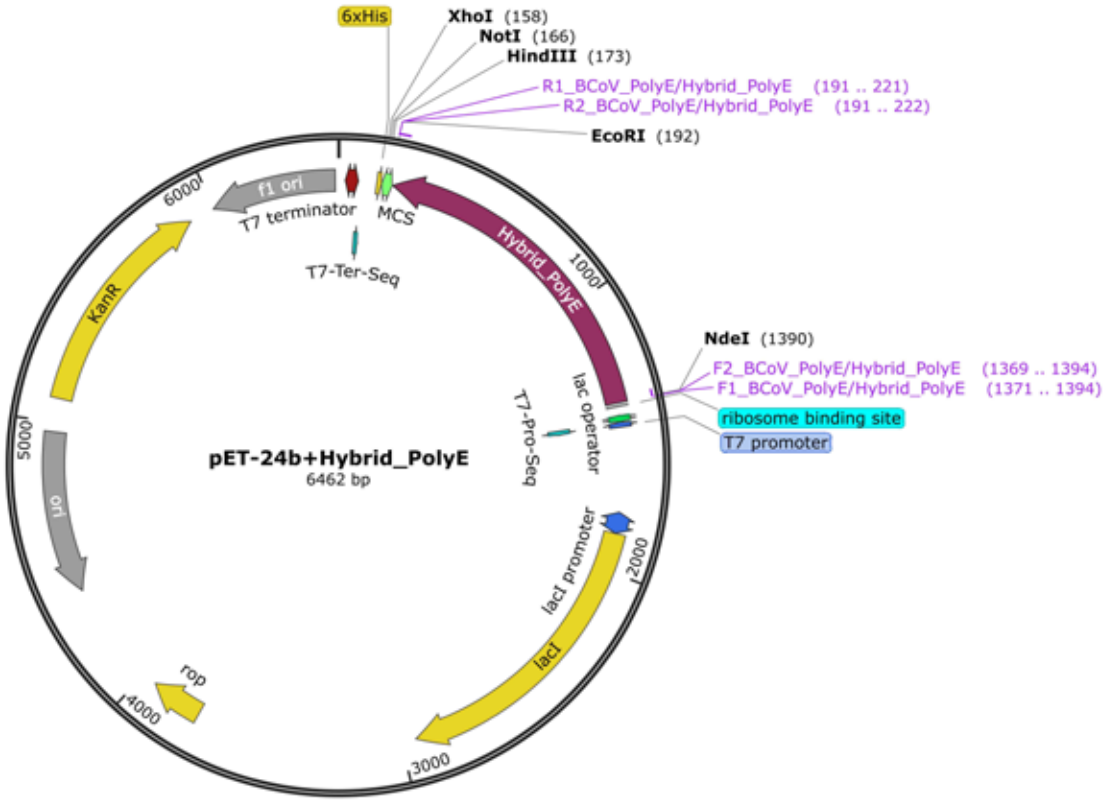


Fig. 8. Vector pET24b with the gene of the protein Hybrid_PolyE. The purple text indicates the primers and their annealing positions

CONCLUSION

A design of polyepitope protein sequences of bovine rota- and coronaviruses has been developed, which theoretically can be used for the prevention and treatment of diseases caused by these viruses in cattle, due to the presence of sites for activation of both components of adaptive immunity. The presence of specific rota- and coronavirus fragments causes more effective stimulation of specific antiviral immunity by the Hybrid_PolyE hybrid protein. At the same time, using a single bioinformatics approach, it is impossible to predict which of the designed constructs will be more effective in combating bovine rota- and/or coronavirus. Answers to these questions will be obtained after the design of real genetic structures and experimental validation of the designed polyepitope proteins *in vivo* and *in vitro*.

REFERENCES

1. Petrusha Ya. V. Design of recombinant polyepitope protein-antigen of bovine coronavirus and rotavirus / Ya. V. Petrusha, M. I. Potapovich, V. A. Prokulevich // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2025. — No.2.

2. *Berge A. C.* Bovine Coronavirus Prevalence and Risk Factors in Calves on Dairy Farms in Europe / A. C. Berge, G. Vertenten // Animals. — 2024. — Vol. 14. — No. 18. — P. 1—15. DOI: 10.3390/ani14182744

3. *Brunauer M.* Prevalence of Worldwide Neonatal Calf Diarrhoea Caused by Bovine Rotavirus in Combination with Bovine Coronavirus, *Escherichia coli* K99 and *Cryptosporidium* spp.: A Meta-Analysis / M. Brunauer, F. — F. Roch, B. Conrady // Animals. — 2021. — Vol. 11. — No. 4. — P. 1—27. DOI: 10.3390/ani11041014.2

4. *Saif L. J.* Coronavirus immunogens / L. J. Saif // Veterinary Microbiology. — 1993. — Vol. 37. — No. 3—4. P. 285—297. DOI: 10.1016/0378-1135(93)90030-B

5. *Fusheng S.* Towards a Safer Future: Enhancing Vaccine Development to Combat Animal Coronaviruses / S. Fusheng, Y. Ruisong, D. Shijuan [et al.] // Vaccines. — 2024. — Vol. 12. — No. 3. — P. 1—31. DOI: 10.3390/vaccines12030330

6. *Nilsson J. B.* Accurate prediction of HLA class II antigen presentation across all loci using tailored data acquisition and refined machine learning / J. B. Nilsson, S. Kaabinejadian, H. Yari [et al.] // Sci. Adv. — 2023. — Vol. 9, — No. 47. — P. 1—20. DOI: 10.1126/sciadv.adj6367

7. *Reynisson B.* NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data / B. Reynisson, B. Alvarez, S. Paul [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2020. — Vol. 48. — No. W1. — P. W449—W454. DOI: 10.1093/nar/gkaa379

8. *Calis J. J. A.* Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity / J. J. A. Calis, M. Maybeno, J. A. Greenbaum [et al.] // PLOS Comput. Biol. —2013. —Vol. 9. — No. 10. — P. 1—13. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003266

9. *Raveh B.* Rosetta FlexPepDock ab-initio: Simultaneous Folding, Docking and Refinement of Peptides onto Their Receptors / B. Raveh, N. London, L. Zimmerman [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — No. 4. — P. 1—10. DOI: 10.1371/journal.pone.0018934

10. *Li X.* Two Distinct Conformations of a Rinderpest Virus Epitope Presented by Bovine Major Histocompatibility Complex Class I N*01801: a Host Strategy To Present Featured Peptides / X. Li, J. Liu, J. Qi [et al.] // J. Virol. — 2011. — Vol. 85. — No. 12. — P. 6038—6048. DOI: 10.1128/JVI.00030-11

11. *Macdonald I. K.* MHC Class I Bound to an Immunodominant *Theileria parva* Epitope Demonstrates Unconventional Presentation to T Cell Receptors / I. K. Macdonald, M. Harkiolaki, L. Hunt [et al.] // PLoS Pathog. 2010. — Vol. 6. — No. 10. — P. 1—11. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001149

12. *Tadros D. M.* Predicting MHC—I ligands across alleles and species: How far can we go? [PrePrint] / D. M. Tadros, J. Racle, D. Gfeller /. — 2024. DOI: 10.1101/2024.05.08.593183

13. *O'Donnell T. J.* MHCflurry 2.0: Improved Pan-Allele Prediction of MHC Class I-Presented Peptides by Incorporating Antigen Processing / T. J. O'Donnell, A. Rubinsteyn, U. Laserson // Cell Syst. — 2020. — Vol. 11. — No. 1. — P. 42—48. DOI: 10.1016/j.cels.2020.06.010

14. *Racle J.* Machine learning predictions of MHC—II specificities reveal alternative binding mode of class II epitopes / J. Racle, P. Guillaume, J. Schmidt [et al.] // Immunity. — 2023. — Vol. 56. — No. 6. — P. 1359—1375. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.03.009

15. *Jumper J.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [et al.] // Nature. — 2021. — Vol. 596. — No. 7873. — P. 583—589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2

16. *Craig D. B.* Disulfide by Design 2.0: a web-based tool for disulfide engineering in proteins / D. B. Craig, A. A. Dombkowski // BMC Bioinformatics. — 2013. — Vol. 14. — No. 1. — P. 1—6. DOI: 10.1186/1471-2105-14-346

17. *Ye J.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya [et al.] // BMC Bioinformatics. — 2012. — Vol. 13. — No. 1. — P. 1—11. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134

18. *Markham N. R.* DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction / N. R. Markham, M. Zuker // Nucleic Acids Res. — 2005. — Vol. 33. — No. Web Server. — P. W577—W581. DOI: 10.1093/nar/gki591

19. *Wang C.* Antigenic structure of the human coronavirus OC43 spike reveals exposed and occluded neutralizing epitopes / C. Wang, E. L. Hesketh, T. M Shamorkina [et al.] // Nat. Commun. — 2022. — Vol. 13. — No. 1. — P. 1—15. DOI: 10.1038/s41467-022-30658-0

20. *Dacon C.* Broadly neutralizing antibodies target the coronavirus fusion peptide / C. Dacon, C. Tucker, L. Peng [et al.] // Science. — 2022. — Vol. 377. — No. 6607. — P. 1—8. DOI: 10.1126/science.abq3773

21. *Tortorici M. A.* Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors / M. A. Tortorici, A. C. Walls, Y. Lang // Nature Struct. Mol. Biol. — 2019. — Vol. 26. — No. 6. — P. 481—489. DOI: 10.1038/s41594-019-0233-y

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ya. V. Petrusha — Postgraduate Student, Junior Scientific Associate of the Research Laboratory of Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Biology;

M. I. Potapovich — Head of the Research Laboratory of Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Biology;

V. A. Prokulevich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Scientific Associate of the Research Laboratory of Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Biology.

The article was submitted 20.03.2025.

Научная статья
УДК 579.62

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ДИЗАЙН ИММУНОГЕННОГО БЕЛКА, СОДЕРЖАЩЕГО ЭПИТОПЫ БЫЧЬЕГО РОТАВИРУСА

Яна Владимировна Петруша✉, Максим Иосифович Потапович, Владимир Антонович Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, yana.petrusha@gmail.com✉

Аннотация. Разработан полиэпитопный белок-антиген на основании выявленных *in silico* консервативных эпитопов белков VP4 и VP6 бычьих ротавирусов. Результаты компьютерного анализа указывают на эффективность и безопасность применения рекомбинантного белка-антигена: белок не токсичен; обладает оптимальными физико-химическими свойствами для крупномасштабной наработки в бактериальной системе экспрессии, не содержит участков, гомологичных бычьему протеому. Входящие в состав белка эпитопы для Т-киллеров, теоретически способны процессироваться протеасомами, а эпитопы для антител сохраняют близкую к оригинальной вторичную структуру, благодаря чему теоретически возможно одновременно индуцировать образование активного иммунного клеточного и гуморального (Т и В) ответа.
Ключевые слова: *Bovine rotavirus*, полиэпитопный белок, рекомбинантный белок, *Bos taurus*, обратная вакцинология.
Благодарности: Ольге Михайловне Коневой за предоставленную последовательность вектора pET24b с клонированным геном, кодирующим α-D-галактозамин-галактозаминидазу. Кулешовой Юлии Михайловне и Романовской Татьяне Владимировне за советы по использованию Two State Melting Folding module DINAMelt

ВВЕДЕНИЕ

В коровьих стадах часто встречаются инфекции, вызванные бычьим ротавирусом (*Bovine rotavirus*, BRV). В Беларуси антитела к ротавирусу выявляли в ~72—92 проанализированных проб болеющих пневмоэнтеритами телят [1].

Главным способом борьбы против ротавирусов является профилактическая или лечебная вакцинация животных, что требует создания специфических вакцин. Вакцины в качестве антигенов могут содержать живые вирусы, вызывая ответ первого типа, зависимый от цитотоксических Т-клеток. Убитые вирусы и очищенные антигены (субъединичные вакцины) обычно стимулируют реакцию, в которой доминируют антитела, вызывая реакцию второго типа.

Антигенная структура вируса определяется тремя сердцевинными белками (VP1, VP2 и VP3), срединный капсид содержит белок VP6, наружный капсид построен из белков VP7 и VP4. Белки наружного капсида вируса играют основную роль в возникновении инфекционного процесса и развитии иммунитета. Они ответственны за осуществление ранних этапов взаимодействия вирионов с чувствительными клетками — адсорбцию и проникновение, с ними связывают вирулентность ротавирусов. Белки VP7, VP6 и VP4 вызывают образование специфических вируснейтрализующих антител [2, 3]. Именно они ответственны за иммуногенность ротавирусов.

Применяют ряд вакцин, созданных на основе бычьего ротавируса [4, 5], но тем не менее до сих пор существует необходимость в разработке новых средств профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ротавирусами. Прогресс в области биоинформационного анализа и накопление большого объема данных позволяют работать *in silico* с вирусными последовательностями с беспрецедентной скоростью и точностью. Благодаря этому, существует возможность в сжатые сроки разработать рекомбинантный полиэпитопный белок-антиген для оптимизации антиротавирусной защиты крупного рогатого скота, в том числе, постнатальных телят, что и являлось **целью настоящей работы**. Проведены биоинформационные расчеты и предложена полиэпитопная структура белковой молекулы, включившей эпитопные элементы двух основных антигенных белков ротавирусов КРС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичную структуру белков VP4, VP6, VP7, претендентов на роль антигенов BRV, определяли на основе баз данных NCBI и UniProt. Выравнивание проводили алгоритмом MUSCLE (MEGAX). VP4 и VP7 классифицировали по генотипам при помощи *tblastn*. Консенсусы белков (усредненные по всем собранным вариантам последовательности) получали при помощи Jalview и использовали для предсказания Т-клеточных эпитопов.

В-клеточные эпитопы искали, анализируя литературные источники, связанные с экспериментально подтвержденными линейными эпитопами из белков представителей вида *Rotavirus* A (IEDB, https://www.iedb.org/), гомологи из *Bos taurus* подбирали при помощи Epitope Conservancy Analysis (IEDB).

Эпитопы для Т-хелперов (15 а. к.) и Т-киллеров (9 а. к.) предсказывали при помощи NetMHCIIpan 4.3 [6] и NetMHCIpan 4.1 [7], используя распространенные у гольштинской породы аллели рецепторов BoLA-1 (Bovine Leukocyte Antigen, бычий лейкоцитарный антиген): *009:01, *019:01, *023:01, *031:01; BoLA-2: *008:01, *012:01, *016:01, *018:01, *018:02, *025:01, *026:01, *026:03; BoLA-3: *002:01, *017:01, *027:02, *036:01, *037:01; BoLA-4: *024:01; BoLA-6: *014:02, *040:01; BoLA-II: *001:01, *007:01, *009:01, *009:02, *010:01, *011:01, *012:01, *014:01, *015:01, *016:01, *018:01, *018:02, *020:01:01, *020:01:02, *020:02, *020:03, *022:01, *022:02, *023:01, *027:01, *027:02, *027:03. Для BoLA-II учитывали возможность связывания пептидов в обратной ориентации и свойства аминокислот, окружающих участок.

Все пептиды оценивали по числу взаимодействующих с ними аллелей BoLA, по степени консервативности (Epitope Conservancy Analysis, IEDB), наличию антигенности (Vaxijen 2.0 [8]), токсичности (Toxinpred 3.0 [9]), степени гомологии с протеомом *Bos taurus* (pBLAST), наличию в пептиде или в ближайших регионах посттрансляционных модификаций.

Для В-эпитопов проверяли длину, вторичную структуру в составе белка, существование экспериментально выработанных моноклональных антител анализом литературных данных. BoLA-II-лиганды проверяли на способность к стимуляции синтеза интерферона-γ (IFN-epitope [10]), интерлейкина-4 (IL4pred [11]), интерлейкина-10 (IL10pred [12]), исключали пептиды, лежащие ближе чем на 15 а. к. к известным В-эпитопам. Лиганды для BoLA-I проверяли на иммуногенность (Class I Immunogenicity (IEDB) [13]).

Дополнительно, Т-эпитопы проверяли на взаимодействие с рецепторами с помощью MixMHCpred [14], MHCFlurry [15] (BoLA-I), MixMHCIIpred [16] (BoLA-II). Пептид принимали, если он взаимодействовал хотя бы с одним аллелем по консенсусу всех программ.

Для оптимальных пептидов-лигандов BoLA-I проводили докинг протоколом FlexPepDock-abinitio, который обеспечивает мобильность боковых групп аминокислот рецептора [17]. Сгенерированные структуры кластеризировали (расстояние между кластерами — 2,0 А) при помощи Energy Based Cluster [18, всп. мат. с. 2—4]. Структуры с минимальной энергией сравнивали с экспериментально полученными комплексами (3pwu [19] и 2xfx [20]), оценивая число водородных связей и взаимодействующих аминокислотных остатков, используя ChimeraX [21].

Полиэпитопный белок получали объединением эпитопов в блоки линкерами KK и AAY. Все пептиды располагали, соблюдая их порядок в изначальном белке. Белок проверяли на антигенность (VaxiJen 2.0 [8]), определяли химические, физические свойства, устойчивость *in vivo* (ProtParam), процессинг Т-киллерных эпитопов (pepsickle [22]), токсичность (ToxinPred 2.0 [23]), наличие сигнальных и трансмембранных доменов (DeepTMHMM [24]), гомологию с протеомом *Bos taurus* (PSY-BLAST), растворимость (NetSolP [25], Protein-Sol [26]). Рассчитывали вторичную структуру В-клеточного региона (PSIPRED [27], SOPMA [28], SSpro8 [29]), доступ растворителя к аминокислотам В-эпитопов (ACCpro [29]), неупорядоченные регионы (fldpnn2 [30]). Трехмерную структуру предсказывали с участием AlphaFold2 [31], качество моделей оценивали при помощи SwissModel Structure Assessment [32], обработку осуществляли в GalaxyRefine2 [33].

Ген оптимизировали с исключением сайтов рестрикции для *Nde* I, *Eco* RI, *Hind* III, *Not* I, *Xho* I и добавлением TAA на 3′-конец (GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific)). Праймеры подбирали с использованием PrimerBLAST [34], а их свойства проверяли в OligoAnalyzer™ Tool (IDTDNA). Ген клонировали *in silico* в pET24b между сайтами *Nde* I и *Eco* RI (SnapGene, ApE [35]). мРНК проверяли на образование шпилек (Two State Melting Folding: DINAMelt [36]; RNA 4,0; 37 °C).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего сгенерировали 31 комплекс пептид-BoLA-I, с использованием протокола FlexPepDock-abinitio и объединили их в три группы: 1) Комплексы, которые максимально близки к полученным рентгеноструктурным анализом структурам (рис. 1а—б). Сильное сродство пептида к рецептору предсказано программами NetMHCpan и MHCFlurry (4 комплекса, рис. 1в—е). Общее число взаимодействующих остатков рецептора с пептидом > 9: среди них есть как минимум три консервативных из контрольных структур (Y84, Y99, S/T143, K146, Y159, Y171). Оба конца пептида взаимодействуют с рецептором; 2) Комплексы, которые могут существовать в теории. Общее число связывающихся с пептидом остатков 6—9 (как минимум, 1 остаток соответствует контролям). Оба конца пептида взаимодействуют с рецептором (8 комплексов: 1:00901—TTYVTPISY, 1:02301—RQRTGFTFH, 1:03101—YEIAGRFSL, две конформации 2:01201—TTYVTPISY, 4:02401—TTYVTPISY, 6:01402—NELSANIAL, 6:01402—YEIAGRFSL); 3) Биологически невозможные комплексы: один конец пептида не взаимодействует с рецептором, или общее число взаимодействующих с пептидом остатков меньше 6, или ни один из выбранных консервативных остатков не связывается с пептидом, или пептид располагается за пределами кармана связывания (19 комплексов).

Стабильные комплексы образовали пептиды NELSANIAL, TTYVTPISY, VQYNRDIVI, YEIAGRFSL, RQRTGFTFH, что косвенно указывает на возможность их презентации Т-киллерам. Т-хелперные эпитопы из VP7 не прошли все этапы валидации. Поскольку без них не будет развиваться независимая иммунная реакция его структурные компоненты не включали в сосав полиэпитопного белка. Всего выбрали 15 пептидов разной длины для включения в состав полиэпитопного белка BRV_PolyE (табл. 1).

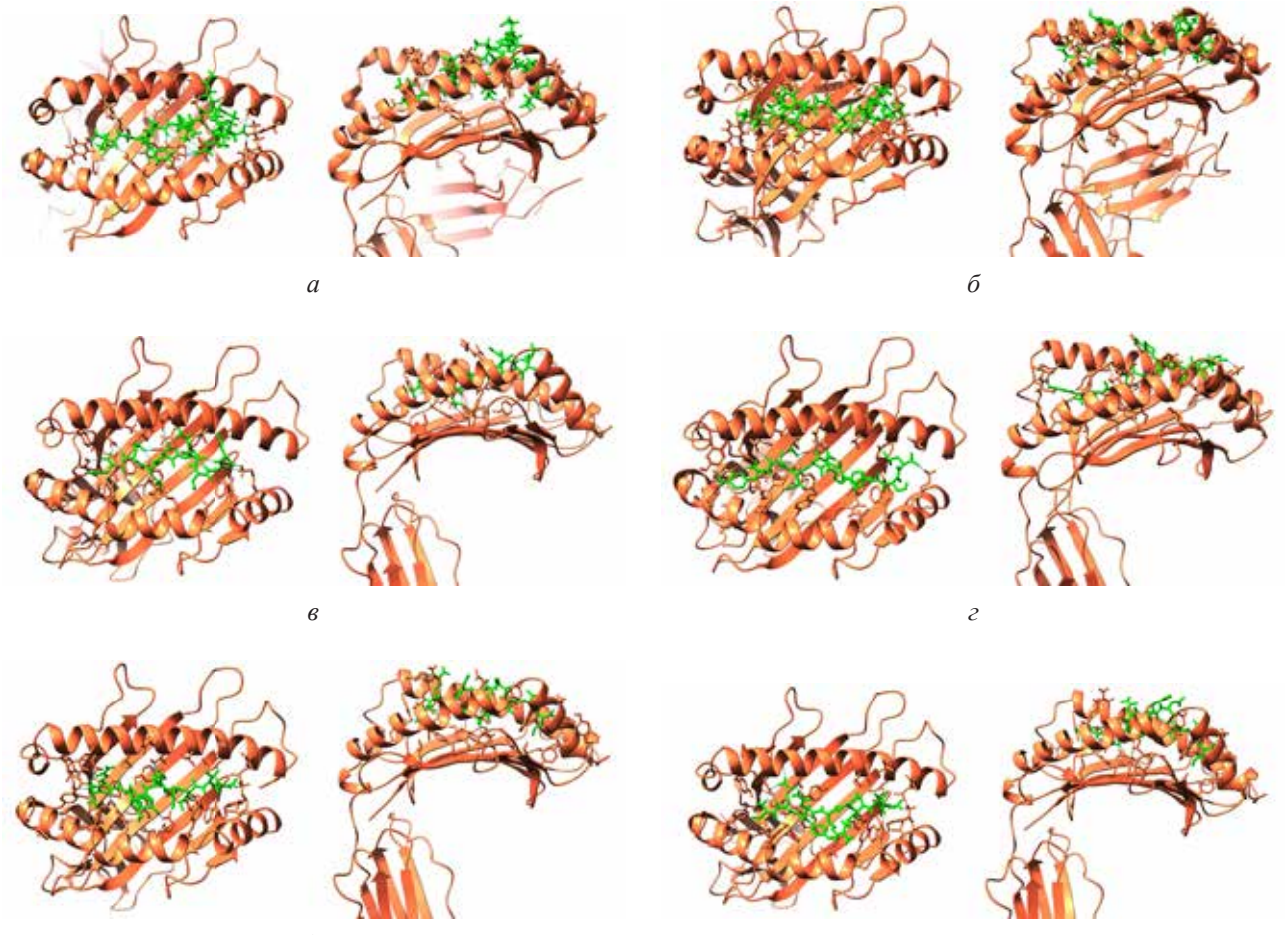


Рис. 1. Модели реальных структур 2xfx (*а*), 3pwu (*б*) и наиболее реалистичных комплексов пептид-BoLA-I, полученные FlexPepDock-abinitio: 1:01901—YEIAGRFSL (*в*), 1:01901—NELSANIAL (*г*), 2:02601—VQYNRDIVI (*д*), 2:02603—VQYNRDIVI (*е*)

Таблица 1

Пептиды B. rotavirus для конструирования полиэпитопного белка

Клетка-мишень	Белок и генотип	Последовательность пептида	Начало, а. к.	Ссылка
Т-хелпер	VP4 P[1]	FTDFVSLNSLRFRFR	415	—
	VP4 P[5]	GTRISNLYGLPAANP	440	—
	VP4 P[11]	AGRFSLISLVPSNDD	464	—
	VP4 P[1], P[5]	IIDFKTLKNLNDNYG	721	—
	VP6	LDANYVETARNTIDY	73	—
	VP6	RPPNMTPAVAALFPN	296	—
Т-киллер	VP4 P[11]	TTYVTPISY	231	—
	VP4 P[11]	VQYNRDIVI	264	—
	VP4 P[1]	YEIAGRFSL	462	—
	VP4 P[11]	NELSANIAL	505	—
	VP6	RQRTGFTFH	145	—
В-клетка	VP4 P[1]	KPANYQYTYTRDGEEVTA	297	[37]
	VP4 P[5]	KAANYQYNYMRDGEEVTA	297	[37]
	VP4 P[11]	KANNYQYTYMRDGVEVVA	296	[37]
	VP6	TGGIGNLPIRNWNFDFG	48	[38]

Полиэпитопный белок обладает оптимальными физико-химическими свойствами для экспрессии в *E. coli* (табл. 2). Расчеты, выполненные Vaxijen 2.0, ToxinPred 2.0, NetSolP и ProteinSol, указывают на то, что BRV_PolyE антигенен, нетоксичен, растворим в воде. Анализ последовательности белка DeepTMHMM показал, что он не содержит сигнальных и трансмембранных участков, влияющих на целостность белка и его локализацию в клетке. Поиск гомологов PSI-BLAST не дал результатов, что снижает вероятность появления аутоиммунной реакции у крупного рогатого скота (КРС) из-за белка.

Для оценки иммуногенности важно знать, будут ли процессироваться входящие в состав белка предсказанные эпитопы для Т-киллеров. Согласно программе pepsickle, большинство пептидов (кроме RQRTGFTFH, рис. 2) для BoLA-I целиком вырезаются протеасомами, что увеличивает шансы получить иммунную реакцию.

Таблица 2

Предсказанные свойства полиэпитопных белков

Размер, а. к.		244
1	2	3
Молекулярная масса, кДа		27 848.65
pI		9.79
ε (коэффициент молярной экстинкции), $M^{-1*}см^{-1}$		39 770

Окончание табл. 2

1	2	3
$T_{1/2}$ (время полураспада белка), ч	E. coli	> 10
	ретикулоциты	30
Индекс нестабильности		20.85
Алифатический индекс		68.11
GRAVY Grand average of hydropathicity (средняя гидропатичность)		–0.603

Рис. 2. Карта процессинга белка BRV_PolyE. Синим текстом обозначены Т-хелперные, зеленым — Т-киллерные, фиолетовым — В-клеточные эпитопы. Стрелками обозначены сайты разрезания протеасомами *in vivo*

Структура большинства В-эпитопов устойчива (рис. 3) и близка к пептидам-гомологам из VP4 родственного вируса Rhesus rotavirus (RRV) (рис. 4), что увеличивает шансы на выработку кросс-реактивных антител к вирусу при иммунизации. Пептид из VP6 отличается по структуре от своего гомолога в целом белке, при этом, он способен индуцировать противовирусные антитела вместе с белком-носителем [37, с. 910]. Эпитопы VP4 (рис. 4а) и VP6 (рис. 4б) идентичны пептидам BRV_PolyE на 72,22 % (VP4 P8), 83,33 % (VP4 P7), 100 % (VP4 P6) и 100 % (VP6).

Для возможности подбора оптимальных праймеров вручную оптимизировали первые и последние 25 а. к. гена с заменой концевых кодонов (табл. 3, рис. 5).

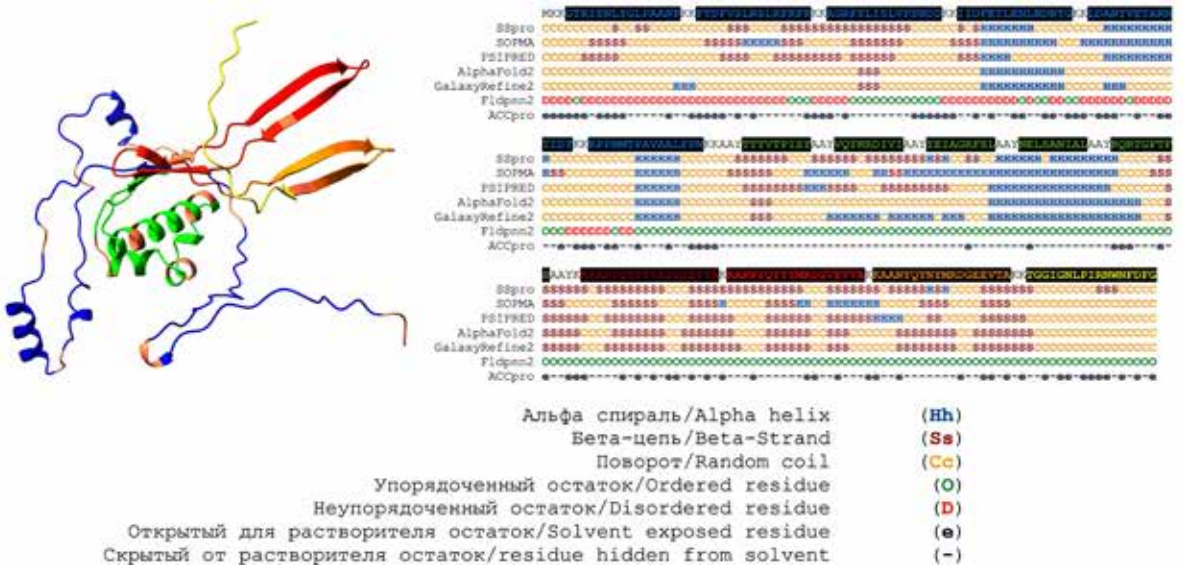


Рис. 3. Пространственная характеристика BRV_PolyE. Синим окрашены эпитопы для Т-хелперов, зеленым — для Т-киллеров, окрашенные в порядке цветов радуги — В-клеточные эпитопы. Слева от описания вторичной структуры названия использованных программ. Расшифровка обозначений вторичной структуры снизу

а *б*

Рис. 4. Гомологи эпитопов VP4 (*а*), VP6 (*б*) RRV (6wxe [39]). Эпитопы окрашены как на рисунке 3

Таблица 3

Позиции BCoV_PolyE, между которыми возможно образование дисульфидных связей при замещении соответствующих аминокислот на цистеины

Вероятное расположение S—S связи	χ_3-угол, °	Энергия связи, ккал/моль
Y11—Q28	**88,89**	**4,39**
G17—K20	**99,66**	**5,95**
N40—Y60	**102,30**	**3,61**
Q47—K54	123,40	7,16

Примечание: оптимальные χ-углы для образования связей имеют значения около –87° или +97°. Энергия связи не должна быть меньше 2,2 ккаль/моль. **Полужирным шрифтом** выделены соответствующие этим требованиям связи.

Клонированный *in silico* в экспрессионный вектор pET24b конструкт содержит собственные сайты терминации без включения 6×His, поскольку предполагается в будущем осуществлять крупномасштабную наработку белков без использования дорогих наборов для элюции.

Для синтеза белка важно, чтобы рибосома связывалась с 5′-концом мРНК, чему стерически препятствуют шпильки. В противоположность вектору без гена (рис. 6а), у кодирующей BRV_PolyE мРНК первые 20 лежащих ниже AUG нуклеотидов свободны в начале синтеза при 37 °C (рис. 6б), что способствует посадке рибосомы. Сайт для связывания рибосомы AAGGAG располагается в составе шпильки, однако, на рисунке 6в видно, что аналогичная ситуация характерна и для мРНК с экспериментально экспрессируемым в векторе pET24b белком α-D-галактозамин-галактозаминидазой (*gal*) [40], что свидетельствует о том, что данная шпилька не мешает экспрессии генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана структура полиэпитопного белка, включающего участки двух реальных антигенов (VP4 и VP6) бычьего ротавируса в составе одной молекулы, которая адаптирована для экспрессии в клетках *E. coli.* Рассчитанные *in silico* свойства белка обеспечивают антигенность, высокую растворимость и стабильность полиэпитопной структуры.

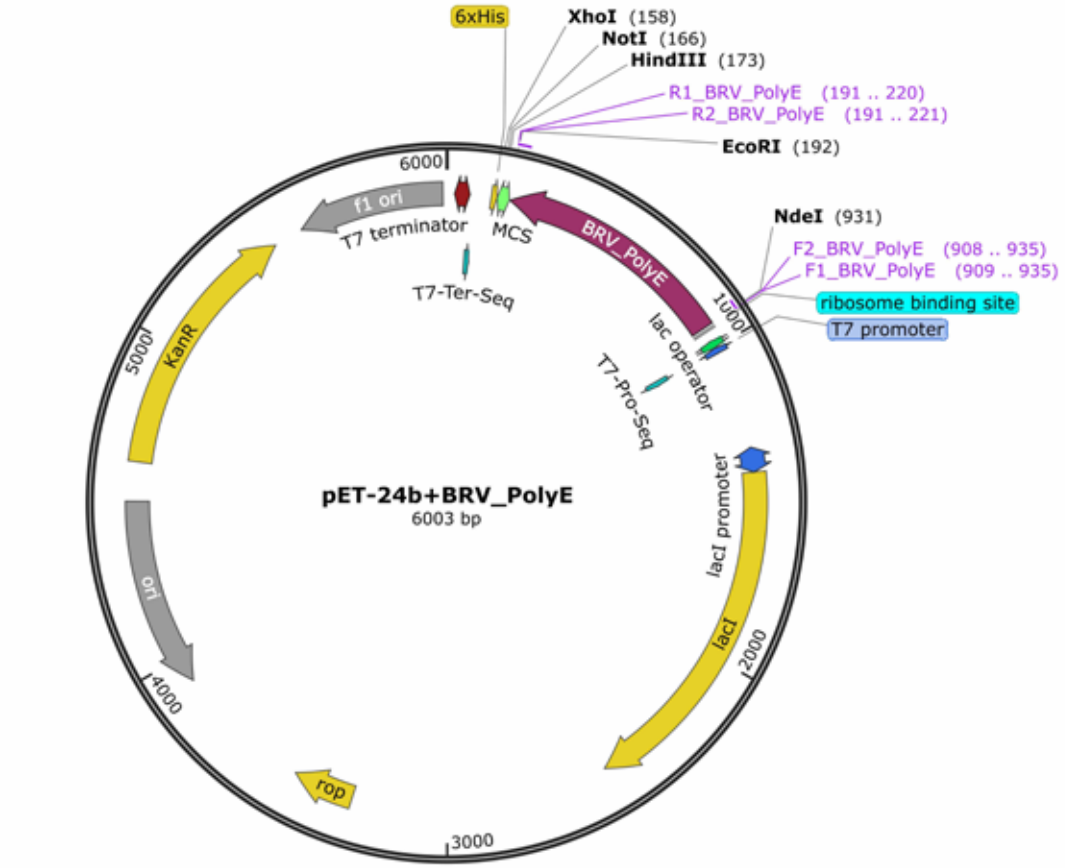
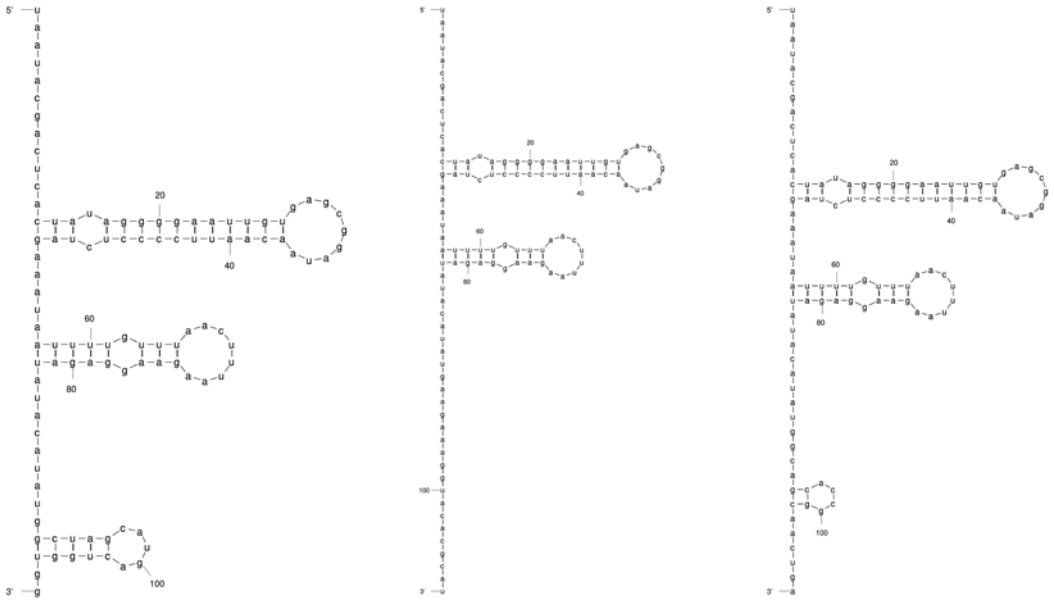


Рис. 5. Вектор pET24b с геном белка BRV_PolyE.
Фиолетовым текстом указаны праймеры и их позиции отжига



а *б* *в*

Рис. 6. Предсказанная структура 5′-конца области мРНК pET24b без вставки (*а*), с геном белка BRV_PolyE (*б*), или с геном gal (*в*)

Благодаря включению протеасомально процессируемых эпитопов для Т-клеток и структурно схожих с вирусными пептидами фрагментов, взаимодействующих с В-клеточными антителами, сконструированный полиэпитопный белок потенциально способен индуцировать компоненты как клеточного, так и гуморального иммунитета, которые важны для эффективной борьбы с вирусами.

Несмотря на все вышеупомянутые выводы, важно отметить, что они получены при помощи биоинформационных расчетов, которые не способны заменить эксперименты *in vitro* или *in vivo* из-за того, что существующие модели не полностью объясняют реальные явления, особенно такую комплексную характеристику как иммуногенность, которая зависит не только от свойств вводимого антигена, но и от состояния реагирующего на него организма.

Разработанная в теории белковая структура готовится к практической реализации путем синтеза соответствующего гена, экспрессируемого в клетках-продуцентах *E. coli* и анализа свойств представленного полиэпитопного белка в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Красочко П. А.* Этиологическая структура вирусов — возбудителей пневмоэнтеритов телят в хозяйствах Республики Беларусь / П. А. Красочко, П. П. Красочко, М. А. Понаськов // Животноводство и Ветеринарная медицина. — 2023. — № 48. — С. 38—41.

2. *Paul P. S.* Immunogens of rotaviruses / P. S. Paul, Y. S. Lyoo // Vet. Microbiol. — 1993. — Vol. 37. — No. 3—4. — P. 299—317. DOI: 10.1128/iai.41.3.1118-1131.1983

3. *Frenchick P.* Immune Responses to Synthetic Peptide Vaccines of Veterinary Importance / P. Frenchick, M. I. Sabara, M. K. Ijaz [et al.] // New Vaccines and Chemotherapy / editors E. Kurstak, R. G. Marusyk, F. A. Murphy [et al.]. — Boston: Springer US, 1988. — Chap. 11. — P. 141—151. — ISBN978—1—4757—9270—6 978—1—4757—9268—3

4. *Saif L. J.* Passive Immunity to Bovine Rotavirus in Newborn Calves Fed Colostrum / L. J. Saif, D. R. Redman, K. L. Smith [et al.] // Infect. Immun. — 1983. — Vol. 41. — No. 3. — P. 1118—1131. DOI: 10.1016/0378-1135(93)90031-2

5. *Maier G. U.* Vaccination for the Prevention of Neonatal Calf Diarrhea in Cow-Calf Operations: A Scoping Review / G. U. Maier, J. Breitenbuecher, J. P. Gomez [et al.] // VAS. — 2022. — Vol. 15. — P. 1—12. DOI: doi.org/10.1016/j.vas.2022.100238

6. *Nilsson J. B.* Accurate prediction of HLA class II antigen presentation across all loci using tailored data acquisition and refined machine learning / J. B. Nilsson, S. Kaabinejadian, H. Yari [et al.] // Sci. Adv. — 2023. — Vol. 9, — No. 47. — P. 1—20. DOI: 10.1126/sciadv.adj6367

7. *Reynisson B.* NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data / B. Reynisson, B. Alvarez, S. Paul [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2020. — Vol. 48. — No. W1. — P. W449—W454. DOI: 10.1093/nar/gkaa379

8. *Doytchinova I. A.* VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines / I. A. Doytchinova, D. R. Flower // BMC Bioinformatics. — 2007. — Vol. 8. — No. 1. — P. 1—7. DOI: 10.1186/1471-2105-8-4

9. *Rathore A. S.* ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides / A. S. Rathore, S. Choudhury, A. Arora [et al.] // Comput. Biol. Med. — 2024. — Vol. 179. — P. 1—13. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2024.108926

10. *Dhanda S. K.* Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders / S. K. Dhanda, P. Vir, G. P. Raghava // Biol. Direct. — 2013. — Vol. 8. — No. 1. — P. 1—15. DOI: 10.1186/1745-6150-8-30

11. *Dhanda S. K.* Prediction of IL4 Inducing Peptides / S. K. Dhanda, S. Gupta, P. Vir [et al.] // J. Immunol. Res. — 2013. — No. 2013. — P. 1—9. DOI: 10.1155/2013/263952

12. *Nagpal G.* Computer-aided designing of immunosuppressive peptides based on IL-10 inducing potential / G. Nagpal, S. S. Usmani, S. K. Dhanda [et al.] // Sci. Rep. — U. — 2017. — Vol. 7. — No. 1. — P. 1—10. DOI: 10.1038/srep42851

13. *Calis J. J. A.* Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity / J. J. A. Calis, M. Maybeno, J. A. Greenbaum [et al.] // PLOS Comput. Biol. —2013. —Vol. 9. — No. 10. — P. 1—13. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003266

14. *Tadros D. M.* Predicting MHC—I ligands across alleles and species: How far can we go? [PrePrint] / D. M. Tadros, J. Racle, D. Gfeller /. — 2024. DOI: 10.1101/2024.05.08.593183

15. *O'Donnell T. J.* MHCflurry 2.0: Improved Pan-Allele Prediction of MHC Class I-Presented Peptides by Incorporating Antigen Processing / T. J. O'Donnell, A. Rubinsteyn, U. Laserson // Cell Syst. — 2020. — Vol. 11. — No. 1. — P. 42—48. DOI: 10.1016/j.cels.2020.06.010

16. *Racle J.* Machine learning predictions of MHC—II specificities reveal alternative binding mode of class II epitopes / J. Racle, P. Guillaume, J. Schmidt [et al.] // Immunity. — 2023. — Vol. 56. — No. 6. — P. 1359—1375. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.03.009

17. *Raveh B.* Rosetta FlexPepDock ab-initio: Simultaneous Folding, Docking and Refinement of Peptides onto Their Receptors / B. Raveh, N. London, L. Zimmerman [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — No. 4. — P. 1—10. DOI: 10.1371/journal.pone.0018934

18. *Hosseinzadeh P.* Comprehensive computational design of ordered peptide macrocycles / P. Hosseinzadeh,

G. Bhardwaj, V. K. Mulligan [et al.] // Science. — 2017. — Vol. 358. — No. 6369. — P. 1461—1466. DOI: 10.1126/science.aap7577

19. *Li X.* Two Distinct Conformations of a Rinderpest Virus Epitope Presented by Bovine Major Histocompatibility Complex Class I N*01801: a Host Strategy To Present Featured Peptides / X. Li, J. Liu, J. Qi [et al.] // J. Virol. — 2011. — Vol. 85. — No. 12. — P. 6038—6048. DOI: 10.1128/JVI.00030-11

20. *Macdonald I. K.* MHC Class I Bound to an Immunodominant *Theileria parva* Epitope Demonstrates Unconventional Presentation to T Cell Receptors / I. K. Macdonald, M. Harkiolaki, L. Hunt [et al.] // PLoS Pathog. 2010. — Vol. 6. — No. 10. — P. 1—11. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001149

21. *Pettersen E. F.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang [et al.] // Protein Sci. — 2021. — Vol. 30. — No. 1. — P. 70—82. DOI: 10.1002/pro.3943

22. *Weeder B. R.* pepsickle rapidly and accurately predicts proteasomal cleavage sites for improved neoantigen identification / B. R. Weeder, M. A. Wood, E. Li [et al.] // Bioinformatics. — 2021. — Vol. 37. — No. 21. — P. 3723—3733. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab628

23. *Sharma N.* ToxinPred2: an improved method for predicting toxicity of proteins / N. Sharma, L. D. Naorem, S. Jain [et al.] // Brief. Bioinform. — 2022. — Vol. 23. — No. 5. — P. 1—12. DOI: 10.1093/bib/bbac174

24. *Hallgren J.* DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks [PrePrint] / J. Hallgren, K. D. Tsirigos, M. D. Pedersen [et al.] // Bioinformatics. — 2022. DOI: 10.1101/2022.04.08.487609

25. *Thumuluri V.* NetSolP: predicting protein solubility in *Escherichia coli* using language models / V. Thumuluri, H. — M. Martiny, J. J. Almagro Armenteros [et al.] // Bioinformatics. — 2022. — Vol. 38. — No. 4. — P. 941—946. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab801

26. *Hebditch M.* Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence / M. Hebditch, M. A. Carballo-Amador, S. Charonis [et al.] // Bioinformatics. — 2017. — Vol. 33. — No. 19. — P. 3098—3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx345

27. *Buchan D. W. A.* Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench / D. W. A. Buchan, F. Minneci, T. C. O. Nugent [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2013. — Vol. 41. — No. W1. — P. W349—W357. DOI: 10.1093/nar/gkt381

28. *Geourjon C.* SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments / C. Geourjon, G. Deléage // Bioinformatics. — 1995. — Vol. 11. — No. 6. — P. 681—684. DOI: 10.1093/bioinformatics/11.6.681

29. *Urban G.* SSpro/ACCpro 6: almost perfect prediction of protein secondary structure and relative solvent accessibility using profiles, deep learning and structural similarity / G. Urban, C. N. Magnan, P. Baldi [et al.] // Bioinformatics. — 2022. — Vol. 38. — No. 7. — P. 2064—2065. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac019

30. *Wang K.* flDPnn2: Accurate and Fast Predictor of Intrinsic Disorder in Proteins / K. Wang, G. Hu, S. Basu [et al.] // J. Mol. Biol. — 2024. — Vol. 436. — No. 17. — P. 1—10. DOI: 10.1016/j.jmb.2024.168605

31. *Jumper J.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [et al.] // Nature. — 2021. — Vol. 596. — No. 7873. — P. 583—589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2

32. *Waterhouse A. M.* The structure assessment web server: for proteins, complexes and more / A. M. Waterhouse, G. Studer, X. Robin [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2024. — Vol. 52. — No. W1. —P. 1—6. DOI: 10.1093/nar/gkae270

33. *Lee G. R.* GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure / G. R. Lee, J. Won, L. Heo [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2019. — Vol. 47. — No. W1. — P. W451—W455. — DOI: 10.1093/nar/gkz288

34. *Ye J.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya [et al.] // BMC Bioinformatics. — 2012. — Vol. 13. — No. 1. — P. 1—11. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134

35. *Davis M. W.* ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program / M. W. Davis, E. M. Jorgensen // Front. Bioinform. — 2022. — Vol. 2. — P. 1—15. DOI: 10.3389/fbinf.2022.818619

36. *Markham N. R.* DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction / N. R. Markham, M. Zuker // Nucleic Acids Res. — 2005. — Vol. 33. — No. Web Server. — P. W577—W581. DOI: 10.1093/nar/gki591

37. *Taniguchi K.* Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus / K. Taniguchi, W. L. Maloy, K. Nishikawa [et al.] // J. Virol. — 1988. — Vol. 62. — No. 7. — P. 2421—2426. DOI: 10.1128/jvi.62.7.2421-2426.1988

38. *Kohli E.* Localization of group-specific epitopes on the major capsid protein of group A rotavirus / E. Kohli, L. Maurice, J. F. Vautherot [et al.] // J. Gen. Virol. — 1992. — Vol. 73. — No. 4. — P. 907—914. DOI: 10.1099/0022-1317-73-4-907

39. *Herrmann T.* Functional refolding of the penetration protein on a non-enveloped virus / T. Herrmann, R. Torres, E. N. Salgado [et al.] // Nature. — 2021. — Vol. 590. — No. 7847. — P. 666—670. DOI: 10.1038/s41586-020-03124-4

40. *Конева О. М.* Синтез α-D- галактозамин-галактозаминидазы бактерий *Flavonifractor plautii* в клетках *Escherichia coli* / О. М. Конева, М. И. Потапович, В. А. Прокулевич // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. — Минск: Беларуская навука, 2024. — ISSN2226—3136. — Т. 16. — С. 76—89.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Я. В. Петруша — аспирант, младший научный сотрудник НИЛ Биотехнологии кафедры Микробиологии биологического факультета;

М. И. Потапович — заведующий НИЛ Биотехнологии кафедры Микробиологии биологического факультета;

В. А. Прокулевич — д. б. н., профессор, главный научный сотрудник НИЛ Биотехнологии кафедры Микробиологии биологического факультета.

Статья поступила в редакцию 20.03.2025.

Original article
UDC 579.62

BIOINFORMATIONAL DESIGN OF AN IMMUNOGENIC PROTEIN CONTAINING BOVINE ROTAVIRUS EPITOPES

Yana Vladimirovna Petrusha✉, Maksim Iosifovich Potapovich, Vladimir Antonovich Prokulevich

Belarusian State University, Minsk, the Republic of Belarus, yana.petrusha@gmail.com✉

Abstract. A polyepitope protein antigen was designed based on conserved epitopes of the VP4 and VP6 proteins of bovine rotaviruses identified *in silico*. The results of computer analysis indicate the efficacy and safety of the recombinant protein antigen. The protein is non-toxic, has optimal physicochemical properties for large-scale production in a bacterial expression system and does not contain regions homologous to the bovine proteome. The T-killer epitopes included in the protein are theoretically capable of being processed by proteasomes, and the antibody epitopes retain a secondary structure close to the original, due to which it is theoretically possible to simultaneously induce the formation of an active immune cellular and humoral (T and B) response.
Keywords: Bovine rotavirus, polyepitope protein, recombinant protein, Bos taurus, reverse vaccinology.
Acknowledgments: to Olga Mikhaylovna Koneva for providing the pET24b vector sequence with the cloned gene encoding α-D-galactosamine-galactosaminidase, to Yuliya Mikhaylovna Kuleshova and Tatyana Vladimirovna Romanovskaya for advice on using the Two State Melting Folding module DINAMelt

INTRODUCTION

Bovine rotavirus (BRV) infections are common in cow herds. In Belarus, antibodies to rotavirus were detected in ~72—92 analyzed samples of calves with pneumoenteritis [1]. The main method of combating rotaviruses is prophylactic or therapeutic vaccination of animals, which requires the design of specific vaccines. Vaccines can contain live viruses as antigens, causing a type I response dependent on cytotoxic T-cells. Killed viruses and purified antigens (subunit vaccines) usually stimulate a reaction dominated by antibodies, causing a type II response. The antigenic structure of the virus is determined by three core proteins (VP1, VP2, and VP3), the middle capsid contains the VP6 protein, and the outer capsid is built of the VP7 and VP4 proteins. The proteins of the outer capsid of the virus play a major role in the occurrence of the infectious process and the immunity development. They are responsible for the implementation of the early stages of interaction of virions with sensitive cells (adsorption and penetration), the virulence of rotaviruses is associated with them. The proteins VP7, VP6 and VP4 cause the formation of specific virus-neutralizing antibodies [2, 3]. They are responsible for the immunogenicity of rotaviruses.

A number of vaccines based on bovine rotavirus are used [4, 5], but nevertheless there is still a need to design new means of preventing and treating diseases caused by rotaviruses. Progress in the field of bioinformatics analysis and the accumulation of large amounts of data make it possible to work *in silico* with viral sequences with unprecedented speed and accuracy. Due to this, it is possible to design a recombinant polyepitopic protein-antigen in a short time to optimize anti-rotavirus protection of cattle, including postnatal calves, which was the objective of this work. Bioinformatic calculations were performed and a polyepitopic structure of a protein molecule was proposed, which included epitopic elements of two main antigenic proteins of bovine rotaviruses.

MATERIAL AND METHODS

The primary structure of the VP4, VP6 and VP7 proteins, candidate BRV antigens, was determined based on the NCBI and UniProt databases. The alignment was performed using the MUSCLE (MEGAX) algorithm. The VP4 and VP7 were classified by genotypes using *tblastn*. Protein consensuses (averaged over all assembled sequence variants) were obtained using Jalview and used to predict the T-cell epitopes.

The B-cell epitopes were searched for by analyzing literature sources associated with experimentally confirmed linear epitopes from proteins of *Rotavirus* A species (IEDB, https://www.iedb.org/), homo-

logues from *Bos taurus* were selected using Epitope Conservancy Analysis (IEDB).

The epitopes for T-helpers (15 aa) and T-killers (9 aa) were predicted using NetMHCIIpan 4.3 [6] and NetMHCIpan 4.1 [7], using the following common Holstein alleles of the BoLA-1 (Bovine Leukocyte Antigen) receptors: *009:01, *019:01, *023:01, *031:01; BoLA-2: *008:01, *012:01, *016:01, *018:01, *018:02, *025:01, *026:01, *026:03; BoLA-3: *002:01, *017:01, *027:02, *036:01, *037:01; BoLA-4: *024:01; BoLA-6: *014:02, *040:01; BoLA-II: *001:01, *007:01, *009:01, *009:02, *010:01, *011:01, *012:01, *014:01, *015:01, *016:01, *018:01, *018:02, *020:01:01, *020:01:02, *020:02, *020:03, *022:01, *022:02, *023:01, *027:01, *027:02, *027:03. For BoLA-II, the possibility of binding peptides in the reverse orientation and the properties of amino acids surrounding the region were taken into account. All peptides were assessed by the number of BoLA alleles interacting with them, the degree of conservation (Epitope Conservancy Analysis, IEDB), the presence of antigenicity (Vaxijen 2.0 [8]), toxicity (Toxinpred 3.0 [9]), the degree of homology with the *Bos taurus* proteome (pBLAST), the presence of post-translational modifications in the peptide or in the nearest regions.

For the B-epitopes, the length, secondary structure in the protein composition, the existence of experimentally produced monoclonal antibodies were checked by analyzing the literary data. BoLA-II ligands were tested for the ability to stimulate the synthesis of interferon-γ (IFN-epitope [10]), interleukin-4 (IL4pred [11]), interleukin-10 (IL10pred [12]), there were excluded peptides located closer than 15 aa to known B-epitopes. The ligands for BoLA-I were tested for immunogenicity (Class I Immunogenicity (IEDB) [13]). Additionally, T-epitopes were tested for interaction with receptors using MixMHCpred [14], MHCFlurry [15] (BoLA-I), MixMHCIIpred [16] (BoLA-II). The A peptide was accepted if it interacted with at least one allele according to the consensus of all programs.

For the optimal BoLA-I ligand peptides, docking has been performed using the FlexPepDock-abinitio protocol, which ensures the mobility of the side groups of the receptor amino acids [17]. The generated structures were clustered (the distance between clusters was 2.0 A) using Energy Based Cluster [18, ref. mat. pp. 2—4]. The structures with the minimum energy were compared with the experimentally obtained complexes (3pwu [19] and 2xfx [20]), assessing the number of hydrogen bonds and interacting amino acid residues using ChimeraX [21].

The polyepitope protein was obtained by combining the epitopes into blocks using KK and AAY linkers. All peptides were arranged in accordance with their order in the original protein. The protein was tested for antigenicity (VaxiJen 2.0 [8]), chemical and physical properties, *in vivo* stability (ProtParam), T-killer epitope processing (pepsickle [22]), toxicity (ToxinPred 2.0 [23]), presence of signaling and transmembrane domains (DeepTMHMM [24]), homology with the *Bos taurus* proteome (PSY-BLAST), solubility (NetSolP [25], Protein-Sol [26]) were determined. The secondary structure of the B-cell region (PSIPRED [27], SOPMA [28], SSpro8 [29]), solvent access to B-epitope amino acids (ACCpro [29]), and disordered regions (fldpnn2 [30]) were calculated. The 3D structure was predicted using AlphaFold2 [31], the quality of the models was assessed using SwissModel Structure Assessment [32], and the processing was performed in GalaxyRefine2 [33].

The gene was optimized by excluding restriction sites for Nde I, Eco RI, Hind III, Not I, Xho I and adding TAA at the 3′ end (GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific)). The primers were designed using PrimerBLAST [34] and their properties were checked in the OligoAnalyzer™ Tool (IDTDNA). The gene was cloned *in silico* into pET24b between the Nde I and Eco RI sites (SnapGene, ApE [35]). mRNA was checked for hairpin formation (Two State Melting Folding: DINAMelt [36]; RNA 4.0; 37 °C).

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

A total of 31 peptide-BoLA-I complexes were generated using the FlexPepDock-abinitio protocol and combined into three groups. 1) Complexes that are maximally similar to the structures obtained by X-ray structural analysis (Fig. 1a—b). Strong affinity of the peptide to the receptor was predicted by the NetMHCpan and MHCFlurry programs (4 complexes, Fig. 1c—e). The total number of residues of the receptor interacting with the peptide is > 9: among them, there are at least three conserved ones from the control structures (Y84, Y99, S/T143, K146, Y159, Y171). Both ends of the peptide interact with the receptor. 2) Complexes that can exist in theory. The total number of residues binding to the peptide is 6—9 (at least 1 residue corresponds to the controls). Both ends of the peptide interact with the receptor (8 complexes: 1:00901—TTYVTPISY, 1:02301—RQRTGFTFH, 1:03101—YEIAGRFSL, two conformations 2:01201—TTYVTPISY, 4:02401—TTYVTPISY, 6:01402—NELSANIAL, 6:01402—YEIAGRFSL). 3) Biologically impossible complexes: one end of the peptide does not interact with the

receptor, or the total number of residues interacting with the peptide is less than 6, or none of the selected conserved residues binds to the peptide, or the peptide is located outside the binding pocket (19 complexes).

Stable complexes have been formed by the peptides NELSANIAL, TTYVTPISY, VQYNRDIVI, YEIAGRFSL, RQRTGFTFH, which indirectly indicates the possibility of their presentation to T-killers. T-helper epitopes from VP7 did not pass all the stages of validation. Since an independent immune response will not develop without them, its structural components were not included in the composition of the polyepitope protein. A total of 15 peptides of different lengths were selected for inclusion in the polyepitope protein BRV_PolyE (Table 1).

The polyepitope protein has optimal physicochemical properties for expression in *E. coli* (Table 2). Calculations performed by Vaxijen 2.0, ToxinPred 2.0, NetSolP and ProteinSol indicate that BRV_PolyE is antigenic, non-toxic and water-soluble. The analysis of the DeepTMHMM protein sequence showed that it does not contain signaling and transmembrane regions that affect the integrity of the protein and its localization in the cell. A PSI-BLAST homologue search has yielded no results, which reduces the likelihood of an autoimmune reaction in cattle due to the protein.

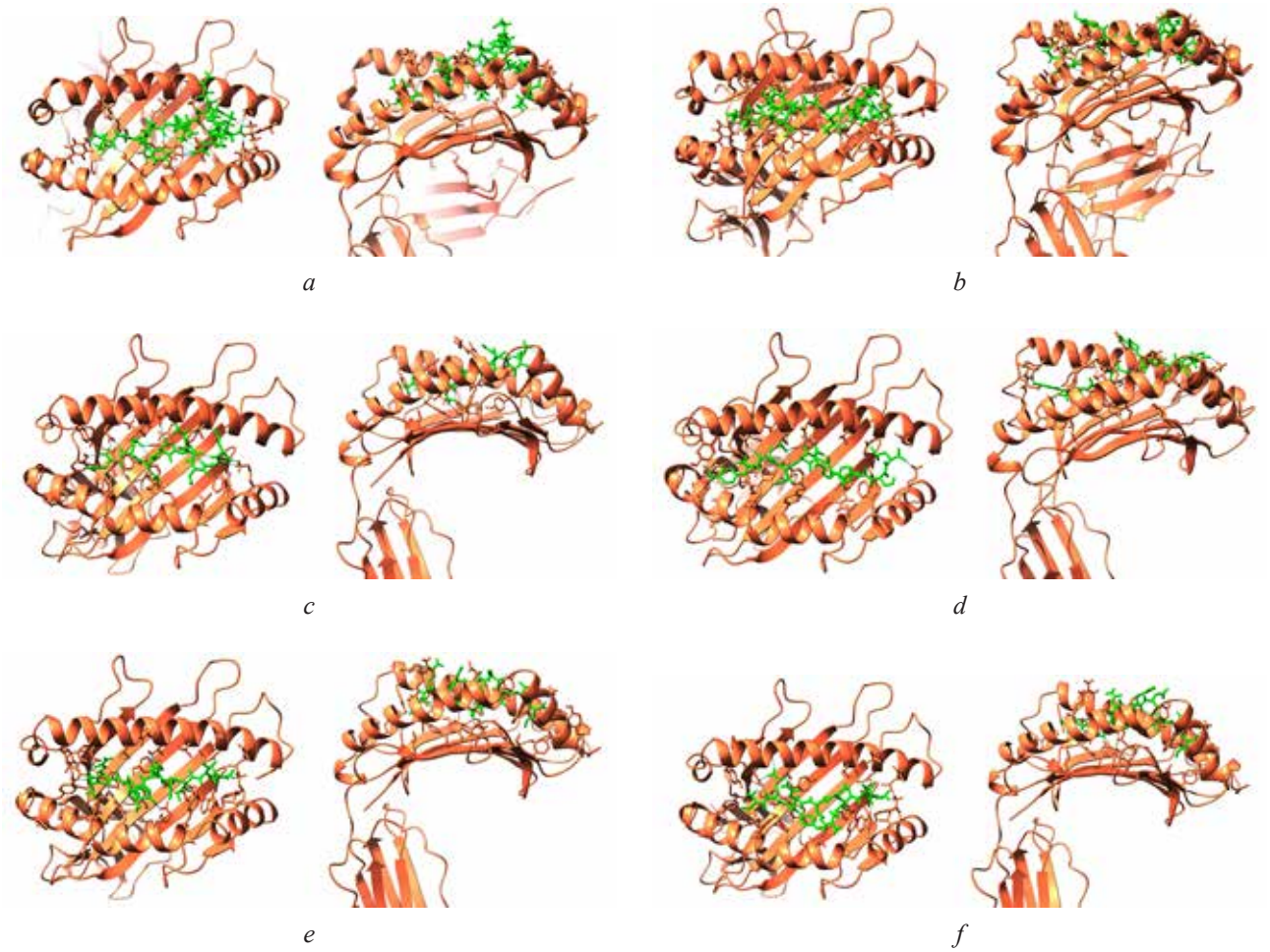


Fig. 1. Models of real structures of 2xfx (*a*), 3pwu (*b*) and the most realistic peptide-BoLA-I complexes obtained by FlexPepDock-abinitio: 1:01901—YEIAGRFSL (*c*), 1:01901—NELSANIAL (*d*), 2:02601—VQYNRDIVI (*e*), 2:02603—VQYNRDIVI (*f*)

To assess immunogenicity, it is important to know whether the predicted T-killer epitopes contained in the protein will be processed. According to the pepsickle program, most peptides (except RQRTGFTFH, Fig. 2) for BoLA-I are completely excised by proteasomes, which increases the chances of obtaining an immune response. The structure of most B-epitopes is stable (Fig. 3) and is close to the peptide homologues from VP4 of the related virus Rhesus rotavirus (RRV) (Fig. 4), which increases the chances of producing cross-reactive antibodies to the virus during immunization. The peptide from VP6 differs in structure from

its homologue in the whole protein, but it is capable of inducing antiviral antibodies together with the carrier protein [37, p. 910].

The epitopes of VP4 (Fig. 4a) and VP6 (Fig. 4b) are identical to the BRV_PolyE peptides by 72.22 % (VP4 P8), 83.33 % (VP4 P7), 100 % (VP4 P6) and 100 % (VP6).

To be able to select optimal primers, the first and last 25 aa of the gene were manually optimized with replacement of terminal codons (Table 3, Fig. 5).

Table 1

B. rotavirus peptides for constructing the polyepitope protein

Target cell	Protein and genotype	Peptide sequence	Beginning, aa	Reference
T-helper	VP4 P[1]	FTDFVSLNSLRFRFR	415	—
	VP4 P[5]	GTRISNLYGLPAANP	440	—
	VP4 P[11]	AGRFSLISLVPSNDD	464	—
	VP4 P[1], P[5]	IIDFKTLKNLNDNYG	721	—
	VP6	LDANYVETARNTIDY	73	—
	VP6	RPPNMTPAVAALFPN	296	—
T-killer	VP4 P[11]	TTYVTPISY	231	—
	VP4 P[11]	VQYNRDIVI	264	—
	VP4 P[1]	YEIAGRFSL	462	—
	VP4 P[11]	NELSANIAL	505	—
	VP6	RQRTGFTFH	145	—
B-cell	VP4 P[1]	KPANYQYTYTRDGEEVTA	297	[37]
	VP4 P[5]	KAANYQYNYMRDGEEVTA	297	[37]
	VP4 P[11]	KANNYQYTYMRDGVEVVA	296	[37]
	VP6	TGGIGNLPIRNWNFDFG	48	[38]

Table 2

Predicted properties of polyepitope proteins

Size, aa		244
Molecular weight, kDa		27 848.65
pI		9.79
ε (molar extinction coefficient), $M^{-1*}cm^{-1}$		39 770
$T_{1/2}$ (protein half-life), h	E. coli	> 10
	reticulocytes	30
Instability index		20.85
Aliphatic index		68.11
GRAVY Grand average of hydropathicity (medium hydropathicity)		–0.603

Fig. 2. BRV_PolyE protein processing map. T-helper epitopes are shown in blue, T-killer epitopes — in green and B-cell epitopes — in purple. Arrows indicate proteasome cleavage sites *in vivo*

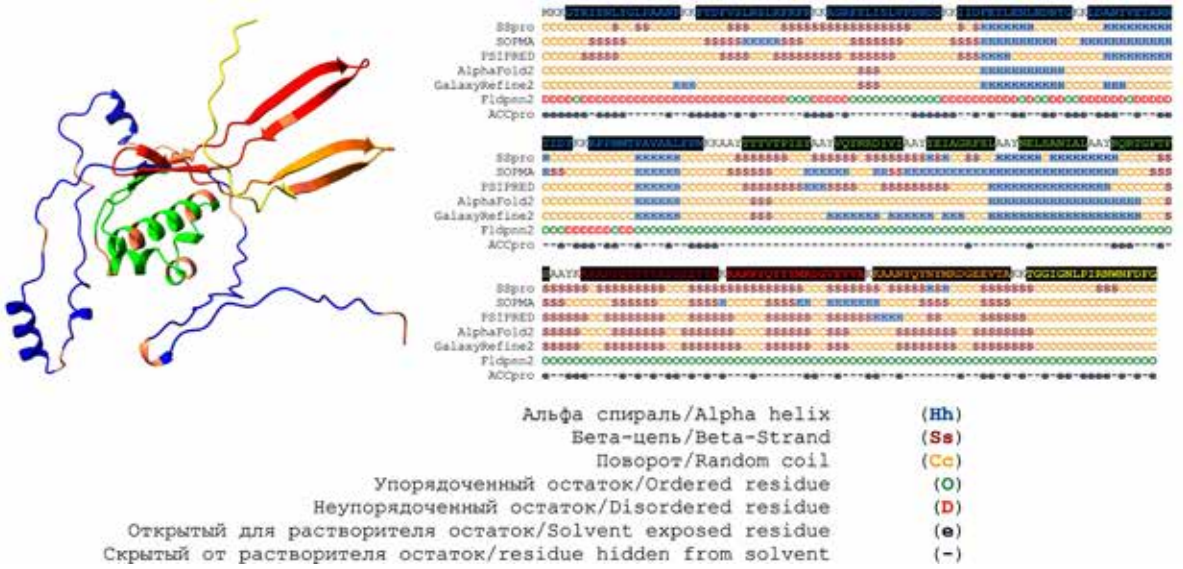
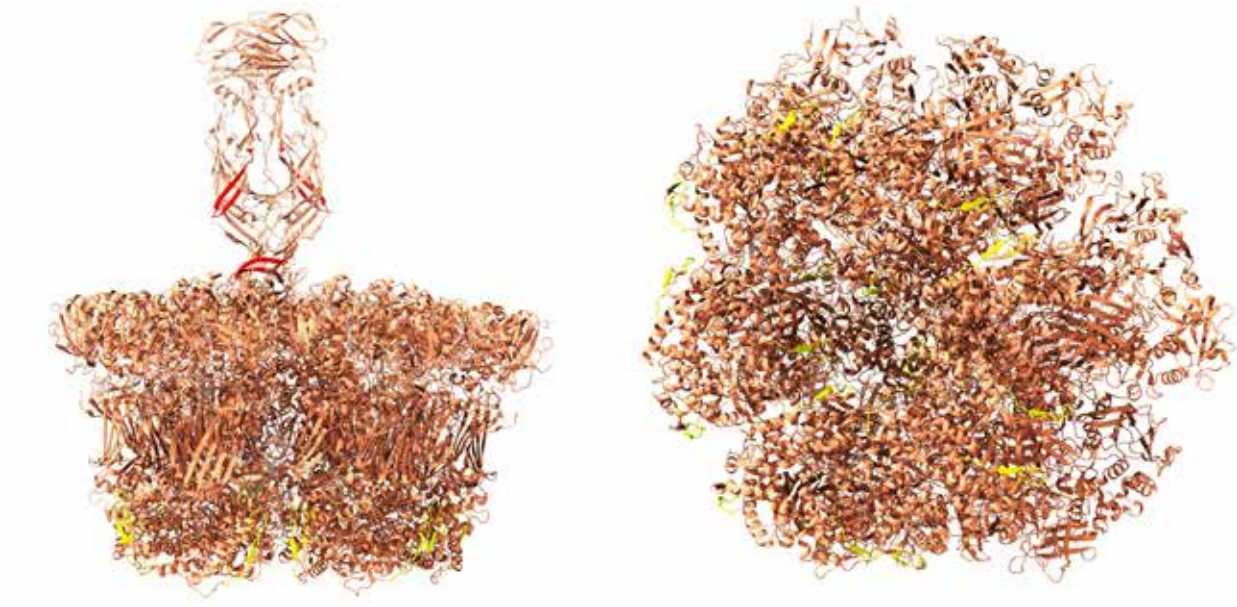


Fig. 3. Spatial characteristics of BRV_PolyE. Epitopes for T-helpers are colored in blue, for T-killers — in green and B-cell epitopes are colored in the order of the rainbow colors. To the left of the secondary structure description are the names of the programs used. Decoding of the secondary structure designations is below



a *b*

Fig. 4. Homologues of VP4 (*a*), VP6 (*b*) epitopes of RRV (6wxe [39]). Epitopes are colored as in Fig. 3

Table 3

Positions of BCoV_PolyE between which disulfide bonds can be formed when the corresponding amino acids are replaced by cysteines

Probable location of the S—S bond	χ3-angle, °	Bond energy, kcal/mol
Y11—Q28	**88.89**	**4.39**
G17—K20	**99.66**	**5.95**
N40—Y60	**102.30**	**3.61**
Q47—K54	123.40	7.16

Note. Optimal χ-angles for bond formation are about –87° or +97°. Bond energy should not be less than 2.2 kcal/mol. Bonds that meet these requirements are highlighted **in bold**.

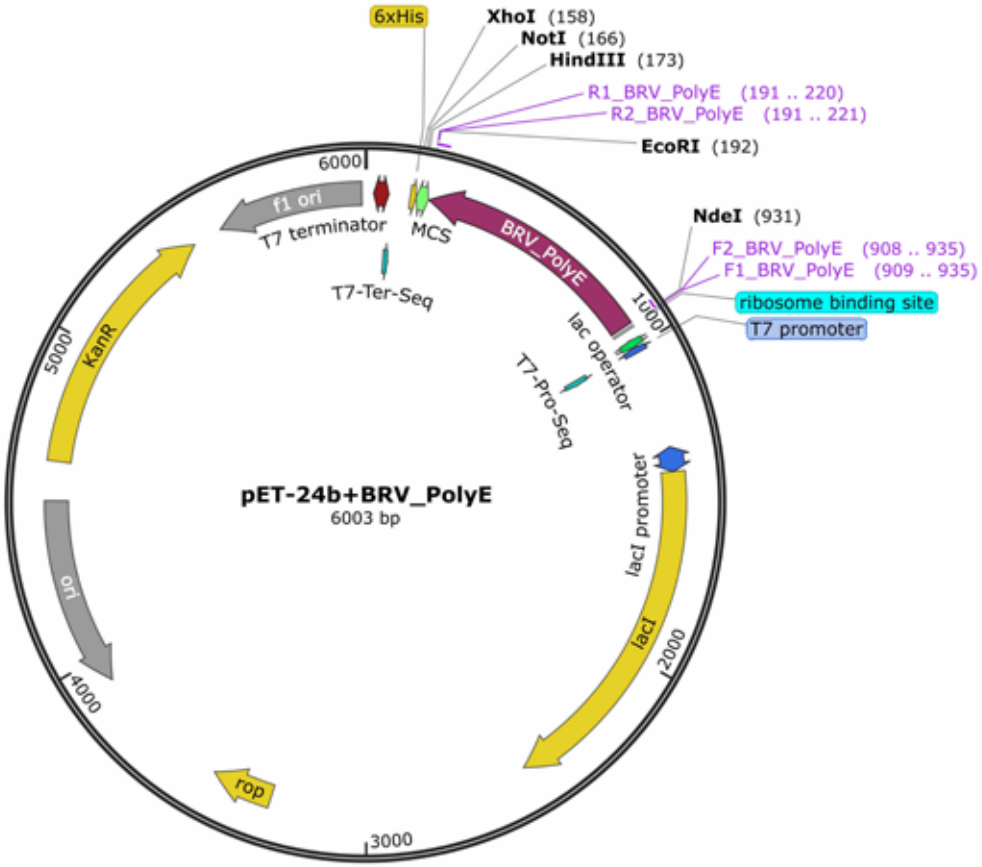
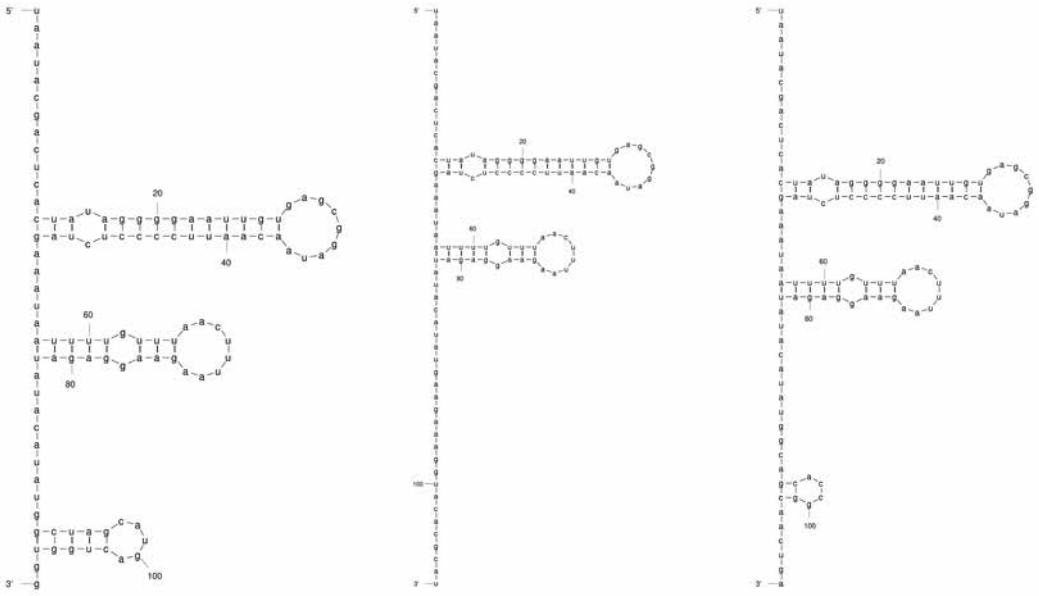


Fig. 5. Vector pET24b with the gene of the BRV_PolyE protein. The purple text indicates the primers and their annealing positions

The construct cloned *in silico* into the pET24b expression vector contains its own termination sites without the inclusion of 6×His, since it is intended to perform large-scale protein production in the future without the use of expensive elution kits.

For protein synthesis, it is important for the ribosome to bind to the 5′ end of the mRNA, which is sterically hindered by hairpins. In contrast to the vector without the gene (Fig. 6a), the first 20 nucleotides downstream of AUG are free in the mRNA encoding

BRV_PolyE at the onset of synthesis at 37 °C (Fig. 6b), which facilitates ribosome landing. The ribosome binding site AAGGAG is located within the hairpin, however, Fig. 6c shows that a similar situation is also characteristic of mRNA with the α-D-galactosamine-galactosaminidase (gal) protein experimentally expressed in the pET24b vector [40], which indicates that this hairpin does not interfere with gene expression.



a *b* *c*

Fig. 6. Predicted structure of the 5′-end region of pET24b mRNA without insertion (*a*), with the BRV_PolyE protein gene (*b*), or with the *gal* gene (*c*)

CONCLUSION

The structure of a polyepitope protein has been designed, which includes regions of two real antigens (VP4 and VP6) of bovine rotavirus in a single molecule, which is adapted for expression in *E. coli* cells. The properties of the protein calculated *in silico* provide antigenicity, high solubility and stability of the polyepitope structure. Due to the inclusion of proteasomally processed epitopes for T-cells and fragments structurally similar to viral peptides that interact with B-cell antibodies, the designed polyepitope protein is potentially capable of inducing components of both cellular and humoral immunity, which are important for effective fight against viruses.

Despite all the above-mentioned conclusions, it is important to note that they were obtained using bioinformatic calculations, which are not able to replace *in vitro* or *in vivo* experiments due to the fact that existing models do not fully explain real phenomena, especially such a complex characteristic as immunogenicity, which depends not only on the properties of the introduced antigen, but also on the state of the organism reacting to it.

The protein structure designed in theory is prepared for practical implementation by synthesizing the corresponding gene expressed in *E. coli* producer cells and analyzing the properties of the presented polyepitopic protein in *in vitro* and *in vivo* experiments.

REFERENCES

1. *Krasochko P. A.* Etiological structure of viruses — causative agents of pneumoenteritis in calves in farms of the Republic of Belarus / P. A. Krasochko, P. P. Krasochko, M. A. Ponaskov // Zhivotnovodstvo i Veterinarnaya meditsina (Animal Husbandry and Veterinary Medicine). — 2023. — No. 48. — P. 38—41.

2. *Paul P. S.* Immunogens of rotaviruses / P. S. Paul, Y. S. Lyoo // Vet. Microbiol. — 1993. — Vol. 37. — No. 3—4. — P. 299—317. DOI: 10.1128/iai.41.3.1118-1131.1983

3. *Frenchick P.* Immune Responses to Synthetic Peptide Vaccines of Veterinary Importance / P. Frenchick, M. I. Sabara, M. K. Ijaz [et al.] // New Vaccines and Chemotherapy / editors E. Kurstak, R. G. Marusyk, F. A. Murphy [et al.]. — Boston: Springer US, 1988. — Chap. 11. — P. 141—151. — ISBN978-1-4757-9270-6 978-1-4757-9268-3

4. *Saif L. J.* Passive Immunity to Bovine Rotavirus in Newborn Calves Fed Colostrum / L. J. Saif, D. R. Redman, K. L. Smith [et al.] // Infect. Immun. — 1983. — Vol. 41. — No. 3. — P. 1118—1131. DOI: 10.1016/0378-1135(93)90031-2

5. *Maier G. U.* Vaccination for the Prevention of Neonatal Calf Diarrhea in Cow-Calf Operations: A Scoping Review / G. U. Maier, J. Breitenbuecher, J. P. Gomez [et al.] // VAS. — 2022. — Vol. 15. — P. 1—12. DOI: doi.org/10.1016/j.vas.2022.100238

6. *Nilsson J. B.* Accurate prediction of HLA class II antigen presentation across all loci using tailored data acquisition and refined machine learning / J. B. Nilsson, S. Kaabinejadian, H. Yari [et al.] // Sci. Adv. — 2023. — Vol. 9, — No. 47. — P. 1—20. DOI: 10.1126/sciadv.adj6367

7. *Reynisson B.* NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data / B. Reynisson, B. Alvarez, S. Paul [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2020. — Vol. 48. — No. W1. — P. W449—W454. DOI: 10.1093/nar/gkaa379

8. *Doytchinova I. A.* VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines / I. A. Doytchinova, D. R. Flower // BMC Bioinformatics. — 2007. — Vol. 8. — No. 1. — P. 1—7. DOI: 10.1186/1471-2105-8-4

9. *Rathore A. S.* ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides / A. S. Rathore, S. Choudhury, A. Arora [et al.] // Comput. Biol. Med. — 2024. — Vol. 179. — P. 1—13. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2024.108926

10. *Dhanda S. K.* Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders / S. K. Dhanda, P. Vir, G. P. Raghava // Biol. Direct. — 2013. — Vol. 8. — No. 1. — P. 1—15. DOI: 10.1186/1745-6150-8-30

11. *Dhanda S. K.* Prediction of IL4 Inducing Peptides / S. K. Dhanda, S. Gupta, P. Vir [et al.] // J. Immunol. Res. — 2013. — No. 2013. — P. 1—9. DOI: 10.1155/2013/263952

12. *Nagpal G.* Computer-aided designing of immunosuppressive peptides based on IL-10 inducing potential / G. Nagpal, S. S. Usmani, S. K. Dhanda [et al.] // Sci. Rep. — U. — 2017. — Vol. 7. — No. 1. — P. 1—10. DOI: 10.1038/srep42851

13. *Calis J. J. A.* Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity / J. J. A. Calis, M. Maybeno, J. A. Greenbaum [et al.] // PLOS Comput. Biol. —2013. —Vol. 9. — No. 10. — P. 1—13. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003266

14. *Tadros D. M.* Predicting MHC—I ligands across alleles and species: How far can we go? [PrePrint] / D. M. Tadros, J. Racle, D. Gfeller /. — 2024. DOI: 10.1101/2024.05.08.593183

15. *O'Donnell T. J.* MHCflurry 2.0: Improved Pan-Allele Prediction of MHC Class I-Presented Peptides by Incorporating Antigen Processing / T. J. O'Donnell, A. Rubinsteyn, U. Laserson // Cell Syst. — 2020. — Vol. 11. — No. 1. — P. 42—48. DOI: 10.1016/j.cels.2020.06.010

16. *Racle J.* Machine learning predictions of MHC—II specificities reveal alternative binding mode of class II epitopes / J. Racle, P. Guillaume, J. Schmidt [et al.] // Immunity. — 2023. — Vol. 56. — No. 6. — P. 1359—1375. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.03.009

17. *Raveh B.* Rosetta FlexPepDock ab-initio: Simultaneous Folding, Docking and Refinement of Peptides onto Their Receptors / B. Raveh, N. London, L. Zimmerman [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — No. 4. — P. 1—10. DOI: 10.1371/journal.pone.0018934

18. *Hosseinzadeh P.* Comprehensive computational design of ordered peptide macrocycles / P. Hosseinzadeh, G. Bhardwaj, V. K. Mulligan [et al.] // Science. — 2017. — Vol. 358. — No. 6369. — P. 1461—1466. DOI: 10.1126/science.aap7577

19. *Li X.* Two Distinct Conformations of a Rinderpest Virus Epitope Presented by Bovine Major Histocompatibility Complex Class I N*01801: a Host Strategy To Present Featured Peptides / X. Li, J. Liu, J. Qi [et al.] // J. Virol. — 2011. — Vol. 85. — No. 12. — P. 6038—6048. DOI: 10.1128/JVI.00030-11

20. *Macdonald I. K.* MHC Class I Bound to an Immunodominant *Theileria parva* Epitope Demonstrates Unconventional Presentation to T Cell Receptors / I. K. Macdonald, M. Harkiolaki, L. Hunt [et al.] // PLoS Pathog. 2010. — Vol. 6. — No. 10. — P. 1—11. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001149

21. *Pettersen E. F.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang [et al.] // Protein Sci. — 2021. — Vol. 30. — No. 1. — P. 70—82. DOI: 10.1002/pro.3943

22. *Weeder B. R.* pepsickle rapidly and accurately predicts proteasomal cleavage sites for improved neoantigen identification / B. R. Weeder, M. A. Wood, E. Li [et al.] // Bioinformatics. — 2021. — Vol. 37. — No. 21. — P. 3723—3733. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab628

23. *Sharma N.* ToxinPred2: an improved method for predicting toxicity of proteins / N. Sharma, L. D. Naorem, S. Jain [et al.] // Brief. Bioinform. — 2022. — Vol. 23. — No. 5. — P. 1—12. DOI: 10.1093/bib/bbac174

24. *Hallgren J.* DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks [PrePrint] / J. Hallgren, K. D. Tsirigos, M. D. Pedersen [et al.] // Bioinformatics. — 2022. DOI: 10.1101/2022.04.08.487609

25. *Thumuluri V.* NetSolP: predicting protein solubility in *Escherichia coli* using language models / V. Thumuluri, H. — M. Martiny, J. J. Almagro Armenteros [et al.] // Bioinformatics. — 2022. — Vol. 38. — No. 4. — P. 941—946. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab801

26. *Hebditch M.* Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence / M. Hebditch, M. A. Carballo-Amador, S. Charonis [et al.] // Bioinformatics. — 2017. — Vol. 33. — No. 19. — P. 3098—3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx345

27. *Buchan D. W. A.* Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench / D. W. A. Buchan, F. Minneci, T. C. O. Nugent [et al.] // Nucleic Acids Res. —

2013. — Vol. 41. — No. W1. — P. W349—W357. DOI: 10.1093/nar/gkt381

28. *Geourjon C.* SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments / C. Geourjon, G. Deléage // Bioinformatics. — 1995. — Vol. 11. — No. 6. — P. 681—684. DOI: 10.1093/bioinformatics/11.6.681

29. *Urban G.* SSpro/ACCpro 6: almost perfect prediction of protein secondary structure and relative solvent accessibility using profiles, deep learning and structural similarity / G. Urban, C. N. Magnan, P. Baldi [et al.] // Bioinformatics. — 2022. — Vol. 38. — No. 7. — P. 2064—2065. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac019

30. *Wang K.* flDPnn2: Accurate and Fast Predictor of Intrinsic Disorder in Proteins / K. Wang, G. Hu, S. Basu [et al.] // J. Mol. Biol. — 2024. — Vol. 436. — No. 17. — P. 1—10. DOI: 10.1016/j.jmb.2024.168605

31. *Jumper J.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [et al.] // Nature. — 2021. — Vol. 596. — No. 7873. — P. 583—589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2

32. *Waterhouse A. M.* The structure assessment web server: for proteins, complexes and more / A. M. Waterhouse, G. Studer, X. Robin [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2024. — Vol. 52. — No. W1. —P. 1—6. DOI: 10.1093/nar/gkae270

33. *Lee G. R.* GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure / G. R. Lee, J. Won, L. Heo [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2019. — Vol. 47. — No. W1. — P. W451—W455. — DOI: 10.1093/nar/gkz288

34. *Ye J.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya [et al.] // BMC Bioinformatics. — 2012. — Vol. 13. — No. 1. — P. 1—11. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134

35. *Davis M. W.* ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program / M. W. Davis, E. M. Jorgensen // Front. Bioinform. — 2022. — Vol. 2. — P. 1—15. DOI: 10.3389/fbinf.2022.818619

36. *Markham N. R.* DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction / N. R. Markham, M. Zuker // Nucleic Acids Res. — 2005. — Vol. 33. — No. Web Server. — P. W577—W581. DOI: 10.1093/nar/gki591

37. *Taniguchi K.* Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus / K. Taniguchi, W. L. Maloy, K. Nishikawa [et al.] // J. Virol. — 1988. — Vol. 62. — No. 7. — P. 2421—2426. DOI: 10.1128/jvi.62.7.2421-2426.1988

38. *Kohli E.* Localization of group-specific epitopes on the major capsid protein of group A rotavirus / E. Kohli, L. Maurice, J. F. Vautherot [et al.] // J. Gen. Virol. — 1992. — Vol. 73. — No. 4. — P. 907—914. DOI: 10.1099/0022-1317-73-4-907

39. *Herrmann T.* Functional refolding of the penetration protein on a non-enveloped virus / T. Herrmann, R. Torres, E. N. Salgado [et al.] // Nature. — 2021. — Vol. 590. — No. 7847. — P. 666—670. DOI: 10.1038/s41586-020-03124-4

40. *Koneva O. M.* Synthesis of α-D-galactosamine-galactosaminidase of *Flavonifractor plautii* bacteria in *Escherichia coli* cells / O. M. Koneva, M. I. Potapovich, V. A. Prokulevich // Mikrobnye biotekhnologii: fundamentalnye i prikladnye aspekty (Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects). — Minsk: Belarusian Science, 2024. — ISSN2226—3136. — Vol. 16. — P. 76—89.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ya. V. Petrusha — Postgraduate Student, Junior Scientific Associate of the Research Laboratory of Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Biology;

M. I. Potapovich — Head of the Research Laboratory of Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Biology;

V. A. Prokulevich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Scientific Associate of the Research Laboratory of Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Biology.

The article was submitted 20.03.2025.

Научная статья
УДК 617.7: 615.015.5

ФАРМАКОКИНЕТИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ОФТАЛЬМИКА® КАПЛИ ГЛАЗНЫЕ

Сергей Владимирович Енгашев[*], Екатерина Сергеевна Енгашева[*, **], Александр Анатольевич Комаров[*✉], Алексей Германович Шилкин[****], Мария Александровна Войтеха[****], Ульяна Эдуардовна Мочалова[****], Елизавета Николаевна Гончарова[*****]**

[*]Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина, Москва, Россия
[**]ВНИИВСГЭ — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия
[***]Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Россия, akomarov1965@gmail.com✉
[****]Ветеринарная клиника «Центр ветеринарной офтальмологии доктора Шилкина А. Г.», Москва, Россия
[*****]МИП «Академия инноваций», Москва, Россия

Аннотация. Проведено исследование по изучению фармакокинетики действующего вещества лекарственного препарата ОФТАЛЬМИКА® капли глазные после применения кроликам. Лекарственный препарат ОФТАЛЬМИКА® капли глазные (Ophthalmica eye drops), разработанный ООО «НВЦ Агроветзащита» (Россия), содержит в 1 мл гатифлоксацина сесквигидрата — 5 мг, а также вспомогательные вещества. Методология исследования заключалась в применении препарата животным с последующим отбором биологических образцов в заданные сроки, их анализе на содержание действующего вещества препарата ОФТАЛЬМИКА® капли глазные и оценке полученных значений. Для целей определения гатифлоксацина в частях глаза был выбран метод ВЭЖХ—МС/МС, ввиду его универсальности, селективности и чувствительности. Действующее вещество препарата ОФТАЛЬМИКА® капли глазные проникает в роговицу глаза, конъюнктиву, в корень радужки и внутриглазную жидкость кроликов и содержится в этих тканях в течение 8 часов. Максимальное содержание гатифлоксацина наступает через час после применения для конъюнктивы, роговицы и внутриглазной жидкости. Наибольшая концентрация гатифлоксацина была обнаружена в роговице глаза и составила 3428 нг/г. Наиболее низкие концентрации гатифлоксацина были обнаружены во внутриглазной жидкости — 358 нг/г через 1 ч после применения препарата и снизились до 27 нг/г по истечению 8 ч после применения препарата. При наружном применении препарат не всасывается в системный кровоток, оказывает местное антимикробное действие и сохраняет терапевтическую эффективность в течение 8 часов.

Ключевые слова: лекарственный препарат ОФТАЛЬМИКА® капли глазные, гатифлоксацин, фармакокинетика, глазные болезни, кошки, собаки

Перечень сокращений и обозначений

ДВ — действующее вещество

ВЭЖХ—МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием;

MIC — минимальная ингибирующая концентрация.

Вопросы рациональной фармакотерапии офтальмологических заболеваний до настоящего времени остаются одной из актуальных ветеринарно-биологических проблем. Это обусловлено тем, что воспалительные заболевания — самые распространенные офтальмологические патологии [4, 7, 9].

Одним из важнейших критериев в оценке эффективности антибактериального препарата при инфекционно-воспалительных заболеваниях глаз является его концентрация в конъюнктиве и роговице при конъюнктивитах, кератитах, язвах и эрозиях роговицы, а также проникновение действу-

ющего вещества во влагу передней камеры глаза и в радужную оболочку при иридоциклитах и увеитах [7].

В гуманной офтальмологии несколько лет назад появился новый офтальмоантибиотик — гатифлоксацин. Он обладает значительно большей клинической эффективностью при лечении глазных инфекций у человека по сравнению с другими фторхинолонами [3, 6, 8].

Лекарственный препарат ОФТАЛЬМИКА® капли глазные (Ophthalmica eye drops), разработанный ООО «НВЦ Агроветзащита» (Россия), содержит в 1 мл гатифлоксацина сесквигидрата — 5 мг, а также вспомогательные вещества. Назначается собакам и кошкам для лечения и профилактики бактериальных, хламидийных, микоплазменных офтальмологических заболеваний, при попадании инородных тел, при операциях на глазном яблоке и веках в предоперационном и послеоперационном периоде, в комплексном лечении герпесвируса и офтальмохламидиоза у кошек и синдрома сухого глаза у собак, а также при отсутствии эффекта при лечении другими антимикробными препаратами.

Гатифлоксацин, относящийся к фторхинолонам IV поколения, обладает широким спектром антибактериальной активности, эффективен против большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий, атипичных микроорганизмов и некоторых анаэробов, в том числе хламидий и микоплазм. Механизм действия гатифлоксацина заключается в ингибировании топоизомеразы II (ДНК-гиразы) и топоизомеразы IV бактерий [5]. В ветеринарной офтальмологии сведения об экстра- и интраокулярной фармакокинетики гатифлоксацина крайне скудны. Низкая изученность проблемы послужила поводом для проведения широких исследований в глазном применении гатифлоксацина у домашних животных.

В настоящее время препарат не имеет аналогов на Российском ветеринарном рынке и представляет значительный интерес для широкого круга ветеринарных врачей практикующих лечение глазных инфекций у животных.

Цель исследования: оценить фармакокинетику гатифлоксацина, входящего в состав лекарственного препарата для ветеринарного применения ОФТАЛЬМИКА® капли глазные после применения кроликам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования выполнялись согласно Приказу Министерства сельского хозяйства РФ от 6 марта 2018 г. N101 «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения». Также в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS123), Strasbourg, 1986).

Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами.

Исследования проводились на базе ООО «МИП «Академия инноваций (г. Москва) и Центра содержания животных ООО «СВС-Н» (г. Сергиев Посад). Опыт проведен с участием 10 кроликов. Сведения об экспериментальных животных указаны в таблице 1.

Препарат закапывали по 1 капле в конъюнктивальный мешок однократно. Схема исследования, режим дозирования и отбора проб представлены в таблице 2.

Пробы конъюнктивы, роговицы, внутриглазной жидкости и корня радужки глаз кроликов отбирали с помощью микрохирургического инструментария (рис. 1, 2).

Таблица 1

Сведения об экспериментальных животных

	Вид исследования
	Изучение фармакокинетики д. в. препарата
1	2
Целевой вид	кролики
Пол	♂♀

Окончание табл. 1

1	2
Порода	Шиншилла
Возраст	2 г
Масса*	5,6—6,2 кг
Количество	10

* Масса всех животных находилась в пределах заданного диапазона, при этом группы сформированы таким образом, чтобы отклонение индивидуальных масс тела от среднего в группе не превышало 20 %.

Таблица 2

Схема исследования и режим дозирования

Контрольная точка	Проводимые манипуляции
До применения препарата	Взятие контрольных проб роговицы, внутриглазной жидкости, конъюнктивы, корня радужки глаз у 1 кролика (контрольное животное)
Индивидуальное применение препарата	Индивидуальное нанесение препарата опытной группе (9 животных) закапывание по 1 капле в конъюнктивальный мешок
через 1 ч после применения препарата	Взятие проб роговицы, внутриглазной жидкости, конъюнктивы, корня радужки глаз у 3 животных (по 2 образца от одного животного)
через 4 ч после применения препарата	Взятие проб роговицы, внутриглазной жидкости, конъюнктивы, корня радужки глаз у 3 животных (по 2 образца от одного животного)
через 8 ч после применения препарата	Взятие проб роговицы, внутриглазной жидкости, конъюнктивы, корня радужки глаз у 3 животных (по 2 образца от одного животного)

Рис. 1. Отбор проб конъюнктивы у кролика

Рис. 2. Отбор проб роговицы: выкраивание роговичного лоскута

Отбор проводили в индивидуальные пронумерованные и заранее взвешенные полипропиленовые пробирки с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл. Все образцы были переданы в лабораторию в замороженном виде. Для целей определения гатифлоксацина в частях глаза был выбран метод ВЭЖХ—МС, ввиду его универсальности, селективности и чувствительности.

Для анализа использовали стандартный образец гатифлоксацина и гатифлоксацина-Д4 в качестве внутреннего стандартного образца. Пробоподготовка рабочих образцов частей глаза кроликов включала в себя экстракцию 1М соляной кислотой, очистку с помощью твердо-фазной экстрации с использованием сорбента С18. Влияние извлечения и матричного эффекта были незначительны, поэтому в качестве градуировочных образцов использовали растворы стандартных образцов.

В процессе исследования контролировали следующие параметры: концентрация ДВ препарата ОФТАЛЬМИКА® капли глазные (гатифлоксацин) в роговице, внутриглазной жидкости, конъюнктиве, корне радужки глаз животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Градуировочные кривые всех аналитических циклов и холостые пробы соответствовали критериям приемлемости. По результатам оценки образцов контроля качества все серии признаны соответствующими критериям.

После применения лекарственного препарата кроликам гатифлоксацин уже через час проникает во все исследуемые экстраокулярные части глаза: в конъюнктиву, роговицу.

Гатифлоксацин также хорошо всасывается внутрь глаза и обнаруживается во влаге передней камеры и корне радужки. Средние значения концентрации гатифлоксацина в тканях глаза представлены на рисунке 3.

Через час после применения гатифлоксацина наибольшая концентрация наблюдалась с в роговице (C_{max} 3428 ± 1108 нг/г) и далее через 8 часов после применения снижалась до 501 ± 67 нг/г. В конъюнктиве пики концентрации обычно фиксируются в первые минуты и затем постепенно медленно начинают снижаться [10] и в нашем исследовании максимальное содержание гатифлоксацина (C_{max} = 1903 ± 892 нг/г) наблюдалось через час после применения и уменьшалось до 389 ± 423 нг/г через 8 часов после применения. Во внутриглазной жидкости T_{max} также составил 1 час, при этом C_{max} составила 358 ± 156 нг/г. В корне радужки максимальные концентрации (C_{max} = 895 ± 559 нг/г) гатифлоксацина наблюдаются через 4 часа после применения препарата.

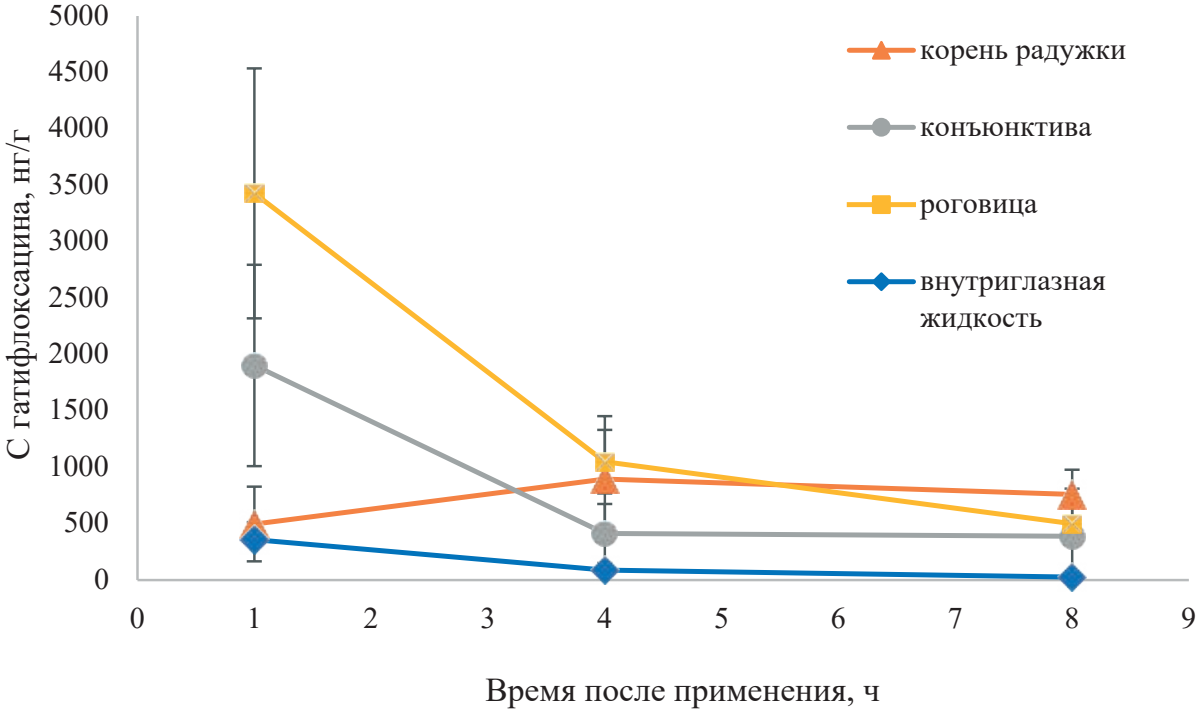


Рис. 3. Средние значения концентрации гатифлоксацина в тканях глаза. Каждая точка представляет среднюю концентрацию и стандартное отклонение

Обнаружение гатифлоксацина в интраокулярных структурах даже при однократном закапывании — важный фактор. Препарат ОФТАЛЬМИКА® капли глазные можно применять при лечении увеитов и иридоциклитов бактериального генеза у животных, а также использовать для профилактики инфекций на внутриглазных операциях типа факоэмульсификации катаракты, антиглаукоматозных вмешательствах, оптико-реконструктивной хирургии при проникающих травмах глаза.

Сведения о минимальных ингибирующих концентрациях (MIC) гатифлоксацина для разных возбудителей приведены в таблице 3. [10] Из полученных результатов видно, что даже при однократном применении гатифлоксацина достигаются концентрации в коньюнктиве, роговице, в корне радужки и внутриглазной жидкости превышающие MIC. Учитывая, что инструкцией по применению предусмотрено курсовое введение препарата (минимум 7 дней), это обеспечит его эффективность против указанных возбудителей инфекций. Полученные результаты согласуются с литературными данными [3, 5, 6, 10].

При таких концентрациях гатифлоксацин проявляет бактериальную и бактерицидную активности, но при этом не вызывает антибиотикорезистентность бактерий к действующему веществу препарата.

Гатифлоксацин имеет длительное воздействие на патогенные возбудители глазных инфекций. Даже через 8 часов после закапывания гатифлоксацин сохраняет свою подавляющую концентрацию против микроогранизмов во всех основных тканях глаза.

Таблица 3

Минимальные ингибирующие концентрации гатифлоксацина для возбудителей инфекций

Вид	Диапазон MIC, мкг/мл	MIC_{90}, мкг/мл	Ссылка
Staphylococcus aureus	0,05—0,20	0,1	5
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus	0,05—0,20	0,2	5
Staphylococcus epidermidis	0,05—0,39	0,2	5
Staphylococcus haemolyticus	0,01—6,25	3,13	5
Staphylococcus pneumoniae	0,20—0,39	0,39	5
Escherichia coli	0,0125—0,05	0,05	5
Pseudomonas aeruginosa	0,78—12,5	3,13	5
Haemophilus influenza	—	0,016	6
M. smegmatis	—	0,03	7
M. tuberculosis	—	0,03	7

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов исследования сформированы следующие выводы:

Действующее вещество препарата ОФТАЛЬМИКА® капли глазные проникает в роговицу глаза, конъюнктиву, в корень радужки и внутриглазную жидкость и содержится в этих тканях в течение 8 часов. Максимальное содержание гатифлоксацина наступает через час после применения для конъюнктивы, роговицы и внутриглазной жидкости. Наибольшая концентрация гатифлоксацина была обнаружена в роговице глаза и составила 3428 нг/г. Наиболее низкие концентрации гатифлоксацина были обнаружены во внутриглазной жидкости — 358 нг/г через 1 ч после применения препарата и снизились до 27 нг/г по истечению 8 ч после применения препарата.

Даже при однократном применении препарата в роговице, в корне радужки, внутриглазной жидкости и конъюнктиве достигаются концентрации гатифлоксацина, превышающие MIC для многих возбудителей инфекций.

Гатифлоксацин свыше 8 часов сохраняет свою высокую антимикробную концентрацию в тканях глаза. Следовательно, препарат ОФТАЛЬМИКА® капли глазные рекомендованы к активному применению в ветеринарной практике в виду удобства режима закапывания — 3 раза в день.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» // под общ. Члена-корреспондента РАМН, профессора ред. *Р. У. Хабриева.* — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005, — 832 с.

2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая// под ред. *А. Н. Миронова*. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

3. *Biswas A.* Pharmacokinetic analysis of gatifloxacin and dexamethasone in rabbit ocular biofluid using a sensitive and selective LC—MS/MS method / *A. Biswas, A. D. Choudhury, A. Mishra, S. K. Verma, A. C. Bisen, S. N. Sanap, S. Agrawal, M. Kumar, S. Kumar, R. S. Bhatta* // J. Mass. Spectrom. — 2024. — No.59 (10): e5088. doi: 10.1002/jms.5088

4. *Kumar G., Reddy A.* Surgical management of cherry eye in a cocker spaniel dog // The Pharma Innovation Journal. — 2020. — SP-9(7). — P. 267—268

5. *Liu M.* Comparative Study of Ocular Pharmacokinetics of Topical 0.3 % Gatifloxacin Eye Gel and Solution in Rabbits / *Liu M., Zhao X., Yang Y., Yang Q., Zeng J., Li Y., Lin X., Duan F* // Antibiotics. — 2022. — V. 11. — P. 502.

6. *Liu X, Wang NL, Wang YL, et al.* Determination of drug concentration in aqueous humor of cataract patients administered gatifloxacin ophthalmic gel. Chin Med J (Engl). — 2010. — No.123. — P. 2105—2110.

7. *Nabi B.* Ocular manifestation of infectious and noninfestious disease of dogs and cats / *B. Nabi et al*//Introduction to Diseases, Diagnosis, and Management of Dogs and Cats. — Academic Press, 2024. — P. 289—295.

8. *Schultz C. L.* Gatifloxacin Ophthalmic Solution for Treatment of Bacterial Conjunctivitis: Safety, Efficacy and Patient Perspective // Opthalmology and Eye Diseases. — 2012. — 4(4). P. 65—70

9. *Sirin Ö. Ş.* Evaluation of eye diseases in cats and dogs: a retrospective study: 200 cases (2021—2022)/ *Ö. Ş. Şirin, M. N. Çetin, B. Neyse* //Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University. — 2023. — T. 8. — No. 1. — P. 44—49

10. *Zhao X.* Comparative study of ocular pharmacokinetics of gatifloxacin between continuous lavage and hourly topical instillation in rabbits / *Xin Zhao, Xu Shen, Xian Zhang, Shichao Chen, Hong Lu, Mingwu Wang* // Cornea. — 2018. — V. 37, N.11. — P. 1457—1462.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

С. В. Енгашев — доктор ветеринарных наук, академик РАН, профессор кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы;

Е. С. Енгашева — доктор биологических наук, профессор кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы;

А. А. Комаров — доктор биологических наук, профессор РАН, профессор кафедры ветеринарной медицины;

А. Г. Шилкин — кандидат медицинских наук, доцент, руководитель центра ветеринарной офтальмологии доктора Шилкина А. Г.;

М. А. Войтеха — кандидат биологических наук, ветеринарный врач-офтальмолог, микрохирург;

У. Э. Мочалова — кандидат биологических наук, ветеринарный врач-офтальмолог, микрохирург;

Е. Н. Гончарова — кандидат химических наук, заведующая лабораторией.

Статья поступила в редакцию 20.03.2025.

Original article
UDC 617.7: 615.015.5

PHARMACOKINETICS OF THE DRUG OPHTHALMICA® EYE DROPS

Sergey Vladimirovich Engashev[*], Ekaterina Sergeevna Engasheva[*, **], Aleksandr Anatolyevich Komarov[*✉], Aleksey Germanovich Shilkin[****], Mariya Aleksandrovna Voytekha[****], Ulyana Eduardovna Mochalova[****], Elizaveta Nikolaevna Goncharova[*****]**

[*]Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Skryabin, Moscow, Russia
[**]ARRIVSH&E — branch of FSBSI FSC ARRIEVM (VIEV) of the RAS, Moscow, Russia
[***]Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia, akomarov1965@gmail.com✉
[****]Veterinary Clinic "Center of Veterinary Ophthalmology of Dr. A. G. Shilkin", Russia, Moscow
[*****]MIP "Academy of Innovations", Moscow, Russia

Abstract. The research was conducted to study the pharmacokinetics of the active substance of the drug OPHTHALMICA® eye drops after its administration to rabbits. The drug OPHTHALMICA® eye drops (Ophthalmica eye drops), designed by R&IC Agrovetzashchita LLC (Russia), contains 5 mg of gatifloxacin sesquihydrate per 1 ml, as well as excipients. The methodology of the study involved administering the drug to animals, followed by collecting biological samples at specified times, analyzing them for the content of the active substance of OPHTHALMICA® eye drops, and evaluating the values obtained. HPLC—MS/MS was chosen to determine gatifloxacin in parts of the eye due to its versatility, selectivity and sensitivity. The active substance of OPHTHALMICA® eye drops penetrates the cornea, conjunctiva, iris root and intraocular fluid of rabbits and is present in these tissues for 8 hours. The maximum content of gatifloxacin occurs one hour after administration to the conjunctiva, cornea and intraocular fluid. The highest concentration of gatifloxacin was found in the cornea and was 3428 ng/g. The lowest concentrations of gatifloxacin were found in the intraocular fluid — 358 ng/g 1 hour after the drug administration and decreased to 27 ng/g 8 hours after the drug administration. When applied externally, the drug is not absorbed into the systemic bloodstream, has a local antimicrobial effect and maintains therapeutic efficacy for 8 hours.

Keywords: drug OPHTHALMICA® eye drops, gatifloxacin, pharmacokinetics, eye diseases, cats, dogs

List of abbreviations and designations

AS — active substance

HPLC—MS — high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection

MIC — minimum inhibitory concentration

The issues of rational pharmacotherapy of ophthalmologic diseases remain one of the most pressing veterinary and biological problems to this day. This is due to the fact that inflammatory diseases are the most common ophthalmologic pathologies [4, 7, 9].

One of the most important criteria in assessing the efficacy of an antibacterial drug in case of infectious and inflammatory eye diseases is its concentration in the conjunctiva and cornea in case of conjunctivitis, keratitis, ulcers and erosions of the cornea, as well as the penetration of the active substance into the moisture of the anterior chamber of the eye and into the iris in case of iridocyclitis and uveitis [7].

A new ophthalmic antibiotic (gatifloxacin) appeared in human ophthalmology several years ago. It has significantly greater clinical efficacy in the treatment of human eye infections, compared to other fluoroquinolones [3, 6, 8].

The drug OPHTHALMICA® eye drops, designed by R&IC Agrovetzashchita LLC (Russia), contains 5 mg of gatifloxacin sesquihydrate per 1 ml, as well as the excipients. It is prescribed to dogs and cats for the treatment and prevention of bacterial, chlamydial, mycoplasmal ophthalmological diseases, in case of foreign bodies, during operations on the eyeball and eyelids in the preoperative and postoperative period,

in the complex treatment of herpes virus and ophthalmochlamydia in cats and dry eye syndrome in dogs, as well as in the absence of the effect during treatment with other antimicrobial drugs.

Gatifloxacin (a fourth-generation fluoroquinolone) has a broad spectrum of antibacterial activity, is effective against most gram-positive and gram-negative bacteria, atypical microorganisms and some anaerobes, including chlamydia and mycoplasma. The mechanism of action of gatifloxacin is to inhibit topoisomerase II (DNA gyrase) and topoisomerase IV of bacteria [5]. In veterinary ophthalmology, information on the extra- and intraocular pharmacokinetics of gatifloxacin is extremely scarce. The poor study of the problem served as a reason for conducting extensive studies in the ocular use of gatifloxacin in domestic animals.

Currently, the drug has no analogues on the Russian veterinary market and is of significant interest to a wide range of veterinarians practicing the treatment of eye infections in animals.

The research objective was to evaluate the pharmacokinetics of gatifloxacin, which is part of the drug for veterinary use OFTALMICA® eye drops after administration to rabbits.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out in accordance with the Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation dtd. March 6, 2018 N101 On Approval of the Rules for Conducting a Preclinical Study of a Drug for Veterinary Use, a Clinical Study of a Drug for Veterinary Use, a Bioequivalence Study of a Drug for Veterinary Use. Also, in accordance with the rules adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS123), Strasbourg, 1986).

Statistical processing of the obtained results was carried out using standard methods.

The studies were conducted at the premises of LLC "MIP 'Academy of Innovations'" (Moscow) and the Animal Keeping Center LLC "SVS-N" (Sergiev Posad). The experiment was conducted with the participation of 10 rabbits. Information about the experimental animals is given in Table 1.

The drug was instilled 1 drop into the conjunctival sac once. The study scheme, dosing regimen and sampling are presented in Table 2.

The samples of the conjunctiva, cornea, intraocular fluid and iris root of the rabbits were collected using microsurgical instruments (Fig. 1, 2).

The samples were collected in individual numbered and pre-weighed polypropylene tubes with a screw cap with a volume of 15 ml. All samples were transferred to the laboratory in a frozen form.

For the purpose of determining gatifloxacin in parts of the eye, the HPLC—MS method was chosen due to its versatility, selectivity and sensitivity.

For the analysis, a standard sample of gatifloxacin and gatifloxacin-D4 were used as an internal standard sample. The sample preparation of working standards of parts of the rabbit eye included extraction with 1M hydrochloric acid, purification by solid-phase extraction using sorbent C18.

The effect of extraction and matrix effect were insignificant, therefore, the solutions of standard samples were used as calibration samples.

Table 1

Information about the experimental animals

	Type of research
	Study of the pharmacokinetics of the active substance of the drug
Target species	rabbits
Gender	♂♀
Breed	Chinchilla
Age	2 g
Mass*	5.6—6.2 kg
Number	10

* The weight of all animals was within the specified range, and the groups were formed in such a way that the deviation of individual body weights from the average in the group did not exceed 20 %.

Table 2

Study scheme and dosing regimen

Control point	Manipulations performed
Before drug administration	Taking control samples of the cornea, intraocular fluid, conjunctiva and iris root from 1 rabbit (control animal)
Individual drug administration	Individual application of the drug to the experimental group (9 animals) by instillation of 1 drop into the conjunctival sac
1 hour after drug administration	Taking samples of the cornea, intraocular fluid, conjunctiva and iris root from 3 animals (2 samples from each animal)
4 hours after drug administration	Taking samples of the cornea, intraocular fluid, conjunctiva and iris root from 3 animals (2 samples from each animal)
8 hours after drug administration	Taking samples of the cornea, intraocular fluid, conjunctiva and iris root from 3 animals (2 samples from each animal)

Fig. 1. Conjunctival sampling in a rabbit

Fig. 2. Corneal sampling: cutting out a corneal flap

During the study, the following parameters were monitored: the concentration of the active substance of the drug OFTALMICA® eye drops (gatifloxacin) in the cornea, intraocular fluid, conjunctiva and iris root of the animals.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

The calibration curves of all analytical cycles and blank samples met the acceptance criteria. According to the results of the evaluation of quality control samples, all series were found to meet the criteria.

After the drug administration to rabbits, gatifloxacin penetrates into all the studied extraocular parts of the eye within an hour: into the conjunctiva, cornea. Gatifloxacin is also well absorbed into the eye and is found in the aqueous humor of the anterior chamber and the iris root. The average values of gatifloxacin concentration in eye tissues are presented in Fig. 3.

One hour after administration of gatifloxacin, the highest concentration was observed in the cornea (C_{max} 3428 ± 1108 ng/g) and then 8 hours after administration it decreased to 501 ± 67 ng/g. In the conjunctiva, peak concentrations are usually recorded in the first minutes and then gradually begin to slowly decrease [10] and in our study, the maximum content of gatifloxacin (C_{max} = 1903 ± 892 ng/g) was observed one hour after administration, and decreased to 389 ± 423 ng/g 8 hours after administration. In the

intraocular fluid, T_{max} was also 1 hour, while C_{max} was 358 ± 156 ng/g. In the iris root, maximum concentrations (C_{max} = 895 ± 559 ng/g) of gatifloxacin are observed 4 hours after the drug administration.

Detection of gatifloxacin in intraocular structures even with a single instillation is an important factor. The drug OPHTHALMICA® eye drops can be used to treat uveitis and iridocyclitis of bacterial genesis in animals, and can also be used to prevent infections in intraocular surgeries such as cataract phacoemulsification, antiglaucoma interventions, optical reconstructive surgery for penetrating eye injuries.

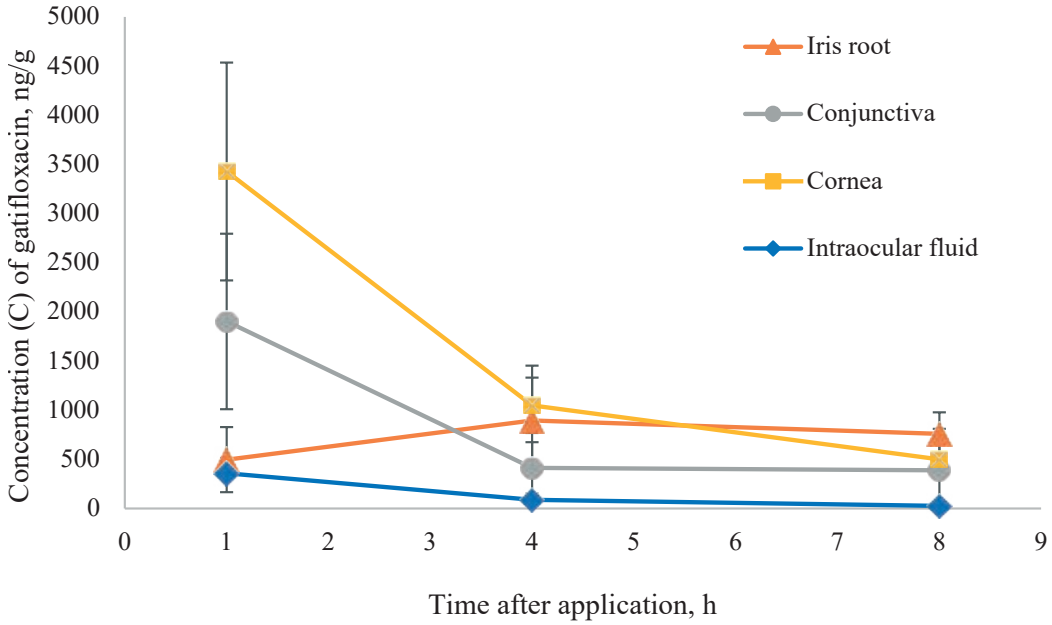


Fig. 3. Mean values of gatifloxacin concentration in ocular tissues. Each point represents the mean concentration and standard deviation

Table 3

Minimum inhibitory concentrations of gatifloxacin for pathogens

Species	MIC range, µg/ml	MIC_{90}, µg/ml	Reference
Staphylococcus aureus	0.05—0.20	0.1	5
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus	0.05—0.20	0.2	5
Staphylococcus epidermidis	0.05—0.39	0.2	5
Staphylococcus haemolyticus	0.01—6.25	3.13	5
Staphylococcus pneumoniae	0.20—0.39	0.39	5
Escherichia coli	0.0125—0.05	0.05	5
Pseudomonas aeruginosa	0.78—12.5	3.13	5
Haemophilus influenza	—	0.016	6
M. smegmatis	—	0.03	7
M. tuberculosis	—	0.03	7

Information on the minimum inhibitory concentrations (MIC) of gatifloxacin for different pathogens is provided in Table 3 [10]. The results show that even with a single use of gatifloxacin, concentrations in the conjunctiva, cornea, iris root and intraocular fluid exceeding the MIC are achieved. Considering that the

instructions for use provide for a course drug administration (at least 7 days), this will ensure its efficacy against the indicated pathogens. The results obtained are consistent with the literature [3, 5, 6, 10]. At such concentrations, gatifloxacin exhibits bacterial and bactericidal activity, but does not cause antibiotic resistance in bacteria to the active substance of the drug.

Gatifloxacin has a long-term effect on pathogenic agents of eye infections. Even 8 hours after instillation, gatifloxacin maintains its inhibitory concentration against microorganisms in all major tissues of the eye.

CONCLUSION

Based on the results of the study, the following conclusions were formed. The active substance of the drug OPHTHALMICA® eye drops penetrates the cornea of the eye, conjunctiva, iris root and intraocular fluid, and it is contained in these tissues for 8 hours. The maximum content of gatifloxacin occurs one hour after application to the conjunctiva, cornea and intraocular fluid. The highest concentration of gatifloxacin was found in the cornea and amounted to 3428 ng/g. The lowest concentrations of gatifloxacin were found in the intraocular fluid — 358 ng/g 1 hour after the drug administration and decreased to 27 ng/g 8 hours after the drug administration. Even with a single application of the drug, concentrations of gatifloxacin in the cornea, iris root, intraocular fluid and conjunctiva exceed the MIC for many pathogens.

Gatifloxacin maintains its high antimicrobial concentration in the eye tissues for over 8 hours. Therefore, the drug OFTALMICA® eye drops is recommended for active use in veterinary practice due to the convenience of the instillation regimen (3 times a day).

REFERENCES

1. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances // under the general editorship of the Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences, *Professor R. U.* Khabriev. — M.: OJSC “Izdatelstvo ‘Medicine’”, 2005, — 832 p.

2. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one // edited by A. N. Mironov. — M.: Grif i K, 2012. — 944 p.

3. *Biswas A.* Pharmacokinetic analysis of gatifloxacin and dexamethasone in rabbit ocular biofluid using a sensitive and selective LC—MS/MS method / *A. Biswas, A. D. Choudhury, A. Mishra, S. K. Verma, A. C. Bisen, S. N. Sanap, S. Agrawal, M. Kumar, S. Kumar, R. S. Bhatta* // J. Mass. Spectrom. — 2024. — No.59 (10): e5088. doi: 10.1002/jms.5088

4. *Kumar G., Reddy A.* Surgical management of cherry eye in a cocker spaniel dog // The Pharma Innovation Journal. — 2020. — SP-9(7). — P. 267—268

5. *Liu M.* Comparative Study of Ocular Pharmacokinetics of Topical 0.3 % Gatifloxacin Eye Gel and Solution in Rabbits / *Liu M., Zhao X., Yang Y., Yang Q., Zeng J., Li Y., Lin X., Duan F* // Antibiotics. — 2022. — V. 11. — P. 502.

6. *Liu X, Wang NL, Wang YL, et al.* Determination of drug concentration in aqueous humor of cataract patients administered gatifloxacin ophthalmic gel. Chin Med J (Engl). — 2010. — No.123. — P. 2105—2110.

7. *Nabi B.* Ocular manifestation of infectious and noninfestious disease of dogs and cats / *B. Nabi et al*//Introduction to Diseases, Diagnosis, and Management of Dogs and Cats. — Academic Press, 2024. — P. 289—295.

8. *Schultz C. L.* Gatifloxacin Ophthalmic Solution for Treatment of Bacterial Conjunctivitis: Safety, Efficacy and Patient Perspective // Opthalmology and Eye Diseases. — 2012. — 4(4). P. 65—70

9. *Sirin Ö. Ş.* Evaluation of eye diseases in cats and dogs: a retrospective study: 200 cases (2021—2022)/ *Ö. Ş. Şirin, M. N. Çetin, B. Neyse* //Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University. — 2023. — T. 8. — No. 1. — P. 44—49

10. *Zhao X.* Comparative study of ocular pharmacokinetics of gatifloxacin between continuous lavage and hourly topical instillation in rabbits / *Xin Zhao, Xu Shen, Xian Zhang, Shichao Chen, Hong Lu, Mingwu Wang* // Cornea. — 2018. — V. 37, N.11. — P. 1457—1462.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

S. V. Engashev — Doctor of Veterinary Sciences, Academician of the RAS, Professor of the Department of Parasitology and Veterinary-Sanitary Expertise;

E. S. Engasheva — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Parasitology and Veterinary-Sanitary Expertise;

A. A. Komarov — Doctor of Biological Sciences, Professor of the RAS, Professor of the Department of Veterinary Medicine;

A. G. Shilkin — Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Center of Veterinary Ophthalmology of Dr. A. G. Shilkin;

M. A. Voytekha — Candidate of Biological Sciences, Veterinary Ophthalmologist, Microsurgeon;

U. E. Mochalova — Candidate of Biological Sciences, Veterinary Ophthalmologist, Microsurgeon;

E. N. Goncharova — Candidate of Chemical Sciences, Head of the Laboratory.

The article was submitted 11.04.2025.

Научная статья
УДК 599.323.44: 591.4: 615.076.9

РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ МАССОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ ОРГАНОВ ПЕСЧАНОК И ИХ АБСОЛЮТНЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Елизавета Владимировна Симонова✉, Кира Тимуровна Султанова

Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», г. п. Кузьмоловский, Всеволожский район, Ленинградская обл., Россия, simonova.ev@doclinika.ru✉

Аннотация. Монгольская песчанка (Meriones unguiculatus) часто используется в качестве экспериментальной тест-системы на доклиническом этапе разработки лекарственных средств, прежде всего в исследованиях фармакодинамики. В токсикологических исследованиях песчанки задействованы в меньшей степени по сравнению с другими грызунами — мышами, крысами, морскими свинками, в связи с этим значения масс органов песчанок практически не представлены в литературных источниках. Цель данной работы — определить референтные интервалы абсолютных значений масс и массовых коэффициентов внутренних органов, вычисленных относительно массы тела и головного мозга монгольских песчанок.
Для расчета интервалов у 44 животных каждого пола были зарегистрированы массы сердца, легких (с трахеей), тимуса, печени, селезенки, почек, головного мозга, семенников и яичников, также у 34 самцов и 24 самок определили массу надпочечников. Расчет референтных значений проводили робастным методом с помощью программного обеспечения *Microsoft Excel* и *Reference Value Advisor v2.1*.
Приведенные в работе референтные значения масс органов и рассчитанных массовых коэффициентов по отношению к массе тела и головного мозга позволят более корректно оценить состояние внутренних органов и систем в исследованиях на песчанках. В работе представлены нижний и верхний пределы референтных интервалов для всех показателей измеренных органов, также для каждого значения приведены доверительные интервалы. У самцов и самок границы референтных интервалов схожи, межполовые статистически значимые отличия были зафиксированы только между значениями абсолютных масс и массовых коэффициентов относительно массы тела надпочечников. Несмотря на это, границы имеют сопоставимый диапазон: 0,019—0,083 г и 0,049—0,119 % у самцов и 0,012—0,072 г и 0,042—0,100 % у самок.
Ключевые слова: доклинические исследования, песчанки, массовые коэффициенты, абсолютные значения, масса органов, референтные интервалы

ВВЕДЕНИЕ

Монгольская песчанка (Meriones unguiculatus) является распространенной экспериментальной тест-системой в доклинических исследованиях. Их используют для изучения эпилепсии, инсульта, нарушений слуха, метаболических расстройств, заболеваний желудочно-кишечного тракта и инфекционных процессов [1—9]. Однако в токсикологических исследованиях песчанки используются реже, чем другие лабораторные грызуны, что ограничивает доступный объем справочной информации, в том числе данных по значениям абсолютных масс внутренних органов и их коэффициентов, используемых для выявления возможных токсических эффектов изучаемых препаратов. Цель данной работы — определить референтные интервалы абсолютных значений масс и массовых коэффициентов внутренних органов, вычисленных относительно массы тела и головного мозга монгольских песчанок.

В данной работе фиксировали массы сердца, тимуса, печени, селезенки, почек, головного мозга и семенников/яичников, которые необходимо взвешивать у эвтаназированных грызунов, задействованных в токсикологических исследованиях, в соответствии с рекомендациями Общества токсикологической патологии у всех животных (Society of Toxicologic Pathology, США) [10].

Также, по возможности, проводили регистрацию массы надпочечников. Массовые коэффициенты перечисленных органов используются для определения их состояния и для оценки работы систем органов.

В связи с редким использованием песчанок в подобных экспериментах, в литературных источниках практически не встречаются массы органов и их массовые коэффициенты. Цель работы — определить референтные интервалы абсолютных значений массы и массовых коэффициентов внутренних органов, вычисленных относительно массы тела и головного мозга монгольских песчанок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Все манипуляции проведены на монгольских песчанках массой 36—96 г. Данные, используемые для расчетов, получены от интактных животных в период с 2020 по 2024 гг. в рамках проведения мониторинга здоровья лабораторных животных в АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Ленинградская область), в течение года эвтаназировали до 10 голов каждого пола. В исследование включено 88 животных — 44 самца и 44 небеременных и нерожавших самки в возрасте от 8 до 16 недель. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре воздуха 22—26 °С, относительной влажности 40—75 % и 12-часовом режиме светового дня.

Песчанки содержались группами по 3—5 особей в клетке на подстиле, площадь пола клетки содержания на одно животное соответствовала Руководству по содержанию и использованию лабораторных животных . Кормление животных осуществляли в соответствии с Директивой 2010/63/EU , вода была в свободном доступе *ad libitum*. В качестве корма использовали гранулированный корм для содержания лабораторных животных ЛБК-120 (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Россия), приготовленный в соответствии с требованиями ГОСТ 34566—2019 . «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия».

Эвтаназию животных осуществляли с помощью диоксида углерода (CO_2) с перерезанием магистральных кровеносных сосудов, предварительно животные были лишены корма на 8—12 часов. Непосредственно перед процедурой эвтаназии регистрировали массу тела животных. Процедуру регистрации масс органов осуществляли на электронных весах Adventurer, модель RV 214 (OHAUS, Китай): минимальный предел взвешивания — 0,001 г, максимальный — 210 г; цена поверочного деления — 0,001 г. Массу надпочечников определяли при условии их детальной визуализации, во избежание их некорректного выделения при большом количестве жировой ткани.

Массовые коэффициенты внутренних органов рассчитывали отдельно для самцов и самок, обработку полученных данных проводили в соответствии с ранее проведенной работой [11]. Статистический анализ данных проводили с исключенными выбросами [11] и в соответствии с руководством CLSI [12, 13].

Согласно литературным данным, определение референтных интервалов допустимо проводить при выборке более 20 значений, при этом, при количестве значений менее 120 считается корректным использование непараметрического или робастного методов. В данном случае расчет проводили при помощи робастного метода, как более точного при малой выборке животных и нормальном распределении данных [14]. При наличии статистической значимости ($p < 0,05$) метода Андерсона — Дарлинга предполагали, что распределение данных является отличным от нормального, и применяли преобразование Бокса — Кокса, приближающее значения к нормальному распределению [15].

Расчет референтных интервалов выполняли с помощью программного обеспечения *Microsoft Excel* и *Reference Value Advisor v2.1*. (National Veterinary School, Toulouse, France) [12]. Результаты расчетов референтных интервалов представлены в таблицах 4—6, также для верхней и нижней границ приведены 90 % доверительные интервалы [12, 16].

---

[2] Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е издание / пер. с англ. Под ред. И. В. Белозерцевой, Д. В. Блинова, М. С. Красильщиковой. Москва: ИРБИС, 2017. 336 с. [Rukovodstvo po soderzhaniyu i ispolsovaniyu laboratornykh zhivotnykh. Vos'moe izdanie / transl. from English. Ed. I. V. Belozercevoi, D. V. Blinova, M. S. Krasil'shikovoi. Moskva: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.)].

[3] Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях / пер. с англ. Под ред. М. С. Красильщиковой, И. В. Белозерцевой. Санкт-Петербург, 2012. 48 с. [Direktiva 2010/63/EU Yevropeyskogo Parlamenta i Soveta Yevropeyskogo Soyuza po okhrane zhivotnykh, ispol'zuyemykh v nauchnykh tselyakh / transl. from English. Ed. M. S. Krasilshchikova, I. V. Belozertseva. St. Petersburg, 2012. 48 p. (In Russ.)].

[4] ГОСТ 34566—2019. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия.

Для статистического анализа при сравнении данных между полами использовали лицензированное программное обеспечение Statistica 10.0 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В таблицах 1—3 представлены доли статистических выбросов для каждого показателя для каждого пола.

Таблица 1

Доля статистических выбросов при анализе абсолютных масс органов песчанок

Орган	Диапазон массы тела самцов 36—96 г, *n* = 44	Диапазон массы тела самок 39—83 г, *n* = 44
	Общее количество выбросов, %	
Сердце	0,0	0,0
Легкие с трахеей	4,5	2,3
Тимус	0,0	0,0
Печень	0,0	0,0
Селезенка	2,3	0,0
Почки	0,0	2,3
Головной мозг	0,0	0,0
Семенники	4,5	—
Яичники	—	0,0
Надпочечники	2,9 (*n* = 34)	0,0 (*n* = 24)

Таблица 2

Доля статистических выбросов при расчете массовых коэффициентов органов относительно массы тела у песчанок

Орган	Диапазон массы тела самцов 36—96 г, *n* = 44	Диапазон массы тела самок 39—83 г, *n* = 44
	Общее количество выбросов, %	
Сердце	2,3	2,3
Легкие с трахеей	11,4	0,0
Тимус	0,0	0,0
Печень	6,8	0,0
Селезенка	0,0	2,3
Почки	2,3	4,5
Головной мозг	2,3	0,0
Семенники	9,1	—
Яичники	—	6,8
Надпочечники	2,9 (*n* = 34)	8,3 (*n* = 24)

Таблица 3

Доля статистических выбросов при расчете массовых коэффициентов органов относительно головного мозга у песчанок

Орган	Диапазон массы тела самцов 36—96 г, *n* = 44	Диапазон массы тела самок 39—83 г, *n* = 44
	Общее количество выбросов, %	
Сердце	0,0	0,0
Легкие с трахеей	4,5	0,0
Тимус	0,0	0,0
Печень	0,0	0,0
Селезенка	2,3	0,0
Почки	0,0	2,3
Семенники	2,3	—
Яичники	—	9,1
Надпочечники	2,9 (*n* = 34)	0,0 (*n* = 24)

Следует отметить, что наибольшая вариативность отмечена у таких показателей как массовые коэффициенты легких, печени, семенников у самцов и надпочечников у самок относительно массы тела, а также массовые коэффициенты яичников относительно головного мозга. Вариабельность значений массовых коэффициентов относительно массы тела, вероятнее всего, связана с большим диапазоном масс тела, в частности, самцов.

Рассчитанные референтные интервалы для всех показателей органов представлены в таблицах 4—6.

Таблица 4

Референтные интервалы абсолютных масс органов, г, референтное значение (90 % доверительный интервал)

Орган	Самцы			Самки		
	n	Нижняя граница	Верхняя граница	*n*	Нижняя граница	Верхняя граница
1	2	3	4	5	6	7
Сердце	44	0,163 (0,137—0,191)	0,469 (0,430—0,500)	44	0,172 (0,151—0,200)	0,415 (0,381—0,446)
Легкие с трахеей	42	0,251 (0,214—0,290)	0,639 (0,598—0,679)	43	0,225 (0,183—0,276)	0,652 (0,609—0,695)
Тимус	44	0,002 (0,0—0,014)	0,137 (0,120—0,151)	44	0,011 (0,0—0,022)	0,131 (0,115—0,143)
Печень	44	1,370 (1,170—1,595)	3,603 (3,321—3,835)	44	1,192 (1,002—1,422)	3,445 (3,181—3,644)
Селезенка	43	0,024 (0,014—0,034)	0,108 (0,097—0,118)	44	0,018 (0,010—0,029)	0,119 (0,107—0,130)
Почки	44	0,387 (0,345—0,442)	0,907 (0,851—0,954)	43	0,404 (0,352—0,457)	0,855 (0,796—0,901)

Окончание табл. 4

1	2	3	4	5	6	7
Головной мозг	44	0,878 (0,842—0,918)	1,244 (1,210—1,283)	44	0,840 (0,799—0,878)	1,245 (1,195—1,285)
Семенники	42	0,690 (0,574—0,784)	1,580 (1,495—1,672)	—		
Яичники	—			44	0,000 (0,0—0,0)	0,194 (0,127—0,241)
Надпочечники	33	0,019 (0,012—0,028)	0,083 (0,074—0,089)	24	0,012 (0,005—0,022)	0,072 (0,064—0,082)

Примечание. Здесь и в табл. 5, 6: *n* — количество значений после исключения выбросов из выборки.

Таблица 5

Референтные интервалы по массовым коэффициентам органов, рассчитанные как отношение массы органа к массе тела, %, референтное значение (90 % доверительный интервал)

Орган	Самцы			Самки		
	n	Нижняя граница	Верхняя граница	*n*	Нижняя граница	Верхняя граница
Сердце	43	0,361 (0,327—0,396)	0,703 (0,665—0,744)	43	0,391 (0,364—0,422)	0,693 (0,653—0,732)
Легкие с трахеей	39	0,487 (0,456—0,526)*	1,293 (1,097—1,535)*	44	0,376 (0,298—0,459)	1,270 (1,155—1,369)
Тимус	44	0,000 (0,0—0,018)	0,255 (0,226—0,285)	44	0,010 (0,0—0,029)	0,261 (0,230—0,289)
Печень	41	3,544 (3,403—3,713)	4,941 (4,753—5,074)	44	2,917 (2,661—3,211)	5,617 (5,337—5,862)
Селезенка	44	0,024 (0,006—0,040)	0,213 (0,184—0,234)	43	0,037 (0,018—0,059)	0,214 (0,195—0,235)
Почки	43	0,735 (0,675—0,811)	1,423 (1,334—1,508)	42	0,835 (0,787—0,903)	1,451 (1,379—1,532)
Головной мозг	43	0,997 (0,851—1,179)	2,538 (2,310—2,741)	44	1,242 (1,061—1,358)	2,677 (2,514—2,825)
Семенники	40	1,223 (1,115—1,341)	2,426 (2,256—2,602)	—		
Яичники	—			41	0,000 (0,0—0,028)	0,227 (0,195—0,258)
Надпочечники	33	0,049 (0,039—0,058)	0,119 (0,111—0,128)	22	0,042 (0,035—0,052)	0,100 (0,092—0,109)

Примечание. * — значения рассчитаны после преобразования Бокса—Кокса.

Таблица 6

Референтные интервалы по массовым коэффициентам органов, рассчитанные как отношение массы органа к массе головного мозга, %, референтное значение (90 % доверительный интервал)

Орган	Самцы			Самки		
	n	Нижняя граница	Верхняя граница	*n*	Нижняя граница	Верхняя граница
Сердце	44	13,59 (10,74—17,10)	45,23 (40,86—49,03)	44	17,89 (16,12—19,99)	39,37 (36,84—41,77)
Легкие с трахеей	42	23,52 (19,86—26,85)	59,61 (55,15—63,39)	44	21,85 (18,87—25,84)	61,15 (56,34—66,40)
Тимус	44	0,36 (0,0—1,58)	12,79 (11,18—14,02)	44	1,61 (0,62—2,67)	12,20 (11,02—13,08)
Печень	44	141,9 (122,8—161,4)	331,2 (311,9—350,9)	44	119,6 (99,65—141,0)	322,3 (298,7—339,9)
Селезенка	43	2,23 (1,34—3,12)	10,08 (8,99—11,15)	44	2,29 (1,48—3,22)	10,92 (9,98—11,87)
Почки	44	37,36 (33,45—41,77)	84,57 (79,41—89,04)	43	41,34 (37,08—46,09)	80,14 (75,96—84,43)
Семенники	43	57,40 (48,10—67,67)	151,5 (140,5—161,3)	—		
Яичники	—			40	0,42 (0,0—1,62)	10,77 (9,68—11,88)
Надпочечники	33	1,95 (1,35—2,67)	7,62 (6,79—8,35)	24	1,12 (0,50—1,94)	6,95 (5,98—7,95)

Рассчитанные референтные значения по всем показателям у самцов и самок образуют схожие интервалы. Статистически значимые различия между полами отмечены при анализе абсолютных масс и массовых коэффициентов относительно массы тела надпочечников (парный Т-тест, $p < 0,05$), при этом отличий при сравнении массовых коэффициентов относительно головного мозга не выявлено. Данные изменения показателей могут быть связаны с малым весом органа на фоне больших диапазонов массы тела.

В литературе были найдены абсолютные значения массы печени, селезенки и почек, зарегистрированные у животных контрольной группы [9]. Эти данные у самок и показатели селезенки и почек у самцов укладываются в границы рассчитанных нами интервалов.

Значения массы печени у самцов в приведенной работе незначительно превышают границу установленного нами референтного диапазона, но при этом попадают в доверительный интервал верхнего предела.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Монгольская песчанка является распространенной экспериментальной тест-системой в исследованиях фармакодинамики. В регуляторных токсикологических исследованиях песчанки задействованы в меньшей степени по сравнению с другими грызунами, что ограничивает доступный объем справочной информации по данным животным, в частности в литературе практически не представлены данные по массам внутренних органов, используемых для выявления возможных токсических эффектов изучаемых препаратов, данные их масс органов в литературе практически не представлены. Рассчитанные референтные интервалы предоставляют возможность корректной оценки результатов при необходимости проведения токсикологических экспериментов на песчанках. Полученными нами референтные интервалы сопоставимы с данными, представленными в литературе.

При использовании рассчитанных референтов необходимо учитывать небольшую выборку жи-

вотных и при необходимости руководствоваться доверительными интервалами верхней или нижней границ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Рыбакова АВ, Макарова МН. Использование песчанок для биомедицинских исследований // Международный вестник ветеринарии. 2017. № 2. С. 117—124.

2. Ito U, Hakamata Y, Yamaguchi T, *Ohno K.* Cerebral ischemia model using Mongolian gerbils-comparison between unilateral and bilateral carotid occlusion models. Brain Edema XV. — Springer Vienna, 2013. 17—21. doi: 10.1007/978—3—7091—1434—6_3

3. Lee JC, Won MH. Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils. Anatomy & cell biology. 2014; 47(3): 149. doi: 10.5115/acb.2014.47.3.149

4. Мирошников МВ, Султанова КТ, Ковалева МА. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референтных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 10: монгольские песчанки // Лабораторные животные для научных исследований. 2023; 3. 74—83. doi: 10.57034/2618723X-2023-03-06

5. Vincent AL, Rodrick GE, Sodeman WAJr. The pathology of the Mongolian Gerbil (Meriones unguiculatus): a review. Laboratory animal science. 1979; 29(5): 645—651.

6. Goldenring JR, Nam KT. Oxyntic atrophy, metaplasia, and gastric cancer. Progress in molecular biology and translational science. 2010; 96: 117—131. doi: 10.1016/B978—0—12—381280—3.00005—1

7. Ruiz TFR, Vilamaior PSL, Grigio V, Colleta SJ, Zucão MI, de Campos SGP, dos Santos FCA. et al. The Mongolian Gerbil as a Useful Experimental Model in Reproductive Biology. Reproductive Sciences. 2023; 30(7): 2092—2106. doi: 10.1007/s43032—023—01171—6

8. Макарова МН, Макаров ВГ. Использование песчанок в доклинических исследованиях // Лабораторные животные для научных исследований. 2024. № 1. doi: 10.57034/2618723X-2024-01-01

9. Port CD, Baxter DW, Richter WR. The Mongolian gerbil as a model for chronic lead toxicity. Journal of Comparative Pathology. 1975; 85(1): 119—131. doi: 10.1016/0021-9975(75)90090-0

10. Sellers RS, Mortan D, *Michael B.* Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. Toxicologic pathology. 2007; 35(5): 751—755. doi: 10.1080/01926230701595300

11. Симонова ЕВ, Савватейкина АИ, Султанова КТ, Макарова МН, Мазукина ЕВ. Референтные интервалы по массовым коэффициентам органов карликовых свиней и их абсолютным значениям // Ветеринарная патология. 2024. Т. 23. № 2. С. 41—50. doi: 10.23947/2949—4826—2024—23—2—41—50

12. Geffré A, Concordet D, Braun J-P, *Trumei C.* Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. Veterinary Clinical Pathology. 2011; 40: 107—112. doi:10.1111/j.1939—165X.2011.00287.x

13. Horowitz GL. CLSI Document C28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, third edition. USA: CLSI; 2010. 61 p.

14. Daly CH, Higgins V, Adeli K, Grey VL, Hamid JS. Reference interval estimation: methodological comparison using extensive simulations and empirical data. Clinical Biochemistry. 2017; 50(18): 1145—1158. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.005

15. Pavlov IY, Wilson AR, Delgado JC. Reference interval computation: which method (not) to choose? Clinica Chimica Acta. 2012; 413(13—14): 1107—1114. doi: 10.1016/j.cca.2012.03.005

16. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. Veterinary clinical pathology. 2012; 41(4): 441—453. doi: 10.1111/vcp.12006

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. В. Симонова — научный сотрудник отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии;

К. Т. Султанова — кандидат медицинских наук, руководитель отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии.

ВКЛАД АВТОРОВ

Симонова Е. В. — анализ данных научной литературы, проведение статистической обработки и анализ полученных данных, формулировка заключения.

Султанова К. Т. — редактирование текста, одобрение окончательного варианта рукописи.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 02.04.2025.

Original article
UDC 599.323.44: 591.4: 615.076.9

REFERENCE INTERVALS OF MASS COEFFICIENTS OF MONGOLIAN GERBIL ORGANS AND THEIR ABSOLUTE VALUES

Elizaveta Vladimirovna Simonova✉, Kira Timurovna Sultanova

Scientific and Production Association "HOME OF PHARMACY", urban-type settlement Kuzmolovskiy, Vsevolozhsk district, Leningrad region, Russia, simonova.ev@doclinika.ru✉

Abstract. The Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) is often used as an experimental test system at the preclinical stage of drug design, primarily in pharmacodynamic studies. Gerbils are used to a lesser extent in toxicological studies, compared to other rodents (mice, rats, guinea pigs), and therefore, the values of gerbil organ weight are practically not presented in the literature. The objective of this work is to determine the reference intervals of the absolute values of the weight and mass coefficients of internal organs calculated relative to the body and brain weight of Mongolian gerbils.

To calculate the intervals, the weight of the heart, lungs (with trachea), thymus, liver, spleen, kidneys, brain, testicles and ovaries was recorded in 44 animals of each gender, and the adrenal gland weight was determined in 34 males and 24 females. The calculation of reference values was performed using a robust method and the *Microsoft Excel* and *Reference Value Advisor v2.*1 software.

The reference values of organ weight and calculated mass coefficients in relation to body and brain weight presented in the work will allow a more correct assessment of the state of internal organs and systems in studies on gerbils. The work presents the lower and upper limits of reference intervals for all indicators of the measured organs, and confidence intervals are also given for each value. The limits of the reference intervals are similar in males and females, statistically significant differences between the genders were recorded only between the values of absolute weight and mass coefficients relative to the body weight of the adrenal glands. Despite this, the limits have a comparable range: 0.019—0.083 g and 0.049—0.119 % in males, and 0.012—0.072 g and 0.042—0.100 % in females.

Keywords: preclinical studies, gerbils, mass coefficients, absolute values, organ weight, reference intervals

The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) is a common experimental test system in preclinical studies. They are used to study epilepsy, stroke, hearing impairment, metabolic disorders, gastrointestinal diseases and infectious processes [1—9]. Gerbils are used less frequently in toxicological studies than other laboratory rodents, which limits the available volume of reference information, including the data on the absolute weight of internal organs and their coefficients used to identify possible toxic effects of the studied drugs.

In this study, we recorded the weight of the heart, thymus, liver, spleen, kidneys, brain and testicles/ovaries — the organs, the weight of which must be recorded in rodents in toxicological studies in accordance with the recommendations of the Society of Toxicologic Pathology (USA) [10]. If possible, the adrenal gland mass was also recorded.

Due to the rare use of gerbils in such experiments, organ mass and their mass coefficients are practically not found in literary sources. The objective of the work is to determine the reference intervals of absolute values of the mass and mass coefficients of internal organs calculated relative to the body and brain mass of Mongolian gerbils.

MATERIAL AND METHODS

All manipulations were carried out on Mongolian gerbils weighing 36—96 g. The data used for the calculations were obtained from intact animals in the period from 2020 to 2024 as part of monitoring the health of laboratory animals at "Scientific and Production Association 'HOME OF PHARMACY'" (Leningrad Region). The study included 88 animals (44 males and 44 non-pregnant and nulliparous females) aged from 8 to 16 weeks. The animals were kept under standard vi-

varium conditions at an air temperature of 22—26 °C, relative humidity of 40—75 % and a 12-hour daylight regime. Gerbils were kept in groups of 3—5 individuals per cage on bedding; the floor area of the cage per animal complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals . The body weight of male gerbils was within 36—96 g, and that of females was 39—83 g. The animals were fed in accordance with Directive 2010/63/EU, and water was freely available *ad libitum*. Granulated feed for keeping laboratory animals LBK-120 (Tosnenskiy Mixed Feed Factory, Russia) was used as feed prepared in accordance with the requirements of GOST 34566—2019 . Complete Feed for Laboratory Animals. Technical Conditions.

The animals were euthanized using carbon dioxide with severing the main blood vessels, after the animals had been deprived of food for 8—12 hours. The body weight of the animals was recorded immediately before the euthanasia procedure. The organ weight recording procedure was performed using an Adventurer electronic scale, model RV 214 (OHAUS, China): minimum weighing limit — 0.001 g, maximum — 210 g; verification division value — 0.001 g. The adrenal gland weight was determined provided that they were visualized in detail, in order to avoid their incorrect isolation in the presence of a large amount of adipose tissue.

The mass coefficients of internal organs were calculated separately for males and females, and the obtained data were processed in accordance with the previously conducted work [11]. The statistical analysis of the data was performed with outliers excluded [11] and in accordance with the CLSI guidelines [12, 13].

According to the literature, reference intervals can be determined with a sample of more than 20 values, while with a number of values less than 120, it is considered correct to use nonparametric or robust methods. In this case, the calculation was performed using the robust method, as it is more accurate with a small sample of animals and a normal data distribution [14]. In the presence of statistical significance ($p < 0.05$) of the Anderson — Darling test, it has been assumed that the data distribution is different from normal, and the Box — Cox transformation has been used, which approximates the values to a normal distribution [15].

Reference intervals were calculated using the *Microsoft Excel* and *Reference Value Advisor v2.1* software. (National Veterinary School, Toulouse, France) [12]. The results of the reference interval calculations are presented in Tables 4—6, and 90 % confidence intervals are also given for the upper and lower limits [12, 16].

For statistical analysis when comparing the data between genders, the licensed software Statistica 10.0 (StatSoft, USA) was used.

STUDY RESULTS

Tables 1—3 present the proportions of statistical outliers for each indicator of each gender.

Table 1

Proportion of statistical outliers in the analysis of absolute mass of gerbil organs

Organ	Total number of outliers, %			
	n	Males	*n*	Females
1	2	3	4	5
Heart	44	0.0	44	0.0
Lungs with trachea	44	4.5	44	2.3
Thymus	44	0.0	44	0.0
Liver	44	0.0	44	0.0
Spleen	44	2.3	44	0.0

[2] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition / translated from English. Edited by I. V. Belozertseva, D. V. Blinov, M. S. Krasilshchikova. Moscow: IRBIS, 2017. 336 p. [Rukovodstvo po soderzhaniyu i ispolsovaniyu laboratornykh zhivotnykh. Vosmoe izdanie / transl. from English. Ed. by I. V. Belozertseva, D. V. Blinova, M. S. Krasilshchikova. Moskva: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.)].

[3] GOST 34566—2019. Complete feed for laboratory animals. Technical conditions

Table 1 (the end)

1	2	3	4	5
Kidneys	44	0.0	44	2.3
Brain	44	0.0	44	0.0
Testicles	44	4.5	—	—
Ovaries	—	—	44	0.0
Adrenal glands	34	2.9	24	0.0

Table 2

Proportion of statistical outliers in the calculation of mass coefficients of organs relative to body weight in gerbils

Organ	Total number of outliers, %			
	n	Males	*n*	Females
Heart	44	2,3	44	2,3
Lungs with trachea	44	11,4	44	0,0
Thymus	44	0.0	44	0.0
Liver	44	6.8	44	0.0
Spleen	44	0.0	44	2.3
Kidneys	44	2.3	44	4.5
Brain	44	2.3	44	0.0
Testicles	44	9.1	—	—
Ovaries	—	—	44	6.8
Adrenal glands	34	2.9	24	8.3

Table 3

Proportion of statistical outliers in the calculation of mass coefficients of organs relative to the brain in gerbils

Organ	Total number of outliers, %			
	n	Males	*n*	Females
1	2	3	4	5
Heart	44	0.0	44	0.0
Lungs with trachea	44	4.5	44	0.0
Thymus	44	0.0	44	0,0
Liver	44	0.0	44	0.0
Spleen	44	2.3	44	0.0

Table 3 (the end)

1	2	3	4	5
Kidneys	44	0.0	44	2.3
Testicles	44	2.3	—	—
Ovaries	—	—	44	9.1
Adrenal glands	34	2.9	24	0.0

It should be noted that the greatest variability is observed in such indicators as mass coefficients of the lungs, liver, testicles in males and adrenal glands in females relative to body weight, as well as mass coefficients of the ovaries relative to the brain. The variability of the values of mass coefficients relative to body weight is most likely associated with a large range of body weight, in particular, of males.

The calculated reference intervals for all organ indicators are presented in Tables 4—6.

Table 4

Reference intervals of absolute organ weight (g), reference value (90 % confidence interval)

Organ	Males			Females		
	n	Lower limit	Upper limit	*n*	Lower limit	Upper limit
Heart	44	0,163 (0.137—0.191)	0.469 (0.430—0.500)	44	0.172 (0.151—0.200)	0.415 (0.381—0.446)
Lungs with trachea	42	0.251 (0.214—0.290)	0.639 (0.598—0.679)	43	0.225 (0.183—0.276)	0.652 (0.609—0.695)
Thymus	44	0.002 (0.0—0.014)	0.137 (0.120—0.151)	44	0.011 (0.0—0.022)	0.131 (0.115—0.143)
Liver	44	1.370 (1.170—1.595)	3.603 (3.321—3.835)	44	1.192 (1.002—1.422)	3.445 (3.181—3.644)
Spleen	43	0.024 (0.014—0.034)	0.108 (0.097—0.118)	44	0.018 (0.010—0.029)	0.119 (0.107—0.130)
Kidneys	44	0.387 (0.345—0.442)	0.907 (0.851—0.954)	43	0.404 (0.352—0.457)	0.855 (0.796—0.901)
Brain	44	0.878 (0.842—0.918)	1.244 (1.210—1.283)	44	0.840 (0.799—0.878)	1.245 (1.195—1.285)
Testicles	42	0.690 (0.574—0.784)	1.580 (1.495—1.672)	—		
Ovaries	—			44	0.000 (0.0—0.0)	0.194 (0.127—0.241)
Adrenal glands	33	0.019 (0.012—0.028)	0.083 (0.074—0.089)	24	0.012 (0.005—0.022)	0.072 (0.064—0.082)

Note. Here and in Tables 5, 6: n is the number of values after excluding outliers from the sample.

Table 5

Reference intervals for organ mass coefficients calculated as the ratio of organ mass to body mass, %, reference value (90 % confidence interval)

Organ	Males			Females		
	n	Lower limit	Upper limit	*n*	Lower limit	Upper limit
Heart	43	0.361 (0.327—0.396)	0.703 (0.665—0.744)	43	0.391 (0.364—0.422)	0.693 (0.653—0.732)
Lungs with trachea	39	0.487 (0.456—0.526)*	1.293 (1.097—1.535)*	44	0.376 (0.298—0.459)	1.270 (1.155—1.369)
Thymus	44	0.000 (0.0—0.018)	0.255 (0.226—0.285)	44	0.010 (0.0—0.029)	0.261 (0.230—0.289)
Liver	41	3.544 (3.403—3.713)	4.941 (4.753—5.074)	44	2.917 (2.661—3.211)	5.617 (5.337—5.862)
Spleen	44	0.024 (0.006—0.040)	0.213 (0.184—0.234)	43	0.037 (0.018—0.059)	0.214 (0.195—0.235)
Kidneys	43	0.735 (0.675—0.811)	1.423 (1.334—1.508)	42	0.835 (0.787—0.903)	1.451 (1.379—1.532)
Brain	43	0.997 (0.851—1.179)	2.538 (2.310—2.741)	44	1.242 (1.061—1.358)	2.677 (2.514—2.825)
Testicles	40	1.223 (1.115—1.341)	2.426 (2.256—2.602)	—		
Ovaries	—			41	0.000 (0.0—0.028)	0.227 (0.195—0.258)
Adrenal glands	33	0.049 (0.039—0.058)	0.119 (0.111—0.128)	22	0.042 (0.035—0.052)	0.100 (0.092—0.109)

* values calculated after the Box—Cox transformation.

Table 6

Reference intervals for organ mass coefficients calculated as the ratio of organ mass to brain mass, %, reference value (90 % confidence interval)

Organ	Males			Females		
	n	Lower limit	Upper limit	*n*	Lower limit	Upper limit
1	2	3	4	5	6	7
Heart	44	13.59 (10.74—17.10)	45.23 (40.86—49.03)	44	17.89 (16.12—19.99)	39.37 (36.84—41.77)
Lungs with trachea	42	23.52 (19.86—26.85)	59.61 (55.15—63.39)	44	21.85 (18.87—25.84)	61.15 (56.34—66.40)
Thymus	44	0.36 (0.0—1.58)	12.79 (11.18—14.02)	44	1.61 (0.62—2.67)	12.20 (11.02—13.08)
Liver	44	141.9 (122.8—161.4)	331.2 (311.9—350.9)	44	119.6 (99.65—141.0)	322.3 (298.7—339.9)

Table 6 (the end)

1	2	3	4	5	6	7
Spleen	43	2.23 (1.34—3.12)	10.08 (8.99—11.15)	44	2.29 (1.48—3.22)	10.92 (9.98—11.87)
Kidneys	44	37.36 (33.45—41.77)	84.57 (79.41—89.04)	43	41.34 (37.08—46.09)	80.14 (75.96—84.43)
Testicles	43	57.40 (48.10—67.67)	151.5 (140.5—161.3)	—		
Ovaries	—			40	0.42 (0.0—1.62)	10.77 (9.68—11.88)
Adrenal glands	33	1.95 (1.35—2.67)	7.62 (6.79—8.35)	24	1.12 (0.50—1.94)	6.95 (5.98—7.95)

The calculated reference values for all indicators in males and females form similar intervals. Statistically significant differences between the genders were noted in the analysis of absolute mass and mass coefficients relative to the body mass of the adrenal glands (paired T-test, $p < 0.05$), while no differences were found when comparing mass coefficients relative to brain. These changes in the indicators may be associated with the small weight of the organ against the background of large ranges of body mass.

Absolute values of the liver, spleen and kidney mass recorded in the animals of the control group were found in the literature [9].

These data in females and the spleen and kidney indicators in males fit within the limits of the intervals we calculated. The liver mass values in males in the cited work slightly exceed the limit of the reference range we have established, but fall within the confidence interval of the upper limit.

CONCLUSION

The Mongolian gerbil is a common experimental test system in pharmacodynamic studies. Gerbils are used to a lesser extent in regulatory toxicology studies compared to other rodents, which limits the available volume of reference information on these animals. In particular, the literature contains virtually no data on the mass of internal organs used to identify possible toxic effects of the studied drugs. The calculated reference intervals provide the opportunity to correctly evaluate the results if it is necessary to conduct toxicology experiments on gerbils. The reference intervals we obtained are comparable with the data presented in the literature.

When using the calculated reference intervals, it is necessary to take into account the small sample of animals and, if necessary, be guided by the confidence intervals of the upper or lower limits.

REFERENCES

1. *Rybakova A. V., Makarova M. N.* Use of gerbils for biomedical research // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii (International Bulletin of Veterinary Medicine). 2017. No. 2. P. 117—124.

2. *Ito U, Hakamata Y, Yamaguchi T, Ohno K.* Cerebral ischemia model using Mongolian gerbils-comparison between unilateral and bilateral carotid occlusion models. Brain Edema XV. — Springer Vienna, 2013. 17—21. doi: 10.1007/978-3-7091-1434-6_3

3. *Lee JC, Won MH.* Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils. Anatomy & cell biology. 2014; 47(3): 149. doi: 10.5115/acb.2014.47.3.149

4. *Miroshnikov M. V., Sultanova K. T., Kovaleva M. A.* Variability of blood biochemical indicators and establishment of reference intervals in preclinical studies. Communication 10: Mongolian gerbils // Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy (Laboratory animals for research). 2023; 3. 74—83. doi: 10.57034/2618723X-2023 03 06

5. *Vincent AL, Rodrick GE, Sodeman WAJr.* The pathology of the Mongolian Gerbil (Meriones unguiculatus): a review. Laboratory animal science. 1979; 29(5): 645—651.

6. *Goldenring JR, Nam KT.* Oxyntic atrophy, metaplasia, and gastric cancer. Progress in molecular biology and translational science. 2010; 96: 117—131. doi: 10.1016/B978-0-12-381280-3.00005-1

7. *Ruiz TFR, Vilamaior PSL, Grigio V, Colleta SJ, Zucão MI, de Campos SGP, dos Santos FCA.* et al. The Mongolian Gerbil as a Useful Experimental Model in Reproductive Bi-

ology. Reproductive Sciences. 2023; 30(7): 2092—2106. doi: 10.1007/s43032-023-01171-6

8. *Makarova M. N., Makarov V. G.* Use of gerbils in preclinical studies // Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy (Laboratory animals for research). 2024. No. 1. doi: 10.57034/2618723X-2024—01—01

9. *Port CD, Baxter DW, Richter WR.* The Mongolian gerbil as a model for chronic lead toxicity. Journal of Comparative Pathology. 1975; 85(1): 119—131. doi: 10.1016/0021—9975(75)90090—0

10. *Sellers RS, Mortan D, Michael B.* Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. Toxicologic pathology. 2007; 35(5): 751—755. doi: 10.1080/01926230701595300

11. *Simonova E. V., Savvateykina A. I., Sultanova K. T., Makarova M. N., Mazukina E. V.* Reference intervals for mass coefficients of organs of dwarf pigs and their absolute values // Veterinarnaya patologiya (Veterinary pathology). 2024. Vol. 23. No. 2. P. 41—50. doi: 10.23947/2949-4826-2024-23-2-41-50

12. *Geffré A, Concordet D, Braun J-P, Trumei C.* Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. Veterinary Clinical Pathology. 2011; 40: 107—112. doi:10.1111/j.1939—165X.2011.00287.x

13. *Horowitz GL.* CLSI Document C28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, third edition. USA: CLSI; 2010. 61 p.

14. *Daly CH, Higgins V, Adeli K, Grey VL, Hamid JS.* Reference interval estimation: methodological comparison using extensive simulations and empirical data. Clinical Biochemistry. 2017; 50(18): 1145—1158. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.005

15. *Pavlov IY, Wilson AR, Delgado JC.* Reference interval computation: which method (not) to choose? Clinica Chimica Acta. 2012; 413(13—14): 1107—1114. doi: 10.1016/j.cca.2012.03.005

16. *Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J.* ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. Veterinary clinical pathology. 2012; 41(4): 441—453. doi: 10.1111/vcp.12006

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

E. V. Simonova — Scientific Associate, Department of Experimental Pharmacology and Toxicology;

K. T. Sultanova — Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Experimental Pharmacology and Toxicology.

CONTRIBUTION OF THE AUTHORS

Simonova E. V. — analysis of scientific literature data, statistical processing and analysis of the data obtained, formulation of the conclusion.

Sultanova K. T. — editing the text, approval of the final version of the manuscript.

The authors declare no conflicts of interests.

The article was submitted 07.02.2025.

Научная статья
УДК 619:57.084.1

ОПТИМАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ЭВТАНАЗИИ ЛОШАДЕЙ-ПРОДУЦЕНТОВ ИММУННЫХ СЫВОРОТОК

Евгений Юрьевич Иванятов[*]✉, Илья Владимирович Шамин[*], Роман Александрович Свинцов[*], Мария Владимировна Овчинникова[*], Елена Геннадьевна Абрамова[*, **], Алексей Владимирович Разживин[*]

[*]Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Саратов, Россия, evgeny.ivanyatov@yandex.ru✉
[**]Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова, Саратов, Россия

Аннотация. В статье представлены результаты поиска оптимальных методов эвтаназии лошадей-продуцентов, используемых в производстве иммунобиологических лечебно-профилактических и диагностических препаратов, которые должны соответствовать следующим критериям: гуманность, экономическая эффективность, доступность и простота исполнения. Выбор медикаментозных методов эвтаназии (интратекального введения лидокаина, внутривенного введения магния сульфата) гуманнее, рентабельнее и проще в исполнении для ветеринарного специалиста, чем физические методы. Кроме того, некоторые физические методы запрещены на законодательном уровне, в соответствии с нормативными документами по охране животных. В статье приводятся данные из российских и зарубежных литературных источников, описывающих методы проведения эвтаназии. Представлен алгоритм проведения процедуры: осуществление венозного доступа, введение успокоительных препаратов, миорелаксантов и средств для наркоза, техника самой процедуры эвтаназии и подтверждение смерти животного.
Ключевые слова: эвтаназия, физические методы, медикаментозные методы, лошади-продуценты

Эвтаназия — прекращение жизни животного, страдающего неизлечимым заболеванием и испытывающего вследствие этого заболевания невыносимые страдания. Данная процедура является одним из важнейших аспектов гуманного обращения с животными. У лошадей-продуцентов показаниями для эвтаназии являются: хронические неизлечимые заболевания, такие как ламинит, онкологические патологии (прогрессирующая меланома, лимфосаркома, лейкоз), эмфизема легких, заболевания сердечно-сосудистой системы (миокардоз, кардиомегалия), экстренные тяжелые состояния (перелом конечности, разрыв желудка, кишечника, перитонит, сепсис); сбои в адаптационных механизмах и социализации животного, которое может представлять опасность для себя, других лошадей и персонала; истечение срока эксплуатации в связи с возрастом животного; нарушение иммунного статуса лошади (иммунодефицит, иммунологическая толерантность).

Цель работы — провести анализ различных методов эвтаназии и определить оптимальные гуманные методы по отношению к лошадям-продуцентам, простые в исполнении и рентабельные для производства иммунобиологических, лечебно-профилактических и диагностических препаратов.

В настоящее время эвтаназия животных проводится физическими и медикаментозными методами.

К физическим методам эвтаназии относят огнестрельное смертельное ранение, применение тока, обескровливание, удар по голове [1, 2].

Все перечисленные методы требуют специальной подготовки персонала; разрешения на покупку, хранение и использование оружия, и, кроме того, они в разы уступают по простоте медикаментозным методам. Согласно Директиве Европейского парламента и совета Европейского союза 2010/63/EU данные методы не рекомендованы к использованию [3, 4].

Такой физический метод эвтаназии, как обескровливание, применим (по показаниям) у животных-продуцентов для получения максимального объема иммунной крови, но только тогда, когда животное находится под седацией или анестезией.

Прежде чем рассматривать медикаментозные методы эвтаназии, отметим первый общий этап этих методов — наркоз. Все медикаментозные методы являются гуманными, так как они проводятся под общей анестезией, которая включает в себя миорелаксацию, потерю сознания и обезболивание. Наркоз — искусственно вызванное обратимое состояние торможения центральной нервной системы, при котором возникает выключение сознания, миорелаксация (расслабление скелетной мускулатуры) и анальгезия (обезболивание). Применять средства для эвтаназии можно только в том случае, если предварительно отключено сознание животного и достигнуто состояние анальгезии! В противном случае умерщвление будет сопровождаться сильными болевыми ощущениями [1, 5—9].

Большое внимание необходимо уделить выбору места для эвтаназии. Это должно быть большое помещение, свободное от препятствий, тихое и легкодоступное для последующей утилизации тела животного. Благодаря правильно подобранному помещению снижается стресс у уже страдающей лошади и предотвращается выброс адреналина, который в свою очередь снижает действие средств для наркоза [10, 11].

Нервные клетки получают информацию при помощи синаптического контакта по всей поверхности дендрита и тела клетки. Импульсы, перемещаясь в пресинаптических волокнах, распространяются до терминальных веток и деполяризуют нервные окончания. Эта деполяризация открывает кальциевые каналы, способствуя поступлению кальция в нервные окончания. Повышение внутриклеточной концентрации кальция, в свою очередь, вызывает внеклеточную секрецию трансмиттера нервными окончаниями.

Высвобожденный трансмиттер диффундирует через синаптическую щель и присоединяется к специфическим рецепторам на постсинаптической мембране. Активация рецепторов приводит к изменению проницаемости клеточной мембраны по отношению к некоторым ионам, что, в свою очередь, приводит к изменению мембранного потенциала и к возбуждению или угнетению постсинаптического нейрона, в зависимости от вида синапса. Общие анестетики угнетают синаптическую трансмиссию [1, 8, 9].

Для лошадей используют комбинированный наркоз [2, 6]. Сначала обеспечивают внутривенный доступ — ставят катетер в яремную вену. Перед введением основного наркозного препарата лошади вводится седативный препарат альфа-2-адренергических антагонистов (чаще всего ксилазин в дозе 0,8—1,1 мг/кг, детомидин в дозе 10—20 мкг/кг или седивет в дозе 80—100 мкг/кг). Седация обеспечивает хорошую миорелаксацию гладкой скелетной мускулатуры, пролонгирует и улучшает действие основного наркозного препарата. В качестве общего наркоза применяют раствор тилетамина и золазепама (Золетил) в дозе 0,7—1 мг/кг.

Тилетамин — общий анестетик диссоциативного действия, вызывающий выраженный анальгетический эффект, но не достаточное расслабление мышц. Тилетамин не подавляет глоточный, гортанный, кашлевой рефлексы, не угнетает дыхательную систему.

Золазепам — угнетает подкорковые зоны мозга, вызывая анксиолитическое и седативное действие, расслабляет поперечнополосатую мускулатуру. Усиливает анестетическое действие тилетамина, улучшает мышечную релаксацию.

При введении комбинации Золетила (Телазола) с ксилазином или детомидином понижается артериальное кровяное давление, частота сердечных сокращений и дыхательных движений, регистрируется угнетение и торможение центральной нервной системы, подкорковых зон головного мозга [7, 8, 11—16].

Рассмотрим распространенные на территории РФ и ближнего зарубежья препараты для медикаментозной эвтаназии и остановимся на некоторых особенностях их применения.

Передозировка препаратами для наркоза

Наиболее простой в применении вариант эвтаназии — передозировка средствами для наркоза. Это гуманный, но экономически невыгодный способ, так как затраты на него в 2—3 раза превышают таковые при использовании других методов. Для этого применяют такие ветеринарные препараты, как рометар, ксиланит, ксила (ксилазин), золетил, телазол (комбинация анестетика тилетамина и миорелаксанта золазепама) [7, 8, 14, 18—22].

Эвтаназия с использованием передозировки барбитуратов

Пентобарбитал натрия и тиопентал натрия при внутривенном введении в больших объемах угне-

тают центральную нервную систему лошадей, вызывают глубокую бесконтрольную анестезию, прогрессирующую до остановки сердца и дыхания. Этот метод легок в исполнении и дешевый. Однако во многих странах барбитураты могут быть недоступны или находиться в специальном списке учета, а их применение может регулироваться законодательством, что требует получения лицензии на использование [19, 22, 24, 26, 29, 33].

Эвтаназия с использованием препарата Т-61

В ряде стран (Германия, Дания, Италия, Словения, Чехия) для осуществления эвтаназии используют препарат Т-61. В его состав входят такие компоненты, как эмбутрамид, тетракаина гидрохлорид, мебезониума йодид. Согласно инструкции по применению указанный препарат рекомендуется вводить животному внутривенно, внутрисердечно или внутрилегочно.

Эмбутрамид вызывает угнетение клеток коры головного мозга, за счет чего оказывается анестезирующее воздействие на центральную нервную систему. Гидрохлорид тетракаина оказывает местное обезболивающее действие, устанавливаемое в течение нескольких минут. Йодид мебезониума относится к миорелаксантам. Он блокирует передачу импульсов от нервных окончаний к мышцам, оказывая курареподобное воздействие и вызывая паралич дыхательной мускулатуры [8, 9, 20].

В описании препарата Т-61 указывается, что сначала действуют анестезирующие компоненты, вызывающие наркотическое состояние, и лишь потом наступает паралич дыхательных органов, остановка сердца и смерть головного мозга. Таким образом, инъекция данного препарата призвана приводить к быстрому, надежному и безболезненному умерщвлению животного без проявления возбуждения. Однако на практике владельцы животных нередко жалуются на то, что их питомцы перед смертью испытывали судороги, боли и мучения. Аналогичные мнения высказывали и ветеринарные врачи. Существует достаточно высокая вероятность того, что расслабление мышечной ткани наступает до того, как животное погружается в наркотический сон и происходит полное отключение сознания. В результате умерщвление производится негуманным способом, так как животное испытывает перед смертью сильные страдания.

Т-61 должен применяться только в комплексе со снотворными препаратами. Стоит также отметить, что внутрилегочные и внутрисердечные инъекции сами по себе во многих странах отнесены к жестоким методам эвтаназии и применяются крайне ограниченно. Общество защиты животных США (HSUS) относит применение препарата Т-61 к негуманным методам усыпления и не рекомендует его использовать с целью эвтаназии [5, 23].

Интратекальная эвтаназия лидокаином

Лидокаин относится к анестетикам амидного типа. Он оказывает местно-анестезирующее действие, стабилизируя мембраны нейронов и снижая их проницаемость для ионов, что препятствует генерации и проведению нервных импульсов. Подобный эффект наблюдается на возбудимых мембранах клеток сердечной мышцы и головного мозга. Лидокаин характеризуется высокой анестезирующей активностью.

При введении лидокаина в субарахноидальное пространство со стороны нервной системы наступает паралич дыхательных мышц, остановка дыхания, моторный и чувствительный блок. Со стороны сердечно-сосудистой системы происходит снижение артериального давления, коллапс, брадикардия вплоть до остановки сердца. В результате наступает гипоксия и гибель мозга [1, 5, 10]. В первую очередь прекращается функционирование ствола мозга, о чем свидетельствует отсутствие его рефлексов, прекращается церебро-кортикальная активность [9, 10, 23—29].

Техника проведения процедуры интратекальной эвтаназии. Лошадь после введения в наркоз следует положить в боковое положение и найти атлантозатылочный сустав на дорсальной средней линии, на уровне краниальной границы крыльев атланта, определив анатомические ориентиры. После этого в сустав вводится 3,5-дюймовый катетер 18 или 20 размера или спинальная игла. Спинальная игла (скос направлен в сторону головы) направляется к губным спайкам или нижней челюсти по дорсальной средней линии в субарахноидальное пространство. Иглу следует медленно продвигать через кожу, мышцу и затылочную связку до тех пор, пока не возникнет ощущение хлопка, сопровождающееся снижением сопротивления при входе в субарахноидальное пространство. Если используется катетер, после удаления стилета из втулки начнет вытекать прозрачная спинномозговая жидкость. Если жидкости во втулке не наблюдается, иглу можно повернуть на 90 градусов, чтобы попытаться получить доступ в субарахноидальное пространство. После успешного вхождения в субарахноидальное про-

странство и удаления шпильки (если она использовалась) надо подсоединить удлинитель (при необходимости). 10 % раствор лидокаина гидрохлорида вводится из расчета 2,6—4 мг/кг. Данный метод эвтаназии является приемлемым с точки зрения гуманности, рентабельности, но есть один большой недостаток — это сложность проведения процедуры. Интратекальное введение лидокаина требует узконаправленной подготовки ветеринарного специалиста [2, 8, 17, 18, 25—27, 30—32].

Внутривенное введение сульфата магния

Данный метод эвтаназии проводится под общей анестезией во избежание клонических спазмов и мышечных фасцикуляций.

Сульфат магния — широко распространенное вещество, применяется и в гуманной медицине. Его кристаллическая форма — английская соль используется местно, например, в форме раствора при замачивании копыт лошадей. Перорально применяют для улучшения пищеварения или как слабительное средство. При парентеральном введении лошадям оказывает снотворное действие, угнетает сердечнососудистый и дыхательный центр. При использовании в больших дозах он может привести к остановке сердечной деятельности и последующему коллапсу. Насыщенный раствор сульфата магния можно приготовить самостоятельно из расчета 360 г $MgSO_4$ на 1 л воды (20 °С) [3, 11, 18, 23, 33—35].

Каким бы способом/методом не проводилась эвтаназия, после процедуры ветеринарный специалист подтверждает смерть животного (отсутствие дыхания, пульса и роговичного рефлекса).

Для определения экономической эффективности медикаментозных методов эвтаназии были выбраны наиболее распространенные и доступные лекарственные препараты и медицинские изделия для проведения процедуры (табл. 1).

Таблица 1

Перечень препаратов и расходных материалов для эвтаназии

Название / Производитель	Состав	Цена	Дозировка	Стоимость процедуры
1	2	3	4	5
Эвтаназия с применение магния сульфата				
Ксиланит 50 мл / ООО «Нита-Фарм», Россия	ксилазина гидрохлорид — 20 мг	705 руб.	3—5 мл / 100 кг	3600 руб.
Телазол 100 мг / Зоэтис, Испания	50 мг тилетамина (в форме тилетамина гидрохлорида) и 50 мг золазепама (в форме золазепама гидрохлорида)	5500 руб.	5 мл / 500 кг	
Магния сульфат 25 г., 20 пак. / ОАО «Ивановская фармацевтическая фабрика», Россия	магния сульфат — 25 г	400 руб.	2 мл / кг	
Катетер внутривенный 14G / SuruInternational PvtLtd (Индия)	длина 45 мм, диаметр 2,0 мм, цвет оранжевый, стерильный	20 руб.	—	
Системы инфузионные Sana / ООО «ТК НИКЕС», Россия	заборная игла из АВС пластика (1,2×40 мм), гибкая магистраль с регулятором течения, фильтр с воздушным клапаном	15 руб.	—	

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
Интратекальная эвтаназия с лидокаином				
Ксиланит 50 мл / ООО «Нита-Фарм», Россия	ксилазина гидрохлорид — 20 мг	705 руб.	3—5 мл / 100 кг	3400 руб.
Телазол 100 мг / Зоэтис, Испания	50 мг тилетамина (в форме тилетамина гидрохлорида) и 50 мг золазепама (в форме золазепама гидрохлорида)	5500 руб.	5 мл / 500 кг	
Лидокаин буфус 100 мг/мл 2 мл № 10 / АО «ПФК Обновление», Россия	лидокаина гидрохлорид — 100 мг	140 руб.	2,6—4 мг/кг	
Игла спинальная 20G 90 мм, срез Квинке / SuruInternationalPvtLtd, Индия	игла спинальная 20G 90 мм, срез Квинке, без проводниковой иглы MediSpine	100 руб.		
Передозировка препаратами для наркоза				
Ксиланит 50 мл / ООО «Нита-Фарм», Россия	ксилазина гидрохлорид — 20 мг	705 руб.	3—5 мл / 100 кг	11 705 руб.
Телазол 100 мг / Зоэтис, Испания	50 мг тилетамина гидрохлорида и 50 мг золазепама гидрохлорида	5500 руб.	20 мл / 500 кг	

На основании представленных данных можно сделать вывод, что все медикаментозные методы эвтаназии являются гуманными, так как проводятся под общим наркозом, при этом отключается сознание, наступает угнетение подкорковых зон мозга, миорелаксация и анальгезия.

Наиболее оптимальным методом для лошадей-продуцентов, используемых в производстве диагностических и лечебно-профилактических препаратов, является эвтаназия с применением сульфата магния. Эта процедура проста в техническом исполнении для ветеринарных специалистов в условиях производства. С экономической точки зрения эвтаназия с применением сульфата магния в 2 раза дешевле передозировки средств для наркоза. В заключении можно отметить, что альтернативой является интратекальная эвтаназия лидокаином, так как она очень эффективна, но сложна в техническом исполнении и проводится в условиях стационара под контролем, с применением дополнительного оборудования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Полатайко О. Р.* Ветеринарная анестезия: практическое пособие. — К.: Перископ, 2009. — 408 с.

2. *Aleman M.* Cerebral and brainstem electrophysiologic activity during euthanasia with pentobarbital sodium in horses / M. Aleman, D. C. Williams, A. Guedes [et al.] // J Vet Intern Med. — 2015. — v. 29(2). — P. 663—672. doi: 10.1111/jvim.12570

3. DIRECTIVE2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. — Electronic resource. — http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj (report dated March 2025).

4. *Рыбакова А. В.* Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с европейской директивой 2010/63 / А. В. Рыбакова, М. Н. Макарова // Международный вестник ветеринарии. — 2015. — № 2. — С. 96—107.

5. *Бетшарт-Вольфенсбергер Р.* Ветеринарная анестезиология: учебное пособие / Р. Бетшарт-Вольфенсбергер, А. А. Стекольников, А. Ю. Нечаев. — СПб.: СпецЛит, 2010. — 270 с.

6. *Ковач М.* Колики лошади. Причины. Диагноз. Лечение / М. Ковач. — М.: Королевский издательский дом, 2010. — 234 с.

7. *Greene S. A.* Pros and cons of using alpha-2 agonists in small animal anesthesia practice / S. A. Greene // Clin Tech Small Anim Pract. — 1999. — v. 14(1). — P. 10—14. doi: 10.1016/s1096—2867(99)80022-x

8. *Pratt S.* A prospective randomized trial of lidocaine 30 mg versus 45 mg for epidural test dose for intrathecal injection in the obstetric population / S. Pratt, A. Vasudevan, P. Hess // Anesth Analg. — 2013. — v. 116(1). — P. 125—132. doi: 10.1213/ANE.0b013e31826c7ebe

9. *Taylor P. M.* Handbook of equine anaesthesia / P. M. Taylor, K. W. Clarke. — Saunders Elsevier, 2007. — 228 pp. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.10.016

10. *Aleman M.* Electrophysiologic study of a method of euthanasia using intrathecal lidocaine hydrochloride administered during intravenous anesthesia in horses / M. Aleman, E. Davis, D. C. Williams [et al.] // J Vet Intern Med. — 2015. — v. 29(6). — P. 1676—1682. doi: 10.1111/jvim.13607

11. *Cistola A. M.* Anesthetic and physiologic effects of tiletamine, zolazepam, ketamine, and xylazine combination (TKX) in feral cats undergoing surgical sterilization / A. M. Cistola, F. J. Golder, L. A. Centonze [et al.] // J Feline Med Surg. — 2004. — v. 6(5). — P. 297—303. doi: 10.1016/j.jfms.2003.11.004

12. Клиническая фармакология: национальное руководство / под ред. Ю. Б. Белоусова, В. Г. Кукеса, В. К. Лепахина и др. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. — 976 с.

13. *Doherty T. J.* Physiologic effects of alpha 2-adrenergic receptors / T. J. Doherty // J Am Vet Med Assoc. — 1988. — v. 192(11). — P. 1612—1614.

14. *Schmidt-Oechtering G. U.* Ein beitrag zur anästhesie des pferdes mit xylazin und ketamin. Teil 2: Die anästhesie des adulten pferdes [Anesthesia of horses with xylazine and ketamine. 2. Anesthesia in adult horses] / G. U. Schmidt-Oechtering, M. Alef, M. Röcken // Tierarztl Prax. — 1990. — v. 18(1). — P. 47—52.

15. *Aleman M.* Brainstem auditory evoked responses in an equine patient population. Part II: foals / M. Aleman, J. E. Madigan, D. C. Williams [et al.]. // J Vet Intern Med. — 2014. — v. 28(4). — P. 1318—1324. doi: 10.1111/jvim.12377

16. *McGrath S.* Randomized blinded controlled clinical trial to assess the effect of oral cannabidiol administration in addition to conventional antiepileptic treatment on seizure frequency in dogs with intractable idiopathic epilepsy / *S. McGrath,* L. R. Bartner, S. Rao [et al.]. // J Am Vet Med Assoc. — 2019. — v. 254(11). — P. 1301—1308. doi: 10.2460/javma.254.11.1301

17. *Williams D. C.* Qualitative and quantitative characteristics of the electroencephalogram in normal horses after sedation / D. C. Williams, M. Aleman, B. Tharp [et al.]. // J Vet Intern Med. — 2012. — v. 26(3). — P. 645—653. doi: 10.1111/j.1939—1676.2012.00921.x

18. *Knottenbelt D.* Euthanasia of horses — alternatives to the bullet / D. Knottenbelt // In Practice. — 1995. — v. 17(10). — P. 462—464. doi: 10.1136/inpract.17.10.462

19. *Marsh R. R.* Resistance of the auditory brain stem response to high barbiturate levels / R. R. Marsh, T. C. Frewen, L. N. Sutton [et al.]. // Otolaryngol Head Neck Surg. — 1984. — v. 92(6). — P. 685—688. doi: 10.1177/01945998 8409200616

20. *Sutton L. N.* The effects of deep barbiturate coma on multimodality evoked potentials / L. N. Sutton, T. Frewen, R. Marsh [et al.]. // J Neurosurg. — 1982. — v. 57(2). — P. 178—185. doi: 10.3171/jns.1982.57.2.0178

21. *Bobbin R. P.* Effects of pentobaribtal and ketamine on brain stem auditory potentials. Latency and amplitude intensity functions after intraperitoneal administration / R. P. Bobbin, J. G. May, R. L. Lemoine // Arch Otolaryngol. — 1979. — v. 105(8). — P. 467—470. doi: 10.1001/archotol.1979.00790200029006

22. *Stockard J. J.* Effects of hypothermia on the human brainstem auditory response / J. J. Stockard, F. W. Sharbrough, J. A. Tinker // Ann Neurol. — 1978. — v. 3(4). — P. 368—370. doi: 10.1002/ana.410030416

23. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. https://www.avma.org/sites/default/files/2020-01/2020-Euthanasia-Final-1-17-20.pdf.

24. *De Lahunta, A.* Veterinary neuroanatomy and clinical neurology / A. De Lahunta. — Saunders Elsevier, 2009. — 544 p.

25. *Fikes L. W.* A preliminary comparison of lidocaine and xylazine as epidural analgesics in ponies / L. W. Fikes, H. C. Lin, J. C. Thurmon // Vet Surg. — 1989. — v. 18(1). — P. 85—86. doi: 10.1111/j.1532—950x.1989.tb01046.x

26. *Mayhew I. G.* Collection of cerebrospinal fluid from the horse / *I. G. Mayhew* // Cornell Vet. — 1975. — v. 65(4). — P. 500—511.

27. *Muir W. W.* Equine Anesthesia: Monitoring and Emergency Therapy, 2nd Edition / W. W. Muir, J. A. E. Hubbell. — Elsevier Health Sciences, 2008. — 508 p.

28. *Sharbrough F. W.* Brainstem auditory-evoked responses in spastic dysphonia / F. W. Sharbrough, J. J. Stockard, A. E. Aronson // Trans Am Neurol Assoc. — 1978. — v. 103. — P. 198—201.

29. *Aleman M.* Brainstem auditory evoked responses in an equine patient population: part I-adult horses / M. Aleman, T. A. Holliday, J. E. Nieto [et al.]. // J Vet Intern Med. — 2014. — v. 28(4). — P. 1310—1317. doi: 10.1111/jvim.12379

30. *Amaral L. A.* Utilização de lidocaína 2 % por via intratecal associado à anestesia prévia com tiopental sódico como método de eutanásia em equinos / L. A. Amaral, V. R. Rabassa, M. Marchiori [et al.]. // ARS Veterinaria (Brasil). — 2011. — v. 27. — P. 011—016.

31. *Close B.* Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission / B. Close, K. Banister, V. Baumans [et al.]. // Lab Anim. — 1996. — v. 30(4). — P. 293—316. doi: 10.1258/002367796780739871

32. *Johnson P. J.* Satellite article: Collection of cerebrospinal fluid from horses / P. J. Johnson, G. M. Constantinescu // Equine veterinary education. — 2000. — v. 12(1). — P. 7—12.

33. *Monteiro L. M.* Transcranial doppler ultrasonography to confirm brain death: a meta-analysis / L. M. Monteiro, C. W. Bollen, A. C. van Huffelen [et al.]. // Intensive Care Med. — 2006. — v. 32(12). — P. 1937—1944. doi: 10.1007/s00134-006-0353-9

34. *Sloan T. B.* Anesthetic effects on electrophysiologic recordings / T. B. Sloan // J Clin Neurophysiol. — 1998. — v. 15(3). — P. 217—226. doi: 10.1097/00004691-199805000-00005

35. *Стекольников А. А.* Местное и общее обезболивание животных / А. А. Стекольников, В. А. Лукьяновский, И. Б. Самошкин. — СПб: Издательство «Лань», 2004. — 208 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. Ю. Иванятов — младший научный сотрудник;
И. В. Шамин — младший научный сотрудник;
Р. А. Свинцов — кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник;
М. В. Овчинникова — кандидат биологических наук, зав. отделом;
А. В. Разживин — младший научный сотрудник;
Е. Г. Абрамова — доктор биологических наук, главный научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 17.03.2025.

Original article
UDC 619:57.084.1

OPTIMAL METHODS OF EUTHANASIA FOR SERUM HORSES

Evgeniy Yuryevich Ivanyatov[*]✉, Ilya Vladimirovich Shamin[*], Roman Aleksandrovich Svintsov[*], Mariya Vladimirovna Ovchinnikova[*], Elena Gennadyevna Abramova[*, **], Aleksey Vladimirovich Razzhivin[*]

[*]FGSI Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Saratov, Russia, evgeny.ivanyatov@yandex.ru✉
[**]Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N. I. Vavilov, Saratov, Russia

Abstract. The article presents the results of the search for optimal methods of euthanasia of serum horses used in the production of immunobiological therapeutic, prophylactic and diagnostic drugs, which must meet the following criteria: humaneness, cost-effectiveness, availability and ease of implementation. The choice of drug-induced methods of euthanasia (intrathecal administration of lidocaine, intravenous administration of magnesium sulfate) is more humane, cost-effective and easier to perform for a veterinarian than physical methods. In addition, some physical methods are prohibited by law, in accordance with regulatory documents on animal welfare. The article provides the data from Russian and foreign literary sources describing the methods of euthanasia. An algorithm for the procedure is presented: venous access, administration of sedatives, muscle relaxants and anesthetics, the technique of the euthanasia procedure itself and confirmation of the animal's death.
Keywords: euthanasia, physical methods, drug-induced methods, serum horses

Euthanasia is the termination of the life of an animal suffering from an incurable disease and experiencing unbearable suffering as a result of this disease. This procedure is one of the most important aspects of humane treatment of animals.

Indications for euthanasia in serum horses are chronic incurable diseases such as laminitis, oncological pathologies (progressive melanoma, lymphosarcoma, leukemia), pulmonary emphysema, cardiovascular diseases (myocardosis, cardiomegaly), emergency severe conditions (limb fracture, rupture of the stomach, intestines, peritonitis, sepsis); failures in the adaptation mechanisms and socialization of the animal, which may pose a danger to itself, other horses and personnel; expiration of the "service life" due to the age of the animal; violation of the immune status of the horse (immunodeficiency, immunological tolerance).

The objective of the work is to analyze various methods of euthanasia and determine the optimal humane methods in relation to serum horses, simple to implement and cost-effective for the production of immunobiological, therapeutic, prophylactic and diagnostic drugs.

Currently, animal euthanasia is carried out by physical and drug-induced methods.

Physical methods of euthanasia include fatal gunshot wounds, electric shock, exsanguination and blow on the head [1, 2].

All of the above methods require special training of personnel; permits to purchase, store and use weapons, and, in addition, they are much simpler than drug-induced methods. According to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union, these methods are not recommended for use [3, 4].

Such a physical method of euthanasia as exsanguination is applicable (according to indications) to serum animals to obtain the maximum volume of immune blood, but only when the animal is under sedation or anesthesia.

Before considering the drug-induced methods of euthanasia, let us note the first common stage of these methods — anesthesia. All drug-induced methods are humane, since they are carried out under general anesthesia, which includes muscle relaxation, loss of consciousness and pain relief. Anesthesia is an artificially induced reversible state of inhibition of the central

nervous system, which causes loss of consciousness, muscle relaxation (relaxation of skeletal muscles) and analgesia (pain relief). Euthanasia can only be used if the animal's consciousness is previously switched off and a state of analgesia is achieved! Otherwise, killing will be accompanied by severe pain [1, 5—9].

Much attention must be paid to the choice of a place for euthanasia. It should be a large room, free of obstacles, quiet and easily accessible for subsequent disposal of the animal's body. A properly selected room reduces stress in an already suffering horse and prevents the release of adrenaline, which in turn reduces the effect of anesthetics [10, 11].

Nerve cells receive information via synaptic contact across the entire surface of the dendrite and cell body. The impulses, moving in presynaptic fibers, spread to the terminal branches and depolarize the nerve endings.

This depolarization opens calcium channels, facilitating the entry of calcium into the nerve endings. An increase in the intracellular calcium concentration, in turn, causes extracellular secretion of the transmitter by the nerve endings. The released transmitter diffuses through the synaptic cleft and attaches to specific receptors on the postsynaptic membrane. The activation of the receptors leads to a change in the permeability of the cell membrane with respect to certain ions, which, in turn, leads to a change in the membrane potential and to excitation or inhibition of the postsynaptic neuron, depending on the type of synapse. General anesthetics inhibit synaptic transmission [1, 8, 9].

Combined anesthesia is used for horses [2, 6]. First, intravenous access is provided by inserting a catheter into the jugular vein. Before the main anesthetic drug is administered, the horse is given a sedative drug of alpha-2-adrenergic antagonists (most often xylazine at a dose of 0.8—1.1 mg/kg, detomidine at a dose of 10—20 mcg/kg or sedivet at a dose of 80—100 mcg/kg). Sedation provides good muscle relaxation of smooth skeletal muscles, prolongs and improves the effect of the main anesthetic drug. A solution of tiletamine and zolazepam (Zoletil) at a dose of 0.7—1 mg/kg is used as a general anesthetic.

Tiletamine is a general anesthetic with dissociative action, causing a pronounced analgesic effect, but not sufficient muscle relaxation. Tiletamine does not suppress the pharyngeal, laryngeal, cough reflexes, does not depress the respiratory system.

Zolazepam depresses the subcortical areas of the brain, causing anxiolytic and sedative effects, relaxes striated muscles. Enhances the anesthetic effect of tiletamine, improves muscle relaxation.

When a combination of Zoletil (Telazol) with xylazine or detomidine is administered, arterial blood pressure, heart rate and respiratory movements are reduced, and depression and inhibition of the central nervous system and subcortical areas of the brain are recorded [7, 8, 11—16].

Let us consider the drugs for medical euthanasia that are common in the Russian Federation and neighboring countries and dwell on some of the features of their use.

Overdose of anesthetic drugs

The easiest euthanasia option to use is an overdose of anesthetic drugs. This is a humane but economically disadvantageous method, since its costs are by 2—3 times higher than those of other methods. For this purpose, veterinary drugs such as rometar, xylanit, xyla (xylazine), zoletil, telazol (a combination of the anesthetic tiletamine and the muscle relaxant zolazepam) are used [7, 8, 14, 18—22].

Euthanasia using an overdose of barbiturates

Sodium pentobarbital and sodium thiopental, when administered intravenously in large volumes, depress the central nervous system of horses, causing deep uncontrolled anesthesia, progressing to cardiac and respiratory arrest. This method is easy to perform and inexpensive. However, in many countries, barbiturates may not be available or may be on a special list, and their use may be regulated by law, requiring a license for use [19, 22, 24, 26, 29, 33].

Euthanasia using T-61

In a number of countries (Germany, Denmark, Italy, Slovenia, the Czech Republic) T-61 is used for euthanasia. It contains such components as embutramide, tetracaine hydrochloride, mebesonium iodide. According to the instructions for use, this drug is recommended to be administered to the animal intravenously, intracardiacly or intrapulmonarily.

Embutramide causes inhibition of the cells of the cerebral cortex, due to which an anesthetic effect on the central nervous system is exerted. Tetracaine hydrochloride has a local anesthetic effect, which is established within a few minutes. Mebesonium iodide is a muscle relaxant. It blocks the transmission of impulses from nerve endings to muscles, exerting a curare-like effect and causing paralysis of the respiratory muscles [8, 9, 20].

The description of the drug T-61 states that first the anesthetic components act, causing a narcotic state,

and only then paralysis of the respiratory organs, cardiac arrest and brain death occur. Thus, the injection of this drug is intended to lead to a quick, reliable and painless killing of the animal without the manifestation of excitement. However, in practice, animal owners often complain that their pets experienced convulsions, pain and suffering before death. Similar opinions were expressed by veterinarians. There is a fairly high probability that muscle relaxation occurs before the animal falls into a narcotic sleep and a complete loss of consciousness occurs. As a result, killing is carried out inhumanely, since the animal experiences severe suffering before death.

T-61 should only be used in combination with opiates. It is also worth noting that intrapulmonary and intracardiac injections are classified as cruel methods of euthanasia in many countries and are used extremely sparingly. The Humane Society of the United States (HSUS) classifies the use of T-61 as an inhumane method of euthanasia and does not recommend its use for euthanasia [5, 23].

Intrathecal euthanasia with lidocaine

Lidocaine is an amide-type anesthetic. It has a local anesthetic effect, stabilizing neuronal membranes and reducing their permeability to ions, which prevents the generation and conduction of nerve impulses. A similar effect is observed on excitable membranes of cardiac muscle cells and the brain. Lidocaine is characterized by high anesthetic activity.

When lidocaine is administered into the subarachnoid space, the nervous system experiences paralysis of the respiratory muscles, respiratory arrest, and motor and sensory block. The cardiovascular system experiences a decrease in blood pressure, collapse, bradycardia and even cardiac arrest. This results in hypoxia and brain death [1, 5, 10]. First of all, the brainstem stops functioning, as evidenced by the absence of its reflexes, and cerebrocortical activity ceases [9, 10, 23—29].

Technique for performing the intrathecal euthanasia procedure. The horse should be placed in a lateral recumbency position after induction of anesthesia and the atlanto-occipital joint should be located on the dorsal midline, at the level of the cranial border of the wings of the atlas, using the anatomical landmarks. A 3.5-inch, 18- or 20-gauge catheter or spinal needle is then inserted into the joint. The spinal needle (beveled toward the head) is directed toward the labial commissures or mandible along the dorsal midline into the subarachnoid space. The needle should be advanced slowly through the skin, muscle and nuchal ligament until a pop is felt, accompanied by a decrease in resistance upon entry into the subarachnoid space. If a catheter is used, clear cerebrospinal fluid will flow from the hub upon removal of the stylet. If no fluid is observed in the hub, the needle can be rotated 90 degrees to attempt to gain access to the subarachnoid space. After successful entry into the subarachnoid space and removal of the pin (if used), an extension should be attached (if necessary). A 10 % lidocaine hydrochloride solution is administered at a rate of 2.6—4 mg / kg. This method of euthanasia is acceptable from the point of view of humanity and cost-effectiveness, but there is one major drawback — the complexity of the procedure. Intrathecal administration of lidocaine requires specialized training of a veterinary specialist [2, 8, 17, 18, 25—27, 30—32].

Intravenous administration of magnesium sulfate

This method of euthanasia is performed under general anesthesia to avoid clonic spasms and muscle fasciculations.

Magnesium sulfate is a widely used substance, also used in humane medicine. Its crystalline form, Epsom salt, is used locally, for example, in the form of a solution when soaking horses' hooves. It is used perorally, to improve digestion or as a laxative. When administered parenterally to horses, it has a hypnotic effect, depresses the cardiovascular and respiratory centers. When used at large doses, it can lead to cardiac arrest and subsequent collapse. A saturated solution of magnesium sulfate can be prepared independently at the rate of 360 g $MgSO_4$ per 1 L of water (20 °C) [3, 11, 18, 23, 33—35].

Regardless of the method used for euthanasia, after the procedure the veterinarian confirms the death of the animal (absence of breathing, pulse and corneal reflex).

To determine the cost-effectiveness of drug euthanasia methods, the most common and accessible drugs and medical products for the procedure were selected (Table 1).

Based on the data presented, it can be concluded that all drug-induced methods of euthanasia are humane, as they are carried out under general anesthesia, which disables consciousness, suppresses the subcortical areas of the brain, muscle relaxation and analgesia.

The most optimal method for serum horses used in the production of diagnostic, therapeutic and prophylactic drugs is euthanasia using magnesium sulfate. This procedure is simple in technical execution for veterinary specialists in production conditions. From an economic point of view, euthanasia using magnesium

sulfate is by 2 times cheaper than an overdose of anesthetics. In conclusion, it can be noted that an alternative is intrathecal euthanasia with lidocaine, as it is very effective, but difficult in technical execution and is carried out in a hospital setting under supervision, using additional equipment.

Table 1

List of drugs and consumables for euthanasia

Name / Manufacturer	Composition	Price	Dosage	Cost of procedure
Euthanasia with magnesium sulfate				
Xylanit 50 ml / "Nita-Pharm" LLC, Russia	xylazine hydrochloride — 20 mg	705 rub.	3—5 ml / 100 kg	3600 rub.
Telazol 100 mg / Zoetis, Spain	50 mg tiletamine (tiletamine hydrochloride) and 50 mg zolazepam (zolazepam hydrochloride)	5500 rub.	5 ml / 500 kg	
Magnesium sulfate 25 g, 20 packs / JSC "Ivanovo Pharmaceutical Factory", Russia	magnesium sulfate — 25 g	400 rub.	2 ml /kg	
Intravenous catheter 14G / SuruInternational PvtLtd (India)	length 45 mm, diameter 2.0 mm, orange color, sterile	20 rub.	—	
Infusion systems Sana / "TK NIKES" LLC, Russia	ABC plastic intake needle (1.2×40 mm), flexible line with flow regulator, filter with air valve	15 rub.	—	
Intrathecal euthanasia with lidocaine				
Xylanit 50 ml / "Nita-Pharm" LLC, Russia	xylazine hydrochloride — 20 mg	705 rub.	3—5 ml / 100 kg	3400 rub.
Telazol 100 mg / Zoetis, Spain	50 mg tiletamine (tiletamine hydrochloride) and 50 mg zolazepam (zolazepam hydrochloride)	5500 rub.	5 ml / 500 kg	
Lidocaine bufus 100 mg/ml 2 ml No. 10 / JSC "PFK Obnovlenie", Russia	lidocaine hydrochloride — 100 mg	140 rub.	2,6—4 mg/kg	
Quincke Spinal needle 20G 90 mm / SuruInternationalPvtLtd, India	Quincke spinal needle 20G 90 mm, without guide needle MediSpine	100 rub.		
Overdose of anesthetic drugs				
Xylanit 50 ml / "Nita-Pharm" LLC, Russia	xylazine hydrochloride — 20 mg	705 rub.	3—5 ml / 100 kg	11 705 rub.
Telazol 100 mg / Zoetis, Spain	50 mg tiletamine hydrochloride and 50 mg zolazepam hydrochloride	5500 rub.	20 ml / 500 kg	

REFERENCES

1. *Polatayko O. R.* Veterinary anesthesia: a practical guide. — K.: Periscope, 2009. — 408 p.

2. *Aleman M.* Cerebral and brainstem electrophysiologic activity during euthanasia with pentobarbital sodium in horses / M. Aleman, D. C. Williams, A. Guedes [et al.] // J Vet Intern Med. — 2015. — v. 29(2). — P. 663—672. doi: 10.1111/jvim.12570

3. DIRECTIVE2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. — Electronic resource. — http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj (report dated March 2025).

4. *Rybakova A. V.* Methods of euthanasia of laboratory animals in accordance with the European Directive 2010/63 / A. V. Rybakova, M. N. Makarova // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii (International Bulletin of Veterinary Medicine). — 2015. — No. 2. — P. 96—107.

5. *Bettschart-Wolfensberger R.* Veterinary anesthesiology: a textbook / R. Betschart-Wolfensberger, A. A. Stekolnikov, A. Yu. — St. Petersburg: SpetsLit, 2010. — 270 p.

6. *Kovac M.* Horse colic. Causes. Diagnosis. Treatment / M. Kovac. — M.: Royal Publishing House, 2010. — 234 p.

7. *Greene S. A.* Pros and cons of using alpha-2 agonists in small animal anesthesia practice / S. A. Greene // Clin Tech Small Anim Pract. — 1999. — v. 14(1). — P. 10—14. doi: 10.1016/s1096—2867(99)80022-x

8. *Pratt S.* A prospective randomized trial of lidocaine 30 mg versus 45 mg for epidural test dose for intrathecal injection in the obstetric population / S. Pratt, A. Vasudevan, P. Hess // Anesth Analg. — 2013. — v. 116(1). — P. 125—132. doi: 10.1213/ANE.0b013e31826c7ebe

9. *Taylor P. M.* Handbook of equine anaesthesia / P. M. Taylor, K. W. Clarke. — Saunders Elsevier, 2007. — 228 pp. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.10.016

10. *Aleman M.* Electrophysiologic study of a method of euthanasia using intrathecal lidocaine hydrochloride administered during intravenous anesthesia in horses / M. Aleman, E. Davis, D. C. Williams [et al.] // J Vet Intern Med. — 2015. — v. 29(6). — P. 1676—1682. doi: 10.1111/jvim.13607

11. *Cistola A. M.* Anesthetic and physiologic effects of tiletamine, zolazepam, ketamine, and xylazine combination (TKX) in feral cats undergoing surgical sterilization / A. M. Cistola, F. J. Golder, L. A. Centonze [et al.] // J Feline Med Surg. — 2004. — v. 6(5). — P. 297—303. doi: 10.1016/j.jfms.2003.11.004

12. Clinical pharmacology: national guidelines / edited by Yu. B. Belousov, V. G. Kukes, V. K. Lepakhin et al. — M.: GEOTAR-Media, 2014. — 976 p.

13. *Doherty T. J.* Physiologic effects of alpha 2-adrenergic receptors / T. J. Doherty // J Am Vet Med Assoc. — 1988. — v. 192(11). — P. 1612—1614.

14. *Schmidt-Oechtering G. U.* Ein beitrag zur anästhesie des pferdes mit xylazin und ketamin. Teil 2: Die anästhesie des adulten pferdes [Anesthesia of horses with xylazine and ketamine. 2. Anesthesia in adult horses] / G. U. Schmidt-Oechtering, M. Alef, M. Röcken // Tierarztl Prax. — 1990. — v. 18(1). — P. 47—52.

15. *Aleman M.* Brainstem auditory evoked responses in an equine patient population. Part II: foals / M. Aleman, J. E. Madigan, D. C. Williams [et al.]. // J Vet Intern Med. — 2014. — v. 28(4). — P. 1318—1324. doi: 10.1111/jvim.12377

16. *McGrath, S.* Randomized blinded controlled clinical trial to assess the effect of oral cannabidiol administration in addition to conventional antiepileptic treatment on seizure frequency in dogs with intractable idiopathic epilepsy / *S. McGrath,* L. R. Bartner, S. Rao [et al.]. // J Am Vet Med Assoc. — 2019. — v. 254(11). — P. 1301—1308. doi: 10.2460/javma.254.11.1301

17. *Williams D. C.* Qualitative and quantitative characteristics of the electroencephalogram in normal horses after sedation / D. C. Williams, M. Aleman, B. Tharp [et al.]. // J Vet Intern Med. — 2012. — v. 26(3). — P. 645—653. doi: 10.1111/j.1939—1676.2012.00921.x

18. *Knottenbelt D.* Euthanasia of horses — alternatives to the bullet / D. Knottenbelt // In Practice. — 1995. — v. 17(10). — P. 462—464. doi: 10.1136/inpract.17.10.462

19. *Marsh R. R.* Resistance of the auditory brain stem response to high barbiturate levels / R. R. Marsh, T. C. Frewen, L. N. Sutton [et al.]. // Otolaryngol Head Neck Surg. — 1984. — v. 92(6). — P. 685—688. doi: 10.1177/019459988409200616

20. *Sutton L. N.* The effects of deep barbiturate coma on multimodality evoked potentials / L. N. Sutton, T. Frewen, R. Marsh [et al.]. // J Neurosurg. — 1982. — v. 57(2). — P. 178—185. doi: 10.3171/jns.1982.57.2.0178

21. *Bobbin R. P.* Effects of pentobaribtal and ketamine on brain stem auditory potentials. Latency and amplitude intensity functions after intraperitoneal administration / R. P. Bobbin, J. G. May, R. L. Lemoine // Arch Otolaryngol. — 1979. — v. 105(8). — P. 467—470. doi: 10.1001/archotol.1979.00790200029006

22. *Stockard J. J.* Effects of hypothermia on the human brainstem auditory response / J. J. Stockard, F. W. Sharbrough, J. A. Tinker // Ann Neurol. — 1978. — v. 3(4). — P. 368—370. doi: 10.1002/ana.410030416

23. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. https://www.avma.org/sites/default/files/2020-01/2020-Euthanasia-Final-1-17-20.pdf.

24. *De Lahunta, A.* Veterinary neuroanatomy and clinical neurology / A. De Lahunta. — Saunders Elsevier, 2009. — 544 p.

25. *Fikes L. W.* A preliminary comparison of lidocaine and xylazine as epidural analgesics in ponies / L. W. Fikes, H. C. Lin, J. C. Thurmon // Vet Surg. — 1989. — v. 18(1). — P. 85—86. doi: 10.1111/j.1532-950x.1989.tb01046.x

26. *Mayhew I. G.* Collection of cerebrospinal fluid from the horse / *I. G. Mayhew* // Cornell Vet. — 1975. — v. 65(4). — P. 500—511.

27. *Muir W. W.* Equine Anesthesia: Monitoring and Emergency Therapy, 2nd Edition / W. W. Muir, J. A. E. Hubbell. — Elsevier Health Sciences, 2008. — 508 p.

28. *Sharbrough F. W.* Brainstem auditory-evoked responses in spastic dysphonia / F. W. Sharbrough, J. J. Stockard, A. E. Aronson // Trans Am Neurol Assoc. — 1978. — v. 103. — P. 198—201.

29. *Aleman M.* Brainstem auditory evoked responses in an equine patient population: part I-adult horses / M. Aleman, T. A. Holliday, J. E. Nieto [et al.]. // J Vet Intern Med. — 2014. — v. 28(4). — P. 1310—1317. doi: 10.1111/jvim.12379

30. *Amaral L. A.* Utilização de lidocaína 2 % por via intratecal associado à anestesia prévia com tiopental sódico como método de eutanásia em equinos / L. A. Amaral, V. R. Rabassa, M. Marchiori [et al.]. // ARS Veterinaria (Brasil). — 2011. — v. 27. — P. 011—016.

31. *Close B.* Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission / B. Close, K. Banister, V. Baumans [et al.]. // Lab Anim. — 1996. — v. 30(4). — P. 293—316. doi: 10.1258/002367796780739871

32. *Johnson P. J.* Satellite article: Collection of cerebrospinal fluid from horses / P. J. Johnson, G. M. Constantinescu // Equine veterinary education. — 2000. — v. 12(1). — P. 7—12.

33. *Monteiro L. M.* Transcranial doppler ultrasonography to confirm brain death: a meta-analysis / L. M. Monteiro, C. W. Bollen, A. C. van Huffelen [et al.]. // Intensive Care Med. — 2006. — v. 32(12). — P. 1937—1944. doi: 10.1007/s00134—006—0353—9

34. *Sloan T. B.* Anesthetic effects on electrophysiologic recordings / T. B. Sloan // J Clin Neurophysiol. — 1998. — v. 15(3). — P. 217—226. doi: 10.1097/00004691—199805000—00005

35. *Stekolnikov A. A.* Local and general anesthesia of animals / A. A. Stekolnikov, V. A. Lukyanovskiy, I. B. Samoshkin. — St. Petersburg: Lan Publishing House, 2004. — 208 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

E. Yu. Ivanyatov — Junior Scientific Associate;
I. V. Shamin — Junior Scientific Associate;
R. A. Svintsov — Candidate of Veterinary Sciences, Scientific Associate;
M. V. Ovchinnikova — Candidate of Biological Sciences, Head of the Department;
E. G. Abramova — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;
A. V. Razzhivin — Junior Scientific Associate.

The article was submitted 17.03.2025.

Научная статья
УДК 619:616—008.9:636.592

СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ КАННИБАЛИЗМА У ИНДЕЕК В УСЛОВИЯХ ПТИЦЕФАБРИКИ

Наталья Викторовна Мельникова

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия, milena.nata@mail.ru

Аннотация. Расклев пера и каннибализм птиц достаточно сложно предотвратить, так как данная поведенческая реакция имеет полиэтиологическую природу и связана с условиями содержания, кормления, компетентностью персонала и т. д., поэтому главная задача для всех птицеводческих хозяйств — осуществлять контроль и профилактику. Каннибализм ведет к серьезным проблемам и гибели птицы, к снижению продуктивности, увеличению расходов на корма и препараты для лечения. Разработанные профилактические мероприятия основаны на устранении нескольких факторов, влияющих на его возникновение: приведении условий содержания к норме, установке дополнительных источников питания и поения птиц, корректировке рациона кормления и численности поголовья, находящегося в одном помещении, применении минерально-витаминных (витамин АД3ЕСК, «Пауэр Дринк», аскорбиновая кислота) и успокоительного (настойки валерианы) препаратов. Предложенный способ профилактики показал свою высокую эффективность, о чем можно судить по результатам: случаи каннибализма среди индейки в каждом корпусе сократились до единичных.

Ключевые слова: профилактика, каннибализм, условия содержания, рацион, витамин АД3ЕСК, «Пауэр Дринк», аскорбиновая кислота, настойка валерианы, индейка

В настоящее время вследствие высокого спроса на диетическое мясо индейки все чаще регистрируется нарушение технологического цикла выращивания, что оказывает отрицательное влияние на организм птицы и приводит к различным патологиям [1, 19].

Постоянное воздействие таких мероприятий, как бонитировка (перегруппировка) и транспортировка из одного помещения в другое, вакцинации, а также шум и резкие звуки, нарушения параметров микроклимата и т. д., — ведут к стрессу [8, 13]. В период приспособления к новым технологическим процессам птица пребывает в состоянии стрессогенной дезадаптации, что обуславливает не только различные нарушения физического развития, но и своеобразные поведенческие реакции как способ компенсации недополучаемых компонентов (питательных веществ, витаминов, минералов).

Распространен каннибализм у птиц практически повсеместно и даже при благоприятных условиях встречается у 2—5 % поголовья. При несвоевременном принятии мер по ликвидации и профилактике может вовлекаться более 30 % поголовья, что приводит к большому экономическому ущербу [1, 2, 4, 11, 16, 18].

В условиях промышленного птицеводства каннибализм приобретает характер сильных массовых расклевов, в свою очередь это ведет к снижению продуктивности, увеличению расходов на корма и лекарственные препараты [3, 9, 14, 15, 17, 22].

Факторами, которые наиболее часто встречаются на производстве и способствуют возникновению каннибализма у птиц, являются высокая плотность посадки в одном помещении, недостаток сбалансированного по всем необходимым основным питательным веществам, витаминам и минералам рациона, недоступность питья [5, 6, 21].

Предотвратить каннибализм достаточно сложно, так как расклев имеет полиэтиологическую природу, тесно связывает между собой условия содержания и кормления и даже компетентность персонала, работающего с птицей [6, 7, 10, 12, 16, 20].

В связи с этим была поставлена цель — разработать эффективный способ профилактики каннибализма индеек в условиях птицефабрики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проводилась в условиях птицеводческого комплекса ООО «Кривец-Птица» Липецкой области. Объектом исследований являлась индейка разного возраста кросса «Хайбрид Конвертер».

В течение эксперимента обращали внимание на условия содержания птицы: на обеспеченность кормами, доступность поилок и кормушек, численность птицы в каждом помещении; соблюдение параметров микроклимата для каждой возрастной группы птиц — освещенность, температурный режим и процент влажности воздуха.

Согласно технологическому циклу полученные яйца индейки сначала поступают в инкубатор. Вылупившиеся индюшата направляются в цех молодняка для выращивания до 40—42 дней, где они содержатся напольно.

Кормление и поение осуществляется из автокормушек и автопоилок; до 14-дневного возраста у индюшат дополнительно стоят поилки с водой и кормушки с кормом.

Через 2 недели самцов (♂) отделяют от самок (♀) и содержат в одном помещении, разделенном на две части.

При достижении птицей 40—42-дневного возраста ее переводят в цех откорма и доращивания до возраста 105 дней (♀) и 140 дней (♂). Здесь птица также содержится напольно и разделена по половому признаку.

В течение опыта микроклимат в помещениях, где содержалась индейка, изменялся в зависимости от возраста птицы. Так температура составляла +36,0 °С для животных 0—1-дневного возраста, понижаясь до +20 °С в процессе взросления. Относительная влажность воздуха в помещении менялась в зависимости от возраста птицы: в 1—7 дней составляла 70 %, от 8 недель и старше — 60 %.

Освещение в помещениях было искусственное, интенсивность света в лампах регулировалась в зависимости от возраста.

Поение птицы осуществлялось неограниченно, подача воды автоматическая.

В основу кормовой базы входило: зерно пшеницы, шрот соевый и подсолнечный, белковый концентрат; мука мясокостная, известковая и кровяная; масло подсолнечное, горох, премиксы (индивидуально для каждой возрастной группы).

Диагноз ставили на основании наличия характерных клинических признаков, результатов патологоанатомических вскрытий и журналов регистрации больной птицы за период с 2022 г. по 2024 г., анализа рациона и условий содержания птицы. Также у больных и здоровых особей 2-, 4-, 98-, 105-, 112- и 119-дневного возраста была взята кровь из подкрыльцовой вены для биохимического анализа на общий белок, общий кальций и неорганический фосфор.

Для статистической обработки данных была использована программа «Microsoft Office Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении журналов патологоанатомического вскрытия проанализирована частота встречаемости случаев каннибализма на птицеводческом комплексе в 2022—2024 гг. (рис. 1).

Согласно полученным данным отмечался рост случаев каннибализма птицы на предприятии, при этом более восприимчива группа птиц старше 42-дневного возраста.

В результате нашего исследования было выявлено, что каннибализм наблюдается в 7 корпусах из 12 у индейки разного возраста (от 7 до 115-дневного возраста).

В результате осмотра поголовья были выявлены особи со следующими характерными клиническими признаками: рваные раны с кровотечениями в области хвоста, крыльев, шеи и головы; отсутствие оперения с точечными геморрагиями в этих областях; угнетение, неподвижность, слабость, нормальная или низкая реакция на окружающие раздражители; у некоторых особей — признаки истощения, анемичность видимых слизистых оболочек, гребней и сережек. Нередко отмечалось поедание птицей опилок.

У ослабленной, неподвижной птицы также были снижены показатели частоты дыхательных движений и сердечных сокращений. У активной птицы с легкими травмами, наоборот, эти показатели были выше нормы, вероятно, из-за испытываемого стресса.

Отмечали, что расклеву подвержены более слабые, истощенные особи с признаками алиментарной дистрофии, а также та птица, которая получила какую-либо механическую травму в результате эксплуатации или в ходе «несчастного случая». Такая птица более пассивная, как правило, сидит на месте, доступ ее к корму и воде ограничен. Травмированная и слабая птица привлекает внимание более агрессивных и сильных особей, которые к тому же видят яркие отметины крови, что провоцирует каннибализм.

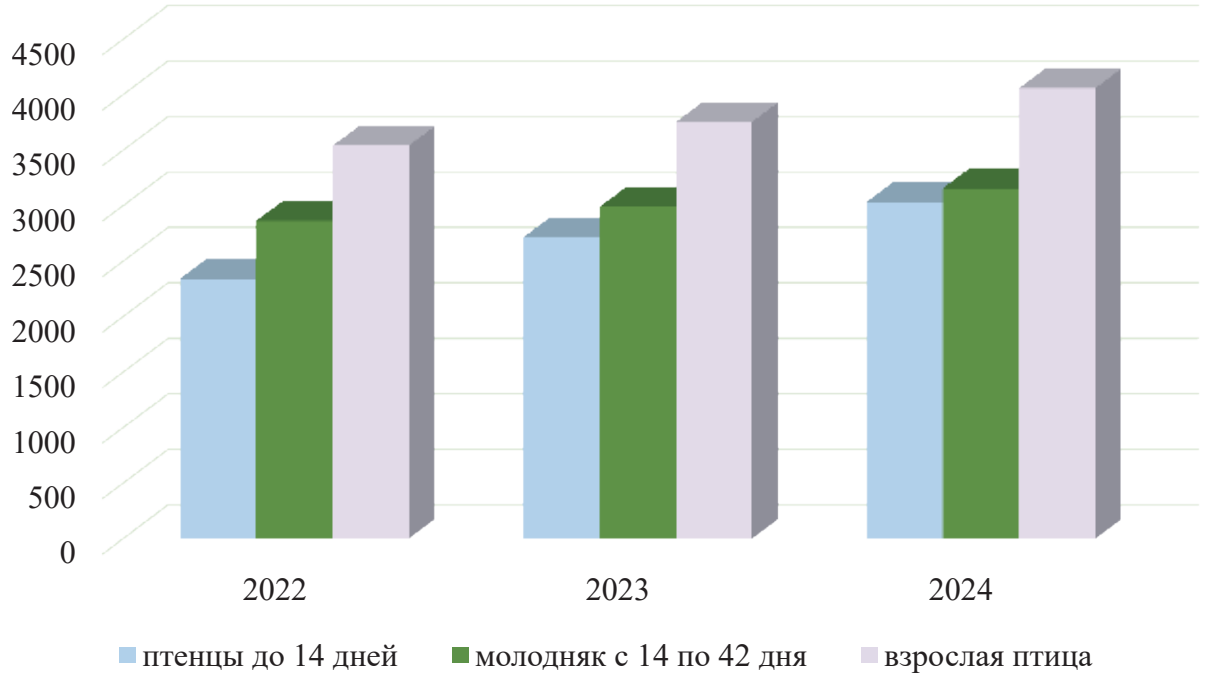


Рис. 1. Количество случаев каннибализма у индейки разного возраста на птицефабрике за 2022—2024 гг.

Реакция организма на травму при каннибализме представляет собой травматический шок, в который птица впадает при большой кровопотере и возникновении болевого синдрома. В результате расклева образуются открытые повреждения тканей, сопровождающиеся ранами на коже, нередко на внутренних органах и слизистых оболочках. В открытую рану в последующем попадает микрофлора, на проникновение которой организм отвечает воспалительной реакцией. Воспаление приводит к тому, что кровотечение, возникшее при расклеве, быстро останавливается, так как происходит выпадение плотного фибринозного сгустка. Следом развивается травматический отек, присоединяя к себе фибринозное воспаление. Последнее приводит к образованию фибринозной массы, которая защищает здоровые органы и ткани от проникновения патогенной микрофлоры и попадания загрязнений.

По результатам патологоанатомического вскрытия у павших от кровопотери вследствие полученных травм индеек были отмечены следующие признаки: на кожных покровах раны разной степени тяжести, нередко запачканные грязными опилками, и кровоподтеки на различных участках тела, чаще — в области головы и шеи. Отмечали выпадение органов грудобрюшной полости, их воспаление и обильное кровотечение. Кроме того, все кожные покровы и слизистые оболочки были анемичные (у вынужденно убитой с диагностической целью птицы при небольших кровопотерях таких признаков не наблюдалось). В качестве сопутствующих заболеваний у таких птиц часто возникали алиментарная дистрофия и закупорка пищевода опилками.

Результаты биохимических показателей крови индеек представлены в таблице 1.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что одним из существенных факторов, вызывающих каннибализм у птиц, является несбалансированное кормление: недостаток кальция и сырого протеина, избыток фосфора. При анализе рациона также было выявлено нарушение в соотношении незаменимых аминокислот — лизина и метионина.

Анализируя условия содержания и кормления индейки, были выявлены следующие причины возникновения случаев каннибализма:

1. Большая скученность животных в двух корпусах и повышенная температура, которые спровоцировали стресс у птицы;

2. Нарушенный режим освещения в шести корпусах;

3. Кормление не соответствовало норме в семи корпусах: в трех наблюдался дисбаланс минеральных веществ (кальция и фосфора), в четырех — сниженное количество сырого протеина и нарушение соотношения незаменимых аминокислот (лизина и метионина);

4. Травмы, повлекшие за собой кровоизлияния.

Таблица 1

Биохимические показатели крови индеек

Возраст птицы, дней	Общий белок, г/л	Общий кальций, ммоль/л	Неорганический фосфор, ммоль/л	Общий белок, г/л	Общий кальций, ммоль/л	Неорганический фосфор, ммоль/л
	Здоровая птица, *n* = 12			Больная птица, *n* = 12		
2	30,6 ± 0,69	2,63 ± 0,09	2,02 ± 0,04	30,1 ± 0,69	2,48 ± 0,09	2,11 ± 0,04
4	31,0 ± 0,61	2,67 ± 0,05	2,05 ± 0,02	29,4 ± 0,61*	2,59 ± 0,05	2,10 ± 0,02*
98	51,1 ± 0,24	3,23 ± 0,09	2,44 ± 0,03	48,0 ± 0,24***	3,18 ± 0,09	2,44 ± 0,03
105	52,7 ± 0,33	3,27 ± 0,12	2,47 ± 0,05	48,7 ± 0,33***	3,26 ± 0,12	2,66 ± 0,05**
112	54,3 ± 0,36	3,31 ± 0,10	2,50 ± 0,03	49,9 ± 0,36***	3,28 ± 0,10	2,58 ± 0,03*
119	55,9 ± 0,25	3,34 ± 0,11	2,53 ± 0,03	47,3 ± 0,25***	3,30 ± 0,11	2,61 ± 0,03*

* $P < 0,05$
** $P < 0,01$
*** $P < 0,001$ — по отношению к клинически здоровой птице

Профилактические меры были основаны на недопущении новых случаев каннибализма и предотвращении их в стадах, где они были зарегистрированы, за счет установки дополнительных напольных кормушек и источников воды, доведения уровня освещенности и параметров микроклимата до нормативных показателей, коррекции рациона, выбраковки сильно травмированной птицы.

Установка дополнительных кормушек и поилок в корпусах с небольшим перенаселением птицы дает ей возможность получать больше корма и не конфликтовать из-за недостатка питания, и, как следствие, уменьшает пищевую агрессию.

Урегулирование микроклимата в помещениях способствует благоприятным условиям для развития птицы, а снижение уровня освещенности в тех корпусах, где наблюдается несоответствие по нормативным показателям, дополнительно снижает ее возбудимость. На основании обнаружения недостатков по минеральным и основным питательным веществам была проведена корректировка в структуре рецепта для индеек разного возраста (табл. 2).

Данная структура рациона нормализует фосфорно-кальциевое соотношение, компенсирует недостаток протеина и повышает содержание незаменимых аминокислот, которые необходимы для птицы (табл. 3).

В результате проведенных биохимических исследований крови индеек после изменения рациона отклонений от нормы обнаружено не было.

Таблица 2

Рекомендуемая структура рациона для индейки

Сырье	%	
	0—2 недели	14—16 недель
1	2	3
Пшеница	46,5	78,8
Шрот соевый	40,6	—
Шрот подсолнечный	—	6,4
Мясокостная мука	—	5,5

Окончание табл. 2

1	2	3
Кровяная мука 92 %	2,5	2,3
Концентрат белковый Агро-Матик	3,5	2,0
Масло подсолнечное	1,1	1,5
Известняк 33 %	1,8	1,5
Премикс	4,0	2,0

Таблица 3

Содержание питательных веществ после корректировки рациона

Возраст, неделя	Показатели									
	Обменная энергия в 100 г		Сырой протеин	Сырая клетчатка	Кальций	Фосфор	Натрий	Линолевая кислота	Лизин	Метионин
	Ккал	МДж								
1—4	290	1,213	28,0	4,0	1,7	1,0	0,4	1,5	1,50	0,60
14—17	300	1,255	20,0	6,0	1,7	0,8	0,3	1,8	1,07	0,43

Выбраковка слабой, неперспективной и травмированной птицы в перенаселенных корпусах не только устраняет данную проблему, но и способствует благоприятному развитию поголовья с большей живой массой, что минимизирует затраты на кормление низкопродуктивной птицы и лечение раненой. Проведение профилактической беседы с персоналом о минимизации травм у индеек позволяет устранить одну из причин возникновения расклева — травмы.

Также дополнительно была предложена выпойка в течение 3—5 дней Витамина АД$_3$ЕСК в дозе 0,5—1 мл/1 л и препарата «Пауэр Дринк» в дозе 0,5—1 л/1000 л воды, а также дача аскорбиновой кислоты перорально в дозе 50 мг/1 кг корма. Применение препаратов способствует нормализации обмена веществ, профилактике гиповитаминозов и заболеваний, развивающихся на их фоне, повышению резистентности организма после перенесенных заболеваний, в периоды стрессов, при истощении и слабости. Выпойка агрессивной птице настойки валерианы в дозе 0,2—1 мл/1000 л воды в течение 3—5 дней позволяет снизить избыточную возбудимость.

В результате были получены следующие данные (табл. 4).

Таблица 4

Эффективность профилактических мероприятий

№ корпуса	1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя	Итого, гол.	%
	случаев каннибализма, гол.	случаев каннибализма, гол.	случаев каннибализма, гол.	случаев каннибализма, гол.		
1	2	3	4	5	6	7
1	7	4	0	0	11	0,11
2	18	9	3	1	31	0,42

Окончание табл. 4

1	2	3	4	5	6	7
3	5	5	1	0	11	0,13
4	3	2	0	0	5	0,06
5	14	4	2	0	20	0,24
6	14	4	1	0	19	0,25
7	11	7	2	0	20	0,29
8	20	15	6	1	42	0,52
9	17	5	4	1	26	0,29
10	12	4	0	0	16	0,18
11	25	8	5	1	39	0,46
12	8	4	1	0	13	0,17
Итого:	154	71	25	4	254	0,20

Анализируя полученные данные, можно проследить, что от начала момента введения профилактических мероприятий наблюдалось уменьшение случаев каннибализма до единичных проявлений, что говорит об эффективности предложенной схемы в отношении данной патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований была предложена схема профилактических мероприятий, основанная на устранении нескольких факторов, влияющих на возникновение каннибализма: корректировка рациона и численности поголовья в помещении, введение витаминных и успокоительных препаратов, оптимизация условий содержания птицы, установка дополнительных источников питания и поения, беседы с работниками комплекса о недопущении травм. Предложенная схема показала свою эффективность, о чем можно судить по результатам, показывающим снижение случаев каннибализма до единичных.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Буяров В. С.* Технологические и экономические аспекты производства продукции животноводства и птицеводства: монография / В. С. Буяров, К. А. Лещуков, А. В. Буяров. — Орел: ОрелГАУ, 2022. — 198 с.

2. *Зимняков В. М.* Промышленное производство мяса индейки / В. М. Зимняков // Вестник ВНИИМЖ. — 2018. — № 2(30). — С. 100—106.

3. *Козырев С. Г.* Влияние микроклимата на характер этологических проявлений и адаптативных реакций у перепелов эстонской породы / С. Г. Козырев, А. В. Леподарова, Г. В. Мулукаев // Известия Горского гос. аграр. ун-та. — 2015. — № 4. — С. 172—177.

4. *Коновалов А. Н.* Дебикирование ремонтного молодняка мясных кур кросса HUBBARD F-15 / А. Н. Коновалов, В. Н. Хаустов, Е. В. Пилюкшина // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. — 2014. — № 4(90). — С. 35—36.

5. *Кузнецов А. И.* Стресс. Влияние на физиологическое состояние и продуктивные качества животных, способы определения и пути профилактики / А. И. Кузнецов, А. В. Мифтахутдинов. — 2-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2024. — 292 с.

6. *Кузнецов А. Ф.* Современные технологии и гигиена содержания птицы: учебное пособие / А. Ф. Кузнецов, Г. С. Никитин. — Санкт-Петербург: Лань, 2022. — 352 с.

7. *Лопаева Н. Л.* Проблема стресса у птицы и пути ее решения / Н. Л. Лопаева // Молодежь и наука. — 2014. — № 3. — С. 8.

8. *Мельникова Н. В.* Влияние пробиотика на микоплазмоз цыплят-бройлеров / Н. В. Мельникова, И. О. Крутов, Д. О. Матвеева // В сборнике: Аграрная наука в условиях глобальных вызовов мирового продовольственного кризиса: проблемы, тенденции, пути решений. Материалы Международной научной заочной конференции, посвященной 55-летию Сибирского научно-исследовательского института птицеводства. Отв. редактор А. Б. Дымков. — Омск. — 2022. — С. 263—267.

9. *Мельникова Н. В.* Эффективность комплексных кормовых добавок для профилактики микотоксикозов крупного рогатого скота / Н. В. Мельникова, Л. В. Ческидова // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2021. — № 3 (16). — С. 96—107.

10. *Мифтахутдинов А. В.* Экспериментальные подходы к диагностике стрессов в птицеводстве / А. В. Мифтахутдинов // Сельскохозяйственная биология. — 2014. — № 2. — С. 20—30.

11. *Нуралиев Е. Р.* Производственные опыты по изучению мер борьбы и профилактики каннибализма кур в промышленном птицеводстве / Е. Р. Нуралиев, И. И. Кочиш // Известия Оренбург. гос. аграр. ун-та. — 2017. — № 3. — С. 117—120.

12. *Правосудова А. Э.* Выявление проблем работы предприятий промышленного птицеводства закрытого типа / А. Э. Правосудова, Е. Г. Лаврушина, Е. В. Кайкова // Интеллектуальный потенциал XXI века: ступени познания. Владивост. гос. ун-т эконом. и сервиса. — Владивосток. — 2015. — С. 17—24.

13. *Самсонова Т. С.* Незаразные болезни сельскохозяйственных птиц. Диагностика, лечение и профилактика / Т. С. Самсонова, Ю. В. Матросова. — Санкт-Петербург: Лань, 2023. — 336 с.

14. *Стрельников В. В.* Влияние цветового восприятия освещенности на продуктивность и экологически безопасную продукцию птицы / В. В. Стрельников, Л. И. Красноплахтова // Научный журнал КубГАУ. — 2019. — № 149 (05). — С. 1—10.

15. *Сулимова Л. И.* Поведенческие реакции и благополучие сельскохозяйственной птицы / Л. И. Сулимова, К. В. Жучаев, М. Л. Кочнева // Сельскохозяйственная биология. — 2020. — Т. 55. — № 2. — С. 209—224.

16. *Ченцов Р. И.* Технологический травматизм у кур и его профилактика в условиях промышленного птицеводства: автореф. дис. … канд. вет. наук: 16.00.05 / Роман Иванович Ченцов // Воронеж. гос. аграр. ун-т. — Воронеж. — 2005. — 21 с.

17. *Шмутц М.* Расклев пера и каннибализм у курнесушек / М. Шмутц // Животноводство России. — 2014. — № 4. — С. 15—16.

18. *Gunnarsson S.* Effect of rearing factors on the prevalence of floor eggs, cloacal cannibalism and feather pecking in commercial flocks of loose housed laying hens / S. Gunnarsson, L. J. Keeling, J. Svedberg // British Poultry Science. — 2014. — V. 20—8. — P. 5—6.

19. *Huber-Eicher B.* Analysis of risk factors for the occurrence of feather pecking in laying hen growers / B. Huber-Eicher, L. Audige // British Poultry Science. — 2016. — V. 3. — P. 7—8.

20. *Janczak A. M.* Review of rearing-related factors affecting the welfare of laying hens / A. M. Janczak, A. B. Riber // British Poultry Science. — 2015. — V. 94 (7). — P. 1454—1469.

21. *Jensen L.* Cannibalism of fowl / L. Jensen // Turkey world. — 2014. — V. 21. — P. 10—15.

22. *Pierce R.* Chicken cannibalism: why it happens and how can you prevent it / R. Pierce // Morning chores. — 2018. — V. 12—6. — P. 4—8.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Н. В. Мельникова — кандидат ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры терапии и фармакологии.

Статья поступила в редакцию 11.03.2025.

Original article
UDC 619:616—008.9:636.592

METHOD OF PREVENTING CANNIBALISM IN TURKEYS AT A POULTRY FARM

Natalya Viktorovna Melnikova

*Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia, milena.nata@mail.ru**

Abstract. Feather pecking and cannibalism in poultry are quite difficult to prevent, since this behavioral reaction has a polyetiological nature and is associated with the conditions of keeping, feeding, staff competence, etc., so the main task for all poultry farms is to manage control and prevention. Cannibalism leads to serious problems and death of poultry, to a decrease in productivity, an increase in the cost of feed and drugs for treatment. The developed preventive measures are based on the elimination of several factors that affect its occurrence: bringing the conditions of keeping to the norm, installing additional sources of food and water for poultry, adjusting the feeding ration and the number of livestock in one room, using mineral and vitamin (vitamin AD3ECK, Power Drink, ascorbic acid) and sedative (valerian tincture) drugs. The proposed method of prevention has proven its high efficacy, which can be judged by the results: cases of cannibalism among turkeys in each building have decreased to isolated ones.

Keywords: prevention, cannibalism, keeping conditions, diet, vitamin AD3ECK, Power Drink, ascorbic acid, valerian tincture, turkey

Currently, due to the high demand for dietary turkey meat, violations of the technological cycle of rearing are increasingly recorded, which has a negative effect on the body of the poultry and leads to various pathologies [1, 19].

The constant effect of such events as grading (regrouping) and transportation from one room to another, vaccinations, as well as noise and sharp sounds, violations of microclimate parameters, etc. lead to stress [8, 13].

During the period of adaptation to new technological processes, the poultry is in a state of stress-induced maladaptation, which causes not only various violations of physical development, but also peculiar behavioral reactions as a way to compensate for the components (nutrients, vitamins, minerals) that are not received.

Cannibalism is widespread among poultry almost everywhere and even under favorable conditions it occurs in 2—5 % of the population. If measures for elimination and prevention are not taken in a timely manner, more than 30 % of the population may be involved, which leads to significant economic damage [1, 2, 4, 11, 16, 18].

In the conditions of industrial poultry farming, cannibalism takes the form of severe mass pecking, which in turn leads to a decrease in productivity, an increase in the cost of feed and medicines [3, 9, 14, 15, 17, 22].

The factors that are most often encountered in production and contribute to the occurrence of cannibalism in poultry are high stocking density in one room, lack of a balanced diet with all the necessary essential nutrients, vitamins and minerals, and lack of access to drinking water [5, 6, 21]. It is quite difficult to prevent cannibalism, since pecking has a polyetiological nature, closely related to the conditions of keeping and feeding and even the competence of the personnel working with the poultry [6, 7, 10, 12, 16, 20].

In this regard, the objective was set to develop an effective method for preventing cannibalism in turkeys at a poultry farm.

MATERIAL AND METHODS

The work was carried out in the conditions of the poultry farm of LLC “Krivets-Ptitsa” in Lipetsk region. The object of the research was turkeys of various ages of Hybrid Converter cross.

During the experiment, the attention was paid to the conditions of poultry keeping: the provision with feed, the availability of drinkers and feeders, the number of poultry in each room; compliance with the microclimate parameters for each age group of poultry

(lighting, temperature conditions and the percentage of air humidity).

According to the technological cycle, the obtained turkey eggs are first sent to the incubator. The hatched turkey-poults are sent to the young stock building for rearing up to 40—42 days, where they are kept on the floor.

Feeding and drinking is carried out from automatic feeders and drinkers; up to the age of 14 days, the turkey-poults also have drinkers with water and feeders with food. In 2 weeks, the males (♂) are separated from the females (♀) and kept in one room, divided into two parts. When the poultry reaches 40—42 days of age, it is transferred to the fattening and rearing building up to the age of 105 days (♀) and 140 days (♂). Here, the poultry are also kept on the floor and separated by gender.

During the experiment, the microclimate in the rooms where the turkey-poults were kept changed depending on the age of the poultry. Thus, the temperature was +36.0 °C for the animals aged 0—1 days, decreasing to +20 °C during maturation. The relative humidity in the room changed depending on the age of the poultry: at 1—7 days it was 70 %, from 8 weeks and older — 60 %.

The lighting in the rooms was artificial, the intensity of light in the lamps was regulated depending on age.

The poultry were given unlimited water. The water supply was automatic.

The feed base included: wheat grain, soybean and sunflower meal, protein concentrate; meat and bone meal, lime and blood meal; sunflower oil, peas, premixes (individually for each age group).

The diagnosis was made based on the presence of characteristic clinical signs, the results of pathological autopsies and registration logs of sick poultry for the period from 2022 to 2024, the analysis of the diet and conditions of poultry keeping. The blood was also taken from the axillary vein of sick and healthy individuals at the age of 2, 4, 98, 105, 112 and 119 days for biochemical analysis of total protein, total calcium and inorganic phosphorus.

For statistical processing of the data, the program Microsoft Office Excel was used.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

When studying the logs of pathological autopsy, the frequency of cannibalism cases occurrence at a poultry farm in 2022—2024 was analyzed (Fig. 1).

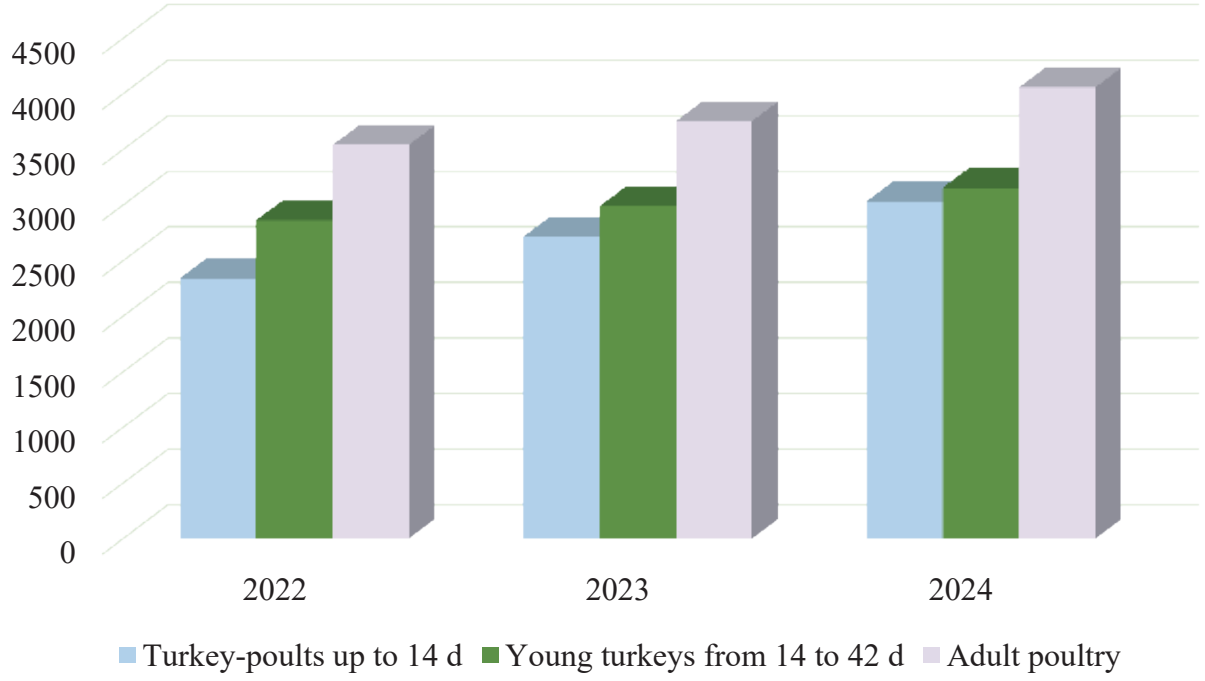


Fig. 1. Number of cannibalism cases in turkeys of various ages at a poultry farm in 2022—2024

According to the data obtained, there was an increase in cases of poultry cannibalism at the enterprise. The group of poultry over 42 days of age was more susceptible.

As a result of our study, it had been found that cannibalism was observed in turkeys of various ages (from 7 to 115 days of age) in 7 out of 12 buildings.

As a result of the flock examination, the individuals with the following characteristic clinical signs were identified: lacerated wounds with bleeding in the tail, wings, neck and head; absence of plumage with pinpoint hemorrhages in these areas; depression, immobility, weakness, normal or low reaction to environmental stimuli; in some individuals — signs of exhaustion, anemia of the visible mucous membranes, combs and earrings. Eating sawdust by poultry was often noted.

Weakened, immobile poultry also had reduced respiratory rate and heart rate. In active poultry with minor injuries, on the contrary, these indicators were higher than normal, probably due to the stress they were experiencing.

It has been noted that pecking is more common in weaker, emaciated individuals with signs of alimentary dystrophy, as well as in the poultry that have suffered some kind of mechanical injury as a result of exploitation or in an accident. Such poultry are more passive, usually sit still, and have limited access to food and water. An injured and weak poultry attracts the attention of more aggressive and stronger individuals, who also see bright blood marks, which provokes cannibalism.

The body's reaction to trauma during cannibalism is a traumatic shock, in which the poultry falls with significant blood loss and the pain onset. As a result of pecking, open tissue damage is formed, accompanied by wounds on the skin, often on internal organs and mucous membranes. Microflora subsequently enters the open wound, and the body responds to its penetration with an inflammatory reaction. Inflammation leads to the fact that the bleeding that occurred during pecking quickly stops, as a dense fibrinous clot falls out. Traumatic edema then develops, adding fibrinous inflammation to itself. The latter leads to the formation of a fibrinous mass that protects healthy organs and tissues from the penetration of pathogenic microflora and contamination.

The results of the pathological examination of turkeys that died from blood loss due to injuries showed the following signs: wounds of varying severity on the skin, often stained with dirty sawdust, and bruises on various parts of the body, most often in the head and neck area. Prolapse of the abdominal organs, their inflammation and profuse bleeding were noted. In addition, all skin and mucous membranes were anemic (in the poultry culled for diagnostic purposes with minor blood loss, such signs were not observed). As concomitant diseases, such poultry often had alimentary dystrophy and blockage of the esophagus with sawdust.

The results of the blood biochemical indicators of turkeys are presented in Table 1.

Table 1

Blood biochemical indicators of turkeys

Poultry age, days	Total protein, g/L	Total calcium, mmol/L	Inorganic phosphorus, mmol/L	Total protein, g/L	Total calcium, mmol/L	Inorganic phosphorus, mmol/L
	Healthy poultry, $n = 12$			Sick poultry, $n = 12$		
2	30.6 ± 0.69	2.63 ± 0.09	2.02 ± 0.04	30.1 ± 0.69	2.48 ± 0.09	2.11 ± 0.04
4	31.0 ± 0.61	2.67 ± 0.05	2.05 ± 0.02	29.4 ± 0.61*	2.59 ± 0.05	2.10 ± 0.02*
98	51.1 ± 0.24	3.23 ± 0.09	2.44 ± 0.03	48.0 ± 0.24***	3.18 ± 0.09	2.44 ± 0.03
105	52.7 ± 0.33	3.27 ± 0.12	2.47 ± 0.05	48.7 ± 0.33***	3.26 ± 0.12	2.66 ± 0.05**
112	54.3 ± 0.36	3.31 ± 0.10	2.50 ± 0.03	49.9 ± 0.36***	3.28 ± 0.10	2.58 ± 0.03*
119	55.9 ± 0.25	3.34 ± 0.11	2.53 ± 0.03	47.3 ± 0.25***	3.30 ± 0.11	2.61 ± 0.03*

* $P < 0.05$
** $P < 0.01$
*** $P < 0.001$ — in relation to clinically healthy poultry

Based on the data obtained, it can be assumed that one of the significant factors causing cannibalism in poultry is unbalanced feeding: lack of calcium and crude protein, excess phosphorus. When analyzing the diet, an imbalance in the ratio of essential amino acids (lysine and methionine) was also found.

Analyzing the conditions of keeping and feeding of turkeys, the following causes of cannibalism were identified.

1. High crowding of poultry in two buildings and high temperature, which provoked stress in the poultry.

2. Violated lighting conditions in six buildings.

3. Feeding did not meet the norm in seven buildings: in three of them there was an imbalance in minerals (calcium and phosphorus), in four — a reduced amount of crude protein and an imbalance in the ratio of essential amino acids (lysine and methionine).

4. Injuries resulting in hemorrhages.

Preventive measures were based on preventing new cases of cannibalism and preventing them in flocks where they were registered, by installing additional floor feeders and water sources, bringing the level of illumination and microclimate parameters to standard indicators, adjusting the diet, and culling severely injured poultry.

Installing additional feeders and drinkers in buildings with a small overcrowding of poultry allows them to receive more food and not to conflict due to lack of food, and, as a result, it reduces food aggression.

Regulation of the microclimate in the rooms contributes to favorable conditions for the poultry development, and a decrease in the level of illumination in those buildings where there is a discrepancy in the standard indicators, additionally reduces its excitability.

Based on the detection of deficiencies in mineral and essential nutrients, an adjustment was made to the structure of the recipe for turkeys of various ages (Table 2).

Table 2

Recommended diet structure for turkey

Raw material	%	
	0—2 weeks	14—16 weeks
Wheat	46.5	78.8
Soybean meal	40.6	—
Sunflower meal	—	6.4
Meat and bone meal	—	5.5
Blood meal 92 %	2.5	2.3
Protein concentrate Agro-Matik	3.5	2.0
Sunflower oil	1.1	1.5
Limestone 33 %	1.8	1.5
Premix	4.0	2.0

This diet structure normalizes the phosphorus-calcium ratio, compensates for the lack of protein and increases the content of essential amino acids that are necessary for poultry (Table 3).

Table 3

Nutrient content after diet adjustment

Age, week	Indicators									
	Metabolic energy in 100 g		Crude protein	Crude fiber	Calcium	Phosphorus	Sodium	Linoleic acid	Lysine	Methionine
	Kcal	MJ								
1—4	290	1.213	28.0	4.0	1.7	1.0	0.4	1.5	1.50	0.60
14—17	300	1.255	20.0	6.0	1.7	0.8	0.3	1.8	1.07	0.43

As a result of the conducted biochemical studies of the turkeys' blood after the change in diet, no deviations from the norm were found.

Culling weak, unpromising and injured poultry in overcrowded rooms not only eliminates this problem, but also contributes to the favorable development of the flock with a higher live weight, which minimizes the costs of feeding low-yielding poultry and treating the injured ones. Conducting a preventive conversation with the staff about minimizing injuries in turkeys allows eliminating one of the causes of pecking — injuries.

Additionally, it was suggested to give Vitamin AD_3ECK at a dose of 0.5—1 ml/1 L and Power Drink at a dose of 0.5—1 l/1000 L of water for 3—5 days, as well as to give ascorbic acid orally at a dose of 50 mg/1 kg of feed. The use of drugs helped to normalize metabolism, prevent hypovitaminosis and diseases that develop against their background, increase the body's resistance after illnesses, during periods of stress, exhaustion and weakness. Giving to aggressive poultry valerian tincture at a dose of 0.2—1 ml/1000 L of water for 3—5 days helped to reduce excessive excitability.

As a result, the following data were obtained (Table 4).

Analyzing the obtained data, it can be seen that from the moment of introduction of preventive measures, there was a decrease in cannibalism cases to isolated manifestations, which indicated the efficacy of the proposed scheme in relation to this pathology.

Table 4

Efficacy of preventive measures

Room No.	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Total, poultry	%
	Cannibalism cases, poultry	Cannibalism cases, poultry	Cannibalism cases, poultry	Cannibalism cases, poultry		
1	7	4	0	0	11	0.11
2	18	9	3	1	31	0.42
3	5	5	1	0	11	0.13
4	3	2	0	0	5	0.06
5	14	4	2	0	20	0.24
6	14	4	1	0	19	0.25
7	11	7	2	0	20	0.29
8	20	15	6	1	42	0.52
9	17	5	4	1	26	0.29
10	12	4	0	0	16	0.18
11	25	8	5	1	39	0.46
12	8	4	1	0	13	0.17
Total:	154	71	25	4	254	0.20

CONCLUSION

As a result of the research, a scheme of preventive measures was proposed based on the elimination of several factors affecting the occurrence of cannibalism: adjustment of the diet and the number of poultry in the rooms, introduction of vitamin and sedative drugs, optimization of the conditions of poultry keeping, installation of additional sources of food and water, conversations with the workers of the farm about preventing injuries. The proposed scheme has proven its efficacy, which can be judged by the results showing a decrease in cannibalism cases to isolated ones.

REFERENCES

1. *Buyarov V. S.* Technological and economic aspects of livestock and poultry production: monograph / V. S. Buyarov, K. A. Leshchukov, A. V. Buyarov. — Orel: OrelSAU, 2022. — 198 p.

2. *Zimnyakov V. M.* Industrial production of turkey meat / V. M. Zimnyakov // Vestnik VNIIMZh. — 2018. — No. 2 (30). — P. 100—106.

3. *Kozyrev S. G.* Effect of microclimate on the nature of ethological manifestations and adaptive reactions in Estonian quails / S. G. Kozyrev, A. V. Lepodarova, G. V. Mulukaev // Izvestiya Gorskogo gos. agrar. un-ta (Bulletin of Gorsk State Agrarian University). — 2015. — No. 4. — P. 172—177.

4. *Konovalov A. N.* Beak trimming of replacement young broiler chickens of HUBBARD F-15 cross / A. N. Konovalov, V. N. Khaustov, E. V. Pilyukshina // Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Bulletin of Altai State Agrarian University). — 2014. — No. 4 (90). — P. 35—36.

5. *Kuznetsov A. I.* Stress. Effect on the physiological state and productive qualities of animals, methods of determination and ways of prevention / A. I. Kuznetsov, A. V. Miftakhutdinov. — 2nd ed., reprinted. — St. Petersburg: Lan, 2024. — 292 p.

6. *Kuznetsov A. F.* Modern technologies and hygiene of poultry keeping: a tutorial / A. F. Kuznetsov, G. S. Nikitin. — St. Petersburg: Lan, 2022. — 352 p.

7. *Lopayeva N. L.* Problem of stress in poultry and ways to solve it / N. L. Lopayeva // Molodezh i nauka (Youth and Science). — 2014. — No. 3. — P. 8.

8. *Melnikova N. V.* Effect of probiotic on mycoplasmosis of broiler chickens / N. V. Melnikova, I. O. Krutov, D. O. Matveeva // In the collection of papers: Agricultural science in the context of global challenges of the world food crisis: problems, trends, solutions. Proceedings of the International Scientific Correspondence Conference dedicated to the 55th anniversary of the Siberian Poultry Research Institute. Responsible editor A. B. Dymkov. — Omsk. — 2022. — P. 263—267.

9. *Melnikova N. V.* Efficacy of complex fodder additives for prevention of mycotoxicoses in cattle / N. V. Melnikova, L. V. Cheskidova // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2021. — No. 3 (16). — P. 96—107.

10. *Miftakhutdinov A. V.* Experimental approaches to the diagnosis of stress in poultry farming / A. V. Miftakhutdinov // Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural Biology). — 2014. — No. 2. — P. 20—30.

11. *Nuraliev E. R.* Production experiments to study measures to combat and prevent chicken cannibalism in industrial poultry farming / E. R. Nuraliev, I. I. Kochish // Izvestiya Orenburg. gos. agrar. un-ta (Transactions of Orenburg State Agrarian University). — 2017. — No. 3. — P. 117—120.

12. *Pravosudova A. E.* Identification of problems in the operation of closed-type industrial poultry enterprises / A. E. Pravosudova, E. G. Lavrushina, E. V. Kaykova // Intellektualnyy potentsial XXI veka: stupeni poznaniya. Vladivost. gos. un-t ekonom. i servisa (Intellectual potential of the 21st century: stages of cognition. Vladivostok state university of economics and service). — Vladivostok. — 2015. — P. 17—24.

13. *Samsonova T. S.* Non-communicable diseases of poultry. Diagnostics, treatment and prevention / T. S. Samsonova, Yu. V. Matrosova. — St. Petersburg: Lan, 2023. — 336 p.

14. *Strelnikov V. V.* Effect of color perception of illumination on productivity and environmentally friendly poultry production / V. V. Strelnikov, L. I. Krasnoplakhtova // Nauchnyy zhurnal KubGAU (Research journal of KubSAU). — 2019. — No. 149 (05). — P. 1—10.

15. *Sulimova L. I.* Behavioral reactions and welfare of poultry / L. I. Sulimova, K. V. Zhuchaev, M. L. Kochneva // Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology). — 2020. — Vol. 55. — No. 2. — P. 209—224.

16. *Chentsov R. I.* Technological injuries in chickens and their prevention in industrial poultry farming: abstract of a thesis … Candidate of Veterinary Sciences: 16.00.05 / Roman Ivanovich Chentsov // Voronezh state agrarian university. — Voronezh. — 2005. — 21 p.

17. *Shmutz M.* Feather pecking and cannibalism in laying hens / M. Shmutz // Zhivotnovodstvo Rossii (Animal Husbandry of Russia). — 2014. — No. 4. — P. 15—16.

18. *Gunnarsson S.* Effect of rearing factors on the prevalence of floor eggs, cloacal cannibalism and feather pecking in commercial flocks of loose housed laying hens / S. Gunnarsson, L. J. Keeling, J. Svedberg // British Poultry Science. — 2014. — V. 20—8. — P. 5—6.

19. *Huber-Eicher B.* Analysis of risk factors for the occurrence of feather pecking in laying hen growers / B. Huber-Eicher, L. Audige // British Poultry Science. — 2016. — V. 3. — P. 7—8.

20. *Janczak A. M.* Review of rearing-related factors affecting the welfare of laying hens / A. M. Janczak, A. B. Riber // British Poultry Science. — 2015. — V. 94 (7). — P. 1454—1469.

21. *Jensen L.* Cannibalism of fowl / L. Jensen // Turkey world. — 2014. — V. 21. — P. 10—15.

22. *Pierce R.* Chicken cannibalism: why it happens and how can you prevent it / R. Pierce // Morning chores. — 2018. — V. 12—6. — P. 4—8.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

N. V. Melnikova — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Therapy and Pharmacology.

The article was submitted 11.03.2025.

СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ, ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

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

ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКА «ПЕНТАПРОЛ» СВИНОМАТКАМ, ПЕРЕБОЛЕВШИМ ПОСЛЕРОДОВЫМИ БОЛЕЗНЯМИ, НА ИММУННЫЙ СТАТУС ВЫРАЩИВАЕМЫХ ПОД НИМИ ПОРОСЯТ

Алексей Гаврилович Шахов[*], Лариса Юрьевна Сашнина[*]✉, Владимир Николаевич Коцарев[*], Ирина Владимировна Волкова[*], Сергей Николаевич Фурчаков[*], Татьяна Игоревна Ермакова[*], Петр Васильевич Мирошниченко[**], Виктория Михайловна Басанкина[**]

[*]Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, vnivipat@mail.ru✉
[**]Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии, Краснодар, Россия

Аннотация. В статье представлены результаты изучения влияния пробиотика «Пентапрол» при его применении лактирующим свиноматкам, переболевшим послеродовыми болезнями, на иммунный статус поросят. Установлено, что у них по сравнению с поросятами, выращиваемыми под свиноматками без препарата, были выше содержание общих иммуноглобулинов, неспецифическая клеточная защита, адаптивный клеточный иммунитет и снижены количество циркулирующих иммунных комплексов и их патогенность, что свидетельствует о более выраженной гуморальной защите, а также уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-2 и ИФН-γ и противовоспалительного медиатора ИЛ-4 вследствие уменьшения антигенной нагрузки на их клетки-продуценты. Повышение иммунного статуса у поросят способствовало уменьшению заболеваемости их желудочно-кишечными болезнями, увеличению сохранности и продуктивности.

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

В промышленных свиноводческих хозяйствах у поросят в ранний постнатальный период часто регистрируют вторичные иммунодефициты [1, 2], одной из причин которых являются послеродовые болезни у свиноматок, проявляющиеся снижением или прекращением секреции молозива (молока) — основного источника питания и колострального иммунитета для новорожденных [3—6].

У поросят, выращиваемых под переболевшими послеродовыми болезнями свиноматками, в 20-дневном возрасте установлено снижение лизоцимной и комплементарной активности сыворотки крови, содержания общих иммуноглобулинов, γ-глобулинов, поглотительной и метаболической активности фагоцитов и их функционального резерва, относительного и абсолютного количества лимфоцитов, Т-клеток, теофиллинрезистентных и теофиллинчувствительных Т-лимфоцитов и В-клеток, концентрации цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4 ИЛ-10, но увеличение содержание мелких циркулирующих иммунных комплексов и их патогенности, что свидетельствует об ослаблении гуморальной и клеточной защиты [7].

Для предупреждения развития послеродовых болезней у свиноматок рекомендованы антимикробные [8, 9], гормональные [10, 11], гепатотропные и селенсодержащие [12, 13] препараты, а также пре- и пробиотики [14, 15]. Применение последних сопровождается оптимизацией микробиоценоза кишечника свиноматок [16], способствуя формированию нормальной микрофлоры кишечника поросят, физиологическая контаминация которых начинает-

ся с момента прохождения через родовые пути, далее за счет фекальной микрофлоры и микрофлоры станков [17]. Медицинскими исследованиями [18] установлено, что состав материнской кишечной микробиоты оказывает влияние на формирование микробиоты ребенка, осуществляющей метаболические, антитоксические, защитные и иммунные функции [19]. Разработанная ООО «Биона» пробиотическая кормовая добавка «Пентапрол», содержащая живые культуры лактобацилл, лактококка, энтерококка фециум и бифидобактерий, рекомендована для стабилизации микрофлоры кишечника, повышения продуктивности и сохранности свиней и сельскохозяйственной птицы.

Цель исследований — изучение влияния применения пробиотика «Пентапрол» свиноматкам, переболевшим послеродовыми болезнями, на иммунный статус выращиваемых под ними поросят.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в промышленном свиноводческом хозяйстве. В опыт были включены 23 свиноматки, переболевшие острым послеродовым эндометритом и/или метрит-мастит-агалактией, которых после проведенного лечения с применением фармакологических средств антимикробного, противовоспалительного и утеротонического действия разделили на две группы. Свиноматкам опытной группы (n = 12) с питьевой водой через медикатор ежедневно назначали пробиотик «Пентапрол» по 10 мл в течение 20 дней. Животные контрольной группы (n = 11) препарат не получали. За выращиваемыми под ними поросятами вели наблюдение, учитывали заболеваемость их желудочно-кишечными болезнями, сохранность и продуктивность.

От поросят (n = 5), выращиваемых под свиноматками обеих групп, в 5 и 26-дневном возрасте были отобраны пробы крови для иммунологических исследований, которые проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке и коррекции иммунного статуса животных» [20]. Содержание 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

У поросят контрольной и опытной групп в возрасте 26 дней по сравнению с фоном установлено повышение лизоцимной и комплементарной активности сыворотки крови на 34,8 и 36,1 %, на 48,1 % ($p < 0,02$) и 27,9 % ($p < 0,01$) соответственно, свидетельствующее об усилении неспецифической гуморальной защиты (табл. 1).

Таблица 1

Показатели гуморального и клеточного звена неспецифического иммунитета у поросят

Показатели	Возраст (дни), группы		
	5	26	26
	фон	контрольная	опытная
1	2	3	4
ЛАСК, мкг/мл	1,55 ± 0,67	2,09 ± 0,19	2,11 ± 0,109
КАСК, % гем.	10,4 ± 0,71	15,4 ± 1,48*	13,3 ± 0,48*
Общие Ig, мг/мл	27,3 ± 2,01	20,6 ± 0,73*	23,2 ± 0,62+
ЦИК 3,0 % мг/мл	0,32 ± 0,01	0,11 ± 0,01*	0,08 ± 0,01*
ЦИК 7,0 % мг/мл	1,15 ± 0,05	0,21 ± 0,03*	0,14 ± 0,01*

Окончание табл. 1

1	2	3	4
С7/С3	3,55 ± 0,18	1,97 ± 0,16*	1,78 ± 0,23*
ФАН, %	77,0 ± 1,29	73,6 ± 0,92	74,4 ± 0,75
ФИ	5,70 ± 0,07	4,84 ± 0,13*	4,94 ± 0,18*
ФЧ	4,39 ± 0,10	3,62 ± 0,03*	3,76 ± 0,19*
сп-НСТ, %	18,0 ± 1,42	14,8 ± 1,02	15,2 ± 0,80
ст-НСТ, %	28,0 ± 1,83	33,0 ± 0,77*	37,8 ± 0,81*+
ПР	1,57 ± 0,11	2,27 ± 0,21*	2,5 ± 0,09*

* $p < 0,05$—0,001 — к фону
\+ $p < 0,05$—0,002 — к контролю

В то же время значение КАСК у поросят опытной группы было достоверно меньше на 13,6 % ($p < 0,01$), что связано с расходом комплемента на осуществление у них более выраженного фагоцитоза, поскольку его компоненты прямо или опосредованно (через антитела) связываются с бактериями.

Содержание общих иммуноглобулинов, отражающих состояние гуморальной защиты, у поросят контрольной и опытной групп снизилось на 24,5 % ($p < 0,02$) и 15,0 %. При этом их значение у животных опытной группы превышало на 12,6 % ($p < 0,05$).

При определении циркулирующих иммунных комплексов, являющихся продуктами реакции антиген-антитело и играющих существенную роль в поддержании гомеостаза организма, установлено достоверное ($p < 0,001$) снижение у поросят контрольной и опытной групп уровня крупных (3,0 %) ЦИК в 2,9 и 4,0 раза и мелкодисперсных (7,0 %) ЦИК — в 5,5 и 8,2 раза и их патогенности (С7/С3) на 44,5 и 49,9 %. При этом их значения у животных опытной группы были меньше на 27,3; 33,3 и 9,6 % соответственно, что свидетельствует о более выраженной у них гуморальной защите.

В клеточном звене неспецифической защиты отмечено снижение количества активных фагоцитов у поросят контрольной и опытной групп на 4,4 и 3,4 %, ФИ — на 15,1 % ($p < 0,001$) и 13,3 % ($p < 0,001$) и ФЧ — на 17,5 % ($p < 0,001$) и 14,4 % ($p < 0,02$). При этом показатели поглотительной функции фагоцитов у животных опытной группы имели тенденцию к незначительному (на 2,1 и 3,9 %) превышению.

При изучении метаболической активности нейтрофилов установлено, что спонтанный НСТ-тест у поросят обеих групп снизился на 17,8 и 15,6 %, а стимулированный НСТ-тест повысился на 17,9 и 35,0 %, также как и функциональный резерв клеток на 44,6 % ($p < 0,02$) и 59,2 % ($p < 0,001$). При этом значения ст-НСТ и ПР у животных опытной группы превышали контрольные показатели на 14,5 % ($p < 0,01$) и 10,1 % соответственно.

При изучении клеточного иммунитета у поросят контрольной группы регистрировали увеличение содержания лейкоцитов на 20,4 %, количество которых у животных опытной группы было ниже на 15,2 %, что, по-видимому, связано с большим расходом на осуществление клеточной защиты (табл. 2).

Относительное и абсолютное количество лимфоцитов, являющихся одним из основных показателей клеточного иммунитета, у животных контрольной и опытной групп увеличилось на 31,7 % ($p < 0,01$) и 38,5 % ($p < 0,01$), на 58,8 ($p < 0,001$) и 41,2 % ($p < 0,001$) соответственно. При этом у поросят опытной группы значение относительного уровня было выше на 5,2 % показателя контроля, а абсолютное количество ниже на 6,0 %.

Абсолютное содержание Т-лимфоцитов у животных обеих групп повысилось на 47,1 и 38,8 %, и было незначительно ниже у поросят опытной группы, при этом относительное их количество было выше на 6,0 %. Количественные изменения произошли и в субпопуляциях Т-лимфоцитов. У животных обеих групп по сравнению с фоном снизилось относительное содержание теофиллинчувствительных Т-лимфоцитов (супрессоров)

на 4,3 и 18,1 %, при этом их значение у поросят опытной группы было меньше, чем в контроле на 14,4 %, что свидетельствует о меньшей супрессии клеточного иммунитета.

Относительное содержание Т-лимфоцитов с хелперной активностью, обеспечивающих формирование гуморального (синтез антител), клеточного иммунитета и активацию макрофагов, у поросят контрольной группы уменьшилось на 20,0 % ($p < 0,01$), а в опытной — практически не изменилось, при этом у последних их значение превышало контрольный показатель на 23,2 % ($p < 0,01$).

Таблица 2

Показатели клеточного иммунитета у поросят

Показатели	Возраст (дни), группы		
	5	26	26
	фон	контрольная	опытная
Лейкоциты, 10^9/л	11,84 ± 1,43	14,25 ± 2,02	12,08 ± 1,12
Лимфоциты, %	41,0 ± 0,70	54,0 ± 2,42*	56,8 ± 0,74*
Лимфоциты, 10^9/л	4,85 ± 0,08	7,70 ± 0,34*	6,85 ± 0,09*
Т-лимфоциты, %	46,8 ± 1,40	43,4 ± 1,12	46,0 ± 1,89
Т-лимфоциты, 10^9/л	2,27 ± 0,07	3,34 ± 0,09*	3,15 ± 0,11*
Ттфч, %	18,8 ± 1,60	18,0 ± 1,14	15,4 ± 0,98
Ттфр, %	28,0 ± 0,93	22,4 ± 0,97*	27,6 ± 0,98+
Ттфр/Ттфч, ед.	1,65 ± 0,18	1,25 ± 0,17	1,89 ± 0,2+
В-лимфоциты, %	16,3 ± 1,25	21,8 ± 0,81*	24,4 ± 0,97*
В-лимфоциты, 10^9/л	0,79 ± 0,06	1,68 ± 0,06*	1,67 ± 0,07*

* $p < 0,01$—$0,001$ — к фону
\+ $p < 0,05$—$0,01$ — к контролю

Иммунорегуляторный индекс (Ттфр/Ттфч) у животных контрольной группы снизился на 24,2 %, а в опытной — увеличился на 14,5 %, превысив контрольный показатель на 51,2 % ($p < 0,05$), что свидетельствует о существенном снижении супрессивной активности Т-лимфоцитов.

Относительное и абсолютное количество В-лимфоцитов, играющих важную роль в реализации иммунного ответа и выработке специфических антител, у поросят контрольной и опытной групп увеличилось на 33,7 % ($p < 0,01$) и 49,5 % ($p < 0,002$), на 61,1 % ($p < 0,001$) и 52,8 % ($p < 0,001$). При этом относительное количество В-клеток у животных опытной группы было выше, чем в контроле на 11,9 %.

При изучении цитокинового профиля у поросят опытной группы по сравнению с контролем установлено пониженное содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1β на 8,8 %, ИЛ-2 — на 4,5 %, ИФН-γ — на 2,8 % ($p < 0,02$), что свидетельствует о предрасположенности животных контрольной группы к развитию воспалительного процесса (табл. 3).

У них же был ниже и уровень противовоспалительного медиатора ИЛ-4 на 5,3 % при отсутствии разницы в количестве ИЛ-10. Общее соотношение про- и противовоспалительных цитокинов, как и отношение медиаторов, продуцируемых Th-1 и Th-2 лимфоцитами, имели тенденцию к незначительному снижению по сравнению с фоном и практически не отличались у подопытных животных (табл. 3).

Применение «Пентапрола» переболевшим послеродовыми болезнями свиноматкам положительно сказалось на клиническом статусе выращиваемых под ними поросят (табл. 4).

Таблица 3

Цитокиновый профиль у поросят

Цитокины, пг/мл	Возраст (дни), группы		
	5	26	26
	фон	контрольная	опытная
ИЛ-1β	3,36 ± 0,075	3,62 ± 0,039*	3,30 ± 0,220
ИЛ-2	4,90 ± 0,075	5,34 ± 0,277	5,10 ± 0,085
ИЛ-4	1,54 ± 0,003	1,71 ± 0,073*	1,62 ± 0,137
ИЛ-10	3,75 ± 0,155	4,04 ± 0,306	3,99 ± 0,092
ФНО-α	1,63 ± 0,019	1,84 ± 0,094	1,89 ± 0,053*
ИФН-γ	12,0 ± 0,188	12,30 ± 0,091	11,96 ± 0,055+
ОЦИ	4,14	4,02	3,97
ЦИ (Th-1/Th-2)	3,50	3,39	3,38

* $p < 0,05$—0,002 — к фону
\+ $p < 0,02$ — к контролю

Таблица 4

Результаты клинических исследований

Показатели	Группы поросят	
	контрольная	опытная
1	2	3
Количество свиноматок с послеродовой патологией	11	12
в том числе эндометритом, кол./% ММА, кол./%	 7/63,6 4/36,4	 9/75,0 3/25,0
Количество поросят под свиноматками,	152	168
Заболело поросят желудочно-кишечными болезнями, кол./%	25/16,7	11/6,5
Продолжительность лечения, дней	7	5
Выздоровело, кол./%	22/88,0	10/90,9
Летальность, кол./%	3/12,0	1/9,1
Общее количество поросят при отъеме	149	167
Количество поросят на одну свиноматку при отъеме	13,5	13,9
Масса поросят при отъеме, кг	1028,6	1235,7
Масса одного поросенка при отъеме, кг	6,9	7,4

Окончание табл. 4

1	2	3
Продолжительность подсосного периода, дни	28	28
Среднесуточный прирост, г	200	218
Сохранность, %	98,0	99,4

Заболеваемость поросят желудочно-кишечными болезнями, выращиваемых под свиноматками опытной группы, составила 6,5 %, в контроле — 16,7 %. Продолжительность лечения больных поросят с использованием антимикробного препарата «Квинокол Плюс» в дозе 0,5 мл/10 кг массы тела один раз в сутки, составила по группам животных соответственно 5 и 7 дней. Численность выздоровевших животных в контрольной и опытной группах составила 90,9 и 88,0 %, летальность — 9,1 и 12,0 % соответственно. Количество отнятых поросят на 1 свиноматку составило соответственно 13,9 и 13,5 голов со средней массой тела 7,4 и 6,9 кг при среднесуточном приросте массы тела 218 и 200 г и сохранности 99,4 и 98,0 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Назначение пробиотика «Пентапрол» лактирующим свиноматкам, переболевшим послеродовыми болезнями, сопровождалось повышением у выращиваемых под ними поросят по сравнению с приплодом, находящимся под свиноматками без применения препарата, содержания общих иммуноглобулинов, неспецифической клеточной защиты, адаптивного клеточного иммунитета, снижением количества циркулирующих иммунных комплексов, их патогенности и антигенной нагрузки на клетки-продуценты провоспалительных (ИЛ-1β, ИЛ-2 и ИФН-γ) и противовоспалительного (ИЛ-4) цитокинов, что способствовало уменьшению заболеваемости их желудочно-кишечными болезнями, сокращению продолжительности лечения больных животных, увеличению массы тела при отъеме и сохранности.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Асрутдинова Р. А.* Оценка иммунного статуса поросят в условиях свиноводческих комплексов / Р. А. Асрутдинова, Л. В. Резниченко //Достижения науки и техники АПК. — № 5. — С. 51—52.

2. *Попов В. С.* Этиологические особенности иммунодефицитов у свиней в условиях промышленной технологии / В.С. Попов, Н. В. Самбуров, А. А. Зорикова // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. — 2016. — № 4. — С. 63—67.

3. *Мисайлов В. Д.* Агалактия у свиноматок — одна из причин высокой заболеваемости и гибели поросят / В. Д. Мисайлов // Ветеринарная патология. — 2003. — № 3 (7). — С. 12—13.

4. *Сидоров М. А.* Иммунный статус и инфекционные болезни новорожденных телят и поросят/ М. А. Сидоров, Ю. Н. Федоров, О. М. Савич // Ветеринария. — 2006. — № 11. — С. 3—5.

5. *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.

6. *Федоров Ю. Н.* Первичные иммунодефициты животных: иммуногенетическая и клинико-иммунологическая характеристика (обзор), Ю. Н. Федоров, В. И. Клюкина, М. Н. Романенко // Сельскохозяйственная биология. — 2014. — № 4. — С. 3—15.

7. *Шахов А. Г.* Состояние неспецифической клеточной защиты у поросят, выращиваемых под переболевшими послеродовыми болезнями свиноматками / А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, Ю. Ю. Владимирова, Г. Г. Чусова // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. — 2023. — Т. 59, № 3. — С. 99—103.

8. *Коцарев В. Н.* Терапия и профилактика послеродовых болезней у свиноматок с использованием антимикробного препарата нородин /В.Н. Коцарев, В. Ю. Боев // Свиноводство. — 2011. — № 4. — С. 57—59.

9. *Филатов А. В.* Фармакопрофилактика послеродовых заболеваний у свиноматок / А. В. Филатов, А. Ф. Сапожников // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. — 2014. — № 4. — С. 39—43.

10. *Шабунин С. В.* Ветеринарные аспекты решения проблемы метрит-мастит-агалактии у свиноматок / С. В. Шабунин, А. Г. Нежданов, В. Н. Коцарев, Л. В. Ческидова // Достижения науки и техники АПК. — 2013. — № 9. — С. 62—654.

11. *Бобрик Д. И.* Распространение и ранняя диагностика синдрома метрит-мастит-агалактия у свиноматок / Д. И. Бобрик // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная ака-

демия ветеринарной медицины. — 2017. — Т. 53, № 1. — С. 25—28.

12. *Коцарев В. Н.* Гепатотропные препараты для коррекции репродуктивной функции свиноматок / В. Н. Коцарев, В. Д. Мисайлов, А. Г. Нежданов //Ветеринария. — 2008. — № 5. — С. —31—35.

13. *Коцарев В. Н.* К вопросу этиологии, диагностики, профилактики и терапии послеродовых гнойно-воспалительных заболеваний половых органов у свиноматок / В. Н. Коцарев, Н. И. Шумский, А. Г. Нежданов, В. Ю. Боев // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. — 2014. — № 4 (39). — С. 225—229.

14. *Бригадиров Ю. Н.* Морфологические показатели крови свиноматок при применении препарата «Триолин» для профилактики воспалительных процессов в репродуктивных органах / Ю. Н. Бригадиров, В. Н. Коцарев, Г. Г. Чусова, А. Э. Лобанов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2020 — № 2 (11). — С. 88—91. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.2.88

15. *Бригадиров Ю. Н.* К вопросу профилактики воспалительных процессов в репродуктивных органах свиноматок /Ю.Н. Бригадиров, В. Н. Коцарев, И. Т. Шапошников, О. А. Манжурина, Н. Е. Папин, И. Ф. Клементьева, Т. Г. Ермолова, А. Э. Лобанов // Ветеринарный фармакологический вестник (научно-практический журнал). — 2019. № 2 (7). — С. 91—98.

16. *Черненок В. В.* Влияние пробиотиков на показатели крови и интенсивность роста поросят-сосунов / В. В. Черненок, Ю. Н. Черненок, Ю. И. Симонов // Зоотехния. — 2016. — № 5. — С. 24—25.

17. *Панин А. Н.* Пробиотики в животноводстве: состояние и перспективы / А. Н. Панин, Н. И. Малик, О. С. Илаев // Ветеринария. — 2012. — № 3. — С. 3—8.

18. *Булатова Е. М.* Влияние применения пробиотических продуктов в период беременности и кормления грудью на становление кишечной микробиоты ребенка / Е. М. Булатова, О. К. Нетребенко, Н. М. Богданова, И. С. Волкова, М. В. Нечеса, А. М. Шабалов, А. И. Шилов, М. И. Дубровская // Педиатрия. — 2015. — Т. 94, № 3. — С. 121—128.

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

20. 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.

21. *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;
И. В. Волкова — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;
С. Н. Фурчаков — старший лаборант;
Т. И. Ермакова — кандидат биологических наук;
П. В. Мирошниченко — ведущий научный сотрудник;
В. М. Басанкина — старший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 03.03.2025.

AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION, DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

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

EFFECT OF THE ADMINISTRATION OF THE PROBIOTIC "PENTAPROL" TO SOWS THAT HAVE SUFFERED FROM POSTPARTUM DISEASES ON THE IMMUNE STATUS OF PIGLETS REARED UNDER THEM

Aleksey Gavrilovich Shakhov[*], Larisa Yuryevna Sashnina[*]✉, Vladimir Nikolaevich Kotsarev[*], Irina Vladimirovna Volkova[*], Sergey Nikolaevich Furchakov[*], Tatyana Igorevna Ermakova[*], Petr Vasilyevich Miroshnichenko[**], Viktoriya Mikhaylovna Basankina[**]

[*]All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, vnivipat@mail.ru✉
[**]Krasnodar Research Center for Zootechnics and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia

Abstract. The article presents the results of studying the effect of the probiotic "Pentaprol" when administered to lactating sows that have recovered from postpartum diseases on the immune status of piglets. It had been found that, compared to piglets reared under sows without the drug, they had a higher content of total immunoglobulins, non-specific cellular protection, adaptive cellular immunity and a reduced number of circulating immune complexes and their pathogenicity, which indicated a more pronounced humoral protection, as well as the level of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-2, IFN-γ and the anti-inflammatory mediator IL-4 due to a decrease in the antigen load on their producer cells. An increase in the immune status of piglets contributed to a decrease in the incidence of gastrointestinal diseases, an increase in survival and productivity.
Keywords: sows, piglets, probiotic "Pentaprol", immune status, cytokines

At industrial pig breeding farms, secondary immunodeficiencies are often recorded in piglets in the early postnatal period [1, 2], one of the causes of which is postpartum diseases in sows, manifested by a decrease or cessation of the secretion of colostrum (milk) — the main source of nutrition and colostral immunity for newborns [3—6].

In piglets reared under sows that had recovered from postpartum diseases, at the age of 20 days, a decrease in the serum lysozyme and complement activity, the content of total immunoglobulins, γ-globulins, the absorptive and metabolic activity of phagocytes and their functional reserve, the relative and absolute number of lymphocytes, T-cells, theophylline-resistant and theophylline-sensitive T-lymphocytes and B-cells, the concentration of cytokines IL-2, IL-4 IL-10 was found, but an increase in the content of small circulating immune complexes and their pathogenicity, which indicated a weakening of humoral and cellular protection [7].

To prevent the development of postpartum diseases in sows, antimicrobial [8, 9], hormonal [10, 11], hepatotropic and selenium-containing [12, 13] drugs, as well as pre- and probiotics [14, 15] are recommended. The use of the latter is accompanied by optimization of the intestinal microbiocenosis of sows [16], contributing to the formation of normal intestinal microflora of piglets, the physiological contamination of which begins from the moment of passing through the parturient canal, then due to fecal microflora and microflora of stalls [17].

Medical studies [18] have established that the composition of the maternal intestinal microbiota affects the formation of the child's microbiota, which carries out metabolic, antitoxic, protective and immune functions [19].

The probiotic feed additive "Pentaprol", designed by "Biona" LLC, contains live cultures of lactobacilli, lactococcus, enterococcus fecium and bifidobacte-

ria, and is recommended for stabilizing intestinal microflora, increasing productivity and survival of pigs and poultry.

The objective of the study was to investigate the effect of the administration of the probiotic "Pentaprol" in sows that had recovered from postpartum diseases on the immune status of piglets reared under them.

MATERIAL AND METHODS

The studies were conducted at an industrial pig breeding farm. The experiment included 23 sows that had recovered from acute postpartum endometritis and/or mastitis-metritis-agalactia, which after treatment with pharmacological agents of antimicrobial, anti-inflammatory and uterotonic action were divided into two groups.

The sows of the experimental group (n = 12) were given the probiotic "Pentaprol" daily with drinking water through a medicator, 10 ml for 20 days. The animals of the control group (n = 11) did not receive the drug. The piglets reared under them were monitored, their incidence of gastrointestinal diseases, livability and productivity were taken into account.

Blood samples were collected from piglets (n = 5) reared under sows of both groups at the age of 5 and 26 days for immunological studies, which were carried out in accordance with the Methodological Recommendations for the Assessment and Correction of the Immune Status of Animals [20]. The content of 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) was 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, indices were calculated: the general ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines (CR) and mediators produced by Th-1 and Th-2 cells (CI Th-1/Th-2) [12].

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

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

In piglets of the control and experimental groups at the age of 26 days, compared with the baseline, an increase in the serum lysozyme and complementary activity by 34.8 and 36.1 %, by 48.1 % ($p < 0.02$) and 27.9 % ($p < 0.01$), respectively, was established, indicating an increase in non-specific humoral protection (Table 1).

Table 1

Indicators of humoral and cellular link of non-specific immunity in piglets

Indicators	Age (days), groups		
	5	26	26
	baseline	control	experimental
1	2	3	4
SLA, mcg/ml	1.55 ± 0.67	2.09 ± 0.19	2.11 ± 0.109
SCA, % hem.	10.4 ± 0.71	15.4 ± 1.48*	13.3 ± 0.48*
Total Ig, mg/ml	27.3 ± 2.01	20.6 ± 0.73*	23.2 ± 0.62+
CIC3.0 % mg/ml	0.32 ± 0.01	0.11 ± 0.01*	0.08 ± 0.01*
CIC7.0 % mg/ml	1.15 ± 0.05	0.21 ± 0.03*	0.14 ± 0.01*
C7/C3	3.55 ± 0.18	1.97 ± 0.16*	1.78 ± 0.23*
NPA, %	77.0 ± 1.29	73.6 ± 0.92	74.4 ± 0.75
PhI	5.70 ± 0.07	4.84 ± 0.13*	4.94 ± 0.18*
PhN	4.39 ± 0.10	3.62 ± 0.03*	3.76 ± 0.19*
spNBT, %	18.0 ± 1.42	14.8 ± 1.02	15.2 ± 0.80

Table 1 (the end)

1	2	3	4
stNBT, %	28.0 ± 1.83	33.0 ± 0.77*	37.8 ± 0.81*+
RI	1.57 ± 0.11	2.27 ± 0.21*	2.5 ± 0.09*

* $p < 0.05$—0.001 — to the baseline
\+ $p < 0.05$—0.002 — to the control

At the same time, the SCA value in piglets of the experimental group was significantly lower by 13.6 % ($p < 0.01$), which was associated with the consumption of complement for the implementation of more pronounced phagocytosis in them, since its components directly or indirectly (through antibodies) bind to bacteria. The content of total immunoglobulins, reflecting the state of humoral protection, in piglets of the control and experimental groups decreased by 24.5 % ($p < 0.02$) and 15.0 %. At the same time, their value in animals of the experimental group exceeded by 12.6 % ($p < 0.05$).

When determining circulating immune complexes, which are products of the antigen-antibody reaction and play a significant role in maintaining the body's homeostasis, a reliable ($p < 0.001$) decrease in the level of large (3.0 %) CIC in piglets of the control and experimental groups by 2.9 and 4.0 times, and fine (7.0 %) CIC — by 5.5 and 8.2 times, and their pathogenicity (C7/C3) — by 44.5 and 49.9 % was established. At the same time, their values in animals of the experimental group were lower by 27.3, 33.3 and 9.6 %, respectively, which indicated a more pronounced humoral protection in them. In the cellular link of non-specific protection, a decrease in the number of active phagocytes in piglets of the control and experimental groups was noted by 4.4 and 3.4 %, PhI — by 15.1 % ($p < 0.001$) and 13.3 % ($p < 0.001$), and PhN — by 17.5 % ($p < 0.001$) and 14.4 % ($p < 0.02$). At the same time, the indicators of the absorptive function of phagocytes in animals of the experimental group tended to slightly (by 2.1 and 3.9 %) exceed.

When studying the metabolic activity of neutrophils, it was found that the spontaneous NBT test in piglets of both groups decreased by 17.8 and 15.6 %, and the stimulated NBT test increased by 17.9 and 35.0 %, as well as the functional cell reserve — by 44.6 % ($p < 0.02$) and 59.2 % ($p < 0.001$). At the same time, the values of stNBT and RI in animals of the experimental group exceeded the control values by 14.5 % ($p < 0.01$) and 10.1 %, respectively.

When studying cellular immunity in piglets of the control group, an increase in the leukocyte content by 20.4 % was recorded, the number of which in animals of the experimental group was lower by 15.2 %, which was apparently due to the greater expenditure on the implementation of cellular protection (Table 2).

The relative and absolute number of lymphocytes, which are one of the main indicators of cellular immunity, in animals of the control and experimental groups increased by 31.7 % ($p < 0.01$) and 38.5 % ($p < 0.01$), by 58.8 ($p < 0.001$) and 41.2 % ($p < 0.001$), respectively. At the same time, in piglets of the experimental group, the relative level was by 5.2 % higher than the control indicator, and the absolute number was by 6.0 % lower.

The absolute content of T-lymphocytes in animals of both groups increased by 47.1 and 38.8 %, and was slightly lower in piglets of the experimental group, while their relative number was higher by 6.0 %.

Quantitative changes also occurred in the subpopulations of T-lymphocytes. In animals of both groups, compared to the baseline, the relative content of theophylline-sensitive T-lymphocytes (suppressors) decreased by 4.3 and 18.1 %, while their value in piglets of the experimental group was lower than in the control by 14.4 %, which indicated less suppression of cellular immunity.

The relative content of T-lymphocytes with helper activity, providing the formation of humoral (antibody synthesis), cellular immunity and activation of macrophages, in piglets of the control group decreased by 20.0 % ($p < 0.01$), and in the experimental group it remained virtually unchanged, while in the latter their value exceeded the control indicator by 23.2 % ($p < 0.01$).

The immunoregulatory index (Tres/Tsen) in animals of the control group decreased by 24.2 %, and in the experimental group it increased by 14.5 %, exceeding the control indicator by 51.2 % ($p < 0.05$), which indicated a significant decrease in the suppressive activity of T-lymphocytes.

Table 2

Indicators of cellular immunity in piglets

Indicators	Age (days), groups		
	5	26	26
	baseline	control	experimental
Leukocytes,10^9/L	11.84 ± 1.43	14.25 ± 2.02	12.08 ± 1.12
Lymphocytes, %	41.0 ± 0.70	54.0 ± 2.42*	56.8 ± 0.74*
Lymphocytes,10^9/L	4.85 ± 0.08	7.70 ± 0.34*	6.85 ± 0.09*
T-lymphocytes, %	46.8 ± 1.40	43.4 ± 1.12	46.0 ± 1.89
T-lymphocytes,10^9/L	2.27 ± 0.07	3.34 ± 0.09*	3.15 ± 0.11*
Tsen, %	18.8 ± 1.60	18.0 ± 1.14	15.4 ± 0.98
Tres, %	28.0 ± 0.93	22.4 ± 0.97*	27.6 ± 0.98+
Tres/Tsen, u	1.65 ± 0.18	1.25 ± 0.17	1.89 ± 0.2+
B-lymphocytes, %	16.3 ± 1.25	21.8 ± 0.81*	24.4 ± 0.97*
B-lymphocytes, 10^9/L	0.79 ± 0.06	1.68 ± 0.06*	1.67 ± 0.07*

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

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 piglets of the control and experimental groups increased by 33.7 % ($p < 0.01$) and 49.5 % ($p < 0.002$), by 61.1 % ($p < 0.001$) and 52.8 % ($p < 0.001$). At the same time, the relative number of B-cells in animals of the experimental group was higher than in the control by 11.9 %.

When studying the cytokine profile in piglets of the experimental group, compared to the control, a reduced content of proinflammatory cytokines IL-1β by 8.8 %, IL-2 — by 4.5 %, IFN-γ — by 2.8 % ($p < 0.02$) was established, which indicated a predisposition of animals of the control group to the inflammatory process development (Table 3). They also had a 5.3 % lower level of the anti-inflammatory mediator IL-4 with no difference in the amount of IL-10. The overall ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as the ratio of mediators produced by Th-1 and Th-2 lymphocytes, tended to decrease slightly, compared to the baseline and were virtually unchanged in the experimental animals (Table 3).

The use of "Pentaprol" in sows that had recovered from postpartum diseases had a positive effect on the clinical status of piglets reared under them (Table 4).

Table 3

Cytokine profile in piglets

Cytokines, pg/ml	Age (days), groups		
	5	26	26
	baseline	control	experimental
1	2	3	4
IL-1β	3.36 ± 0.075	3.62 ± 0.039*	3.30 ± 0.220

Table 3 (the end)

1	2	3	4
IL-2	4.90 ± 0.075	5.34 ± 0.277	5.10 ± 0.085
IL-4	1.54 ± 0.003	1.71 ± 0.073*	1.62 ± 0.137
IL-10	3.75 ± 0.155	4.04 ± 0.306	3.99 ± 0.092
TNF-α	1.63 ± 0.019	1.84 ± 0.094	1.89 ± 0.053*
IFN-γ	12.0 ± 0.188	12.30 ± 0.091	11.96 ± 0.055+
CR	4.14	4.02	3.97
Th-1/Th-2	3.50	3.39	3.38

* $p < 0.05$—0.002 — to the baseline
\+ $p < 0.02$ — to the control

Table 4

Results of clinical studies

Indicators	Groups of piglets	
	control	experimental
Number of sows with postpartum pathology	11	12
including endometritis, n/% MMA, n/%	 7/63.6 4/36.4	 9/75.0 3/25.0
Number of piglets under sows	152	168
Piglets fell ill with gastrointestinal diseases, n/%	25/16.7	11/6.5
Duration of treatment, days	7	5
Recovered, n/%	22/88.0	10/90.9
Mortality, n/%	3/12.0	1/9.1
Total number of piglets at weaning	149	167
Number of piglets per sow at weaning	13.5	13.9
Weight of piglets at weaning, kg	1028.6	1235.7
Weight of one piglet at weaning, kg	6.9	7.4
Duration of suckling period, days	28	28
Average daily weight gain, g	200	218
Livability, %	98.0	99.4

The incidence of gastrointestinal diseases in piglets reared under sows in the experimental group was 6.5 %, in the control — 16.7 %. The duration of treatment of sick piglets using the antimicrobial drug

"Quinocol Plus" at a dose of 0.5 ml/10 kg of body weight once a day was 5 and 7 days in groups of animals, respectively.

The number of recovered animals in the control and experimental groups was 90.9 and 88.0 %, mortality — 9.1 and 12.0 %, respectively. The number of weaned piglets per 1 sow was 13.9 and 13.5 animals, respectively, with an average body weight of 7.4 and 6.9 kg with an average daily weight gain of 218 and 200 g and a livability of 99.4 and 98.0 %.

CONCLUSION

The administration of the probiotic "Pentaprol" to lactating sows that had recovered from postpartum diseases was accompanied by an increase in the content of total immunoglobulins, non-specific cellular protection, adaptive cellular immunity in piglets reared under them, compared to the offspring reared under sows without the use of the drug, a decrease in the number of circulating immune complexes, their pathogenicity and antigen load on cells producing proinflammatory (IL-1β, IL-2 and IFN-γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines, which contributed to a decrease in the incidence of gastrointestinal diseases, a reduction in the duration of treatment of sick animals, an increase in body weight at weaning and livability.

REFERENCES

1. *Asrutdinova R. A.* Evaluation of the immune status of piglets at pig-breeding complexes / R. A. Asrutdinova, L. V. Reznichenko // Dostizheniya nauki i tekhniki APK (Achievements of science and technology of the agro-industrial complex). — No. 5. — P. 51—52.

2. *Popov V. S.* Etiological features of immunodeficiencies in pigs in industrial technology / V. S. Popov, N. V. Samburov, A. A. Zorikova // Vestnik Kurskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii (Bulletin of Kursk State Agricultural Academy). — 2016. — No. 4. — P. 63—67.

3. *Misaylov V. D.* Agalactia in sows is one of the reasons for high morbidity and mortality of piglets / V. D. Misaylov // Veterinarnaya patologiya (Veterinary pathology). — 2003. — No. 3 (7). — P. 12—13.

4. *Sidorov M. A.* Immune status and infectious diseases of newborn calves and piglets / M. A. Sidorov, Yu.N. Fedorov, O. M. Savich // Veterinariya (Veterinary medicine). — 2006. — No. 11. — pp. 3—5.

5. *Starostina N. S.* Immune status and livability of suckling piglets with the administration of selenium compounds into the body of their mothers / N. S. Starostina, A. V. Ostapchuk // Niva Povolzhya. — 2013. — No. 2 (27). — P. 118—123.

6. *Fedorov Yu.N.* Primary immunodeficiencies of animals: immunogenetic and clinical and immunological characteristics (review), Yu.N. Fedorov, V. I. Klyukina, M. N. Romanenko // Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology). — 2014. — No. 4. — P. 3—15.

7. *Shakhov A. G.* State of non-specific cellular protection in piglets reared under sows that have recovered from postpartum diseases / A. G. Shakhov, L. Yu. Vladimirova, G. G. Chusova // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya Vitebskaya ordena Znak pocheta gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny (Transactions of the educational establishments Vitebsk Order of the Badge of Honor State Academy of Veterinary Medicine). — 2023. — V. 59, No. 3. — P. 99—103.

8. *Kotsarev V. N.* Therapy and prevention of postpartum diseases in sows using the antimicrobial drug norodin / V. N. Kotsarev, V. Yu. Boev // Svinovodstvo (Pig breeding). — 2011. — No. 4. — P. 57—59.

9. *Filatov A. V.* Pharmacoprophylaxis of postpartum diseases in sows / A. V. Filatov, A. F. Sapozhnikov // Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka (Agrarian science of the Euro-North-East). — 2014. — No. 4. — P. 39—43.

10. *Shabunin S. V.* Veterinary aspects of solving the problem of mastitis-metritis-agalactia in sows / S. V. Shabunin, A. G. Nezhdanov, V. N. Kotsarev, L. V. Cheskidova // Dostizheniya nauki i tekhniki APK (Achievements of science and technology of the agro-industrial complex). — 2013. — No. 9. — P. 62—654.

11. *Bobrik D. I.* Distribution and early diagnosis of mastitis-metritis-agalactia syndrome in sows /D.I. Bobrik // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya Vitebskaya ordena Znak pocheta gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny (Transactions of the educational establishments Vitebsk Order of the Badge of Honor State Academy of Veterinary Medicine). — 2017. — V. 53, No. 1. — P. 25—28.

12. *Kotsarev V. N.* Hepatotropic drugs for the correction of reproductive function of sows / V. N. Kotsarev, V. D. Misaylov, A. G. Nezhdanov // Veterinariya (Veterinary science). — 2008. — No. 5. — P. —31—35.

13. *Kotsarev V. N.* On the issue of etiology, diagnosis, prevention and therapy of postpartum purulent-inflammatory diseases of the genital organs in sows / V. N. Kotsarev, N. I. Shumskiy, A. G. Nezhdanov, V. Yu. Boev // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Bulletin of Voronezh State Agrarian University). — 2014. — No. 4 (39). — P. 225—229.

14. *Brigadirov Yu.N.* Morphological indicators of sows' blood when using the drug "Triolin" for the prevention of inflammatory processes in the reproductive organs / Yu.N. Brigadirov, V. N. Kotsarev, G. G. Chusova, A. E. Lobanov // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii (Normative-Legal Regulatory Issues in Veterinary Medicine). — 2020 — No. 2 (11). — P. 88—91. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.2.88

15. *Brigadirov Yu.N.* On the issue of prevention of inflammatory processes in the reproductive organs of sows / Yu.N. Brigadirov, V. N. Kotsarev, I. T. Shaposhnikov, O. A. Manzhurina, N. E. Papin, I. F. Klementyeva, T. G. Er-

molova, A. E. Lobanov // Bulletin of Veterinary Pharmacology (scientific and practical journal). — 2019. No. 2 (7). — P. 91—98.

16. *Chernenok V. V.* Effect of probiotics on blood indicators and the growth rate of suckling piglets / V. V. Chernenok, Yu.N. Chernenok, Yu.I. Simonov // Zootekhniya (Zootechnics). — 2016. — No. 5. — P. 24—25.

17. *Panin A. N.* Probiotics in animal husbandry: status and prospects / A. N. Panin, N. I. Malik, O. S. Ilaev // Veterinariya (Veterinary medicine). — 2012. — No. 3. — P. 3—8.

18. *Bulatova E. M.* Effect of Probiotic Product Use During Pregnancy and Breastfeeding on the Development of the Child's Intestinal Microbiota / E. M. Bulatova, O. K. Netrebenko, N. M. Bogdanova, I. S. Volkova, M. V. Nechesa, A. M. Shabalov, A. I. Shilov, M. I. Dubrovskaya // Pediatriya (Pediatrics). — 2015. — Vol. 94, No. 3. — P. 121—128.

19. *Ardatskaya M. D.* Probiotics, Prebiotics and Metabiotics in the Correction of Microecological Intestinal Disorders / M. D. Ardatskaya // Meditsinskiy sovet (Medical Council). — 2015. — No. 13. P. 94—99.

20. Methodical 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.

21. *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;
I. V. Volkova — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientific Associate;
S. N. Furchakov — Senior Laboratory Assistant;
T. I. Ermakova — Candidate of Biological Sciences;
P. V. Miroshnichenko — Principal Scientific Associate;
V. M. Basankina — Senior Scientific Associate.

The article was submitted 03.03.2025.

Научная статья
УДК 636.5.033 577.126

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНКУБАЦИИ ЯИЦ КУР РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП КРОССА «КОББ-500» ПРИ ТРАНСОВАРИЛЬНОЙ ОБРАБОТКЕ ЦИТОХРОМОМ С

Татьяна Олеговна Азарнова, Семен Вадимович Успенский✉, Иван Иванович Кочиш

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина, Москва, Россия, uspenskiy.sema@mail.ru✉

Аннотация. В статье приведены исследования сравнительного анализа влияния возраста родительского стада кур кросса «КОББ-500», как стресс-фактора на инкубацию яиц и зооветеринарные показатели получаемого молодняка после предынкубационной обработки цитохромом С. Установлено, что обработка яиц цитохромом С в оптимальной концентрации (1 %) позволяет снизить в организме зародышей мясного направления продуктивности аномально высокую интенсивность перекисного окисления липидов на всех стадиях процесса в обеих опытных группах, а вместе с тем увеличить антиоксидантную активность сыворотки крови, определив условия для повышения эмбриональной жизнеспособности и качества молодняка суточного возраста.

Ключевые слова: возраст родительского стада, цитохром С, перекисное окисление липидов, отходы инкубации, эмбриогенез цыплят, качество цыплят.

Современная птицеводческая промышленность базируется на использовании высокопродуктивных кроссов, обеспечивающих население качественной и биологически полноценной продукцией, которая во многом позволяет реализовать задачи продовольственной безопасности страны, повысить возможности наращивания темпов импортозамещения и экспорта. Однако ввиду достаточно высоких затрат на содержание ремонтного молодняка и кур родительского стада, отдельным птицефабрикам приходится в ряде случаев использовать последних в инкубацию в возрасте свыше допустимого (более 65 недель) [1]. Как известно, возраст, оказывает влияние как на качество инкубационных яиц, так и на эмбриональное и постэмбриональное развитие цыплят [2]. При этом использование в инкубацию яиц от возрастных групп свыше пороговых значений, определяет ряд негативных последствий, которые выражаются в изменении в них физико-химических свойств всех составляющих, разрушении биологически активных веществ, необходимых для интенсивного развития зародышей (незаменимых аминокислот, витаминов и др.) [3]. Молодняк, получаемый из таких яиц, обычно не соответствует стандартам качества, что обусловлено нарушением развития всех тканей и органов, и, как следствие неполноценным становлением потенциала хозяйственно — полезных признаков птицы [4]. Учитывая изложенное выше, не вызывает сомнений необходимость детального изучения нарушений, происходящих в организме эмбрионов при использовании в инкубацию яиц от старшего возраста, а также разработки новых, высокоэффективных, научно обоснованных подходов стимуляции эмбриогенеза и повышения его результативности.

В этой связи, для решения заявленной проблемы многие авторы рекомендуют к использованию различные полифункциональные биологически активные вещества, обладающие свойствами, позволяющими скорректировать развитие эмбрионов кур в условиях гипоксии и недостатка питательных веществ [5]. По мнению коллектива авторов представленной работы, к таковым можно отнести белок-переносчик митохондриальной дыхательной цепи — цитохром С, который обладает энергостабилизирующими, обменостимулирующими, антигипоксическими, антиоксидантными и антитоксическими свойствами [6]. При этом данное вещество является естественным метаболитом, и характеризуется высокой степенью биодоступности, универсальностью действия для многих живых организмов [7]. Следует отметить, что биостимулятор,

предложенный нами в эксперименте, представляет собой конформацию, которая в клетке находятся в межмембранном пространстве митохондрии и обладает антиоксидантными возможностями, тогда, как другая закрепленная на внутренней стороне мембраны — реализует в основном проапоптотические функции [8].

Таким образом, преимущество выбранной формы не вызывает сомнений и не определяет риски развития апоптоза клеток после применения цитохрома С [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе исследования осуществляли 2 эксперимента: в условиях ФГБНУ ФНЦ «ВНИТИП», кафедр химии имени проф. С. И. Афонского и А. Г. Малахова, а также зоогигиены и птицеводства им. А. К. Даниловой ФГБОУ ВО МГАВМИБ — МВА имени К. И. Скрябина.

В первом эксперименте объектами исследования были инкубационные яйца, полученные от кур мясного направления продуктивности кросса «КОББ-500» 70-недельного возраста (превышение рекомендуемого возраста для использования в инкубацию яиц составило 5 недель) [1].

Во втором опыте использовали инкубационные яйца, полученные от кур кросса «КОББ-500» 50-недельного возраста, который допустим для использования в инкубацию яиц [1]. Опыты были проведены в течение одного сезона.

В обоих экспериментах были сформированы 2 группы (опытная и контрольная) по 252 яйца в каждой. Опытные в обоих случаях перед инкубацией однократно трансовариально обрабатывали раствором биостимулятора цитохрома С в 1 %-ой концентрации, ранее выявленной в серии предшествующих экспериментов [9]. Яйца контрольных групп оставались интактными. Все группы были подобраны по принципу аналогов с учетом времени снесения, сроков хранения и массы.

Совокупность предложенных в работе показателей, определяли по общепринятым методикам [10, 11]. В свою очередь, полученные цифровые данные были обработаны методом вариационной статистики с определением t_d — критерия достоверности по Стьюденту и уровня достоверности различий в показателях по группам.

Все исследования проведены с соблюдением правил, определенных Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предынкубационное использование цитохрома С в концентрации 1 %, определило позитивное влияние на эмбриогенез молодняка, полученного из яиц, как средневозрастной, так и птицы старшего возраста, однако, с определенной долей различий, что во многом было обусловлено реализацией его антиоксидантных возможностей (табл. 1).

Таблица 1

Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидативной защитной системы (АОСЗ) у суточных цыплят (M ± m, n = 5)

Показатель	Род. стадо 70 недель		Род. стадо 50 недель	
	Контрольная	Опытная	Контрольная	Опытная
ОАА, мг/мл	1,62 ± 0,28	2,01 ± 0,03**	1,98 ± 0,07	2,1 ± 0,25
ДК, мкмоль/л	2,17 ± 0,16	2,0 ± 0,28	2,3 ± 0,14	2,1 ± 0,11
ТК, мкмоль/л	1,0 ± 0,08	0,9 ± 0,13	1,2 ± 0,12	0,9 ± 0,10
МДА, мкмоль/л	4,3 ± 0,55	2,8 ± 0,17**	2,1 ± 0,16	1,8 ± 0,15
ОШ, отн.ед/мл	0,9 ± 0,31	0,3 ± 0,08	0,2 ± 0,37	0,1 ± 0,37

Здесь и далее
* $p < 0,05$
** $p < 0,01$
*** $p < 0,001$
К — контрольная, О — опытная группа.

При анализе данных таблицы 1, установлено, что трансовариальная обработка яиц цитохромом С в оптимальной концентрации, определила снижение интенсивности липопероксидации на всех ее стадиях у молодняка суточного возраста в обеих опытных группах, относительно контроля. При этом оказываемый биостимулятором эффект на концентрации продуктов липопероксидации в крови у молодняка суточного возраста был различен в зависимости от возраста родительского стада.

Так, содержание первичных и некоторых вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), таких как диеновые и триеновые конъюгаты уменьшилось на 8 % и 9 % у молодняка, полученного от старшего родительского стада и на 10 %, и 25 % у молодняка от средневозрастного, соответственно, по сравнению с контролем.

В свою очередь уровень других вторичных продуктов, а именно малонового диальдегида (МДА) снизился на 34,8 % ($p < 0,01$) у цыплят, полученных от старшего родительского стада и на 14,8 % (МДА) от средневозрастного, соответственно, по сравнению с контролем. При этом уменьшение концентрации конечных продуктов в виде оснований Шиффа (ОШ) составило — 66 % у молодняка, полученного при использовании яиц в инкубацию от старшего родительского стада и 50 % (ОШ) от средневозрастного, соответственно относительно контроля.

Вышеуказанное свидетельствует, что применение цитохрома С в оптимальной концентрации в случае использования в инкубацию старшего и средневозрастного родительских стад, позволяет предотвратить накопление модифицированных продуктов обмена, предупредить нарушения дифференцировки, пролиферации клеток, мутации, предупредить развитие воспалительных и аутоиммунных реакций, инициируемых избыточным синтезом, а вместе с тем цитотоксичным действием продуктов ПОЛ [13, 17].

Сопоставление разницы концентраций этих веществ в организме молодняка суточного возраста опытных и контрольных групп позволило выявить, что процесс липопероксидации на начальных стадиях более интенсивно идет у цыплят, полученных из яиц средневозрастного стада, тогда как в середине и в конце процесса наибольшие различия зафиксированы у представителей, выведенных из яиц от старшего стада.

При этом несмотря на то, что цитохром С снижает интенсивность реакции на протяжении всего процесса липопероксидации, картина изменений по этапам процесса, ассоциированная с возрастом птицы, остается аналогичной контролю. Выявленные закономерности позволяют выдвинуть предположение о том, что у молодняка, полученного от средневозрастного стада, антиоксидантная защита более реактивна относительно особей, выведенных из яиц старшего стада, что подтверждается увеличением ОАА на 24 % ($p < 0,01$) в первом случае против 6 % во втором.

Это также свидетельствует о том, что у первых более выражены перспективы сохранения целостности и функциональности клеток в условиях воздействия сильных и средних стрессоров. В свою очередь, у представителей контроля и опыта, полученных от старшего родительского стада протекание процесса липопероксидации было менее контролируемое и стремительное, что подтверждается значительным преобладанием вторичных и конечных продуктов ПОЛ: малонового диальдегида (МДА) и оснований Шиффа (ОШ), в отличие от таковых в опыте и контроле выведенных из яиц средневозрастного стада.

Следует напомнить, что малоновый диальдегид способен взаимодействовать с белковыми структурами, что приводит к нарушению реализации их функциональных возможностей, а вместе с тем с липидами и нуклеиновыми кислотами, обуславливая их внутримолекулярное или межмолекулярное сшивание и, как следствие, глубокие изменения в биохимических свойствах биомолекул. К таковым по данным Ayala A. (2014) можно отнести нарушения в регуляции системы комплимента, инициирующие аутоиммунные повреждения организма [13]. В свою очередь, в работах Arulselvan P. (2016) отражено, что модификация альдегидами нуклеиновых кислот при прогрессии липопероксидации индуцирует экспрессию различных генов, которые кодируют провоспалительные цитокины (IL-2, IL-6, TGF-a) и молекулы адгезии (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1), определяя инициацию и масштабирование, прежде всего, воспалительных реакций [14]. Также взаимодействие альдегидов с нуклеиновыми кислотами с образованием ДНК-аддуктов определяет возникновение спонтанных мутаций [13].

Принимая во внимание, изложенное выше, можно предполагать, что обработка цитохром С профилактировала инициацию вышеуказанных процессов, определяя условия для успешной реализации адаптационных возможностей и стабилизации гомеостаза [8].

В свою очередь увеличение ОАА у представителей опытных групп не только подтверждает вы-

шеуказанное, но свидетельствует о реализации, как собственных антиоксидантных возможностей [15], так и о возможности стимуляции синтеза других компонентов антиоксидантной системы [7]. При этом ввиду разницы в содержании необходимых питательных веществ в яйцах, полученных от разных по возрасту кур родительских стад, становление данной системы и ее возможности у молодняка, полученного от старшего стада, были ограничены в отличие цыплят, выведенных из яиц от средневозрастных.

Коррекция интенсивности процессов липопероксидации и улучшение антиоксидантных возможностей организма молодняка опытных групп, а вместе с тем перспективы сохранения целостности клеточных структур [8], определили более комфортное протекание эмбриогенеза кур и большую результативность процесса вывода цыплят (табл. 2).

Таблица 2

Место наклева и показатели скорлупы яиц, оставшейся после вывода цыплят. (M ± m, n = 10)

Толщина скорлупы, мм		Количество фрагментов скорлупы %		Место наклева, %	
		2	3 и более	Физиологическое место наклева (между серединой и тупым концом) %	Атипичное место наклева (в середине или между срединой и острым концом яйца) %
Род. стадо 70 недель					
О	0,21 ± 0,2	70 %	30 %	80 %	20 %
К	0,25 ± 0,4	60 %	40 %	70 %	30 %
Род. стадо 50 недель					
О	0,30 ± 0,02	90 %	10 %	90 %	10 %
К	0,35 ± 0,02	70 %	30 %	80 %	20 %

При изучении показателя толщины скорлупы, оставшейся на выводе цыплят, было выявлено, что она была тоньше в партии яиц, полученных от кур старшего родительского стада, преимущество опытной группы относительно контроля по обсуждаемому показателю составило — 16 %, тогда как в партии яиц, полученных от средневозрастного родительского стада — 14 %.

Наблюдаемое истончение скорлупы в обоих опытных группах связано с тем, что она является депо кальция и других минеральных веществ, необходимых для построения не только опорно-двигательного аппарата молодняка, но и активизации и/или построения ферментов; реализации функций нервной системы, осуществления мембранно-внутриклеточного механизма действия гормонов, стимуляции синтеза отдельных из них и т. д. [16]. Из этого следует, что истончение скорлупы было обусловлено более полным потреблением организмом эмбриона необходимых для его развития веществ в обоих опытных группах, определяя условия для повышения качества получаемого молодняка, что согласуется с данными таблиц 3, 4.

Немало важную роль в характеристике качества и интенсивности развития зародыша, играет наклев. При анализе этого показателя, было установлено, что у цыплят опытной группы, полученных от старшего родительского стада, наклев в физиологически правильном месте, наблюдали в 16 % случаев, тогда как у средневозрастного данный показатель составил 28 %, относительно контрольной группы по данному показателю.

Выявленные результаты в опытных группах позволяют считать, что расположение молодняка в яйце в них было в большинстве случаев правильным благодаря благоприятному действию цитохрома С, препятствующему деструктивным явлением в клетках организма эмбриона, сохранению синтеза энергии, определившим условия для более полного потребления питательных веществ, а вместе с тем

качественного развития птицы. Следует отметить, что наблюдаемое нами преобладание двухфрагментных скорлупок над трех- и более фрагментными в обоих опытных группах на 14 % у старшего стада и 12,5 % у средневозрастного стада, относительно контроля, свидетельствует о более быстром и эффективном выводе молодняка, относительно контроля.

Таблица 3

Качество цыплят суточного возраста по шкале «Пасгар», баллы (M ± m, n = 10)

Показатель	Род. стадо 70 недель		Род. стадо 50 недель	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Рефлекс поведения	1,7 ± 0,15	1,9 ± 0,10	1,6 ± 0,16	1,9 ± 0,10
Пупочное кольцо	1,6 ± 0,22	2,0 ± 0,00	1,8 ± 0,20	2,0 ± 0,00
Плюсна и пальцы	1,8 ± 0,13	1,9 ± 0,10	1,6 ± 0,16	1,8 ± 0,13
Клюв	1,9 ± 0,10	2,0 ± 0,00	1,8 ± 0,13	2,0 ± 0,00
Живот	1,8 ± 0,20	2,0 ± 0,00	1,8 ± 0,20	2,0 ± 0,00
Критерий «Пасгар»	8,5 ± 0,27	9,7 ± 0,15	8,6 ± 0,31	9,7 ± 0,15**

Таблица 4

Качество цыплят суточного возраста по шкале «Оптистарт», баллы (M ± m, n = 10)

Показатель	Род. стадо 70 недель		Род. стадо 50 недель	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Мышечный тонус шеи	1,7 ± 0,15	1,9 ± 0,10	1,6 ± 0,16	2,0 ± 0,00
Рефлекс поведения	1,7 ± 0,15	1,9 ± 0,10	1,6 ± 0,16	1,9 ± 0,10
Пупочное кольцо	1,6 ± 0,22	2,0 ± 0,00	1,8 ± 0,20	2,0 ± 0,00
Клюв	1,9 ± 0,10	2,0 ± 0,00	1,8 ± 0,13	2,0 ± 0,00
Живот	1,8 ± 0,20	2,0 ± 0,00	1,8 ± 0,20	2,0 ± 0,00
Критерий «Оптистарт»	8,7 ± 0,50	9,8 ± 0,13*	8,6 ± 0,48	9,9 ± 0,10

Анализ данных таблицы 3 и 4, свидетельствует о том, что бальная оценка качества полученного молодняка по шкалам «ПАСГАР» и «ОПТИСТАРТ» в опытных группах однократно предынкубационно обработанных цитохромом С в концентрации 1 % имела преимущество относительно контроля на 1,2 балла в группе молодняка, полученного от старшего родительского стада и 1,1 ($p < 0,05$) балла в группе от средневозрастного родительского стада в первом случае и 1,0 ($p < 0,01$) и на 1,2 балла, соответственно, во втором. Наибольшие различия были установлены по показателям, характеризующим развитие нервной системы и производных кожи. Наилучшие эффекты стимуляции становления этих тканей, зафиксированы в группе молодняка, полученного от старого родительского стада.

Предынкубационная трансовариальная обработка яиц оптимальным раствором цитохрома С определила более комфортное протекание эмбриогенеза, что обусловило повышение эмбриональной жизнеспособности на всех этапах периода.

Полученные данные свидетельствуют о том, что даже однократное использование биостимулятора позволило нивелировать негативные последствия аномального развития процессов липопероксидации и гипоксии, гипоэнергетических состояний в организме эмбрионов кур, что определило снижение всех изученных категорий отходов инку-

бации в обоих опытных группах. Так, количество «неоплодотворенных» уменьшилось на 1,56 %, «замерших» на 0,77 %, тогда как «кровяные кольца» полностью отсутствовали в опытной группе, полученной от старшего родительского стада, при этом в опытной группе, полученной от средневозрастного категория «неоплодотворенные» снизилась на 0,70 %, «кровяные кольца» на 0,78 % ($p < 0,01$), «замершие» в 1,7 раза, соответственно по сравнению с контролем. Заявленное определило повышение показателей эмбриональной жизнеспособности, в частности, выводимости яиц на 5,37 % и вывода цыплят на 6,25 %, в опытной группе, выведенной из яиц старшего родительского стада и на 10,1 % ($p < 0,01$) и на 10,16 % ($p < 0,01$), из яиц от средневозрастного стада.

Таблица 5

Биологический контроль инкубации, %, (M ± m, n = 252)

Группа Кросс Кобб-500	Отходы инкубации, %							Выводимость яиц, %	±Δ	Вывод цыплят, %	±Δ
	Неоплод (в том числе ложный)	Кровяные кольца	Тумак	Замершие 5—10	Замершие 11—18	Задохлики	Слабые				
Род. стадо 70 недель											
К	7,42 ± 1,64	2,34 ± 0,95	0,39 ± 0,39	6,64 ± 1,56	5,08 ± 1,37	5,47 ± 1,42	1,56 ± 0,78	76,79 ± 2,64	—	71,09 ± 2,83	—
О (1 %)	5,86 ± 1,47	0,0 ± 0,0	0,78 ± 0,55	5,47 ± 1,42	3,52 ± 1,15	4,30 ± 1,27	2,73 ± 1,02	82,16 ± 2,39	5,37	77,34 ± 2,62	6,25
Род. стадо 50 недель											
К	3,13 ± 1,09	2,34 ± 0,95	0,0 ± 0,0	1,56 ± 0,78	3,13 ± 1,09	3,91 ± 1,21	3,13 ± 1,09	85,48 ± 2,20	—	82,81 ± 2,36	—
О (1 %)	2,73 ± 1,02	1,56 ± 0,78 **	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,56 ± 0,78	1,17 ± 0,67	0,0 ± 0,0	95,58 ± 1,28 **	10,1	92,97 ± 1,60**	10,16

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, однократное применение цитохрома С в оптимальной (1 %-ой) концентрации, определяет значительное снижение интенсивности липопероксидации на всех стадиях данного процесса в обеих опытных группах. Однако, на начальных стадиях ПОЛ предынкубационное однократное воздействие цитохрома С было более выраженным в группе, яйца которой подбирали от средневозрастного родительского стада, тогда как на конечных — от старого родительского стада. Снижение интенсивности липопероксидации практически в равной степени позволило повысить качество молодняка суточного возраста в обоих случаях, тогда, как позитивное влияние на эмбриональную жизнеспособность на всех стадиях развития было выражено в большей степени в той из них, в которую подбирали яйца от средневозрастного родительского стада.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Забудский Ю. И.* Репродуктивная функция у гибридной сельскохозяйственной птицы. Сообщение III. Влияние возраста родительского стада (обзор) // Сельскохозяйственная биология. — 2016. — Т. 51, № 4. — С. 436—449.

2. *Ali M. S.* The Effect of Egg Shape (egg Quality Traits) Parameters on The Characteristics of Hatched Chicks by Local Chicken / M. S. Ali, C. R. Aziz, J. A. Mohammed, M. S. Mohammed // Basrah Journal of Veterinary Research. — 2022. — V.21, (S1). — P. 224—233.

3. *Khoroshevskaya L. V.* The influence of the age of the parent herds and the duration of incubation egg storage on the development of embryos and the quality of the daily broiler / L. V. Khoroshevskaya, I. F. Gorlov, M. I. Slozhenkina, E. G. Abramenko, A. V. Rudkovskaya, I. A. Panin // Veterinaria i kormlenie. — 2023. — № 1. — P. 64—66.

4. *Успенский С. В.* Корригирование результатов инкубации при использовании яиц, полученных от старого родительского стада / С. В. Успенский, Т. О. Азарно-

ва, Ю. И. Блохин, И. С. Луговая, Е. А. Золотухина, Д. В. Аншаков // Птицеводство. — 2023. — № 5. — С. 59—65.

5. *Kpodo K. R.* Physiological effects of in ovo delivery of bioactive substances in broiler chickens / K. R. Kpodo, M. Proszkowiec-Weglarz // Frontiers in Veterinary Science. — V10. — P. 1124007.

6. *Guerra-Castellano A.* Oxidative stress is tightly regulated by cytochrome c phosphorylation and respirasome factors in mitochondria / A. Guerra-Castellano, A. Díaz-Quintana, G. Pérez-Mejías, C. A. Elena-Real, K. González-Arzola, S. García-Mauriño, A. M. De la Rosa, I. Díaz-Moreno // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2018. — V.115. — P. 7955—7960.

7. *González-Arzola K.* (2019) New moonlighting functions of mitochondrial cytochrome c in the cytoplasm and nucleus / K. González-Arzola, A. Velázquez-Cruz, A. Guerra-Castellano, M. Á. Casado-Combreras, G. Pérez-Mejías, A. Díaz-Quintana, I. Díaz-Moreno, M. Á. De la Rosa // FEBS Lett. — 2019. — V.593, № 22. — P. 3101—3119.

8. *Hannibal L.* Alternative Conformations of Cytochrome c: Structure, Function, and Detection / L. Hannibal, F. Tomasina, D. A. Capdevila, V. Demicheli, V. Tórtora, D. Alvarez-Paggi, R. Jemmerson, D. H. Murgida, R. Radi // Biochemistry. — 2016. — V.55, № 3. — P. 407—428

9. Патент РФ № 2022129763 16.11.2022 *Азарнова Т. О.*, *Успенский С. В.*, *Луговая И. С.*, *Бачинская В. М.* Способ коррекции негативных последствий при использовании в инкубацию яиц от старого родительского стада // Патент России № 2797 685. 2023. Бюл. № 16.

10. *Кочиш И. И.* Птицеводство / И. И. Кочиш, *Петраш М. Г.*, *Смирнов С. Б.* учебник для вузов. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: КолосС, 2007. — 430 с.

11. *Кондрахин И. П.* Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справ. изд. / И. П. Кондрахин и др. — М. — КолосС. — 2004. — 520 с.

12. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes. ETS № 123. — Strasbourg, 1986

13. *Ayala A.* Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal / A. Ayala, M. F. Muñoz, S. Argüelles // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2014. — P. 360438.

14. *Arulselvan P.* Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. / P. Arulselvan, M. T. Fard, W. S. Tan, S. Gothai, S. Fakurazi, M. E. Norhaizan, S. Kumar // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2016. — P. 5276130.

15. *Qui N. H.* Recent Advances of Using Polyphenols to Extenuate Oxidative Stress in Animal Production: Evidence from Poultry / N. H. Qui, N. T. Thu // Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. — 2022. — V.28, № 4. — P. 535—541.

16. *Dolgorukova A.* Deposition of Calcium in the Embryos of the Broiler Chicken as Affected by Hen Age / A. Dolgorukova, A. Zotov, M. Tishenkova // Fundamental and Applied Scientific Research in the Development of Agriculture in the Far East *(AFE-2021)*.

17. *Кочиш И. И.* Повышение стрессоустойчивости молодняка кур яичного кросса при использовании биологически активных веществ перед инкубацией / И. И. Кочиш, И. С. Луговая, Т. О. Азарнова, М. С. Найденский, А. А. Антипов, Ю. В. Петрова, Д. В. Аншаков, Е. А. Золотухина // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. — 2020. — Т. 494, № 1. — С. 236—239.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Т. О. Азарнова — доктор биологических наук, профессор кафедры химии имени проф. С. И. Афонского и А. Г. Малахова;

С. В. Успенский — студент факультета ветеринарной медицины;

И. И. Кочиш — академик РАН, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой зоогигиены и птицеводства им. А. К. Даниловой.

Статья поступила в редакцию 20.03.2025.

Original article
UDC 636.5.033 577.126

COMPARATIVE ANALYSIS OF EGG INCUBATION OF THE CHICKENS OF COBB500 CROSS OF VARIOUS AGE GROUPS UNDER TRANSOVARIAL TREATMENT WITH CYTOCHROME C

Tatyana Olegovna Azarnova, Semen Vadimovich Uspenskiy✉, Ivan Ivanovich Kochish

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Skryabin, Moscow, Russia, uspenskiy.sema@mail.ru✉

Abstract. The article presents the research of comparative analysis of the effect of the age of parent flock of the chickens of COBB500 cross as a stress-factor on egg incubation and zooveterinary indicators of the obtained young chickens after preincubation treatment with cytochrome C. It has been established that the treatment of eggs with cytochrome C in an optimal concentration (1 %) allows to reduce the abnormally high intensity of lipid peroxidation in the body of broiler (meat-type productivity) embryos at all stages of the process in both experimental groups, and at the same time to increase the blood serum antioxidant activity, determining the conditions for increasing the embryonic viability and quality of day-old young poultry.

Keywords: age of the parent flock, cytochrome C, lipid peroxidation, incubation waste, chicken embryogenesis, chicken quality

The modern poultry industry is based on the use of highly productive crosses that provide the population with high-quality and biologically complete products, which in many ways allows to implement the tasks of food security of the country, increase the possibilities of increasing the rate of import substitution and export. However, due to the rather high costs of maintaining replacement chickens and parent flock chickens, some poultry farms have to use the latter in incubation at an age above the permissible age (more than 65 weeks) in some cases [1].

As it is known, the age affects both the quality of hatching eggs and the embryonic and postembryonic development of chickens [2]. At the same time, the use of eggs from age groups above the threshold values for incubation determines a number of negative consequences, which are expressed in a change in the physicochemical properties of all components, the destruction of biologically active substances necessary for the intensive development of embryos (essential amino acids, vitamins, etc.) [3]. The young poultry obtained from such eggs usually do not meet quality standards, which is due to the disruption of the development of all tissues and organs, and, as a consequence, the incomplete development of the potential of economically useful traits of the poultry [4]. Given the above, there is no doubt about the need for a detailed study of the disorders occurring in the body of embryos when using older eggs for incubation, as well as the development of new, highly effective, scientifically based approaches to stimulating embryogenesis and increasing its efficacy.

In this regard, to solve the stated problem, many authors recommend the use of various multifunctional biologically active substances with properties that allow correcting the development of chicken embryos under conditions of hypoxia and lack of nutrients [5]. According to the team of authors of the presented work, these include the mitochondrial respiratory chain carrier protein (cytochrome C), which has energy-stabilizing, metabolically stimulating, antihypoxic, antioxidant and antitoxic properties [6]. At the same time, this substance is a natural metabolite and is characterized by a high degree of bioavailability, universality of action for many living organisms [7]. It should be noted that the biostimulant proposed by us in the experiment is a conformation that is located in the cell in the intermembrane space of the mitochondria and has antioxidant capabilities, while the other, fixed on the inner side of the membrane, implements mainly pro-apoptotic functions [8]. Thus, the advantage of the chosen form is beyond doubt and does not determine the risks of cell apoptosis after the use of cytochrome C [6].

MATERIAL AND METHODS

During the study, 2 experiments were carried out: in the conditions of FSBSI FSC "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry Farming", the Department of Chemistry named after prof. S. I. Afonskiy and A. G. Malakhov, as well as the Zoohygiene and Poultry Farming Department named after A. K. Danilova of FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Skryabin".

In the first experiment, the objects of the study were hatching eggs obtained from broiler chickens of Cobb 500 cross aged 70 weeks (the excess of the recommended age for use in egg incubation was 5 weeks) [1].

In the second experiment, we used hatching eggs obtained from 50-week-old Cobb 500 chickens, which was acceptable for use in egg incubation [1]. The experiments were conducted during one season.

In both experiments, two groups (experimental and control) were formed, with 252 eggs in each one. In both cases, the experimental eggs were once transovarially treated with a solution of the cytochrome C biostimulator in a 1 % concentration, previously identified in a series of experiments [9], before incubation. The eggs of the control groups remained intact. All groups were selected based on the principle of analogs, taking into account the time of laying, storage periods and weight.

The set of indicators proposed in the work was determined using generally accepted methods [10, 11]. In turn, the obtained digital data were processed using the variation statistics method with the determination of t_d — the Student reliability criterion and the level of reliability of differences in indicators by groups.

All studies were conducted in compliance with the rules defined by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and other Scientific Purposes [12].

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

Pre-incubation use of cytochrome C at a concentration of 1 % determined a positive effect on the embryogenesis of young poultry obtained from eggs of both middle-aged and older poultry, however, with a certain degree of differences, which was largely due to the implementation of its antioxidant capabilities (Table 1).

Table 1

Indicators of lipid peroxidation (LPO) and antioxidant defense (AOD) system in day-old chickens (M ± m, n = 5)

Indicator	Parent flock, 70 weeks		Parent flock, 50 weeks	
	Control	Experimental	Control	Experimental
EP/ADG ratio, mg/ml	1.62 ± 0.28	2.01 ± 0.03**	1.98 ± 0.07	2.1 ± 0.25
DC, μmol/L	2.17 ± 0.16	2.0 ± 0.28	2.3 ± 0.14	2.1 ± 0.11
TC, μmol/L	1.0 ± 0.08	0.9 ± 0.13	1.2 ± 0.12	0.9 ± 0.10
MDA, μmol/L	4.3 ± 0.55	2.8 ± 0.17**	2.1 ± 0.16	1.8 ± 0.15
SB, rel.units/ml	0.9 ± 0.31	0.3 ± 0.08	0.2 ± 0.37	0.1 ± 0.37

* $p < 0.05$
** $p < 0.01$
*** $p < 0.001$
C — control, E — experimental group

When analyzing the data in Table 1, it had been found that transovarial treatment of eggs with cytochrome C at an optimal concentration determined a decrease in the intensity of lipid peroxidation at all its stages in day-old young poultry in both experimental groups, relative to the control. At the same time, the effect of the biostimulant on the concentration of lipid peroxidation products in the blood of day-old young poultry was different depending on the age of the parent flock. Thus, the content of primary and some secondary products of lipid peroxidation (LPO), such as diene (DC) and triene conjugates (TC), decreased by 8 % and 9 % in young poultry obtained from older parent flock, and by 10 % and 25 % — in young poultry from middle-aged ones, respectively, compared to the control.

In turn, the level of other secondary products, namely malondialdehyde (MDA) decreased by 34.8 %

($p < 0.01$) in the chickens obtained from the older parent flock, and by 14.8 % (MDA) — from the middle-aged, respectively, compared to the control. At the same time, the decrease in the concentration of end products in the form of Schiff bases (SB) was 66 % in the young poultry obtained using eggs for incubation from the older parent flock, and 50 % (SB) — from the middle-aged, respectively, relative to the control.

The above indicates that the use of cytochrome C in an optimal concentration in the case of using older and middle-aged parent flocks in incubation allows preventing the accumulation of modified metabolic products, preventing differentiation disorders, cell proliferation, mutations, preventing the development of inflammatory and autoimmune reactions initiated by excessive synthesis, and at the same time the cytotoxic effect of LPO products [13, 17].

Comparison of the difference in the concentrations of these substances in the body of day-old young poultry in the experimental and control groups made it possible to reveal that the lipid peroxidation process at the initial stages is more intense in the chickens obtained from eggs of the middle-aged flock, while in the middle and at the end of the process the greatest differences were recorded in the representatives hatched from eggs of the older flock. At the same time, despite the fact that cytochrome C reduces the intensity of the reaction throughout the lipid peroxidation process, the pattern of changes at the stages of the process associated with the age of the poultry remains similar to the control. The revealed regularities allow to suggest that the antioxidant protection of the young poultry obtained from the middle-aged flock is more reactive, compared to the individuals hatched from the eggs of the older flock, which is confirmed by the increase in the egg production to average daily gain ratio (EP/ADG ratio) by 24 % ($p < 0.01$) in the first case versus 6 % in the second. This also indicates that the former have more pronounced prospects for maintaining the integrity and functionality of cells under the effect of strong and moderate stressors. In turn, in the representatives of the control and experiment obtained from the older parent flock, the course of the lipid peroxidation process was less controlled and rapid, which was confirmed by the significant predominance of secondary and final products of lipid peroxidation: malondialdehyde (MDA) and Schiff bases (SB), in contrast to those in the experiment and control hatched from the eggs of the middle-aged flock.

It should be recalled that malondialdehyde is capable of interacting with protein structures, which leads to a disruption in the implementation of their functional capabilities, and at the same time with lipids and nucleic acids, causing their intramolecular or intermolecular cross-linking and, as a consequence, profound changes in the biochemical properties of biomolecules. According to Ayala A. (2014), these include disruptions in the regulation of the complement system, initiating autoimmune damage to the body [13]. In turn, the works of Arulselvan P. (2016) reflect that modification of nucleic acids by aldehydes during the progression of lipid peroxidation induces the expression of various genes that encode proinflammatory cytokines (IL-2, IL-6, TGF-a) and adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1), determining the initiation and scaling of, first of all, inflammatory reactions [14]. Also, the interaction of aldehydes with nucleic acids with the formation of DNA adducts determines the occurrence of spontaneous mutations [13].

Taking into account the above, it can be assumed that the treatment with cytochrome C prevented the initiation of the above processes, determining the conditions for the successful implementation of adaptive capabilities and stabilization of homeostasis [8]. In turn, the increase in the EP/ADG ratio in the representatives of the experimental groups not only confirms the above, but also indicates the implementation of both their own antioxidant capabilities [15] and the possibility of stimulating the synthesis of other components of the antioxidant system [7]. At the same time, due to the difference in the content of essential nutrients in the eggs obtained from the chickens of various ages of the parent flocks, the formation of this system and its capabilities in the young poultry obtained from the older flock were limited, unlike the chickens hatched from the eggs of the middle-aged ones.

Correction of the intensity of lipid peroxidation processes and improvement of the antioxidant capacity of the organism of young poultry in the experimental groups, and at the same time the prospects for maintaining the integrity of cellular structures [8], determined a more comfortable course of embryogenesis in chickens and greater efficacy of the hatching process (Table 2).

When studying the indicator of the shell thickness remaining after hatching of the chickens, it had been found that it was thinner in the batch of the eggs obtained from chickens of the older parent flock, the advantage of the experimental group relative to the control in the discussed indicator was 16 %, while in the batch of the eggs obtained from the middle-aged parent flock — 14 %. The observed thinning of the shell in both experimental groups is due to the fact that it is a depot of calcium and other minerals necessary for

the construction of not only the musculoskeletal system of young poultry, but also the activation and/or construction of enzymes; the implementation of the functions of the nervous system, the implementation of the membrane-intracellular mechanism of hormone action, stimulation of the synthesis of some of them, etc. [16]. It follows that the thinning of the shell was due to a more complete consumption of the substances necessary for the development of the embryo in both experimental groups, determining the conditions for improving the quality of the resulting young poultry, which is consistent with the data in Tables 3 and 4.

Table 2

Pecking site and indicators of eggshells remaining after hatching (M ± m, n = 10)

Shell thickness, mm		Number of shell fragments, %		Pecking site, %	
		2	3 and more	Physiological pecking site (between the middle and the blunt end), %	Atypical pecking site (in the middle or between the middle and the sharp end of the egg), %
Parent flock, 70 weeks					
E	0.21 ± 0.2	70 %	30 %	80 %	20 %
C	0.25 ± 0.4	60 %	40 %	70 %	30 %
Parent flock, 50 weeks					
E	0.30 ± 0.02	90 %	10 %	90 %	10 %
C	0.35 ± 0.02	70 %	30 %	80 %	20 %

Pecking plays an important role in characterizing the quality and intensity of embryo development. When analyzing this indicator, it had been found that in the chickens of the experimental group obtained from the older parent flock, pecking in the physiologically correct site was observed in 16 % of cases, while in the middle-aged this indicator was 28 %, relative to the control group for this indicator. The results revealed in the experimental groups allow to believe that the location of the young poultry in the egg in them was correct in most cases due to the favorable effect of cytochrome C, which prevented destructive phenomena in the cells of the embryo's body, maintaining energy synthesis, determining the conditions for a more complete consumption of nutrients, and at the same time, high-quality development of the poultry.

It should be noted that the observed prevalence of two-fragment shells over three- or more fragment shells in both experimental groups by 14 % in the older flock and by 12.5 % in the middle-aged flock, relative to the control, indicates a faster and more effective hatching of young poultry, relative to the control.

Table 3

Quality of day-old chickens according to the Pasgar scale, points (M ± m, n = 10)

Indicator	Parent flock, 70 weeks		Parent flock, 50 weeks	
	Control	Experiment	Control	Experiment
1	2	3	4	5
Behavioral reflex	1.7 ± 0.15	1.9 ± 0.10	1.6 ± 0.16	1.9 ± 0.10
Umbilical ring	1.6 ± 0.22	2.0 ± 0.00	1.8 ± 0.20	2.0 ± 0.00

Table 3 (the end)

1	2	3	4	5
Tarsus and fingers	1.8 ± 0.13	1.9 ± 0.10	1.6 ± 0.16	1.8 ± 0.13
Beak	1.9 ± 0.10	2.0 ± 0.00	1.8 ± 0.13	2.0 ± 0.00
Abdomen	1.8 ± 0.20	2.0 ± 0.00	1.8 ± 0.20	2.0 ± 0.00
Pasgar criterion	8.5 ± 0.27	9.7 ± 0.15	8.6 ± 0.31	9.7 ± 0.15**

Table 4

Quality of day-old chickens according to the Optistart scale, points (M ± m, n = 10)

Indicator	Parent flock, 70 weeks		Parent flock, 50 weeks	
	Control	Experiment	Control	Experiment
Neck muscle tone	1.7 ± 0.15	1.9 ± 0.10	1.6 ± 0.16	2.0 ± 0.00
Behavioral reflex	1.7 ± 0.15	1.9 ± 0.10	1.6 ± 0.16	1.9 ± 0.10
Umbilical ring	1.6 ± 0.22	2.0 ± 0.00	1.8 ± 0.20	2.0 ± 0.00
Beak	1.9 ± 0.10	2.0 ± 0.00	1.8 ± 0.13	2.0 ± 0.00
Abdomen	1.8 ± 0.20	2.0 ± 0.00	1.8 ± 0.20	2.0 ± 0.00
Optistart criterion	8.7 ± 0.50	9.8 ± 0.13*	8.6 ± 0.48	9.9 ± 0.10

The analysis of the data in Tables 3 and 4 shows that the point assessment of the quality of the young poultry obtained according to the PASGAR and OPTISTART scales in the experimental groups treated once with a 1 % cytochrome C pre-incubation had an advantage over the control by 1.2 points in the group of the young poultry obtained from the older parent flock and by 1.1 ($p < 0.05$) points in the group from the middle-aged parent flock in the first case and by 1.0 ($p < 0.01$) and 1.2 points, respectively, in the second one. The greatest differences were established for the indicators characterizing the development of the nervous system and skin derivatives. The best effects of stimulation of these tissue formation were recorded in the group of young poultry obtained from the old parent flock.

Table 5

Biological control of incubation, %, (M ± m, n = 252)

Group COBB 500 cross	Incubation waste, %							Egg hatchability, %	±Δ	Hatching of chickens, %	±Δ
	Unfertilized (including false)	Blood rings	Exploder	Dead-in-shell 5—10	Dead-in-shell 11—18	Late dead	Weak				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Parent flock, 70 weeks											
C	7.42 ± 1.64	2.34 ± 0.95	0.39 ± 0.39	6.64 ± 1.56	5.08 ± 1.37	5.47 ± 1.42	1.56 ± 0.78	76.79 ± 2.64	—	71.09 ± 2.83	—

Table 5 (the end)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E (1 %)	5.86 ± 1.47	0.0 ± 0.0	0.78 ± 0.55	5.47 ± 1.42	3.52 ± 1.15	4.30 ± 1.27	2.73 ± 1.02	82.16 ± 2.39	5.37	77.34 ± 2.62	6.25
Parent flock, 50 weeks											
C	3.13 ± 1.09	2.34 ± 0.95	0.0 ± 0.0	1.56 ± 0.78	3.13 ± 1.09	3.91 ± 1.21	3.13 ± 1.09	85.48 ± 2.20	—	82.81 ± 2.36	—
E (1 %)	2.73 ± 1.02	1.56 ± 0.78 **	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.56 ± 0.78	1.17 ± 0.67	0.0 ± 0.0	95.58 ± 1.28 **	10.1	92.97 ± 1.60**	10.16

Pre-incubation transovarial treatment of eggs with an optimal solution of cytochrome C determined a more comfortable course of embryogenesis, which led to an increase in embryonic viability at all stages of the period.

The obtained data indicate that even a single use of the biostimulator allowed to neutralize the negative consequences of the abnormal development of lipid peroxidation and hypoxia processes, hypoenergetic states in the body of chicken embryos, which determined the decrease in all the studied categories of incubation waste in both experimental groups.

Thus, the number of unfertilized decreased by 1.56 %, dead-in-shell — by 0.77 %, while blood rings were completely absent in the experimental group obtained from the older parent flock, while in the experimental group obtained from the middle-aged category the unfertilized decreased by 0.70 %, blood rings — by 0.78 % ($p < 0.01$), dead-in-shell — by 1.7 times, respectively, compared to the control. The stated results determined an increase in the embryonic viability indices, in particular, egg hatchability — by 5.37 % and hatching of chickens — by 6.25 %, in the experimental group hatched from the eggs of the older parent flock — by 10.1 % ($p < 0.01$), and by 10.16 % ($p < 0.01$) from the eggs of the middle-aged flock.

CONCLUSION

Thus, a single application of cytochrome C in an optimal (1 %) concentration determines a significant decrease in the intensity of lipid peroxidation at all stages of this process in both experimental groups. However, at the initial stages of LPO, the pre-incubation single effect of cytochrome C was more pronounced in the group, the eggs of which were selected from the middle-aged parent flock, whereas at the final stages — from the old parent flock. The decrease in the intensity of lipid peroxidation almost equally improved the quality of day-old young poultry in both cases, while the positive effect on embryonic viability at all stages of development was expressed to a greater extent in the one, in which the eggs from the middle-aged parent flock were selected.

REFERENCES

1. Zabudskiy, Yu.I. Reproductive function in hybrid poultry. Report III. Effect of the age of the parent flock (review) // Agricultural biology (Selskokhozyaystvennaya biologiya). — 2016. — V. 51, No. 4. — P. 436—449.

2. *Ali M. S.* The Effect of Egg Shape (egg Quality Traits) Parameters on The Characteristics of Hatched Chicks by Local Chicken / M. S. Ali, C. R. Aziz, J. A. Mohammed, M. S. Mohammed // Basrah Journal of Veterinary Research. — 2022. — V.21, (S1). — P. 224—233.

3. *Khoroshevskaya L. V.* The influence of the age of the parent herds and the duration of incubation egg storage on the development of embryos and the quality of the daily broiler / L. V. Khoroshevskaya, I. F. Gorlov, M. I. Slozhenkina, E. G**.** Abramenko, A. V. Rudkovskaya, I. A. Panin // Veterinaria i kormlenie. — 2023. — No. 1. — P. 64—66.

4. *Uspenskiy S. V.* Correction of incubation results when using eggs obtained from the old parent flock / S. V. Uspenskiy, T. O. Azarnova, Yu.I. Blokhin, I. S. Lugovaya, E. A. Zolotukhina, D. V. Anshakov // Ptitsevodstvo (Poultry farming). — 2023. — No. 5. — P. 59—65.

5. *Kpodo K. R.* Physiological effects of in ovo delivery of bioactive substances in broiler chickens / K. R. Kpodo, M. Proszkowiec-Weglarz // Frontiers in Veterinary Science. — V10. — P. 1124007.

6. *Guerra-Castellano A.* Oxidative stress is tightly regulated by cytochrome c phosphorylation and respirasome factors in mitochondria / A. Guerra-Castellano, A. Díaz-Quintana, G. Pérez-Mejías, C. A. Elena-Real, K. González-Arzola, S. García-Mauriño, A. M. De la Rosa, I. Díaz-Moreno // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2018. — V.115. — P. 7955—7960.

7. *González-Arzola K.* (2019) New moonlighting functions of mitochondrial cytochrome c in the cytoplasm and nucleus / K. González-Arzola, A. Velázquez-Cruz, A. Guerra-Castellano, M. Á. Casado-Combreras, G. Pérez-Mejías, A. Díaz-Quintana, I. Díaz-Moreno, M. Á. De la Rosa // FEBS Lett. — 2019. — V.593, № 22. — P. 3101—3119.

8. *Hannibal L.* Alternative Conformations of Cytochrome c: Structure, Function, and Detection / L. Hannibal, F. Tomasina, D. A. Capdevila, V. Demicheli, V. Tórtora, D. Alvarez-Paggi, R. Jemmerson, D. H. Murgida, R. Radi // Biochemistry. — 2016. — V.55, No. 3. — P. 407—428

9. Russian Federation Patent No. 2022129763 16.11.2022 *Azarnova T. O.*, *Uspenskiy S. V.*, *Lugovaya I. S.*, *Bachinskaya V. M.* Method for Correcting Negative Consequences When Using Eggs from an Old Parent Flock for Incubation // Russian Federation Patent No. 2797 685. 2023. Bulletin No. 16.

10. *Kochish I. I.* Poultry Farming / I. I. Kochish, M. G. Petrash, S. B. Smirnov. Textbook for Universities. — 2nd ed., revised. and enlarged. — Moscow: KolosS, 2007. — 430 p.

11. *Kondrakhin I. P.* Methods of Veterinary Clinical Laboratory Diagnostics: reference ed. / I. P. Kondrakhin et al. — M. — KolosS. — 2004. — 520p.

12. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes. ETS No.123. — Strasbourg, 1986

13. *Ayala A.* Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal / A. Ayala, M. F. Muñoz, S. Argüelles // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2014. — P. 360438.

14. *Arulselvan P.* Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. / P. Arulselvan, M. T. Fard, W. S. Tan, S. Gothai, S. Fakurazi, M. E. Norhaizan, S. Kumar // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2016. — P. 5276130.

15. *Qui N. H.* Recent Advances of Using Polyphenols to Extenuate Oxidative Stress in Animal Production: Evidence from Poultry / N. H. Qui, N. T. Thu // Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. — 2022. — V.28, No.4. — P. 535—541.

16. *Dolgorukova A.* Deposition of Calcium in the Embryos of the Broiler Chicken as Affected by Hen Age / A. Dolgorukova, A. Zotov, M. Tishenkova // Fundamental and Applied Scientific Research in the Development of Agriculture in the Far East *(AFE-2021)*.

17. *Kochish I. I.* Increasing stress resistance of young egg-laying chickens using biologically active substances before incubation / I. I. Kochish, I. S. Lugovaya, T. O. Azarnova, M. S. Naydenskiy, A. A. Antipov, Yu. V. Petrova, D. V. Anshakov, E. A. Zolotukhina // Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences. — 2020. — Vol. 494, No. 1. — P. 236—239.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

T. O. Azarnova — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Chemistry named after Prof. S. I. Afonskiy and A. G. Malakhov;

S. V. Uspenskiy — Student;

I. I. Kochish — Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Head of the Department of Zoohygiene and Poultry Farming named after A. K. Danilova.

The article was submitted 25.03.2025.

Научная статья
УДК 619:616.98:578:636.7:615.371

ОЦЕНКА АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ «КАРНИКАН-4» ПРИ ИММУНИЗАЦИИ СОБАК

Анна Александровна Комарова✉, Татьяна Сергеевна Галкина, Анастасия Антоновна Климова, Алексей Максимович Киселев

Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Россия, komarova_aa@arriah.ru✉

Аннотация. Возбудители чумы плотоядных, парвовирусного, коронавирусного энтеритов и аденовирусной инфекции циркулируют в популяции собак, несмотря на развитие биологической промышленности и широкий спектр предлагаемых средств специфической профилактики. Целью настоящего исследования являлась оценка антигенной активности новой вакцины «Карникан-4» и изучение продолжительности иммунного ответа. Щенков, принадлежащих частным владельцам, а также животных, содержащихся в приютах, иммунизировали вакциной «Карникан-4» согласно инструкции по применению. Перед первой иммунизацией и далее согласно определенной схеме опыта у животных отбирали кровь и исследовали на наличие гуморальных антител к вышеперечисленным инфекциям в реакции нейтрализации и реакции торможения гемагглютинации. Иммунизация вакциной «Карникан-4» вызывает у щенков прирост титра антител к вирусам чумы плотоядных, коронавирусного и парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита после однократного введения на 2,0 log2 и более уже на 14 сутки после иммунизации. Максимальных значений титры достигали через 14 суток после двукратной иммунизации. В течение 12 месяцев антитела сохранялись в крови на высоком уровне. Поствакцинальных патологических реакций у щенков не отмечалось. Результаты проведенных исследований подтвердили, что вакцина «Карникан-4» является безопасной для собак и обладает выраженной антигенной активностью. Вакцина успешно прошла контроль и зарегистрирована на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: чума плотоядных, парвовирусный энтерит, коронавирусный энтерит, аденовирусная инфекция собак, вакцинация, собаки

Вакцинация является одним из эффективных средств предотвращения распространения инфекционных болезней в популяции животных. Иммунобиологическая промышленность, совершенствуясь с течением времени, предлагает широкий спектр ассоциированных вакцин, обеспечивающих эффективную защиту от большого количества инфекций. Это позволяет снизить заболеваемость животных в странах с широким распространением вакцинации, но не искоренить болезни полностью. Чума плотоядных, парвовирусный и коронавирусный энтериты, аденовирозы до сих пор часто встречаются среди домашних собак и наносят значительный урон популяции, особенно при несоблюдении правил содержания, транспортировки, а также в условиях скученности и антисанитарии.

Возбудитель чумы плотоядных — пантропный вирус (Canine distemper virus — CDV), крайне опасный для собак, вызывает болезнь, протекающую в различных формах, летальность которой составляет 80—90 % [1—4]. Не менее опасны для собак парвовирусный энтерит (возбудитель — парвовирус собак 2-го типа (Canine parvovirus — CPV-2)), летальность которого составляет 70 %, и инфекционный гепатит (возбудитель — аденовирус собак 1 серотипа (Canine adenovirus — CAV-1)), летальность которого по некоторым данным достигает 50 % [5—7]. Чаще всего данные болезни протекают в тяжелой форме, а заражение с высокой вероятностью заканчиваются летально или несет последствия для здоровья, требующие долгой и затратной для владельцев реабилитации. Вакцины для их профилактики Всемирная ветеринарная ассоциация мелких животных (WSAVA) относит к «базовым» вакцинам (т. е. вакцинам, обеспечивающим защиту против болезней, угрожающих жизни животного) [8]. Возбудителем коронавирусного энтерита (Canine coronavirus — CCoV) считается инфекцией, не требующей ветеринарного вмешательства, так как возникающие симптомы гастроэн-

терита часто проходят самостоятельно [9]. Однако, в случае ко-инфекции с другими вирусными и бактериальными патогенами, а также при заражении открытыми недавно высоковирулентными штаммами, болезнь протекает значительно тяжелее и часто заканчивается летально [10]. В подобных случаях, а также в условиях приютов и питомников вакцинация против коронавируса собак является оправданной.

В настоящее время биологическая промышленность производит большое количество ассоциированных вакцин для собак, профилактирующих чуму плотоядных, парвовирусный энтерит и аденовироз, однако, не все существующие вакцины обеспечивают полноценную защиту в связи с распространением на определенной территории различных генетических вариантов вирусов, высоким уровнем материнских антител и нарушением рекомендуемых схем иммунизации.

На основании вышеизложенного перед Федеральным центром охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ») была поставлена задача разработать и зарегистрировать вакцину для собак, содержащую в своем составе штаммы, актуальные на данный момент времени для территории Российской Федерации, безопасную, эффективную и доступную для владельцев животных.

Цель данного исследования — оценить эффективность разработанной вакцины против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак («Карникан-4») по двум показателям: уровень гуморальных антител и продолжительность иммунного ответа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцина. В опытах использовали вакцину против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак («Карникан-4»). Вакцина состоит из лиофилизированного (сухого) и жидкого компонентов. Сухой компонент изготовлен из культуральной жидкости, полученной при репродукции вируса чумы плотоядных в перевиваемой культуре клеток почки зеленой мартышки (Vero-V), лиофильно высушенной с добавлением в качестве стабилизаторов желатина, сахарозы и гидролизата лактальбумина (ГЛА). Жидкий компонент изготовлен из культуральной жидкости перевиваемой линии клеток MDCK (почка собаки), инфицированной вирусом инфекционного гепатита собак, и культуральной жидкости перевиваемой линии клеток CRFK (почка кошки), инфицированной вирусами парвовирусного и коронавирусного энтерита собак, инактивированной 1-(2-аминоэтил) азиридином (15 % димер этиленимина) с добавлением гидроокиси алюминия (ГОА) в качестве сорбента.

Разработка и контроль качества вакцины «Карникан-4» были проведены согласно требованиям Федерального закона № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и приказа Минсельхоза России № 101 «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения»

Животные. Для клинических исследований использовали беспородных щенков в возрасте 8 нед. (n = 113), из разных пометов, принадлежащих частным владельцам или содержащихся в приютах для животных. От владельцев животных получено информированное согласие на проведение исследования. Все опыты на животных проводились в строгом соответствии с этическими стандартами и положениями, принятым Европейской конвенцией ETS № 123, а также требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Схема опыта. Щенков вакцинировали в 8-недельном возрасте двукратно с интервалом 21 сутки внутримышечно в дозе 1 см^3, а затем однократно через 12 месяцев. Кровь для исследования у животных отбирали перед первой иммунизацией и через 14, 21, 28, 35 и 42 суток после нее, а затем каждый месяц в течение года.

Метод торможения гемагглютинации (HI, РТГА). Антитела в сыворотках крови к вирусу парвовирусного энтерита собак определяли методом торможения гемагглютинации в круглодонных полистероловых планшетах. Сыворотки предварительно инактивировали на водяной бане при температуре 56°С в течение 30—40 мин., затем в лунках планшета, заполненных фосфатно-буферным раствором с pH 6,4, готовили серию двукратных разведений сыворотки, начиная с разведения сыворотки 1:2. Далее во все лунки добавляли вирусную суспензию, содержащую рабочую дозу вируса равную 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ). После инкубации в течение 60 мин. при температуре 22 ± 2°С, в лунки с исследуемыми сыворотками вносили 0,8 % суспензию эритроцитов свиньи.

Учет реакции осуществляли через 2—3 ч. За титр антител принимали предельное разведение сыворотки, вызывающее полное ингибирование гемагглютинации в лунках (образование «пуговки») и выражали в логарифмах с основанием 2 ($\log_2$).

Метод нейтрализации вируса (VN, РН). Уровень нейтрализующих антител к вирусам чумы плотоядных, коронавирусного энтерита и инфекционного гепатита собак в сыворотках крови исследуемых животных определяли в реакции нейтрализации (РН) микрометодом с использованием чувствительной перевиваемой культуры клеток, выращенной в 96-луночном планшете (производитель SPL, Китай).

В лунки планшета, предварительно заполненные необходимым количеством питательной среды, вносили исследуемые сыворотки, инактивированные на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30—40 мин., и с помощью многоканального автоматического дозатора готовили серию последовательных двукратных разведений с последующим внесением рабочей дозы вирусной суспензии (100 $ТЦД_{50}$). Далее планшет помещали в CO_2-инкубатор с содержанием 5 % углекислого газа при температуре (37,0 ± 0,5) °С на 60 мин. для взаимодействия антител сыворотки с вирусом. После инкубации в лунки планшета вносили суспензию чувствительной культуры клеток с посевной концентрацией 300 тыс.кл./см^3, затем планшет возвращали в CO_2-инкубатор. Культивирование осуществляли в течение 120 ч с ежедневным микроскопированием состояния монослоя. Учет реакции проводили визуально, отмечая количество лунок с монослоем без признаков цитопатического действия (ЦПД). За титр антител принимали максимальное разведение сыворотки, нейтрализующее 100 $ТЦД_{50}$ вируса в 50 % лунок. Расчет титра антител проводили по методу Кербера.

Статистический анализ результатов. Обрабатывали полученные данные и строили графики с помощью компьютерной программы Microsoft Excel. Вычисляли среднее по группе значение титров антител (*M*) и стандартное отклонение (σ). Расчет титра специфических антител осуществляли по формуле Кербера и выражали в двоичных логарифмах ($\log_2$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

К иммунизации вакциной «Карникан-4» допускались только клинически здоровые животные, предварительно осмотренные ветеринарным врачом. Щенки были вакцинированы согласно инструкции к препарату в 8-недельном возрасте, двукратно с интервалом 21 сутки. После вакцинации за животными устанавливали наблюдение в течение 10 суток для выявления возможных поствакцинальных реакций.

На рисунке 1 представлена динамика формирования гуморального иммунного ответа у щенков в ответ на иммунизацию вакциной «Карникан-4». Следует отметить, что до вакцинации все щенки были серонегативными к вирусам чумы плотоядных, инфекционного гепатита и коронавирусного энтерита по данным РН. К парвовирусу собак средние по группе значения антител по данным РТГА определялись на уровне 4,2 ± 0,23 $\log_2$. После однократного введения вакцины наблюдался прирост титра гуморальных антител к вирусам чумы плотоядных, парвовирусного и коронавиурсного энтеритов, инфекционного гепатита собак на 2,0 $\log_2$ и более уже на 14 сутки после иммунизации. В течение 7 суток до следующей иммунизации титры антител продолжали нарастать, и перед второй иммунизацией определялись на уровне 6,65 ± 0,58 $\log_2$ к вирусу чумы плотоядных, 2,83 ± 0,12 $\log_2$ к вирусу коронавирусного энтерита, 3,80 ± 0,23 $\log_2$ к вирусу инфекционного гепатита и 8,6 ± 0,44 $\log_2$ к вирусу парвовирусного энтерита.

Титры антител ко всем четырем вирусам-компонентам вакцины также продолжали нарастать после бустерной вакцинации через 21 сутки. Установлено, что максимальных значений титры достигали к 35 суткам после введения первой дозы вакцины (или через 14 суток после повторной вакцинации). Значения титров антител на 35 и 42 сутки статистически значимых различий не имели ($p \geq 0,05$), что свидетельствовало о фазе стабилизации гуморального иммунного ответа в период с 35 по 42 сутки.

В течение 10 суток наблюдения температура тела у щенков оставалась в пределах физиологической нормы, не отмечалось уменьшения двигательной активности или снижения аппетита, клинических симптомов инфекций, из чего следует, что применяемая вакцина «Карникан-4» является безопасной для щенков.

Наблюдение за животными продолжалось до следующей плановой вакцинации через 12 месяцев. Каждый месяц у щенков отбирали кровь и определяли уровень антител к вирусу чумы плотоядных, коронавирусному и парвовирусному энтериту, инфекционному гепатиту описанными выше методами. Результаты исследования отображены на рисунке 2.

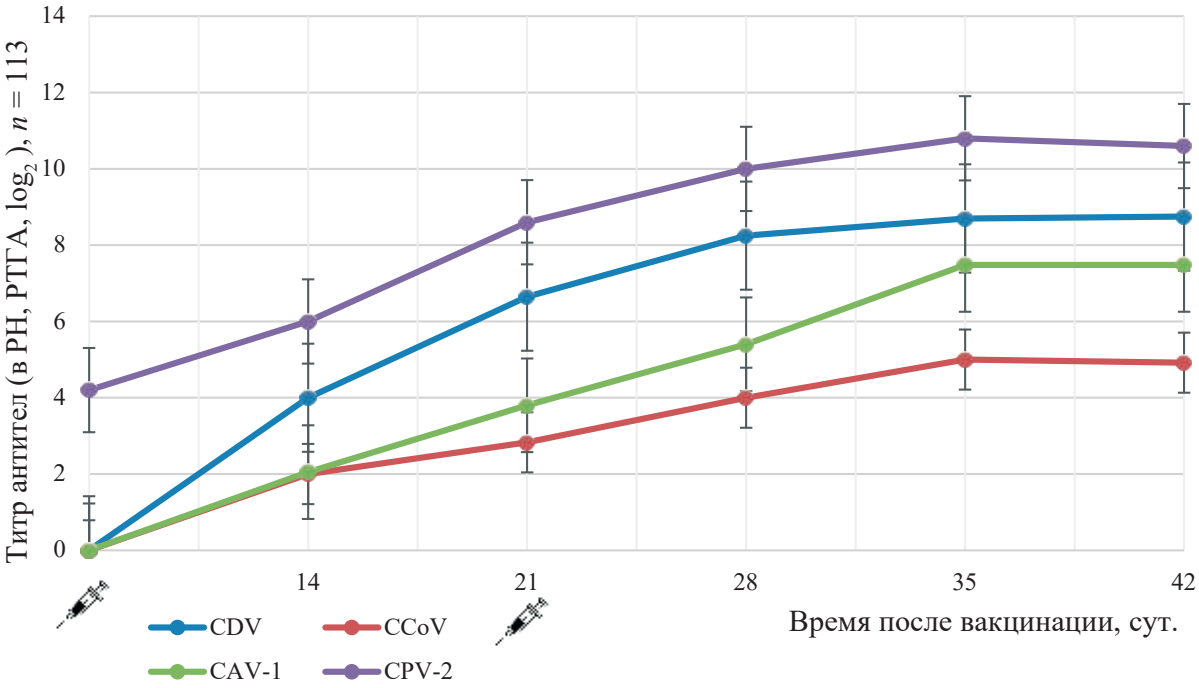


Рис. 1. Динамика формирования гуморального иммунного ответа у щенков на введение вакцины «Карникан-4»

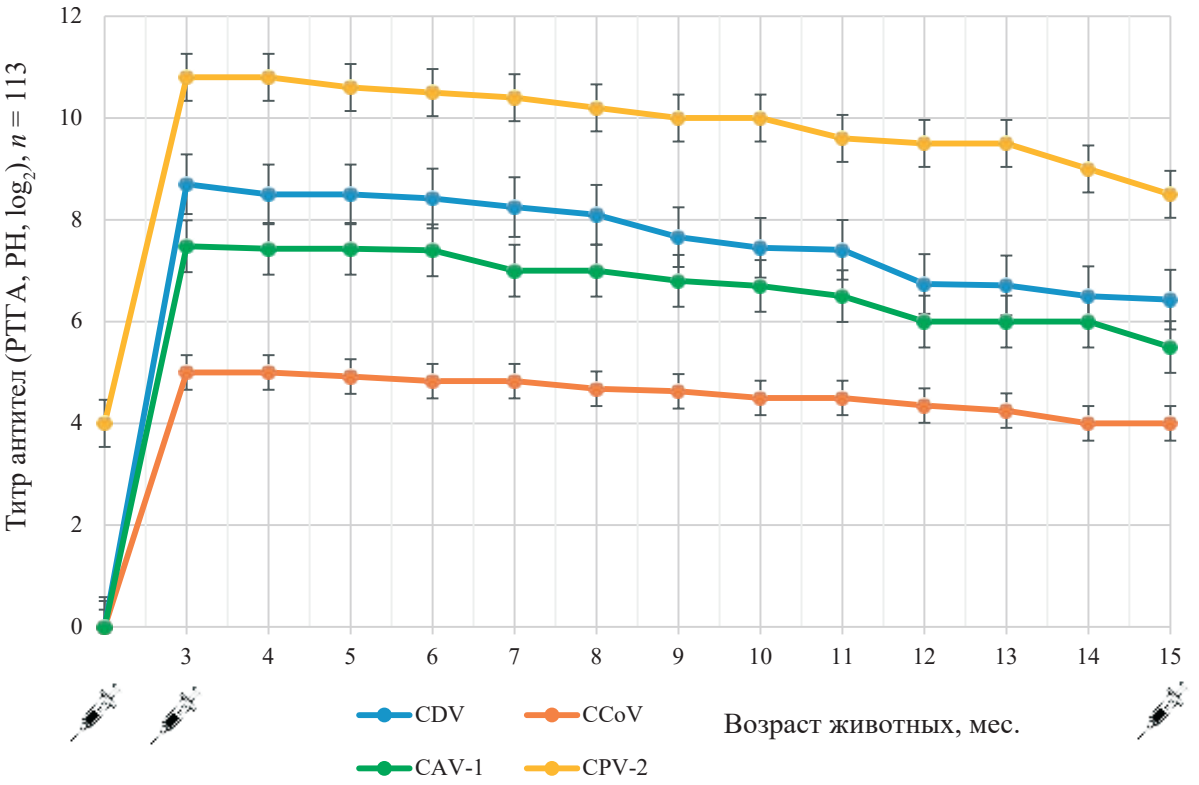


Рис. 2. Продолжительность иммунного ответа у собак на введение вакцины «Карникан-4»

Показано, что в течение 12 месяцев наблюдалось постепенное снижение уровня гуморальных антител к антигенам, входящим в состав вакцины. Исследования показали, что через 6 месяцев после бустерной вакцинации титр антител к вирусу чумы плотоядных снизился в среднем на 1,0 $\log_2$, к парвовирусному энтериту на 0,8 $\log_2$, к коронавирусному энтериту менее, чем на 0,5 $\log_2$, к вирусу ин-

фекционного гепатита на 0,7 $\log_2$. Через 12 месяцев средний по группе титр антител к вирусу чумы плотоядных составил 6,43 ± 0,32 $\log_2$, к вирусу парвовирусного энтерита 8,5 ± 0,54 $\log_2$, к вирусу коронавирусного энтерита 4,0 ± 0,19 $\log_2$, к вирусу инфекционного гепатита 5,5 ± 0,28 $\log_2$. Однако, несмотря на снижение титра антител через 12 месяцев после вакцинации, уровень антител к вирусу чумы плотоядных, парвовирусному энтериту и инфекционному гепатиту был выше предполагаемого некоторыми исследователями титра антител, необходимого для защиты собак от данных инфекций. Так для вируса чумы плотоядных защитным титром является 1:16 (4,0 $\log_2$), для парвовирусного энтерита 1:80 (6,3 $\log_2$), для инфекционного гепатита титр выше 1:4 (2,0 $\log_2$) [11—13]. Значения титров антител, полученные при вакцинации собак вакциной «Карникан-4», превышали данные показатели как через 14 дней после бустерной вакцинации в возрасте 3 месяцев, так и через 12 месяцев после иммунизации, что свидетельствует о высокой антигенной активности вакцины. Уровень гуморальных антител к вирусу коронавирусного энтерита собак после вакцинации также был выше, чем установленный в исследованиях некоторых авторов протективный уровень 1:4 (2,0 $\log_2$). Несмотря на то, что по другим литературным данным для защиты животного от заражения решающую роль играет секреторный иммуноглобулин (IgA) слизистой кишечника, а высокий уровень гуморальных антител в крови, определенный в РН, не всегда коррелирует с защитой при контрольном заражении, установлено, что сероконверсия позволяет избежать клинических проявлений болезни и существенно сократить время выделения возбудителя с фекалиями [14—17]. Всемирная ветеринарная ассоциация мелких животных (WSAVA) относит вакцинацию против коронавирусного энтерита к необязательным (не рекомендованным), но учитывая широкое распространение CCoV в приютах и питомниках, а также его генетическую пластичность и рост вирулентности, иммунизация вакцинами, содержащими в своем составе коронавирус собак, оказывает положительный эффект, снижая распространение вируса, и показана щенкам, находящихся в группе риска [9, 10, 17, 18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак («Карникан-4») безопасна для животных, обладает выраженной антигенной активностью и вызывает формирование у щенков напряженного иммунного ответа через 14 суток после бустерной вакцинации с сохранением высокого уровня гуморальных антител в крови в течение 12 месяцев, что является одним из показателей эффективности вакцины и позволяет рекомендовать ее к применению с целью профилактической иммунизации собак против вышеперечисленных инфекционных болезней.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Канищук Р. А.* Диагностика и терапия чумы плотоядных / Р. А. Канищук, И. В. Сердюченко // Новая наука: Стратегии и векторы развития. — 2017. — Т. 2, № 2. — С. 8—10.

2. Safety and Immunogenicity of Morbillivirus canis Vaccines for Domestic and Wild Animals: A Scoping Review / S. Rendon-Marin, L. F. Higuita-Gutiérrez, J. Ruiz-Saenz // Viruses. — 2024. V. 16. № 7. — P. 1078.

3. *Покровская С. С.* Патоморфологические изменения в мозге собак при нервной форме чумы плотоядных / С. С. Покровская // Молодежная наука 2024: технологии инновации: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, молодых ученых, аспирантов и студентов, посвященной Десятилетию науки и технологий в Российской Федерации. В 4-х частях, Пермь, 08—12 апреля 2024 года. — Пермь: ИПЦ Прокростъ, 2024. — С. 75—77.

4. Canine morbillivirus (CDV): a review on current status, emergence and the diagnostics / M. Karki, K. K. Rajak, R. P. Singh // Virusdisease. — 2022. — V. 33. № 3. — P. 309—321.

5. *Decaro N.* Canine parvovirus — a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c / N. Decaro, C. Buonavoglia // Veterinary Microbiology. — 2012. — V.155. № 1. — P. 1—12.

6. *Mazzaferro E. M.* Update on Canine Parvoviral Enteritis / E. M. Mazzaferro // Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. — 2020. — V. 50. № 6 — P. 1307—1325.

7. *Вахрушева Т. И.* Патоморфологические изменения при инфекционном гепатите у собак / Т. И. Вахрушева // Вестник КрасГАУ. — 2015. — № 2(101). — С. 177—184.

8. WSAVA: [сайт]. — 2023. — URL: https://wsava.org (дата обращения 02.02.2025 г.). — Текст: электронный.

9. Etiology and genetic evolution of canine coronavirus circulating in five provinces of China, during 2018—2019 / H. J. He, W. Zhang, J. Liang [et al.] // Microbial Pathogenesis. — 2020. — V. 145. — P. 104209.

10. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs / C. Buonavoglia, N. Decaro, V. Martella [et al.] // Emerging Infectious Diseases. — 2006. — V. 12. № 3. — P. 492—494.

11. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? /N. Decaro, C. Buonavoglia, V. R. Barrs // Veterinary Microbiology. — 2020. — V. 247. — P. 108760.

12. Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs / P. Olson P, H. Finnsdóttir, B. Klingeborn, A. Hedhammar // The Veterinary record. — 1997. — V. 141. № 25. — P. 654—655.

13. Antibody Response to Canine Adenovirus-2 Virus Vaccination in Healthy Adult Dogs / M. Bergmann, M. Freisl, Y. Zablotski [et al.] // Viruses. — 2020. — V.12. № 10. — P. 1198.

14. Антигенная активность усовершенствованной вакцины против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтерита, лептоспироза и бешенства собак Мультикан-8 / А. Н. Мухин, О. В. Остапчук, М. А. Лосич [и др.] // Ветеринария. — 2021. — № 3. — С. 8—13. — DOI 10.30896/0042-4846.2021.24.3.08-14

15. Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs/ A. Pratelli, A. Tinelli, N. Decaro [et al.]// Veterinary Microbiology. — 2004. — V. 99. № 1. — P. 43—49.

16. Evaluating a canine coronavirus vaccine through antigen extinction and challenge studies / B. G. Edwards, R. H. Fulker, W.M Acree [et al.]// Veterinary Medicine. — 1985. — V. 80. — P. 28—33.

17. Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus/ N. Decaro, A. Pratelli, A. Tinelli // Clinical and Vaccine Immunology. — 2004. — V.11. № 1. — P. 102—105.

18. Cross sectional and longitudinal surveys of canine enteric coronavirus infection in kennelled dogs: a molecular marker for biosecurity/ J. *Stavisky G.* Pinchbeck, R. M. Gaskell [et al.]// Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. — 2012. V. 12. № 7. — P. 1419—1426.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. А. Комарова — ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных;

Т. С. Галкина — кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики болезней мелких домашних животных;

А. А. Климова — ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных;

А. М. Киселев — ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных.

Статья поступила в редакцию 20.03.2025.

Original article
UDC 619:616.98:578:636.7:615.371

EVALUATION OF ANTIGENIC ACTIVITY OF THE VACCINE "KARNIKAN-4" IN IMMUNIZATION OF DOGS

Anna Aleksandrovna Komarova✉, Tatyana Sergeevna Galkina, Anastasiya Antonovna Klimova, Aleksey Maksimovich Kiselev

Federal Center for Animal Health Protection, Vladimir, Russia, komarova_aa@arriah.ru✉

Abstract. The causative agents of canine distemper, parvovirus, coronavirus enteritis and adenovirus infection circulate in the dog population, despite the biological industry development and a wide range of proposed specific prophylaxis agents. The objective of this study was to evaluate the antigenic activity of a new vaccine "Karnikan-4" and to study the duration of the immune response. The puppies belonging to private owners, as well as the animals kept in shelters, were immunized with the vaccine "Karnikan-4" according to the instructions for use. Before the first immunization and then according to a specific experimental scheme, blood was collected from the animals and examined for the presence of humoral antibodies to the above mentioned infections in the neutralization reaction and the hemagglutination inhibition reaction. The immunization with the vaccine "Karnikan-4" causes an increase in the titer of antibodies to canine distemper viruses, coronavirus and parvovirus enteritis, infectious hepatitis in puppies after a single administration by 2.0 log2 or more already on day 14 after immunization. The titers reached their maximum values 14 days after double immunization. For 12 months, antibodies remained in the blood at a high level. No post-vaccination pathological reactions were observed in puppies. The results of the studies confirmed that the vaccine "Karnikan-4" is safe for dogs and has pronounced antigenic activity. The vaccine has successfully passed the control and is registered in the territory of the Russian Federation.

Keywords: canine distemper, parvovirus enteritis, coronavirus enteritis, canine adenovirus infection, vaccination, dogs

Vaccination is one of the effective means of preventing the spread of infectious diseases in animal populations. The immunobiological industry, improving over time, offers a wide range of associated vaccines that provide effective protection against a large number of infections. This helps reduce the incidence of animals in countries with widespread vaccination, but does not completely eradicate diseases. Distemper, parvovirus and coronavirus enteritis, adenoviruses are still common among domestic dogs and cause significant damage to the population, especially when the rules of keeping, transportation, as well as in crowded and unsanitary conditions, are not followed.

The causative agent of canine distemper is a pantropic virus (Canine distemper virus — CDV), which is extremely dangerous for dogs, causes a disease that occurs in various forms, the mortality rate of which is 80—90 % [1—4]. No less dangerous for dogs are parvovirus enteritis (the causative agent is canine parvovirus type 2 (Canine parvovirus — CPV-2)), the mortality rate of which is 70 %, and infectious hepatitis (the causative agent is canine adenovirus serotype 1 (Canine adenovirus — CAV-1)), the mortality rate of which, according to some data, reaches 50 % [5—7]. Most often, these diseases are severe, and infection is highly likely to be fatal or have health consequences that require long-term and costly rehabilitation for owners. The World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) classifies vaccines for their prevention as "core" vaccines (i. e. vaccines that provide protection against diseases that threaten the life of an animal) [8].

The causative agent of coronavirus enteritis (Canine coronavirus — CCoV) is considered an infection that does not require veterinary intervention, since the symptoms of gastroenteritis often go away on their own [9]. However, in case of co-infection with other viral and bacterial pathogens, as well as infection with recently discovered highly virulent strains, the disease is much more severe and often fatal [10]. In such cases, as well as in shelters and kennels, vaccination against canine coronavirus is justified.

Currently, the biological industry produces a large number of associated vaccines for dogs that prevent canine distemper, parvovirus enteritis and adenovirus, however, not all existing vaccines provide full protection due to the spread of various genetic variants of viruses in a certain territory, high levels of maternal antibodies and violation of recommended immunization schedules.

Based on the above, the Federal Center for Animal Health (FSBI "ARRIAH") was tasked with designing and registering a vaccine for dogs containing strains that are currently relevant for the territory of the Russian Federation, safe, effective and accessible to animal owners.

The objective of this study is to evaluate the efficacy of the designed vaccine against canine distemper, parvovirus and coronavirus enteritis, canine adenovirus infection ("Karnikan-4") by two indicators: the level of humoral antibodies and the duration of the immune response.

MATERIAL AND METHODS

Vaccine. The experiments used a vaccine against canine distemper, parvovirus and coronavirus enteritis, canine adenovirus infection ("Karnikan-4"). The vaccine consists of lyophilized (dry) and liquid components. The dry component is made from culture fluid obtained during reproduction of the canine distemper virus in a continuous culture of green monkey kidney cells (Vero-V), lyophilized with the addition of gelatin, sucrose and lactalbumin hydrolysate (LAH) as stabilizers.

The liquid component is made from the culture fluid of the continuous MDCK cell line (dog kidney) infected with the infectious canine hepatitis virus and the culture fluid of the continuous CRFK cell line (cat kidney) infected with the canine parvovirus and coronavirus enteritis viruses, inactivated with 1-(2-aminoethyl) aziridine (15 % ethyleneimine dimer) with the addition of aluminum hydroxide (AHO) as a sorbent.

The design and quality control of the vaccine "Karnikan-4" were carried out in accordance with the requirements of Federal Law No. 61-FZ On Circulation of Medicines and the Order of the Ministry of Agriculture of Russia No. 101 On Approval of the Rules for Conducting a Preclinical Study of a Medicinal Product for Veterinary use, a Clinical Study of a Medicinal Product for Veterinary Use, a Study of the Bioequivalence of a Medicinal Product for Veterinary Use.

Animals. For clinical studies, mongrel puppies aged 8 weeks (n = 113) from different litters belonging to private owners or kept in animal shelters were used. Informed consent for the study was obtained from the owners of the animals. All animal experiments were carried out in strict accordance with the ethical standards and provisions adopted by the European Convention ETS No. 123, as well as the requirements of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes.

Experimental design. The puppies were vaccinated at the age of 8 weeks twice with an interval of 21 days intramuscularly at a dose of 1 cm^3, and then once in 12 months. Blood for the study was collected from the animals before the first immunization and 14, 21, 28, 35 and 42 days after it, and then every month for a year.

Hemagglutination inhibition assay (HI, HAI). Blood serum antibodies to canine parvovirus enteritis virus were determined by the hemagglutination inhibition assay in round-bottomed polystyrene plates. The sera were preliminarily inactivated in a water bath at a temperature of 56°C for 30—40 min., then a series of two-fold serum dilutions were prepared in plate wells filled with a phosphate buffer solution with a pH of 6.4, starting with a serum dilution of 1:2. Next, a viral suspension containing a working dose of the virus equal to 8 hemagglutinating units (HAU) was added to all wells. After incubation for 60 min. at a temperature of 22 ± 2°C, a 0.8 % suspension of pig erythrocytes was added to the wells with the studied sera. The reaction was recorded in 2—3 hours. The antibody titer was taken as the limiting dilution of the serum causing complete inhibition of hemagglutination in the wells (formation of a "button") and was expressed in logarithms with a base of 2 ($\log_2$).

Virus neutralization assay (VN, NR). The level of neutralizing antibodies to canine distemper virus, coronavirus enteritis and infectious canine hepatitis viruses in the blood sera of the studied animals was determined in the neutralization reaction (NR) by the microassay using a sensitive continuous cell culture grown in a 96-well plate (manufacturer SPL, China). The test sera, inactivated in a water bath at a temperature of 56°C for 30—40 min, were added to the wells of the plate, pre-filled with the required amount of nutrient medium, and a series of successive two-fold dilutions were prepared using a multichannel automatic dispenser, followed by the administration of a working dose of the viral suspension (100 $TCID_{50}$). Then the plate was placed in a CO_2 incubator containing 5 % carbon dioxide at a temperature of (37.0 ± 0.5) °C for 60 min. for the interaction of serum antibodies with the virus. After incubation, a suspension of sensitive

cell culture with a seeding concentration of 300 ths cells/cm^3 was added to the wells of the plate, then the plate was returned to the CO_2 incubator. The cultivation was carried out for 120 hours with daily microscopic examination of the monolayer state. The reaction was recorded visually, noting the number of wells with a monolayer without signs of cytopathic effect (CPE). The antibody titer was taken as the maximum dilution of serum that neutralized 100 $TCID_{50}$ of the virus in 50 % of the wells. The antibody titer was calculated using the Kerber method.

Statistical analysis of the results. The obtained data were processed and the graphs were constructed using the Microsoft Excel computer program. The mean value of antibody titers (M) and standard deviation (σ) for the group were calculated. The titer of specific antibodies was calculated using the Kerber formula and expressed in binary logarithms ($\log_2$).

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

Only clinically healthy animals, previously examined by a veterinarian, were allowed to be immunized with the vaccine "Karnikan-4". The puppies were vaccinated according to the instructions for the drug at the age of 8 weeks, twice with an interval of 21 days. After vaccination, the animals were observed for 10 days to identify possible post-vaccination reactions.

Fig. 1 shows the dynamics of the humoral immune response formation in puppies in response to immunization with the vaccine "Karnikan-4". It should be noted that before vaccination, all puppies were seronegative to canine distemper viruses, infectious hepatitis and coronavirus enteritis according to the NR data.

To canine parvovirus, the mean antibody values for the group according to the HAI data were determined at a level of 4.2 ± 0.23 $\log_2$. After a single administration of the vaccine, an increase in the titer of humoral antibodies to canine distemper virus, parvovirus and coronavirus enteritis, infectious canine hepatitis by 2.0 $\log_2$ or more was already observed on day 14 after immunization.

During 7 days before the next immunization, antibody titers continued to increase, and before the second immunization they were determined at the level of 6.65 ± 0.58 $\log_2$ to canine distemper virus, 2.83 ± 0.12 $\log_2$ — to coronavirus enteritis virus, 3.80 ± 0.23 $\log_2$ — to infectious hepatitis virus, and 8.6 ± 0.44 $\log_2$ — to parvovirus enteritis virus.

Antibody titers to all four virus components of the vaccine also continued to increase after booster vaccination 21 days later. It was established that the titers reached their maximum values by day 35 after the first dose of the vaccine (or 14 days after repeated vaccination). The values of antibody titers on days 35 and 42 did not have statistically significant differences ($p \geq 0.05$), which indicated a stabilization phase of the humoral immune response in the period from day 35 to day 42.

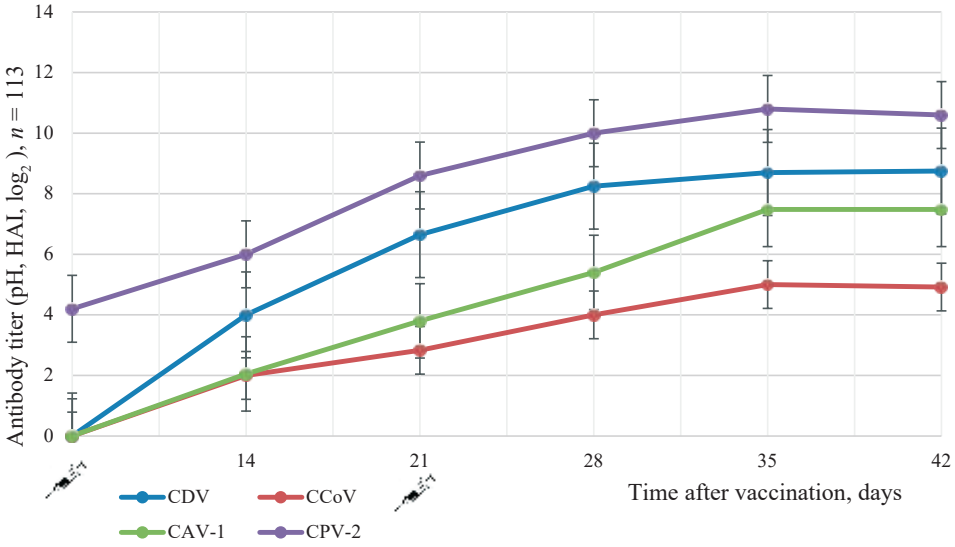


Fig. 1. Dynamics of the humoral immune response formation in puppies to the administration of the vaccine "Karnikan-4"

During the 10-day observation period, the puppies' body temperature remained within the physiological norm, there was no decrease in motor activity or appetite, clinical symptoms of infections, which means that the used vaccine "Karnikan-4" is safe for puppies. The animals were observed until the next sched-

uled vaccination in 12 months. Every month, blood was taken from the puppies and the level of antibodies to the canine distemper virus, coronavirus and parvovirus enteritis, infectious hepatitis was determined using the methods described above. The study results are shown in Fig. 2.

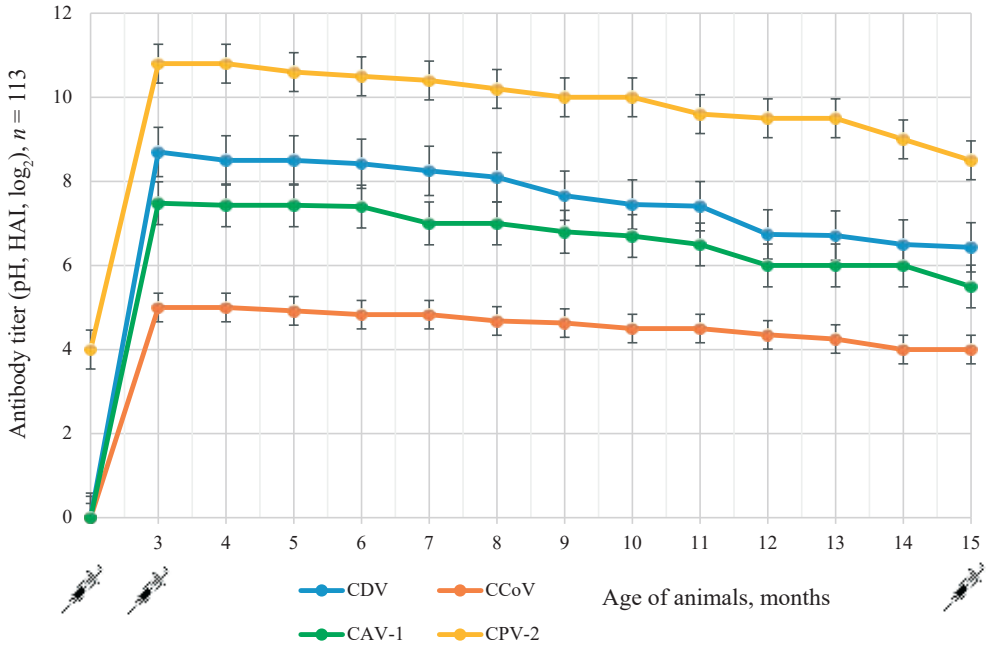


Fig. 2. Duration of the immune response in dogs to the administration of the vaccine "Karnikan-4"

It had been shown that over 12 months, there was a gradual decrease in the level of humoral antibodies to the antigens included in the vaccine. The studies have shown that 6 months after booster vaccination, the titer of antibodies to canine distemper virus decreased by an average of 1.0 $\log_2$, to parvovirus enteritis — by 0.8 $\log_2$, to coronavirus enteritis — by less than 0.5 $\log_2$, to infectious hepatitis virus — by 0.7 $\log_2$. In 12 months, the mean titer of antibodies to canine distemper virus in the group was 6.43 ± 0.32 $\log_2$, to parvovirus enteritis virus — 8.5 ± 0.54 $\log_2$, to coronavirus enteritis virus — 4.0 ± 0.19 $\log_2$, to infectious hepatitis virus — 5.5 ± 0.28 $\log_2$. However, despite the decrease in antibody titer 12 months after vaccination, the level of antibodies to canine distemper virus, parvovirus enteritis and infectious hepatitis was higher than the antibody titer assumed by some researchers, which is necessary to protect dogs from these infections. Thus, for canine distemper virus, the protective titer is 1:16 (4.0 $\log_2$), for parvovirus enteritis — 1:80 (6.3 $\log_2$), for infectious hepatitis the titer is higher than 1:4 (2.0 $\log_2$) [11—13]. The antibody titer values obtained when vaccinating dogs with the vaccine "Karnikan-4" exceeded these values both 14 days after booster vaccination at the age of 3 months and 12 months after immunization, which indicates high antigenic activity of the vaccine. The level of humoral antibodies to the canine coronavirus enteritis virus after vaccination was also higher than the protective level of 1:4 (2.0 $\log_2$) established in the studies of some authors. Despite the fact that, according to other literature data, secretory immunoglobulin (IgA) of the intestinal mucosa plays a decisive role in protecting animals from infection, and a high level of humoral antibodies in the blood, determined in the NR, does not always correlate with protection during challenge, it has been established that seroconversion allows avoiding clinical manifestations of the disease and significantly reducing the time of excretion of the pathogen with feces [14—17]. The World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) classifies vaccination against coronavirus enteritis as optional (not recommended), but given the widespread distribution of CCoV in shelters and kennels, as well as its genetic plasticity and increasing virulence, immunization with vaccines containing canine coronavirus has a positive effect, reducing the spread of the virus, and is indicated for puppies at risk [9, 10, 17, 18].

CONCLUSION

The results of the conducted studies indicate that the vaccine against canine distemper, parvovirus and

coronavirus enteritis, adenovirus infection of dogs ("Karnikan-4") is safe for animals, has pronounced antigenic activity and causes the formation of a strong immune response in puppies 14 days after booster vaccination with the maintenance of a high level of humoral antibodies in the blood for 12 months, which is one of the indicators of the vaccine efficacy and allows us to recommend it for use for the purpose of prophylactic immunization of dogs against the above mentioned infectious diseases.

REFERENCES

1. *Kanishchuk R. A.* Diagnostics and therapy of distemper / R. A. Kanishchuk, I. V. Serdyuchenko // Novaya nauka: Strategii i vektory razvitiya (New science: Strategies and vectors of development). — 2017. — V. 2, No. 2. — P. 8—10.

2. Safety and Immunogenicity of Morbillivirus canis Vaccines for Domestic and Wild Animals: A Scoping Review / S. Rendon-Marin, L. F. Higuita-Gutiérrez, J. Ruiz-Saenz // Viruses. — 2024. V. 16. No. 7. — P. 1078.

3. *Pokrovskaya S. S.* Pathomorphological changes in the brain of dogs with the nervous form of canine distemper / S. S. Pokrovskaya // Youth Science 2024: Innovation Technologies: Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists, Postgraduates and Students Dedicated to the Decade of Science and Technology in the Russian Federation. In 4 parts, Perm, April 08—12, 2024. — Perm: IPTs Prokrost, 2024. — P. 75—77.

4. Canine morbillivirus (CDV): a review on current status, emergence and the diagnostics / M. Karki, K. K. Rajak, R. P. Singh // Virusdisease. — 2022. — V. 33. No. 3. — P. 309—321.

5. *Decaro N.* Canine parvovirus — a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c / N. Decaro, C. Buonavoglia // Veterinary Microbiology. — 2012. — V.155. No. 1. — P. 1—12.

6. *Mazzaferro E. M.* Update on Canine Parvoviral Enteritis / E. M. Mazzaferro // Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. — 2020. — V. 50. No. 6 — P. 1307—1325.

7. *Vakhrusheva T. I.* Pathomorphological changes in case of infectious hepatitis in dogs / T. I. Vakhrusheva // Vestnik KrasGAU (Bulletin of KrasSAU). — 2015. — No. 2 (101). — P. 177—184.

8. WSAVA: [website]. — 2023. — URL: https://wsava.org (accessed 02.02.2025). — Text: electronic.

9. Etiology and genetic evolution of canine coronavirus circulating in five provinces of China, during 2018—2019 / H. J. He, W. Zhang, J. Liang [et al.] // Microbial Pathogenesis. — 2020. — V.145. — P. 104209.

10. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs / C. Buonavoglia, N. Decaro, V. Martella [et al.] // Emerging Infectious Diseases. — 2006. — V. 12. No. 3. — P. 492—494.

11. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? /N. Decaro, C. Buonavoglia, V. R. Barrs // Veterinary Microbiology. — 2020. — V. 247. — P. 108760.

12. Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs / P. Olson P, H. Finnsdóttir, B. Klingeborn, A. Hedhammar // The Veterinary record. — 1997. — V. 141. No. 25. — P. 654—655.

13. Antibody Response to Canine Adenovirus-2 Virus Vaccination in Healthy Adult Dogs / M. Bergmann, M. Freisl, Y. Zablotski [et al.] // Viruses. — 2020. — V.12. No. 10. — P. 1198.

14. Antigenic activity of the improved vaccine Multikan-8 against distemper, adenovirus infections, parvovirus and coronavirus enteritis, leptospirosis and rabies in dogs / A. N. Mukhin, O. V. Ostapchuk, M. A. Losich [et al.] // Veterinariya (Veterinary Medicine). — 2021. — No. 3. — P. 8—13. — DOI 10.30896/0042-4846.2021.24.3.08-14

15. Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs/ A. Pratelli, A. Tinelli, N. Decaro [et al.]// Veterinary Microbiology. — 2004. — V. 99. No. 1. — P. 43—49.

16. Evaluating a canine coronavirus vaccine through antigen extinction and challenge studies / B. G. Edwards, R. H. Fulker, W.M Acree [et al.]// Veterinary Medicine. — 1985. — V. 80. — P. 28—33.

17. Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus/ N. Decaro, A. Pratelli, A. Tinelli // Clinical and Vaccine Immunology. — 2004. — V.11. No.1. — P. 102—105.

18. Cross sectional and longitudinal surveys of canine enteric coronavirus infection in kennelled dogs: a molecular marker for biosecurity / J. *Stavisky G.* Pinchbeck, R. M. Gaskell [et al.]// Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. — 2012. V. 12. No. 7. — P. 1419—1426.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. A. Komarova — Leading Veterinarian of the Laboratory for Disease Prevention in Small Domestic Animals;

T. S. Galkina — Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory for Disease Prevention in Small Domestic Animals;

A. A. Klimova — Veterinarian of the Laboratory for Disease Prevention in Small Domestic Animals;

A. M. Kiselev — Veterinarian of the Laboratory for Disease Prevention in Small Domestic Animals.

The article was submitted 11.04.2025.

Научная статья
УДК 619:[612.1:612.273.2]:636.2

ПОКАЗАТЕЛИ БИОХИМИЧЕСКОГО СТАТУСА КРОВИ КОРОВ, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К РАЗВИТИЮ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ ПЛОДА

Виталий Иванович Михалев[*]✉, Галина Германовна Чусова[*], Егор Максимович Степанов[*], Дмитрий Игоревич Шабанов[*], Константин Алексеевич Лободин[**]

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

Аннотация. В статье представлены материалы изучения показателей биохимического статуса крови коров, предрасположенных к развитию внутриутробной гипоксии плода. Динамика изменений изученных биохимических показателей свидетельствует о том, их манифестация начинается с 60—75 дней беременности, они имеют четкое проявление в 135—150 дней и ярко выражены в 210—230 дней. Установлено, что на заключительном этапе беременности с осложненным ее течением, сопровождающейся внутриутробной гипоксией, содержание глюкозы ниже на 12,4 % ($P < 0,001$), пировиноградной кислоты — на 10,2 % ($P < 0,05$), витамина А — на 21,2 % ($P < 0,001$), витамина Е — на 21,7 % ($P < 0,05$), активности каталазы — на 23,3 % ($P < 0,05$), ГПО — на 34,2 % ($P < 0,001$), при повышении уровня молочной кислоты на 29,3 % ($P < 0,001$), соотношения лактат: пируват — на 40,5 %, креатинина — на 25,0 % ($P < 0,05$), мочевины — на 35,7 % ($P < 0,01$), МСМ — на 39,6 % ($P < 0,001$), ИЭИ — на 38,8 % ($P < 0,05$), свидетельствующее о преобладании катаболических процессов, нарастании явлений интоксикации в условиях нехватки кислорода и дефицита энергии, интенсификации процессов перекисного окисления липидов и белков, разбалансировке работы антиоксидантной защиты, что приводит к внутриутробной гипоксии и рождению приплода с низкими показателями жизнеспособности.

Ключевые слова: коровы, беременность, биохимические показатели, внутриутробная гипоксия плода

Стабилизация показателей воспроизводительной функции является неотъемлемым условием рентабельного ведения молочного животноводства. Причины нарушения воспроизводительной функции молочных коров многообразны: нарушения условий содержания, кормления, патология матки, гормональный дисбаланс, инфекционные заболевания и др. Отрицательное влияние на состояние воспроизводительной функции также оказывает высокая молочная продуктивность [1, 2].

В современных условиях ведения молочного животноводства все большую актуальность приобретают нарушения эмбрионального развития, к которым можно отнести эмбриональную смертность, синдром задержки развития эмбриона, аборты, поздний токсикоз беременных (гестоз) и др. Возникновение эмбриопатологии тесно связано с биохимическими, функциональными и морфологическими изменениями в системе «мать-плацента-плод». Причины нарушений эмбриогенеза разнообразны, но в основе лежат нарушения процессов питания развивающегося зародыша, кислородное голодание гипоксия, приводящая, вначале к замедлению развития, а затем и его гибели [3, 4].

Внутриутробная гипоксия сопровождается развитием комплекса изменений в организме, связанного с недостаточным поступлением кислорода либо неадекватной его утилизацией. Обеспеченность плода кислородом зависит от по-

казателей скорости кровотока среднематочных артерий [5, 6].

Течение гестации на физиологическом уровне зависит от оптимального уровня обменных процессов в организме беременного животного, адекватной диффузионной способности плаценты, изменение функционирования которых способствует развитию нарушений метаболизма плода, доминирующую роль при этом играет гипоксия [7—9]. Данное патологическое состояние организма беременного животного можно рассматривать как один из факторов, определяющих характер течения беременности. Поэтому особую актуальность приобретают вопросы изучения характера течения обменных процессов у коров, предрасположенных к развитию внутриутробной гипоксии.

Цель исследований — изучить показатели биохимического статуса крови коров, предрасположенных к развитию внутриутробной гипоксии плода.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для проведения исследований служили коровы голштинской породы племенного завода Орловской области. Коровы в 38—45 дней беременности были разделены на две группы в соответствии результатами клинико-эхографических исследований. В первую группу вошли животные с физиологическим течением родов ($n = 25$), во вторую — с диагностированным синдромом задержки развития эмбриона (СЗРП, $n = 16$). Трансректальные и ультразвуковые исследования выполнены в соответствии с методическими пособиями [10, 11].

От пяти коров из каждой группы отобраны пробы крови в 60—75, 135—150 и 210—230 дней беременности для проведения лабораторных исследований. В крови определен уровень общего белка, мочевины, глюкоза, молочной и пировиноградных кислот, их соотношения, а также содержание креатинина, малонового диальдегида (МДА), средних молекулярных пептидов (СМП), индекса эндогенной интоксикации (ИЭИ), витамина А, витамина Е, активность каталазы и глутатионпероксидазы (ГПО). Биохимические показатели определены на анализаторе «Hitachi-902», показатели системы ПОЛ-АОЗ — в соответствии с методическим положением [12].

Полученные результаты подвергали статистической обработке с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При изучении биохимических показателей крови коров в 60—75 дней беременности установлено (табл. 1), что при осложненном течении гестации в форме синдрома задержки развития эмбриона содержание глюкозы ниже на 17,6 % ($P < 0,01$), сравнению с физиологически протекающей гестацией, витамина Е — на 15,4 % ($P < 0,05$), активность каталазы — на 9,9 %, ГПО — на 20,9 % ($P < 0,001$) при повышении уровня мочевины на 17,6 % ($P < 0,05$), молочной кислоты — на 7,2 %, соотношения лактат/пируват — на 10,1 %, малонового диальдегида — на 11,0 %, что свидетельствует о нарушениях в энергетическом обмене, накоплении продуктов перекисного окисления липидов, снижении ресурсов антиоксидантной защиты.

Таблица 1

Биохимические показатели крови коров в 60—75 дней беременности при физиологическом и осложненном ее течении

Показатели	Характер течения беременности	
	физиологическое	СЗРП
1	2	3
Белок, г/л	81,0 ± 1,4	79,1 ± 1,5
Мочевина, мМ/л	4,71 ± 0,22	5,54 ± 0,23*
Глюкоза, мМ/л	3,29 ± 0,13	2,71 ± 0,15**
Лактат, мМ/л	0,69 ± 0,05	0,74 ± 0,05
Пируват, мкМ/л	169,6 ± 10,2	165,1 ± 6,9

Окончание табл. 1

1	2	3
Лактат: Пируват, ед	4,07	4,48
Креатинин, мкМ/л	67,3 ± 2,9	70,8 ± 3,8
МДА, мкМ/л	2,45 ± 0,14	2,72 ± 0,16
СМП, усл. ед.	0,77 ± 0,02	0,79 ± 0,03
ИЭИ	19,7 ± 0,8	20,1 ± 0,7
Каталаза, мкМH_2O_2/л·мин·10^3	46,5 ± 1,5	41,9 ± 1,9
ГПО, мкMGSH/л·мин·10^3	22,4 ± 0,9	17,7 ± 0,6***
Витамин А, мкМ/л	1,41 ± 0,03	1,38 ± 0,07
Витамин Е, мкМ/л	14,3 ± 0,7	12,1 ± 0,6*

* $P < 0,05$
** $P < 0,01$
*** $P < 0,001$ — по сравнению с физиологическим течением беременности

В 4,5—5,0 месяцев гестации при осложненном ее течении (табл. 2) содержание общего белка в крови ниже на 6,5 % по сравнению с физиологической беременностью, глюкозы — на 19,2 % ($P < 0,01$), пировиноградной кислоты — на 9,7 % ($P < 0,05$), витамина А — на 20,0 % ($P < 0,05$), витамина Е — на 19,1 % ($P < 0,01$), активности каталазы — на 11,3 % ($P < 0,05$), ГПО — на 30,8 % ($P < 0,001$) при повышении уровня мочевины на 27,3 % ($P < 0,05$), молочной кислоты — на 23,9 % ($P < 0,05$), соотношения лактат: пируват — на 37,2 %, креатинина — на 25,6 % ($P < 0,01$), малонового диальдегида — на 17,6 % ($P < 0,001$), средних молекулярных пептидов — на 26,4 % ($P < 0,001$), индекса эндогенной интоксикации — на 20,0 % ($P < 0,001$).

Таблица 2

Биохимические показатели крови коров в 135—150 дней беременности при физиологическом и осложненном ее течении

Показатели	Характер течения беременности	
	физиологическое	СЗРП
1	2	3
Белок, г/л	83,5 ± 2,6	78,1 ± 1,9
Мочевина, мМ/л	5,09 ± 0,31	6,48 ± 0,24*
Глюкоза, мМ/л	3,18 ± 0,13	2,57 ± 0,11**
Лактат, мМ/л	0,71 ± 0,04	0,88 ± 0,05*
Пируват, мкМ/л	181,0 ± 7,8	163,6 ± 5,9*
Лактат: Пируват, ед	3,92	5,38
Креатинин, мкМ/л	78,9 ± 3,5	99,1 ± 5,4**

Окончание табл. 2

1	2	3
МДА, мкМ/л	2,10 ± 0,06	2,47 ± 0,05***
СМП, усл. ед.	0,87 ± 0,03	1,10 ± 0,04***
ИЭИ	23,5 ± 0,5	28,2 ± 0,8***
Каталаза, мкМH_2O_2/л·мин·10^3	47,6 ± 1,5	42,2 ± 1,7*
ГПО, мкMGSH/л·мин·10^3	27,9 ± 0,9	19,3 ± 0,8***
Витамин А, мкМ/л	1,5 ± 0,11	1,2 ± 0,07*
Витамин Е, мкМ/л	15,2 ± 0,4	12,3 ± 0,6**

* $P < 0,05$
** $P < 0,01$
*** $P < 0,001$ — по сравнению с физиологическим течением беременности

Выявленные изменения биохимических показателей крови коров при осложненном течении гестации свидетельствуют о нарушении энергетического обмена, снижением доли аэробных механизмов получения энергии и увеличением доли анаэробных, накоплением кислых продуктов обмена веществ, приводящих к развитию гипоксии плода. Одновременно констатируется снижение активности ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты на фоне повышенного накопления продуктов перекисного окисления липидов и эндогенной интоксикации.

В 7,0—7,5 месяцев беременности изменения показателей биохимического статуса носят более выраженный характер у животных с осложненным течением гестации (табл. 3).

Таблица 3

Биохимические показатели крови коров в 210—230 дней беременности при физиологическом и осложненном ее течении

Показатели	Характер течения беременности	
	физиологическое	СЗРП
1	2	3
Белок, г/л	82,9 ± 3,7	85,2 ± 4,4
Мочевина, мМ/л	5,24 ± 0,41	7,11 ± 0,35**
Глюкоза, мМ/л	2,75 ± 0,07	2,41 ± 0,04***
Лактат, мМ/л	0,75 ± 0,02	0,97 ± 0,02***
Пируват, мкМ/л	198,1 ± 7,6	177,9 ± 5,7*
Лактат: Пируват, ед	3,88	5,45
Креатинин, мкМ/л	84,3 ± 3,5	105,4 ± 4,9**
МДА, мкМ/л	2,22 ± 0,05	3,12 ± 0,14***
СМП, усл. ед.	0,91 ± 0,02	1,27 ± 0,04***
ИЭИ	27,8 ± 1,3	38,6 ± 2,1*

Окончание табл. 3

1	2	3
Каталаза, мкМH_2O_2/л·мин·10^3	52,3 ± 3,6	40,1 ± 2,1*
ГПО, мкMGSH/л·мин·10^3	29,5 ± 1,1	19,4 ± 1,3***
Витамин А, мкМ/л	1,65 ± 0,03	1,30 ± 0,09***
Витамин Е, мкМ/л	16,1 ± 0,8	12,6 ± 0,9*

* $P < 0,05$
** $P < 0,01$
*** $P < 0,001$ — по сравнению с физиологическим течением беременности

Так, в крови у этих коров содержание глюкозы ниже на 12,4 % ($P < 0,001$), пировиноградной кислоты — на 10,2 % ($P < 0,05$) при повышении уровня молочной — на 29,3 % ($P < 0,001$), соотношения лактат: пируват — на 40,5 %, подтверждающее нехватку кислорода в организме матери, приводящее к внутриутробной гипоксии плода. Высокий уровень креатинина (на 25,0 %, $P < 0,05$) у коров с осложненным течением беременности с внутриутробной гипоксией плода объясняется повышенным его образованием в системе креатин-креатинфосфат-креатинин при увеличении двигательной активности зародыша, что рассматривается в качестве ответной реакции на дефицит кислорода. Повышение уровня мочевины на 35,7 % ($P < 0,01$), МСМ — на 39,6 % ($P < 0,001$) и ИЭИ — на 38,8 % ($P < 0,05$) свидетельствуют о преобладании катаболических процессов и нарастании явлений интоксикации в условиях нехватки кислорода и дефицита энергии. Одновременно с этим, установлены значительные изменения в функционировании системы ПОЛ-АОЗ у коров с внутриутробной гипоксией плода на заключительном этапе беременности. В крови коров с осложненным течением гестации, по сравнению с физиологической беременностью, содержание малонового диальдегида выше 40,5 % ($P < 0,001$), при снижении уровня витамина А — на 21,2 % ($P < 0,001$), витамина Е — на 21,7 % ($P < 0,05$), активности каталазы — на 23,3 % ($P < 0,05$) и ГПО — на 34,2 % ($P < 0,001$), свидетельствующее об интенсификации процессов перекисного окисления липидов и белков и разбалансировке работы антиоксидантной защиты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при осложненном течении беременности, сопровождающейся внутриутробной гипоксией плода, изменения биохимического статуса начинают проявляться в ранние периоды эмбриогенеза и максимума достигают к моменту родов. В 2 месяца беременности изменения показателей биохимического статуса свидетельствуют о нарушениях в энергетическом обмене, накоплении продуктов перекисного окисления липидов, снижении ресурсов антиоксидантной защиты. В 4,5—5,0 месяцев гестации нарушения в энергетическом обмене характеризуются снижением доли аэробных механизмов получения энергии и увеличением доли анаэробных, накоплением кислых продуктов обмена веществ, приводящих к развитию гипоксии плода. В 7,0—7,5 месяцев беременности с осложненным ее течением, сопровождающейся внутриутробной гипоксией, происходит интенсификация катаболических процессов метаболизма, снижение доли аэробных процессов метаболизма и преобладание анаэробных, накопление продуктов перекисного окисления липидов, усиление процессов эндогенной интоксикации, снижение ресурсов ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Butler W. R.* Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle / W. R. Butler, J. J. Calaman, S. W. Beam // J. Anim. Sci. — 1996. — 74. P. 858—865.

2. *Peters M. W.* Fertility of lactating dairy cows treated with Ovsynch after presynchronization injections of PGF2α and GnRH / M. W. Peters, J. R. Pursley // J. Dairy Sci. — 2002. — V. 85. — P. 2403—2406.

3. *Нежданов А. Г.* Клинико-гематологический и биохимический статус коров при гестозе / А. Г. Нежданов, М. И. Рецкий, Ю. Н. Алехин, В. А. Сафонов и др. // Сельскохозяйственная биология. — 2010. — № 4. — С. 118—123.

4. *Бутко В. А.* Фармакопрофилактика нарушений эмбрионального развития у коров / В. А. Бутко, Е. Г. Лозовая, В. И. Михалев // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 1 (10). — С. 60—69. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.1.60

5. *Figueroa-Diesel H.* Doppler changes in the main fetal brain arteries at different stages of hemodynamic adaptation in severe intrauterine growth restriction / H. Figueroa-Diesel, E. Hernandez-Andrade, R. Acosta-Rojas et al. // Ultrasound Obstet. Gynecol. — 2007. — V. 30. — P. 297—302.

6. *Барашнев Ю. И.* Перинатальная неврология / Ю. И. Барашнев // М.: Триада-Х, 2005. — 672 с.

7. *Нежданов А. Г.* Метаболический статус коров при задержке внутриутробного развития эмбриона и плода / А. Г. Нежданов, В. И. Михалев, Г. Г. Чусова и др. // Сельскохозяйственная биология. —2016. — Том 51. —№ 2. — С. 230—236.

8. *Сафонов В. А.* О метаболическом профиле высокопродуктивных коров при беременности и бесплодии / В. А. Сафонов // Сельскохозяйственная биология. — 2008. — № 4. — С. 64—67.

9. *Forbes K.* Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth / K. Forbes, M. Westwood // J. Endocrinol. — 2010. V. 207 (1). — P. 1—16.

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.

11. Диагностика и профилактика внутриутробной задержки развития и гибели эмбрионов у коров / В. И. Михалев, С. В. Шабунин, П. А. Паршин и др. // Методическое пособие. — Воронеж, 2022. — 44 с.

12. Методическое положение по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма / М. И. Рецкий, С. В. Шабунин, Г. Н. Близнецова и др. // Методические положения. — Воронеж, 2010. — 70 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

В. И. Михалев — доктор ветеринарных наук, заведующий сектором;

Г. Г. Чусова — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией;

Е. М. Степанов — кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики;

Д. И. Шабанов — научный сотрудник лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем;

К. А. Лободин — заведующий кафедрой акушерства, анатомии и хирургии.

Статья поступила в редакцию 02.04.2025.

Original article
UDC 619:[612.1:612.273.2]:636.2

INDICATORS OF BLOOD BIOCHEMICAL STATUS OF COWS PREDISPOSED TO THE DEVELOPMENT OF INTRAUTERINE FETAL HYPOXIA

Vitaliy Ivanovich Mikhalev[*]✉, Galina Germanovna Chusova[*], Egor Maksimovich Stepanov[*], Dmitriy Igorevich Shabanov[*], Konstantin Alekseevich Lobodin[**]

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

Abstract. The article presents the research material on the blood biochemical status of cows predisposed to the development of intrauterine fetal hypoxia. The dynamics of changes in the studied biochemical indicators indicates that their manifestation begins since 60—75 days of gestation, they have a clear manifestation at 135—150 days and are clearly expressed at 210—230 days. It has been established that at the final stage of gestation with its complicated course, accompanied by intrauterine hypoxia, the glucose content is lower by 12.4 % ($P < 0.001$), pyruvic acid — by 10.2 % ($P < 0.05$), vitamin A — by 21.2 % ($P < 0.001$), vitamin E — by 21.7 % ($P < 0.05$), catalase activity — by 23.3 % ($P < 0.05$), GPO — by 34.2 % ($P < 0.001$), with an increase in the level of lactic acid by 29.3 % ($P < 0.001$), the lactate/pyruvate ratio — by 40.5 %, creatinine — by 25.0 % ($P < 0.05$), urea — by 35.7 % ($P < 0.01$), MWM — by 39.6 %. ($P < 0.001$), IEI — by 38.8 % ($P < 0.05$), indicating the prevalence of catabolic processes, an increase in intoxication phenomena under conditions of oxygen deficiency and energy deficit, intensification of lipid and protein peroxidation processes, imbalance in the functioning of antioxidant protection, which leads to intrauterine hypoxia and the birth of offspring with low viability indicators.
Keywords: cows, gestation, biochemical indicators, intrauterine fetal hypoxia

Stabilization of reproductive function indicators is an essential condition for profitable dairy farming. The causes of reproductive function disorders in dairy cows are varied: violations of keeping conditions, feeding, uterine pathology, hormonal imbalance, infectious diseases, etc. High milk productivity also has a negative effect on the reproductive function [1, 2].

In modern dairy farming conditions, embryonic development disorders are becoming increasingly important, which include embryonic mortality, embryonic intrauterine growth restriction syndrome, abortions, late toxicosis of gestation (gestosis), etc. The occurrence of embryopathology is closely associated with biochemical, functional and morphological changes in the mother-placenta-fetus system. The causes of embryogenesis disorders are varied, but the underlying causes are disturbances in the nutritional processes of the developing embryo, oxygen starvation, hypoxia, which initially leads to a slowdown in development and then to its death [3, 4].

Intrauterine hypoxia is accompanied by the development of a complex of changes in the body associated with insufficient oxygen supply or inadequate utilization. The fetus's oxygen supply depends on the blood flow rate of the middle uterine arteries [5, 6].

The gestation course at the physiological level depends on the optimal level of metabolic processes in the body of the pregnant animal, adequate diffusion capacity of the placenta, changes in the functioning of which contribute to the metabolic disorders development in the fetus, with hypoxia playing a dominant role [7—9]. This pathological condition of the pregnant animal's body can be considered as one of the factors determining the nature of the gestation course. Therefore, the issues of studying the nature of the course of metabolic processes in cows predisposed

to the development of intrauterine hypoxia are of particular relevance.

The research objective is to study the blood biochemical status of cows predisposed to the development of intrauterine fetal hypoxia.

MATERIAL AND METHODS

The material for the research was Holstein cows of the breeding farm in Orel region. The cows at 38—45 days of gestation were divided into two groups according to the results of clinical and echographic studies. The first group included animals with a physiological course of calving ($n = 25$), the second — with a diagnosed embryonic intrauterine growth restriction syndrome (IUGRS, $n = 16$). Transrectal and ultrasound studies were performed in accordance with the methodological manuals [10, 11].

Blood samples were taken from five cows from each group at 60—75, 135—150 and 210—230 days of gestation for laboratory tests. The blood was analyzed for the levels of total protein, urea, glucose, lactic and pyruvic acids, their ratios, as well as the content of creatinine, malondialdehyde (MDA), medium molecular weight peptides (MMP), index of endogenous intoxication (IEI), vitamin A, vitamin E, catalase and glutathione peroxidase (GPO) activity. Biochemical indicators were determined on a Hitachi-902 analyzer, and the LPO-AOD system indicators were determined in accordance with the methodological provisions [12].

The obtained results were subjected to statistical processing using the Statistica 6.0 software package. The differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

STUDY RESULTS

When studying the blood biochemical indicators of cows at 60—75 days of gestation, it has been established (Table 1) that in case of a complicated gestation in the form of embryonic intrauterine growth restriction syndrome, the glucose content is by 17.6 % lower ($P < 0.01$) than in case of a physiologically normal gestation, vitamin E — by 15.4 % ($P < 0.05$), catalase activity — by 9.9 %, GPO — by 20.9 % ($P < 0.001$) with an increase in the level of urea by 17.6 % ($P < 0.05$), lactic acid — by 7.2 %, the lactate/pyruvate ratio — by 10.1 %, malondialdehyde — by 11.0 %, which indicates disturbances in energy metabolism, accumulation of lipid peroxidation products and a decrease in resources of antioxidant protection.

Table 1

Blood biochemical indicators of cows at 60—75 days of gestation in case of its physiological and complicated course

Indicators	Nature of gestation course	
	physiological	IUGRS
1	2	3
Protein, g/L	81.0 ± 1.4	79.1 ± 1.5
Urea, mm/L	4.71 ± 0.22	5.54 ± 0.23*
Glucose, mm/L	3.29 ± 0.13	2.71 ± 0.15**
Lactate, mm/L	0.69 ± 0.05	0.74 ± 0.05
Pyruvate, μM/L	169.6 ± 10.2	165.1 ± 6.9
Lactate/Pyruvate, units	4.07	4.48
Creatinine, μM/L	67.3 ± 2.9	70.8 ± 3.8
MDA, μM/L	2.45 ± 0.14	2.72 ± 0.16
MMP, r. units	0.77 ± 0.02	0.79 ± 0.03
IEI	19.7 ± 0.8	20.1 ± 0.7
Catalase, $\mu MN_2O_2/Lxminx10^3$	46.5 ± 1.5	41.9 ± 1.9

Table 1 (the end)

1	2	3
GPO, μMGSH/Lxminxh10^3	22.4 ± 0.9	17.7 ± 0.6***
Vitamin A, μM/L	1.41 ± 0.03	1.38 ± 0.07
Vitamin E, μM/L	14.3 ± 0.7	12.1 ± 0.6*

* $P < 0.05$
** $P < 0.01$
*** $P < 0.001$ — compared to the physiological course of gestation

At 4.5—5.0 months of gestation with a complicated course (Table 2), the blood content of total protein is lower by 6.5 %, compared to the physiological gestation course, glucose — by 19.2 % ($P < 0.01$), pyruvic acid — by 9.7 % ($P < 0.05$), vitamin A — by 20.0 % ($P < 0.05$), vitamin E — by 19.1 % ($P < 0.01$), catalase activity — by 11.3 % ($P < 0.05$), GPO — by 30.8 % ($P < 0.001$) with an increase in the level of urea by 27.3 % ($P < 0.05$), lactic acid — by 23.9 % ($P < 0.05$), the lactate/pyruvate ratio — by 37.2 %, creatinine — by 25.6 %. ($P < 0.01$), malondialdehyde — by 17.6 % ($P < 0.001$), medium molecular weight peptides — by 26.4 % ($P < 0.001$), index of endogenous intoxication — by 20.0 % ($P < 0.001$).

Table 2

Blood biochemical indicators of cows at 135—150 days of gestation in case of its physiological and complicated course

Indicators	Nature of gestation course	
	physiological	IUGRS
Protein, g/L	83.5 ± 2.6	78.1 ± 1.9
Urea, mm/L	5.09 ± 0.31	6.48 ± 0.24*
Glucose, mm/L	3.18 ± 0.13	2.57 ± 0.11**
Lactate, mm/L	0.71 ± 0.04	0.88 ± 0.05*
Pyruvate, μM/L	181.0 ± 7.8	163.6 ± 5.9*
Lactate/Pyruvate, units	3.92	5.38
Creatinine, μM/L	78.9 ± 3.5	99.1 ± 5.4**
MDA, μM/L	2.10 ± 0.06	2.47 ± 0.05***
MMP, r. units	0.87 ± 0.03	1.10 ± 0.04***
IEI	23.5 ± 0.5	28.2 ± 0.8***
Catalase, μMN_2O_2/Lxminx10^3	47.6 ± 1.5	42.2 ± 1.7*
GPO, μMGSH/Lxminxh10^3	27.9 ± 0.9	19.3 ± 0.8***
Vitamin A, μM/L	1.5 ± 0.11	1.2 ± 0.07*
Vitamin E, μM/L	15.2 ± 0.4	12.3 ± 0.6**

* $P < 0.05$
** $P < 0.01$
*** $P < 0.001$ — compared to the physiological course of gestation

The revealed changes in the blood biochemical indicators of cows with a complicated gestation indicate a disturbance in energy metabolism, a decrease in the share of aerobic mechanisms for obtaining energy and an increase in the share of anaerobic ones, accumulation of acidic metabolic products, leading to the development of fetal hypoxia. At the same time, a decrease in the activity of the enzymatic and non-enzymatic links of antioxidant protection against the background of an increased accumulation of lipid peroxidation products and endogenous intoxication is noted.

At 7.0—7.5 months of gestation, changes in biochemical status indicators are more pronounced in animals with a complicated gestation (Table 3).

Table 3

Blood biochemical indicators of cows at 210—230 days of gestation in case of its physiological and complicated course

Indicators	Nature of gestation course	
	physiological	IUGRS
Protein, g/L	82.9 ± 3.7	85.2 ± 4.4
Urea, mm/L	5.24 ± 0.41	7.11 ± 0.35**
Glucose, mm/L	2.75 ± 0.07	2.41 ± 0.04***
Lactate, mm/L	0.75 ± 0.02	0.97 ± 0.02***
Pyruvate, μM/L	198.1 ± 7.6	177.9 ± 5.7*
Lactate/Pyruvate, units	3.88	5.45
Creatinine, μM/L	84.3 ± 3.5	105.4 ± 4.9**
MDA, μM/L	2.22 ± 0.05	3.12 ± 0.14***
MMP, r. units	0.91 ± 0.02	1.27 ± 0.04***
IEI	27.8 ± 1.3	38.6 ± 2.1*
Catalase, μMN_2O_2/Lxminx10^3	52.3 ± 3.6	40.1 ± 2.1*
GPO, μMGSH/Lxminxh10^3	29.5 ± 1.1	19.4 ± 1.3***
Vitamin A, μM/L	1.65 ± 0.03	1.30 ± 0.09***
Vitamin E, μM/L	16.1 ± 0.8	12.6 ± 0.9*

* $P < 0.05$
** $P < 0.01$
*** $P < 0.001$ — compared to the physiological course of gestation

Thus, in the blood of these cows the glucose content is lower by 12.4 % ($P < 0.001$), pyruvic acid — by 10.2 % ($P < 0.05$) with an increase in the level of lactic acid — by 29.3 % ($P < 0.001$), the lactate/pyruvate ratio — by 40.5 %, confirming the lack of oxygen in the mother's body, leading to intrauterine hypoxia of the fetus. The high level of creatinine (by 25.0 %, $P < 0.05$) in cows with a complicated gestation with intrauterine hypoxia of the fetus is explained by its increased formation in the creatine-creatine phosphate-creatinine system with an increase in the motor activity of the embryo, which is considered as a response to oxygen deficiency. The increase in the urea level by 35.7 % ($P < 0.01$), MWM — by 39.6 % ($P < 0.001$) and IEI — by 38.8 % ($P < 0.05$) indicates the prevalence of catabolic processes and the increase in intoxication phenomena under conditions of oxygen deficiency and energy deficit. At the same time, significant changes in the functioning of the LPO-AOD system were established in cows with intrauterine fetal hypoxia at the final stage of gestation. In the blood of cows with a complicated gestation, compared to a

physiological one, the content of malondialdehyde is higher than 40.5 % ($P < 0.001$), with a decrease in the level of vitamin A by 21.2 % ($P < 0.001$), vitamin E — by 21.7 % ($P < 0.05$), catalase activity — by 23.3 % ($P < 0.05$) and GPO — by 34.2 % ($P < 0.001$), indicating the intensification of lipid and protein peroxidation processes and an imbalance in the antioxidant defense.

CONCLUSION

Thus, in case of a complicated gestation, accompanied by intrauterine hypoxia of the fetus, changes in the biochemical status begin to manifest themselves in the early periods of embryogenesis and reach a maximum by the time of calving. At 2 months of gestation, changes in biochemical status indicators indicate disturbances in energy metabolism, accumulation of lipid peroxidation products and decreased antioxidant defense resources. At 4.5—5.0 months of gestation, disturbances in energy metabolism are characterized by a decrease in the share of aerobic mechanisms for obtaining energy and an increase in the share of anaerobic ones, accumulation of acidic metabolic products leading to the fetal hypoxia development. At 7.0—7.5 months of gestation with a complicated course, accompanied by intrauterine hypoxia, there is an intensification of catabolic metabolic processes, a decrease in the share of aerobic metabolic processes and the predominance of anaerobic ones, accumulation of lipid peroxidation products, increased endogenous intoxication processes, a decrease in the resources of the enzymatic and non-enzymatic links of the antioxidant system.

REFERENCES

1. *Butler W. R.* Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle / W. R. Butler, J. J. Calaman, S. W. Beam // J. Anim. Sci. — 1996. — 74. P. 858—865.

2. *Peters M. W.* Fertility of lactating dairy cows treated with Ovsynch after presynchronization injections of PGF2α and GnRH / M. W. Peters, J. R. Pursley // J. Dairy Sci. — 2002. — V. 85. — P. 2403—2406.

3. *Nezhdanov A. G.* Clinical, hematological and biochemical status of cows with gestosis / A. G. Nezhdanov, M. I. Retskiy, Yu.N. Alekhin, V. A. Safonov, et al. // Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology). — 2010. — No. 4. — P. 118—123.

4. *Butko V. A.* Pharmacoprophylaxis of embryonic development disorders in cows / V. A. Butko, E. G. Lozovaya, V. I. Mikhalev // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2020. — No. 1 (10). — P. 60—69. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.1.60

5. *Figueroa-Diesel H.* Doppler changes in the main fetal brain arteries at different stages of hemodynamic adaptation in severe intrauterine growth restriction / H. Figueroa-Diesel, E. Hernandez-Andrade, R. Acosta-Rojas et al. // Ultrasound Obstet. Gynecol. — 2007. — V. 30. — P. 297—302.

6. *Barashnev Yu. I.* Perinatal neurology / Yu.I. Barashnev // Moscow: Triada-X, 2005. — 672 p.

7. *Nezhdanov A. G.* Metabolic status of cows with intrauterine growth restriction syndrome of the embryo and fetus / A. G. Nezhdanov, V. I. Mikhalev, G. G. Chusova, et al. // Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology). —2016. — Vol. 51. — No.2. — P. 230—236.

8. *Safonov V. A.* On the metabolic profile of high yielding cows during gestation and in case of infertility / V. A. Safonov // Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology). — 2008. — № 4. — P. 64—67.

9. *Forbes K.* Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth / K. Forbes, M. Westwood // J. Endocrinol. — 2010. V. 207 (1). — P. 1—16.

10. Ultrasound diagnostics of gestation and embryonic and fetal intrauterine growth restriction syndrome in cows / A. G. Nezhdanov, V. I. Mikhalev, N. T. Klimov et al. // Methodological manual. — Voronezh, 2013. — 19 p.

11. Diagnosis and prevention of intrauterine growth restriction syndrome and embryo death in cows / V. I. Mikhalev, S. V. Shabunin, P. A. Parshin et al. // Methodological manual. — Voronezh, 2022. — 44 p.

12. 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. // Methodological provisions. — Voronezh, 2010. — 70 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

V. I. Mikhalev — Doctor of Veterinary Sciences, Head of the Sector;

G. G. Chusova — Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory;

E. M. Stepanov — Candidate of Veterinary Sciences, 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;

K. A. Lobodin — Head of the Department of Obstetrics, Anatomy and Surgery.

The article was submitted 02.04.2025.

Научная статья
УДК 619:618.96:569.822.2—086

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИНДЕКСОВ У КОШЕК ПРИ НЕФРОКАРДИАЛЬНОМ СИНДРОМЕ

Константин Евгеньевич Белкин[*], Юрий Анатольевич Ватников[*]✉, Андрей Анатольевич Руденко[*, **], Елена Александровна Кротова[*], Евгений Владимирович Куликов[*]

[*]Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия, vatnikov@yandex.ru✉
[**]Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Россия

Аннотация. В данной статье рассматриваются вопросы изучения информативности интегральных иммунновоспалительных гематологических индексов у кошек при нефрокардиальном синдроме. Нефрокардиальный синдром представляет собой прогрессирующее заболевание, регистрирующееся кошек среднего и старшего возраста, характеризующее собой патологический процесс, когда на фоне первичного хронического почечного заболевания развивается коморбидное поражение сердечно-сосудистой системы в виде вторичной кардиомиопатии. Имеется гипотетическая патогенетическая связь между хроническими воспалительными процессами и прогрессированием заболевания почек и сердца. Интегральные иммунновоспалительные гематологические индексы изучались при многих патологических состояниях, однако их диагностическая ценность при нефрокардиальном синдроме у кошек неизвестна. Целью настоящего исследования было детальное изучение диагностической информативности интегральных иммунновоспалительных гематологических индексов у кошек, больных нефрокардиальным синдромом. Результаты показали, что в крови больных животных происходит значимое повышение лейкоцитарного индекса интоксикации, индекса сдвига лейкоцитов крови, индекса соотношения количества нейтрофилов и моноцитов, индекса соотношения количества лейкоцитов и СОЭ, индекса Кребса, соотношения количества нейтрофилов к количеству лимфоцитов, соотношения количества тромбоцитов к количеству лимфоцитов, соотношения количества моноцитов к количеству лимфоцитов, индекса системного иммунного воспаления, снижение лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса. Эти результаты указывают на то, что кошки с прогрессирующим нефрокардиальным синдромом находятся в состоянии хронического системного воспаления, которое можно выявить с помощью простого гематологического анализа. Однако прогностическую ценность маркеров воспаления, полученных с помощью гемограммы, следует оценить в ходе дальнейших исследований.

Ключевые слова: нефрокардиальный синдром, системное воспаление, патогенез, кошки, хроническая почечная недостаточность

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая болезнь почек у домашних кошек встречается очень часто, имеет прогрессирующее течение и является предиктором высокой смертности [1—4]. При хронической болезни почек у кошек могут развиваться различные коморбидные патологии со стороны других внутренних органов (артериальная гипертония, гепатопатия, вторичный гиперпаратиреоз, нарушения водно-электролитного баланса, анемии и т. д.) [5—7]. В последние годы эффективность лечебных мероприятий в области ветеринарной нефрологии значительно улучшилась, и многие животные доживают до той стадии патологии, когда на фоне первичного почечного заболевания развивается вторичное поражение сердечно-сосудистой системы. Данная коморбидность в литературе имеет название — нефрокардиальный синдром, наднозологическое понятие, когда в организме одного и того же животного развиваются две патологии, характеризующиеся хронической болезнью почек и вторичной кардиомиопатией [8, 9]. У кошек описаны случаи

развития вторичной нефрогенной кардиомиопатии у домашних кошек [10]. Однако, следует акцентировать внимание на том факте, что этиология и точная патофизиология развития и прогрессирования нефрокардиального синдрома у животных до сих пор неясны. В научной литературе имеются многочисленные сообщения о том, что системное воспаление играет важную роль в развитии и прогрессировании как хронической почечной декомпенсации [2, 3], так и хронической сердечной недостаточности у мелких домашних животных [11]. У животных при кардиомиопатиях и эндокардиозе митрального клапана нередко отмечается повышение С-реактивного белка, фибриногена, цитокинов в крови, также описаны изменения в гемограммах, характеризующие развитие нейтрофилии, а также повышение скорости оседания эритроцитов. Подобные изменения описаны у кошек, больных хронической болезнью почек.

Интегральные иммунновоспалительные гематологические индексы, полученные из стандартной гемограммы, являются недорогими и легкодоступными маркерами системного воспаления, полученными из обычных анализов гемограммы. В медицине для людей воспалительные маркеры, полученные из гемограммы, используются в качестве прогностических и/или диагностических маркеров онкологических и воспалительных заболеваний [12—21]. Однако, в специализированной научной литературе отсутствуют данные о иммунновоспалительных маркерах, определяемых по результатам анализа крови, при нефрокардиальном синдроме у животных.

Исходя из вышесказанного, *целью данной работы* стало детальное изучение диагностической информативности интегральных иммунновоспалительных гематологических индексов у кошек, больных нефрокардиальным синдромом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данном клиническом исследовании были проанализированы данные интегральных иммунновоспалительных гематологических индексов, больных нефрокардиальным синдромом, с 2021 по 2025 год. В группы сравнения вошли клинически здоровые кошки (отрицательный контроль), а также кошки больные хронической болезнью почек (положительный контроль). Для верификации диагноза и формирования групп животных проводили комплексные клинические, гематологические, биохимических анализы, а также анализы мочи, эхокардиографические, электрокардиографические исследования.

Критерием включения кошек в группу, больных нефрокардиальным синдромом (n = 37, возраст 132,9 ± 4,9 мес), в исследование было наличие подтвержденного диагноза хронической болезни почек III—IV стадий (3,4 ± 0,1 ед.) в соответствии с рекомендациями Международного общества по изучению заболеваний почек (IRIS), а также признаки кардиомиопатии (концентрическая гипертрофия левого желудочка и/или дилатация левого предсердия) [3]. В группу больных хронической болезнью почек вошли 23 кошки со стадиями патологического процесса III—IV IRIS (3,4 ± 0,1 ед.), возрастом 131,4 ± 7,3 мес.

Из исследования были исключены кошки с диагнозами острого повреждения почек, постренальной или преренальной азотемией, нефропатией инфекционного или токсического происхождения в течение последних 30 дней, обструкцией мочевыводящих путей, острым системным воспалением, заболеваниями печени, поджелудочной железы или онкологическими заболеваниями, а также кошки с положительным результатом тестов на вирус лейкемии и иммунодефицита кошек. В случае обнаружения пиурии, положительного результата бакпосева мочи, полученного с помощью цистоцентеза, и/или ультразвуковых признаков, указывающих на пиелит, пиелонефрит, кошки исключались из исследования.

В контрольную группу вошли 22 здоровые кошки (возраст 126,1 ± 6,5 мес), у которых были проанализированы аналогичные показатели. У кошек данной группы гематологические и биохимические анализы, а также анализ мочи были проведены либо в рамках диспансеризации, либо перед плановой стерилизацией/кастрацией. С целью верификации состояния клинического здоровья у кошек контрольной группы использовали результаты физического осмотра, гематологических и биохимических анализов крови и мочи, которые должны были находиться в пределах референсных значениях, а также животные должны были быть свободны от вирусоносительства кошачьей лейкемии и иммунодефицита.

Детально оценивались результаты гематологических анализов (общий анализ крови с дифференциальным подсчетом лейкоцитов), биохимических профилей (концентрации мочевины, креатинина, общих белков, альбуминов, общего кальция и неорганического фосфата в сыворотке крови, активность аланинаминотрансферазы и щелочной

фосфатазы в сыворотке крови) и результаты общего анализа мочи (анализ мочи на pH, микроскопическое исследование осадка мочи, удельный вес мочи и отношение белка мочи к креатинину, количество почечного эпителия, цилиндров, эритроцитов и лейкоцитов в поле зрения при цитологическом исследовании мочи.

У всех обследованных кошек биохимический анализ крови проводился с помощью автоматического биохимического анализатора (CS-600B, Dirui, Китай), а гематологический анализ — с помощью автоматического лазерного гематологического анализатора (HEMAX 53 VET, B&E BIO-TECHNOLOGY CO., LTD., Китай) с использованием специального программного обеспечения. В случае обнаружения агрегации тромбоцитов (ошибка при анализе) количество тромбоцитов не учитывалось и кошки исключались из исследования. В мазках крови, окрашенных по Романовскому — Гимза, проводили подсчет лейкограммы.

Интегральные гематологические иммунновоспалительные индексы рассчитывали по следующим формулам: ЛИ = Л/(*П* + С); ИК = (*П* + С)/Л; ИЛГ = (Л*10)/(*М* + *Ю* + *П* + *С* + *Э* + Б); ИЛСОЭ = Лк*СОЭ/100; *Я*И = (*М* + *Ю* + П)/С; ЛИИ = (*П* + С)/(*Л* + Э + М); ИСЛК = (*Э* + *Б* + *П* + С)/(*М* + Л); ИСНМ = (*П* + С)/М; ОНЛ = Н/Л; ОТЛ = Т/Л; ОМЛ = М/Л; ИСИВ = Н*Т/Л. Где: ЛИ — лейкоцитарный индекс [ед.]; ИК — индекс Кребса [ед.]; ИЛГ — лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс [ед.]; ИЛСОЭ — индекс соотношения количества лейкоцитов и СОЭ [ед.]; ЯИ — ядерный индекс [ед.]; ЛИИ — лейкоцитарный индекс интоксикации [ед.]; ИСЛК — индекс сдвига лейкоцитов крови [ед.]; ИСНМ — индекс соотношения количества нейтрофилов и моноцитов [ед.]; ОНЛ — отношение количества нейтрофилов к количеству лимфоцитов [ед.]; ОТЛ — отношение количества тромбоцитов к количеству лимфоцитов [ед.]; ОМЛ — отношение количества моноцитов к количеству лимфоцитов [ед.]; Л — лимфоциты [10^9/л], П — палочкоядерные нейтрофилы [10^9/л], С — сегментоядерные нейтрофилы [10^9/л], М — моноциты [10^9/л], Ю — юные нейтрофилы [10^9/л], Э — эозинофилы [10^9/л], Б — базофилы [10^9/л], СОЭ — скорость оседания эритроцитов [мм/ч]; Лк — общее количество лейкоцитов [10^9/л], Т — количество тромбоцитов [10^9/л], Н — количество нейтрофилов [10^9/л].

Статистический анализ проводился с помощью компьютерной программы Statistica 10. Для определения распределения данных был проведен тест Шапиро—Уилка. Для описания цифровых характеристик трех групп кошек использовались методы описательной статистики. Исследуемые параметры соответствовали нормальному распределению и поэтому сравнивались между группами кошек с помощью параметрического Т-критерия Стьюдента для несвязанных выборок. Нормально распределенные данные представлены в таблице виде среднего значения (*M*) ± стандартная ошибка (*m*). Межгрупповую разницу в цифровых параметрах считали значимой при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе мы оценили изменения таких интегральных лейкоцитарных индексов, как ЛИИ, ЯИ, ИСЛК, ИСНМ, ИСЛМ, ИЛСОЭ, ИЛГ, ИК, ЛИ, ОНЛ, ОТЛ, ОМЛ, ИСИВ. В рамках стратификации в исследование включены следующие группы: 22 клинически здоровые кошки (отрицательный контроль); 23 кошек, больных хроническая болезнью почек (положительный контроль); 37 кошек с нефрокардиальным синдромом (опыт). Определяли межгрупповые изменения в лейкоцитарных индексах, используя критерий Манна — Уитни. Ниже в таблице 1 представлены детерминация ЛИИ, ЯИ, ИСЛК, ИСНМ, ИСЛМ, ИЛСОЭ, ИЛГ, ИК, ЛИ, ОНЛ, ОТЛ, ОМЛ, ИСИВ в разных группах обследованных кошек.

Интересно, что в группе кошек, больных нефрокардиальным синдромом, величина ЛИИ была достоверно выше, чем у животных, больных хронической болезнью почек ($p \leq 0,001$), и клинически здоровых кошек ($p \leq 0,001$). ЯИ был достоверно выше как в группе кошек с хронической болезнью почек ($p \leq 0,001$), так и при нефрокардиальном синдроме ($p \leq 0,001$), по сравнению с клинически здоровыми животными. Также примечательным выявился тот факт, что ЯИ не отличался у больных хронической болезнью почек животных, по сравнению с группой больных нефрокардиальным синдромом кошек.

У здоровых кошек ИСЛК в среднем составлял 1,7 ± 0,1 ед. При ХБП и нефрокардиальном синдроме данный параметр достоверно повышался. Следует отметить, что значение ИСЛК выявилось также достоверно выше в группе кошек с нефрокардиальным синдромом, чем в группе кошек с хронической болезнью почек ($p \leq 0,001$).

По сравнению с контролем, ИСНМ достоверно принимал более высокие значения в группе кошек, больных как нефрокардиальным ($p \leq 0,001$), так и хронической болезнью почек ($p \leq 0,05$). Между

группами больных нефрокардиальным синдромом кошек и хронической болезнью почек также была установлена высокодостоверная разница в отношении показателя ИСНМ ($p \leq 0,001$).

Таблица 1

Характеристика и диагностическая информативность лейкоцитарных индексов интоксикации у кошек, больных нефрокардиальным синдромом

Параметр	Здоровые кошки ($n = 22$)	Больные кошки		Статистическая значимость (критерий Манна—Уитни)		
		Хроническая болезнь почек ($n = 23$)	Нефрокардиальный синдром ($n = 37$)	p1	p2	p3
ЛИИ, ед.	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,2	3,7 ± 0,3	≤ 0,01	≤ 0,001	≤ 0,001
ЯИ, ед.	2,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,2	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 1
ИСЛК, ед.	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,2	3,8 ± 0,3	≤ 0,05	≤ 0,001	≤ 0,001
ИСНМ, ед.	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,2	3,8 ± 0,3	≤ 0,05	≤ 0,001	≤ 0,001
ИСЛМ, ед.	15,1 ± 1,0	9,1 ± 0,7	6,3 ± 0,5	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,01
ИЛСОЭ, ед.	0,43 ± 0,03	1,68 ± 0,13	2,29 ± 0,17	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,05
ИЛГ, ед.	5,9 ± 0,4	4,5 ± 0,3	2,6 ± 0,2	≤ 0,05	≤ 0,001	≤ 0,001
ИК, ед.	1,8 ± 0,2	2,5 ± 0,3	4,7 ± 0,4	≤ 0,05	≤ 0,001	≤ 0,001
ЛИ, ед.	0,63 ± 0,05	0,49 ± 0,04	0,27 ± 0,02	≤ 0,05	≤ 0,001	≤ 0,001
ОНЛ, ед.	1,8 ± 0,2	2,5 ± 0,3	4,7 ± 0,4	≤ 0,05	≤ 0,001	≤ 0,001
ОТЛ, ед.	93,4 ± 11,1	98,4 ± 13,6	170,9 ± 19,0	≤ 1	≤ 0,001	≤ 0,001
ОМЛ, ед.	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,02	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,01
ИСИВ, ед.	439,7 ± 48,1	650,1 ± 79,0	1281,9 ± 116,4	≤ 0,01	≤ 0,001	≤ 0,001

Примечание: p1 — между здоровыми и больными хронической почечной недостаточностью кошками; p2 — между здоровыми и больными нефрокардиальным синдромом кошками; p3 — между больными хронической почечной недостаточностью и нефрокардиальным синдромом кошками; ИК — индекс Кребса; ИЛГ — лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс; ИЛСОЭ — индекс соотношения количества лейкоцитов и СОЭ; ЯИ — ядерный индекс; ЛИИ — лейкоцитарный индекс интоксикации; ИСЛК — индекс сдвига лейкоцитов крови; ИСНМ — индекс соотношения количества нейтрофилов и моноцитов; ОНЛ — отношение количества нейтрофилов к количеству лимфоцитов; ОТЛ — отношение количества тромбоцитов к количеству лимфоцитов; ОМЛ — отношение количества моноцитов к количеству лимфоцитов; ИСИВ — индекс системного иммунного воспаления.

Показатель ИСЛМ достоверно ($p \leq 0,001$) снижается до 9,1 ± 0,7 ед. в группе кошек, больных хронической болезнью почек до 9,1 ± 0,7 ед., даже прогрессивно снижается в группе кошек, больных нефрокардиальным синдромом до 6,3 ± 0,5 ед., относительно клинически здоровых животных (15,1 ± 1,0 ед.). В отношении детерминанты ИСЛМ также установлена статистическая разница ($p \leq 0,01$) между группами кошек с нефрокардиальным синдромом и хронической болезнью почек.

ИЛСОЭ выявился наиболее высоким (2,29 ± 0,17 ед., $p \leq 0,001$) в группе кошек, больных нефрокардиальным синдромом, несколько ниже в группе больных хронической почечной недостаточности животных (1,68 ± 0,13 ед., $p \leq 0,001$), по сравнению с клинически здоровыми (0,43 ± 0,03 ед.).

ИЛСОЭ был также достоверно выше у животных при нефрокардиальном синдроме ($p \leq 0,05$), чем при хронической болезни почек.

В отличии от ИЛСОЭ показатель ИЛГ значимо снижался при развитии патологии. Так, в группе кошек с нефрокардиальным синдромом ИЛГ был достаточно низким (2,6 ± 0,2 ед., $p \leq 0,001$), по сравнению с группой кошек, больных хронической болезнью почек (4,5 ± 0,3 ед.), и даже в сравнении с клинически здоровыми животными (5,9 ± 0,4 ед.). Однако, ИК достоверно повышался как в группе животных с нефрокардиальным синдромом ($p \leq 0,001$), так и при хронической болезни почек ($p \leq 0,05$), по сравнению с клинически здоровыми. По сравнению с группой хронической болезнью почек, у кошек при нефрокардиальном синдроме верифицированы более высокие значения показателя ИК ($p \leq 0,001$).

При сравнительном анализе показателя ЛИ были установлены минимальные его значения при развитии нефрокардиального синдрома (0,27 ± 0,02 ед.), что вылилось в статистически значимом различии, по сравнению с группой как больных хронической болезнью почек кошек ($p \leq 0,001$), так и клинически здоровыми животными ($p \leq 0,001$). Значения показателя ОТН у животных при нефрокардиальном синдроме были значимо выше, чем у кошек, больных хронической болезнью почек ($p \leq 0,001$), и группы клинически здоровых животных ($p \leq 0,001$).

Установлено, что величина показателя ОТЛ была значимо повышенной в группе нефрокардиального синдрома, по сравнению с группой кошек, больных хронической болезнью почек ($p \leq 0,001$), и даже с группой клинически здоровых животных ($p \leq 0,001$). Интересно, что данный показатель в группе хронической болезни почек не отличался от значений группы клинически здоровых животных. Что касается показателя ОМЛ, то следует отметить, что он значимо повышался в группе кошек при нефрокардиальным синдромом, по сравнению с группой животных с хронической болезнью почек ($p \leq 0,001$) и клинически здоровыми ($p \leq 0,001$). Гистограммы распределения показателя ИСИВ у животных разных опытных групп представлены на рисунке 1.

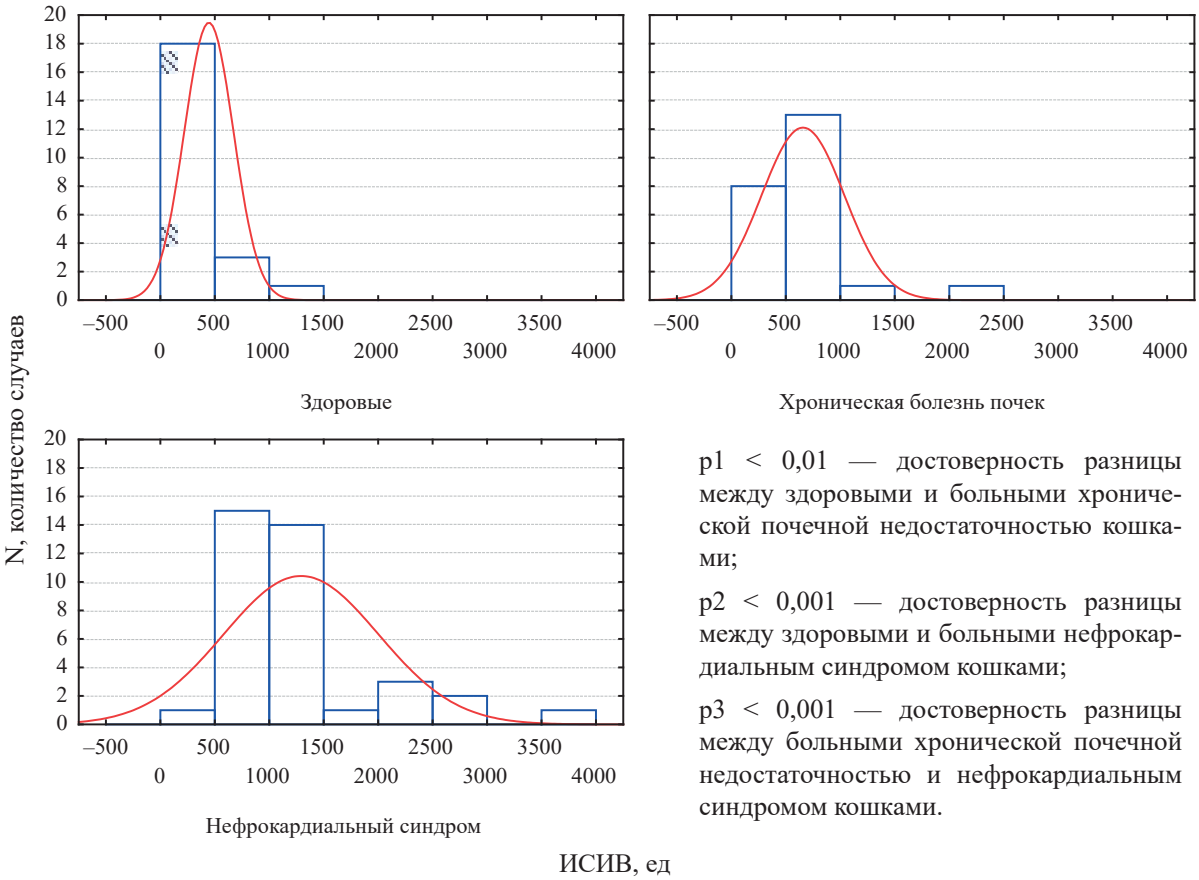


Рис. 1. Гистограммы распределения показателя индекса системного иммунного воспаления (ИСИВ) у клинически здоровых кошек, а также больных хронической болезнью почек и нефрокардиальным синдромом

Как видно на (рис. 1), величина показателя ИСИВ в разных опытных группах существенно различалась. Так, у 81,8 % здоровых кошек величина показателя ИСИВ находилась в диапазоне до 500 ед. У 95,6 % кошек, больных хронической болезнью почек, он находился в диапазоне 0—1000 ед. У 78,4 % больных нефрокардиальном синдроме кошек ИСИВ варьировал от 500 до 1500 ед. При этом, показатель ИСИВ статистически значимо повышался в группе нефрокардиального синдрома, по сравнению с группой нефрокардиального синдрома ($p \leq 0{,}001$) и контрольной группой ($p \leq 0{,}001$).

Очевидно, что нефрокардиальный синдром у кошек характеризуется хроническим воспалительным процессом, при которых функциональные нефроны и кардиомиоциты постепенно разрушаются и замещаются соединительной тканью. Хроническое воспаление может приводить к избыточной выработке супероксидных радикалов активированными нейтрофилами (оксидативный нейтрофильный взрыв), что требует дальнейших широкоформатных исследований.

Внедрение интегральных иммунновоспалительных гематологических индексов у кошек при сочетанной ренальной и кардиальной патологии может помочь выявить патологический процесс на ранней стадии и своевременно провести корригирующие мероприятия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании у кошек с нефрокардиальным синдромом значения ряда интегральных иммунновоспалительных гематологических индексов, рассчитанных из стандартной гемограммы, показали высокую диагностическую информативность. У кошек при нефрокардиальном синдроме происходит значимое повышение лейкоцитарного индекса интоксикации, индекса сдвига лейкоцитов крови, индекса соотношения количества нейтрофилов и моноцитов, индекса соотношения количества лейкоцитов и скорости оседания эритроцитов, индекса Кребса, соотношения количества нейтрофилов к количеству лимфоцитов, соотношения количества тромбоцитов к количеству лимфоцитов, соотношения количества моноцитов к количеству лимфоцитов, индекса системного иммунного воспаления, снижение лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса.

Наибольшей информативностью обладал индекс системного иммунного воспаления. Интегральные иммунновоспалительные гематологические индексы можно использовать как потенциальные предикторы неблагоприятного прогрессирующего течения патологии и маркеры эффективности терапевтических мероприятий. Необходимы дальнейшие исследования для определения пороговых значений интегральных иммунновоспалительных гематологических индексов у кошек с нефрокардиальным синдромом, а также для изучения их роли в мониторинге клинического состояния у больных кошек и в качестве независимых прогностических маркеров.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гистологические изменения в почках при хронической болезни почек у кошек, связанные с отложением амилоида / Л. Б. Инатуллаева, Ю. А. Ватников, И. Ф. Вилковыский, Ю. Ю. Воронина // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2017. — № 5. — С. 25—31.

2. Uva A, Cavalera MA, Gusatoaia O, Donghia R, Gernone F, Silvestrino M, *Zatelli A.* Inflammatory Status and Chronic Kidney Disease in Cats: Old and New Inflammatory Markers-A Pilot Prospective Study. Animals (Basel). 2023 Nov 28;13(23):3674. doi: 10.3390/ani13233674. PMID: 38067025; PMCID: PMC10705084

3. Krofič Žel M, Nemec Svete A, Tozon N, *Pavlin D.* Hemogram-Derived Inflammatory Markers in Cats with Chronic Kidney Disease. Animals (Basel). 2024 Jun 18;14(12):1813. doi: 10.3390/ani14121813. PMID: 38929432; PMCID: PMC11200498

4. Jepson RE, Brodbelt D, Vallance C, Syme HM, *Elliott J.* Evaluation of predictors of the development of azotemia in cats. J Vet Intern Med. 2009 Jul-Aug;23(4):806—13. doi: 10.1111/j.1939—1676.2009.0339.x. PMID: 19566846

5. Szlagor M, Dybiec J, Młynarska E, Rysz J, *Franczyk B.* Chronic Kidney Disease as a Comorbidity in Heart Failure. Int J Mol Sci. 2023 Feb 3;24(3):2988. doi: 10.3390/ijms24032988. PMID: 36769308; PMCID: PMC9918100

6. Hamrahian SM, *Falkner B.* Hypertension in Chronic Kidney Disease. Adv Exp Med Biol. 2017;956:307—325. doi: 10.1007/5584_2016_84. PMID: 27873228

7. Особенности развития гепатокардиального синдрома у собак с дилатационной кардиомиопатией / Ю. А. Ватников, Е. Д. Сотникова, В. М. Бяхова [и др.] // Ветеринария. — 2022. — № 10. — С. 52—57. — DOI 10.30896/0042—4846.2022.2

8. Brown CA, Elliott J, Schmiedt CW, Brown SA. Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogeneses. Vet Pathol. 2016 Mar;53(2):309—26. doi: 10.1177/0300985815622975. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26869151.5.10.52—57

9. Luis Fuentes V, Abbott J, Chetboul V, Côté E, Fox PR, Häggström J, Kittleson MD, Schober K, Stern JA. ACVIM consensus statement guidelines for the classifica-

tion, diagnosis, and management of cardiomyopathies in cats. J Vet Intern Med. 2020 May;34(3):1062—1077. doi: 10.1111/jvim.15745. Epub 2020 Apr 3. PMID: 32243654; PMCID: PMC7255676

10. Payne JR, Brodbelt DC, Luis *Fuentes V.* Cardiomyopathy prevalence in 780 apparently healthy cats in rehoming centres (the CatScan study). J Vet Cardiol. 2015 Dec;17 Suppl 1: S244—57. doi: 10.1016/j.jvc.2015.03.008. PMID: 26776583

11. *Руденко А. А.* Оценка частоты дыхания во время сна у кошек с застойной сердечной недостаточностью: степень приверженности к данному тесту владельцев животных и ее влияние на выживаемость пациентов / А. А. Руденко // Российский ветеринарный журнал. — 2018. — № 4. — С. 9—14. — DOI 10.32416/article_5bd-1c1f917fda5.38468318

12. *Руденко А. А.* Показатели специфического клеточного иммунитета у собак с дилатационной кардиомиопатией / А. А. Руденко // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2018. — № 6. — С. 21—27.

13. Petrucci GN, Lobo L, Queiroga F, Martins J, Prada J, Pires I, *Henriques J.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent prognostic marker for feline mammary carcinomas. Vet Comp Oncol. 2021 Sep;19(3):482—491. doi: 10.1111/vco.12686. Epub 2021 Mar 15. PMID: 33576562

14. *Neumann S.* Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in dogs and cats with acute pancreatitis. Vet Clin Pathol. 2021 Mar;50(1):45—51. doi: 10.1111/vcp.12979. Epub 2021 Mar 23. Erratum in: Vet Clin Pathol. 2021 Sep;50(3):469. doi: 10.1111/vcp.13071. PMID: 33759228

15. Mureșan AV, Russu E, Arbănași EM, Kaller R, Hosu I, Arbănași EM, Voidăzan ST. The Predictive Value of NLR, MLR, and PLR in the Outcome of End-Stage Kidney Disease Patients. Biomedicines. 2022 May 29;10(6):1272. doi: 10.3390/biomedicines10061272. PMID: 35740294; PMCID: PMC9220159

16. Brito GMC, Fontenele AMM, Carneiro ECRL, Nogueira IAL, Cavalcante TB, Vale AAM, Monteiro SCM, Salgado *Filho N.* Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in Nondialysis Chronic Kidney Patients. Int J Inflam. 2021 Jun 23;2021:6678960. doi: 10.1155/2021/6678960. PMID: 34257898; PMCID: PMC8245254

17. Gori E, Pierini A, Lippi I, Lubas G, *Marchetti V.* Leukocytes Ratios in Feline Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis: A Retrospective Analysis of 209 Cases. Animals (Basel). 2021 Jun 1;11(6):1644. doi: 10.3390/ani11061644. PMID: 34206019; PMCID: PMC8227061

18. Li L, Chen K, Wen C, Ma X, *Huang L.* Association between systemic immune-inflammation index and chronic kidney disease: A population-based study. PLoS One. 2024 Feb 8;19(2): e0292646. doi: 10.1371/journal.pone.0292646. PMID: 38329961; PMCID: PMC10852278

19. Tagawa M, Shimbo G, *Miyahara K.* Prognostic role of lymphocyte to monocyte ratio in feline high-grade lymphomas. Can *Vet J.* 2021 Oct;62(10):1095—1103. PMID: 34602638; PMCID: PMC8439333.

20. Solak Y, Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, Cakir E, Unal HU, Gok M, Caglar K, Oguz Y, Yenicesu M, Karaman M, Ay SA, Gaipov A, Turk S, Vural A, Carrero JJ. Neutrophil to lymphocyte ratio independently predicts cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 2013 Aug;17(4):532—40. doi: 10.1007/s10157—012—0728-x. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23180042

21. Altunoren O, Akkus G, Sezal DT, Ciftcioglu M, Guzel FB, Isiktas S, Torun GI, Uyan M, Sokmen MF, Sevim HA, Sarısık FN, Senel ME, Erken E, *Gungor O.* Does neutrophyl to lymphocyte ratio really predict chronic kidney disease progression? Int Urol Nephrol. 2019 Jan;51(1):129—137. doi: 10.1007/s11255—018—1994—7. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30276600

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

К. Е. Белкин — аспирант департамента ветеринарной медицины;
Ю. А. Ватников — д-р вет. наук, профессор, директор департамента ветеринарной медицины;
А. А. Руденко — д-р вет. наук, доцент, профессор кафедры ветеринарной медицины;
Е. А. Кротова — канд. вет. наук, доцент департамента ветеринарной медицины;
Е. В. Куликов — канд. биол. наук, доцент департамента ветеринарной медицины.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 19.03.2025.

Original article
UDC 619:618.96:569.822.2—086

INFORMATIVENESS OF INTEGRAL HEMATOLOGICAL INDICES IN CATS WITH NEPHROCARDIAL SYNDROME

Konstantin Evgenyevich Belkin[*], Yuriy Anatolyevich Vatnikov[*]✉, Andrey Anatolyevich Rudenko[*,], Elena Aleksandrovna Krotova[*], Evgeniy Vladimirovich Kulikov[*]**

[*]Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia, vatnikov@yandex.ru✉
[**]Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia

Abstract. This article discusses the issues of studying the informativeness of integral immunoinflammatory hematological indices in cats with nephrocardial syndrome. Nephrocardial syndrome is a progressive disease registered in middle-aged and older cats, characterized by a pathological process when, against the background of primary chronic kidney disease, comorbid cardiovascular disease develops in the form of a secondary cardiomyopathy. There is a hypothetical pathogenetic relationship between chronic inflammatory processes and the progression of kidney and heart disease. Integral immunoinflammatory hematological indices have been studied in many pathological conditions, but their diagnostic value in case of nephrocardial syndrome in cats is unknown. The objective of this research was a detailed study of the diagnostic informativeness of integral immunoinflammatory hematological indices in cats with nephrocardial syndrome. The results have shown that in the blood of sick animals there is a significant increase in the leukocyte intoxication index, leukocyte shift index, neutrophil to monocyte ratio, leukocyte to ESR ratio, Krebs's index, neutrophil to lymphocyte ratio, platelet to lymphocyte ratio, monocyte to lymphocyte ratio, systemic immune inflammation index, and a decrease in the lymphocyte-granulocyte index. These results indicate that cats with progressive nephrocardial syndrome are in a state of chronic systemic inflammation, which can be detected by a simple hematological analysis. However, the prognostic value of inflammation markers obtained using a hemogram should be assessed in further studies.
Keywords: nephrocardial syndrome, systemic inflammation, pathogenesis, cats, chronic renal failure

INTRODUCTION

Chronic kidney disease in domestic cats is very common, has a progressive course and is a predictor of high mortality [1—4]. In cats with chronic kidney disease, various comorbid pathologies may develop in other internal organs (arterial hypertension, hepatopathy, secondary hyperparathyroidism, water-electrolyte imbalance, anemia, etc.) [5—7]. In recent years, the efficacy of therapeutic measures in the field of veterinary nephrology has improved significantly, and many animals survive to the stage of pathology when secondary damage to the cardiovascular system develops against the background of primary kidney disease. This comorbidity is called nephrocardial syndrome in the literature, a supra-nosological concept when two pathologies characterized by chronic kidney disease and secondary cardiomyopathy develop in the body of the same animal [8, 9]. In cats, cases of secondary nephrogenic cardiomyopathy have been described in domestic cats [10]. However, it should be emphasized that the etiology and exact pathophysiology of the development and progression of nephrocardial syndrome in animals are still unclear. There are numerous reports in the scientific literature that systemic inflammation plays an important role in the development and progression of both chronic renal decompensation [2, 3] and chronic heart failure in small domestic animals [11]. In animals with cardiomyopathy and mitral valve endocardiosis, an increase in C-reactive protein, fibrinogen, cytokines in the blood is often observed, changes in hemograms characterizing the development of neutrophilia, as well as an increase in the erythrocyte sedimentation rate have also been described. Similar changes have been described in cats with chronic kidney disease.

Integral immunoinflammatory hematological indices obtained from standard hemogram are inexpensive and readily available markers of systemic inflammation

obtained from routine hemogram analyses. In human medicine, inflammatory markers obtained from hemogram are used as prognostic and/or diagnostic markers of oncological and inflammatory diseases [12—21]. However, there are no data in the specialized scientific literature on immunoinflammatory markers determined by blood analysis in case of nephrocardial syndrome in animals.

Based on the above, the objective of this work was to study in detail the diagnostic information content of integral immunoinflammatory hematological indices in cats with nephrocardial syndrome.

MATERIAL AND METHODS

This clinical study analyzed the data of integral immunoinflammatory hematological indices in cats with nephrocardial syndrome from 2021 to 2025. The comparison groups included clinically healthy cats (negative control), as well as cats with chronic kidney disease (positive control). To verify the diagnosis and form groups of animals, comprehensive clinical, hematological, biochemical, as well as urine tests, echocardiographic, electrocardiographic studies were performed.

The inclusion criterion for the cats in the group with nephrocardial syndrome (n = 37, age 132.9 ± 4.9 months) in the study was the presence of a confirmed diagnosis of chronic kidney disease stages III—IV (3.4 ± 0.1 units) in accordance with the recommendations of the International Renal Interest Society (IRIS), as well as signs of cardiomyopathy (concentric hypertrophy of the left ventricle and/or dilation of the left atrium) [3]. The group of animals with chronic kidney disease included 23 cats with IRIS stages III—IV of pathological process (3.4 ± 0.1 units), aged 131.4 ± 7.3 months.

The cats diagnosed with acute kidney injury, postrenal or prerenal azotemia, nephropathy of infectious or toxic origin within the last 30 days, urinary tract obstruction, acute systemic inflammation, liver, pancreatic or cancer diseases, as well as cats with positive results of tests for feline leukemia virus and immunodeficiency virus were excluded from the study. The cats were excluded from the study in case of detection of pyuria, positive urine culture obtained by cystocentesis and/or ultrasound signs indicating pyelitis, pyelonephritis.

The control group included 22 healthy cats (age 126.1 ± 6.5 months), in which similar indicators were analyzed. In cats of this group, hematological and biochemical analyses, as well as urine analysis, were carried out either as part of a medical examination or before planned sterilization/castration. In order to verify the clinical health of cats in the control group, the results of a physical examination, hematological and biochemical blood and urine tests were used, which had to be within the reference values, and the animals had to be free of the feline leukemia virus and immunodeficiency.

The results of hematological tests (complete blood count with differential leukocyte count), biochemical profiles (concentrations of urea, creatinine, total proteins, albumin, total calcium and inorganic phosphate in serum, serum alanine aminotransferase and alkaline phosphatase activities) and the results of clinical urine analysis (urine analysis for pH, microscopic examination of urine sediment, specific gravity of urine and urine protein to creatinine ratio, the amount of renal epithelium, casts, red blood cells and white blood cells in the field of view in the cytology of urine) were evaluated in detail.

All examined cats underwent blood biochemistry analysis using an automatic biochemical analyzer (CS-600B, Dirui, China), and hematology analysis was performed using an automatic laser hematology analyzer (HEMAX 53 VET, B&E BIO-TECHNOLOGY CO., LTD., China) using special software. In case of platelet aggregation detection (analysis error), the platelet count was not taken into account, and the cats were excluded from the study. Leukogram was counted in blood smears stained according to Romanowsky — Giemsa.

Integral hematological immunoinflammatory indices were calculated using the following formulas: LI = L/(B + S); KI = (B + S)/L; LGI = (L*10)/(M + I + B + S + E + Bs); ILESR = TLC*ESR/100; NI = (M + I + B)/S; LII = (B + S)/(L + E + M); BLSI = (E + Bs + B + S)/(M + L); INMR = (B + S)/M; NLR = N/L; PLR = P/L; MLR = M/L; ISII = N*P/L. Where: LI — leukocyte index [units]; KI — Krebs' index [units]; LGI — lymphocyte-granulocyte index [units]; ILESR — index of the leukocyte to ESR ratio [units]; NI — nuclear index [units]; LII — leukocyte intoxication index [units]; BLSI — blood leukocyte shift index [units]; INMR — index of the neutrophil to monocyte ratio [units]; NLR — neutrophil to lymphocyte ratio [units]; PLR — platelet to lymphocyte ratio [units]; MLR — monocyte to lymphocyte ratio [units]; ISII — index of systemic immune inflammation [units]; L — lymphocytes [10^9/L], B — band neutrophils [10^9/L], S — segmented neutrophils [10^9/L], M — monocytes [10^9/L], I — immature neutrophils [10^9/L], E — eosinophils [10^9/L], Bs — basophils [10^9/L], ESR — erythrocyte sedimentation rate

[mm/h]; TLC — total leukocyte count [10^9/L], P — platelet count [10^9/L], N — neutrophil count [10^9/L].

Statistical analysis was performed using the Statistica 10 software. The Shapiro — Wilk test was used to determine the data distribution. Descriptive statistics methods were used to describe the digital characteristics of the three groups of cats. The parameters under study corresponded to the normal distribution and were therefore compared between the groups of cats using the parametric Student's t-test for unrelated samples. Normally distributed data are presented in the table as the mean value (M) ± standard error (m). The intergroup difference in digital parameters was considered significant at $p < 0.05$.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

In our work, we assessed changes in such integral leukocyte indices as LII, NI, BLSI, INMR, ILMR, ILESR, LGI, KI, LI, NLR, PLR, MLR, ISII. The study included the following groups for stratification: 22 clinically healthy cats (negative control); 23 cats with chronic kidney disease (positive control); 37 cats with nephrocardial syndrome (experiment). Intergroup changes in leukocyte indices were determined using the Mann — Whitney criterion. Table 1 below presents the determination of LII, NI, BLSI, INMR, ILMR, ILESR, LGI, KI, LI, NLR, PLR, MLR, ISII in different groups of examined cats.

Table 1

Characteristics and diagnostic information content of leukocyte intoxication indices in cats with nephrocardial syndrome

Parameter	Healthy cats (n = 22)	Sick cats		Statistical significance (Mann—Whitney test)		
		Chronic kidney disease (n = 23)	Nephrocardial syndrome (n = 37)	p1	p2	p3
LII, u	1.6 ± 0.1	2.1 ± 0.2	3.7 ± 0.3	≤ 0.01	≤ 0.001	≤ 0.001
NI, u	2.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 1
BLSI, u	1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	3.8 ± 0.3	≤ 0.05	≤ 0.001	≤ 0.001
INMR, u	1.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2	3.8 ± 0.3	≤ 0.05	≤ 0.001	≤ 0.001
ILMR, u	15.1 ± 1.0	9.1 ± 0.7	6.3 ± 0.5	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.01
ILESR, u	0.43 ± 0.03	1.68 ± 0.13	2.29 ± 0.17	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.05
LGI, u	5.9 ± 0.4	4.5 ± 0.3	2.6 ± 0.2	≤ 0.05	≤ 0.001	≤ 0.001
KI, u	1.8 ± 0.2	2.5 ± 0.3	4.7 ± 0.4	≤ 0.05	≤ 0.001	≤ 0.001
LI, u	0.63 ± 0.05	0.49 ± 0.04	0.27 ± 0.02	≤ 0.05	≤ 0.001	≤ 0.001
NLR, u	1.8 ± 0.2	2.5 ± 0.3	4.7 ± 0.4	≤ 0.05	≤ 0.001	≤ 0.001
PLR, u	93.4 ± 11.1	98.4 ± 13.6	170.9 ± 19.0	≤ 1	≤ 0.001	≤ 0.001
MLR, u	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.02	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.01
ISII, u	439.7± 48.1	650.1 ± 79.0	1281.9 ± 116.4	≤ 0.01	≤ 0.001	≤ 0.001

Note. p1 — between healthy cats and cats with chronic renal failure; p2 — between healthy cats and cats with nephrocardial syndrome; p3 — between cats with chronic renal failure and nephrocardial syndrome; KI — Krebs index; LGI — lymphocyte-granulocyte index; ILESR — index of leukocyte to ESR ratio; NI — nuclear index; LII — leukocyte intoxication index; BLSI — blood leukocyte shift index; INMR — index of neutrophil to monocyte ratio; NLR — neutrophil to lymphocyte ratio; PLR — platelet to lymphocyte ratio; MLR — monocyte to lymphocyte ratio; ISII — index of systemic immune inflammation.

It is interesting that in the group of cats with nephrocardial syndrome, the LII value was significantly higher than in animals with chronic kidney disease ($p \leq 0.001$) and clinically healthy cats ($p \leq 0.001$). The NI was significantly higher both in the group of cats with chronic kidney disease ($p \leq 0.001$) and with nephrocardial syndrome ($p \leq 0.001$), compared with clinically healthy animals. It is also noteworthy that the NI did not differ in animals with chronic kidney disease, compared with the group of cats with nephrocardial syndrome.

In healthy cats, BLSI averaged 1.7 ± 0.1 units. In case of chronic kidney disease and nephrocardial syndrome, this parameter significantly increased. It should be noted that the value of the BLSI was also found to be significantly higher in the group of cats with nephrocardial syndrome than in the group of cats with chronic kidney disease ($p \leq 0.001$).

Compared with the control, the INMR significantly demonstrated higher values in the group of cats with both nephrocardial ($p \leq 0.001$) and chronic kidney disease ($p \leq 0.05$). A highly reliable difference in the INMR indicator was also established between the groups of cats with nephrocardial syndrome and chronic kidney disease ($p \leq 0.001$).

The ILMR indicator significantly ($p \leq 0.001$) decreases to 9.1 ± 0.7 units in the group of cats with chronic kidney disease to 9.1 ± 0.7 units, and even progressively decreases in the group of cats with nephrocardial syndrome to 6.3 ± 0.5 units, relative to clinically healthy animals (15.1 ± 1.0 units). With regard to the determinant of the ILMR, a statistical difference ($p \leq 0.01$) was also established between the groups of cats with nephrocardial syndrome and chronic kidney disease.

The ILESR was the highest (2.29 ± 0.17 units, $p \leq 0.001$) in the group of cats with nephrocardial syndrome, slightly lower in the group of animals with chronic renal failure (1.68 ± 0.13 units, $p \leq 0.001$), compared to clinically healthy animals (0.43 ± 0.03 units). The ILESR was also significantly higher in animals with nephrocardial syndrome ($p \leq 0.05$) than in those with chronic kidney disease.

Unlike the ILESR, the LGI significantly decreased with the development of pathology. Thus, in the group of cats with nephrocardial syndrome, the LGI was quite low (2.6 ± 0.2 units, $p \leq 0.001$), compared to the group of cats with chronic kidney disease (4.5 ± 0.3 units), and even compared to clinically healthy animals (5.9 ± 0.4 units). However, the KI significantly increased both in the group of animals with nephrocardial syndrome ($p \leq 0.001$) and with chronic kidney disease ($p \leq 0.05$), compared to clinically healthy animals. Compared with the group with chronic kidney disease, higher KI values were verified in cats with nephrocardial syndrome ($p \leq 0.001$).

In the comparative analysis of the LI index, its minimum values were established during the development of nephrocardial syndrome (0.27 ± 0.02 units), which resulted in a statistically significant difference, compared with the group of both cats with chronic kidney disease ($p \leq 0.001$) and clinically healthy animals ($p \leq 0.001$). The values of the PLR index in animals with nephrocardial syndrome were significantly higher than in cats with chronic kidney disease ($p \leq 0.001$) and the group of clinically healthy animals ($p \leq 0.001$). It had been found that the value of the PLR index was significantly increased in the nephrocardial syndrome group, compared with the group of cats with chronic kidney disease ($p \leq 0.001$), and even with the group of clinically healthy animals ($p \leq 0.001$). Interestingly, this indicator in the chronic kidney disease group did not differ from the values in the group of clinically healthy animals.

As for the MLR index, it should be noted that it significantly increased in the group of cats with nephrocardial syndrome, compared with the group of animals with chronic kidney disease ($p \leq 0.001$) and clinically healthy ones ($p \leq 0.001$). Histograms of the distribution of the ISII in animals of different experimental groups are presented in Fig. 1.

As can be seen in Fig. 1, the value of the ISII in different experimental groups varied significantly. Thus, in 81.8 % of healthy cats, the value of the ISII was in the range of up to 500 units. In 95.6 % of cats with chronic kidney disease, it was in the range of 0—1000 units. In 78.4 % of cats with nephrocardial syndrome, the ISII varied from 500 to 1500 units. At the same time, the ISII statistically significantly increased in the nephrocardial syndrome group, compared with the nephrocardial syndrome group ($p \leq 0.001$) and the control group ($p \leq 0.001$).

Obviously, nephrocardial syndrome in cats is characterized by a chronic inflammatory process, in which functional nephrons and cardiomyocytes are gradually destroyed and replaced by connective tissue. Chronic inflammation can lead to excessive production of superoxide radicals by activated neutrophils (oxidative neutrophil burst), which requires further large-scale studies. The introduction of integrated immunoinflammatory hematological indices in cats with combined renal and cardiac pathology can help to identify the pathological process at an early stage and carry out timely corrective measures.

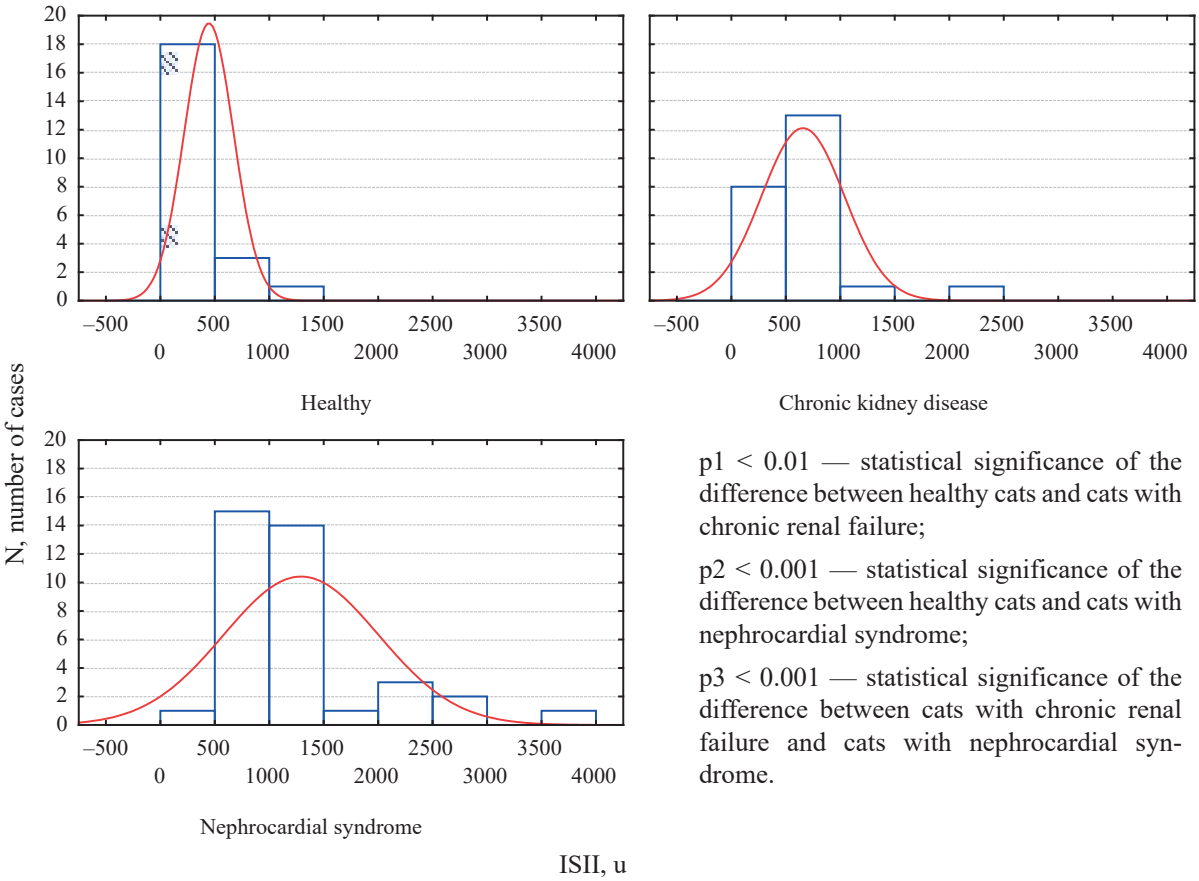


Fig. 1. Histograms of the distribution of the index of systemic immune inflammation (ISII) in clinically healthy cats, as well as in cats with chronic kidney disease and nephrocardial syndrome

CONCLUSION

In our study, the values of a number of integral immunoinflammatory hematological indices calculated from the standard hemogram showed high diagnostic information value in cats with nephrocardial syndrome. In cats with nephrocardial syndrome, there is a significant increase in the leukocyte intoxication index, blood leukocyte shift index, index of neutrophil-monocyte ratio, index of leukocyte-erythrocyte sedimentation rate ratio, Krebs's index, neutrophil to lymphocyte ratio, platelet to lymphocyte ratio, monocyte to lymphocyte ratio, index of systemic immune inflammation, and a decrease in the lymphocyte-granulocyte index. The index of systemic immune inflammation had the greatest information value. Integral immunoinflammatory hematological indices can be used as potential predictors of an unfavorable progressive course of pathology and markers of the efficacy of therapeutic measures. Further studies are needed to determine the cut-off values of integrated immunoinflammatory hematological indices in cats with nephrocardial syndrome, as well as to examine their role in monitoring the clinical status of sick cats and as independent prognostic markers.

REFERENCES

1. Histological changes in the kidneys in case of chronic kidney disease in cats associated with amyloid deposition / L. B. Inatullaeva, Yu. A. Vatnikov, I. F. Vilkoviskiy, Yu. Yu. Voronina // Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya (Veterinary science, zootechnics and biotechnology). — 2017. — No. 5. — P. 25—31.

2. *Uva A, Cavalera MA, Gusatoaia O, Donghia R, Gernone F, Silvestrino M, Zatelli A.* Inflammatory Status and Chronic Kidney Disease in Cats: Old and New Inflammatory Markers-A Pilot Prospective Study. Animals (Basel). 2023 Nov 28;13(23):3674. doi: 10.3390/ani13233674. PMID: 38067025; PMCID: PMC10705084

3. *Krofič Žel M, Nemec Svete A, Tozon N, Pavlin D.* Hemogram-Derived Inflammatory Markers in Cats with Chronic Kidney Disease. Animals (Basel). 2024 Jun 18;14(12):1813. doi: 10.3390/ani14121813. PMID: 38929432; PMCID: PMC11200498

4. *Jepson RE, Brodbelt D, Vallance C, Syme HM, Elliott J.* Evaluation of predictors of the development of azotemia in cats. J Vet Intern Med. 2009 Jul-Aug;23(4):806—13. doi: 10.1111/j.1939—1676.2009.0339.x. PMID: 19566846

5. *Szlagor M, Dybiec J, Młynarska E, Rysz J, Franczyk B.* Chronic Kidney Disease as a Comorbidity in Heart Failure. Int J Mol Sci. 2023 Feb 3;24(3):2988. doi:

10.3390/ijms24032988. PMID: 36769308; PMCID: PMC9918100

6. *Hamrahian SM, Falkner B.* Hypertension in Chronic Kidney Disease. Adv Exp Med Biol. 2017;956:307—325. doi: 10.1007/5584_2016_84. PMID: 27873228

7. Features of the hepatocardial syndrome development in dogs with dilated cardiomyopathy / Yu. A. Vatnikov, E. D. Sotnikova, V. M. Byakhova [et al.] // Veterinariya (Veterinary Science). — 2022. — No. 10. — P. 52—57. — DOI 10.30896/0042—4846.2022.2

8. *Brown CA, Elliott J, Schmiedt CW, Brown SA.* Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogeneses. Vet Pathol. 2016 Mar;53(2):309—26. doi: 10.1177/0300985815622975. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26869151.5.10.52—57

9. *Luis Fuentes V, Abbott J, Chetboul V, Côté E, Fox PR, Häggström J, Kittleson MD, Schober K, Stern JA.* ACVIM consensus statement guidelines for the classification, diagnosis, and management of cardiomyopathies in cats. J Vet Intern Med. 2020 May;34(3):1062—1077. doi: 10.1111/jvim.15745. Epub 2020 Apr 3. PMID: 32243654; PMCID: PMC7255676

10. *Payne JR, Brodbelt DC, Luis Fuentes V.* Cardiomyopathy prevalence in 780 apparently healthy cats in rehoming centres (the CatScan study). J Vet Cardiol. 2015 Dec;17 Suppl 1: S244—57. doi: 10.1016/j.jvc.2015.03.008. PMID: 26776583

11. *Rudenko A. A.* Evaluation of respiratory rate during sleep in cats with congestive heart failure: the degree of adherence to this test by animal owners and its effect on patient survival / A. A. Rudenko // Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal (Russian Veterinary Journal). — 2018. — No. 4. — P. 9—14. — DOI 10.32416/article_5bd1c1f917fda5.38468318

12. *Rudenko A. A.* Indicators of specific cellular immunity in dogs with dilated cardiomyopathy / A. A. Rudenko // Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya (Veterinary science, zootechnics and biotechnology). — 2018. — No. 6. — P. 21—27.

13. *Petrucci GN, Lobo L, Queiroga F, Martins J, Prada J, Pires I, Henriques J.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent prognostic marker for feline mammary carcinomas. Vet Comp Oncol. 2021 Sep;19(3):482—491. doi: 10.1111/vco.12686. Epub 2021 Mar 15. PMID: 33576562

14. *Neumann S.* Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in dogs and cats with acute pancreatitis. Vet Clin Pathol. 2021 Mar;50(1):45—51. doi: 10.1111/vcp.12979. Epub 2021 Mar 23. Erratum in: Vet Clin Pathol. 2021 Sep;50(3):469. doi: 10.1111/vcp.13071. PMID: 33759228

15. *Mureşan AV, Russu E, Arbănaşi EM, Kaller R, Hosu I, Arbănaşi EM, Voidăzan ST.* The Predictive Value of NLR, MLR, and PLR in the Outcome of End-Stage Kidney Disease Patients. Biomedicines. 2022 May 29;10(6):1272. doi: 10.3390/biomedicines10061272. PMID: 35740294; PMCID: PMC9220159

16. *Brito GMC, Fontenele AMM, Carneiro ECRL, Nogueira IAL, Cavalcante TB, Vale AAM, Monteiro SCM, Salgado Filho N.* Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in Nondialysis Chronic Kidney Patients. Int J Inflam. 2021 Jun 23;2021:6678960. doi: 10.1155/2021/6678960. PMID: 34257898; PMCID: PMC8245254

17. *Gori E, Pierini A, Lippi I, Lubas G, Marchetti V.* Leukocytes Ratios in Feline Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis: A Retrospective Analysis of 209 Cases. Animals (Basel). 2021 Jun 1;11(6):1644. doi: 10.3390/ani11061644. PMID: 34206019; PMCID: PMC8227061

18. *Li L, Chen K, Wen C, Ma X, Huang L.* Association between systemic immune-inflammation index and chronic kidney disease: A population-based study. PLoS One. 2024 Feb 8;19(2): e0292646. doi: 10.1371/journal.pone.0292646. PMID: 38329961; PMCID: PMC10852278

19. *Tagawa M, Shimbo G, Miyahara K.* Prognostic role of lymphocyte to monocyte ratio in feline high-grade lymphomas. Can *Vet J.* 2021 Oct;62(10):1095—1103. PMID: 34602638; PMCID: PMC8439333.

20. *Solak Y, Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, Cakir E, Unal HU, Gok M, Caglar K, Oguz Y, Yenicesu M, Karaman M, Ay SA, Gaipov A, Turk S, Vural A, Carrero JJ.* Neutrophil to lymphocyte ratio independently predicts cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 2013 Aug;17(4):532—40. doi: 10.1007/s10157—012—0728-x. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23180042

21. *Altunoren O, Akkus G, Sezal DT, Ciftcioglu M, Guzel FB, Isiktas S, Torun GI, Uyan M, Sokmen MF, Sevim HA, Sarısık FN, Senel ME, Erken E, Gungor O.* Does neutrophyl to lymphocyte ratio really predict chronic kidney disease progression? Int Urol Nephrol. 2019 Jan;51(1):129—137. doi: 10.1007/s11255—018—1994—7. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30276600

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

K. E. Belkin — Postgraduate Student of the Department of Veterinary Medicine;

Yu.A. Vatnikov — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of the Department of Veterinary Medicine;

A. A. Rudenko — Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Veterinary Medicine;

E. A. Krotova — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of Veterinary Medicine;

E. V. Kulikov — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Veterinary Medicine.

The authors declare no conflicts of interest.

The article was submitted 19.03.2025.

Научная статья
УДК 636.5.082.474

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОРРИГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГЛУТАТИОНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ У ЦЫПЛЯТ И ПЕРЕПЕЛЯТ СУТОЧНОГО ВОЗРАСТА

Валерия Александровна Попова[*]✉, Татьяна Олеговна Азарнова[**], Инесса Сергеевна Луговая[*], Николь Григорьевна Азарнова[**]

[*]Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия, valer-ka99@mail.ru✉
[**]Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина, Москва, Россия

Аннотация. Стресс является ключевым фактором, определяющим снижение жизнеспособности, продуктивности и воспроизводительных качеств сельскохозяйственной птицы [1]. На молекулярном уровне это проявляется в виде интенсификации свободнорадикальных реакций, и, как следствие, процессов перекисного окисления липидов, которые наиболее опасны в период инкубации, когда эмбрион еще не имеет сформированных антиоксидантных механизмов защиты. Для предупреждения заявленных негативных явлений коллектив авторов статьи рекомендует трансовариальное предынкубационное использование антиоксиданта глутатиона, в ранее выявленной оптимальной концентрации [2, 3]. В ходе исследований было установлено, что применение изучаемого трипептида снижает интенсивность липопероксидации на всех стадиях процесса при повышении антиокислительной активности сыворотки крови, как у цыплят, так и у перепелят на 9,7 % ($p < 0,05$) и на 28,5 %, соответственно. Реализация антиоксидантных свойств глутатиона определила условия для повышения жизнеспособности сельскохозяйственной птицы обоих видов, за счет снижения большинства изученных категорий отходов инкубации, что обусловило увеличение вывода особей и выводимости яиц на 3,97 %, на 3,64 % (цыплята) и на 7,60 %, на 4,35 % (перепелята), соответственно по сравнению с контролем.

Ключевые слова: глутатион, эмбриогенез, перепела, цыплята, оксидативный стресс, свободные радикалы

В настоящее время птицеводство успешно конкурирует с мясным скотоводством в отношении обеспечения населения продуктами питания [4]. Это происходит за счет более короткого цикла воспроизводства и высокой окупаемости вложенных инвестиций [4]. Однако интенсификация птицеводческой отрасли, которая определяет все более жесткие условия содержания для получения большего количества продукции при меньшем количестве затрат, влияет на физиологическое состояние птицы [5]. Это приводит к напряжению всех систем ее организма и, в отсутствии дополнительного поддержания антиоксидантами в онтогенезе, ослабляет его, обуславливая повышение восприимчивости особи к действию факторов стресса [1, 6].

Стресс сопровождает все технологические этапы производства, однако наиболее важным и часто сопряженным с действиями негативных факторов является период инкубации, когда организм птицы еще не сформирован, а антиоксидантные системы еще не завершили свое становление [7, 8]. Известно, что, с самого начала своего развития, эмбрион в условиях производственного цикла находится под действием большого количества факторов стресса одновременно, совокупное действие которых никак не может являться тренировочным, а потому определяет негативные изменения в клетках, органах и тканях, сопряженные с избыточным накоплением активных форм кислорода и прогрессией липопероксидации [8, 9]. Причиной этого может быть недостаточность антиоксидантов в яйце, а также их быстрое истощение в случае длительного воздействия факторов стресса или присутствия широкого спектра их разнообразия [8]. Важно отметить, что периоды гипоксии, периодически сопровождающие эмбриональный период птицы, также

сопряжены с прогрессией оксидативного стресса, это связано с тем, что кислород в меньшей концентрации, но сохраняет свое присутствие [10].

В зависимости от силы воздействия стрессоров существует минимум три адаптационные реакции: реакция тренировки — возникает в ответ на систематические слабые воздействия, что приводит к устойчивости организма к раздражителям; реакция активации — отклик на воздействия средней силы, характеризующийся подъемом активности защитных систем, повышая выносливость организма; реакция на сильные чрезвычайные воздействия — это стресс [11]. При долговременном или очень сильном влиянии стрессоров, адаптационные возможности организма снижаются, особь функционирует на пределе своих возможностей, происходит некомпенсируемая интенсификация процессов липопероксидации, наступает стадия истощения [12]. Избыток продуктов свободнорадикального окисления, которые обладают повышенной реакционной способностью и являются причиной модификации структур липидов, белков и нуклеиновых кислот, приводит к инициации и прогрессии патологических процессов в организме, определяя нарушение метаболизма, а вместе с тем снижение роста, развития, естественной резистентности, жизнеспособности и воспроизводительных возможностей особи [1].

Особенности обменных и физиологических процессов в организме птицы зависят от вида, стадии онтогенеза, возраста, направления, уровня продуктивности и индивидуальных особенностей [13]. При этом современные генотипы сельскохозяйственной птицы очень чувствительны к стрессам различной этиологии и генеза [14]. Указанное актуализирует изучение метаболических процессов у популярных видов сельскохозяйственной птицы. Это позволяет найти наиболее действенные способы коррекции оксидативного стресса и оптимизации метаболических процессов, которые позволят повысить результативность промышленной инкубации, а вместе с тем увеличат вывод молодняка и выводимость яиц, качество особи. Для снижения степени негативных проявлений действия стрессоров и недопущения чрезмерной интенсификации свободнорадикальных процессов в обсуждаемый период многие ученые предлагают применение антиоксидантов перед инкубацией, использование которых экономично, выгодно и безопасно [8, 15]. Именно к таковым можно отнести глутатион — трипептид, состоящий из остатков аминокислот: глутамата, цистеина и глицина, который синтезируется во многих растительных, микробных и всех животных клетках [16]. Его основная функция — инактивация свободнорадикальных процессов. Он непосредственно ингибирует различные окислители, такие как супероксидный анион, гидроксильный радикал, оксид азота и углеродные радикалы, а также является кофактором различных антиоксидантных ферментов, включая глутатионпероксидазу и глутатион-S-трансферазу [17]. Также обсуждаемый антиоксидант участвует в детоксикации поглощенных тяжелых металлов и продуктов, которые выводятся из метаболизма [16]. Помимо этого глутатион играет важную роль в биосинтезе, фолдинге белка и стабилизации его структуры, транспорте некоторых аминокислот в клетку [18].

Нужно еще раз отметить, что обсуждаемый трипептид является наиболее распространенным в эукариотических клетках, но при стрессах его пул быстро истощается [19]. Указанное актуализирует его использование перед инкубацией для исследования его влияния на интенсивность липопероксидации у различных видов сельскохозяйственной птицы.

Цель работы: сравнение действий оптимальной концентрации глутатиона при трансовариальном однократном предынкубационном введении на интенсивность липопероксидации у цыплят и перепелят суточного возраста.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперимент проводили в условиях СГЦ «Загорское ЭПХ» — филиал ФНЦ ВНИТИП РАН и Шепиловской птицефабрики, а также на кафедре химии имени профессоров С. И. Афонского, А. Г. Малахова ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К. И. Скрябина. Для осуществления опыта в партии были взяты: яйца кур кросса «Росс 308» (по 252 штуки в каждую) и яйца перепелов японской породы (по 250 штук в каждую), при соблюдении принципа аналогов, а именно: сроков снесения и хранения, массы. Опытные группы орошали оптимальным раствором глутатиона, концентрация которого была выявлена в серии предшествующих экспериментов — 2,5 % [2, 3]. Контрольные партии яиц обработке не подвергали.

Для исследования маркеров липопероксидации использовали сыворотку крови цыплят и перепелят суточного возраста опытных и контрольных групп. Заявленные показатели определяли колориметрическими методами [20]; изучение АОА осуществляли на основании регистрации торможе-

ния окисления О-дианизидина дихлоргидрата радикалом гидроксила, который образуется в системе Фентона сыворотки крови [20]. Исследование показателей биоконтроля инкубации, а также расчет вывода цыплят и выводимости яиц проводили, основываясь на рекомендациях Бессарабова Б. Ф. (2015) [21].

Полученный в ходе научно-исследовательской работы цифровой материал подвергали статистической обработке с помощью критерия Стьюдента с использованием программы Microsoft Excel [22]. Результат считали достоверными при $p \leq 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предынкубационная обработка яиц оптимальной концентрацией глутатиона определила ослабление процессов оксидативного стресса, что выразилось в снижении показателей ПОЛ у всех изучаемых видов птиц опытных групп (табл. 1): липиды, содержащие изолированные двойные связи (ИДС) снизились на 47,8 % у цыплят и на 38,4 % у перепелят, диеновые конъюгаты (ДК) на 32,6 и 19,2 %; триеновые конъюгаты (ТК) на 44,1 и 12,7 % ($p < 0,05$); оксодиеновые конъюгаты (ОДК) на 57,6 и 14,9 % ($p < 0,05$); основания Шиффа (ОШ) на 57,9 % ($p < 0,01$) и 13,6 %. Указанное стало следствием повышения антиокислительной активности (АОА) на 9,7 % ($p < 0,05$) у цыплят и на 28,5 % у перепелят.

Анализируя данные, представленные в таблице 1, следует, что организм всех изученных нами видов сельскохозяйственных птиц отзывчив к действию глутатиона, однако в разной степени. Так, снижение первичных продуктов липопероксидации было зафиксировано и у цыплят, и у перепелят примерно с одинаковой разницей относительно контроля. При оценке промежуточных и конечных продуктов оксидативного стресса установлено, что более восприимчивы к действию глутатиона были цыплята, при этом организм перепелят также противодействовал процессам липопероксидации по сравнению с контрольной группой. Однако антиокислительная активность относительно контроля была выше у перепелят.

Таблица 1

Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защитной системы (АОЗС), (n = 5)

Группы	Первичные продукты ПОЛ		Вторичные продукты ПОЛ		Конечные продукты ПОЛ	АОА, %
	ИДС, отн.ед/мл	ДК, отн.ед/мл	ТК, отн.ед/мл	ОДК, отн.ед/мл	ОШ, отн.ед/мл	
Цыплята						
Контрольная	9,2 ± 0,15	4,3 ± 0,11	3,4 ± 0,15	3,3 ± 0,19	1,4 ± 0,14	55,6 ± 1,57
Опытная 2,5 %	4,8 ± 0,08	2,9 ± 0,10	1,9 ± 0,08	1,4 ± 0,15	0,59 ± 0,02**	61,0 ± 1,30*
Перепелята						
Контрольная	6,34 ± 0,12	2,6 ± 0,11	1,73 ± 0,07	1,68 ± 0,06	0,59 ± 0,02	47,0 ± 1,30
Опытная 2,5 %	3,9 ± 0,10	2,1 ± 0,09*	1,51 ± 0,03*	1,43 ± 0,03*	0,51 ± 0,02	60,4 ± 0,93

Здесь и далее
* $p < 0,05$
** $p < 0,01$
*** $p < 0,001$

Зафиксированная интенсивность липопероксидации, очевидно, являлась у представителей опытных групп более позитивной, так как и у перепелят, и у цыплят было установлено увеличение эмбриональной жизнеспособности, что выразилось в увеличении вывода цыплят на 3,97 %, а выводимости яиц на 3,64 %, перепелят на 7,60 и 4,35 %, соответственно. Указанное было обусловлено сни-

жением большинства изученных отходов инкубации (табл. 2). Так количество «неоплодотворенных», за счет «ложнонеоплодотворенных», у цыплят уменьшилось на 8,8 % и у перепелов на 35,5 %, «кровяных колец» в 1,9 раз и в 1,5 раз, «замерших» на 17,4 % и на 17,8 %, «слабых» на 9,2 % и на 40 %, соответственно по сравнению с контролем.

По данным Бессарабова Б. Ф. (2015), 3—6 и 17—20 сутки являются наиболее опасными критическими периодами инкубации, так как в это время наблюдаются особенно высокие пики эмбриональной смертности, обусловленные резкими, масштабными физиологическими изменениями у эмбриона и совокупностью действия негативных факторов, сопряженных с несовершенством промышленной инкубации, являющихся высокоэнергозатратными для организма, а потому не всегда обеспеченными нужным количеством макроэргов на покрытие [8, 21]. Все это является фактором стресса экстремальной силы, инициирующий аномально высокую прогрессию свободнорадикальных процессов, как следствие липопероксидации, приводящих эмбрионов к ослаблению или к гибели. Однако, как видно из таблиц 1 и 2, благодаря антиоксидантным свойствам глутатиона, эмбрионы цыплят и перепелят опытных групп были более стрессоустойчивы в эти критические периоды, что выразилось в снижении большинства категорий отходов инкубации в соответствующие периоды и увеличении жизнеспособности полученного молодняка.

Исходя из полученных результатов следует, что глутатион оказал стимулирующее воздействие на эмбриогенез обсуждаемых видов сельскохозяйственной птицы, при этом в большей степени это выразилось у перепелов.

Таблица 2

Показатели биоконтроля инкубации цыплят и перепелят

Группа	Неоплод, в т. ч. ложный	Кровяные кольца	Замершие	задохлики	Слабые	Вывод молодняка	±Δ, %	Выводимость яиц	±Δ, %
цыплята, % (n = 252)									
Контрольная	9,13± 1,81	0,79± 0,56	9,13 ± 1,81	4,37 ± 1,29	4,37 ± 1,29	72,22± 2,82	—	79,48± 2,54	—
Опытная 2,5 %	8,33± 1,74	0,40± 0,40	7,54 ± 1,66	3,57 ± 1,17	3,97 ± 1,23	76,19 ± 2,68	+3,97	83,12± 2,36	+3,64
перепелята, % (n = 250)									
Контроль	12,4 ± 2,08	2,40± 0,97	7,60± 1,68	2,00± 0,89	±4,00 ± 1,24	71,60± 2,85	—	81,74± 2,44	—
Опытная 2,5 %	8,00 ± 1,72	1,60± 0,79	6,00± 1,50	2,80± 1,04	2,40± 0,97	79,20± 2,57	+7,60	86,09± 2,19	+4,35

±Δ — разница между контрольной и опытной группой

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансовариальное предынкубационное использование глутатиона в оптимальной концентрации способствовало снижению процессов липопероксидации в организме цыплят и перепелят. Указанное стало следствием снижения показателей перекисного окисления липидов на всех его стадиях, на фоне повышения антиокислительной активности. На начальном, промежуточном и конечных этапах оксидативного стресса более выраженный эффект был зафиксирован у цыплят, при меньшей разнице по совокупной антиоксидантной защите относительно перепелят. Указанные позитивные явления определили условия для снижения большинства изученных категорий отходов инкубации, а вместе с тем увеличение вывода цыплят и перепелов, с преимуществом численных значений у вторых. Исходя из представленного, коллектив авторов рекомендует предынкубационное трансовариальное использование 2,5 % раствора глутатиона для стимуляции эмбриогенеза, как кур, так и перепелов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Сурай П.* Природные антиоксиданты в эмбриогенезе кур и защита от стрессов в постнатальном развитии (обзор) / П. Сурай, В. И. Фисинин // Сельскохозяйственная биология. — 2013. — Т. 48. — № 2. — С. 3—18. — EDN OJNVCH.

2. *Азарнова Т. О.* Эффективность реализации антиоксидантного и обменостимулирующего действий глутатиона в промышленном перепеловодстве / Т. О. Азарнова, В. А. Попова, М. С. Найденский, И. С. Луговая, В. А. Комар // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 3(12). — С. 70—80. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.3.70

3. *Попова В. А.* Эффективность реализации некоторых механизмов адаптации при использовании глутатиона у цыплят-бройлеров / В. А. Попова, Т. О. Азарнова, И. С. Луговая, Е. А. Золотухина // Балтийский морской форум: Материалы IX Международного Балтийского морского форума. В 6-ти томах. XIX Международная научная конференция, Калининград, 04—09 октября 2021 года. Том 1. — Калининград: Калининградский государственный технический университет, 2022. — С. 220—226. — EDN MEDESV.

4. *Клетикова Л. В.* Метаболическая реакция организма птиц в ответ на применение современных биостимуляторов / Л. В. Клетикова, В. А. Пономарев, Н. Н. Якименко, А. А. Каминская // Вестник Омского государственного аграрного университета. — 2022. — № 2(46). — С. 107—114. — DOI 10.48136/2222—0364_2022_2_107

5. *Сидорова К. А.* Особенности морфофункционального состояния систем организма продуктивных птиц в условиях Северного Зауралья: монография / К. А. Сидорова, С. А. Веремеева, С. В. Козлова, Е. П. Краснолобова, Н. А. Черменина, А. С. Копылова, А. В. Балакшина. — Тюмень: ГАУ Северного Зауралья, 2022. — 178 с. — EDN HHYJJE.

6. *Индюхова Е. Н.* Моделирование паттерна адаптационных реакций у кур-несушек при действии биологического стресс-фактора / Е. Н. Индюхова, М. В. Арисов, В. И. Максимов, Т. О. Азарнова // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К. И. Скрябина. — 2022. — No 3(62). — С. 33—37. — EDN EWOMIF

7. *Азарнова Т. О.* Мембранопротекторные, обменостимулирующие и антиоксидантные свойства комплекса естественных метаболитов: серина, сукцината и коламина / Т. О. Азарнова, И. И. Кочиш, М. С. Найденский, С. Ю. Зайцев, И. С. Ярцева // Прикладная аналитическая химия. — 2012. — Т. 3, № 7. — С. 46—49. — EDN OYJDDV.

8. *Азарнова Т. О.* Научно-практические аспекты профилактики оксидативного стресса, как способа оптимизации условий инкубации и акселерации эмбрионов кур: дис. … доктора биол. наук. / Т. О. Азарнова; МГАВМиБ — М., 2013. — 309 с. — EDN SUNBYD.

9. Ufer C, Wang CC. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. Front Mol Neurosci. 2011 Jul 28;4:12. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00012

10. *Азарнова Т. О.* Особенности динамики липопероксидации у эмбрионов кур в условиях промышленной инкубации при трансовариальном использовании феруловой кислоты / Т. О. Азарнова, А. М. Резвых, И. И. Кочиш, И. С. Луговая // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. — 2024. — Т. 17, № 1. — С. 82—94. — EDN: MMPZTF

11. *Суханова Г. А.* Биохимия клетки / Г. А. Суханова, В. Ю. Серебров. — Томск: Чародей, 2000. — 184 с. — EDN VJEUBT.

12. *Порядин Г. В.* Стресс и патология: методическое пособие / Г. В. Порядин — М.: — Москва: РГМУ, 2009. — 23 с.

13. *Кырылив Б. Я.* Биологические и метаболические особенности различных видов сельскохозяйственной птицы / Б. Я. Кырылив, И. Б. Ратич, А. В. Гунчак, Е. И. Федорович // Научный вестник Львовского национального университета ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. С. Гжицкого. — 2015. — Т. 17, № 1—3(61). — С. 71—80. — EDN VLAAMF.

14. *Боголюбова Н. В.* Биохимический профиль организма кур разного направления продуктивности / Н. В. Боголюбова, Р. В. Некрасов, А. А. Зеленченкова, *Рыков Р. А.*, *Колесник Н. С.*, *Волкова Н. А.*, *Ветох А. Н.* // Ветеринария и кормление. — 2022. — № 6. — С. 11—15. — DOI 10.30917/ATT-VK-1814—9588—2022—6—3

15. *Найденский М. С.* Экологически безопасные методы повышения вывода кондиционных цыплят / М. С. Найденский, В. В. Нестеров, Н. Ю. Лазарева // Био. Ветеринарному специалисту. — 2007. — № 10. — С. 23—24. — EDN VDJMJF.

16. *Толпыгина О. А.* Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) / О. А. Толпыгина // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. — 2012. — № 2—2(84). — С. 178—180. — EDN PCQJAR.

17. Wangsanut T, *Pongpom M.* The Role of the Glutathione System in Stress Adaptation, Morphogenesis and Virulence of Pathogenic Fungi. Int J Mol Sci. 2022 Sep 13;23(18):10645. DOI:10.3390/ijms231810645

18. *Баймухаметова Э. А.* Глутатион и глутатион-S-трансферазы: важнейшие компоненты системы антиоксидантной защиты растений / Э. А. Баймухаметова, Р. М. Таипова, Б. Р. Кулуев // Биомика. — 2016. — Т. 8, № 4. — С. 311—322. — EDN XRYLFJ.

19. *Gardiner C. S.*, *Reed D. J.* (1995). Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. Arch. Biochem. Biophys. 318, 30—36 — doi: 10.1006/abbi.1995.1200

20. *Кондрахин И. П.* Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / И. П. Кондрахин, А. В. Архипов, В. И. Левченко и др. — М.: КолосС, 2004. — 519 с. — EDN QKWKND.

21. *Бессарабов Б. Ф.* Инкубация яиц сельскохозяйственной птицы / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Крыканов, А. Л. Киселев. — Санкт-Петербург: Лань, 2015. — 160 с. — EDN UPUGIF.

22. *Кочиш И. И.* Селекция в птицеводстве / И. И. Кочиш. — Москва: Издательство «Колос», 1992. — 271 с. — EDN SUEKMM.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

В. А. Попова — специалист отдела бактериологии, соискатель;

Т. О. Азарнова — доктор биологических наук, профессор кафедры химии имени проф. С. И. Афонского и А. Г. Малахова;

И. С. Луговая — кандидат биологических наук, начальник отдела «Аспирантура»;

Н. Г. Азарнова — студентка 3-го курса факультета биотехнологии и экологии.

Статья поступила в редакцию 20.03.2025.

Original article
UDC 636.5.082.474

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CORRECTIVE EFFECT OF GLUTATHIONE ON THE INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION IN DAY-OLD CHICKENS AND QUAIL CHICKS

Valeriya Aleksandrovna Popova[*]✉, Tatyana Olegovna Azarnova[**], Inessa Sergeevna Lugovaya[*], Nikol Grigoryevna Azarnova[**]

[*]All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russia, valer-ka99@mail.ru✉
[**]Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Skryabin, Moscow, Russia

Abstract. Stress is a key factor determining the decrease in viability, productivity and reproductive qualities of poultry. At the molecular level, this is manifested in the form of intensification of free radical reactions and, as a consequence, lipid peroxidation processes, which are most dangerous during the incubation period, when the embryo does not yet have formed antioxidant defense mechanisms. To prevent the stated negative phenomena, the team of authors of the article recommends transovarial pre-incubation use of the antioxidant glutathione, in the previously identified optimal concentration. The studies have found that the use of the studied tripeptide reduces the intensity of lipid peroxidation at all stages of the process, which was expressed in a decrease in all the studied indicators of lipid peroxidation, with an increase in the serum antioxidant activity both in chickens and quail chicks by 9.7 % ($p < 0.05$) and by 28.5 %, respectively. The implementation of the antioxidant properties of glutathione determined the conditions for increasing the livability of poultry of both species, due to the reduction of most of the studied categories of incubation waste, which led to an increase in the hatching of individuals and egg hatchability by 3.97 %, by 3.64 % (chickens) and by 7.60 %, by 4.35 % (quail chicks), respectively, compared to the control.

Keywords: glutathione, embryogenesis, quail chicks, chickens, oxidative stress, free radicals

Currently, poultry farming successfully competes with beef cattle breeding in terms of providing the population with food products [1]. This is due to a shorter reproduction cycle and high return on investment [1]. However, the intensification of the poultry industry, which determines increasingly tough keeping conditions in order to obtain more products at a lower cost, affects the physiological state of the poultry [2]. This leads to stress on all systems of its body and, in the absence of additional support with antioxidants in ontogenesis, weakens it, causing an increase in the susceptibility of the individual to the effects of stress factors [3, 4].

Stress accompanies all technological stages of production, but the most important and often associated with the effects of negative factors is the incubation period, when the poultry's body has not been formed yet, and the antioxidant systems have not yet completed their formation [5, 6]. It is known that, from the very beginning of its development, the embryo in the conditions of the production cycle is exposed to a large number of stress factors simultaneously, the combined effect of which cannot be training, and therefore determines negative changes in cells, organs and tissues associated with excessive accumulation of active forms of oxygen and progression of lipid peroxidation [6, 7]. The reason for this may be the insufficiency of antioxidants in the egg, as well as their rapid depletion in the case of prolonged exposure to stress factors or the presence of a wide range of their diversity [6]. It is important to note that periods of hypoxia, periodically accompanying the embryonic period of the poultry, are also associated with the progression of oxidative stress [8].

Depending on the strength of the effect of stressors, there are at least three adaptive reactions: the training reaction occurs in response to systematic weak effects, which leads to the body's resistance to irritants; the activation reaction is a response to medium-strength effects, characterized by an increase in the activity of

defense systems, increasing the body's endurance; the reaction to strong emergency effects is stress [9]. In case of a long-term or very strong effect of stressors, the adaptive capabilities of the body are reduced, the individual functions at the limit of its capabilities, uncompensated intensification of lipid peroxidation processes occurs, and the stage of exhaustion begins [10]. Excess free radical oxidation products, which have increased reactivity and cause modification of the structures of lipids, proteins and nucleic acids, lead to the initiation and progression of pathological processes in the body, determining metabolic disorders, and at the same time a decrease in growth, development, natural resistance, viability and reproductive capabilities of the individual [3].

The features of metabolic and physiological processes in the poultry's body depend on the species, stage of ontogenesis, age, economic direction, productivity level and individual characteristics [11]. At the same time, modern genotypes of poultry are very sensitive to stress of various etiologies and genesis [13]. This actualizes the study of metabolic processes in popular species of poultry. This allows to find the most effective ways to correct oxidative stress and optimize metabolic processes, which will improve the efficacy of industrial incubation, and at the same time increase the hatching of young poultry and hatchability of eggs, the quality of the individual.

To reduce the degree of negative effects of stressors and to prevent excessive intensification of free radical processes during the period under discussion, many scientists suggest using antioxidants before incubation, the use of which is economical, beneficial and safe [6, 13]. Glutathione, a tripeptide consisting of amino acid residues (glutamate, cysteine and glycine), which is synthesized in many plant, microbial and all animal cells [14], can be attributed to these. Its main function is the inactivation of free radical processes. It directly inhibits various oxidants, such as superoxide anion, hydroxyl radical, nitric oxide and carbon radicals, and it is also a cofactor of various antioxidant enzymes, including glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase [15]. The discussed antioxidant is also involved in the detoxification of absorbed heavy metals and products that are excreted from metabolism [14]. In addition, glutathione plays an important role in biosynthesis, protein folding and stabilization of its structure, and the transport of some amino acids into the cell [16].

It should be noted once again that the discussed tripeptide is the most common in eukaryotic cells, but under stress its pool is quickly depleted [17]. This makes it relevant to use it before incubation to study its effect on the intensity of lipid peroxidation in various species of poultry.

The research objective is the comparison of the effects of the optimal concentration of glutathione with a single transovarial pre-incubation administration on the intensity of lipid peroxidation in day-old chickens and quail chicks.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out in the conditions of Zagorsk Poultry Farm — a branch of the FSC of ARRIPS&T of the RAS and Shepilovskaya Poultry Farm, as well as at the Department of Chemistry named after professors S. I. Afonskiy, A. G. Malakhov of FSBEI HE MSAVM&B — MVA named after K. I. Skryabin. To carry out the experiment, the following eggs were taken in the batch: eggs of the Ross 308 cross hens (252 pieces each) and eggs of the Japanese quail (250 pieces each), observing the principle of analogs, namely the timing of laying and storage, weight. The eggs of the experimental and control batches were incubated under standard conditions in industrial incubators Stimul IP-16M and Stimul IV-16M (chickens), and incubator cabinets of the series Reserve RP 03—32 and RV 03—32 (quail chicks). The experimental groups were irrigated with an optimal glutathione solution, the concentration of which was determined in a series of previous experiments — 2.5 % [18, 19]. The control batches of eggs were not subjected to treatment.

To study markers of lipid peroxidation (lipids containing isolated double bonds (IDB), diene conjugates (DC), triene conjugates (TC), oxodiene conjugates (ODC) of the Schiff base (SB)), we used the blood serum of day-old chickens and quail chicks of the experimental and control groups. The declared indicators were determined by colorimetric methods using an SF-26 spectrophotometer (LOMO OJSC, Russia) [20]; the study of antioxidant activity (AOA) was carried out on the basis of recording the inhibition of O-dianisidine dihydrochloride oxidation by the hydroxyl radical, which is formed in the Fenton system of blood serum [20].

The study of incubation biocontrol indicators, as well as the calculation of chicken hatchability and egg hatchability were carried out based on the recommendations of Bessarabov B. F. (2015) [21].

The digital material obtained during the research work was subjected to statistical processing using the Student's criterion and the Microsoft Excel program [22]. The result was considered reliable at $p < 0.05$ ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

Pre-incubation treatment of eggs with an optimal concentration of glutathione determined the weakening of oxidative stress processes, which was expressed in a decrease in the LPO indicators in all studied poultry species of the experimental groups (Table 1): lipids containing IDB decreased by 47.8 % in chickens, and by 38.4 % — in quail chicks, DC — by 32.6 % and 19.2 %; TC — by 44.1 % and 12.7 % ($p < 0.05$); ODC — by 57.6 % and 14.9 % ($p < 0.05$); SB — by 57.9 % ($p < 0.01$) and 13.6 %. This was a consequence of an increase in AOA by 9.7 % ($p < 0.05$) in chickens and by 28.5 % — in quail chicks.

Analyzing the data presented in Table 1, it follows that the organism of all the studied species of poultry is responsive to the action of glutathione, but to varying degrees. Thus, a decrease in the primary products of lipid peroxidation was recorded in both chickens and quail chicks with approximately the same difference, relative to the control. When assessing the intermediate and final products of oxidative stress, it was found that chickens were more susceptible to the action of glutathione, while the organism of quail chicks also counteracted the processes of lipid peroxidation, compared to the control group. However, antioxidant activity was higher in quail chicks relative to the control.

Table 1

Indicators of lipid peroxidation (LPO) and antioxidant defense system (AODS), (n = 5)

Groups	Primary products of LPO		Secondary products of LPO		Final products LPO	AOA, %
	IDB, r.u./ml	DC, r.u./ml	TC, r.u./ml	ODC, r.u./ml	SB, r.u./ml	
Chickens						
Control	9.2 ± 0.15	4.3 ± 0.11	3.4 ± 0.15	3.3 ± 0.19	1.4 ± 0.14	55.6 ± 1.57
Experimental 2.5 %	4.8 ± 0.08	2.9 ± 0.10	1.9 ± 0.08	1.4 ± 0.15	0.59 ± 0.02**	61.0 ± 1.30*
Quail chicks						
Control	6.34 ± 0.12	2.6 ± 0.11	1.73 ± 0.07	1.68 ± 0.06	0.59 ± 0.02	47.0 ± 1.30
Experimental 2.5 %	3.9 ± 0.10	2.1 ± 0.09*	1.51 ± 0.03*	1.43 ± 0.03*	0.51 ± 0.02	60.4 ± 0.93

Hereinafter
* $p < 0.05$
** $p < 0.01$
*** $p < 0.001$

The recorded intensity of lipid peroxidation was obviously more positive in the experimental groups, since both quail chicks and chickens showed an increase in embryonic viability, which was expressed in an increase in the hatchability of chickens by 3.97 % and egg hatchability — by 3.64 %, quail chicks — by 7.60 % and 4.35 %, respectively. This was due to a decrease in most of the studied incubation waste (Table 2). Thus, the number of unfertilized due to false unfertilized in chickens decreased by 8.8 % and in quail chicks — by 35.5 %, blood rings — by 1.9 and 1.5 times, dead-in-shell — by 17.4 % and 17.8 %, weak — by 9.2 % and 40 %, respectively, compared to the control.

According to Bessarabov B. F. (2015), days 3—6 and 17—20 are the most dangerous critical periods of incubation, since during this time there are especially high peaks of embryonic mortality caused by sharp, large-scale physiological changes in the embryo and a combination of negative factors associated with the imperfection of industrial incubation, which are highly energy-consuming for the body, and therefore not always provided with the required amount of macroergs for coating [6, 21].

All this is a stress factor of extreme strength, initiating an abnormally high progression of free-radical processes, as a consequence of lipid peroxidation, leading to the weakening or death of embryos.

However, as can be seen from Tables 1 and 2, due to the antioxidant properties of glutathione, the embryos of chickens and quail chicks in the experimental groups were more stress-resistant during these critical periods, which was reflected in a decrease in most categories of incubation waste in the corresponding periods and an increase in the viability of the resulting young animals.

Based on the results obtained, it follows that glutathione had a stimulating effect on the embryogenesis of the discussed species of poultry, and this was expressed to a greater extent in quail chicks.

Table 2

Indicators of biocontrol of incubation of chickens and quail chicks

Group	Unfertilized, including false unfertilized	Blood rings	Dead-in-shell	Late dead	Weak	Hatching of young poultry	±Δ, %	Egg hatchability	±Δ, %
chickens, % (*n* = 252)									
Control	9.13± 1.81	0.79± 0.56	9.13 ± 1.81	4.37 ± 1.29	4.37 ± 1.29	72.22± 2.82	—	79.48± 2.54	—
Experimental 2.5 %	8.33± 1.74	0.40± 0.40	7.54 ± 1.66	3.57 ± 1.17	3.97 ± 1.23	76.19 ± 2.68	+3.97	83.12± 2.36	+3.64
quail chicks, % (*n* = 250)									
Control	12.4 ± 2.08	2.40± 0.97	7.60± 1.68	2.00± 0.89	±4.00 ± 1.24	71.60± 2.85	—	81.74± 2.44	—
Experimental 2.5 %	8.00 ± 1.72	1.60± 0.79	6.00± 1.50	2.80± 1.04	2.40± 0.97	79.20± 2.57	+7.60	86.09± 2.19	+4.35

±Δ — difference between experimental and control groups

CONCLUSION

Transovarial pre-incubation use of glutathione in optimal concentration contributed to the reduction of lipid peroxidation processes in the body of chickens and quail chicks. This was a consequence of the reduction of lipid peroxidation indices at all its stages, against the background of increased antioxidant activity. At the initial, intermediate and final stages of oxidative stress, a more pronounced effect was recorded in chickens, with a smaller difference in total antioxidant protection relative to quail chicks. These positive phenomena determined the conditions for reducing most of the studied categories of incubation waste, and at the same time increasing the hatchery of chickens and quail chicks, with the advantage of numerical values in the latter. Based on the presented, the team of authors recommends pre-incubation transovarial use of a 2.5 % glutathione solution to stimulate embryogenesis in both chickens and quail chicks.

REFERENCES

1. *Kletikova L. V.* Metabolic reaction of the poultry's organism in response to the use of modern biostimulants / L. V. Kletikova, V. A. Ponomarev, N. N. Yakimenko, A. A. Kaminskaya // Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Bulletin of Omsk State Agrarian University). — 2022. — No. 2 (46). — P. 107—114. — DOI 10.48136 / 2222—0364_2022_2_107

2. *Sidorova K. A.* Features of the morphofunctional state of the body systems of productive poultry in the conditions of the Northern Trans-Urals: monograph / K. A. Sidorova, S. A. Veremeeva, S. V. Kozlova, E. P. Krasnolobova, N. A. Cheremenina, A. S. Kopylova, A. V. Balakshina. — Tyumen: GAU Severnogo Zauralya, 2022. — 178 p. — EDN HHYJJE.

3. *Suray P.* Natural antioxidants in chicken embryogenesis and protection against stress in postnatal development (review) / P. Suray, V. I. Fisinin // Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology). — 2013. — Vol. 48. — No. 2. — P. 3—18. — EDN OJNVCH.

4. *Indyukhova E. N.* Modeling the pattern of adaptive responses in laying hens under the effect of a biological stress factor / E. N. Indyukhova, M. V. Arisov, V. I. Maksimov, T. O. Azarnova // Vestnik Kyrgyzskogo natsionalnogo agrarnogo universiteta im. K. I. Skryabina. (Bulletin of Kyrgyz National Agrarian University named after K. I. Skryabin). — 2022. — No. 3(62). — P. 33—37. — EDN EWOMIF

5. *Azarnova T. O.* Membrane-protective, exchange-stimulating and antioxidant properties of a complex of natural metabolites: serine, succinate and calamine / T. O. Azarnova, I. I. Kochish, M. S. Naydenskiy, S. Yu. Zaytsev, I. S. Yartseva // Prikladnaya analiticheskaya khimiya (Applied Analytical Chemistry). — 2012. — Vol. 3, No. 7. — P. 46—49. — EDN OYJDDV.

6. *Azarnova T. O.* Scientific and practical aspects of oxidative stress prevention as a way to optimize incubation conditions and acceleration of chicken embryos: thesis … Doctor of Biological Sciences. / T. O. Azarnova; Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — Moscow, 2013. — 309 p. — EDN SUNBYD.

7. *Ufer C, Wang CC.* The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. Front Mol Neurosci. 2011 Jul 28;4:12. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00012

8. *Azarnova T. O.* Features of the dynamics of lipid peroxidation in chicken embryos under industrial incubation conditions with transovarial use of ferulic acid / T. O. Azarnova, A. M. Rezvykh, I. I. Kochish, I. S. Lugovaya // Zhurnal Sibirskogo federalnogo universiteta. Seriya: Biologiya (Journal of Siberian Federal University. Series: Biology). — 2024. — Vol. 17, No. 1. — P. 82—94. — EDN: MMPZTF

9. *Sukhanova G. A.* Biochemistry of the cell / G. A. Sukhanova, V. Yu. Serebrov. — Tomsk: Charodey, 2000. — 184 p. — EDN VJEUBT.

10. *Poryadin G. V.* Stress and pathology: a methodological manual / G. V. Poryadin — M.: — Moscow: RGMU (RSMU), 2009. — 23 p.

11. *Kyryliv B. Ya.* Biological and metabolic characteristics of various species of poultry / B. Ya. Kyryliv, I. B. Ratich, A. V. Gunchak, E. I. Fedorovich // Nauchnyy vestnik Lvovskogo natsionalnogo universiteta veterinarnoy meditsiny i biotekhnologiy imeni S. S. Gzhitskogo (Scientific Bulletin of Lvov National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named after S. S. Gzhitskiy). — 2015. — Vol. 17, No. 1—3(61). — P. 71—80. — EDN VLAAMF.

12. *Bogolyubova N. V.* Biochemical profile of the body of chickens of different productivity directions / N. V. Bogolyubova, R. V. Nekrasov, A. A. Zelenchenkova, *Rykov R. A.*, *Kolesnik N. S.*, *Volkova N. A.*, *Vetokh A. N.* // Veterinariya i kormlenie (Veterinary science and feeding). — 2022. — No. 6. — P. 11—15. — DOI 10.30917 / ATT-VK-1814—9588—2022—6—3

13. *Naydenskiy M. S.* Environmentally friendly methods for increasing the hatchery of conditioned chickens / M. S. Naydenskiy, V. V. Nesterov, N. Yu. Lazareva // Bio. Veterinarnomu spetsialistu (Bio. For a veterinary specialist). — 2007. — No. 10. — P. 23—24. — EDN VDJMJF.

14. *Tolpygina O. A.* Role of glutathione in the antioxidant defense system (review) / O. A. Tolpygina // Byulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk (Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences). — 2012. — No. 2—2 (84). — P. 178—180. — EDN PCQJAR.

15. *Wangsanut T, Pongpom M.* The Role of the Glutathione System in Stress Adaptation, Morphogenesis and Virulence of Pathogenic Fungi. Int J Mol Sci. 2022 Sep 13;23(18):10645. DOI:10.3390/ijms231810645

16. *Baymukhametova E. A.* Glutathione and glutathione-S-transferases: the most important components of the antioxidant defense system of plants / E. A. Baymukhametova, R. M. Taipova, B. R. Kuluev // Biomika. — 2016. — Vol. 8, No. 4. — P. 311—322. — EDN XRYLFJ.

17. *Gardiner C. S., Reed D. J.* (1995). Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. Arch. Biochem. Biophys. 318, 30—36 — doi: 10.1006/abbi.1995.1200

18. *Azarnova T. O.* Effectiveness of the antioxidant and metabolic-stimulating effects of glutathione in industrial scale quail farming / T. O. Azarnova, V. A. Popova, M. S. Naydenskiy, I. S. Lugovaya, V. A. Komar // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2020. — No. 3 (12). — P. 70—80. — DOI 10.17238 / issn2541—8203.2020.3.70

19. *Popova V. A.* Efficacy of the implementation of some adaptation mechanisms when using glutathione in broiler chickens / V. A. Popova, T. O. Azarnova, I. S. Lugovaya, E. A. Zolotukhina // Baltic Maritime Forum: Proceedings of the IX International Baltic Maritime Forum. In 6 volumes. XIX International Scientific Conference, Kaliningrad, October 4—9, 2021. Volume 1. — Kaliningrad: Kaliningrad State Technical University, 2022. — P. 220—226. — EDN MEDESV.

20. *Kondrakhin I. P.* Methods of Veterinary Clinical Laboratory Diagnostics: Handbook / I. P. Kondrakhin, A. V. Arkhipov, V. I. Levchenko, et al. — Moscow: KolosS, 2004. — 519 p. — EDN QKWKND.

21. *Bessarabov B. F.* Incubation of Poultry Eggs / B. F. Bessarabov, A. A. Krykanov, A. L. Kiselev. — St. Petersburg: Lan, 2015. — 160 p. — EDN UPUGIF.

22. *Kochish I. I.* Selection in poultry farming / I. I. Kochish. — Moscow: Kolos Publishing House, 1992. — 271 p. — EDN SUEKMM.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

V. A. Popova — Specialist of the Bacteriology Department;

T. O. Azarnova — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Chemistry named after Prof. S. I. Afonskiy and A. G. Malakhov;

I. S. Lugovaya — Candidate of Biological Sciences, Head of the Postgraduate Studies Department;

N. G. Azarnova — 3rd year Student of the Faculty of Biotechnology and Ecology.

The article was submitted 12.02.2025.

Научная статья
УДК 619:616—076:636.3

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ У БАРАНОВ В РАЗЛИЧНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА

Андрей Григорьевич Ульянов[*]✉, Вячеслав Иванович Котарев[**], Игнатий Андреевич Ульянов[***], Петр Макарович Торгун[*]

[*]*Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия, agu16@mail.ru*✉
[**]*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия*
[***]*Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко, Воронеж, Россия*

Аннотация. Шерстная продуктивность овец в большей степени определяется строением кожи, структурой волосяных фолликулов расположенной в ней. В коже баранов выявлены три типа волосяных фолликулов: первичные, вторичные и зачаточные фолликулы. Отличительной особенностью первичных фолликулов является наличие мышцы-поднимающей волос, двух сальных желез и протока потовой железы. Вторичные фолликулы встречаются в большем количестве, не содержат мышцы поднимающей волос, отсутствуют протоки потовых желез. Зачаточные фолликулы характеризуются скоплением мелких эпителиальных клеток, которые окружены тонкими прослойками коллагеновых волокон. В зимний период выявлено увеличение численности вторичных фолликулов по сравнению с летним периодом, при этом количество зачаточных фолликулов зимой уменьшается. Отношение количества вторичных фолликулов к первичным варьирует от 6,2 до 6,7 и этот показатель не претерпевает статистически значимых сезонных изменений.
Ключевые слова: бараны, морфология кожи, волосяные фолликулы первичные, вторичные, зачаточные, сезонные изменения, диаметр фолликулов

Несмотря на обширную научную информацию [1, 3, 6, 8, 10], посвященную морфологии кожи и шерстного покрова у различных видов животных, многие вопросы структурной организации компонентов кожи остаются недостаточно изученными. В литературе [2, 4, 6, 7], отсутствуют сведения о морфологических особенностях волосяных фолликулах кожи у домашних млекопитающих. Недостаточно изученными [1, 9, 12] являются вопросы, связанные с эмбриональным развитием волосяных фолликулов. Многие исследователи считают [2, 11], что закладка всех фолликулов происходит в эмбриональной периоде развития животных, однако признают существование зачаточных фолликулов, которые превращаются в дифференцированные фолликулы уже после рождения на протяжении первых двух лет жизни. В литературе отсутствуют сведения, касающиеся новообразования фолликулов в постнатальном периоде развития животных.

Целью настоящего сообщения является изучение тонкой структуры волосяных фолликулов у баранов русской длинношерстной породы в различные сезоны года. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить нижеследующие задачи: определить типы волосяных фолликулов в коже баранов русской длинношерстной породы; изучить гистологические особенности строения фолликулов и определить их морфометрические показатели; выяснить изменения морфофункциональных показателей волосяных фолликулов в различные сезоны года.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Собран материал от 21 барана русской длинношерстной породы в различные сезоны года (лето- 6 баранов; осень- 9 баранов и зима — 6 баранов). Были использованы половозрелые бараны в возрасте 2—3 года. Фрагменты кожи из области бока фиксировали в жидкостях Штиве, Буэна и Ценкера. Материал заливали в парафин. Тонкие парафиновые срезы окрашивали гематоксилин — эозином, азаном по Гейденгайну.

При увеличении 300 (об.20, ок.15) в поле зрения светового микроскопа производили подсчет первичных, вторичных и зачаточных фолликулов (50 полей зрения для каждого животного). С помощью винтового окуляр-микрометра определяли диаметр первичных, вторичных и зачаточных фолликулов (50 измерений для каждого животного). Результаты измерений диаметра волосяных фолликулов и количества фолликулов в коже баранов, исследованных в различные сезоны года, не имели нормального распределения и не были выявлено равенство дисперсий в сравниваемых группах. Эти данные обрабатывались с применением непараметрического Т-критерия Уайта. При сравнении морфофункциональных показателей волосяных фолликулов в различные сезоны года при уровне значимости $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В коже баранов русской длинношерстной породы выявлены первичные, вторичные и зачаточные фолликулы. Первичные фолликулы отличались максимальным диаметром по сравнению с другими волосяными фолликулами (табл. 1). Отличительной особенностью первичных фолликулов является наличие мышцы-поднимающей волос, двух сальных желез и протока потовой железы (рис. 1, 2).

Первичные волосяные фолликулы встречаются в небольшом количестве и численность этих фолликулов практически не изменяется в различные сезоны года. Средний диаметр первичных фолликулов (табл. 2) составляет 156—160 мкм и статистически значимо ($p < 0,05$) больше среднего диаметра зрелых вторичных фолликулов и более чем в три раза превышает диаметр молодых вторичных и зачаточных фолликулов.

Вторичные фолликулы встречаются в большем количестве, не содержат мышцы поднимающей волос, отсутствуют протоки потовых желез (рис. 3, 4). В зимний период выявлено увеличение численности вторичных фолликулов на 9,1 % по сравнению с летним периодом (различия статистически значимы $p < 0,05$). Некоторые вторичные фолликулы в отличие от первичных фолликулов имеют небольшую одну сальную железу. Отношение количества вторичных фолликулов к первичным в различные сезоны года варьирует от 6,2 до 6,7 и этот показатель не претерпевает статистически значимых изменений (табл. 1).

Таблица 1

Сезонные изменения количества фолликулов (на 1 мм² кожи) у баранов русской длинношерстной породы

Сезон года	Первичные фолликулы	Вторичные фолликулы	Отношение вторичных фолликулов к первичным ВФ/ПФ	Зачаточные фолликулы
Лето	7,5 ± 0,04	46,9 ± 0,63	6,2	7,3 ± 0,03
Осень	7,4 ± 0,03	49,5 ± 0,62*	6,6	4,6 ± 0,04*
Зима	7,6 ± 0,04	51,2 ± 0,65*	6,7	3,5 ± 0,05*

* $P < 0,05$ (непараметрический Т-критерий Уайта). Относительно летнего периода.

Таблица 2

Сезонные изменения диаметра волосяных фолликулов у баранов русской длинношерстной породы, мкм

Сезон года	Первичные фолликулы	Вторичные фолликулы	Зачаточные фолликулы
Лето	156,4 ± 3,25	102,6 ± 3,26*	42,4 ± 0,73*
Осень	159,8 ± 4,27	108,4 ± 2,81*	43,5 ± 0,85*
Зима	160,2 ± 3,31	113,4 ± 3,29*	42,8 ± 0,69*

* $P < 0,05$ (непараметрический Т-критерий Уайта). Вторичные фолликулы относительно первичных и зачаточные фолликулы относительно вторичных фолликулов.

В летний период диаметр вторичных фолликулов статистически значимо ($P < 0,05$) меньше диаметра первичных фолликулов на 53,8 мкм или 52,3 % (табл. 2). Диаметр вторичных фолликулов на 60,2 мкм или 142,0 % превышает диаметр зачаточных фолликулов ($P < 0,05$).

Аналогичные результаты выявлены в другие сезоны года. В осенний период (табл. 2) диаметр вторичных фолликулов меньше диаметра первичных фолликулов на 51,4 мкм или 47,4 % ($P < 0,05$). Диаметр вторичных фолликулов на 64,9 мкм или 149,2 % превышает диаметр зачаточных фолликулов ($P < 0,05$).

В зимний период диаметр вторичных фолликулов статистически ($P < 0,05$) меньше диаметра первичных фолликулов на 46,8 мкм или 41,3 % (табл. 2). Диаметр вторичных фолликулов на 70,6 мкм или 165,0 % превышает диаметр зачаточных фолликулов ($P < 0,05$).

Зачаточные фолликулы (рис. 3, 4) имеют наименьший диаметр (табл. 2). Они характеризуются скоплением малодифференцированных эпителиальных клеток, которые окружены тонкими прослойками коллагеновых волокон. Между волокнами располагаются фибробласты. Диаметр зачаточных и незрелых вторичных фолликулов практически не изменяется в различные сезоны года.

Ранее нами были отмечены процессы формирования новых волосяных фолликулов в постнатальном онтогенезе [9]. В этом сообщении мы подтверждаем многочисленные наблюдения образования молодых волосяных фолликулов путем почкования в постнатальном онтогенезе. На (рис. 5) отчетливо видно одновременное образование двух молодых фолликулов вокруг вторичного малодифференцированного фолликула.

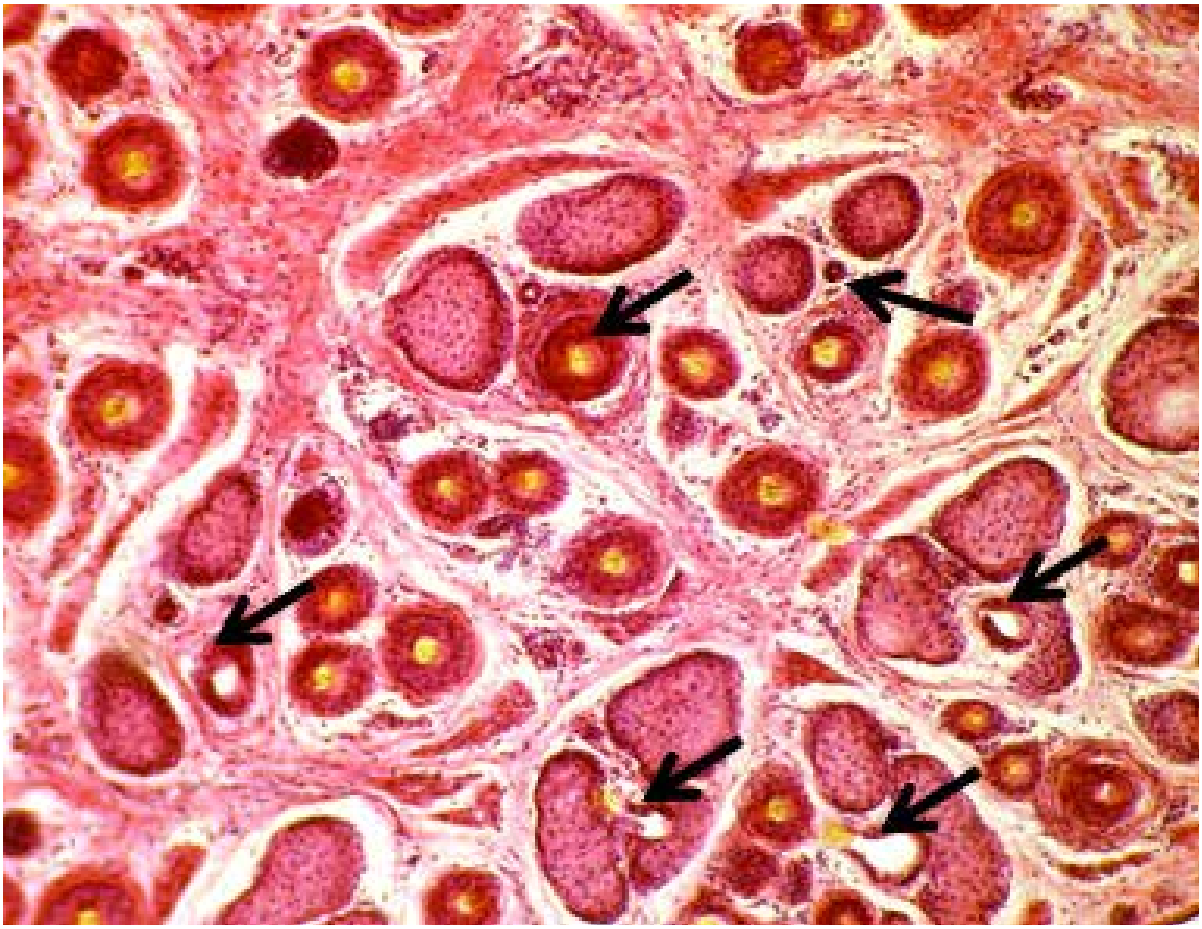


Рис. 1. Горизонтальный срез кожи барана. Видны первичные фолликулы (черные стрелки), состоящие из двух сальных желез, протока потовой железы, мышцы, поднимающей волос, и поперечно разрезанный волос. Остальные фолликулы — вторичные. Фиксация: жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозин. Ув. об. 10, ок. 16

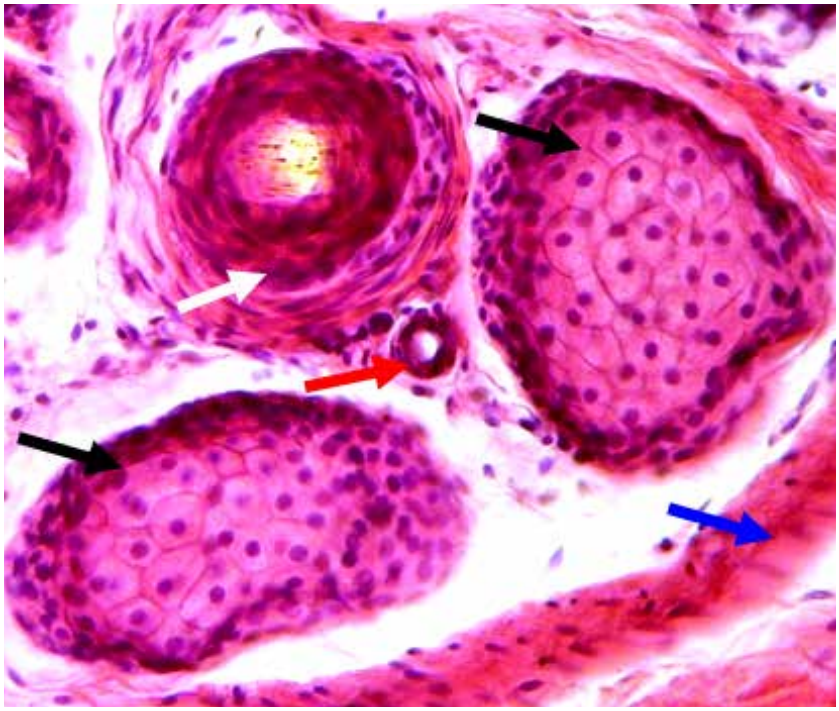


Рис. 2. Первичный фолликул при большом увеличении. Внизу мышца, поднимающая волос (голубая стрелка); выше расположены две сальные железы (черные стрелки), между которыми располагается проток потовой железы (оранжевая стрелка); вверху поперечный разрез волоса (белая стрелка). Фиксация: жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозин. Ув. об. 40, ок. 16

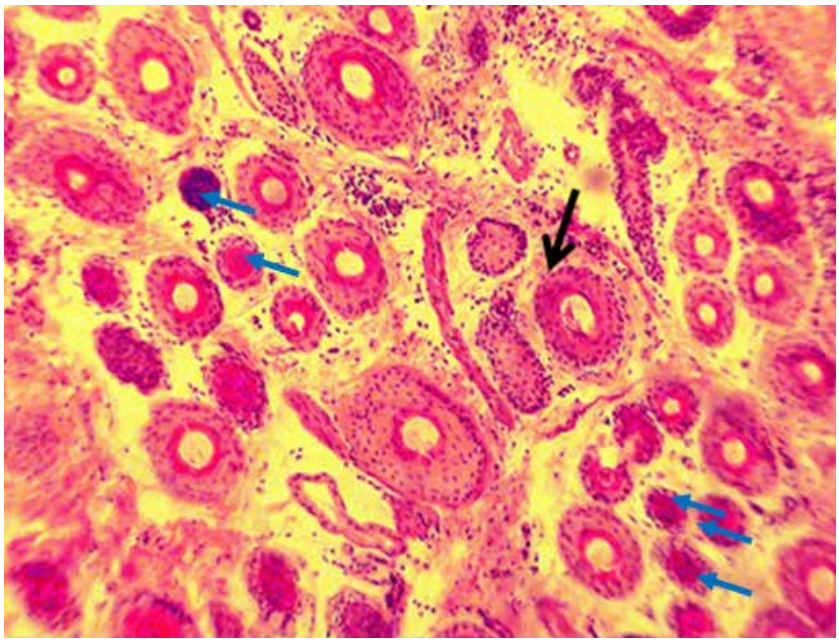


Рис. 3. Горизонтальный срез кожи барана. Черной стрелкой обозначен единственный в поле зрения первичный фолликул, включающий две сальные железы, проток потовой железы и мышца — подниматель волоса. Остальные вторичные фолликулы, между которыми встречаются группы зачаточных фолликулов (голубые стрелки). Фиксация: жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозин. Ув. об. 20, ок. 16

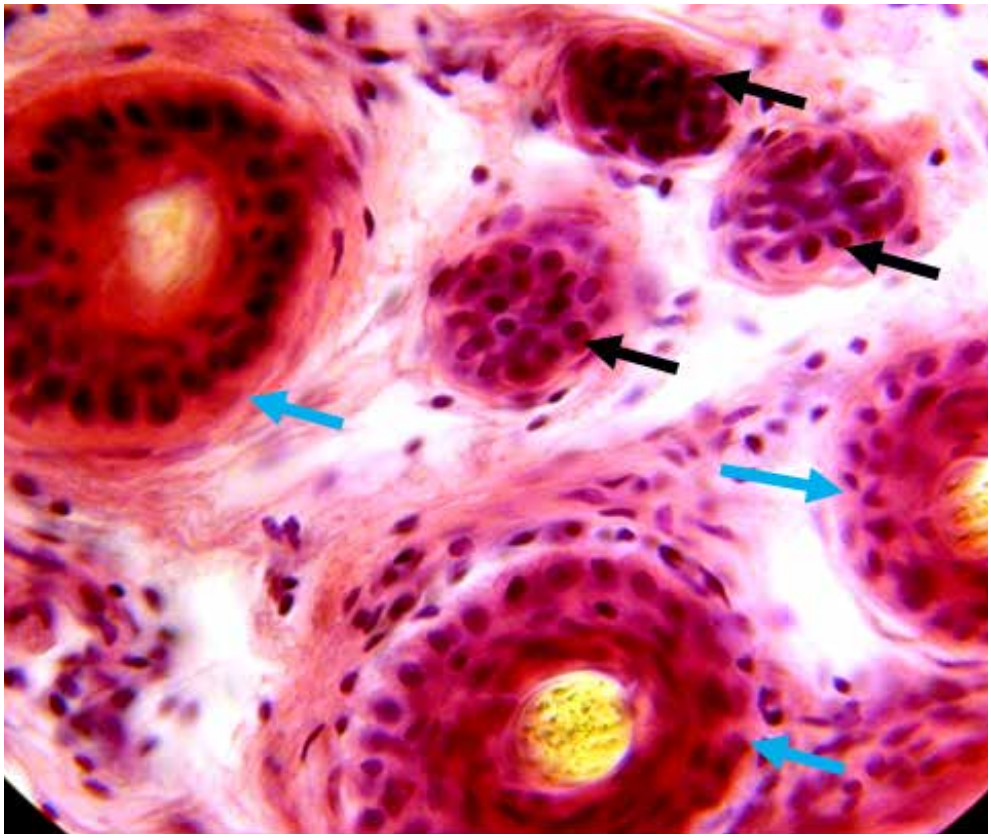


Рис. 4. Вверху справа три зачаточных фолликула (черные стрелки). Остальные зрелые вторичные фолликулы (голубые стрелки). Фиксация: жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозин. Ув. об 40, ок. 16

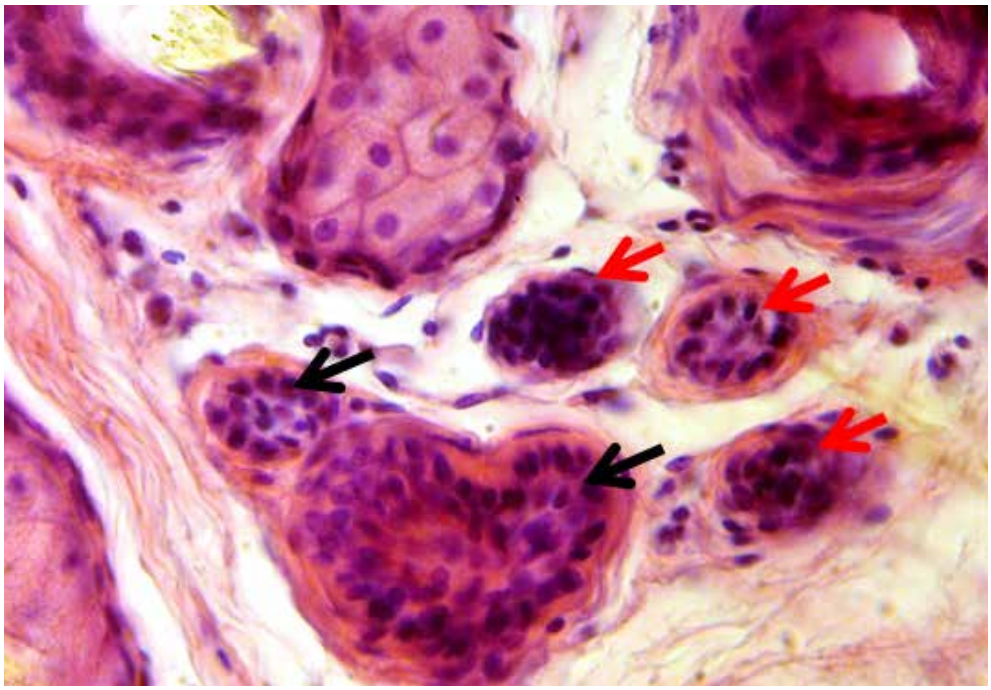


Рис. 5. Черными стрелками показаны молодые формирующиеся фолликулы путем почкования зачаточных фолликулов. Оранжевыми стрелками обозначены дифференцирующиеся зачаточные фолликулы. Фиксация: жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозин. Ув. об 40, ок. 16

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В коже баранов русской длинношерстной породы выявлено три типа волосяных фолликулов: первичные, вторичные и зачаточные.

2. Первичные фолликулы отличались максимальным диаметром, наличием мышцы-поднимающей волос, двух сальных желез и протока потовой железы.

3. Вторичные фолликулы встречаются в большем количестве, не содержат мышцы поднимающей волос, отсутствуют протоки потовых желез.

4. Зачаточные фолликулы имеют наименьший диаметр. Они характеризуются скоплением малодифференцированных эпителиальных клеток, которые окружены тонкими прослойками коллагеновых волокон.

5. В зимний период выявлено увеличение численности вторичных фолликулов по сравнению с летним периодом, при этом количество зачаточных фолликулов зимой уменьшается.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ:

1. *Гогаев О. К.* Закономерности формирования кожи и шерстного покрова кроссбредных овец в условиях центрального предкавказья / О. К. Гогаев, Х. Е. Кесаев, А. Р. Демурова, Ж. А. Гогаева // Известия горского государственного аграрного университета. — 2012. т. 49, № 3. — С. 100—114.

2. *Дмитрик И. И.* Взаимосвязь гистоструктуры кожи и шерстной продуктивности с комплексной оценкой рун мериносовых овец: Автореф. дисс. …кан. с.-х. наук / И. И. Дмитрик. ВНИИОК Ставрополь, 1998. — 23 с.

3. *Корниенко П. П.* Наследование гистологических структур кожи у кроссбредных овец / П. П. Корниенко, Т. В. Кокорева, А. А. Рабочий // Современные достижения науки и практики в области селекции овец и коз. — Ставрополь, 1991. ч. 1 — С. 93—99.

4. *Кумиров С. Г.* Сравнительная морфофункциональная характеристика кожного покрова пушных зверей клеточного содержания … дис. канд. биол. наук / С. Г. Кумиров. МГАВМиБ им. К. И. Скрябина — М., 2017. — 120 с.

5. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф Лакин. — М.: Высшая школа, 1980. — 291 с.

6. *Подлесных Е. А.* Морфологическое обоснование типологической принадлежности волос собачьи: … дис. канд. биол. наук / Е. А. Подлесных. МГАВМиБ им. К. И. Скрябина — М., 2018. — 108с.

7. *Соколов В. Е.* Кожный покров млекопитающих / В. Е. Соколов. — М.: Наука, 1973. — 487 с.

8. *Слесаренко Н. А.* Морфофункциональные преобразования общего покрова соболя клеточного содержания в условиях стимулирования ростовых процессов / Н. А. Слесаренко, В. В. Степанишин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2015. — № 224. — С. 203—209.

9. *Тапильский И. А.* Формирование волосяных фолликулов в постнатальном онтогенезе у овец / И. А. Тапильский, П. М. Торгун, А. Г. Ульянов // Овцы, козы, шерстяное дело. — 1996. — № 1. — С. 32—33.

10. The Molecular and structural biology of hair / edited by Kurt Stenn, A. G. Messenger, *Howard P.* Baden, New York, 1991. — 520 p.

11. *Tridico S. R.* Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls / S. R. Tridico, M. M. Houck, K. P. Kirkbride et al. // Forensic Sci Int. — 2014. — V. 238. — P. 101—107.

12. *Manheim J.* Differentiation of human, animal and synthetic hair by ATR FTIR Spectroscopy / J. Manheim // ApplSpectrosc. — 2016. — V. 70(7). — P. 1109—1117.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. Г. Ульянов — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры частной зоотехнии;

В. И. Котарев — доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник лаборатории гематологии и биохимии отдела клинико-лабораторных исследований;

И. А. Ульянов — аспирант 1-го курса;

П. М. Торгун — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры акушерства, анатомии и хирургии.

Статья поступила в редакцию 07.04.2025.

Original article
UDC 619:616—076:636.3

HISTOLOGICAL STUDIES OF WOOL FOLLICLES IN RAMS IN DIFFERENT SEASONS OF THE YEAR

Andrey Grigoryevich Ulyanov[*]✉, Vyacheslav Ivanovich Kotarev[**], Ignatiy Andreevich Ulyanov[***], Petr Makarovich Torgun[*]

[*]Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia, agu16@mail.ru✉
[**]All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia
[***]Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko, Voronezh, Russia

Abstract. Wool productivity of sheep is largely determined by the structure of the skin, the structure of the wool follicles located in it. Three types of wool follicles were found in the skin of rams: primary, secondary and rudimentary follicles. A distinctive feature of the primary follicles is the presence of a muscle that raises the wool, two sebaceous glands and a sweat gland duct. Secondary follicles are found in greater numbers, do not contain a muscle that raises the wool, and there are no sweat gland ducts. Rudimentary follicles are characterized by an accumulation of small epithelial cells that are surrounded by thin layers of collagen fibers. In the winter period, an increase in the number of secondary follicles has been found, compared to the summer period, while the number of rudimentary follicles decreases in winter. The ratio of secondary to primary follicles varies from 6.2 to 6.7 and this indicator does not undergo statistically significant seasonal changes.
Keywords: rams; skin morphology; primary, secondary, rudimentary wool follicles; seasonal changes; follicle diameter.

Despite the extensive scientific information [1, 3, 6, 8, 10] devoted to the morphology of the skin and fur in various animal species, many issues of the structural organization of skin components remain insufficiently studied. In the literature [2, 4, 6, 7], there is no information on the morphological features of wool follicles of the skin in domestic mammals. Insufficiently studied [1, 9, 12] are issues related to the embryonic development of wool follicles. Many researchers believe [2, 11] that the formation of all follicles occurs in the embryonic period of animal development, but recognize the existence of rudimentary follicles that turn into differentiated follicles after birth during the first two years of life. There is no information in the literature regarding the neoplasm of follicles in the postnatal period of animal development.

The objective of this report is to study the fine structure of wool follicles in Russian Longwool rams in different seasons of the year. To achieve this goal, it was necessary to solve the following problems: to determine the types of wool follicles in the skin of Russian Longwool rams; to study the histological features of the structure of follicles and determine their morphometric indicators; to find out the changes in the morphofunctional indicators of wool follicles in different seasons of the year.

MATERIAL AND METHODS

The material was collected from 21 Russian Longwool rams in different seasons of the year (summer — 6 rams, autumn — 9 rams and winter — 6 rams). Sexually mature rams aged 2—3 years were used. Skin fragments from the flank area were fixed in Steve's, Buen's and Zenker's solutions. The material was embedded in paraffin. Thin paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin, with azan according to Heidenhain.

At a magnification of 300 (ob. mag. 20, approx. 15) in the field of view of a light microscope, primary, secondary and rudimentary follicles were counted (50 fields of view for each animal). Using a screw eyepiece micrometer, the diameter of the primary, secondary and rudimentary follicles was determined (50 measurements for each animal). The results of measurements of wool follicle diameter and the number of follicles in the skin of rams examined in different seasons of the year did not have a normal distribution and equality of dispersions in the compared groups. These

data were processed using the White's non-parametric T-test. When comparing the morphofunctional indicators of wool follicles in different seasons of the year at a significance level of $p < 0.05$, the differences were considered statistically significant [5].

STUDY RESULTS

Primary, secondary and rudimentary follicles were found in the skin of Russian Longwool rams. Primary follicles had the largest diameter, compared to other wool follicles (Table 1). A distinctive feature of primary follicles is the presence of a muscle that raises the wool, two sebaceous glands and a sweat gland duct (Fig. 1, 2).

Primary wool follicles are found in small quantities and the number of these follicles practically does not change in different seasons of the year. The average diameter of primary follicles (Table 2) is 156—160 μm and is statistically significantly ($p < 0.05$) larger than the average diameter of mature secondary follicles and more than three times larger than the diameter of young secondary and rudimentary follicles.

Table 1

Seasonal changes in the number of follicles (per 1 mm² of skin) in Russian Longwool rams

Season of the year	Primary follicles	Secondary follicles	Secondary follicle to primary follicle ratio SF/PF	Rudimentary follicles
Summer	7.5 ± 0.04	46.9 ± 0.63	6.2	7.3 ± 0.03
Autumn	7.4 ± 0.03	49.5 ± 0.62*	6.6	4.6 ± 0.04*
Winter	7.6 ± 0.04	51.2 ± 0.65*	6.7	3.5 ± 0.05*

* $P < 0.05$ (White's non-parametric T-test). Relative to the summer period.

Secondary follicles are more numerous, do not contain the muscle that raises the wool, and have no sweat gland ducts (Fig. 3, 4). In winter, an increase in the number of secondary follicles by 9.1 % was found, compared to the summer period (the differences are statistically significant at $p < 0.05$). Some secondary follicles, unlike primary follicles, have a small sebaceous gland.

The ratio of the number of secondary follicles to primary follicles in different seasons of the year varies from 6.2 to 6.7, and this indicator does not undergo statistically significant changes (Table 1).

Table 2

Seasonal changes in the diameter of wool follicles in Russian Longwool rams, μm

Season of the year	Primary follicles	Secondary follicles	Rudimentary follicles
Summer	156.4 ± 3.25	102.6 ± 3.26*	42.4 ± 0.73*
Autumn	159.8 ± 4.27	108.4 ± 2.81*	43.5 ± 0.85*
Winter	160.2 ± 3.31	113.4 ± 3.29*	42.8 ± 0.69*

* $P < 0.05$ (White's non-parametric T-test). Secondary follicles relative to primary follicles and rudimentary follicles. Relative to secondary follicles.

In summer, the diameter of secondary follicles is statistically significantly ($P < 0.05$) smaller than the diameter of primary follicles by 53.8 μm or 52.3 % (Table 2). The diameter of secondary follicles is by 60.2 μm or 142.0 % larger than the diameter of rudimentary follicles ($P < 0.05$).

Similar results were found in other seasons of the year. In autumn (Table 2), the diameter of secondary follicles is by 51.4 μm or 47.4 % ($P < 0.05$) smaller than the diameter of primary follicles. The diameter of secondary follicles is by 64.9 μm or 149.2 % larger than the diameter of rudimentary follicles ($P < 0.05$).

In winter, the diameter of secondary follicles is statistically ($P < 0.05$) by 46.8 μm or 41.3 % smaller than the diameter of primary follicles (Table 2). The diameter of secondary follicles is by 70.6 μm or 165.0 % larger than the diameter of rudimentary follicles ($P < 0.05$).

Rudimentary follicles (Fig. 3, 4) have the smallest diameter (Table 2). They are characterized by an accumulation of poorly differentiated epithelial cells surrounded by thin layers of collagen fibers. Fibroblasts are located between the fibers. The diameter of rudimentary and immature secondary follicles remains virtually unchanged throughout the seasons.

We have previously noted the processes of formation of new wool follicles in postnatal ontogenesis [9]. In this report, we confirm numerous observations of the formation of young wool follicles by forming in postnatal ontogenesis. In Fig. 5 the simultaneous formation of two young follicles around a secondary poorly differentiated follicle is clearly visible.

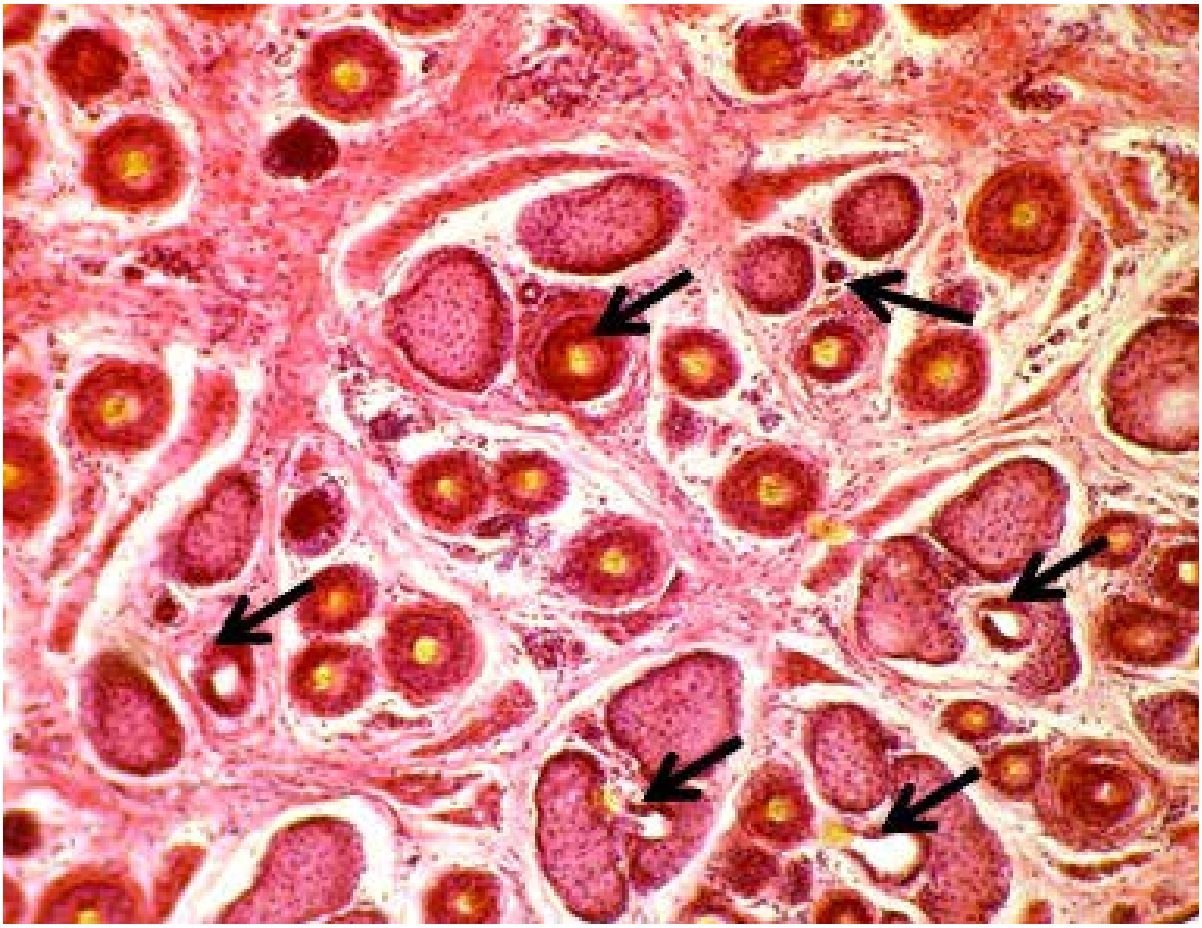


Fig. 1. Horizontal section of ram skin. Primary follicles (black arrows) are visible, consisting of two sebaceous glands, a sweat gland duct, a muscle that raises the wool and a transversely cut wool. The remaining follicles are secondary. Fixation: Steve's solution, hematoxylin and eosin staining. Ob. mag. 10, approx. 16

CONCLUSION

1. Three types of wool follicles were found in the skin of Russian Longwool rams: primary, secondary and rudimentary.

2. Primary follicles were distinguished by their maximum diameter, the presence of a wool-raising muscle, two sebaceous glands and a sweat gland duct.

3. Secondary follicles are found in greater numbers, do not contain a wool-raising muscle and have no sweat gland ducts.

4. Rudimentary follicles have the smallest diameter. They are characterized by an accumulation of poorly differentiated epithelial cells surrounded by thin layers of collagen fibers.

5. In the winter period, an increase in the number of secondary follicles has been found, compared to the summer period, while the number of rudimentary follicles decreases in winter.

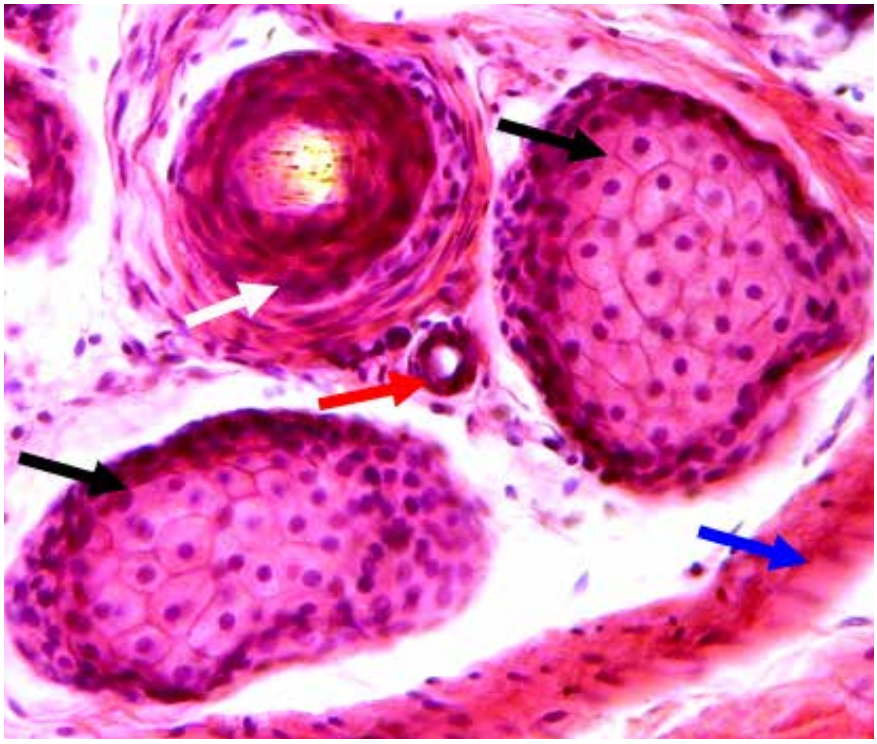


Fig. 2. Primary follicle at high magnification. Below is the muscle that raises the wool (blue arrow); above are two sebaceous glands (black arrows), between which is the duct of the sweat gland (orange arrow); above is a cross-section of the wool (white arrow). Fixation: Steve's solution, hematoxylin and eosin staining. Ob. mag. 40, approx. 16

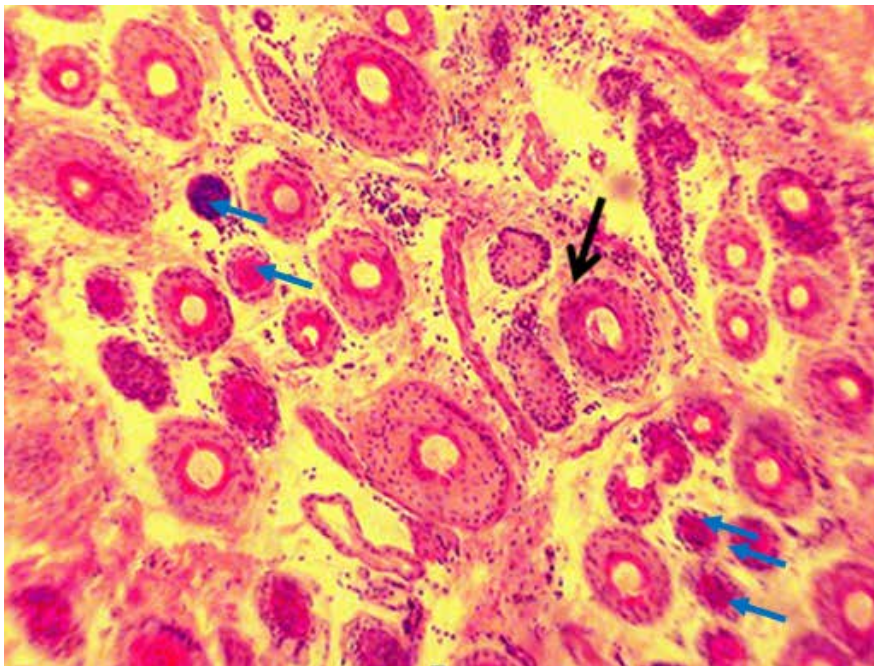


Fig. 3. Horizontal section of ram skin. The black arrow indicates the only primary follicle in the field of view, which includes two sebaceous glands, a sweat gland duct and a wool-raising muscle. The remaining follicles are secondary, between which there are groups of rudimentary follicles (blue arrows). Fixation: Steve's solution, hematoxylin and eosin staining. Ob. mag. 20, approx. 16

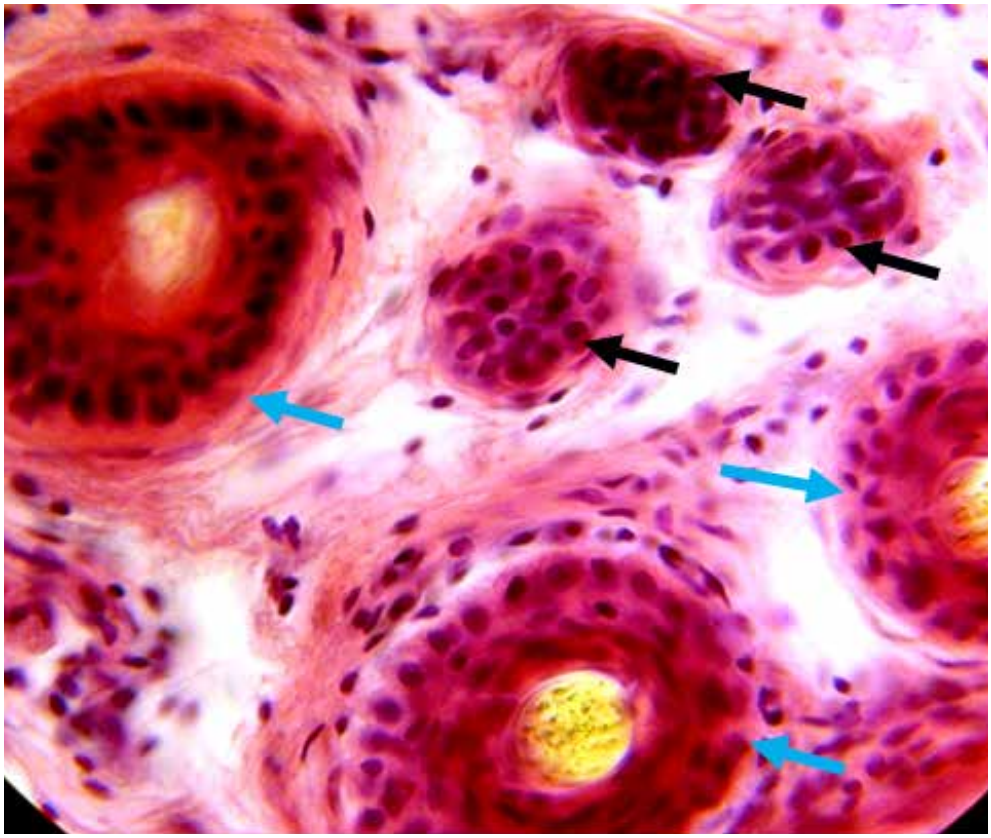


Fig. 4. At the top right, there are three rudimentary follicles (black arrows). The remaining mature secondary follicles (blue arrows). Fixation: Steve's fluid, hematoxylin and eosin staining. Ob. mag. 40, approx. 16

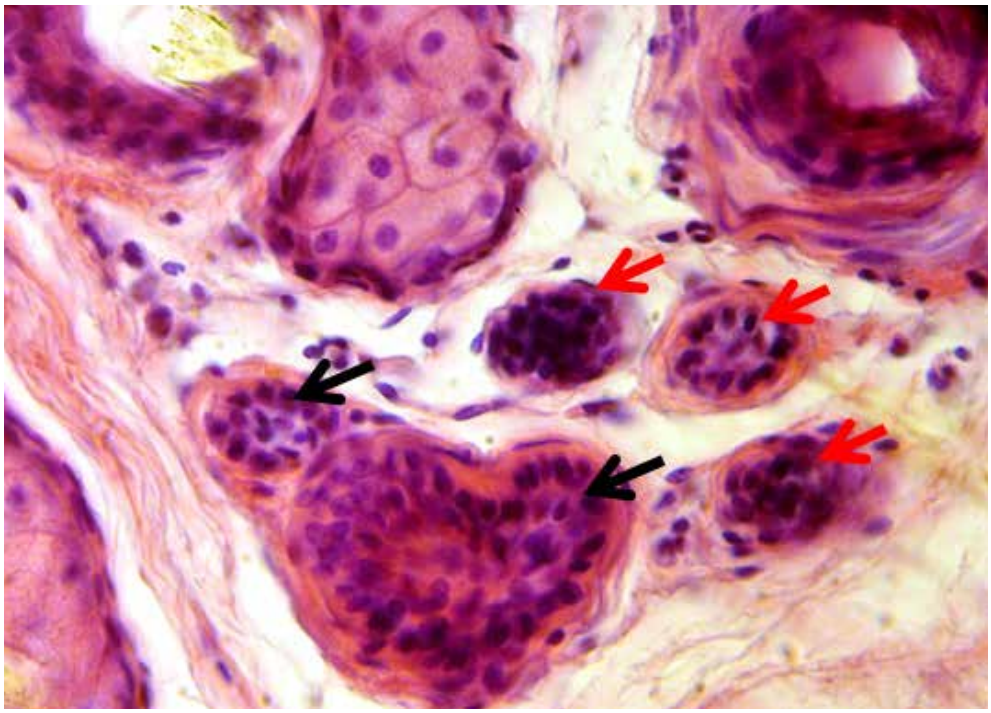


Fig. 5. Black arrows show young follicles forming by formation of rudimentary follicles. Orange arrows show differentiating rudimentary follicles. Fixation: Steve's solution, hematoxylin and eosin staining. Ob. mag. 40, approx. 16

REFERENCES

1. *Gogaev O. K.* Patterns of skin and wool formation in crossbred sheep in the conditions of the central Ciscaucasia / O. K. Gogaev, Kh. E. Kesaev, A. R. Demurova, Zh. A. Gogaeva // Izvestiya gorskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Bulletin of the Mountain State Agrarian University). — 2012. V.49, No.3. — P. 100—114.

2. *Dmitrik I. I.* Relationship between skin histostructure and wool productivity with a comprehensive assessment of merino sheep fleeces: Abstract of a thesis … Cand. of Agricultural Sciences / I. I. Dmitrik. VNIIOK Stavropol, 1998. — 23 p.

3. *Kornienko P. P.* Inheritance of histological structures of the skin in crossbred sheep / P. P. Kornienko, T. V. Kokoreva, A. A. Rabochiy // Sovremennye dostizheniya nauki i praktiki v oblasti selektsii ovets i koz (Modern achievements of science and practice in the field of breeding sheep and goats). — Stavropol, 1991. Part 1 — P. 93—99.

4. *Kumirov S. G.* Comparative morphofunctional characteristics of the skin of fur animals kept in cages … Thesis … Candidate of Biological Sciences / S. G. Kumirov. MGAVMiB im. K. I. Skryabina (MSAVM&B named after K. I. Skryabin) — M., 2017. — 120 p.

5. *Lakin G. F.* Biometry / G. F. Lakin. — M.: Higher School, 1980. — 291 p.

6. *Podlesnykh E. A.* Morphological substantiation of the typological affiliation of dog hair: Thesis … Cand. of Biol. Sciences / E. A. Podlesnykh. MGAVMiB im. K. I. Skryabina (MSAVM&B named after K. I. Skryabin) — Moscow, 2018. — 108 p.

7. *Sokolov V. E.* Skin of mammals / V. E. Sokolov. — Moscow: Nauka, 1973. — 487 p.

8. *Slesarenko N. A.* Morphofunctional transformations of the general cover of sable with cellular content under conditions of stimulation of growth processes / N. A. Slesarenko, V. V. Stepanishin // Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Baumana (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman). — 2015. — No. 224. — P. 203—209.

9. *Tapilskiy I. A.* Formation of wool follicles in postnatal ontogenesis in sheep / I. A. Tapilskiy, P. M. Torgun, A. G. Ulyanov // Ovtsy, kozy, sherstyanoe delo (Sheep, goats, wool business). — 1996. — No. 1. — P. 32—33.

10. The Molecular and structural biology of hair / edited by Kurt Stenn, A. G. Messenger, *Howard P.* Baden, New York, 1991. — 520 p.

11. *Tridico S. R.* Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls / S. R. Tridico, M. M. Houck, K. P. Kirkbride et al. // Forensic Sci Int. — 2014. — V. 238. — P. 101—107.

12. *Manheim J.* Differentiation of human, animal and synthetic hair by ATR FTIR Spectroscopy / J. Manheim // ApplSpectrosc. — 2016. — V. 70(7). — P. 1109—1117.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. G. Ulyanov — Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor of the Department of Special Zootechnics;

V. I. Kotarev — Doctor of Agricultural Sciences, Chief Scientific Associate of the Laboratory of Hematology and Biochemistry of the Department of Clinical and Laboratory Studies;

I. A. Ulyanov — 1st year Postgraduate Student;

P. M. Torgun — Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Obstetrics, Anatomy and Surgery.

The article was submitted 07.04.2025.

Научная статья
УДК 619:616—076:636.3

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СУСТЕНТОЦИТОВ У МОЛОДЫХ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ БАРАНОВ В РАЗЛИЧНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА

Андрей Григорьевич Ульянов[*]✉, **Вячеслав Иванович Котарев**[**], **Игнатий Андреевич Ульянов**[***], **Петр Макарович Торгун**[*]

[*]*Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия, agu16@mail.ru*✉
[**]*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия*
[***]*Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко, Воронеж, Россия*

Аннотация. Сустентоциты играют важную роль в становлении и функционировании половых желез у млекопитающих, обеспечивают опорную, трофическую, фагоцитарную, регулирующую функции сперматогенеза. В осенний период количество сустентоцитов в извитых семенных канальцах баранов увеличивается на 21,9 % по сравнению с летним периодом ($P < 0,05$), площадь ядер сустентоцитов — на 44,1 % ($P < 0,001$). Численность мигрирующих сустентоцитов в осенний период увеличивается более чем в 4 раза по сравнению с летним периодом ($P < 0,05$). В зимний период по сравнению с осенним периодом функциональная активность сустентоцитов снижается: количество клеток уменьшается на 11,8 % ($P < 0,05$), площадь ядер — на 6.5 % ($P < 0,001$), количество мигрирующих сустентоцитов — на 9,3 % ($P < 0,05$). Представлена электронная микроскопия сустентоцитов: выявлены в цитоплазме удлиненные митохондрии, каналы агранулярной цитоплазматической сети, многочисленные мелкие и крупные вакуоли, липидные капли.
Ключевые слова: бараны, семенные канальцы. сустентоциты, мигрирующие клетки, площадь ядер, электронная микроскопия

Сустентоциты играют важную роль в становлении и функционировании половых желез у млекопитающих. Они обеспечивают опорную, трофическую, фагоцитарную, регулирующую функции сперматогенеза [1, 2, 3, 4, 8]. Эти клетки синтезируют различные биологически активные вещества: цитокины, простогландины, стимуляторы пролиферации, факторы роста, стероидные гормоны. Сустентоциты фагоцитируют патологически измененные клетки, остатки цитоплазмы сперматид в период их превращения в сперматозоиды [1, 2, 4, 9]. Сустентоциты, выполняя функцию клеток-мостов, переносят питательные вещества из кровеносных сосудов, расположенных вокруг извитого семенного канальца, к сперматогенным клеткам [10, 11] Обеспечение сперматогенных клеток питательными веществами осуществляется путем диффузии веществ через базальную мембрану. Питательные вещества из кровеносных сосудов поступают вначале в цитоплазму сустентоцитов, которая находится в контакте со всеми сперматогенными клетками, исключением являются сперматогонии, имеющие прямой контакт с базальной мембраной [12].

Целью настоящего исследования явилось изучение микроскопическиех и электронномикроскопических особенностей сустентоцитов у молодых, половозрелых баранов в различные сезоны года.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использован материал от 30 баранов русской длинношерстной породы в возрасте 2—3 года. Материал собран в различные сезоны года (лето, осень, зима, весна). Фрагменты семенников фиксировали в жидкости Штиве, Буэна. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином, азаном по Гейденгайну. Применяли Шик-реакцию и окраску трихром-ШИК. Производили подсчет количе-

ства сустентоцитов в 25 извитых семенных канальцах и определяли численность сустентоцитов в одном канальце. Планиметрически определяли площадь ядер сустентоцитов (25 измерений для каждого животного).

Для электронной микроскопии образцы яичек фиксировали в 2,5 %-ном глютаровом альдегиде и в 1 %-ном осмиевом фиксаторе. Готовили срезы на ультрамикротомах БС-490 и ЛКБ-4800. Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе «Тесла БС-500». Статистическую обработку результатов определения площади ядер проводили с помощью параметрического *t*-критерий Стьюдента [5—7]. Распределения исследуемых показателей (площадь ядер) удовлетворяли двум обязательным условиям применения *t*-критерия Стьюдента: нормальность распределения в обеих группах сравнения и равенство двух генеральных дисперсий в группах сравнения. Результаты подсчета количества клеток обрабатывали с помощью непараметрического Т-критерия Уайта. Различия между средними показателями сравниваемых групп рассматривались как статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$ (Т-критерий Уайта) и $p < 0,001$ (*t*-критерий Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В летний период у баранов численность сустентоцитов в одном извитом семенном канальце составляет 13,2 ± 0,09; площадь ядер — 46,4 ± 0,77мкм^2 (табл. 1). Сустентоциты характеризуются небольшой величиной, располагаются на базальной мембране (рис. 1, 2). Ядра клеток овальные или округлые. Их продольная ось расположена параллельно базальной мембране. В небольшом количестве (6,5 %) выявлены мигрирующие сустентоциты, которые содержат более крупные ядра, продольная ось которых направлена перпендикулярно базальной мембране.

Таблица 1

Численность сустентоцитов и площади их ядер у молодых половозрелых баранов в различные сезоны года

Сезон года	*N*	Общее количество сустентоцитов в одном извитом канальце	Количество мигрирующих сустентоцитов, %	Средняя площадь ядер сустентоцитов, мкм^2
Лето	6	13,2 ± 0,09	6,5 ± 0,05	46,4 ± 0,77
Осень	8	16,3 ± 0,13*	27,6 ± 0,19*	66,9 ± 0,88**
Зима	10	13,2 ± 0,15*	18,8 ± 0,11*	62,5 ± 0,85**
Весна	6	15,7 ± 0,11*	15,7 ± 0,12*	56,6 ± 0,92**

* $P < 0,05$ (Т-критерий Уайта)

** $P < 0,001$ (*t*-критерий Стьюдента)

Различия статистически значимы относительно предыдущего периода.

В осенний период количество сустентоцитов увеличивается на 21,9 % по сравнению с летним периодом ($P < 0,05$); численность мигрирующих сустентоцитов — на 21,1 % ($P < 0,05$). Мигрирующие сустентоциты (рис. 3, 4) имеют крупные овальные ядра. Мигрирующие сустентоциты перемещаются и располагаются перпендикулярно базальной мембране (рис. 3).

В дальнейшем ядра этих клеток располагаются ближе к центру семенного канальца на некотором расстоянии от базальной мембраны (рис. 4). Площадь ядер сустентоцитов увеличивается на 44,1 % ($P < 0,001$).

В зимний период по сравнению с осенним периодом количество сустентоцитов уменьшается на 11,8 % ($P < 0,05$); площадь ядер — на 6,5 % ($P < 0,001$). Выявлено так же значительное уменьшение количества мигрирующих сустентоцитов на 9,3 % ($P < 0,05$) по сравнению с осенним периодом.

В весенний период по сравнению с зимним периодом количество сустентоцитов увеличивается на 10,5 % ($P < 0,05$), однако их площадь ядер уменьшается на 9,4 % ($P < 0,001$), количество мигрирующих сустентоцитов — на 2,6 %. Все эти показатели отражают снижение функциональной активности сустентоцитов.

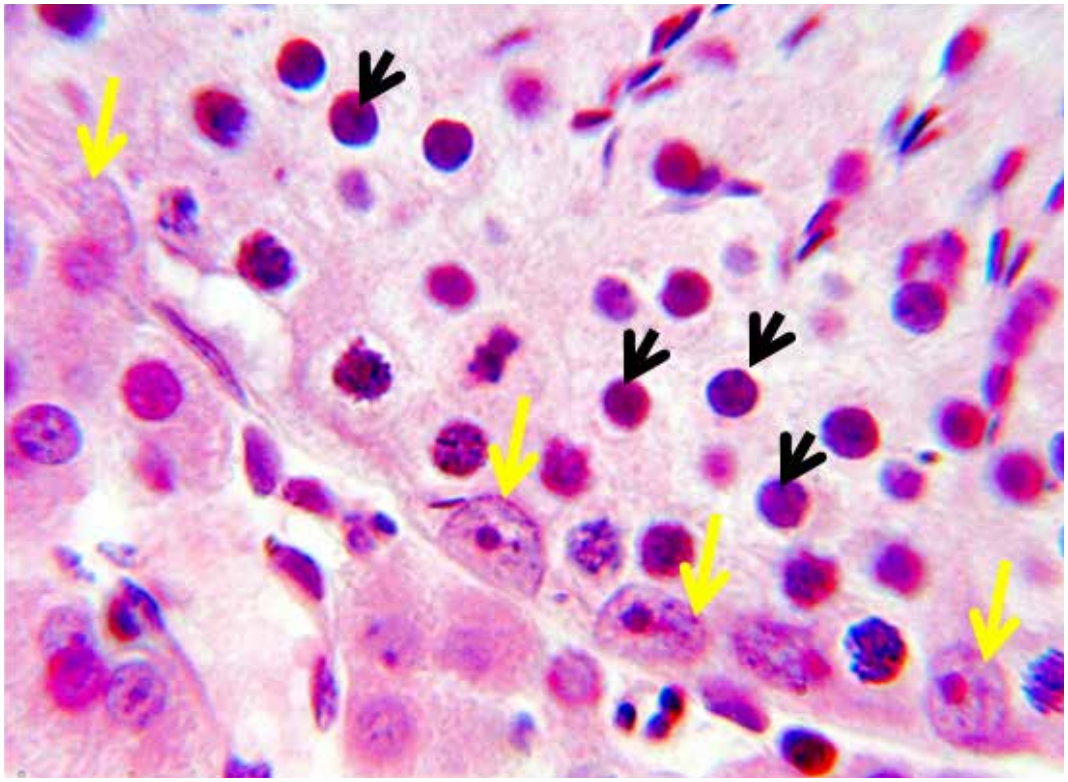


Рис. 1. На базальной мембране семенного канальца барана (летний период) видны округлые ядра трех сустентоцитов (отмечены желтыми стрелками). Черными стрелками обозначены сперматоциты вторичные. Фиксация жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозин. Ув. об. 60, ок. 10

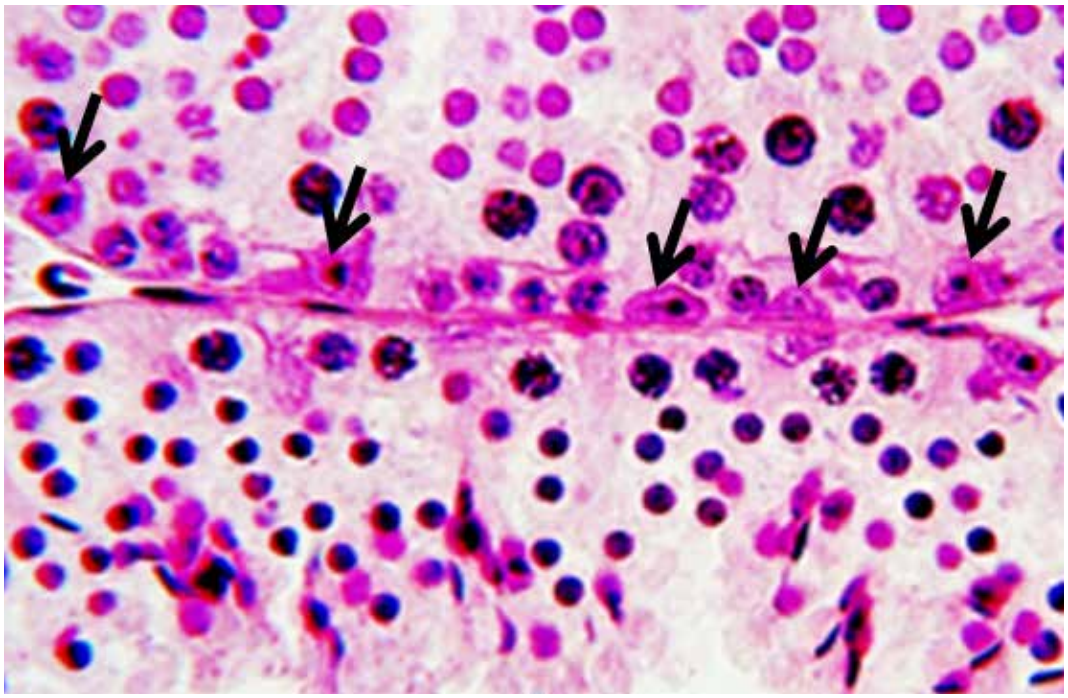


Рис. 2. Два фрагмента семенника (летний период). Вверху на базальной мембране видны слабо функционирующие сустентоциты (черные стрелки). Фиксация жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозином. Ув. об. 40, ок. 10

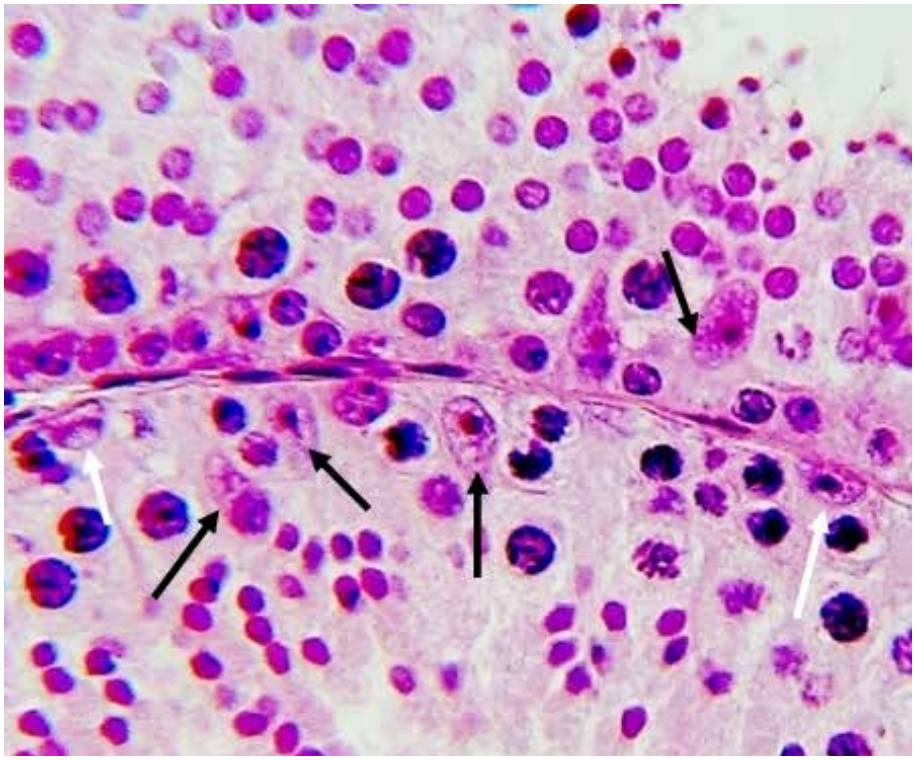


Рис. 3. Мигрирующие сустентоциты отмечены стрелками (осенний период). Крупные овальные ядра сустентоцитов располагаются перпендикулярно базальной мембране. Фиксация жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозином. Ув. об. 40, ок. 16

Рис. 4. Фрагмент семенного канальца (осенний период). Мигрирующие сустентоциты отмечены стрелками. Крупные овальные ядра их расположены ближе к центру семенного канальца и не касаются базальной мембране. Фиксация жидкость Штиве, окраска гематоксилин-эозином. Ув. об. 60, ок. 10

Электронномикроскопические исследования сустентоцитов показали, что их цитоплазма отличается обилием мелких и более крупных светлых вакуолей, располагающихся по всей цитоплазме (рис. 5, 6).

Сустентоциты соединяются с базальной мембраной аморфным веществом Поверхность контакта сустентоцитов с базальной мембраной семенных канальцев имеет много вдавлений, иногда глубоких, проникающих до ядер. В зоне контакта обнаружено много пиноцитозных пузырьков, коллагеновых и ретикулиновых волокон. Между собой сустентоциты соединяются по типу инердигитаций и с помощью десмосом. Между плазмалеммами смежных клеток имеются небольшие межклеточные пространства.

В базальной части сустентоцитов расположено ядро. Ядра сустентоцитов имеют разнообразную форму: удлиненно-угловатую, эллипсоидную, треугольную и реже круглую.

Слабо функционирующие клетки имеют округлое или слегка овальное ядро, продольная ось которых направлена параллельно базальной мембране. Эти клетки непосредственно прилегают к базальной мембране. Ядра сустентоцитов имеют хорошо выраженную ядерную мембрану. Нами было установлено, что ядерная мембрана сустентоцитов имеет многочисленные углубления. В ядре содержится хроматин в виде мелких гранул.

Ядра активно функционирующих клеток увеличиваются в размерах, как правило, располагаются на некотором расстоянии от базальной мембраны, их продольная ось направлена перпендикулярно базальной мембране.

Цитоплазма сустентоцитов богата органоидами и включениями. В цитоплазме сустентоцитов обнаружен хорошо развитый агранулярный эндоплазматический ретикулюм; гранулярный эндоплазматический ретикулюм слабо развит.

В большом количестве представлены митохондрии палочковидные или круглые по форме, расположенные в базальной части цитоплазмы сустентоцита, с частыми трубчатыми кристами. Много митохондрий сосредоточено в цитоплазматических отростках сустентоцитов, расположенных между сперматогенными клетками. Количество митохондрий может меняться в зависимости от сперматогенной активности семенника.

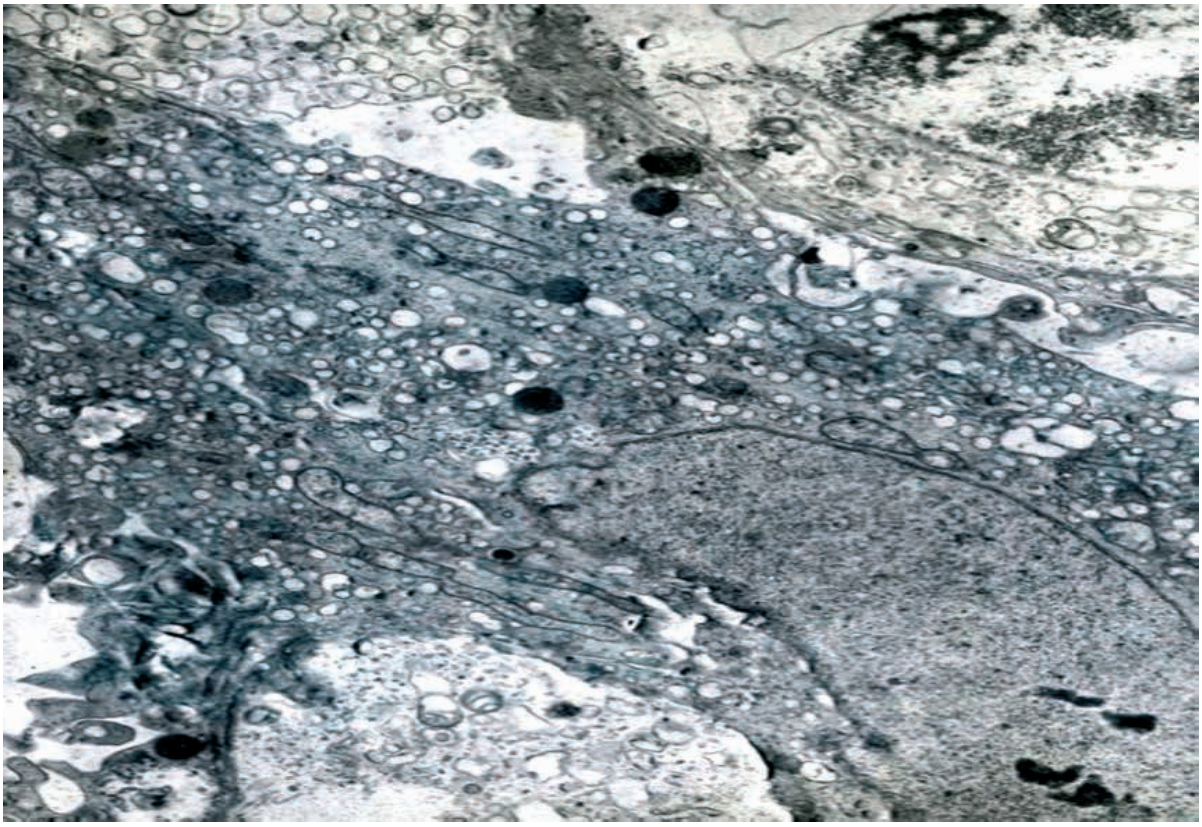


Рис. 5. Электронная микроскопия активно функционирующего сустентоцита барана (осенний период). Внизу справа овальное крупное ядро. В темной цитоплазме видны митохондрии, мелкие и крупные вакуоли, темные липидные капли. Ув. х 8000. Масштабный отрезок 1 мкм

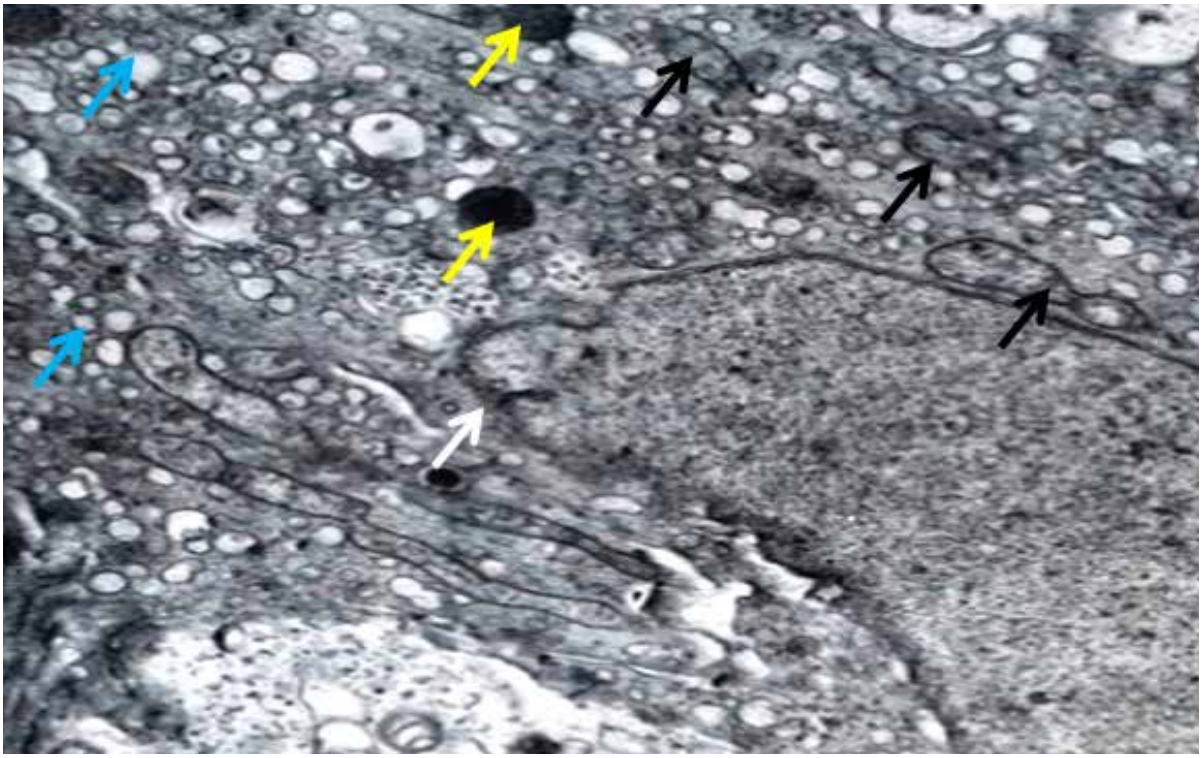


Рис. 6. То же, что на рисунке 3 при большем увеличении х 12 000. Внизу справа видна часть ядра. В цитоплазме выявляются удлиненные митохондрии (черные стрелки), мелкие и крупные вакуоли (белые стрелки), темные липидные капли (желтые стрелки). Масштабный отрезок 1 мкм

Рибосомы представлены в большом количестве и расположены на мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулюма или между каналами цитоплазматической сети. Выявляются так же полирибосомы.

Сустентоциты содержат липиды, которые представлены в виде темных округлых тел. Липидные капли чаще выявляются в базальной части клеток, тогда как в цитоплазматических тяжах они встречаются реже. Содержание липидов в цитоплазме сустентоцитов подвержено колебаниям в зависимости от функционального состояния клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Площадь ядер сустентоцитов является одним из наиболее объективных критериев функциональной активности клеток. Значительное увеличение площади ядер сустентоцитов выявлено нами в осенний период по сравнению с летним периодом. Повышение функциональной активности сустентоцитов сопровождается перемещением, миграцией ядер этих клеток ближе к центру семенных канальцев, ядра приобретают овальную форму, продольная ось ядер направлена перпендикулярно к базальной мембране. Все эти изменения свидетельствуют о высокой функциональной активности сустентоцитов в осенний период, что обеспечивает повышенную сперматогенную активность семенника.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Быков В. Л.* Современные тенденции изменения активности сперматогенеза у человека / В. Л. Быков // Морфология. — 1999. — Т. 116. — № 6. — С. 78—86

2. *Захидов С. Т.* Старение сперматогенной системы / С. Т. Захидов, А. Н. Хохлов, Е. А. Малолина, А. Ю. Кулибин, Т. Л. Маршак // Изв. РАН. Сер. Биол., — 2010. — № 1. — С. 16—24.

3. *Котарев В. И.*, Кариометрические исследования сустентоцитов, интерстициальных эндокриноцитов и сперматогенных клеток яичек у баранов в различные сезоны года / В. И. Котарев, А. Г. Ульянов, П. М. Торгун // Журнал анатомии и гистопатологии. — 2015. — № 1. — С. 45—50.

4. *Котарев В. И.* Кариометрические исследования сперматогенных клеток у баранов. / В. И. Котарев, А. Г. Ульянов, П. М. Торгун // Морфология. — № 5. — 2013. — С. 86—87.

5. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин — М.: Высшая школа, 1980. — 291 с.

6. *Торгун П. М.* Сравнительно-морфологическое и электронно-микроскопическое исследование сперматогенеза у млекопитающих / П. М. Торгун, А. И. Болтнев // ВГАУ, Воронеж. — 2004. — С. 200.

7. *Шевлюк Н. Н.* Сравнительная гистология мужской репродуктивной системы позвоночных / Н. Н. Шевлюк. Оренбург: Изд-во ОрГМУ; 2017.

8. *Шевлюк Н. Н.* Основные направления преобразований органов половой системы в ходе эволюции позвоночных / Н. Н. Шевлюк // Журнал анатомии и гистопатологии. 2023. Т. 12, № 3. С. 103—112.

9. *Ульянов А. Г.* Морфологические исследования сперматогенных клеток у баранов в постнатальном онтогенезе / А. Г. Ульянов // Морфология. — 2011. — Т. 140. — № 5. — С. 55—56.

10. Dzimira S, Nizanski W, Madej JA. Morphological analysis of testicles in cats with disorders of sex development. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2017 Mar 28;20(1):123—31. doi: 10.1515/pjvs-2017—0016

11. Elcock L, *Schoning P.* Age-related changes in the cat testis and epididymis. Am J Vet Res. 1984;45:2380—4.

12. França LR, Godinho CL. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (Felis catus). Biology of Reproduction. 2003 May 1;68(5):1554—61. doi: 10.1095/biolreprod.102.010652

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. Г. Ульянов — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры частной зоотехнии;

В. И. Котарев — доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник лаборатории гематологии и биохимии отдела клинико-лабораторных исследований;

И. А. Ульянов — аспирант 1-го курса;

П. М. Торгун — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры акушерства, анатомии и хирургии.

Статья поступила в редакцию 07.04.2025.

Original article
UDC 619:616—076:636.3

MICROSCOPIC AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF SERTOLI CELLS IN YOUNG SEXUALLY MATURE RAMS IN DIFFERENT SEASONS OF THE YEAR

Andrey Grigoryevich Ulyanov[*]✉, Vyacheslav Ivanovich Kotarev[**], Ignatiy Andreevich Ulyanov[***], Petr Makarovich Torgun[*]

[*]Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia, agu16@mail.ru✉
[**]All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia
[***]Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko, Voronezh, Russia

Abstract. Sertoli cells play an important role in the development and functioning of the gonads in mammals, providing supporting, trophic, phagocytic and regulatory functions of spermatogenesis. In the autumn period, the number of Sertoli cells in the convoluted seminiferous tubules of rams increases by 21.9 %, compared to the summer period ($P < 0.05$), the area of the nuclei of Sertoli cells — by 44.1 % ($P < 0.001$). In the autumn period, the number of migrating Sertoli cells increases more than by 4 times, compared to the summer period ($P < 0.05$). In winter, compared to autumn, the functional activity of Sertoli cells decreases: the number of cells decreases by 11.8 % ($P < 0.05$), the area of nuclei — by 6.5 % ($P < 0.001$), the number of migrating Sertoli cells — by 9.3 % ($P < 0.05$). Electron microscopy of Sertoli cells is presented: elongated mitochondria, channels of the agranular cytoplasmic reticulum, numerous small and large vacuoles, lipid droplets were found in the cytoplasm.
Keywords: rams, seminiferous tubules, Sertoli cells, migrating cells, area of nuclei, electron microscopy

Sertoli cells play an important role in the development and functioning of the sex glands in mammals. They provide supporting, trophic, phagocytic and regulatory functions of spermatogenesis [1—4, 8]. These cells synthesize various biologically active substances: cytokines, prostaglandins, proliferation stimulators, growth factors and steroid hormones. Sertoli cells phagocytize pathologically altered cells and the remnants of spermatid cytoplasm during their transformation into spermatozoa [1, 2, 4, 9].

Sertoli cells, acting as "bridge" cells, transfer nutrients from the blood vessels located around the convoluted seminiferous tubule to spermatogenic cells [10, 11]. Sertoli cells are supplied with nutrients by diffusion of substances through the basal membrane. Nutrients from the blood vessels first enter the cytoplasm of Sertoli cells, which is in contact with all spermatogenic cells, with the exception of spermatogonia, which have direct contact with the basal membrane [12].

The objective of this research was to study the microscopic and electron microscopic features of Sertoli cells in young sexually mature rams in different seasons of the year.

MATERIAL AND METHODS

The material from 30 Russian Longhair rams aged 2—3 years was used. The material was collected in different seasons of the year (summer, autumn, winter, spring). The fragments of the testicles were fixed in Steve's and Buen's solutions. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin, with azan according to Heidenhain. The Schick reaction and trichrome staining were used. The number of Sertoli cells in 25 convoluted seminiferous tubules was counted and the number of Sertoli cells in one tubule was determined. The area of the Sertoli cells nuclei was determined planimetrically (25 measurements for each animal).

For electron microscopy, testicular samples were fixed in 2.5 % glutaraldehyde and 1 % osmium fixative. The sections were prepared on BS-490 and LKB-4800 ultramicrotomes. The sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Tesla BS-500 electron microscope. The statistical processing of the results of determining the nuclear area was performed using the parametric Student's t-test [5—7]. The distributions of the studied indicators (nuclear area) met two mandatory conditions for using the Student's t-test: normal distribution in both compari-

son groups and equality of two general variances in the comparison groups. The results of cell counting were processed using the White's non-parametric T-test. The differences between the average indicators of the compared groups were considered statistically significant at a significance level of $p < 0.05$ (White's T-test) and $p < 0.001$ (Student's t-test).

STUDY RESULTS

In the summer period, the number of Sertoli cells in one convoluted seminiferous tubule in rams is 13.2 ± 0.09; the area of the nuclei is 46.4 ± 0.77 μm^2 (Table 1). Sertoli cells are characterized by a small size, located on the basal membrane (Fig. 1, 2). The nuclei of the cells are oval or round. Their longitudinal axis is parallel to the basal membrane. A small number (6.5 %) of migrating Sertoli cells have been found, which contain larger nuclei, the longitudinal axis of which is directed perpendicular to the basal membrane.

In autumn, the number of Sertoli cells increases by 21.9 %, compared to the summer period ($P < 0.05$); the number of migrating Sertoli cells — by 21.1 % ($P < 0.05$). Migrating Sertoli cells (Fig. 3, 4) have large oval nuclei. Migrating Sertoli cells move and are located perpendicular to the basement membrane (Fig. 3). Subsequently, the nuclei of these cells are located closer to the center of the seminiferous tubule at some distance from the basement membrane (Fig. 4). The area of the nuclei of Sertoli cells increases by 44.1 % ($P < 0.001$).

Table 1

Number of Sertoli cells and the area of their nuclei in young sexually mature rams in different seasons of the year

Season of the year	N	Total number of Sertoli cells in one convoluted tubule	Number of migrating Sertoli cells, %	Average area of nuclei of Sertoli cells, μm^2
Summer	6	13.2 ± 0.09	6.5 ± 0.05	46.4 ± 0.77
Autumn	8	16.3 ± 0.13*	27.6 ± 0.19*	66.9 ± 0.88**
Winter	10	13.2 ± 0.15*	18.8 ± 0.11*	62.5 ± 0.85**
Spring	6	15.7 ± 0.11*	15.7 ± 0.12*	56.6 ± 0.92**

* $P < 0.05$ (White's t-test)

** $P < 0.001$ (Student's t-test)

The differences are statistically significant relative to the previous period.

In winter, compared to autumn, the number of Sertoli cells decreases by 11.8 % ($P < 0.05$); the area of the nuclei — by 6.5 % ($P < 0.001$). A significant decrease in the number of migrating Sertoli cells by 9.3 % ($P < 0.05$) was also revealed, compared to the autumn period.

In the spring period, compared to the winter period, the number of Sertoli cells increases by 10.5 % ($P < 0.05$), but their nuclear area decreases by 9.4 % ($P < 0.001$), the number of migrating Sertoli cells — by 2.6 %. All these indicators reflect a decrease in the functional activity of Sertoli cells.

Electron microscopic studies of Sertoli cells have shown that their cytoplasm is distinguished by an abundance of small and larger light vacuoles located throughout the cytoplasm (Fig. 5, 6). Sertoli cells are connected to the basal membrane by an amorphous substance. The contact surface of Sertoli cells with the basal membrane of the seminiferous tubules has many depressions, sometimes deep, penetrating to the nuclei. Many pinocytotic vesicles, collagen and reticulin fibers were found in the contact zone. Sertoli cells are connected to each other by the type of interdigitation and with the help of desmosomes. There are small intercellular spaces between the plasmalemmas of adjacent cells.

The nucleus is located in the basal part of Sertoli cells. Sertoli cell nuclei have a variety of shapes: elongated-angular, ellipsoid, triangular and less often round.

Weakly functioning cells have a round or slightly oval nucleus, the longitudinal axis of which is directed parallel to the basement membrane. These cells are directly adjacent to the basement membrane. The nuclei of Sertoli cells have a well-defined nuclear membrane. We have found that the nuclear membrane of Sertoli cells has numerous depressions. The nucleus contains chromatin in the form of small granules.

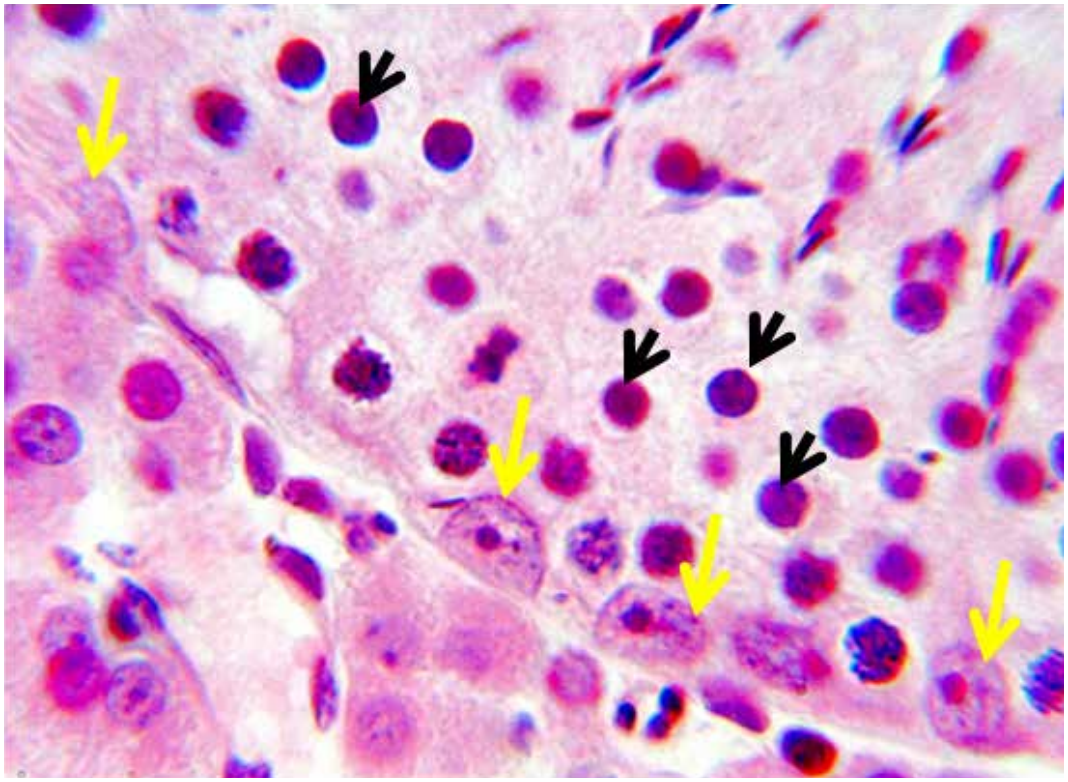


Fig. 1. Round nuclei of three Sertoli cells (marked with yellow arrows) are visible on the basement membrane of the seminiferous tubule of a ram (summer period). Secondary spermatocytes are marked with black arrows. Fixation with Steve's solution, stained with hematoxylin and eosin. Ob. mag. 60, approx. 10

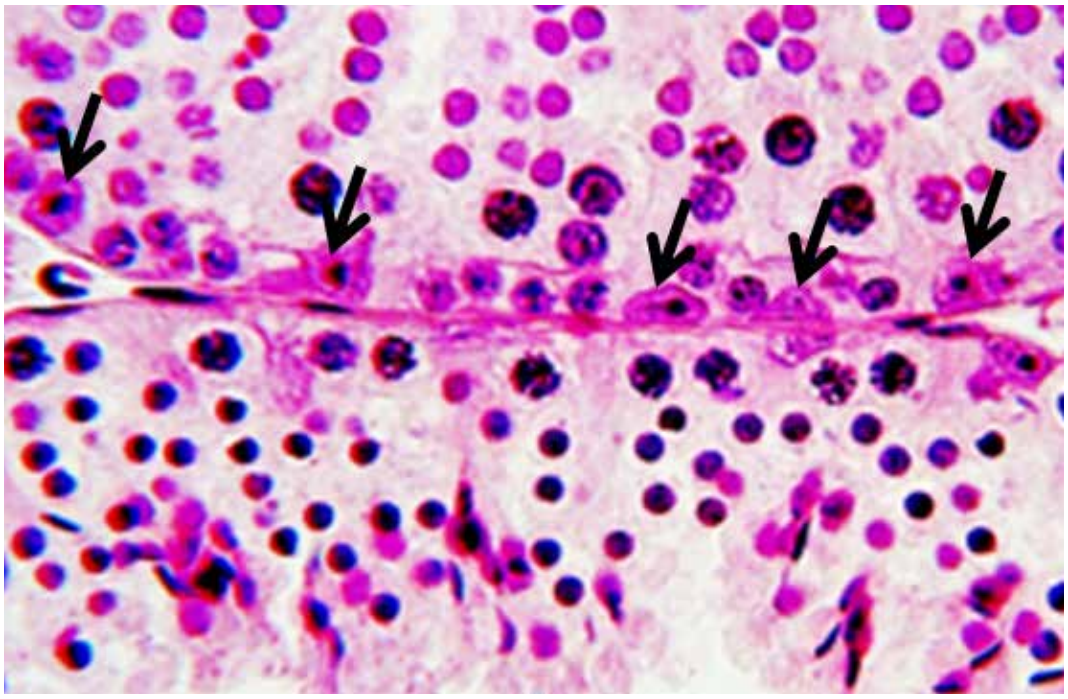


Fig. 2. Two fragments of the testicle (summer period). At the top, weakly functioning Sertoli cells are visible on the basement membrane (black arrows). Fixation with Steve's solution, stained with hematoxylin and eosin. Ob. mag. 40, approx. 10

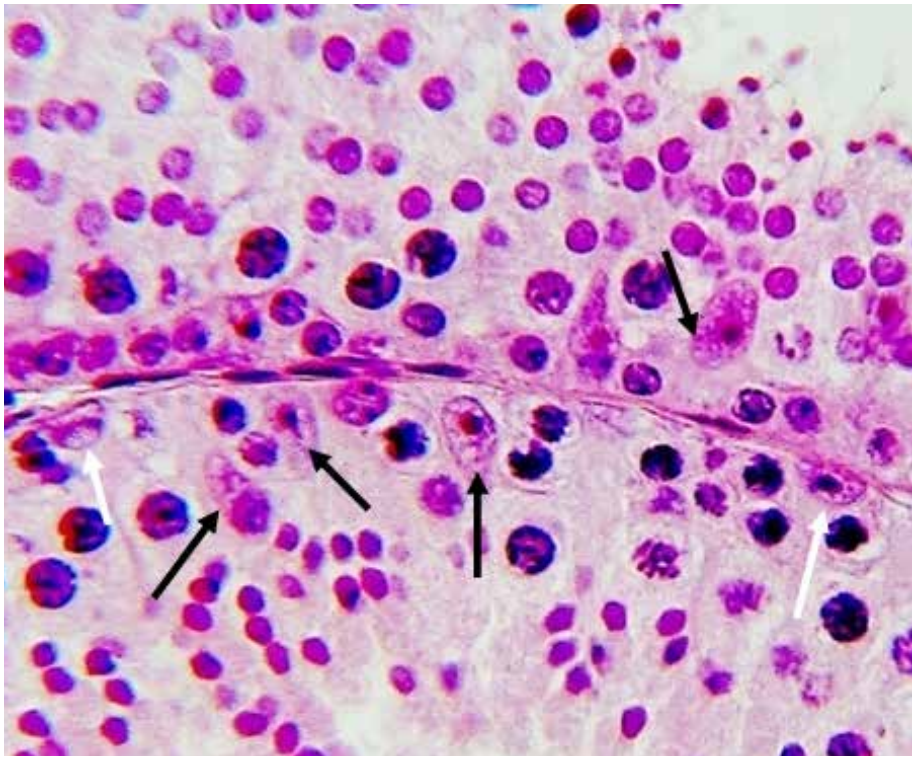


Fig. 3. Migrating Sertoli cells are marked with arrows (autumn period). Large oval nuclei of Sertoli cells are located perpendicular to the basement membrane. Fixation with Steve's solution, stained with hematoxylin and eosin. Ob. mag. 40, approx. 16

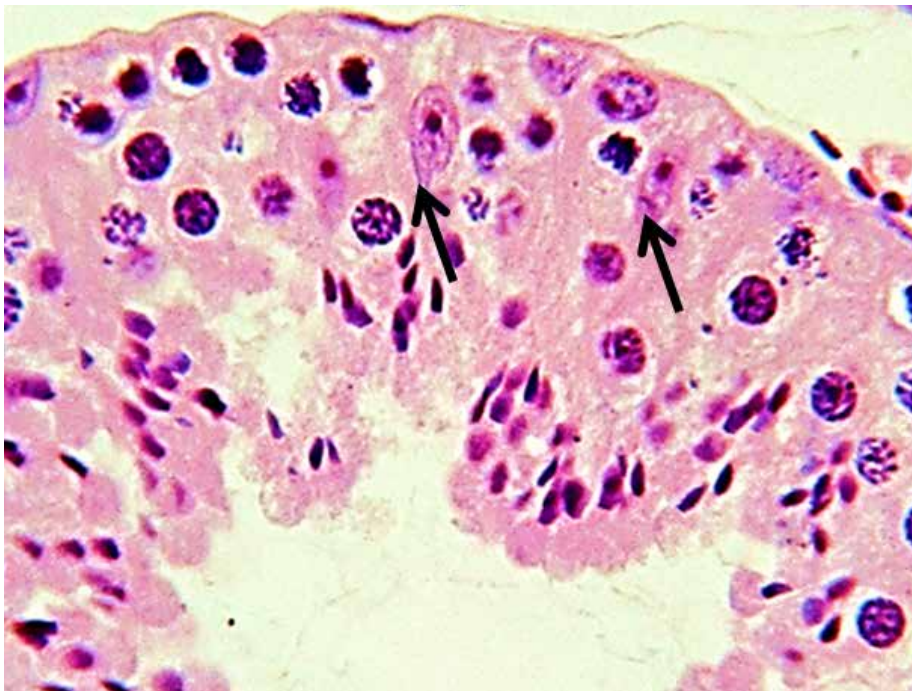


Fig. 4. Fragment of the seminiferous tubule (autumn period). Migrating Sertoli cells are marked with arrows. Their large oval nuclei are located closer to the center of the seminiferous tubule and do not touch the basement membrane. Fixation with Steve's solution, stained with hematoxylin and eosin. Ob. mag. 60, approx. 10

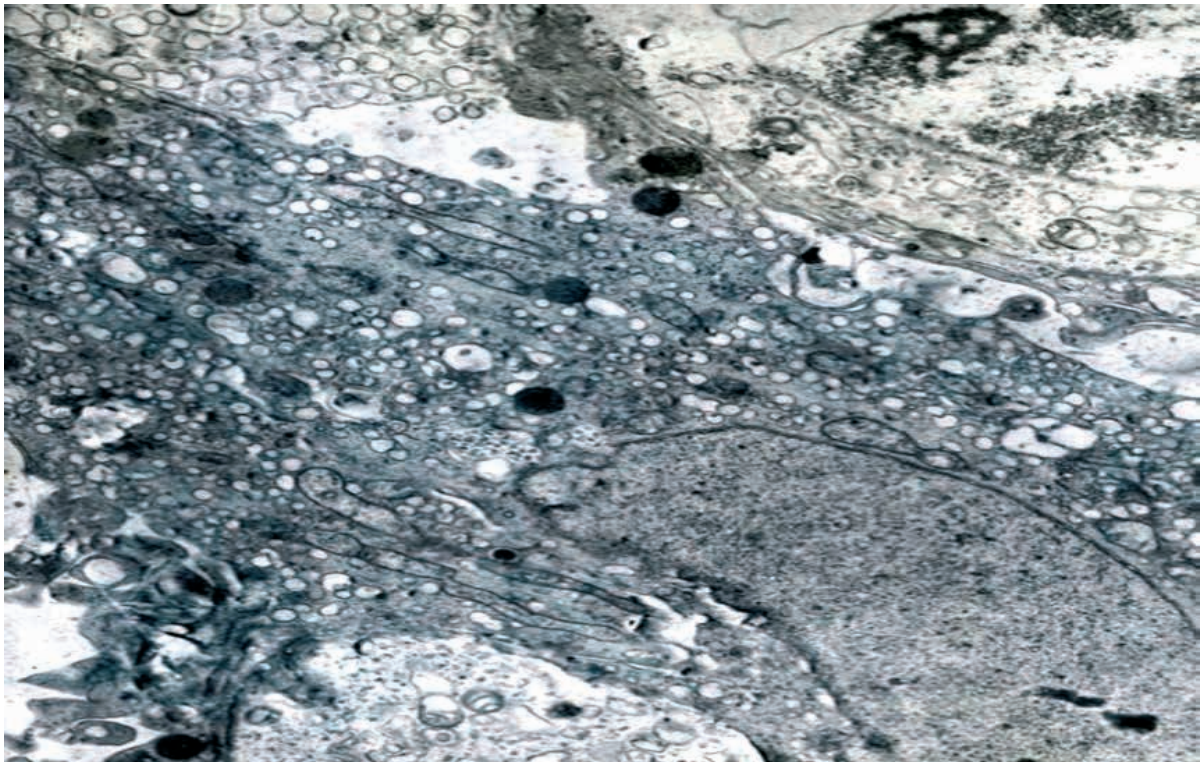


Fig. 5. Electron microscopy of an actively functioning ram Sertoli cell (autumn period). At the bottom right is a large oval nucleus. Mitochondria, small and large vacuoles, and dark lipid droplets are visible in the dark cytoplasm. Mag. x 8000. Scale bar 1 μm

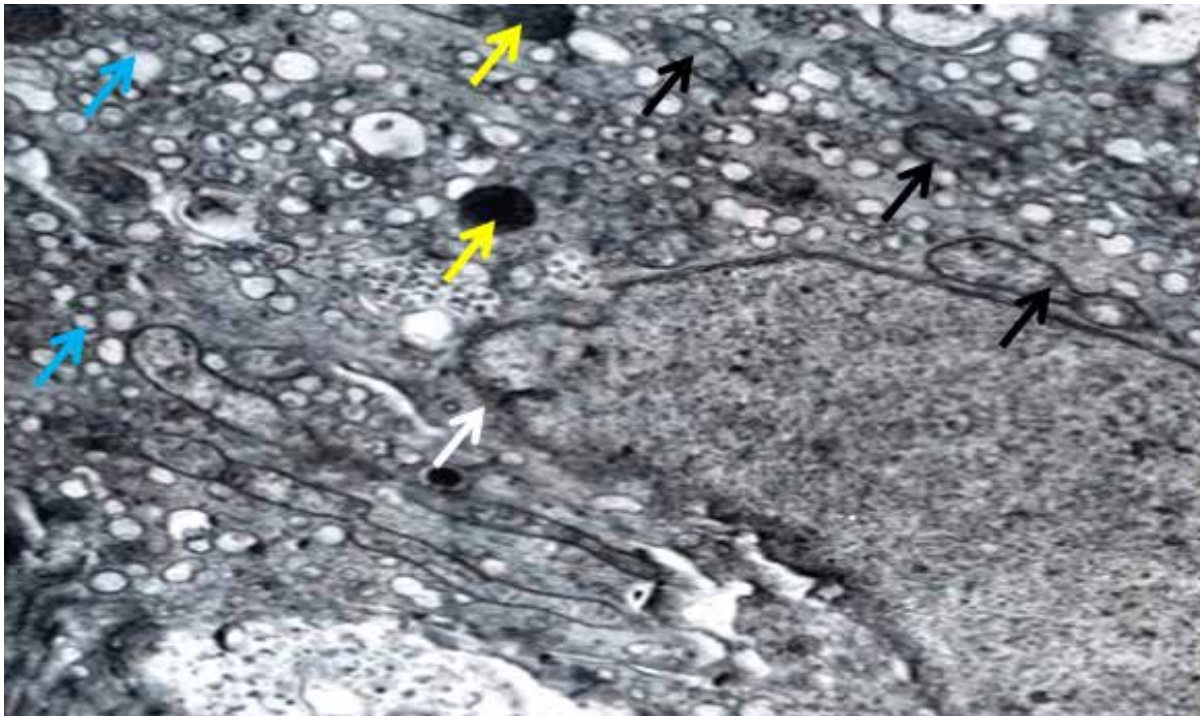


Fig. 6. Same as in Fig. 3 at higher magnification x12 000. Part of the nucleus is visible at the bottom right. Elongated mitochondria (black arrows), small and large vacuoles (white arrows), dark lipid droplets (yellow arrows) are revealed in the cytoplasm. Scale bar is 1 μm

The nuclei of actively functioning cells increase in size, as a rule, are located at some distance from the basement membrane, their longitudinal axis is directed perpendicular to the basement membrane.

The cytoplasm of Sertoli cells is rich in organelles and inclusions. In the cytoplasm of Sertoli cells, a well-developed agranular endoplasmic reticulum is found; the granular endoplasmic reticulum is poorly developed.

Mitochondria are present in large numbers, rod-shaped or round in shape, located in the basal part of the cytoplasm of the Sertoli cell, with frequent tubular cristae. Many mitochondria are concentrated in the cytoplasmic projections of Sertoli cells, located between the spermatogenic cells. The number of mitochondria can change depending on the spermatogenic activity of the testicle.

The ribosomes are present in large numbers and are located on the membranes of the granular endoplasmic reticulum or between the channels of the cytoplasmic network. The polyribosomes are also detected.

Sertoli cells contain lipids, which are presented in the form of dark round bodies. Lipid droplets are more often detected in the basal part of the cells, while they are less common in the cytoplasmic strands. The lipid content in the cytoplasm of Sertoli cells is subjected to fluctuations depending on the functional state of the cells.

CONCLUSION

The area of the nuclei of Sertoli cells is one of the most objective criteria of the functional activity of cells. We have found a significant increase in the area of the nuclei of Sertoli cells in autumn, compared to summer. An increase in the functional activity of Sertoli cells is accompanied by the movement, migration of the nuclei of these cells closer to the center of the seminiferous tubules, the nuclei acquire an oval shape, the longitudinal axis of the nuclei is directed perpendicular to the basal membrane. All these changes indicate a high functional activity of Sertoli cells in the autumn period, which ensures increased spermatogenic activity of the testicle.

REFERENCES

1. *Bykov V. L.* Modern trends in changes of spermatogenesis activity in humans / V. L. Bykov // Morfologiya (Morphology). — 1999. — Vol. 116. — No. 6. — P. 78—86

2. *Zakhidov S. T.* Aging of the spermatogenic system / S. T. Zakhidov, A. N. Khokhlov, E. A. Malolina, A. Yu. Kulibin, T. L. Marshak // Izv. RAS. Ser. Biol., — 2010. — No. 1. — P. 16—24.

3. *Kotarev V. I.,* Karyometric studies of Sertoli cells, interstitial endocrinocytes and spermatogenic cells of the testicles of rams in different seasons of the year / V. I. Kotarev, A. G. Ulyanov, P. M. Torgun // Zhurnal Anatomii i gistopatologii (Journal of Anatomy and Histopathology). — 2015. — No. 1. — P. 45—50.

4. *Kotarev V. I.* Karyometric studies of spermatogenic cells in rams. / V. I. Kotarev, A. G. Ulyanov, P. M. Torgun // Morfologiya (Morphology). — No. 5. — 2013. — P. 86—87.

5. *Lakin G. F.* Biometry / G. F. Lakin — M.: Higher School, 1980. — 291 p.

6. *Torgun P. M.* Comparative morphological and electron microscopic study of spermatogenesis in mammals / P. M. Torgun, A. I. Boltnev // VGAU (VSAU), Voronezh. — 2004. — P. 200.

7. *Shevlyuk N. N.* Comparative histology of the male reproductive system of vertebrates / N. N. Shevlyuk. Orenburg: Publishing house of Orenburg State Medical University; 2017.

8. *Shevlyuk N. N.* Main directions of transformations of the reproductive system organs during the evolution of vertebrates / N. N. Shevlyuk // Zhurnal Anatomii i gistopatologii (Journal of Anatomy and Histopathology). 2023. Vol. 12, No. 3. P. 103—112.

9. *Ulyanov A. G.* Morphological studies of spermatogenic cells in rams in postnatal ontogenesis / A. G. Ulyanov // Morfologiya (Morphology). — 2011. — T. 140. — No. 5. — P. 55—56.

10. *Dzimira S, Nizanski W, Madej JA.* Morphological analysis of testicles in cats with disorders of sex development. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2017 Mar 28;20(1):123—31. doi: 10.1515/pjvs-2017—0016

11. *Elcock L, Schoning P.* Age-related changes in the cat testis and epididymis. Am J Vet Res. 1984;45:2380—4.

12. *França LR, Godinho CL.* Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (Felis catus). Biology of Reproduction. 2003 May 1;68(5):1554—61. doi: 10.1095/biolreprod.102.010652

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. G. Ulyanov — Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor of the Department of Special Zootechnics;

V. I. Kotarev — Doctor of Agricultural Sciences, Chief Scientific Associate of the Laboratory of Hematology and Biochemistry of the Department of Clinical and Laboratory Studies;

I. A. Ulyanov — 1st year Postgraduate Student;

P. M. Torgun — Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Obstetrics, Anatomy and Surgery.

The article was submitted 07.04.2025.

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».