

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 24.03.2020 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	06.02.01 — Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных (биологические науки), 06.02.01 — Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных (ветеринарные науки), 06.02.02 — Ветеринарная микробиология, вирусология, теринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (биологические науки), 06.02.02 — Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки), 06.02.03 — Ветеринарная фармакология с токсикологией (биологические науки), 06.02.03 — Ветеринарная фармакология с токсикологией (ветеринарные науки), 06.02.04 — Ветеринарная хирургия (биологические науки), 06.02.04 — Ветеринарная хирургия (ветеринарные науки), 06.02.05 — Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза (биологические науки), 06.02.05 — Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза (ветеринарные науки), 06.02.06 — Ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных (ветеринарные науки), 06.02.06 — Ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных (биологические науки), 06.02.08 — Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов (сельскохозяйственные науки), 06.02.08 — Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов (биологические науки), 06.02.10 — Частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства (сельскохозяйственные науки)	с 28.02.2020

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.

EDITORIAL BOARD

Chief Editor

Shabunin Sergey Viktorovich — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Academician of the RAS, Academic Director of FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy", Russia

Deputy Chief Editor

Kotarev Vyacheslav Ivanovich — Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Deputy Director of FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy", Russia

Tkacheva Yuliya Aleksandrovna — Executive Secretary

EDITORIAL COUNCIL

Chairman

Shakhov Aleksey Gavrilovich — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Chief Scientific Associate of FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy", Russia

Editorial Council Members

Abilov Akhmedaga Imash ogly — Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Scientific Associate of FSBSI "Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academician L. K. Ernst", Russia

Vostroilova Galina Anatolyevna — Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for Science of FSBSI "ARVRIPP&T", Russia

Donnik Irina Mikhaylovna — Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the RAS, Vice-President of the RAS, Russia

Dorozhkin Vasily Ivanovich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the RAS, Head of All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology — branch of FSBSI FSC VIEV RAS, Russia

Duskaev Galimzhan Kalikhanovich — Doctor of Biological Sciences, First Deputy Director, Principal Scientific Associate of Federal Scientific Center of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (FSBSI FSC BS&A of the RAS)

Ermakova Tatyana Igorevna — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Scientific Secretary of FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy", Russia

Klimenko Aleksandr Ivanovich — Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of FSBSI "Federal Rostov Agrarian Research Center", Russia

Kochish Ivan Ivanovich — Academician of the RAS, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Head of the Department of Zoohygiene and Poultry Farming of FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K. I. Skryabin", Russia

Maykanov Balgabay Sadepovich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of Veterinary Sanitation of "Kazakh Agro-technical University named after S. Seifullin", Republic of Kazakhstan

Okoniewski Piotr — DVM PhD, member of PTFARM and EAVPT, Poland

Parshin Pavel Andreevich — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy", Russia

Pozyabin Sergey Vladimirovich — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Rector of FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Skryabin", Russia

Rypula Krzysztof — DVM PhD, Professor, Head of Epidemiology Dep., the Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland

Safonov Vladimir Aleksandrovich — Doctor of Biological Sciences, Principal Scientific Associate of Federal State Budgetary Institution of Science of the Order of Lenin and the Order of the October Revolution Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry named after V. I. Vernadsky of the Russian Academy of Sciences (FSBSI IG&AC named after V. I. Vernadsky of the RAS)

Stekolnikov Anatoliy Aleksandrovich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences. Head of the Department of General and Special Surgery of FSBEI HE "St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine", Russia

Chertov Evgeniy Dmitrievich — Doctor of Engineering Sciences, Professor, Head of the Department of FSBEI HE "Voronezh State University of Engineering Technologies", Russia

Yunusov Khudaynazar Beknazarovich — Doctor of Sciences, Academician of the RANS, Rector of Samarkand Institute of Veterinary Medicine, Uzbekistan

Yatusevich Anton Ivanovich — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Academician of the RAS, Head of the Department of Parasitology and Invasive Diseases, EE "Vitebsk Order "Badge of Honour" State Academy of Veterinary Medicine", the Republic of Belarus

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 March 24, 2020)

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	06.02.01 — Diagnosis of diseases and therapy of animals, pathology, oncology and morphology of animals (biological sciences), 06.02.01 — Diagnosis of diseases and therapy of animals, pathology, oncology and morphology of animals (veterinary sciences), 02.06.02 — Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology (biological sciences), 06.02.02 — Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology (veterinary sciences), 06.02.03 — Veterinary pharmacology with toxicology (biological sciences), 06.02.03 — Veterinary Pharmacology with Toxicology (veterinary sciences), 06.02.04 — Veterinary surgery (biological sciences), 06.02.04 — Veterinary surgery (veterinary sciences), 06.02.05 — Veterinary sanitation, ecology, zoohygiene and veterinary and sanitary expertise (biological sciences), 06.02.05 — Veterinary sanitation, ecology, zoohygiene and veterinary and sanitary expertise (veterinary sciences), 06.02.06 — Veterinary obstetrics and biotechnology of animal reproduction (veterinary sciences), 06.02.06 — Veterinary obstetrics and biotechnology of animal reproduction (biological sciences), 06.02.08 — Feed production, feeding of farm animals and feed technology (agricultural sciences), 06.02.08 — Feed production, feeding of farm animals and feed technology (biological sciences), 06.02.10 — Special zootechnics, production technology of livestock products (agricultural sciences)	Since February 28, 2020

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

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

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

The address of the editorial office: 394087 Lomonosova 114b, Voronezh, Russia

Tel./fax + 7 (473) 253-92-81

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

ВЕТЕРИНАРНЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

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



Издается
с июня 2017 года
Периодичность
выпуска —
4 номера в год
Свидетельство
о регистрации
ПИ № ФС 77-69340
от 6 апреля 2017 г.

№ 1 (22) • 2023

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

**Характеристика морфо-функционального состояния
организма лабораторных мышей-опухоленосителей
при применении интерферонсодержащего препарата**

*Востроилова Г. А., Грицюк В. А., Хохлова Н. А., Шабанов Д. И.,
Корчагина А. А., Ермакова Т. И., Некрасов А. В. 8*

**Токсикологическая характеристика водного
раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина
гидрохлорида на лабораторных животных**

Алексеев А. А., Клюкин С. Д., Пудовкин Н. А. 22

**Токсикологическое исследование препарата интерферона
лямбда при его многократном введении белым крысам**

*Хохлова Н. А., Востроилова Г. А., Корчагина А. А., Жуков М. С.,
Шабанов Д. И., Некрасов А. В. 31*

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

**Габитабс — новый подход к лечению
идиопатического цистита кошек**

*Костянко Н. О., Шантыз А. Х., Жолобова И. С., Лысенко Ю. А.,
Марченко Е. Ю., Петрова О. В. 47*

**Профилактическая эффективность
минерально-белковой добавки остеомин при
алиментарной остеодистрофии лактирующих коров**

Савинков А. В., Лаптева Е. И., Наговицина Е. М., Пузиков И. Д. 63

СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ,
ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

Терапевтическая эффективность

Гентабиферона-Б при мастите у коров

Грицюк В. А., Востроилова Г. А., Ческидова Л. В., Зимников В. И. 77

Определение переносимости препарата ВетЛан на кошках

Бушмина А. А., Оробец В. А. 87

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОБИОХИМИЯ
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Иммуногистохимический анализ

**семенников белых лабораторных мышей при
пренатальном введении эстрогенов**

Квочко А. Н., Сулайманова Р. Т. 97

**Оценка влияния цитрата цинка на гематологический
профиль у молодняка кур в раннем онтогенезе**

*Азарнова Т. О., Давлетов А. С., Луговая И. С., Золотухина Е. А.,
Анишаков Д. В. 107*

**Морфобиохимический и иммунологический статус
крови коров при гипофункции яичников**

*Степанов Е. М., Михалев В. И., Скорилов В. Н., Сашина Л. Ю.,
Чусова Г. Г., Сулейманов С. М., Андрианов Е. А. 118*

**Цитокиновый профиль у свиноматок с риском
развития послеродовой патологии в разные
периоды репродуктивного цикла**

*Шахов А. Г., Сашина Л. Ю., Владимирова Ю. Ю., Акулова К. О.,
Никоненко Г. В., Андрианов Е. А. 129*

**Экспериментальное исследование
структурно-функциональных свойств эритроцитов
крови крыс по параметрам осмотических эритрограмм**

*Вели А. А., Сулин В. Ю., Мартынова А. В., Паршин П. А.,
Востроилова Г. А., Ермакова Т. И., Вели Е. Ю. 139*

Условия публикации и правила оформления статей 158

BULLETIN OF VETERINARY PHARMACOLOGY

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



Established
in June, 2017

Published
4 times a year

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

No. 1 (22) • 2023

EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY

Characteristics of the morphofunctional state of the organism of laboratory tumor-bearing mice when using interferon-containing drug

*Vostroilova G. A., Gritsyuk V. A., Khokhlova N. A., Shabanov D. I.,
Korchagina A. A., Ermakova T. I., Nekrasov A. V. 15*

Toxicological characteristics of an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride on laboratory animals

Alekseev A. A., Klyukin S. D., Pudovkin N. A. 27

Toxicological study of the interferon lambda preparation at its multiple administration to white rats

*Khokhlova N. A., Vostroilova G. A., Korchagina A. A., Zhukov M. S.,
Shabanov D. I., Nekrasov A. V. 39*

CLINICAL PHARMACOLOGY

Gabitrabs — a new approach to the treatment of feline idiopathic cystitis

*Kostyanko N. O., Shantyz A. K., Zholobova I. S., Lysenko Yu. A.,
Marchenko E. Yu., Petrova O. V. 55*

Preventive efficacy of the mineral and protein additive osteomin in case of alimentary osteodystrophy in lactating cows

Savinkov A. V., Lapteva E. I., Nagovitsina E. M., Puzikov I. D. 70

AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION,
DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

**Therapeutic efficacy of gentabiferon-b
in case of bovine mastitis**

Gritsyuk V. A., Vostroilova G. A., Cheskidova L. V., Zimnikov V. I. 82

VetLan drug tolerance determination on cats

Bushmina A. A., Orobets V. A. 92

PATHOPHYSIOLOGY, PATHOBIOCHEMISTRY
AND EXPERIMENTAL THERAPY

**Immunohistochemical analysis of the testes of white
laboratory mice with prenatal estrogen administration**

Kvochko A. N., Sulaymanova R. T. 102

**Evaluation of the effect of zinc citrate on the
hematological profile of young hens in early ontogenesis**

*Azarnova T. O., Davletov A. S., Lugovaya I. S., Zolotukhina E. A.,
Anshakov D. V.* 113

**Morphobiochemical and immunological blood
status of cows with ovarian hypofunction**

*Stepanov E. M., Mikhalev V. I., Skorikov V. N., Sashnina L. Yu.,
Chusova G. G., Suleymanov S. M., Andrianov E. A.* 124

**Cytokine profile in sows with the risk of the
postpartum pathology development during
different periods of the reproductive cycle**

*Shakhov A. G., Sashnina L. Yu., Vladimirova Yu. Yu., Akulova K. O.,
Nikonenko G. V., Andrianov E. A.* 134

**Experimental study of the structural and
functional properties of rat blood erythrocytes
by the parameters of osmotic erythrograms**

*Veli A. A., Sulin V. Yu., Martynova A. V., Parshin P. A., Vostroilova G. A.,
Ermakova T. I., Veli E. Yu.* 149

Publishing terms and article formatting requirements 158

Научная статья

УДК 631.528.1:577.182.22:636.028

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.8

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИНТЕРФЕРОНСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА

Галина Анатольевна Востроилова[✉], Василина Александровна Грицюк, Нина Алексеевна Хохлова, Дмитрий Игоревич Шабанов, Анастасия Андреевна Корчагина, Татьяна Игоревна Ермакова, Артем Валерьевич Некрасов

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, e-mail: gvostroilova@mail.ru[✉]

Аннотация. Проведено исследование противоопухолевой и иммуномодулирующей активности интерферонсодержащего препарата («Субмастин-КРС») на модели опухолевого роста асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей при его двукратном введении на 2 и 4 сутки роста АКЭ в дозе 0,1 мг/кг при монотерапии и совместно с противоопухолевым антибиотиком — доксорубицином, в дозе 3,5 мг/кг. В ходе эксперимента были исследованы показатели продолжительности жизни мышей с АКЭ, а также концентрация опухолевых клеток в асцитной жидкости, лейкоцитов крови и их популяций, цитологические препараты тканей селезенки, печени, почек, костного мозга у животных на 10 сутки опухолевого роста. Обнаружено увеличение продолжительности жизни мышей с АКЭ после введения доксорубицина отдельно и совместно с «Субмастином-КРС» относительно животных с АКЭ без лечения. Введение доксорубицина отдельно и в комбинации с препаратом «Субмастин-КРС» мышам с АКЭ приводило к статистически значимому снижению количества клеток в асцитной жидкости и лейкоцитов крови у мышей относительно животных с АКЭ без лечения на 10 сутки опухолевой прогрессии. При этом отмечено значимое снижение числа лейкоцитов, и, в частности, гранулоцитов у животных с АКЭ, получавших комплексное лечение, относительно животных с АКЭ при использовании одного доксорубицина. Таким образом, установлено, что препарат «Субмастин-КРС» не обладает прямой противоопухолевой активностью, однако оказывает иммуномодулирующее действие при комбинированной противоопухолевой терапии с доксорубицином.

Ключевые слова: доклинические исследования, «Субмастин-КРС», доксорубицин, асцитная карцинома Эрлиха, белые мыши, выживаемость, лейкоцитарная формула

Известно, что цитокины имеют чрезвычайно многообразные биологические и фармакологические свойства, что делает их объектом особого внимания со стороны фармакологов при разработке лекарственных средств для клинического применения, в том числе в онкологии [1]. Множество препаратов, содержащих в составе рекомбинантные цитокины, в настоящее время проходят оценку их противоопухолевого действия и влияния на иммунную систему [2].

В современных клинических испытаниях противоопухолевой и/или иммуномодулирующей ак-

тивности препаратов часто используются модели перевиваемых мышинных опухолей [3]. Одной из популярных моделей такого типа выступает асцитная аденокарцинома Эрлиха [4].

Исследователями все больше внимания уделяется использованию цитокинов в комбинированных стратегиях для синергетического усиления иммунитета и терапевтического действия [5]. Доксорубицин является одним из часто назначаемых противоопухолевых препаратов у человека и животных [6], который нарушает синтез нуклеиновых кислот, в связи с интеркаляцией между азоти-

© Востроилова Г. А., Грицюк В. А., Хохлова Н. А., Шабанов Д. И., Корчагина А. А., Ермакова Т. И., Некрасов А. В., 2023

стыми основаниями и генерацией свободных радикалов [7]. Основываясь на взаимодополняющих механизмах действия, доксорубин и иммуномодулирующие препараты могут обеспечить дополнительные преимущества при использовании в комбинированных схемах лечения [8].

Поэтому целью нашей работы являлась оценка противоопухолевых и иммуномодулирующих свойств интерферонсодержащего препарата («Субмастин-КРС») на модели асцитной карциномы Эрлиха у мышей при монотерапии опухоли и в комбинации с противоопухолевым препаратом — доксорубином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная работа была проведена на базе лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем и вивария ФГБНУ «ВНИВИПФиТ» в соответствии с требованиями действующих международных и российских законодательных актов и «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [9], а также требований биоэтической комиссии института. В качестве биологических тест-систем использовали клинически здоровых половозрелых белых беспородных мышей-самцов разведения вивария ФГБНУ «ВНИВИПФиТ». Содержание животных и манипуляции с ними соответствовали Директиве 2010/63/EU от 22.09.2010, Европейской конвенции (ETS123), Strasbourg, 1986,

а также ГОСТ 33216—2014, ГОСТ 33215—2014 [10, 11]. Исследуемым объектом служил интерферонсодержащий препарат («Субмастин-КРС») (ООО «НПЦ «ПроБиоТех», Республика Беларусь), в 1 мл которого содержится смесь видоспецифических для КРС рекомбинантных цитокинов суммарной активностью не менее 10^4 МЕ и 75 000 МЕ витамина А. В качестве противоопухолевого препарата с доказанной эффективностью использовали доксорубин (Доксорубин-Ферейн®, ПАО «Брынцалов-А», РФ) — один из основных представителей сильнодействующего класса химиотерапевтических препаратов — антрациклинов.

Для моделирования асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха использовали семидневную суспензию опухолевых клеток, перевиваемую на белых беспородных лабораторных мышках-самцах массой 18—20 г. Для трансплантации опухоли, подопытным мышам интродуперитонеально вводили по $3 \cdot 10^6$ опухолевых клеток на мышью, разведенных до 0,5 мл раствором Хэнкса.

Для проведения экспериментальной работы было сформировано 5 групп белых беспородных мышей-самцов по $n = 12$ в каждой массой 18—20 г. Дизайн эксперимента представлен в таблице 1. На 10 сут опухолевого роста по 6 животных из каждой группы эвтаназировали путем передозировки CO_2 для получения образцов тканей и органов. За остальными животными вели наблюдение в течение 50 дней для определения продолжительности их жизни.

Таблица 1

Дизайн эксперимента

Группы животных	Асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ)	Препарат
I	$3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл	Изотонический раствор натрия хлорида внутримышечно на 2 и 4 сут в объеме 0,2 мл
II	$3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл	Доксорубин 3,5 мг/кг интраперитонеально на 2 и 4 сут в объеме 0,2 мл
III	$3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл	Доксорубин 3,5 мг/кг интраперитонеально и «Субмастин-КРС» 0,1 мл/кг внутримышечно на 2 и 4 сут в объеме 0,2 мл
IV	$3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл	«Субмастин-КРС» 0,1 мл/кг на 2 и 4 сут в объеме 0,2 мл
V	—	Изотонический раствор натрия хлорида внутримышечно и интродуперитонеально на 2 и 4 сут в объеме 0,2 мл

Для взятия асцитной жидкости животное-опухоленоситель выводили из эксперимента и фиксировали в положении на спине на специальном столике. Кожу с шерстным покровом в области брюшной стенки обрабатывали ватным тампоном, смоченным 70° этиловым спиртом, стерильным шприцем отбирали асцитную жидкость, используя чрезбрюшинный доступ.

Общую концентрацию опухолевых клеток и их жизнеспособность определяли в камере Горяева методом эксклюзии красителя трипанового синего (0,23 %) [12]. Количество лейкоцитов в крови определяли в камере Горяева после лизиса эритроцитов 2,5 % раствором уксусной кислоты [13].

Для цитологического исследования отбирали асцитную жидкость, кровь и ткани селезенки, печени, почек, костного мозга. Цитологические препараты окрашивали по Паппенгейму [14].

Исследование микропрепаратов проводили с помощью микроскопа Биоскоп-1 (ЛОМО, Россия) при увеличении $\times 1000$. Для определения доли

клеток различных типов подсчитывали 200 клеток в препарате.

Для оценки выживаемости мышей (кумулятивной доли выживших) использовали анализ выживания Каплана — Майера, группы сравнивали с помощью Лог-ранк теста [15]. U-тест Майна — Уитни применяли для сравнения других исследуемых показателей между группами животных, с помощью программы STATISTICA 10 (Statsoft, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам эксперимента нами были получены кривые выживаемости мышей из групп, получивших прививку клеток АКЭ (группы I—IV). Средняя продолжительность жизни мышей-опухоленосителей из группы I составила $19,7 \pm 6,71$ сут. Применение доксорубицина (группа II) вызывало статистически значимое повышение средней продолжительности жизни мышей на 57,2 % ($p < 0,05$), продолжительность жизни у таких животных составляла $30,8 \pm 9,62$ сут (рис. 1).

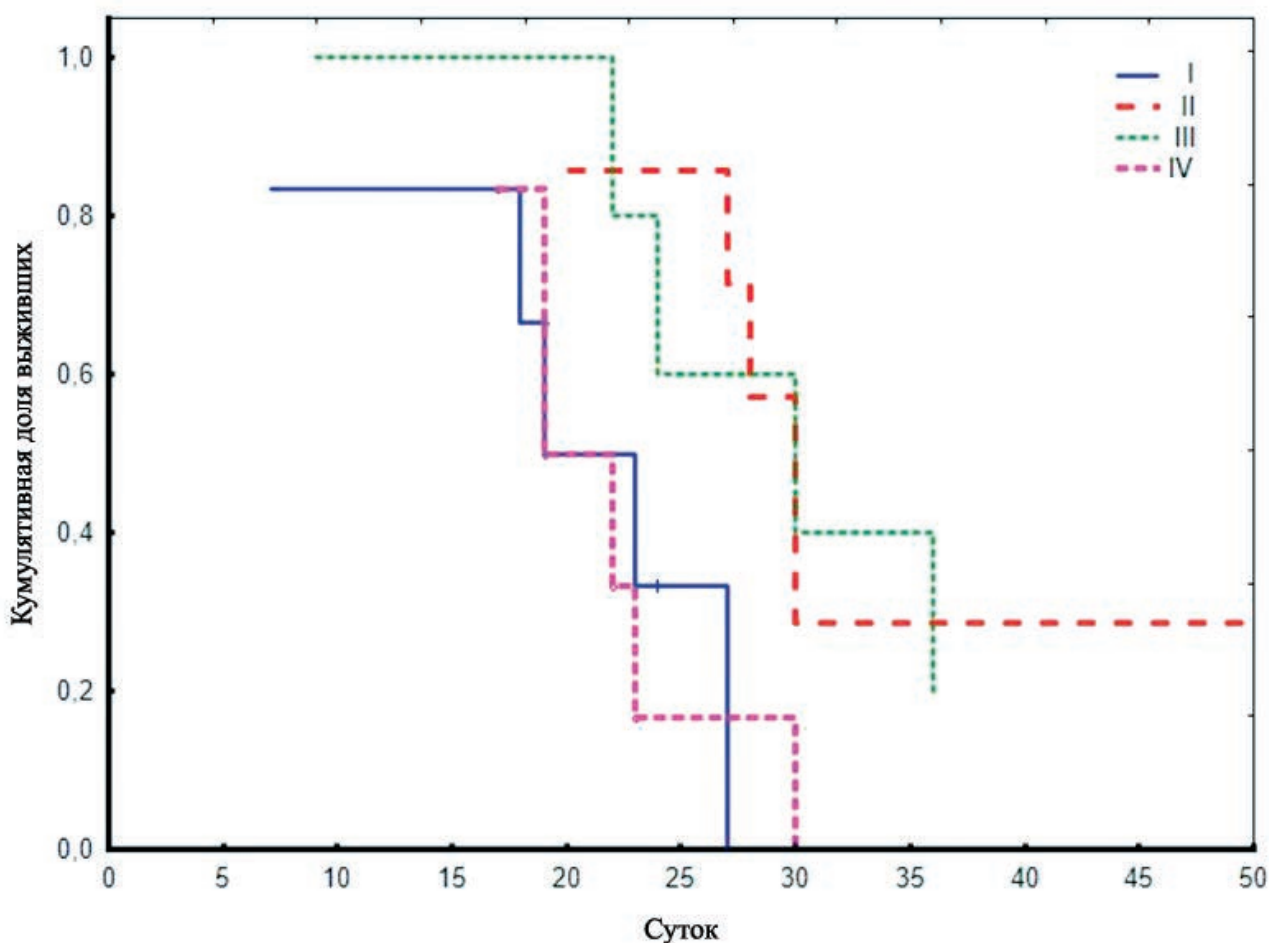


Рис. 1. Кривые кумулятивной выживаемости Каплана — Майера исследуемых групп мышей с асцитной карциномой Эрлиха в условиях эксперимента

Применение доксорубина совместно с «Субмастином-КРС» также приводило к увеличению средней продолжительности жизни на 45,7 % ($p < 0,05$) относительно мышей с АКЭ (группа I), средняя продолжительность жизни мышей группы III составляла $28,7 \pm 10,73$ сут, однако статистически значимо не отличалась от данного показателя группы II. Применение «Субмастина-КРС» у мышей с АКЭ без противоопухолевого препарата (группа IV) не вызывало значимого повышения продолжительности жизни мышей, она составля-

ла $21,67 \pm 4,42$ сут, и была на 29,71 % ($p < 0,05$) ниже, чем в группе II. Таким образом, применение «Субмастина-КРС» совместно с доксорубином вызывало увеличение продолжительности жизни мышей с АКЭ.

В эксперименте нами была определена концентрация клеток в асцитной жидкости мышей исследуемых групп. Около 80—90 % клеток в ней составляли клетки карциномы, однако присутствовали также лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и эритроциты (рис. 2).

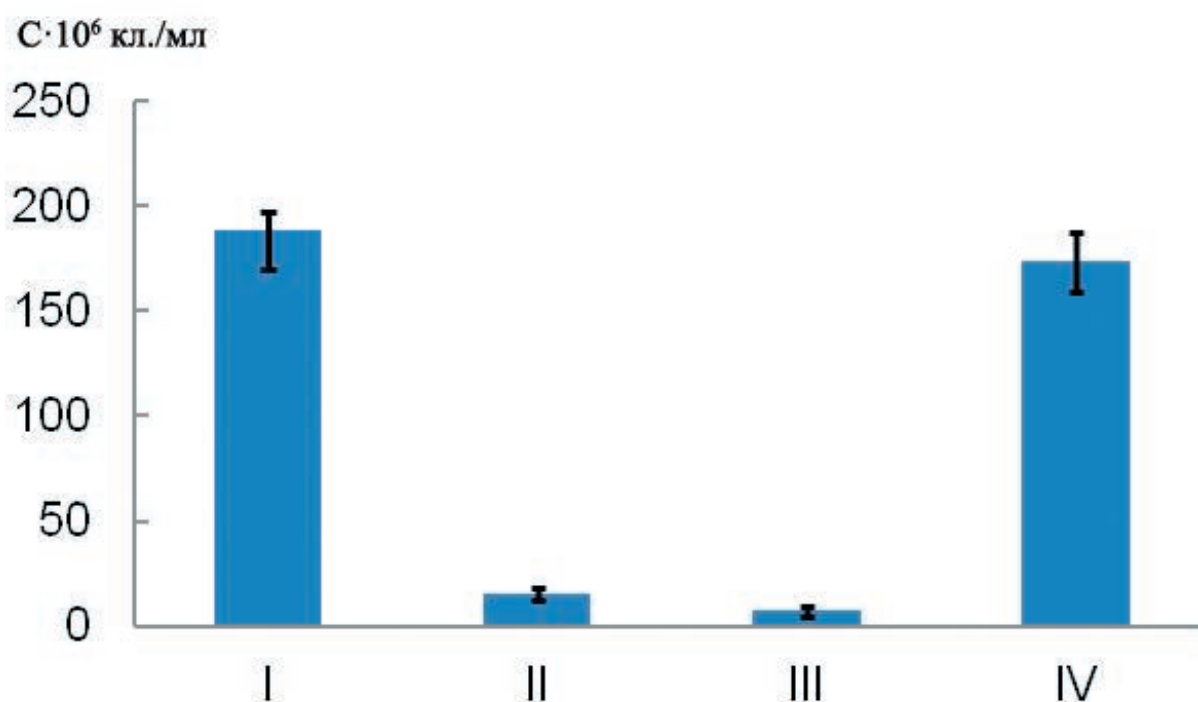


Рис. 2. Концентрация клеток в асцитной жидкости мышей с карциномой Эрлиха на 10 сутки опухолевой прогрессии

Жизнеспособность опухолевых клеток на 10 сут опухолевой прогрессии не имела статистически значимых отличий у всех мышей с АКЭ и была близкой к 100 %.

В группе I число клеток в асцитной жидкости составляло $(189,0 \pm 18,9) \cdot 10^6$ кл/мл. Применение доксорубина приводило к статистически значимому снижению концентрации клеток в перитонеальной полости на 91,9 % ($p < 0,005$), количество клеток в группе II составляло $(15,4 \pm 3,11) \cdot 10^6$ кл/мл.

Использование «Субмастина-КРС» совместно с доксорубином также значимо снижало содержание клеток в асцитной жидкости у мышей группы III на 96,2 % ($p < 0,005$) относительно животных группы I. При этом количество клеток в асците мышей группы III составляло $(7,17 \pm 2,27) \cdot 10^6$ кл/мл

и было в 2,2 раза ниже таковой у мышей группы II. На 10-е сутки опухолевого роста число клеток в асцитной жидкости у мышей, получавших только «Субмастин-КРС» (группа IV) составляло $(179,6 \pm 14,25) \cdot 10^6$ кл/мл и статистически значимо не отличалась от таковой у животных группы I.

Таким образом, препарат «Субмастин-КРС» не вызывал задержку опухолевой прогрессии при его использовании на мышах-опухоленосителях без противоопухолевого препарата, однако приводил к снижению количества опухолевых клеток в асците при его комбинации с доксорубином.

Также нами было определено количество лейкоцитов и их популяций в крови мышей исследуемых групп на 10 сут опухолевого роста (табл. 2, рис. 3).

Таблица 2

Содержание лейкоцитов и некоторых их популяций в крови мышей исследуемых групп

Группа	Лейкоциты $\cdot 10^6$ кл./мл	Лимфоциты $\cdot 10^6$ кл./мл	Моноциты $\cdot 10^6$ кл./мл	Гранулоциты $\cdot 10^6$ кл./мл
I	$22,5 \pm 2,62$	$1,9 \pm 0,44$	$2,0 \pm 0,82$	$18,6 \pm 2,64$
II	$12,4 \pm 1,19^{1,3*}$	$1,9 \pm 0,35$	$0,6 \pm 0,22$	$9,9 \pm 1,13^{1,3*}$
III	$8,8 \pm 1,21^{1*2,3*}$	$1,5 \pm 0,26$	$0,7 \pm 0,17$	$6,6 \pm 1,0^{1*2,3*}$
IV	$18,9 \pm 2,58^{3*}$	$2,7 \pm 0,79$	$1,3 \pm 0,23^{3*}$	$14,9 \pm 2,40^{1*3*}$
V	$3,6 \pm 0,72^{1*}$	$1,6 \pm 0,30$	$0,3 \pm 0,20^{1*}$	$1,7 \pm 0,48^{1*}$

Примечание: $M \pm SE$ (среднее арифметическое \pm стандартная ошибка); $\cdot 10^6$ кл./мл — концентрация клеток $\cdot 10^6$ кл./мл

¹ статистически значимые различия при $p < 0,05$ относительно группы I

^{1*} при $p < 0,005$ относительно группы I

² при $p < 0,05$ относительно группы II

³ при $p < 0,05$ относительно группы V

^{3*} при $p < 0,005$ относительно группы V

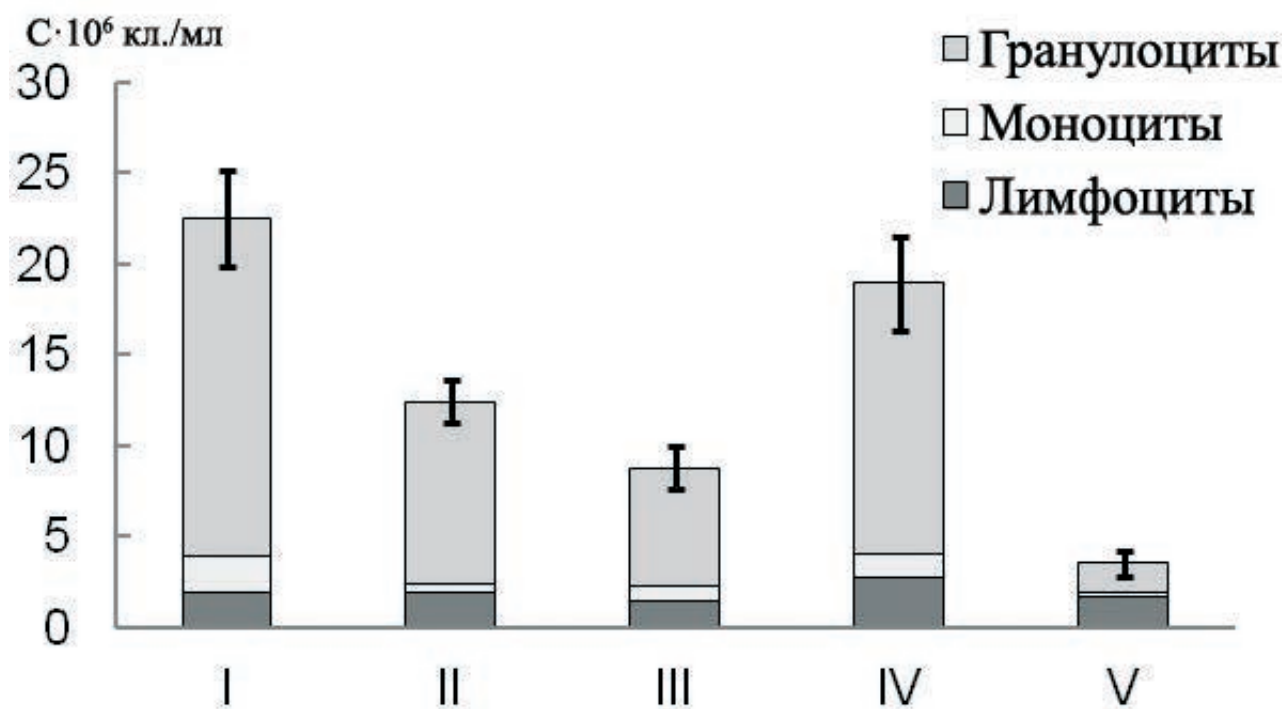


Рис. 3. Концентрация лейкоцитов в крови мышей исследуемых групп на 10 сутки опухолевого роста

В группе I к 10 суткам опухолевого роста наблюдалось увеличение содержания лейкоцитов более чем в шесть раз ($p < 0,005$), относительно количества лейкоцитов у здоровых мышей (группа V). При этом в крови мышей с АКЭ наблюдался выраженный гранулоцитоз и моноцитоз. Число гранулоцитов и моноцитов в группе I возрастало в 33,5

и 6 раз ($p < 0,005$ и $p < 0,05$) соответственно, относительно контрольных животных. Применение доксорубина, как отдельно (группа II), так и совместно с препаратом «Субмастин-КРС» (группа III), снижало концентрацию лейкоцитов на 44,7 и 60,8 % ($p < 0,05$ и $p < 0,005$) за счет уменьшения доли гранулоцитов на 46,3 и 64,7 % ($p < 0,05$

и $p < 0,005$), соответственно, относительно мышей с АКЭ. Основную долю гранулоцитов при этом составляли сегментоядерные нейтрофилы. При этом применение «Субмастина-КРС» совместно с доксорубином (группа III) приводило к снижению количества лейкоцитов на 34,3 % ($p < 0,05$) за счет снижения гранулоцитов на 29,2 % ($p < 0,05$) в крови мышей-опухоленосителей относительно аналогичных показателей у мышей, получавших только доксорубин (Группа II). Применение только «Субмастина-КРС» животным с АКЭ (группа IV) не вызывало статистически значимых изменений лейкоцитов и их популяций в крови мышей относительно животных группы I.

Во всех группах мышей с АКЭ (группы I—IV) не выявлено статистически значимого изменения моноцитов. В тоже время, нами не установлено статистически значимых изменений в содержании лимфоцитов в крови животных всех исследуемых групп. Таким образом, опухолевая прогрессия сопровождалась лейкоцитозом опосредованным гранулоцитозом, и, в частности, нейтрофилезом.

Изучение препаратов мазков-отпечатков таких органов, как костный мозг, печень, селезенка, почки у мышей-опухоленосителей выявило усиленную продукцию гранулоцитов и активацию экстрамедуллярного гематопоэза, а также метастатические опухолевые клетки в группах I—IV.

Накопление гранулоцитов и, в частности, нейтрофилов в крови мышей с АКЭ могло быть вызвано секрецией клетками карциномы ряда таких факторов, как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, медиаторов воспаления (простагландин E2) [16]. Несмотря на неоднозначную роль нейтрофилов в патогенезе опухоли, ряд исследователей определили нейтрофилию в крови и инверсию лейкоцитарной формулы как биомаркер, сопряженный с развитием воспаления, метастазированием, формированием проопухолевого микроокружения, снижением времени жизни, эффективности противоопухолевой терапии, рецидивами и плохим прогнозом [17, 18]. Поэтому снижение количества гранулоцитов, за счет уменьшения концентрации нейтрофилов в крови мышей-опухоленосителей при введении доксорубина совместно с «Субмастином-КРС» (группа III) относительно животных, получавших лечение только противоопухолевым препаратом (группа II) может свидетельствовать об иммуномодулирующем действии «Субмастина-КРС» в комбинированной противоопухолевой терапии. Дан-

ный эффект, возможно, может наблюдаться в связи с входящими в состав препарата рекомбинантными цитокинами. Например, известно, что ИФН- γ может снижать воспалительный процесс и подавлять продукцию гранулоцитов в костном мозге [19]. Для ИФН- α показана прямая противоопухолевая и иммуномодулирующая активности [20]. Известно антипролиферативное и цитостатическое действие ИФН в отношении как нормальных, так и опухолевых клеток [1]. Витамин А, который входит в состав исследуемого нами препарата, также оказывает иммуномодулирующее действие, поскольку является ключевым регулятором функций различных врожденных и адаптивных звеньев иммунитета и способствует иммунному гомеостазу [21]. Отмечено, что снижение концентрации лейкоцитов наблюдается только в группах, получавших инъекции доксорубина, и наибольшее снижение числа лейкоцитов за счет уменьшения количества гранулоцитов получено нами при комбинации доксорубина и цитокинсодержащего препарата. Действительно, другие исследования с применением комбинированной противоопухолевой терапии доксорубином с различными иммуномодуляторами также продемонстрировали снижение числа нейтрофилов вплоть до нейтропении [8]. Вероятно, данный эффект наблюдается в связи с синергетическим действием интерферонсодержащего препарата и доксорубина в отношении клеток опухоли и иммунной системы мышей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных нами экспериментальных данных можно сделать вывод, что препарат «Субмастин-КРС» не проявлял прямого противоопухолевого действия, однако, в комбинации с доксорубином оказывал противоопухолевое действие, выражающееся в снижении содержания опухолевых клеток и увеличении продолжительности жизни мышей-опухоленосителей. Кроме того, совместное применение препаратов доксорубина и «Субмастин-КРС» вызывало уменьшение концентрации лейкоцитов, за счет уменьшения количества нейтрофильных гранулоцитов в крови мышей с опухолями, что может быть следствием иммуномодулирующего действия препарата «Субмастин-КРС» при комбинированной терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Телетаева Г. М. Цитокины и противоопухолевый иммунитет / Г. М. Телетаева // Практическая онкология. 2007. Т. 8. № 4(32). С. 211—218.

2. Berraondo P., Sanmamed M. F., Ochoa M. C., Etxeberria I., Aznar M. A., Pérez-Gracia J.L., Rodríguez-Ruiz M.E., Ponz-Sarvisé M., Castañón E., Melero I. Cytokines in clinical cancer immunotherapy // *Br. J. Cancer*. 2019. Vol. 120(1). P. 6—15. doi: 10.1038/s41416—018—0328-y.
3. Мусеева Е. В. Тестирование препаратов с противоопухолевой и/или иммуномодулирующей активностью на системе спонтанных мышинных моделей рака молочных желез и лимфолейкоза // *Российский биотерапевтический журнал*. 2008. Т. 7. № 2. С. 40—48.
4. Ozaslan M., Karagoz I., Kilic I., Guldur M. Ehrlich ascites carcinoma // *African journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 10. P. 2375—2378.
5. Yang Y., Lundqvist A. Immunomodulatory Effects of IL-2 and IL-15 Implications for Cancer Immunotherapy // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12 (12). P. 3586. doi: 10.3390/cancers12123586.
6. Якунина М. Н. Современный подход к лекарственной терапии спонтанного рака молочной железы у собак и кошек // *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные*. 2014. № 2. С. 38—41.
7. Мазукина Е. В., Шекунова Е. В., Гуцин Я. А., Фаустова Н. М. Апробация моделей кардиотоксичности, индуцированной доксорубицином, на крысах и кроликах // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021. № 4. С. 40—55. doi 10.29296/2618723X-2021-04-05.
8. Chanan-Khan A.A., Lee K. Pegylated liposomal doxorubicin and immunomodulatory drug combinations in multiple myeloma: rationale and clinical experience. // *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007. Suppl 4. S. 163—169. doi: 10.3816/clm.2007.s.018.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. — М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
10. ГОСТ 33215—2014. «Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». Дата введения 2016-07-01.
11. ГОСТ 33216—2014. «Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Дата введения 2016—07—01.
12. Инжеваткин Е. В. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха. Метод. разработка. Красноярск: Красноярский Государственный Университет. 2004. 10 с.
13. Люмина А. Я. и др. Клинические лабораторные исследования. М.: Медицина, 1984. 288 с.
14. Сулейманов С. М., Гребенщиков А. В., Михайлов Е. В. и др. Методы морфологических исследований 2-е издание, испр. и доп. ГНУ ВНИВИПФиТ. Воронеж, 2007. 87 с.
15. Schober P. Kaplan-Meier, Vetter Curves T. Log-Rank Tests, and Cox Regression for Time-to-Event Data // *Anesth Analg*. 2021. Vol. 132 (4). P. 969—970. doi: 10.1213/ANE.0000000000005358.
16. de Morales J. R., Vélez D., Subiza J. L. Ehrlich tumor stimulates extramedullary hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells // *Exp Hematol*. 1999. Vol. 27 (12). P. 1757—1767. doi: 10.1016/s0301—472x(99)00119—8.
17. Bergami-Santos P.C., Mariano M., Barbuto J. A. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice // *Life Sci*. 2004. 75(2). P. 245—255. doi: 10.1016/j.lfs.2004.02.003.
18. Schernberg A., Blanchard P., Chargari C. Deusch Neutrophils, a candidate biomarker and target for radiation therapy? // *Acta Oncol*. 2017. Vol. 56 (11). P. 1522—1530. doi: 10.1080/0284186X.2017.1348623.
19. Nandi B., Behar S. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection // *J Exp Med*. 2011. 208 (11). P. 2251—2262. doi: 10.1084/jem.20110919.
20. Berraondo P., Sanmamed M., Ochoa M. et al. Etxeberria, Cytokines in clinical cancer immunotherapy // *Br. J. Cancer*. 2019. Vol. 120 (1). P. 6—15. doi: 10.1038/s41416—018—0328-y.
21. Midha I. K., Kumar N., Kumar A., Madan T. Mega doses of retinol: A possible immunomodulation in Covid-19 illness in resource-limited setting кандидат ветеринарных наук gs. // *Rev Med Virol*. 2021. Vol. 31 (5). P. 1—14. doi: 10.1002/rmv.2204.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- Г. А. Востроилова** — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;
В. А. Грицюк — кандидат сельскохозяйственных наук, докторант;
Н. А. Хохлова — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
Д. И. Шабанов — научный сотрудник;
А. А. Корчагина — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
Т. И. Ермакова — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник;
А. В. Некрасов — старший лаборант.

Статья поступила в редакцию 25.01.2023 г.

CHARACTERISTICS OF THE MORPHOFUNCTIONAL STATE
OF THE ORGANISM OF LABORATORY TUMOR-BEARING
MICE WHEN USING INTERFERON-CONTAINING DRUG

Galina Anatolyevna Vostroilova[✉], Vasilina Aleksandrovna Gritsyuk,
Nina Alekseevna Khokhlova, Dmitriy Igorevich Shabanov, Anastasiya Andreevna Korchagina,
Tatyana Igorevna Ermakova, Artem Valeryevich Nekrasov

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and
Therapy, Voronezh, Russia, e-mail: gvostroilova@mail.ru[✉]

Abstract. The study of the antitumor and immunomodulatory activity of interferon-containing drug (“Submastin-KRS”) was carried out on a tumor model of Ehrlich ascites carcinoma (ACE) in mice. The drug was administered twice on days 2 and 4 of ACE growth at a dose of 0.1 ml/kg in monotherapy and together with an antitumor antibiotic (doxorubicin) at a dose of 3.5 mg/kg. In the course of the experiment, the life expectancy of mice with ACE was studied, as well as the concentration of tumor cells in the ascitic fluid, blood leukocytes and their populations, cytological specimens of the spleen, liver, kidney and bone marrow tissues in animals on day 10 of tumor growth. An increase in the life expectancy of mice with ACE was found after the administration of doxorubicin alone and together with “Submastin-KRS” relative to the animals with ACE without treatment. The administration of doxorubicin alone and in combination with “Submastin-KRS” to mice with ACE resulted in a statistically significant decrease in the concentration of cells in the ascitic fluid and blood leukocytes in the animals with ACE without treatment on day 10 of tumor progression. At the same time, a significant decrease in the concentration of leukocytes and, in particular, granulocytes was noted in the animals with ACE receiving complex treatment, compared with the animals with ACE when using doxorubicin alone. Thus, it has been found that the drug “Submastin-KRS” does not have a direct antitumor activity, however, it has an immunomodulatory effect in combined antitumor therapy with doxorubicin.

Keywords: preclinical studies, “Submastin-KRS”, doxorubicin, Ehrlich ascites carcinoma, white mice, survival rate, leucogram

It is known that cytokines have extremely diverse biological and pharmacological properties, which makes them an object of special attention on the part of pharmacologists when designing drugs for clinical use, including in case of oncology [1]. Many drugs containing recombinant cytokines are currently being evaluated for their antitumor effect and effect on the immune system [2].

In modern clinical trials of antitumor and/or immunomodulatory activity of drugs, models of transplanted mouse tumors are often used [3]. One of the popular models of this type is Ehrlich ascites adenocarcinoma [4].

Researchers are increasingly focusing on the use of cytokines in combined strategies for synergistic

enhancement of immunity and therapeutic action [5]. Doxorubicin is one of the commonly prescribed anticancer drugs in humans and animals [6], which disrupts the synthesis of nucleic acids due to intercalation between nitrogenous bases and the generation of free radicals [7]. Based on complementary mechanisms of action, doxorubicin and immunomodulatory drugs may provide additional benefits when used in combination regimens [8].

Therefore, the objective of our work was to evaluate the antitumor and immunomodulatory properties of interferon-containing drug (“Submastin-KRS”) on the model of Ehrlich ascites carcinoma in mice with tumor monotherapy and in combination with the antitumor drug Doxorubicin.

MATERIAL AND METHODS

Experimental work was carried out on the basis of the Laboratory of Preclinical Studies and Simulation of Biological Systems and the vivarium of FSBSI “ARVRIPP&T” in accordance with the requirements of the current international and Russian legislative acts and the Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs [9], as well as the requirements of the bioethical commission of the Institute. As biological test systems, there were used clinically healthy sexually mature white outbred male mice bred in the vivarium of FSBSI “ARVRIPP&T”. The keeping of animals and manipulations with them complied with the Directive 2010/63/EU dtd. September 22, 2010, the European Convention (ETS123), Strasbourg, 1986, as well as GOST 33216—2014, GOST 33215—2014 [10, 11]. The test object was interferon-containing drug (“Submastin-KRS”) (LLC “NPTs “ProBioTech”, Republic of Belarus), 1 ml of which contains a mixture of species-specific recombinant cytokines for cattle with a total activity of at least 10⁴ IU and 75000 IU of vitamin A. As an antitumor drug with a proven efficacy there was used doxorubicin (Doxorubicin-Ferein®, PJSC “Bryntsalov-A”, RF) — one of the main representa-

tives of a potent class of chemotherapeutic drugs — anthracyclines.

To simulate the ascitic variant of Ehrlich adenocarcinoma, a seven-day suspension of tumor cells was used, transplanted into white outbred laboratory male mice weighing 18—20 g. For tumor transplantation, experimental mice were intraperitoneally injected with 3·10⁶ tumor cells per mouse, diluted to 0.5 ml with Hanks’ solution.

To carry out the experimental work, 5 groups of white outbred male mice were formed, *n* = 12 in each, weighing 18—20 g. The experiment design is presented in Table 1. On day 10 of tumor growth, 6 animals from each group were euthanized by CO₂ overdose to obtain samples of tissues and organs. The rest of the animals were observed for 50 days to determine their life expectancy.

To collect ascitic fluid, the tumor-bearing animal was taken out of the experiment and fixed in a supine position on a special table. The skin with wool in the area of the abdominal wall was treated with a cotton swab moistened with 70° ethyl alcohol, ascitic fluid was taken with a sterile syringe using transperitoneal access.

Table 1

Experiment Design

Groups of animals	Ehrlich ascites carcinoma (ACE)	Drug
I	3·10 ⁶ cells/ml intraperitoneally in a volume of 0.5 ml	Isotonic sodium chloride solution intramuscularly on days 2 and 4 in a volume of 0.2 ml
II	3·10 ⁶ cells/ml intraperitoneally in a volume of 0.5 ml	Doxorubicin 3.5 mg/kg intraperitoneally on days 2 and 4 in a volume of 0.2 ml
III	3·10 ⁶ cells/ml intraperitoneally in a volume of 0.5 ml	Doxorubicin 3.5 mg/kg intraperitoneally and “Submastin-KRS” 0.1 ml/kg intramuscularly on days 2 and 4 in a volume of 0.2 ml
IV	3·10 ⁶ cells/ml intraperitoneally in a volume of 0.5 ml	“Submastin-KRS” 0.1 ml/kg on days 2 and 4 in a volume of 0.2 ml
V	—	Isotonic sodium chloride solution intramuscularly and intraperitoneally on days 2 and 4 in a volume of 0.2 ml

The total concentration of tumor cells and their viability were determined in the Goryaev chamber by trypan blue dye exclusion (0.23 %) [12]. The number of leukocytes in the blood was determined in the Goryaev chamber after lysis of erythrocytes with a 2.5 % solution of acetic acid [13].

Ascitic fluid, blood and tissues of the spleen, liver, kidneys and bone marrow were taken for cytological examination. Cytological specimens were stained according to Pappenheim [14]. Microspecimens were studied using a Bioscope-1 microscope (LOMO, Russia) at a magnification of ×1000. To determine the pro-

portion of cells of various types, 200 cells were counted in the specimen.

To assess the survival of mice (the cumulative proportion of survivors), Kaplan — Meier survival analysis was used, groups were compared using the Log-rank test [15]. The Mine — Whitney U-test was used to compare other studied indicators among groups of animals using the STATISTICA 10 program (Statsoft, USA).

STUDY RESULTS

According to the results of the experiment, we obtained survival curves for mice from groups that received ACE cells inoculation (groups I—IV). The average life expectancy of tumor-bearing mice from group I was 19.7 ± 6.71 days. The use of doxorubicin (group II) caused a statistically significant increase in the average lifespan of mice by 57.2 % ($p < 0.05$), the lifespan in such animals was 30.8 ± 9.62 days (Fig. 1).

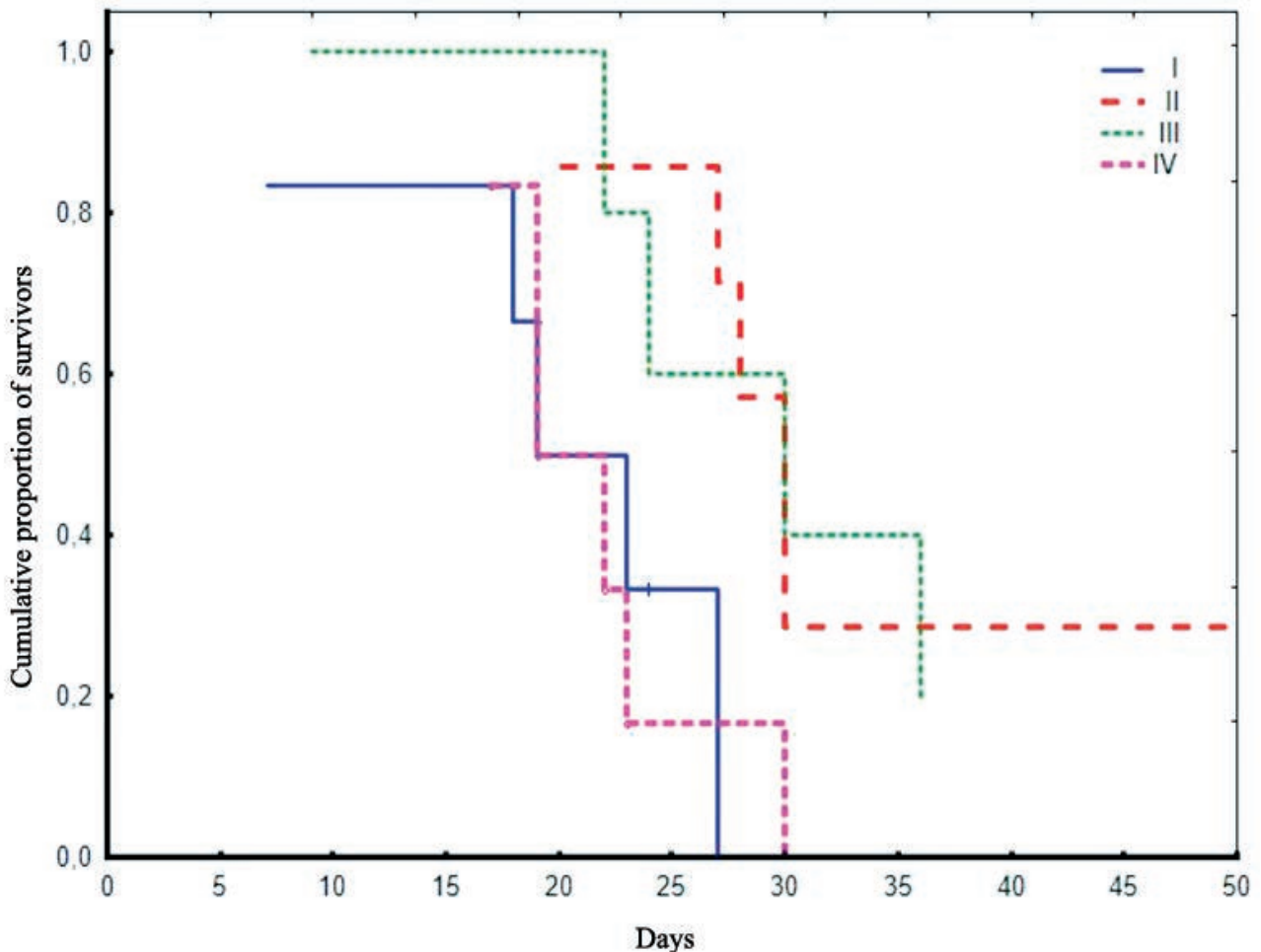


Fig. 1. Kaplan — Meier survival curves of experimental groups of mice with Ehrlich ascites carcinoma

The use of doxorubicin together with “Submastin-KRS” also led to an increase in the average lifespan by 45.7 % ($p < 0.05$) relative to mice with ACE (group I), the average lifespan of mice in group III was $28.7 \pm 10, 73$ days, however, did not differ statistically significantly from this indicator of group II. The use of “Submastin-KRS” in mice with ACE without an antitumor drug (group IV) did not cause a significant increase in the life expectancy of mice, it was 21.67 ± 4.42 days, and was by 29.71 % ($p < 0.05$) lower than in group II.

Thus, the use of “Submastin-KRS” together with doxorubicin caused an increase in the life expectancy of mice with ACE.

In the experiment, we determined the concentration of cells in the ascitic fluid of mice of the studied groups. About 80—90 % of the cells in it were carcinoma cells, but there were also lymphocytes, monocytes, neutrophils and erythrocytes (Fig. 2). The viability of tumor cells on day 10 of tumor progression had no statistically significant differences in all mice with ACE and was close to 100 %.

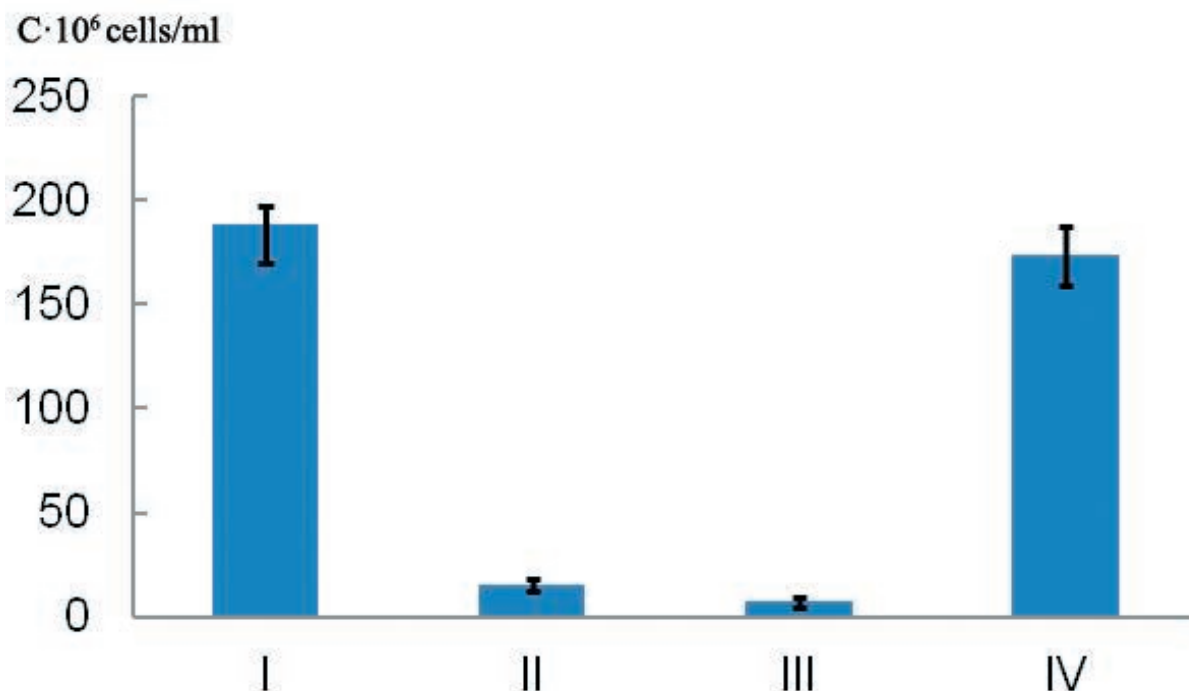


Fig. 2. Concentration of cells in the ascitic fluid of mice with Ehrlich carcinoma on day 10 of tumor progression

In group I, the number of cells in the ascitic fluid was $(189.0 \pm 18.9) \cdot 10^6$ cells/ml. The use of doxorubicin led to a statistically significant decrease in the concentration of cells in the peritoneal cavity by 91.9 % ($p < 0.005$), the number of cells in group II was $(15.4 \pm 3.11) \cdot 10^6$ cells/ml. The use of “Submastin-KRS” together with doxorubicin also significantly reduced the content of cells in the ascitic fluid in mice of group III by 96.2 % ($p < 0.005$) relative to the animals of group I. At the same time, the number of cells in the ascites of mice of group III was $(7.17 \pm 2.27) \cdot 10^6$ cells/ml and was by 2.2 times lower than that in mice of group II. On day 10 of tumor growth, the number of cells in the ascitic fluid in the mice treated only with “Submastin-KRS” (group IV) was $(179.6 \pm 14.25) \cdot 10^6$ cells/ml and did not statistically significantly differ from that in the animals of group I. Thus, the drug “Submastin-KRS” did not cause a delay in tumor progression when it was used on tumor-bearing mice without an antitumor drug, however, it led to a decrease in the number of tumor cells in ascites when it was combined with doxorubicin.

We also determined the number of leukocytes and their populations in the blood of mice of the studied groups on day 10 of tumor growth (Table 2, Fig. 3).

In group I, by day 10 of tumor growth, an increase in the content of leukocytes was observed by more than six times ($p < 0.005$), relative to the number of leukocytes in healthy mice (group V). At the same time, pro-

nounced granulocytosis and monocytosis were observed in the blood of mice with ACE. The number of granulocytes and monocytes in group I increased by 33.5 and 6 times ($p < 0.005$ and $p < 0.05$), respectively, relative to control animals. The use of doxorubicin, both separately (group II) and in combination with “Submastin-KRS” (group III), reduced the concentration of leukocytes by 44.7 and 60.8 % ($p < 0.05$ and $p < 0.005$) due to a decrease in the proportion of granulocytes by 46.3 and 64.7 % ($p < 0.05$ and $p < 0.005$), respectively, relative to mice with ACE. The main proportion of granulocytes were segmented neutrophils. At the same time, the use of “Submastin-KRS” together with doxorubicin (group III) led to a decrease in the number of leukocytes by 34.3 % ($p < 0.05$) due to a decrease in granulocytes by 29.2 % ($p < 0.05$) in the blood of tumor-bearing mice relative to the mice treated with doxorubicin alone (group II). The use of only “Submastin-KRS” to animals with ACE (group IV) did not cause statistically significant changes in leukocytes and their populations in the blood of mice relative to the animals of group I.

In all groups of mice with ACE (groups I—IV), no statistically significant changes in monocytes were detected. At the same time, we did not establish statistically significant changes in the blood content of lymphocytes in the animals of all the studied groups. Thus, tumor progression was accompanied by granulocytosis-mediated leukocytosis, and, in particular, neutrophilia.

Table 2

Blood content of leukocytes and some of their populations in experimental mice

Group	Leukocytes C·10 ⁶ cells/ml	Lymphocytes C·10 ⁶ cells/ml	Monocytes C·10 ⁶ cells/ml	Granulocytes C·10 ⁶ cells/ml
I	22.5 ± 2.62	1.9 ± 0.44	2.0 ± 0.82	18.6 ± 2.64
II	12.4 ± 1.19 ^{1,3*}	1.9 ± 0.35	0.6 ± 0.22	9.9 ± 1.13 ^{1,3*}
III	8.8 ± 1.21 ^{1*2,3*}	1.5 ± 0.26	0.7 ± 0.17	6.6 ± 1.0 ^{1*2,3*}
IV	18.9 ± 2.58 ^{3*}	2.7 ± 0.79	1.3 ± 0.23 ^{3*}	14.9 ± 2.40 ^{1*3*}
V	3.6 ± 0.72 ^{1*}	1.6 ± 0.30	0.3 ± 0.20 ^{1*}	1.7 ± 0.48 ^{1*}

Note: M ± SE (arithmetic mean ± standard error); C·10⁶ cells/ml — cell concentration·10⁶ cells/ml

¹ statistically significant differences at $p < 0.05$ relative to group I

^{1*} at $p < 0.005$ relative to group I

² at $p < 0.05$ relative to group II

³ at $p < 0.05$ relative to group V

^{3*} at $p < 0.005$ relative to group V

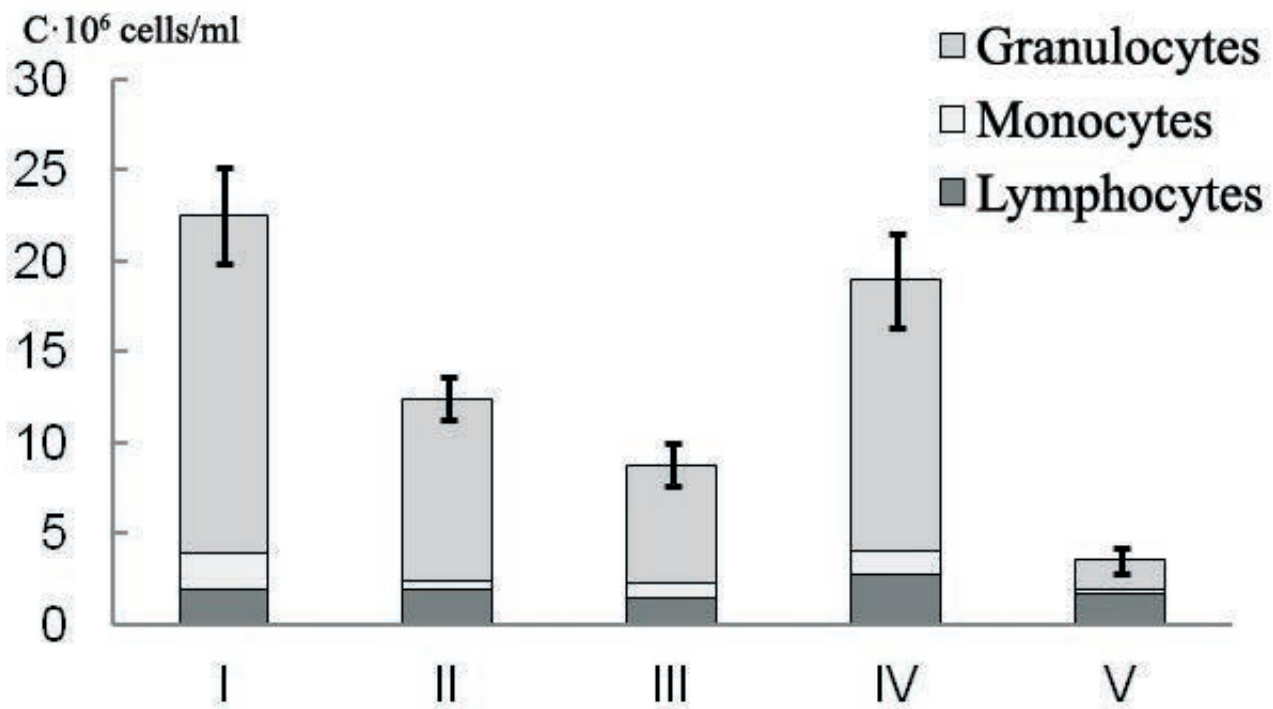


Fig. 3. Blood concentration of leukocytes in the mice of the studied groups on day 10 of tumor growth

The study of specimens of smears-prints of organs such as bone marrow, liver, spleen, kidneys in tumor-bearing mice revealed increased production of granulocytes and activation of extramedullary hematopoiesis, as well as metastatic tumor cells in groups I—IV.

The accumulation of granulocytes and, in particular, neutrophils in the blood of mice with ACE could

be caused by the secretion by carcinoma cells of a number of factors such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, granulocyte colony-stimulating factor, and inflammatory mediators (prostaglandin E₂) [16]. Despite the ambiguous role of neutrophils in tumor pathogenesis, a number of researchers have identified blood neutrophilia and leukocyte count inversion as a biomarker associated with the de-

velopment of inflammation, metastasis, the formation of a protumor microenvironment, a decrease in survival time, the efficacy of antitumor therapy, relapses and poor prognosis [17, 18]. Therefore, a decrease in the number of granulocytes due to a decrease in the blood concentration of neutrophils in the tumor-bearing mice with the introduction of doxorubicin together with “Submastin-KRS” (group III) relative to the animals treated only with an antitumor drug (group II) may indicate an immunomodulatory effect of “Submastin-KRS” in combined anticancer therapy. This effect, possibly, can be observed in connection with the recombinant cytokines included in the drug. For example, it is known that IFN- γ can reduce the inflammatory process and suppress the production of granulocytes in the bone marrow [19]. IFN- α has been shown to have direct antitumor and immunomodulatory activities [20]. Antiproliferative and cytostatic effects of IFN are known for both normal and tumor cells [1]. Vitamin A, which is part of the drug we are studying, also has an immunomodulatory effect, since it is a key regulator of the functions of various innate and adaptive parts of the immune system and promotes immune homeostasis [21]. It was noted that a decrease in the concentration of leukocytes was observed only in the groups that were given injections of doxorubicin, and the greatest decrease in the number of leukocytes due to a decrease in the number of granulocytes was obtained by us with a combination of doxorubicin and a cytokine-containing drug. Indeed, other studies using combined antitumor therapy with doxorubicin and various immunomodulators have also demonstrated a decrease in the number of neutrophils up to neutropenia [8]. This effect is probably observed in connection with the synergistic effect of the interferon-containing drug and doxorubicin in relation to tumor cells and the immune system of mice.

CONCLUSION

Based on the experimental data obtained by us, we can conclude that the drug “Submastin-KRS” did not show a direct antitumor effect, however, in combination with doxorubicin, it had an antitumor effect, expressed in a decrease in the content of tumor cells and an increase in the life expectancy of tumor-bearing mice. In addition, the combined use of doxorubicin and “Submastin-KRS” caused a decrease in the concentration of leukocytes, due to a decrease in the number of neutrophilic granulocytes in the blood of mice with tumors, which may be a consequence of the immunomodulatory effect of “Submastin-KRS” in combined therapy.

REFERENCES

1. *Teletaeva G. M.* Cytokines and antitumor immunity / G. M. Teletaeva // *Prakticheskaya onkologiya (Practical oncology)*. 2007. V. 8. No. 4(32). P. 211—218.
2. *Berraondo P., Sanmamed M. F., Ochoa M. C., Etxeberria I., Aznar M. A., Pérez-Gracia J.L., Rodríguez-Ruiz M.E., Ponz-Sarvisé M., Castañón E., Melero I.* Cytokines in clinical cancer immunotherapy // *Br. J. Cancer*. 2019. Vol. 120(1). P. 6—15. doi: 10.1038/s41416—018—0328-y.
3. *Moiseeva E. V.* Testing drugs with antitumor and/or immunomodulatory activity on a system of spontaneous mouse models of mammary gland cancer and lymphocytic leukemia // *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal (Russian Journal of Biotherapy)*. 2008. V. 7. No. 2. P. 40—48.
4. *Ozaslan M., Karagoz I., Kilic I., Guldur M.* Ehrlich ascites carcinoma // *African journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 10. P. 2375—2378.
5. *Yang Y., Lundqvist A.* Immunomodulatory Effects of IL-2 and IL-15 Implications for Cancer Immunotherapy // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12 (12). P. 3586. doi: 10.3390/cancers12123586.
6. *Yakunina M. N.* Modern approach to drug therapy of spontaneous mammary gland cancer in dogs and cats // *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye (Russian Veterinary Journal. Small domestic and wild animals)*. 2014. No. 2. P. 38—41.
7. *Mazukina E. V., Shekunova E. V., Gushchin Ya.A., Faustova N. M.* Approbation of models of cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats and rabbits // *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy (Laboratory animals for scientific research)*. 2021. No. 4. P. 40—55. doi: 10.29296/2618723X-2021—04—05.
8. *Chanan-Khan A.A., Lee K.* Pegylated liposomal doxorubicin and immunomodulatory drug combinations in multiple myeloma: rationale and clinical experience. // *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007. Suppl 4. P. 163—169. doi: 10.3816/clm.2007.s.018.
9. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. — M.: Grif and K. 2012. 944 p.
10. GOST 33215—2014. Interstate standard. Guidelines for keeping and care of laboratory animals. Rules for equipping premises and organizing procedures. Date of validity 2016—07—01.
11. GOST 33216—2014. Interstate standard. Guidelines for keeping and care of laboratory animals. Date of validity 2016—07—01.
12. *Inzhevatin E. V.* Workshop on experimental oncology on the example of Ehrlich ascites carcinoma. Method. manual. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk State University. 2004. 10 p.
13. *Lyumina A. Ya. et al.* Clinical laboratory research. Moscow: Meditsina (Medicine), 1984. 288 p.
14. *Suleymanov S. M., Grebenshchikov A. V., Mikhaylov E. V. et al.* Methods of morphological studies 2nd edition, revised and enlarged. GNU VNIVIPfIT (SSIAVRIPP&T). Voronezh, 2007. 87 p.

15. Schober P. Kaplan-Meier, Vetter Curves T. Log-Rank Tests, and Cox Regression for Time-to-Event Data // *Anesth Analg*. 2021. Vol. 132 (4). P. 969—970. doi: 10.1213/ANE.0000000000005358.
16. de Morales J. R., Vélez D., Subiza J. L. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells // *Exp Hematol*. 1999. Vol. 27 (12). P. 1757—1767. doi: 10.1016/s0301—472x(99)00119—8.
17. Bergami-Santos P.C., Mariano M., Barbuto J. A. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice // *Life Sci*. 2004. 75(2). P. 245—255. doi: 10.1016/j.lfs.2004.02.003.
18. Schernberg A., Blanchard P., Chargari C. Deusch Neutrophils, a candidate biomarker and target for radiation therapy? // *Acta Oncol*. 2017. Vol. 56 (11). P. 1522—1530. doi: 10.1080/0284186X.2017.1348623.
19. Nandi B., Behar S. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection // *J Exp Med*. 2011. 208 (11). P. 2251—2262. doi: 10.1084/jem.20110919.
20. Berraondo P., Sanmamed M., Ochoa M. et al. Etxeberria, Cytokines in clinical cancer immunotherapy // *Br. J. Cancer*. 2019. Vol. 120 (1). P. 6—15. doi: 10.1038/s41416—018—0328-y.
21. Midha I. K., Kumar N., Kumar A., Madan T. Mega doses of retinol: A possible immunomodulation in Covid-19 illness in resource-limited settings. // *Rev Med Virol*. 2021. Vol. 31 (5). P. 1—14. doi: 10.1002/rmv.2204.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- G. A. Vostroilova** — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;
V. A. Gritsyuk — Candidate of Agricultural Sciences, Doctoral Student;
N. A. Khokhlova — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
D. I. Shabanov — Scientific Associate;
A. A. Korchagina — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
T. I. Ermakova — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate;
A. V. Nekrasov — Senior Laboratory Assistant.


The article was submitted 25.01.2023


Научная статья

УДК 619:615:038.28:648.61

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.22

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДНОГО РАСТВОРА ФУЛЛЕРЕНА C₆₀, РЕСВЕРАТРОЛА И БЕТАИНА ГИДРОХЛОРИДА НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Алексей Александрович Алексеев, Сергей Дмитриевич Клюкин,
Николай Александрович Пудовкин 

*Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии
имени Н. И. Вавилова, Саратов, Россия, e-mail: niko-pudovkin@yandex.ru *

Аннотация. В статье изложены результаты исследований острой токсичности соединений водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида для лабораторных животных, а также влияние данного соединения на процессы перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы защиты организма. Острую токсичность соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида определяли на белых крысах и белых мышах, которые предварительно были разделены на 5 опытных групп и контрольную, крысам препарат вводили подкожно в объеме 1,0 мл, мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 14 суток после введения соединения. Животные, получавшие фармакологическую композицию на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида в изучаемых дозах в течение всего периода наблюдения (14 суток) активно передвигались по клеткам, по пищевому и питьевому поведению мало отличались от крыс контрольной группы, адекватная реакция на внешние раздражители (звук, свет) была на уровне контроля. У мышей в первые сутки после введения изучаемого соединения отмечалось угнетение, отказ от корма и воды. На протяжении всего эксперимента отмечали согласованные, скоординированные движения, отсутствие параличей. Слизистые оболочки были розового цвета без патологических изменений. В течение опыта животные реагировали на внешние (звуковые) раздражители. Так же в сыворотке крови опытных животных проводили исследование уровня диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и активности каталазы для оценки и контроля уровня оксидативного стресса на фоне применения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Установлено, что при подкожном введении белым крысам в дозе 5000 мг/кг изучаемое соединение вызывает незначительное повышение содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сыворотке крови, а так же активизацию фермента каталазы. Результаты исследований и наблюдений за подопытными животными в течение 14 дней позволяют нам отнести разработанную инъекционную форму к IV классу опасности и к группе малотоксичных веществ.

Ключевые слова: водный раствор фуллерена, острая токсичность, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, каталаза.

Благодарность: работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-26-00019 «Разработка антиоксидантных и противоопухолевых ветеринарных препаратов на основе нанофуллеренов»

ВВЕДЕНИЕ

Фуллерены представляют собой новую группу молекул, состоящую из углерода. Они бывают сферическими (бакиболы), эллипсоидальными или цилиндрическими (углеродные нанотрубки) и имеют широкий спектр технологических и медицинских применений. Однако рост их производства и ис-

пользования вызвал опасения по поводу их потенциальной токсичности [5].

Фуллерены представляют собой группу молекул, и их токсичность может различаться, поскольку она зависит от размера молекулы, состава, свойств поверхности и функционализации. Кроме того, токсичность фуллеренов может быть связана

с используемыми растворителями и их побочными продуктами, а также с примесями металлов [6, 9].

В доступной литературе встречаются противоречивые данные по механизму токсического действия фуллеренов. Высокие дозы соединений способны вызывать окислительный стресс за счет образования активных форм кислорода. Другими механизмами являются активация каспазы 3/7, которая может привести к апоптозу, дестабилизации лизосомальной мембраны и снижению потенциала митохондриальной мембраны, повреждению мембраны и ДНК. Фуллерены также могут усиливать экспрессию генов, связанных с воспалительным процессом, активностью металлоэндопептидаз и реакцией иммунной системы. Кроме того, нарушение фагоцитоза из-за волокнистой формы длинных углеродных нанотрубок может привести к негативным последствиям [2, 11].

Однако другие исследования сообщают об отсутствии летального исхода после воздействия высоких доз коллоидных фуллеренов на эпидермальные и бактериальные клетки человека, отсутствии острой или подострой токсичности фуллеренов и антиоксидантных свойств, а также об отсутствии генотоксичности, фототоксичности и прооксидантной активности водорастворимых фуллеренов [1, 11].

Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить точную токсичность каждой молекулы фуллереновой группы для животных, поскольку их использование становится все более и более распространенным, а текущие данные неубедительны и противоречивы.

Исходя из вышеизложенного, **целью** работы явилось изучение токсикологических свойств раствора фуллерена, ресвератрола и бетаина гидрохлорида на лабораторных животных.

Исследования проводили в 2022 году на кафедре «Морфология, патология животных и биология» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Острую токсичность соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида определяли на белых мышах и белых крысах.

Белым крысам соединение вводили подкожно в дозах 550, 825, 1100, 2500, 5000 мг/кг по действующему веществу, белым мышам — внутрижелудоч-

но в тех же дозах. За животными наблюдали в течение 14 суток после введения препарата. Объем вводимого раствора составлял белым крысам 1,0 мл, белым мышам — 0,5 мл. Среднюю смертельную дозу (LD₅₀) рассчитывали по методу Кербера. В качестве контроля служили животные, которым вводили стерильный водный раствор фуллерена C₆₀.

Диеновые конъюгаты (ДК) исследовали с помощью спектрофотометра при уровне поглощения ультрафиолета в диапазоне длины волны 232—234 нм [8]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли тиобарбитуровым методом в сыворотке крови [7]. Активность каталазы исследовали с помощью спектрофотометрического способа при нагревании в водяной бане [4]. Кровь у белых крыс брали на 1 сутки, 7 суток и 14 суток после введения изучаемого соединения в дозе 5000 мг/кг. Аспирацию крови на 1 и 7 суток осуществляли из боковой хвостовой вены в количестве 0,5 мл. На 14 сутки проводили декапитацию животных в соответствии с Европейской директивой по защите животных, используемых в научных целях [10].

Цифровой материал подвергался статистической обработке с вычислением критерия Стьюдента на персональном компьютере с использованием стандартной программы вариационной статистики Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований по определению острой токсичности изучаемого соединения для лабораторных животных представлены в таблицах 1 и 2.

Клиника токсического действия при подкожном введении соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида у белых крыс сопровождалась следующими симптомами: животные, получавшие фармакологическую композицию в изучаемых дозах течение всего периода наблюдения (14 суток) активно передвигались по клеткам, по пищевому и питьевому поведению не отличались от крыс контрольной группы, реакция на внешние раздражители (звук, свет) была адекватной и на уровне контроля.

При внутрижелудочном введении соединения в дозе 5000 мг/кг белые мыши в течение первых суток были угнетены, малоподвижны, отказывались от корма. Реакция на внешние раздражители была понижена. На вторые сутки после введения соединения восстанавливалось пищевое и питьевое поведение, реакции на внешние раздражители. В течение 14 суток исследований гибели опытных животных не отмечено. В связи с этим установить LD₅₀ не

представилось возможным. Это позволяет считать изучаемое соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида нетоксичным в испытанном диапазоне доз.

Также было проведено исследование уровня диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и активности каталазы в сыворотке крови. Результаты исследований представлены на рис. 1.

Таблица 1

Острая токсичность соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида для белых крыс при подкожном введении

Группа	Доза, мг/кг	Количество животных в опыте	Наблюдавшийся эффект	
			пало	выжило
1	550	6	0	6
2	825	6	0	6
3	1100	6	0	6
4	2500	6	0	6
5	5000	6	0	6
6	Контроль	6	0	6

Таблица 2

Острая токсичность соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида для белых мышей при внутрижелудочном введении

Группа	Доза, мг/кг	Количество животных в опыте	Наблюдавшийся эффект	
			пало	выжило
1	550	6	0	6
2	825	6	0	6
3	1100	6	0	6
4	2500	6	0	6
5	5000	6	0	6
6	Контроль	6	0	6

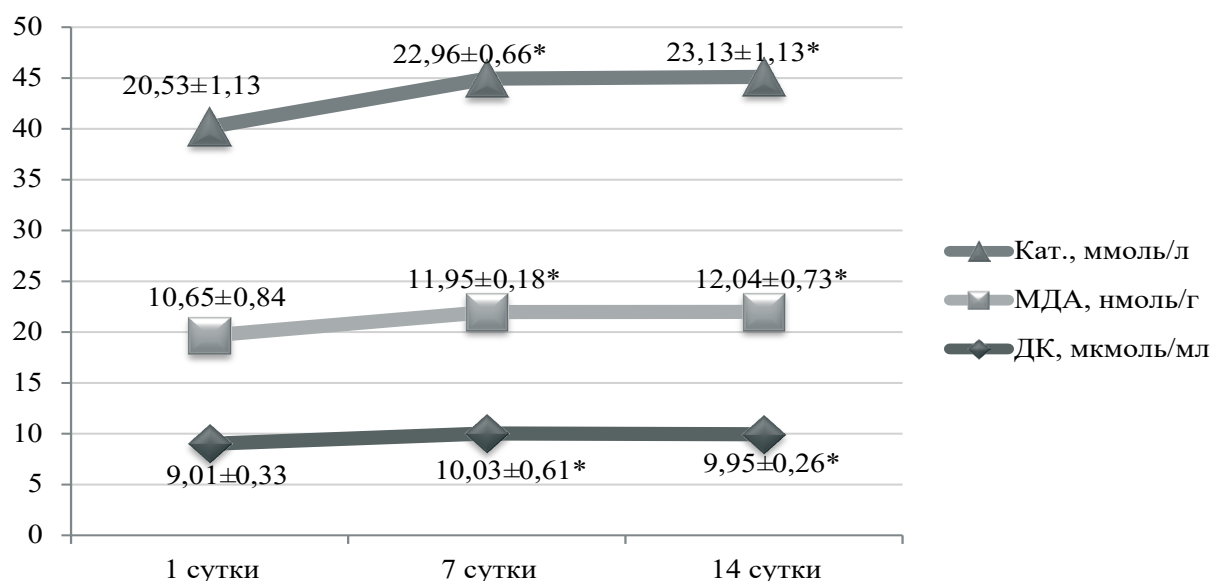


Рис. 1. Кинетика продуктов окисления липидов и активности каталазы в крови белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида

При оценке уровня каталазы в сыворотке крови опытных животных отмечали следующее: активность фермента на 7 сутки увеличилась до 22,96 ммоль/л, что на 11,8 % выше первоначального значения, на 14 сутки — до 23,13 ммоль/л, что больше на 12,6 % относительно первых суток опыта.

При изучении динамики малонового диальдегида на фоне применения водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида установлено увеличение его концентрации до 11,95 нмоль/л на 7 сутки исследования и стабилизацию значений на уровне 12,04 нмоль/л на 14 сутки, что на 12,2 % и 13,1 % соответственно выше показателей первых суток опыта.

Содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови опытных животных на 7 и 14 сутки опыта возрастало до 10,03 мкмоль/мл и 9,95 мкмоль/мл, что на 11,3 % и 10,4 % соответственно выше значений, зарегистрированных в первые сутки.

В нашем исследовании мы обнаружили повышение показателей перекисного окисления липидов в сыворотке крови белых крыс после введения изучаемого соединения, о чем свидетельствует концентрация продуктов, отражающих начальную фазу перекисного окисления липидов, а именно малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. С другой стороны, мы установили повышение активности фермента каталазы в сыворотке крови. Это можно рассматривать как компенсаторную реакцию защиты организма, так как каталаза расщепляет молекулы свободных радикалов на одну молекулу кислорода и две молекулы воды, тем самым снижая уровень свободных радикалов в крови [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанное соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида относится к IV классу опасности и к группе малотоксичных веществ. При подкожном введении белым крысам в дозе 5000 мг/кг вызывает незначительное повышение содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сыворотке крови, а также активизацию фермента каталазы.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Алексеев А. А. Изменение белково-азотистого обмена у лабораторных животных под влиянием водного

раствора фуллерена C₆₀ / А. А. Алексеев, Н. А. Пудовкин, В.В. Салаутин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана. — 2021. — Т. 247. — № 3. — С. 6—10.

2. Гендриксон О. Д. Фуллерены: in vivo исследования биораспределения, токсичности и биологического действия / О. Д. Гендриксон, А. В. Жердев, И. В. Гмошинский, Б. Б. Дзантиев // Российские нанотехнологии. — 2014. — Т. 9. — № 11—12. — С. 5—17.

3. Каримова Р. Г. Взаимосвязь распределения концентрации ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и скелетной мышечной ткани крыс / П. В. Борискин, О. Н. Гуленко, А. А. Девяткин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2020. — Т. 243. — № 3. — С. 36—39.

4. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарева // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16—19.

5. Пиотровский Л. Б. Фуллерены в биологии / Л. Б. Пиотровский, О. И. Кисилев. — СПб.: Росток, 2006. — 336 с.

6. Рябоконт И. С. Анализ токсичности и антиоксидантных свойств комплексов фуллерена C₆₀ с фолиевой кислотой / И. С. Рябоконт, О. И. Большакова, А. А. Борисенкова, С. В. Саранцева // В книге: OpenScience 2021. Сборник тезисов VIII Всероссийского молодежного научного форума. — Гатчина, 2022. — С. 174.

7. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 66—67.

8. Стальная И. Д. Методы определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 67—68.

9. Alekseev A. A. The effect of an aqueous solution of fullerene C₆₀ on protein-nitrogen metabolism in laboratory animals / A. A. Alekseev, N. A. Pudovkin, V. V. Salautin // В сборнике: Наука и образование в XXI веке: современные векторы развития и перспективы. Сборник статей II Всероссийской (Национальной) научно-практической конференции. — Саратов, 2022. — С. 127—131.

10. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance): European Commission: Brussels. 2010.

11. Zupanc J., Drobne D., Drasler B., Valant J., Iglic A., Kralj-Iglic V., Makovec D., Rappolt M., Sartori B., Kogej K. Experimental evidence for the interaction of C60 fullerene with lipid vesicle membranes // Carbon. — 2012. — V. 50. — N3. — P. 1170—1178.

А. А. Алексеев, С. Д. Клюкин, Н. А. Пудовкин

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. А. Алексеев — аспирант кафедры «Морфология, патология животных и биология»;

С. Д. Клюкин — кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Морфология, патология животных и биология»;

Н. А. Пудовкин — доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой «Морфология, патология животных и биология».

Статья поступила в редакцию 07.02.2023 г.

TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS OF AN AQUEOUS SOLUTION OF FULLERENE C₆₀, RESVERATROL AND BETAINE HYDROCHLORIDE ON LABORATORY ANIMALS

Aleksey Aleksandrovich Alekseev, Sergey Dmitrievich Klyukin,
Nikolay Aleksandrovich Pudovkin✉

*Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after
N. I. Vavilov, Saratov, Russia, e-mail: niko-pudovkin@yandex.ru✉*

Abstract. The article presents the results of studies of the acute toxicity of compounds in an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride for laboratory animals, as well as the effect of this compound on the processes of lipid peroxidation and the activity of the antioxidant defense system of the body. The acute toxicity of a compound based on an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride was determined on white rats and white mice, which were previously divided into 5 experimental groups and a control group, the drug was administered subcutaneously to rats in a volume of 1.0 ml, to mice — intragastrically in a volume of 0.5 ml. The animals were observed for 14 days after administration of the compound. The animals that received a pharmacological composition based on an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride in the studied doses during the entire observation period (14 days) actively moved around the cages, did not differ much in their eating and drinking behavior from the rats of the control group, an adequate response to external stimuli (sound, light) was at the control level. In mice, depression, unwillingness to eat and drink were noted on the first day after the introduction of the studied compound. Throughout the experiment, coordinated movements and the absence of paralysis were noted. The mucous membranes were pink in color without pathological changes. During the experiment, the animals reacted to external (sound) stimuli. The blood serum level of diene conjugates, malondialdehyde and catalase activity in experimental animals was also studied to assess and control the level of oxidative stress against the background of the use of a compound based on an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride. It has been found that when subcutaneously administered to white rats at a dose of 5000 mg/kg, the compound under study causes a slight increase in the content of malondialdehyde and diene conjugates in blood serum, as well as activation of the catalase enzyme. The results of research and observations of experimental animals for 14 days allow us to attribute the designed injectable form to hazard class IV and to the group of low-toxic substances.

Keywords: fullerene aqueous solution, acute toxicity, malondialdehyde, diene conjugates, catalase.

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-26-00019 Design of Antioxidant and Antitumor Veterinary Drugs based on Nanofullerenes

INTRODUCTION

Fullerenes are a new group of molecules made up of carbon. They are spherical (buckyballs), ellipsoidal or cylindrical (carbon nanotubes) and have a wide range of technological and medical applications. However, the growth in their production and use has raised concerns about their potential toxicity [5].

Fullerenes are a group of molecules and their toxicity can vary as it depends on molecular size, composition, surface properties and functionalization. In addition, the toxicity of fullerenes can be associated with the solvents used and their by-products, as well

as with metal impurities [6, 9]. The available literature contains contradictory data on the mechanism of the toxic action of fullerenes. High doses of compounds can cause oxidative stress due to the formation of reactive oxygen species. Other mechanisms are activation of caspase 3/7, which can lead to apoptosis, destabilization of the lysosomal membrane and a decrease in the potential of the mitochondrial membrane, membrane and DNA damage. Fullerenes can also enhance the expression of genes associated with the inflammatory process, the activity of metalloendopeptidases, and the response of the immune system. In ad-

dition, disruption of phagocytosis due to the fibrous shape of long carbon nanotubes can lead to negative consequences [2, 11].

However, other studies report the absence of a lethal outcome after exposure to high doses of colloidal fullerenes on human epidermal and bacterial cells, the absence of acute or subacute fullerene toxicity and antioxidant properties, and the absence of genotoxicity, phototoxicity and prooxidant activity of water-soluble fullerenes [1,11].

Thus, further research is needed to determine the exact toxicity of each fullerene group molecule for animals as their use becomes more and more common and current data is inconclusive and contradictory.

Based on the foregoing, **the objective of the work** was to study the toxicological properties of a solution of fullerene, resveratrol and betaine hydrochloride on laboratory animals.

The studies were carried out in 2022 at the Department of Morphology, Animal Pathology and Biology of FSBEI HE “Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N. I. Vavilov”.

MATERIAL AND METHODS

The acute toxicity of a compound based on an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride was determined on white mice and white rats.

In white rats, the compound was administered subcutaneously at doses of 550, 825, 1100, 2500,

5000 mg/kg of the active substance, white mice — intragastrically at the same doses. The animals were observed for 14 days after drug administration. The volume of the injected solution was 1.0 ml for white rats and 0.5 ml for white mice. The median lethal dose (LD₅₀) was calculated using the Kerber method. The animals that were injected with a sterile aqueous solution of fullerene C₆₀ served as the control.

Diene conjugates (DC) were studied using a spectrophotometer at an ultraviolet absorption level in the wavelength range of 232—234 nm [8]. The content of malondialdehyde (MDA) was determined by the thio-barbituric method in blood serum [7]. Catalase activity was studied using a spectrophotometric method when heated in a water bath [4]. Blood was taken from white rats on day 1, day 7 and day 14 after administration of the studied compound at a dose of 5000 mg/kg. Blood aspiration on days 1 and 7 was carried out from the lateral tail vein in the amount of 0.5 ml. On day 14, the animals were decapitated in accordance with the European Directive for the Protection of Animals Used for Scientific Purposes [10].

The digital material was subjected to statistical processing with the calculation of the Student’s criterion on a personal computer using the standard variation statistics program Microsoft Excel.

STUDY RESULTS

The results of studies to determine the acute toxicity of the studied compound for laboratory animals are presented in Tables 1 and 2.

Table 1

Acute toxicity of a compound based on an aqueous solution of fullerene C60, resveratrol and betaine hydrochloride for white rats when administered subcutaneously

Group	Dose, mg/kg	Number of animals in the experiment	Observed effect	
			mortality	survived
1	550	6	0	6
2	825	6	0	6
3	1100	6	0	6
4	2500	6	0	6
5	5000	6	0	6
6	Control	6	0	6

Clinical toxicity after subcutaneous administration of a compound based on an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride in white rats was accompanied by the following symptoms: animals that received the pharmacological composition at the studied doses during the entire observation peri-

od (14 days) actively moved around the cages, did not differ much in their eating and drinking behavior from the rats of the control group, an adequate response to external stimuli (sound, light) was at the control level.

During the intragastric administration of the compound at a dose of 5000 mg/kg, white mice were de-

pressed, inactive, and demonstrated unwillingness to eat during the first day. Reaction to external stimuli was reduced. On the second day after the administration of the compound, eating and drinking behavior and reactions to external stimuli were restored. Within 14 days of research, the death of experimental animals was not observed. In this regard, it was not possi-

ble to use LD₅₀. This allows us to consider the studied compound based on an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride as non-toxic in the tested dose range.

The blood serum level of diene conjugates, malondialdehyde and catalase activity were also studied. The research results are presented in Fig. 1.

Table 2

Acute toxicity of a compound based on an aqueous solution of fullerene C60, resveratrol and betaine hydrochloride for white mice after intragastric administration

Group	Dose, mg/kg	Number of animals in the experiment	Observed effect	
			mortality	survived
1	550	6	0	6
2	825	6	0	6
3	1100	6	0	6
4	2500	6	0	6
5	5000	6	0	6
6	Control	6	0	6

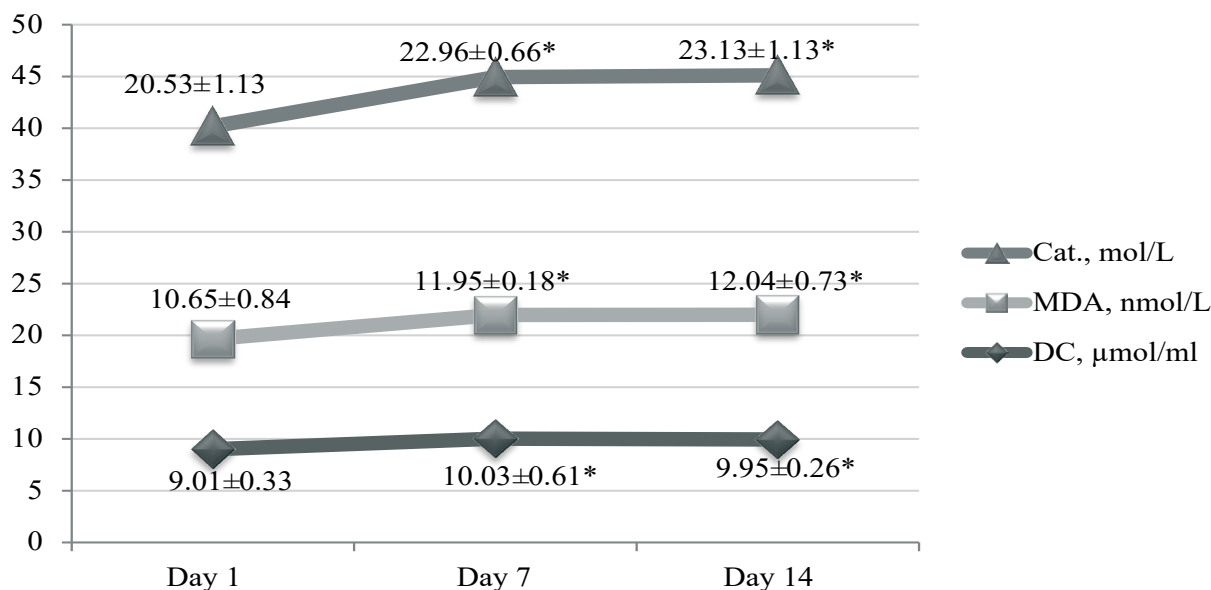


Fig. 1. Kinetics of lipid oxidation products and catalase activity in the blood of white rats after administration of a compound based on an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride

When assessing the blood serum level of catalase in the of experimental animals, the following was noted: on day 7, the activity of the enzyme increased up to 22.96 mmol/L, which was by 11.8 % higher than the initial value, on day 14 — up to 23.13 mmol/L, which was by 12.6 % more relative to day 1 of the experiment.

When studying the dynamics of malondialdehyde against the background of the use of an aqueous solu-

tion of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride, an increase in its concentration up to 11.95 nmol/L on day 7 of the study and stabilization of values at the level of 12.04 nmol/L on day 14, which was higher by 12.2 % and 13.1 %, respectively, than on day 1 of the experiment.

The blood serum content of diene conjugates in the of experimental animals on days 7 and 14 of the experiment increased up to 10.03 μmol/ml and 9.95

μmol/ml, which was higher by 11.3 % and 10.4 %, respectively, than the values recorded on day 1.

In our study, we found an increase in lipid peroxidation in the blood serum of white rats after the administration of the studied compound, as evidenced by the concentration of products reflecting the initial phase of lipid peroxidation, namely malondialdehyde and diene conjugates. On the other hand, we found an increase in the activity of the catalase enzyme in the blood serum. This can be considered as a compensatory defense reaction of the body, since catalase splits free radical molecules into one oxygen molecule and two water molecules, thereby reducing the level of free radicals in the blood [3].

CONCLUSION

Thus, the designed compound based on an aqueous solution of fullerene C₆₀, resveratrol and betaine hydrochloride belongs to the hazard class IV and to the group of low-toxic substances. When administered subcutaneously to white rats at a dose of 5000 mg/kg, it causes a slight increase in the content of malondialdehyde and diene conjugates in the blood serum, as well as the catalase enzyme activation.

REFERENCES

1. *Alekseev A. A.* Changes in protein-nitrogen metabolism in laboratory animals under the effect of an aqueous solution of fullerene C₆₀ / A. A. Alekseev, N. A. Pudovkin, V. V. Salautin // *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny imeni N. E. Bauman* (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman). — 2021. — V. 247. — No. 3. — P. 6—10.
2. *Gendrikson O. D.* Fullerenes: in vivo studies of bio-distribution, toxicity and biological action / O. D. Gendrikson, A. V. Zherdev, I. V. Gmoshinskiy, B. B. Dzantiev // *Rossiyskie nanotekhnologii* (Russian Nanotechnologies). — 2014. — V. 9. — No. 11—12. — P. 5—17.
3. *Karimova R. G.* Relationship between the distribution of the concentration of enzymes of the LPO-AOD system in the blood serum and skeletal muscle tissue of rats / P. V. Boriskin, O. N. Gulenko, A. A. Devyatkin // *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny imeni N. E. Bauman* (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman). — 2020. — V. 243. — No. 3. — P. 36—39.
4. *Korolyuk M. A.* Method for determining the activity of catalase / M. A. Korolyuk, L. I. Ivanova, I. G. Mayorova, V. E. Tokareva // *Laboratornoe delo* (Laboratory science) — 1988. — No. 1. — P. 16—19.
5. *Piotrovskiy L. B.* Fullerenes in biology / L. B. Piotrovskiy, O. I. Kisilev. — St. Petersburg: Rostock, 2006. — 336 p.
6. *Ryabokon I. S.* Analysis of toxicity and antioxidant properties of fullerene C₆₀ complexes with folic acid / I. S. Ryabokon, O. I. Bolshakova, A. A. Borisenkova, S. V. Sarantseva // In the book: *OpenScience 2021. Collection of abstracts of the VIII All-Russian Youth Scientific Forum*. — Gatchina, 2022. — P. 174.
7. *Stalnaya I. D.* Method for the determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid / I. D. Stalnaya, T. G. Garishvili // *Sovremennye metody v biokhimii* (Modern methods in biochemistry). — M.: Medicine, 1977. — P. 66—67.
8. *Stalnaya I. D.* Methods for determining diene conjugation of unsaturated higher fatty acids / I. D. Stalnaya, T. G. Garishvili *Sovremennye metody v biokhimii* (Modern methods in biochemistry). — M.: Medicine, 1977. — P. 67—68.
9. *Alekseev A. A.* The effect of an aqueous solution of fullerene C₆₀ on protein-nitrogen metabolism in laboratory animals / A. A. Alekseev, N. A. Pudovkin, V. V. Salautin // In the collection of articles: *Science and education in the XXI century: modern vectors of development and prospects. Collection of articles of the II All-Russian (National) scientific and practical conference*. — Saratov, 2022. — P. 127—131.
10. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance): European Commission: Brussels. 2010.
11. *Zupanc J., Drobne D., Drasler B., Valant J., Iglic A., Kralj-Iglic V., Makovec D., Rappolt M., Sartori B., Kogej K.* Experimental evidence for the interaction of C60 fullerene with lipid vesicle membranes // *Carbon*. — 2012. — V. 50. — N3. — P. 1170—1178.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. A. Alekseev — Postgraduate Student, Department of Morphology, Animal Pathology and Biology;

S. D. Klyukin — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of Morphology, Animal Pathology and Biology;

N. A. Pudovkin — Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Morphology, Animal Pathology and Biology.

The article was submitted 07.02.2023

Научная статья

УДК 619:615.065:615.375:636.028

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.31

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТА ИНТЕРФЕРОНА ЛЯМБДА ПРИ ЕГО МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ БЕЛЫМ КРЫСАМ

Нина Алексеевна Хохлова[✉], Галина Анатольевна Востроилова,
Анастасия Андреевна Корчагина, Максим Сергеевич Жуков,
Дмитрий Игоревич Шабанов, Артем Валерьевич Некрасов

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, e-mail: nina_xoxlova@mail.ru[✉]*

Аннотация. Первоочередной задачей доклинических исследований лекарственных средств является определение потенциальных токсических свойств, в том числе при многократном введении в разных дозах — терапевтической и кратно ее превышающей. Поэтому целью данного исследования являлось изучение токсических эффектов препарата интерферона лямбда при многократном внутримышечном введении, а также исследование возможности обратимости вызываемых повреждений. Для этого были сформированы 3 группы белых лабораторных крыс, массой тела 190—210 г. по $n = 12$ в каждой. Животным группы контроля, в течение 14 дней один раз в сутки применяли стерильный изотонический раствор хлорида натрия в объеме 0,25 мл внутримышечно. Крысам опытных групп исследуемый препарат в такой же последовательности в дозах 0,1 мл/кг (условно-терапевтическая) и 1,0 мл/кг (в 10 раз превышающая терапевтическую) в объеме введения 0,25 мл. После 14-дневного курса применения препарата и 10 дней после проводился отбор образцов крови, которые исследовались гематологическими и биохимическими методами. Для морфометрии и гистологического исследования внутренних органов часть грызунов из каждой группы подвергали эвтаназии. Установлено, что многократное внутримышечное введение препарата интерферона лямбда в условно-терапевтической и десятикратно ее превышающей дозах вызвало некоторые нежелательные побочные эффекты, выражающиеся в гепатотоксическом действии. Так у крыс, которым вводили препарат интерферона лямбда в десятикратной терапевтической дозе, наблюдалось увеличение активности аминотрансфераз (АсАТ на 21,8 %, АлАТ на 14,8 %) и количества общего билирубина в 2,2 раза, а при гистологическом исследовании отмечались структурные изменения (умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация перипортальных трактов, диплоидность ядер гепатоцитов). Стоит отметить, что такие же структурные изменения наблюдались у крыс, которым препарат вводился в терапевтической дозе, при отсутствии изменений в биохимическом статусе. Однако, данный процесс был обратимым и нивелировался в течение 10 дней после отмены препарата в каждой группе.

Ключевые слова: доклинические исследования, токсикология, интерферон лямбда, белые крысы, гематология, биохимия крови, массовый коэффициент органа

ВВЕДЕНИЕ

Первоочередной задачей доклинических исследований лекарственных средств является определение потенциальных токсических свойств, в том числе при многократном введении в разных дозах — терапевтической и кратно ее превышающей. При этом особое внимание уделяется выявлению нежелательных побочных эффектов с учетом влияния ряда факторов: доза и кратность применения,

класс лекарственного вещества, его способность к кумуляции, вид, пол, возраст, уровень продуктивности животных.

Протокол доклинических исследований включает ряд обязательных испытаний, в том числе определение токсических эффектов при многократном повторном введении, а также выявление органов-мишеней и обратимости вызываемых повреждений. Все это позволяет оценить риск потенциальных негативных последствий его приме-

© Хохлова Н. А., Востроилова Г. А., Корчагина А. А., Жуков М. С., Шабанов Д. И., Некрасов А. В., 2023

нения у целевых видов животных в ходе клинического этапа испытаний [1—5].

В современных условиях ведения животноводства актуальной задачей является разработка новых безопасных и эффективных лекарственных средств для повышения естественной резистентности организма животных. Одним из направлений поиска является создание и всесторонняя фармако-токсикологическая оценка препаратов на основе рекомбинантных интерферонов, корригирующих иммунные дисфункции посредством нивелирования дефицита эндогенных регуляторных молекул и воспроизведения их эффектов [6—7].

Интерфероны (ИФН) представляют собой семейство секретируемых белков, которые влияют на широкий спектр физиологических процессов, регулирующих врожденный и адаптивный иммунитет [8]. Интерфероны подразделяются на три подгруппы: интерфероны типа I (ИФН α , ИФН β , ИФН ϵ , ИФН κ и ИФН ω), интерфероны типа II (ИФН γ) и интерфероны типа III (ИФН λ). Интерфероны типа III являются относительно новым дополнением к семейству интерферонов и особенно важны для иммунной защиты барьерных поверхностей [9]. ИФН- λ выполняют функции, схожие с семейством интерферонов I типа, но имеют весомые отличия от последних: действуют прежде всего в клетках эпителиальных барьеров и, благодаря более целенаправленной передаче сигналов, обладают существенными терапевтическими преимуществами вследствие исключения ряда побочных эффектов, лимитирующих клиническое использование ИФН I типа [10].

Целью данного исследования являлось изучение токсических эффектов препарата интерферона лямбда при многократном внутримышечном введении белым лабораторным крысам, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование возможности обратимости вызываемых повреждений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для оценки возможного токсического действия препарата интерферона лямбда при многократном введении в соответствии с [11] был разработан дизайн эксперимента, одобренный биоэтической комиссией ФГБНУ «ВНИВИПФиТ». В условиях вивария были сформированы 3 группы белых лабораторных крыс, массой тела 190—210 г. по $n = 12$ в каждой. Содержание подопытных животных и все манипуляции с ними в рамках эксперимента соот-

ветствовали требованиям международных и российский законодательных актов (ETS123, Strasbourg, 1986; Директива 2010/63/EU от 22.09.2010 г; ГОСТ 33216—2014, ГОСТ 33215—2014).

Крысам опытных групп исследуемый препарат вводили внутримышечно один раз в сутки примерно в одно и то же время в течение 14 дней в дозах 0,1 мл/кг (условно-терапевтическая) и 1,0 мл/кг (в 10 раз превышающая терапевтическую) в объеме введения 0,25 мл. Животным группы контроля, которые содержались в аналогичных условиях, применяли стерильный изотонический раствор хлорида натрия в объеме введения 0,25 мл внутримышечно.

Интегральными характеристиками общетоксического действия препарата служили внешний вид, поведение, поедаемость корма и прием воды; динамика массы тела животных при взвешивании 1 раз в 7 дней; гематологические и биохимические показатели крови, морфометрия и гистологическое исследование образцов внутренних органов.

Морфологические характеристики периферической крови определяли с помощью гематологического анализатора (АВХ Micros 60 СТ/ОТ, Франция), а также по стандартной методике подсчета клеток в камере Горяева.

Биохимические показатели определяли в образцах сыворотки крови: концентрацию общего белка, общих липидов, мочевины, глюкозы, креатинина, холестерина, билирубина, активность ферментов аспартат- и аланинаминотрансфераз (АсАТ и АлАТ) — наборами фирмы «Витал» (Санкт-Петербург); фракции белка — электрофорезом в агарозном геле.

Образцы крови отбирали через сутки после 14-дневного курса применения препарата и окончания 10-дневного восстановительного периода.

Для морфометрии и гистологического исследования внутренних органов часть грызунов из каждой группы подвергали эвтаназии передозировкой углекислого газа в специальной камере через 15 и 25 дней от начала эксперимента.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При многократном внутримышечном введении препарата интерферона лямбда и в течение

восстановительного периода гибели подопытных крыс зафиксировано не было. Так же не наблюдали отклонений в поведенческих реакциях, реакции на внешние раздражители и двигательной активности, нарушений координации движений. Корм и воду крысы принимали охотно. Состояние шерст-

ного покрова и слизистых оболочек соответствовало физиологическим нормам, как в опытных, так и в контрольной группах.

В течение эксперимента масса тела подопытных животных увеличивалась во всех группах, но динамика имела определенные различия (рис. 1).

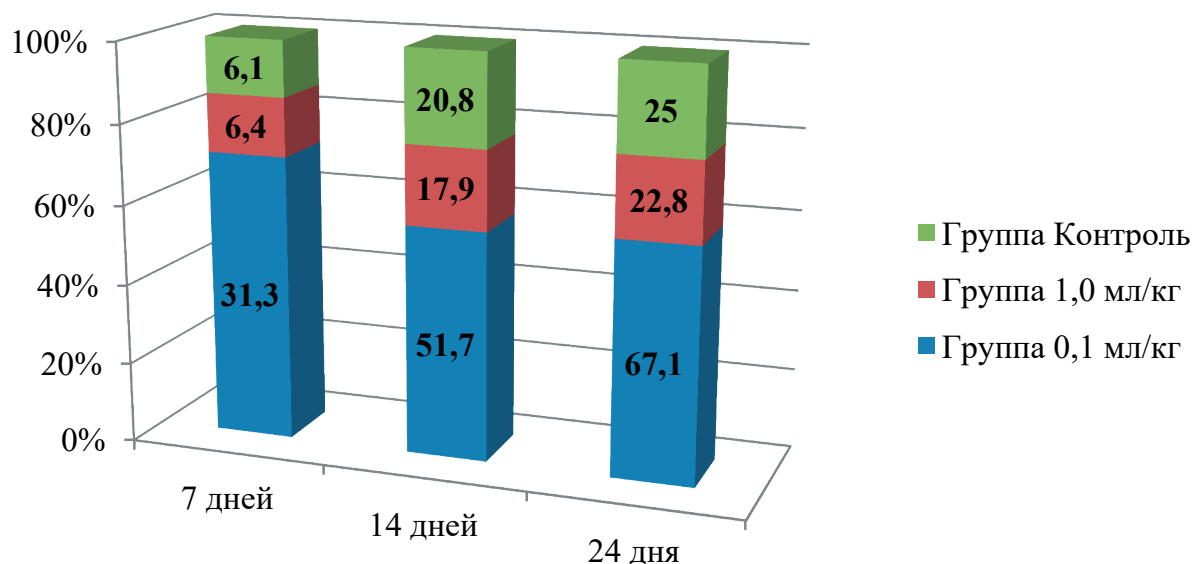


Рис. 1. Влияние многократного введения препарата «Лямбда-интерферон» на динамику массы тела у крыс (% к исходной массе тела до начала эксперимента)

Наибольший прирост массы тела лабораторных крыс относительно исходных данных (до начала эксперимента) был зафиксирован в группе, которой применяли исследуемый препарат в дозе 0,1 мл/кг. В группе крыс, которым применяли исследуемый препарат в десятикратной терапевтической дозе, прирост массы тела был идентичен таковому в группе контроля.

Таким образом, в испытанных дозах при внутримышечном введении животным препарата интерферона лямбда общетоксических эффектов у крыс не обнаружено. При этом в группе крыс, которым применяли условно-терапевтическую дозу, прирост массы тела имел более выраженную динамику относительно других групп подопытных животных.

Для оценки состояния внутренних органов в токсикологических исследованиях использовали такой интегральный показатель как массовый коэффициент органов (МКО) — процентное отношение массы органа к массе тела.

Результаты расчета МКО, представленные в таблице 1, указывают на то, что 14-дневное внутримышечное введение препарата в испытанных дозах не вызывает у опытных крыс достоверных

изменений относительной массы внутренних органов по сравнению с таковыми у животных контрольной группы.

Анализ гистопрепаратов внутренних органов от подопытных крыс показал, что через 14 дней введения препарата интерферона лямбда в испытанных дозах в печени были отмечены структурные изменения (умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация перипортальных трактов, диплоидность ядер гепатоцитов), что может быть связано с взаимодействием реактивных метаболитов препарата со структурными компонентами печеночной ткани и нарушением структурно-функциональной целостности гепатоцитов и клеток стромального окружения с развитием гепатодистрофии [12]. Данные изменения указывают на наличие определенного токсического влияния препарата при многократном его применении, однако, оно было проходящим, и через 10 дней восстановительного периода указанные изменения зафиксированы не были ни в одной из подопытных групп.

Гематологическое исследование (табл. 2) крови крыс показало, что после 14 дневного введения лямбда-интерферон в дозе 0,1 мл/кг отмечали достоверное снижение количества эритроцитов и об-

щего гемоглобина на 11,4 и 10,1 %. Уровень лейкоцитов и тромбоцитов при этом возрастал на 47,7 и 25,2 %, соответственно. При увеличении дозы до 1,0 мл/кг наблюдалась аналогичная тенденция. Так данные животные в сравнении с контролем имели повышенный уровень лейкоцитов, тромбоцитов и сегментоядерных нейтрофилов на 45,8, 16,5 и 18,3 %, соответственно, а количество общего гемоглобина было понижено на 6,4 %. Стоит отме-

тить, что такие изменения характерны при развитии воспалительно-дегенеративных процессов; в данном случае таковой наблюдался в печени, что подтверждалось результатом гистологических исследований. Однако по прошествии 10-дневного восстановительного периода достоверных изменений по вышеуказанным гематологическим показателям зафиксировано не было, что указывает на обратимость процессов при отмене препарата.

Таблица 1

Массовые коэффициенты внутренних органов (МКО) крыс при многократном внутримышечном введении препарата интерферона лямбда (M ± m)

Органы	Группа животных		
	Контроль	0,1	1,0
Через 14 дней			
Тимус	0,09 ± 0,012	0,08 ± 0,006	0,08 ± 0,001
Селезенка	0,32 ± 0,024	0,26 ± 0,004	0,29 ± 0,011
Печень	2,99 ± 0,114	3,07 ± 0,146	2,97 ± 0,127
Почки	0,57 ± 0,014	0,59 ± 0,033	0,60 ± 0,034
Надпочечники	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,002	0,03 ± 0,003
Сердце	0,34 ± 0,017	0,33 ± 0,006	0,35 ± 0,019
Легкие	0,67 ± 0,063	0,68 ± 0,052	0,69 ± 0,072
Семенники	1,20 ± 1,126	1,30 ± 0,060	1,13 ± 0,070
Через 10 дней восстановительного периода			
Тимус	0,07 ± 0,007	0,06 ± 0,003	0,06 ± 0,005
Селезенка	0,26 ± 0,006	0,29 ± 0,015	0,26 ± 0,023
Печень	3,60 ± 0,151	3,57 ± 0,195	3,37 ± 0,169
Почки	0,58 ± 0,031	0,63 ± 0,066	0,55 ± 0,020
Надпочечники	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,002
Сердце	0,37 ± 0,026	0,32 ± 0,015	0,34 ± 0,019
Легкие	0,69 ± 0,038	0,60 ± 0,057	0,68 ± 0,018
Семенники	0,97 ± 0,072	0,96 ± 0,063	1,06 ± 0,047

Подтверждением развития гепатотоксического действия при длительном применении препарата интерферона лямбда стало увеличение фракции альфа-глобулинов, входящих в состав белков острой фазы. Так у крыс, которым препарат вво-

дили в дозе 0,1 мл/кг, наблюдалось увеличение фракции на 18,1 % в сравнении с контролем, и на 48,4 % у крыс, которым препарат применялся в дозе 1,0 мл/кг (табл. 3). Дальнейшие биохимические исследования показали, что у крыс после 14-дневного

введения препарата интерферона лямбда в условно-терапевтической дозе происходило увеличение соотношения лактата к пирувату на 12,1 %, а также уменьшение количества общих липидов и триглицеридов на 16,7 и 36,5 %, соответственно. На

фоне этого уровень холестерина оставался без достоверного изменения, но имел тенденцию к увеличению количества общего билирубина в крови, что может быть связано с изменением процесса желчеотведения.

Таблица 2

Морфологические показатели крови белых крыс при многократном внутримышечном применении препарата интерферона лямбда ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	Опытные группы	
		0,1 мл/кг	1,0 мл/кг
Через 14 дней			
Эритроциты, $10^{12}/л$	$7,18 \pm 0,29$	$6,36 \pm 0,36^*$	$6,97 \pm 0,19$
Лейкоциты, $10^9/л$	$5,35 \pm 0,39$	$7,90 \pm 0,79^*$	$7,80 \pm 0,42^*$
Гемоглобин, г/л	$116,8 \pm 2,7$	$105,2 \pm 5,8^*$	$109,0 \pm 2,3^*$
Нейтрофилы, % Палочкоядерные	$1,75 \pm 0,41$	$1,25 \pm 0,31$	$1,75 \pm 0,31$
Сегментоядерные	$29,0 \pm 1,7$	$28,0 \pm 2,2$	$34,3 \pm 2,1^*$
Эозинофилы, %	$0,50 \pm 0,19$	$1,00 \pm 0,27$	$0,75 \pm 0,31$
Базофилы, %	—	—	—
Лимфоциты, %	$66,0 \pm 2,3$	$66,3 \pm 2,1$	$60,8 \pm 2,8$
Моноциты, %	$3,0 \pm 0,05$	$3,5 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,3$
Тромбоциты, $10^9/л$	$925,8 \pm 66,4$	$1158,8 \pm 81,4^*$	$1079,7 \pm 50,2^*$
Через 10 дней восстановительного периода			
Эритроциты, $10^{12}/л$	$6,94 \pm 0,12$	$6,42 \pm 0,28$	$6,31 \pm 0,27^*$
Лейкоциты, $10^9/л$	$6,35 \pm 0,46$	$7,27 \pm 0,45$	$7,05 \pm 0,68$
Гемоглобин, г/л	$119,7 \pm 1,3$	$113,8 \pm 3,1$	$117,0 \pm 3,9$
Нейтрофилы, % Палочкоядерные	$1,75 \pm 0,31$	$1,33 \pm 0,21$	$1,25 \pm 0,31$
Сегментоядерные	$30,5 \pm 2,5$	$28,0 \pm 1,9$	$32,5 \pm 2,3$
Эозинофилы, %	$0,50 \pm 0,19$	$0,67 \pm 0,21$	$2,25 \pm 0,31$
Базофилы, %	—	—	—
Лимфоциты, %	$63,8 \pm 2,3$	$66,7 \pm 1,8$	$61,8 \pm 3,5$
Моноциты, %	$3,5 \pm 0,54$	$3,3 \pm 0,21$	$2,3 \pm 0,51$
Тромбоциты, $10^9/л$	$893,3 \pm 75,7$	$850,8 \pm 27,4$	$775,3 \pm 56,4$

* $p \leq 0,05$ относительно группы контроля

Таблица 3

Влияние многократного введения препарата интерферона лямбда на биохимические показатели крови крыс в эксперименте ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	Группа животных	
		0,1 мл/кг	1,0 мл/кг
АЛТ, Е/л	76,4 ± 3,6	65,1 ± 7,8	85,4 ± 2,1*
АСТ, Е/л	100,1 ± 6,1	110,8 ± 9,2	121,9 ± 9,1*
Глюкоза, ммМ/л	4,2 ± 0,14	4,0 ± 0,20	3,9 ± 0,08*
Лактат, ммМ/л	0,85 ± 0,044	0,86 ± 0,072	0,95 ± 0,036*
Пируват, мкМ/л	129,3 ± 5,1	116,8 ± 9,2	107,8 ± 7,9*
ЛП	0,66 ± 0,015	0,74 ± 0,011*	0,88 ± 0,023*
Общ. белок, г/л	66,8 ± 1,8	64,7 ± 0,28	68,2 ± 1,7
Альбумины, %	45,9 ± 2,7	46,1 ± 1,6	47,2 ± 1,8
Глобулины, %			
— альфа	9,2 ± 0,45	10,9 ± 0,8*	13,7 ± 0,5*
— бета	21,5 ± 0,4	20,7 ± 0,4	20,6 ± 0,6
— гамма	22,2 ± 1,5	21,2 ± 0,7	18,5 ± 1,4*
Креатинин, мкМ/л	26,0 ± 2,1	28,5 ± 2,7	26,3 ± 1,7
Мочевина, ммМ/л	5,22 ± 0,378	5,69 ± 0,387	5,39 ± 0,228
Триглицериды, ммМ/л	0,96 ± 0,07	0,61 ± 0,054*	0,48 ± 0,044*
Общ. липиды, г/л	1,62 ± 0,082	1,35 ± 0,084*	1,26 ± 0,050*
Холестерин, ммМ/л	1,43 ± 0,039	1,53 ± 0,092	1,42 ± 0,119
Билирубин, мкМ/л	5,75 ± 0,42	9,32 ± 1,56	10,5 ± 2,60*
Общие ИГ, мг/мл	15,4 ± 1,14	13,3 ± 0,73	14,7 ± 1,46

* $p \leq 0,05$ относительно группы контроля

В свою очередь у крыс, которым вводили препарат интерферона лямбда в десятикратной терапевтической дозе, наблюдалось увеличение активности аминотрансфераз (АсАТ на 21,8 %, АлАТ на 14,8 %) и количества общего билирубина на 2,2 раза, что указывает на появление первых признаков синдрома холестаза, вызванного развитием гепатодистрофии, что также подтверждается гистологическими исследованиями. Вследствие гепатотоксического действия препарата у подопытных животных отмечали снижение количества глюкозы и пирувиноградной кислоты в крови на 7,2

и 16,6 %, а также общих липидов и триглицеридов на 50,0 и 22,2 % соответственно. Уровень молочной кислоты при этом увеличивался на 11,8 %, что отражалось на соотношении лактата к пирувату, которое было выше уровня контроля на 33,3 %, что указывает на смещение метаболизма с аэробного на анаэробный путь.

Через 10 дней после окончания применения препарата у большинства задействованных в исследовании животных наблюдали восстановление гематологических и биохимических параметров крови до уровня контрольной группы (табл. 4).

У крыс, которым вводили препарат интерферона лямбда в десятикратной терапевтической дозе, также наблюдали восстановление большинства биохимических показателей, что указывает на разре-

шение гепатоксических процессов. Однако уровень общих липидов и триглицеридов все еще был ниже уровня контрольной группы на 16,9 и 31,5 % соответственно.

Таблица 4

Биохимические и иммунологические показатели крови крыс в эксперименте через 10 дней восстановительного периода ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	Группа животных	
		0,1 мл/кг	1,0 мл/кг
АлАТ, Е/л	88,5 ± 1,0	86,6 ± 5,3	80,9 ± 5,0
АсАТ, Е/л	110,9 ± 7,3	93,7 ± 9,3	98,1 ± 7,1
Глюкоза, мМ/л	4,8 ± 0,04	4,9 ± 0,13	4,5 ± 0,20
Лактат, мМ/л	0,87 ± 0,09	0,63 ± 0,09*	0,91 ± 0,12
Пируват, мкМ/л	130,0 ± 7,2	138,3 ± 4,3	129,3 ± 10,4
Л/П	0,67 ± 0,014	0,46 ± 0,018*	0,71 ± 0,025
Общ. белок, г/л	69,9 ± 1,3	66,1 ± 1,8	67,2 ± 0,9
Альбумины, %	46,0 ± 2,7	50,1 ± 0,7	47,8 ± 1,0
Глобулины, %			
— альфа	9,9 ± 0,9	9,6 ± 0,3	10,8 ± 0,9
— бета	22,5 ± 1,2	20,4 ± 0,6	21,4 ± 0,8
— гамма	21,6 ± 0,6	19,9 ± 0,8	20,0 ± 0,6*
Креатинин, мкМ/л	23,3 ± 2,1	26,0 ± 1,5	25,0 ± 1,2
Мочевина, мМ/л	6,52 ± 0,27	7,03 ± 0,5	6,51 ± 0,18
Триглицериды, мМ/л	0,92 ± 0,089	0,80 ± 0,052	0,63 ± 0,68*
Общ. липиды, г/л	1,77 ± 0,130	1,53 ± 0,068	1,47 ± 0,103*
Холестерин, мМ/л	1,32 ± 0,09	1,28 ± 1,15	1,26 ± 0,07
Билирубин, мкМ/л	6,7 ± 0,57	7,8 ± 0,71	6,6 ± 1,50
Общие ИГ, мг/мл	17,8 ± 1,96	18,8 ± 0,87	20,8 ± 1,97

* $p \leq 0,05$ относительно группы контроля

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что многократное внутримышечное введение препарата интерферона лямбда в условно-терапевтической и десятикратно ее превышающей дозах вызвало некоторые нежелательные побочные эффекты, выражающиеся в гепатотоксическом действии. Дан-

ный эффект был дозозависимым, и более выраженно проявился при использовании завышенной дозы препарата, что отразилось в изменении отдельных гематологических и биохимических показателей крови и гистоструктуры печени. Однако, данный процесс был обратимым и нивелировался в течение 10 дней после отмены препарата.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гуськова Т. А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований // Токсикологический вестник. 2010. № 5 (104). С. 2—5.
2. Енгальчева Г. Н., Сюбаев Р. Д., Горячев Д. В. Стандарты качества доклинических фармакологических исследований // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2019. Т. 9. № 4. С. 248—255. DOI 10.30895/1991-2919-2019-9-4-248-255.
3. Постников С. С. Токсические эффекты антибиотиков // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. 2008. Т. 87. № 2. С. 111—116.
4. Бирюкова Н. П., Русаков С. В., Напалкова В. В. Общие принципы доклинической оценки безопасности фармакологических лекарственных средств для ветеринарного применения // Ветеринарный врач. 2018. № 1. С. 3—8.
5. Кузьминова Е. В., Семенов М. П., Сампиев А. М., Семенов К. А., Абрамов А. А., Рудь Е. Н. Оценка безопасности препарата для фармакокоррекции теплового стресса у животных // Ветеринарный фармакологический вестник. 2022. № 3(20). С. 48—56. DOI 10.17238/issn2541—8203.2022.3.48.
6. Шабунин С. В., Востроилова Г. А., Григорьева Н. А., Жуков М. С., Грицюк В. А. Интерфероны- α и - γ в клинической ветеринарной практике при профилактике и лечении инфекционных заболеваний у крупного рогатого скота и свиней (обзор). Аграрная наука Северо-Востока. 2022. № 23(1). С. 16—35. DOI: 10.30766/2072—9081.2022.23.1.16—35.
7. Shabunin S., Gritsyuk V., Vostroilova G., Shabanov D., Khokhlova N., Korchagina A. Study of Mutagenic and Antitoxic Properties of Gentabiferon-B // Macedonian Veterinary Review. 2022. Vol. 45. No 1. P. 79—87. DOI 10.2478/macvetrev-2022—0016.
8. Aung T, Grubbe WS, Nusbaum RJ, Mendoza JL. Recent and future perspectives on engineering interferons and other cytokines as therapeutics // Trends Biochem Sci. 2023. № 48(3). P. 259—273. DOI 10.1016/j.tibs.2022.09.005.
9. Ye L, Schnepf D, Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses // Nat. Rev. Immunol. 2019/ № 19. P. 614—625. DOI 10.1038/s41577—019—0182-z.
10. Read SA, Wijaya R, Ramezani-Moghadam M et al. Macrophage Coordination of the Interferon Lambda Immune Response // Front. Immunol. 2019. № 10 P. 2674. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02674.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А. Н. — М.: Гриф и К. 2012. 944с.
12. Хомерики С. Г. Патогенетические механизмы и морфологические проявления лекарственных поражений печени // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2011. № 6. С. 11—21.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- Н. А. Хохлова** — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
Г. А. Востроилова — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;
А. А. Корчагина — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник.
М. С. Жуков — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
Д. И. Шабанов — научный сотрудник;
А. В. Некрасов — старший лаборант.

Статья поступила в редакцию 01.03.2023 г.

TOXICOLOGICAL STUDY OF THE INTERFERON LAMBDA PREPARATION AT ITS MULTIPLE ADMINISTRATION TO WHITE RATS

Nina Alekseevna Khokhlova[✉], Galina Anatolyevna Vostroilova,
Anastasiya Andreevna Korchagina, Maksim Sergeevich Zhukov, Dmitriy Igorevich Shabanov,
Artem Valeryevich Nekrasov

*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy,
Voronezh, Russia, e-mail: nina_xoxlova@mail.ru[✉]*

Abstract. The primary task of preclinical studies of drugs is to determine potential toxic properties, including those with repeated administration at various doses (therapeutic and a multiple of it). Therefore, the objective of this research was to study the toxic effects of the interferon lambda preparation with repeated intramuscular injection, as well as to study the possibility of reversibility of the damage caused. For this, 3 groups of white laboratory rats were formed, weighing 190—210 g, $n = 12$ in each. The animals of the control group were intramuscularly administered a sterile isotonic solution of sodium chloride in a volume of 0.25 ml for 14 days once a day. The rats of the experimental groups, were administered the study preparation in the same sequence at doses of 0.1 ml/kg (conditionally therapeutic) and 1.0 ml/kg (10 times higher than the therapeutic dose, tenfold dose) in the injection volume of 0.25 ml. After a 14-day course of the preparation and 10 days after, blood samples were taken, which were examined by the hematological and biochemical methods. For morphometry and histological examination of the internal organs, a part of the rodents from each group were subjected to euthanasia. It has been established that repeated intramuscular administration of the interferon lambda preparation at conditionally therapeutic and tenfold doses caused some undesirable side effects, expressed in hepatotoxicity. So, in the rats, which were injected with interferon lambda at a tenfold therapeutic dose, there was an increase in the activity of aminotransferases (AST — by 21.8 %, ALT — by 14.8 %) and the amount of total bilirubin — by 2.2 times, and histological examination showed structural changes (moderate lymphohistiocytic infiltration of periportal tracts, diploidy of hepatocyte nuclei). It should be noted that the same structural changes were observed in the rats, which were administered the preparation at a therapeutic dose, in the absence of changes in the biochemical status. However, this process was reversible and leveled off within 10 days after the preparation withdrawal in each group.

Keywords: preclinical studies, toxicology, interferon lambda, white rats, hematology, blood biochemistry, organ mass coefficient

INTRODUCTION

The primary task of preclinical studies of drugs is to determine potential toxic properties, including those with repeated administration at different doses (therapeutic and a multiple of it). At the same time, special attention is paid to the identification of undesirable side effects, taking into account the effect of a number of factors: the dose and frequency of use, the class of the medicinal substance, its ability to accumulate, species, gender, age and the level of animal productivity. The protocol of preclinical studies includes a number of mandatory tests, including the determination of toxic effects with repeated administration, as well as the identification of target organs and the

reversibility of the damage caused. All this makes it possible to assess the risk of potential negative consequences of its use in target animal species during the clinical stage of testing [1—5].

In modern conditions of animal husbandry, an urgent task is the development of new safe and effective drugs to increase the natural resistance of the animal organism.

One of the research areas is the design and comprehensive pharmaco-toxicological evaluation of drugs based on recombinant interferons that correct immune dysfunctions by leveling the deficiency of endogenous regulatory molecules and reproducing their effects [6—7].

Interferons (IFN) are a family of secreted proteins that affect a wide range of physiological processes that regulate innate and adaptive immunity [8]. Interferons are divided into three subgroups: type I interferons (IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ and IFN ω), type II interferons (IFN γ) and type III interferons (IFN λ). Type III interferons are a relatively new addition to the interferon family and are especially important for the immune defense of barrier surfaces [9]. IFN- λ perform functions similar to the type I interferon family, but have significant differences from the latter: they act primarily in epithelial barrier cells and due to more targeted signaling have significant therapeutic advantages and can eliminate a number of side effects that limit the clinical use of IFN I type [10].

The objective of this research was to study the toxic effects of interferon lambda after repeated intramuscular administration to white laboratory rats, to identify the most sensitive organs and systems of the body, and to study the possibility of reversibility of the damage caused.

MATERIAL AND METHODS

To assess the possible toxic effect of the interferon lambda preparation upon repeated administration, in accordance with [11], an experiment design was developed, approved by the bioethical commission of FSBSI "ARVRIPP&T". In vivarium conditions, 3 groups of white laboratory rats were formed, weighing 190—210 g, $n = 12$ in each. The keeping of experimental animals and all manipulations with them within the framework of the experiment complied with the requirements of international and Russian legislative acts (ETS123, Strasbourg, 1986; Directive 2010/63/EU of 22.09.2010; GOST 33216—2014, GOST 33215—2014).

The rats of the experimental groups were injected intramuscularly once a day at approximately the same time for 14 days at doses of 0.1 ml/kg (conditionally therapeutic) and 1.0 ml/kg (10 times higher than therapeutic, tenfold) in the injection volume of 0.25 ml. The animals of the control group, which were kept in similar conditions, were intramuscularly administered a sterile isotonic solution of sodium chloride in the injection volume of 0.25 ml.

The integral characteristics of the general toxic effect of the preparation were appearance, behavior, food intake and water intake; dynamics of body weight of animals when weighing 1 time in 7 days; hematological and biochemical blood indicators, morphometry and histological examination of internal organs specimens. Morphological characteristics of peripheral

blood were determined using a hematological analyzer (ABX Micros 60 CT/OT, France), as well as according to the standard method for counting cells in a Goryaev chamber.

Biochemical indicators were determined in blood serum samples: the concentration of total protein, total lipids, urea, glucose, creatinine, cholesterol, bilirubin, the activity of enzymes of aspartate- and alanine aminotransferases (AST and ALT), using Vital kits (St. Petersburg); protein fractions — by electrophoresis in agarose gel.

Blood samples were taken one day after a 14-day course of preparation use and the end of the 10-day recovery period.

For the morphometry and histological examination of internal organs, some of the rodents from each group were euthanized by an overdose of carbon dioxide in a special chamber 15 and 25 days after the experiment onset.

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

STUDY RESULTS

With repeated intramuscular administration of the interferon lambda preparation and during the recovery period, the death of experimental rats was not recorded. There were no deviations in behavioral reactions, reactions to external stimuli and motor activity, and impaired coordination of movements. The rats ate food and drank water willingly. The state of the coat and mucous membranes corresponded to physiological norms, both in the experimental and control groups.

During the experiment, the body weight of experimental animals increased in all groups, but the dynamics had certain differences (Fig. 1).

The largest increase in body weight of laboratory rats relative to the initial data (before the experiment onset) was recorded in the group, the animals of which were administered the study preparation at a dose of 0.1 ml/kg. In the group of rats treated with the study preparation at a tenfold therapeutic dose, body weight gain was identical to that in the control group.

Thus, in the tested doses with intramuscular administration of the interferon lambda preparation to animals, no general toxic effects were found in rats. At the same time, in the group of the rats, which were administered a conditionally therapeutic dose, the increase in body weight had a more pronounced dynamics relative to other groups of experimental animals.

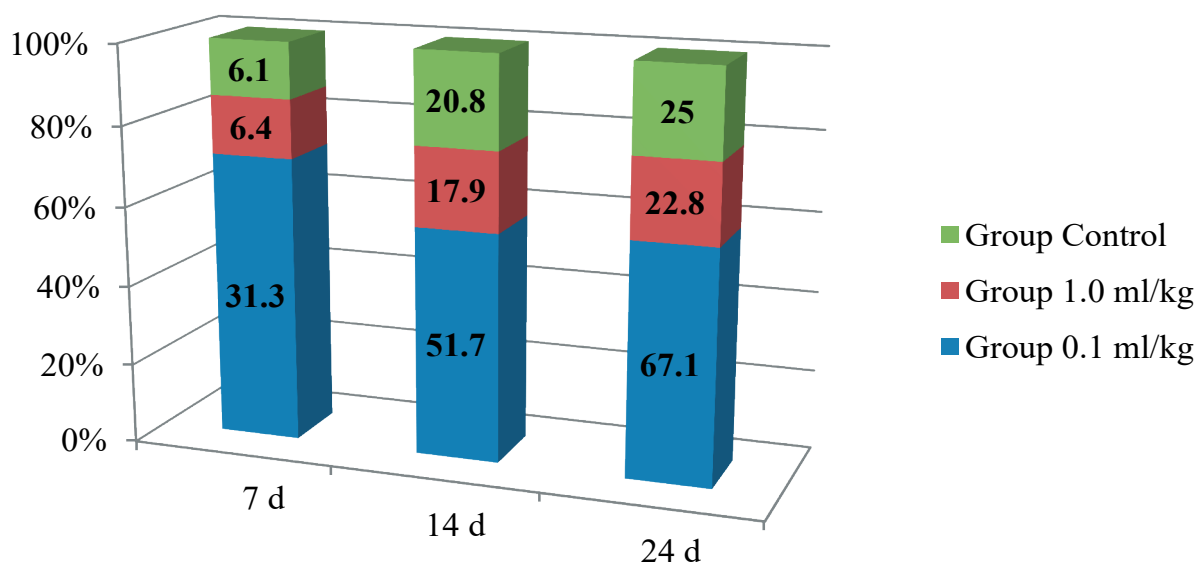


Fig. 1. Effect of repeated administration of the preparation “Lambda-interferon” on the dynamics of body weight in rats (% to the initial body weight before the experiment onset)

To assess the state of internal organs in toxicological studies, such an integral indicator as the organ mass coefficient (OMC) was used — the percentage ratio of organ mass to body mass.

The results of the OMC calculation presented in Table 1 indicate that the 14-day intramuscular administration of the preparation at the tested doses does not cause significant changes in the relative mass of internal organs in experimental rats compared to those in the animals of the control group.

The analysis of histology specimens of internal organs from experimental rats showed that 14 days after the administration of the interferon lambda preparation at the tested doses, structural changes have been noted in the liver (moderate lymphohistiocytic infiltration of the periportal tracts, diploidy of hepatocyte nuclei), which may be associated with the interaction of reactive metabolites of the preparation with structural components of hepatic tissue and violation of the structural and functional integrity of hepatocytes and cells of the stromal environment with the hepatodystrophy development [12]. These changes indicate the presence of a certain toxic effect of the preparation with its repeated use, however, it was transient, and these changes were not recorded in any of the experimental groups 10 days after the recovery period.

A hematological study (Table 2) of rat blood showed that 14 days after the administration of interferon lambda at a dose of 0.1 ml/kg, a significant decrease in the number of erythrocytes and total hemoglobin by 11.4 and 10.1 % was noted. The level of leukocytes and platelets at the same time increased by

47.7 and 25.2 %, respectively. When the dose was increased up to 1.0 ml/kg, a similar trend was observed. So these animals, compared with the control, had an increased level of leukocytes, platelets and segmented neutrophils by 45.8, 16.5 and 18.3 %, respectively, and the amount of total hemoglobin was reduced by 6.4 %. It should be noted that such changes are typical of the development of inflammatory and degenerative processes; in this case, it was observed in the liver, which was confirmed by the result of histological studies. However, after a 10-day recovery period, no significant changes in the above hematological indicators have been recorded, which indicates the reversibility of the processes after the preparation withdrawal.

An increase in the fraction of alpha-globulins that make up acute phase proteins was confirmed by the development of a hepatotoxic effect with prolonged use of the interferon lambda preparation. Thus, in the rats, to which the preparation was administered at a dose of 0.1 ml/kg, an increase in the fraction by 18.1 % was observed compared to the control, and by 48.4 % — in the rats, to which the preparation was administered at a dose of 1.0 ml/kg (Table 3). Further biochemical studies showed that in the rats after a 14-day administration of interferon lambda at a conditionally therapeutic dose, there was an increase in the lactate to pyruvate ratio by 12.1 %, as well as a decrease in the amount of total lipids and triglycerides by 16.7 and 36.5 %, respectively. Against this background, the cholesterol level remained without significant changes, but tended to increase the amount of total bilirubin in the blood, which may be associated with a change in the process of bile excretion.

Table 1

Internal organs mass coefficients (OMC) of rats after repeated intramuscular administration of the interferon lambda preparation ($M \pm m$)

Organs	Group of animals		
	Control	0.1	1.0
In 4 d			
Thymus	0.09 ± 0.012	0.08 ± 0.006	0.08 ± 0.001
Spleen	0.32 ± 0.024	0.26 ± 0.004	0.29 ± 0.011
Liver	2.99 ± 0.114	3.07 ± 0.146	2.97 ± 0.127
Kidneys	0.57 ± 0.014	0.59 ± 0.033	0.60 ± 0.034
Adrenal glands	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.002	0.03 ± 0.003
Heart	0.34 ± 0.017	0.33 ± 0.006	0.35 ± 0.019
Lungs	0.67 ± 0.063	0.68 ± 0.052	0.69 ± 0.072
Testicles	1.20 ± 1.126	1.30 ± 0.060	1.13 ± 0.070
10 d after the recovery period			
Thymus	0.07 ± 0.007	0.06 ± 0.003	0.06 ± 0.005
Spleen	0.26 ± 0.006	0.29 ± 0.015	0.26 ± 0.023
Liver	3.60 ± 0.151	3.57 ± 0.195	3.37 ± 0.169
Kidneys	0.58 ± 0.031	0.63 ± 0.066	0.55 ± 0.020
Adrenal glands	0.03 ± 0.003	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.002
Heart	0.37 ± 0.026	0.32 ± 0.015	0.34 ± 0.019
Lungs	0.69 ± 0.038	0.60 ± 0.057	0.68 ± 0.018
Testicles	0.97 ± 0.072	0.96 ± 0.063	1.06 ± 0.047

Table 2

Morphological blood indicators of white rats with repeated intramuscular use of the interferon lambda preparation ($M \pm m$)

Indicators	Control	Experimental groups	
		0.1 ml/kg	1.0 ml/kg
1	2	3	4
In 14 d			
Erythrocytes, $10^{12}/L$	7.18 ± 0.29	6.36 ± 0.36*	6.97 ± 0.19
Leukocytes, $10^9/L$	5.35 ± 0.39	7.90 ± 0.79*	7.80 ± 0.42*
Hemoglobin, g/L	116.8 ± 2.7	105.2 ± 5.8*	109.0 ± 2.3*
Neutrophils, %	1.75 ± 0.41	1.25 ± 0.31	1.75 ± 0.31

Table 2 (the end)

1	2	3	4
stab	29.0 ± 1.7	28.0 ± 2.2	34.3 ± 2.1*
segmented	0.50 ± 0.19	1.00 ± 0.27	0.75 ± 0.31
Eosinophils, %	—	—	—
Basophils, %	66.0 ± 2.3	66.3 ± 2.1	60.8 ± 2.8
Lymphocytes, %	3.0 ± 0.05	3.5 ± 0.6	2.5 ± 0.3
Monocytes, %	925.8 ± 66.4	1158.8 ± 81.4*	1079.7 ± 50.2*
10 d after the recovery period			
Erythrocytes, 10 ¹² /L	6.94 ± 0.12	6.42 ± 0.28	6.31 ± 0.27*
Leukocytes, 10 ⁹ /L	6.35 ± 0.46	7.27 ± 0.45	7.05 ± 0.68
Hemoglobin, g/L	119.7 ± 1.3	113.8 ± 3.1	117.0 ± 3.9
Neutrophils, %	1.75 ± 0.31	1.33 ± 0.21	1.25 ± 0.31
stab	30.5 ± 2.5	28.0 ± 1.9	32.5 ± 2.3
segmented	0.50 ± 0.19	0.67 ± 0.21	2.25 ± 0.31
Eosinophils, %	—	—	—
Basophils, %	63.8 ± 2.3	66.7 ± 1.8	61.8 ± 3.5
Lymphocytes, %	3.5 ± 0.54	3.3 ± 0.21	2.3 ± 0.51
Monocytes, %	893.3 ± 75.7	850.8 ± 27.4	775.3 ± 56.4

* at $p \leq 0.05$ relative to the control group

Table 3

Effect of repeated administration of the interferon lambda preparation on the biochemical blood indicators of the rats in the experiment (M ± m)

Indicators	Control	Group of animals	
		0.1 ml/kg	1.0 ml/kg
1	2	3	4
ALT, U/L	76.4 ± 3.6	65.1 ± 7.8	85.4 ± 2.1*
AST, U/L	100.1 ± 6.1	110.8 ± 9.2	121.9 ± 9.1*
Glucose, mM/L	4.2 ± 0.14	4.0 ± 0.20	3.9 ± 0.08*
Lactate, mm/L	0.85 ± 0.044	0.86 ± 0.072	0.95 ± 0.036*
Pyruvate, μM/L	129.3 ± 5.1	116.8 ± 9.2	107.8 ± 7.9*
L/P ratio	0.66 ± 0.015	0.74 ± 0.011*	0.88 ± 0.023*
Tot. protein, g/L	66.8 ± 1.8	64.7 ± 0.28	68.2 ± 1.7

Table 3 (the end)

1	2	3	4
Albumins, %	45.9 ± 2.7	46.1 ± 1.6	47.2 ± 1.8
Globulins, %	9.2 ± 0.45	10.9 ± 0.8*	13.7 ± 0.5*
— alpha			
— beta	21.5 ± 0.4	20.7 ± 0.4	20.6 ± 0.6
— gamma	22.2 ± 1.5	21.2 ± 0.7	18.5 ± 1.4*
Creatinine, μM/L	26.0 ± 2.1	28.5 ± 2.7	26.3 ± 1.7
Urea, mm/L	5.22 ± 0.378	5.69 ± 0.387	5.39 ± 0.228
Triglycerides, mM/L	0.96 ± 0.07	0.61 ± 0.054*	0.48 ± 0.044*
Tot. lipids, g/L	1.62 ± 0.082	1.35 ± 0.084*	1.26 ± 0.050*
Cholesterol, mM/L	1.43 ± 0.039	1.53 ± 0.092	1.42 ± 0.119
Bilirubin, μM/L	5.75 ± 0.42	9.32 ± 1.56	10.5 ± 2.60*
Total Igs, mg/ml	15.4 ± 1.14	13.3 ± 0.73	14.7 ± 1.46

* $p \leq 0.05$ relative to the control group

In turn, in the rats, which were injected with interferon lambda at a tenfold therapeutic dose, there was an increase in the activity of aminotransferases (AST — by 21.8 %, ALT — by 14.8 %) and the amount of total bilirubin by 2.2 times, which indicated the appearance of the first signs of cholestasis syndrome caused by the development of hepatodystrophy, which was also confirmed by histological studies. Due to the hepatotoxic effect of the preparation in the experimental animals, a decrease in the amount of glucose and pyruvic acid in the blood by 7.2 and 16.6 %, as well as total lipids and triglycerides — by 50.0 and 22.2 %, respectively, was noted. At the same time, the level of lactic acid increased by 11.8 %, which was reflected in the lac-

tate to pyruvate ratio, which was higher than the control level by 33.3 %, that indicated a shift in metabolism from aerobic to anaerobic pathway.

Ten (10) days after the end of the preparation use, most of the animals involved in the study showed the restoration of hematological and biochemical blood indicators to the level of the control group (Table 4). In the rats, which were injected with interferon lambda at a tenfold therapeutic dose, recovery of most biochemical indicators was also observed, which indicated the resolution of hepatotoxic processes. However, the level of total lipids and triglycerides was still below the level of the control group by 16.9 and 31.5 %, respectively.

Table 4

Biochemical and immunological blood indicators of the rats in the experiment 10 days after the recovery period (M ± m)

Indicators	Control	Group of animals	
		0.1 ml/kg	1.0 ml/kg
1	2	3	4
ALT, U/L	88.5 ± 1.0	86.6 ± 5.3	80.9 ± 5.0
AST, U/L	110.9 ± 7.3	93.7 ± 9.3	98.1 ± 7.1
Glucose, mM/L	4.8 ± 0.04	4.9 ± 0.13	4.5 ± 0.20

Table 4 (the end)

1	2	3	4
Lactate, mm/L	0.87 ± 0.09	0.63 ± 0.09*	0.91 ± 0.12
Pyruvate, μM/L	130.0 ± 7.2	138.3 ± 4.3	129.3 ± 10.4
L/P ratio	0.67 ± 0.014	0.46 ± 0.018*	0.71 ± 0.025
Tot. protein, g/L	69.9 ± 1.3	66.1 ± 1.8	67.2 ± 0.9
Albumins, %	46.0 ± 2.7	50.1 ± 0.7	47.8 ± 1.0
Globulins, %			
— alpha	9.9 ± 0.9	9.6 ± 0.3	10.8 ± 0.9
— beta	22.5 ± 1.2	20.4 ± 0.6	21.4 ± 0.8
— gamma	21.6 ± 0.6	19.9 ± 0.8	20.0 ± 0.6*
Creatinine, μM/L	23.3 ± 2.1	26.0 ± 1.5	25.0 ± 1.2
Urea, mm/L	6.52 ± 0.27	7.03 ± 0.5	6.51 ± 0.18
Triglycerides, mM/L	0.92 ± 0.089	0.80 ± 0.052	0.63 ± 0.68*
Tot. lipids, g/L	1.77 ± 0.130	1.53 ± 0.068	1.47 ± 0.103*
Cholesterol, mM/L	1.32 ± 0.09	1.28 ± 1.15	1.26 ± 0.07
Bilirubin, μM/L	6.7 ± 0.57	7.8 ± 0.71	6.6 ± 1.50
Total Igs, mg/ml	17.8 ± 1.96	18.8 ± 0.87	20.8 ± 1.97

* $p \leq 0.05$ relative to the control group

CONCLUSION

The conducted studies have shown that repeated intramuscular administration of the interferon lambda preparation at conditionally therapeutic and tenfold doses caused some undesirable side effects, expressed in the hepatotoxic effect. This effect was dose-dependent and more pronounced when using an overestimated dose of the preparation, which was reflected in the change in individual hematological and biochemical blood indicators and liver histology. However, this process was reversible and leveled off within 10 days after the preparation withdrawal.

REFERENCES

1. Guskova T. A. Preclinical toxicological study of drugs as a guarantee of the safety of their clinical trials // Toxicological Bulletin (Toksikologicheskij vestnik). 2010. No. 5 (104). P. 2—5.
2. Engalycheva G. N., Syubaev R. D., Goryachev D. V. Quality standards for preclinical pharmacological studies //

Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medicinal Products. Regulatory research and examination of medicines (Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv). 2019. V. 9. No. 4. P. 248—255. DOI 10.30895/1991-2919-2019-9-4-248-255.

3. Postnikov S. S. Toxic effects of antibiotics // Pediatrics. Journal named after G. N. Speranskiy (Pediatriya. Zhurnal im. G. N. Speranskogo). 2008. V. 87. No. 2. P. 111—116.

4. Biryukova N. P., Rusakov S. V., Napalkova V. V. General principles of preclinical safety assessment of pharmacological drugs for veterinary use // Veterinarnyy vrach (Veterinarian). 2018. No. 1. P. 3—8.

5. Kuzminova E. V., Semenenko M. P., Sampiev A. M., Semenenko K. A., Abramov A. A., Rud E. N. Safety assessment of the drug for pharmacocorrection of heat stress in animals // Bulletin of Veterinary Pharmacology. 2022. No. 3(20). P. 48—56. DOI 10.17238/issn2541—8203.2022.3.48.

6. Shabunin S. V., Vostroilova G. A., Grigoryeva N. A., Zhukov M. S., Gritsyuk V. A. Interferons- α and - γ in clinical veterinary practice in the prevention and treatment of infec-

tious diseases in cattle and pigs (review). *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* (Agrarian science of the Euro-North-East). 2022. No. 23(1). P. 16—35. DOI: 10.30766/2072—9081.2022.23.1.16—35.

7. *Shabunin S., Gritsyuk V., Vostroilova G., Shabanov D., Khokhlova N., Korchagina A.* Study of Mutagenic and Antitoxic Properties of Gentabiferon-B // *Macedonian Veterinary Review*. 2022. Vol. 45. No 1. P. 79—87. DOI 10.2478/macvetrev-2022—0016.

8. *Aung T, Grubbe WS, Nusbaum RJ, Mendoza JL.* Recent and future perspectives on engineering interferons and other cytokines as therapeutics // *Trends Biochem Sci*. 2023. No.48(3). P. 259—273. DOI 10.1016/j.tibs.2022.09.005.

9. *Ye L, Schnepf D, Staeheli P.* Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses // *Nat. Rev.*

Immunol. 2019/ № 19. P. 614—625. DOI 10.1038/s41577—019—0182-z.

10. *Read SA, Wijaya R, Ramezani-Moghadam M et al.* Macrophage Coordination of the Interferon Lambda Immune Response // *Front. Immunol.* 2019. № 10 P. 2674. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02674.

11. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs / Ed. by *Mironova A. N.* — M.: Grif and K. 2012. 944p.

12. *Khomeriki S. G.* Pathogenetic mechanisms and morphological manifestations of drug-induced liver lesions // *Eksperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya* (Experimental and Clinical Gastroenterology). 2011. No. 6. P. 11—21.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

N. A. Khokhlova — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;

G. A. Vostroilova — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;

A. A. Korchagina — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;

M. S. Zhukov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;

D. I. Shabanov — Scientific Associate;

A. V. Nekrasov — Senior Laboratory Assistant.

The article was submitted 01.03.2023

ГАБИТАБС — НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ИДИОПАТИЧЕСКОГО ЦИСТИТА КОШЕК

Николай Олегович Костянко*, Азамат Хазретович Шантыз*✉,
Инна Сергеевна Жолобова*, Юрий Андреевич Лысенко*, Евгений Юрьевич Марченко*,
Ольга Владиславовна Петрова**

*Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия

**Апицерна, Москва, Россия, e-mail: shah_8383@mail.ru✉

Аннотация. В статье представлены результаты исследования по изучению клинической эффективности лекарственного препарата для ветеринарного применения Габитабс при идиопатическом цистите кошек. Эксперименты были проведены в условиях ветеринарной клиники Айболит (г. Краснодар) на целевых видах животных — кошках ($n = 16$) с диагнозом идиопатический цистит. Установлено, что лечение идиопатического цистита кошек с применением в схеме лечения ветеринарного препарата Габитабс в дозировке 10 мг/кг в течение 7-ми дней 2 раза в сутки способствовало выздоровлению животных опытной группы за $8,75 \pm 0,90$ сут. против $14,12 \pm 0,81$ сут. в контроле, что на 61,4 % эффективнее в пользу опытной группы. При изучении показателей общего анализа мочи отмечено достоверное снижение содержания белка у животных обеих групп к концу опыта, с преимуществом в 17,8 % в пользу животных, получавших в схеме лечения препарат Габитабс. В результатах ультразвукового исследования мочевого пузыря кошек, а также в биохимическом и гематологическом анализе крови после курса лечения идиопатического цистита между животными опытной и контрольной групп статистически достоверной и диагностически значимой разницы отмечено не было.

Ключевые слова: кошки, идиопатический цистит, FIC (ИЦК), габапентин, лекарственное средство, эффективность, УЗИ, биохимия крови, гематология крови, анализ мочи

Одной из наиболее распространенных патологий нижнего отдела мочевыделительной системы у молодых домашних кошек является идиопатический цистит (FIC). Долгое время этиология ИЦК была неизвестной и терапевтические подходы строились на устранении кристаллурии, изменении pH мочи и применении антибактериальных препаратов.

Впоследствии при более глубоком рассмотрении проблемы было замечено, что триггером для развития цистита выступает стресс. Установлено, что у кошек с FIC более крупные сенсорные нейроны в спинных рогах, и они, как правило, выделяют больше норадреналина, чем нормальные кошки. У кошек, предрасположенных к ИЦК наблюдается десенсibilизация альфа-2-рецепторов в центральной нервной системе, что приводит к меньшему ингибированию норадреналина и выбросу гормонов стресса в организм.

Такие кошки находятся в постоянном гипервозбудимом состоянии борьбы, бегства или замиранья. У кошек с FIC наблюдается патология, связанная с нарушением слоя гликозаминогликанов уротелия, который защищает его от воздействия токсических продуктов мочи. Нарушение в слое гликозамингликанов связано с высвобождением вещества P, одного из основных нейротрансмиттеров, опосредующих боль, тревогу и стресс. Новое понимание механизма развития FIC у кошек открыло широкие возможности для успешной коррекции состояния через блокирование тревожности и стрессовой реакции.

Нами была проведена клиническая апробация препарата на основе габапентина в терапии кошек с идиопатическим циститом. Габапентин широко применяется в гуманной медицине как антиконвульсант в купировании нейропатической боли у пациентов. Однако в настоящее время он уже зареко-

мендовал себя в ветеринарной медицине как препарат для устранения повышенной тревожности у собак и кошек [1—4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование эффективности препарата на основе габапентина (далее — Габитабс) при идиопатическом цистите кошек провели с февраля по май 2022 г в ветеринарной клинике Айболит, г. Краснодар.

По принципу парных аналогов было сформировано 2 группы домашних кошек (контрольная и опытная) по 8 в каждой, средним весом $4,26 \pm 0,25$ кг в возрасте от 1 г. 2 мес. до 11 лет с симптомами цистита [2, 7]. При первичном обращении у животных собирали анамнез, общий анализ мочи, проводили ультразвуковую диагностику мочевого пузыря, биохимические и морфологические анализы крови [5—7]. Повторно животных исследовали при выздоровлении.

Ультразвуковое исследование мочевого пузыря осуществляли на аппарате Mindray BC-2800Vet, интерпретацию полученных данных согласовывали с литературными источниками [8—10].

Сбор мочи для общего анализа проводили с помощью цистоцентеза, анализ проводили при помощи визуальных тест-полосок для анализа мочи «Уриполиан-11А» (Биосенсор АН, Россия), плотность определяли на Рефрактометре RZ-128 (RZ,

Китай), также проводили микроскопию осадка и цитологическое исследование мочи.

Для морфологических исследований цельной крови использовали пробирки вакуумные объемом 2,0 мл, с реагентом ЭДТА-К2 (МиниМед, Россия). Для биохимических исследований сыворотки крови использовали пробирки вакуумные объемом 2,0 мл, с реагентом (клот-активатор SiO₂) (МиниМед, Россия).

Морфологические исследования крови проводились на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray DC-T6, а также использовались стандартные гематологические исследования, принятые в ветеринарной диагностической практике.

Биохимические исследования показателей крови проводили на экспресс-анализаторе MNCHIP V2 (Tianjin MNCHIP Technologies Co., Ltd, Китай) с набором дисков для биохимического экспресс-анализатора Pointcare (Tianjin MNCHIP Technologies Co., Ltd, Китай). Полученные данные по гематологическим исследованиям сравнивали со значениями до начала терапии животных и с референсными показателями для вида [11—13].

Все животные, участвующие в опыте, содержались в квартирных условиях без выгула. Кормление было 2-разовым, в основе рациона — промышленные сухие корма премиум-класса, вода у всех животных находилась в постоянном свободном доступе. Схемы лечения для опытной и контрольной группы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Схема лечения идиопатического цистита кошек

Группа	Назначение
Опытная	Габитабс 10 мг/кг, 2 р/день, 7 дней КотЭрвин, перорально, 2 мл 2 р/день, 7 дней
Контрольная	КотЭрвин, перорально, 2 мл 2 р/день, 7 дней СтопСтресс ½ — ¼ табл., 2 раза в день, 14 дней

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании данных клинического осмотра, результатов анализа крови и мочи было установлено, что применение препарата Габитабс в схеме лечения идиопатического цистита кошек является более эффективным, чем аналогичное лечение без его использования. Установлено, что сроки лечения идиопатического цистита кошек контрольной группы были выше, чем в опытной группе, получавшей габапентин (рис. 1). Время, потребовавшееся для полного выздоровления животных опытной

группы, составило $8,75 \pm 0,90$ сут., в контрольной $14,12 \pm 0,81$ сут. Разница между группами была статистически достоверной ($p \leq 0,001$) и составила 5,37 сут. или 61,4 %.

Анализируя данные динамики живой массы тела подопытных кошек (рис. 2) видно, что изменения живой массы тела животных в течение всего периода испытаний в разрезе групп были незначительными. При измерении данного показателя в 1-й день опыта, среднegrupповая масса тела кошек опытной группы составила $4,40 \pm 0,34$ кг,

в контроле $4,17 \pm 0,34$ кг, при контрольном взвешивании было отмечено, что масса тела животных опытной группы увеличилась на 0,7 % и составила $4,43 \pm 0,32$ кг, тогда как в контрольной группе было зафиксировано снижение на 0,1 кг (2,4 %).

Данные изменения у животных контрольной группы могут быть связаны с более длительным периодом лечения, однако статистической достоверности полученных цифровых значений зафиксировано не было.



Рис. 1. Количество дней лечения ИЦК

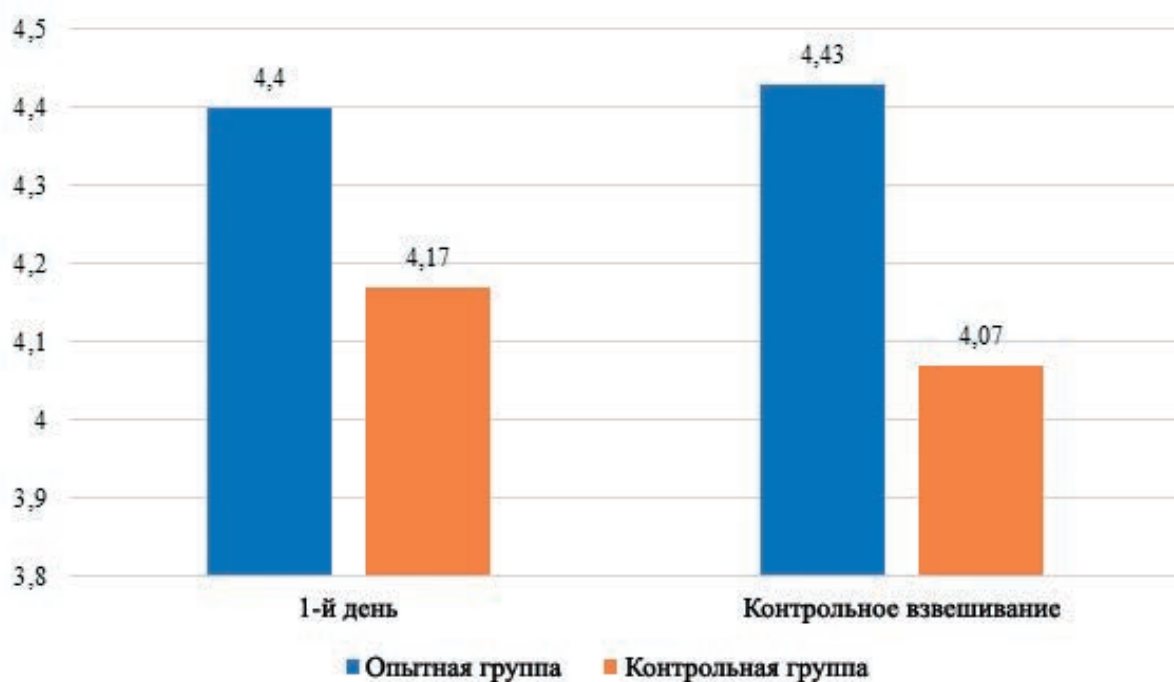


Рис. 2. Динамика средней живой массы тела подопытных кошек, кг

При проведении ультразвукового исследования мочевого пузыря у кошек с идиопатическим циститом, установлено, что при первичном исследовании, у животных всех групп мочевой пузырь визуализировался, топографическое положение со-

ответствовало анатомическим нормам, отмечалось утолщение слизистого слоя, дифференциация слоев стенки была не четкой (рис. 3).

Анализ толщины стенки мочевого пузыря представлена на рисунке 4.



Рис. 3. УЗИ мочевого пузыря при ИЦК

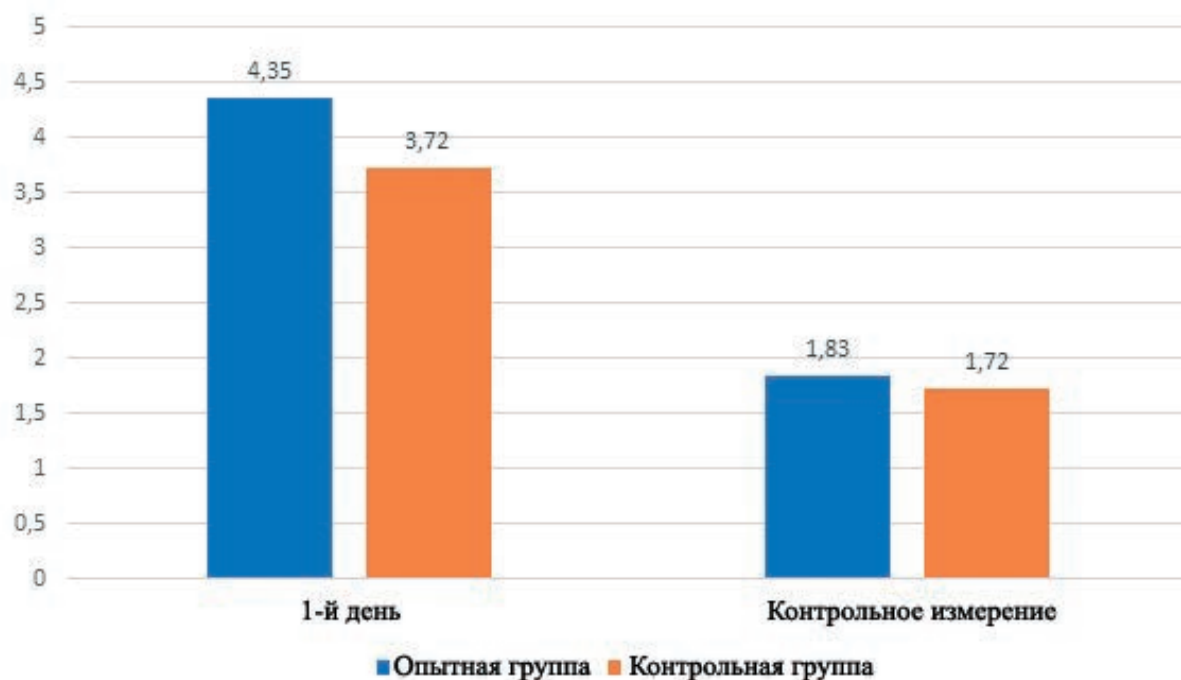


Рис. 4. Толщина стенки мочевого пузыря кошек при идиопатическом цистите и после лечения

При проведении ультразвукового исследования мочевого пузыря животных установили, что толщина стенки мочевого пузыря у кошек опытной группы в день обращения в клинику соста-

вила $4,35 \pm 0,34$ мм, в контрольной группе — $3,72 \pm 0,24$ мм (при норме от 1 до 2,3 мм в зависимости от наполненности мочевого пузыря). Увеличение толщины стенки мочевого пузыря сви-

детельствует о развитии воспалительного процесса. При проведении повторного измерения мочевого пузыря у кошек (рис. 5) установлено, что во всех группах мочевой пузырь хорошо визуализируется, был разной степени наполненности, эхогенность стенки не была повышена, дифференциация

слоев четкая, слизистый слой не утолщен, содержимое однородное, эхогенное, не содержит осадка. Толщина стенки мочевого пузыря у животных опытной группы уменьшилась на 57,9 %, составив $1,83 \pm 0,13$ мм, у кошек контрольной группы изменения составили 53,7 % ($1,72 \pm 0,09$ мм).



Рис. 5. УЗИ мочевого пузыря после лечения ИЦК

Результаты общего анализа мочи подопытных кошек при первичном исследовании также демонстрировали изменения, характерные для цистита. Уровень лейкоцитов у животных опытной группы составил $5,75 \pm 2,11$ ед/п.з., в контрольной группе $2,62 \pm 1,45$ ед/п.з., уровень белка составил в опытной группе $20,00 \pm 5,08$ г/л, в контрольной группе $13,12 \pm 3,39$ г/л, рН у животных опытной группы находилось в пределах физиологической нормы и составила $5,46 \pm 0,83$ ед, в кон-

трольной группе — превышал референсное значение, составив $7,31 \pm 0,16$ ед. Количество эритроцитов в моче животных опытной группы составило $106,25 \pm 35,50$ ед/в п. з., в контрольной $36,87 \pm 24,18$ ед/в п. з.

При микроскопии осадка у животных обеих групп обнаружен плоский эпителий, эритроциты, единичные лейкоциты. При цитологическом исследовании мочи выявлен плоский эпителий и единичные лейкоциты (табл. 2)

Таблица 2

Результаты общего анализа мочи кошек с FIC

Показатель	1-е измерение		Контрольное измерение		Норма
	Опытная	Контрольная	Опытная	Контрольная	
1	2	3	4	5	6
Лейкоциты, ед/п. з.	$5,75 \pm 2,11$	$2,62 \pm 1,45$	$1,50 \pm 0,50$	$1,00 \pm 0,56$	0,0—3,0
Кетоны, ммоль/л	$0,25 \pm 0,25$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	0,0
Уробилиноген	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	0,0
Билирубин	$0,62 \pm 0,62$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	0,0

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6
Белок, г/л	20,00 ± 5,08	13,12 ± 3,39	0,25 ± 0,25**	2,50 ± 1,33**	0,0—0,2
Глюкоза, ммоль/л	2,50 ± 2,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,0
Удельный вес, г/мл	1,018 ± 0,005	1,014 ± 0,002	1,021 ± 0,004	1,017 ± 0,001	1,020—1,025
Эритроциты, ед/п.з.	106,25 ± 35,50	36,87 ± 24,18	5,62 ± 3,19	8,12 ± 6,11	0,0
pH, ед	5,46 ± 0,83	7,31 ± 0,16	5,68 ± 0,81	6,37 ± 0,12**	5,0—6,5

** $P \leq 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы

При повторном исследовании мочи леченных кошек, было установлено, что количество лейкоцитов у кошек опытной группы снизилось до $1,50 \pm 0,50$ ед/в п. з. и в контрольной группе до $1,00 \pm 0,56$ ед/в п. з. Отмечено снижение белка в опытной группе на 98,75 % и в контроле на 80,95 %. Эритроциты в моче животных испытываемых групп после курса лечения еще превышали значения нормы, однако снижение данного показателя составило 94,71 % в опытной группе и на 77,98 % в контроле. Результаты микроскопии осадка и цитологии не выявили отклонений от референсных показателей животных.

Морфологические показатели крови подопытных кошек находились в пределах физиологических норм (табл. 3). Однако стоит отметить некоторые из-

менения: количество лейкоцитов у кошек опытной группы до лечения составило $12,31 \pm 1,73$ тыс/мкл, а после лечения $10,65 \pm 0,64$ тыс/мкл — снижение составило 13,48 %, в контрольной группе данный показатель снизился лишь на 9,46 %. Было отмечено статистически достоверное снижение количества эритроцитов у животных опытной группы к концу опыта на 25,76 %, в контроле снижение данного показателя составило 6,94 %, однако данное изменение не являлось статистически достоверным. Уровень эозинофилов в опытной группе в начале опыта составил $1,75 \pm 0,36$ %, к концу опыта данный показатель снизился на 7,43 %, в контрольной группе отметили противоположную ситуацию: к концу эксперимента эозинофилы увеличились на 33,69 %.

Таблица 3

Результаты общего анализа крови подопытных кошек

Показатель	1-е измерение		Контрольное измерение		Норма
	Опытная	Контрольная	Опытная	Контрольная	
1	2	3	4	5	6
Лейкоциты, тыс/мкл	$12,31 \pm 1,73$	$13,22 \pm 1,34$	$10,65 \pm 0,64$	$11,97 \pm 0,78$	5,5—18,5
Эритроциты, млн/мкл	$7,57 \pm 0,68$	$7,92 \pm 0,25$	$5,62 \pm 0,43^*$	$7,37 \pm 0,19$	5,3—10,0
Тромбоциты, тыс/мкл	$433,25 \pm 32,89$	$497,25 \pm 18,34$	$422,62 \pm 15,50$	$471,50 \pm 14,49$	300,0—630,0
Гематокрит, %	$36,87 \pm 2,46$	$36,25 \pm 1,89$	$39,00 \pm 0,70$	$40,12 \pm 1,74$	26,0—48,0
Гемоглобин, г/л	$117,25 \pm 8,26$	$111,25 \pm 6,17$	$127,00 \pm 3,25$	$124,12 \pm 5,53$	80,0—150,0

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6
Сред. объем эритроцитов, мкм ³	47,37 ± 1,33	46,87 ± 1,38	49,37 ± 0,62	47,75 ± 1,13	43,0—53,0
Сред. концентр. гемоглобина в эритроците, %	32,87 ± 0,58	36,25 ± 1,93	32,87 ± 0,44	37,75 ± 0,99	31,0—36,0
Сред. содержание гемоглобина в эритроците, пг	15,75 ± 0,55	16,87 ± 0,58	15,37 ± 0,46	15,25 ± 0,25*	14,0—19,0
Лимфоциты, %	42,50 ± 2,44	31,00 ± 2,48	42,75 ± 1,13	36,25 ± 1,81	36,0—51,0
Сегментоядерные нейтрофилы, %	58,25 ± 5,62	51,87 ± 6,65	56,62 ± 3,53	55,12 ± 3,22	35,0—75,0
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,75 ± 0,36	1,50 ± 0,56	2,12 ± 0,35	1,75 ± 0,25	0,0—3,0
Эозинофилы, %	1,75 ± 0,36	1,87 ± 0,81	1,62 ± 0,32	2,50 ± 0,46	0,0—4,0

* $P \leq 0,05$ — по сравнению с животными контрольной группы

Таблица 4

Результаты биохимического анализа сыворотки подопытных кошек

Показатель	1-е измерение		Контрольное измерение		Норма
	Опытная	Контрольная	Опытная	Контрольная	
АЛТ, Ед/л	35,75 ± 2,52	35,25 ± 3,663	34,87 ± 1,46	41,25 ± 2,47	8,0—60,0
АСТ, Ед/л	40,32 ± 2,91	33,37 ± 2,46	41,00 ± 1,68	42,75 ± 2,40*	12,0—45,0
ЩФ, Ед/л	91,75 ± 6,86	93,62 ± 8,39	90,50 ± 3,44	105,37 ± 4,86	49,0—90,0
Мочевина, ммоль/л	9,81 ± 2,34	7,26 ± 1,21	6,92 ± 0,14	4,92 ± 0,20	5,4—12,1
Глюкоза, ммоль/л	4,86 ± 0,21	4,87 ± 0,29	4,70 ± 0,19	7,41 ± 0,24	3,3—6,3
Креатинин, мкмоль/л	142,37 ± 47,58	108,62 ± 18,44	105,75 ± 7,26	102,87 ± 5,33	70,0—165,0
Общий белок, г/л	73,37 ± 2,69	64,50 ± 1,21	68,37 ± 0,75	66,12 ± 1,21	54,0—79,0
Общий билирубин, мкмоль/л	8,02 ± 0,53	7,41 ± 0,42	7,47 ± 0,42	7,66 ± 0,24	2,0—12,0

* $P \leq 0,01$ — по сравнению с животными контрольной группы

Биохимические показатели крови, представленные на таблице 4, взятые у подопытных кошек, соответствовали физиологической нормы для данного вида и возрастной группы животных. Однако, имелись незначительные различия. Так, уровень АЛТ у кошек опытной группы до лечения составил $35,75 \pm 2,52$ Ед/л, к концу опыта данный показатель незначительно снизился и составил $34,87 \pm 1,46$ Ед/л, в контрольной группе уровень АЛТ к концу опыта увеличился на 17,02 %. Также было отмечено достоверное увеличение АСТ в контрольной группе: в начале опыта его уровень составил $33,37 \pm 2,46$ Ед/л, к концу опыта $42,75 \pm 2,40$ Ед/л, изменение составило 28,11 %, в опытной группе к концу опыта отметили незначительное увеличение данного показателя на 1,69 %. Было отмечено значительное снижение уровня мочевины к концу опыта у животных опытной и контрольной групп на 29,46 % и 32,23 % соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследований применение препарата Габитабс, разработанного ООО «АПИ-САН» (Россия) для мелких домашних животных в схеме лечения идиопатического цистита кошек было эффективным. Назначение габапентина способствовало ускорению выздоровления животных на 61,4 %, в сравнении с кошками, не получавшими препарат. Таким образом, Габитабс может быть рекомендован в клинической практике ветеринарного врача в протоколе лечения идиопатического цистита кошек.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sarah J. Wooten, Feline interstitial cystitis: Its not about the bladder. <https://www.dvm360.com/view/feline-interstitial-cystitis-it-s-not-about-bladder>. November 30, 2017
2. Forrester S. D. Feline idiopathic cystitis / S. D. Forrester, T. L. Towell // Vet Clin North Am Small Anim Pract. — 2015. — P. 783—806.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- Н. О. Костянюк** — аспирант;
А. Х. Шантыз — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики;
И. С. Жолобова — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики;
Ю. А. Лысенко — доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики;
Е. Ю. Марченко — кандидат ветеринарных наук, ветеринарный врач;
О. В. Петрова — кандидат ветеринарных наук, специалист по фармаконадзору.

Статья поступила в редакцию 18.01.2023 г.

3. Jones E, Palmieri C, Thompson M, Jackson K, Al-lavena R. Feline Idiopathic Cystitis: Pathogenesis, Histopathology and Comparative Potential / E. Jones [et al.] // J Comp Pathol. — 2021. — P. 18—29.

4. Crowell-Davis S. L., Murray T. Combinations in: veterinary psychopharmacology // S. L. Crowell-Davis, T. Murray // Ames, Iowa: Blackwell Publishing. — 2006. — P. 234—240.

5. Воронин Е. С. Клиническая диагностика с рентгенологией / Е. С. Воронин, Г. В. Сноз, М. Ф. Васильев и др. — М.: Колос, 2006. — 509 с.

6. Правила проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения» (приказ Минсельхоза России от 06.03.2018 № 101 (ред. от 05.06.2020), зарегистрировано в Минюсте России 05.06.2018 № 51296).

7. Воронин Е. С. Практикум по клинической диагностике с рентгенологией / Е. С. Воронин и др. — М. ИНФРА — М, 2014. — 355 с.

8. Зуева Н. М. УЗИ в ветеринарии. Мелкие домашние животные. Органы брюшной полости / Н. М. Зуева, В. А. Сургина // М.: Видар, 2015. — 192 с.

9. Mannion P. Diagnostic Ultrasound in Small Animal Practice 1st Edition / P. Mannion // Blackwell Publishing, 2006. — 344 p.

10. Делорм С. Руководство по ультразвуковой диагностике. 3-е изд. Пер. с англ. / С. Делорм, Ю. Дебю, К. — В. Йендерка // М.: МЕДпресс-информ. — 2021. — 408 с.

11. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. — М.: «Колосс». — 2004. — 520 с.

12. Медведева М. А. Клиническая ветеринарная лабораторная диагностика. — М.: «Аквариум Принт». — 2013. — 416 с.

13. Мейер Д. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика. Пер. с англ. / Д. Мейер, Дж. Харви // М.: Софион. — 2007. — 456 с.

GABITABS — A NEW APPROACH TO THE TREATMENT OF FELINE IDIOPATHIC CYSTITIS

Nikolay Olegovich Kostyanko*, Azamat Khazretovich Shantyz*✉, Inna Sergeevna Zholobova*,
Yuriy Andreevich Lysenko*, Evgeniy Yuryevich Marchenko*, Olga Vladislavovna Petrova**

*Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia

**Apicenna, Moscow, Russia, e-mail: shah_8383@mail.ru✉

Abstract. The article presents the results of a study on the clinical efficacy of the drug for veterinary use Gabitabs in case of feline idiopathic cystitis. The experiments were carried out in the conditions of the veterinary clinic “Aybolit” (Krasnodar) on the target animal species — cats ($n = 16$) with an idiopathic cystitis diagnosis. It was established that the treatment of idiopathic cystitis in cats with the use of the veterinary drug Gabitabs in the treatment regimen at a dosage of 10 mg/kg for 7 days 2 times a day contributed to the recovery of the animals of the experimental group in 8.75 ± 0.90 days versus 14.12 ± 0.81 days in the control one, which was by 61.4 % more effective in favor of the experimental group. When studying the indicators of the urinalysis, a significant decrease in the protein content in the animals of both groups by the end of the experiment was noted, with an advantage of 17.8 % in favor of the animals that received Gabitabs in the treatment regimen. In the results of ultrasound examination of the bladder of cats, as well as in the biochemical and hematological blood analysis after the course of treatment of idiopathic cystitis, there was no statistically significant and diagnostically significant difference among the animals of the experimental and control groups.

Keywords: cats, idiopathic cystitis, FIC, gabapentin, drug, efficacy, ultrasound, blood biochemistry, blood hematology, urinalysis

One of the most common lower urinary tract pathologies in young domestic cats is feline idiopathic cystitis (FIC). For a long time, the etiology of FIC was unknown and therapeutic approaches were based on the elimination of crystalluria, changes in urine pH and the use of antibacterial drugs. Subsequently, with a deeper consideration of the problem, it has been noticed that the trigger for the development of cystitis is stress. It has been found that cats with FIC have larger sensory neurons in their dorsal horns and tend to release more norepinephrine than normal cats. Cats predisposed to FIC show desensitization of alpha-2 receptors in the central nervous system, resulting in less norepinephrine inhibition and release of stress hormones into the body. Such cats are in a constant hyperexcitable state of fight, escapement or freezing behavior.

Cats with FIC have an abnormality in the glycosaminoglycan layer of urothelium, which protects it from exposure to toxic urine products. The disruption in the glycosaminoglycan layer is associated with the release of substance P, one of the main neurotransmitters mediating pain, anxiety and stress. New un-

derstanding of the mechanism of FIC development in cats has opened up great opportunities for successful correction of the state through blocking anxiety and stress response.

We have conducted a clinical approbation of the drug based on gabapentin in the treatment of cats with idiopathic cystitis. Gabapentin is widely used in human medicine as an anticonvulsant in the management of neuropathic pain in patients. However, at present, it has already established itself in veterinary medicine as a drug for the elimination of increased anxiety in dogs and cats [1–4].

MATERIAL AND METHODS

The study of the efficacy of a drug based on gabapentin (hereinafter referred to as Gabitabs) in case of feline idiopathic cystitis was conducted from February to May, 2022 at the veterinary clinic “Aybolit”, Krasnodar.

According to the principle of paired analogues, 2 groups of domestic cats (control and experimental) were formed, 8 in each one, with an average weight of

4.26 ± 0.25 kg, aged from 1 year and 2 mths up to 11 years of age with cystitis symptoms [2, 7].

Anamnesis, urinalysis, ultrasound diagnostics of the bladder, biochemical and morphological blood analyses were performed at the initial visit to the veterinarian [5—7]. The animals were re-examined upon recovery.

Ultrasound examination of the bladder was performed using a Mindray BC-2800Vet apparatus, the interpretation of the data obtained was consistent with the literature [8—10].

Urine collection for general analysis was carried out using cystocentesis, the analysis was performed using visual test strips for urine analysis Uripollian-11A (Biosensor AN, Russia), the density was determined on the Refractometer RZ-128 (RZ, China), sediment microscopy and urine cytology were also performed.

For morphological studies of whole blood, 2.0 ml vacuum tubes with EDTA-K2 reagent (MiniMed, Russia) were used. For biochemical studies of blood se-

rum, 2.0 ml vacuum tubes with a reagent (clot-activator SiO₂) (MiniMed, Russia) were used.

Morphological blood analyses were carried out on an automatic hematological analyzer Mindray DC-T6, and standard hematological tests accepted in veterinary diagnostic practice were also used.

Biochemical studies of blood indicators were performed on MNCHIP V2 express analyzer (Tianjin MNCHIP Technologies Co., Ltd, China) with a set of disks for the Pointcare biochemical express analyzer (Tianjin MNCHIP Technologies Co., Ltd, China). The obtained data on hematological studies were compared with the values before the start of animal therapy and with the reference values for the species [11—13].

All animals participating in the experiment were kept in apartment conditions without walking. Feeding was 2 times a day, the diet was based on premium industrial dry food, water was in constant free access for all animals.

Treatment regimens for the experimental and control groups are presented in Table 1.

Table 1

Treatment regimen for feline idiopathic cystitis

Group	Therapy
Experimental	Gabitrabs 10 mg/kg, 2 t/d, 7 d KotErvin, orally, 2 ml 2 t/d, 7 d
Control	KotErvin, orally, 2 ml 2 t/d, 7 d StopStress ½ — ¼ tab., 2 t/d, 14 d

STUDY RESULTS

Based on clinical examination data, blood and urine analyses, it has been found that the use of Gabitrabs in the treatment regimen for feline idiopathic cystitis is more effective than similar treatment without its use. It was established that the terms of treatment of idiopathic cystitis in the cats of the control group were higher than in the experimental group that received gabapentin (Fig. 1). The time required for complete recovery of the animals of the experimental group was 8.75 ± 0.90 days, in the control group it was 14.12 ± 0.81 days.

The difference between the groups was statistically significant ($p \leq 0.001$) and amounted to 5.37 d or 61.4 %.

Analyzing the data on the dynamics of the body weight of experimental cats (Fig. 2), it can be seen that changes in the body weight of animals during the entire period of testing in the context of groups were insignificant. When measuring this indicator on day of

the experiment, the average group body weight of the cats of the experimental group was 4.40 ± 0.34 kg, in the control — 4.17 ± 0.34 kg, during the control weighing it was noted that the body weight of the animals of the experimental group increased by 0.7 % and amounted to 4.43 ± 0.32 kg, while in the control group a decrease by 0.1 kg (2.4 %) was recorded. These changes in the animals of the control group may be associated with a longer period of treatment, but the statistical significance of the obtained numerical values was not recorded.

When conducting an ultrasound examination of the bladder in cats with idiopathic cystitis, it was found that during the initial study, in the animals of all groups, the bladder was visualized, the topographic position corresponded to anatomical norms, thickening of the mucous layer was noted, differentiation of the wall layers was not clear (Fig. 3).

An analysis of the thickness of the bladder wall is presented in Fig. 4.

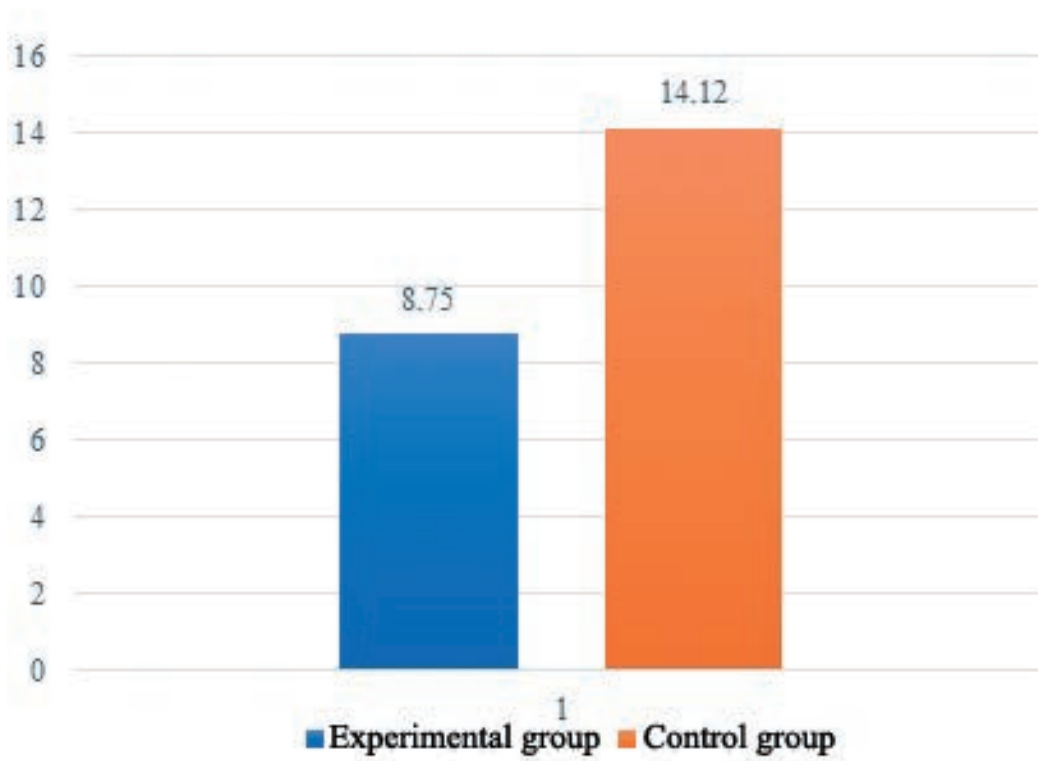


Fig. 1. Number of days of FCI treatment

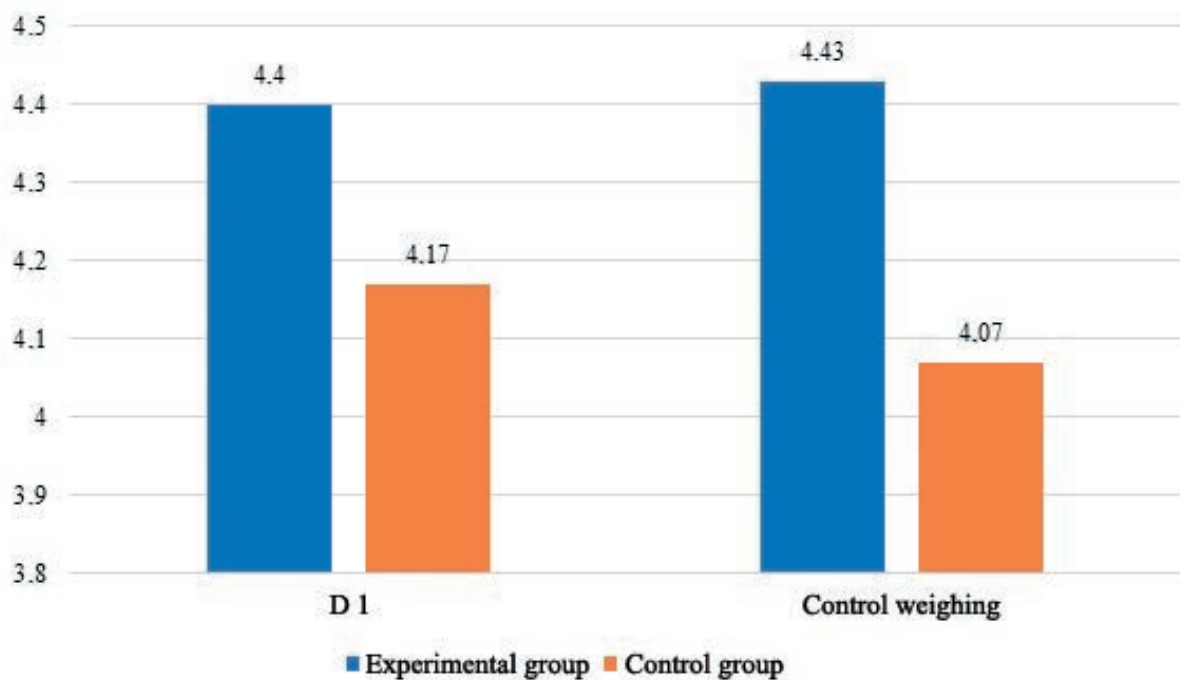


Fig. 2. Dynamics of the average live body weight of experimental cats, kg

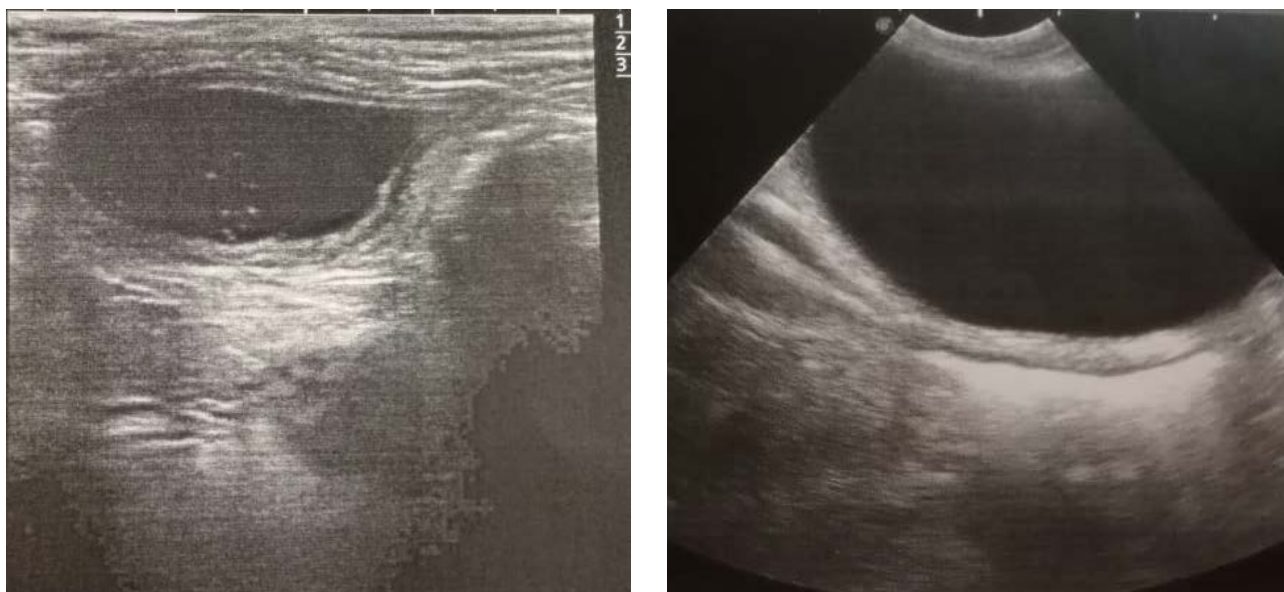


Fig. 3. Ultrasound of the bladder in case of FIC

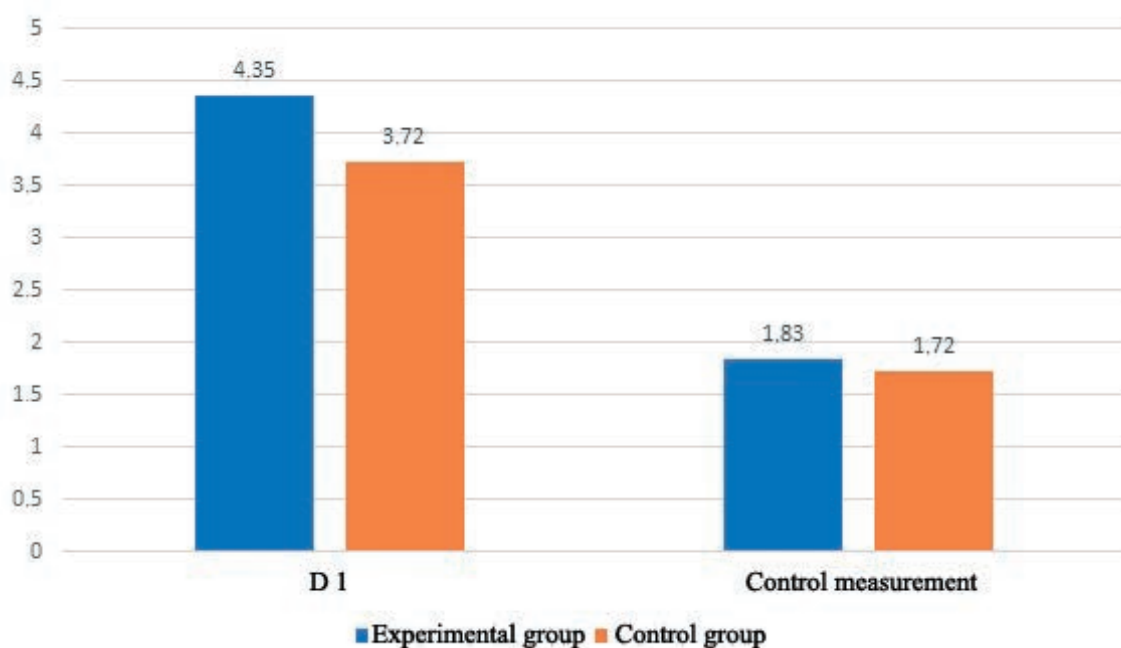


Fig. 4. Bladder wall thickness in cats with idiopathic cystitis and after treatment

When conducting an ultrasound examination of the bladder of animals, it was found that the thickness of the bladder wall in the cats of the experimental group on the day of visiting the clinic was 4.35 ± 0.34 mm, in the control group — 3.72 ± 0.24 mm (with a norm from 1 up to 2.3 mm depending on the fullness of the bladder). An increase in the thickness of the bladder wall indicates the development of an inflammatory process.

When re-measuring the bladder in cats (Fig. 5), it was found that in all groups the bladder was well visualized, it was of varying degrees of fullness, the

echogenicity of the wall was not increased, the differentiation of the layers was clear, the mucous layer was not thickened, the contents were homogeneous, echogenic, did not contain sediment. The bladder wall thickness in the animals of the experimental group decreased by 57.9 %, amounting to 1.83 ± 0.13 mm, in the cats of the control group the changes were 53.7 % (1.72 ± 0.09 mm).

The results of the urinalysis of experimental cats at the initial examination also showed changes typical of cystitis. The level of leukocytes in the an-

imals of the experimental group was 5.75 ± 2.11 U/v.f. (v. f. — visual field), in the control group — 2.62 ± 1.45 U/v.f., the protein level in the experimental group was 20.00 ± 5.08 g/L, in the control group — 13.12 ± 3.39 g/L; pH in the animals of the experimental group was within the physiological norm and amounted to 5.46 ± 0.83 units, in the control group it exceeded the reference value, amounting to 7.31 ± 0.16 units.

The number of erythrocytes in the urine of the animals of the experimental group was 106.25 ± 35.50 U/v.f., in the control group — 36.87 ± 24.18 U/v.f. Microscopic examination of the sediment in the animals of both groups revealed squamous epithelium, erythrocytes, single leukocytes. Cytological examination of urine revealed squamous epithelium and single leukocytes (Table 2)

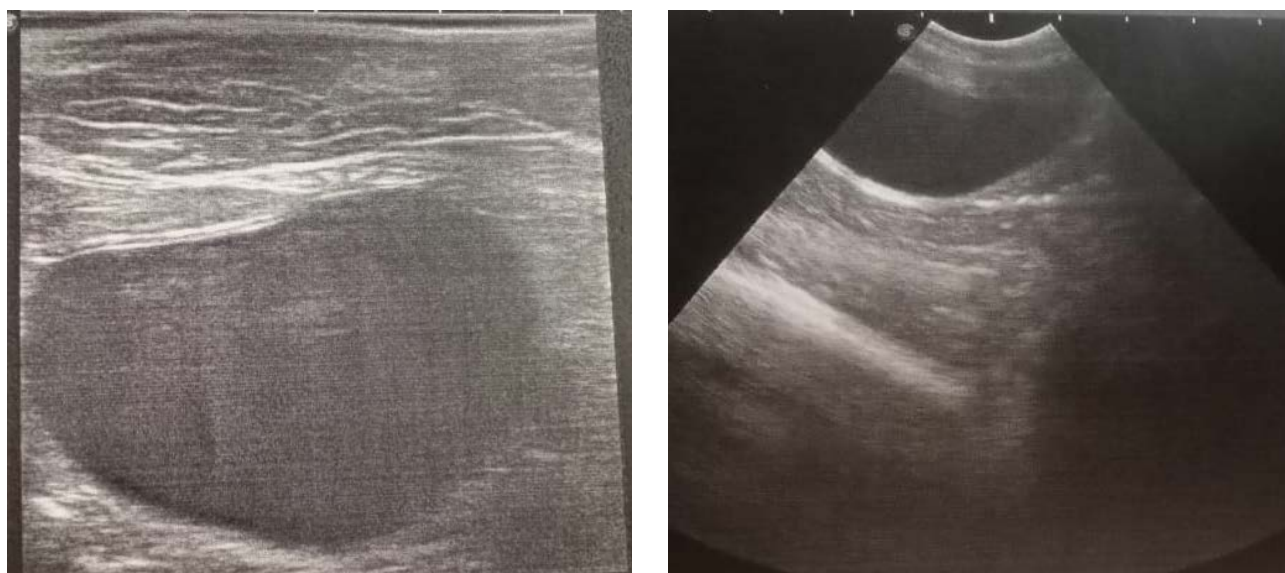


Fig. 5. Ultrasound of the bladder after FIC treatment

Table 2

Results of a urinalysis of cats with FIC

Indicator	1st measurement		Control measurement		Norm
	Experimental	Control	Experimental	Control	
Leukocytes, U/v.f.	5.75 ± 2.11	2.62 ± 1.45	1.50 ± 0.50	1.00 ± 0.56	0.0—3.0
Ketones, mmol/L	0.25 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.0
Urobilinogen	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.0
Bilirubin	0.62 ± 0.62	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.0
Protein, g/L	20.00 ± 5.08	13.12 ± 3.39	$0.25 \pm 0.25^{**}$	$2.50 \pm 1.33^{**}$	0.0—0.2
Glucose, mmol/L	2.50 ± 2.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.0
Specific gravity, g/ml	1.018 ± 0.005	1.014 ± 0.002	1.021 ± 0.004	1.017 ± 0.001	1.020—1.025
Erythrocytes, U/v.f.	106.25 ± 35.50	36.87 ± 24.18	5.62 ± 3.19	8.12 ± 6.11	0.0
pH, U	5.46 ± 0.83	7.31 ± 0.16	5.68 ± 0.81	$6.37 \pm 0.12^{**}$	5.0—6.5

****** $P \leq 0.001$ — compared with the animals of the control group

When re-examining the urine of treated cats, it was found that the number of leukocytes in the cats of the experimental group decreased to 1.50 ± 0.50 U/v.f. and in the control group — up to 1.00 ± 0.56 units/v.f. A decrease in protein by 98.75 % was noted in the experimental group and in the control group — by 80.95 %. Erythrocytes in the urine of the animals of the experimental groups after the course of treatment still exceeded the normal values, however, the decrease in this indicator was 94.71 % in the experimental group and by 77.98 % in the control one. The results of sediment microscopy and cytology did not reveal deviations from the reference indicators of animals.

The morphological blood indicators of the experimental cats were within the physiological norms (Table 3). However, it is worth noting some changes: the

number of leukocytes in the cats of the experimental group before treatment was 12.31 ± 1.73 ths/ μ L, and after treatment — 10.65 ± 0.64 ths/ μ L, the decrease was 13.48 %, this indicator in the control group decreased only by 9.46 %. A statistically significant decrease in the number of erythrocytes by 25.76 % in the animals of the experimental group by the end of the experiment was noted. In the control one, the decrease in this indicator was 6.94 %, however, this change was not statistically significant.

The level of eosinophils in the experimental group at the beginning of the experiment was 1.75 ± 0.36 %, by the end of the experiment this indicator decreased by 7.43 %. In the control group, the opposite situation was noted. By the end of the experiment, eosinophils increased by 33.69 %.

Table 3

Results of a clinical blood analysis of experimental cats

Indicator	1st measurement		Control measurement		Norm
	Experimental	Control	Experimental	Control	
Leukocytes, ths/ μ L	12.31 ± 1.73	13.22 ± 1.34	10.65 ± 0.64	11.97 ± 0.78	5.5—18.5
Erythrocytes, mln/ μ L	7.57 ± 0.68	7.92 ± 0.25	$5.62 \pm 0.43^*$	7.37 ± 0.19	5.3—10.0
Platelets, ths/ μ L	433.25 ± 32.89	497.25 ± 18.34	422.62 ± 15.50	471.50 ± 14.49	300.0—630.0
Hematocrit, %	36.87 ± 2.46	36.25 ± 1.89	39.00 ± 0.70	40.12 ± 1.74	26.0—48.0
Hemoglobin, g/L	117.25 ± 8.26	111.25 ± 6.17	127.00 ± 3.25	124.12 ± 5.53	80.0—150.0
Mean corpuscular volume, μ m ³	47.37 ± 1.33	46.87 ± 1.38	49.37 ± 0.62	47.75 ± 1.13	43.0—53.0
Mean corpuscular hemoglobin concentration, %	32.87 ± 0.58	36.25 ± 1.93	32.87 ± 0.44	37.75 ± 0.99	31.0—36.0
Mean corpuscular hemoglobin, pg	15.75 ± 0.55	16.87 ± 0.58	15.37 ± 0.46	$15.25 \pm 0.25^*$	14.0—19.0
Lymphocytes, %	42.50 ± 2.44	31.00 ± 2.48	42.75 ± 1.13	36.25 ± 1.81	36.0—51.0
Segmented neutrophils, %	58.25 ± 5.62	51.87 ± 6.65	56.62 ± 3.53	55.12 ± 3.22	35.0—75.0
Stab neutrophils, %	2.75 ± 0.36	1.50 ± 0.56	2.12 ± 0.35	1.75 ± 0.25	0.0—3.0
Eosinophils, %	1.75 ± 0.36	1.87 ± 0.81	1.62 ± 0.32	2.50 ± 0.46	0.0—4.0

* $P \leq 0.05$ — compared with the animals of the control group

Table 4

Results of a biochemical blood serum analysis of experimental cats

Indicator	1st measurement		Control measurement		Norm
	Experimental	Control	Experimental	Control	
ALT, U/L	35.75 ± 2.52	35.25 ± 3.663	34.87 ± 1.46	41.25 ± 2.47	8.0—60.0
AST, U/L	40.32 ± 2.91	33.37 ± 2.46	41.00 ± 1.68	42.75 ± 2.40*	12.0—45.0
ALP, U/L	91.75 ± 6.86	93.62 ± 8.39	90.50 ± 3.44	105.37 ± 4.86	49.0—90.0
Urea, mmol/L	9.81 ± 2.34	7.26 ± 1.21	6.92 ± 0.14	4.92 ± 0.20	5.4—12.1
Glucose, mmol/L	4.86 ± 0.21	4.87 ± 0.29	4.70 ± 0.19	7.41 ± 0.24	3.3—6.3
Creatinine, μmol/L	142.37 ± 47.58	108.62 ± 18.44	105.75 ± 7.26	102.87 ± 5.33	70.0—165.0
Total protein, g/L	73.37 ± 2.69	64.50 ± 1.21	68.37 ± 0.75	66.12 ± 1.21	54.0—79.0
Total bilirubin, μmol/L	8.02 ± 0.53	7.41 ± 0.42	7.47 ± 0.42	7.66 ± 0.24	2.0—12.0

* $P \leq 0.01$ — compared with the animals of the control group

The biochemical blood indicators presented in Table 4, taken from experimental cats, corresponded to the physiological norm for this species and age group of animals. However, there were minor differences. Thus, the level of ALT in the cats of the experimental group before treatment was 35.75 ± 2.52 U/L, by the end of the experiment this indicator slightly decreased and amounted to 34.87 ± 1.46 U/L. In the control group, the level of ALT by the end of the experiment increased by 17.02 %. A significant increase in AST was also noted in the control group: at the beginning of the experiment, its level was 33.37 ± 2.46 U/L, by the end of the experiment it was 42.75 ± 2.40 U/L, the change was 28.11 %. In the experimental group, by the end of the experiment, there was noted a slight increase in this indicator by 1.69 %. There was a significant decrease in the level of urea by the end of the experiment in the animals of the experimental and control groups by 29.46 % and 32.23 %, respectively.

CONCLUSION

According to the results of studies, the use of Gabitabs, designed by “API-SAN” LLC (Russia) for small pets in the treatment of feline idiopathic cystitis, was effective. The administration of gabapentin contributed to the acceleration of recovery of animals by 61.4 %, in comparison with the cats that did not receive the drug. Thus, Gabitabs can be recommended in the clin-

ical practice of a veterinarian in the protocol for the treatment of feline idiopathic cystitis.

REFERENCES

1. Sarah J. Wooten, Feline interstitial cystitis: It's not about the bladder. <https://www.dvm360.com/view/feline-interstitial-cystitis-it-s-not-about-bladder>. November 30, 2017
2. Forrester S. D. Feline idiopathic cystitis / S. D. Forrester, T. L. Towell // *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* — 2015. — P. 783—806.
3. Jones E, Palmieri C, Thompson M, Jackson K, Al-lavena R. Feline Idiopathic Cystitis: Pathogenesis, Histopathology and Comparative Potential / E. Jones [et al.] // *J Comp Pathol.* — 2021. — P. 18—29.
4. Crowell-Davis S. L., Murray T. Combinations in: veterinary psychopharmacology // S. L. Crowell-Davis, T. Murray // Ames, Iowa: Blackwell Publishing. — 2006. — P. 234—240.
5. Voronin E. S. Clinical diagnostics with radiology / E. S. Voronin, G. V. Snoz, M. F. Vasilyev et al. — M.: Kolos, 2006. — 509 p.
6. 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 (order of the Ministry of Agriculture of Russia dtd. 06.03.2018 No. 101 (as amended 05.06.2020), registered in the Ministry of Justice of Russia 05.06.2018 No. 51296).
7. Voronin E. S. Workshop on clinical diagnostics with radiology / E. S. Voronin et al. — M. INFRA — M, 2014. — 355 p.

8. *Zueva N. M.* Ultrasound in veterinary medicine. Small pets. Abdominal organs / N. M. Zueva, V. A. Surgina // M.: Vidar, 2015. — 192 p.

9. *Mannion P.* Diagnostic Ultrasound in Small Animal Practice 1st Edition / P. Mannion // Blackwell Publishing, 2006. — 344 p.

10. *Delorme S.* Guide on ultrasound diagnostics. 3rd ed. Trans. from English. / S. Delorme, Y. Debyu, K. — V. Yenderka // M.: MEDpress-inform. — 2021. — 408 p.

11. *Kondrakhin I. P.* Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics. — M.: “Colossus”. — 2004. — 520 p.

12. *Medvedeva M. A.* Clinical veterinary laboratory diagnostics. — M.: “Aquarium Print”. — 2013. — 416 p.

13. *Meyer D.* Veterinary laboratory medicine. Interpretation and diagnostics. Trans. from English. / D. Meyer, J. Harvey // M.: Sofion. — 2007. — 456 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

N. O. Kostyanko — Postgraduate Student;

A. Kh. Shantyz — Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Biotechnology, Biochemistry and Biophysics;

I. S. Zholobova — Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Biotechnology, Biochemistry and Biophysics;

Yu. A. Lysenko — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Biotechnology, Biochemistry and Biophysics;

E. Yu. Marchenko — Candidate of Veterinary Sciences, Veterinarian;

O. V. Petrova — Candidate of Veterinary Sciences, Pharmacovigilance Specialist.

The article was submitted 18.01.2023

Научная статья

УДК 619.611.711/611.018.41—43

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.63

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИНЕРАЛЬНО-БЕЛКОВОЙ ДОБАВКИ ОСТЕОМИН ПРИ АЛИМЕНТАРНОЙ ОСТЕОДИСТРОФИИ ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

Алексей Владимирович Савинков*, Елена Игоревна Лаптева**✉,
Елена Михайловна Наговицина*, Иван Денисович Пузиков*

*Самарский государственный аграрный университет, Кинель, Россия

**Самарский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Самара, Россия, e-mail: e.i.lapteva@samsmu.ru✉

Аннотация. Цель исследования — изучить профилактическое действие минерально-белковой кормовой добавки остеомин при алиментарной остеодистрофии лактирующих коров в зимне-весенний период года. Для исследования было отобрано две группы коров в период раздоя, по 50 голов в каждой. Животные контрольной группы получали корма основного рациона и 100 г минеральной добавки монокальцийфосфат в сутки. Животные второй группы к основному рациону получали кормовую добавку остеомин два раза в сутки в дозе 1 г/кг массы тела животного. Животные обеих групп раз в десять суток парентерально получали препарат тетрамаг, содержащий группу жирорастворимых витаминов. Продолжительность опыта составила 60 суток. В конце эксперимента у животных опытной группы увеличилось количество эритроцитов на 8,8 %, гемоглобина — на 33,2 %, гематокрита — на 5,0 %, среднего объема эритроцитов — на 6,0 %, среднего содержания гемоглобина в эритроците — на 15,2 %, общего кальция — на 14,7 %, а уровень неорганического фосфора уменьшился — на 17,5 %.

Кроме того, такие показатели, как гамма-глобулины сыворотки крови и фагоцитарная активность нейтрофилов у опытных коров находились на стабильном уровне в течение всего опыта, а у контрольных животных отмечалось их снижение. Установлено, что у коров опытной группы увеличилась молочная продуктивность на 35,0 %, а в молоке возросло количество белка, жира, сухих веществ. Таким образом, систематическое использование в рационе коров, находящихся в стадии интенсивной лактации, минерально-белковой добавки остеомин, профилактирует развитие алиментарной остеодистрофии.

Ключевые слова. Алиментарная остеодистрофия, лактирующие коровы, нарушение минерального обмена, минерально-белковая добавка, молочная продуктивность, биохимия крови

Согласно сведениям из литературных источников, алиментарная остеодистрофия у лактирующих коров чаще всего развивается в период интенсивной молокоотдачи и отражается на всех сферах жизнедеятельности [2, 3]. Такое состояние существенно уменьшает резистентность организма к заболеваниям инфекционного характера и способствует появлению массовых случаев гинекологической патологии у взрослых животных и неизбежно влечет за собой снижение молочной продуктивности [6]. В развитии причин этого заболевания рассматривают совокупность факторов: неблагоприятные условия окружающей среды, неудовлетворительные параметры микроклимата, отсутствие

активного моциона. Однако главной и первостепенной причиной является дисбаланс питательных веществ в рационах животных, несоблюдение разработанных нормативов полноценного сбалансированного питания. Также большое значение имеет стресс, связанный с нарушением технологии содержания, периодом адаптации, кормлением и др. [5].

Несмотря на длительное развитие данного заболевания и не выраженность клинических проявлений на начальных этапах развития патологии, остеодистрофия алиментарного характера и системное нарушение минерального обмена приводят к существенному снижению продуктивности больных животных, дополнительным тратам

© Савинков А. В., Лаптева Е. И., Наговицина Е. М., Пузиков И. Д., 2023

на лечение, длительному периоду восстановления и развитию вторичных патологических явлений. Исходя из этого, следует уделять особое внимание своевременной профилактике нарушений минерального обмена с учетом всех основных факторов риска [4, 7].

Исходя из этого разработана научно обоснованная, обладающая клинической и экономической эффективностью средств лечения и профилактики алиментарной остеодистрофии молочных коров является одной из актуальных задач современной ветеринарии [11].

Цель исследования: усовершенствование профилактических мероприятий при алиментарной остеодистрофии молочных коров.

В задачи исследования входило: изучить профилактическое действие минерально-белковой кормовой добавки остеомин при алиментарной остеодистрофии лактирующих коров в зимне-весенний период года.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Остеомин получают путем смешивания исходных составляющих: бентонит, монокальцийфосфат, мел кормовой, автолизат дрожжей.

Для исследования было отобрано две группы коров в период раздоя, по 50 голов в каждой группе. Лабораторные исследования проводились у 10 голов из каждой группы. Опыт по изучению профилактической эффективности добавки остеомин составил 60 дней.

Первая группа была определена как контрольная. Животные этой группы получали только корма основного рациона, используемого в данном предприятии, а также 100 г минеральной добавки монокальцийфосфат в сутки. Животные второй группы к основному рациону получали кормовую добавку остеомин два раза в сутки в дозе 1 г/кг массы тела животного.

В ходе экспериментального периода животные витаминизировались препаратом тетрамаг имеющий в своем составе ретинол, холекальциферол, токоферол и ненасыщенные жирные кислоты (линолевую, линоленовую и арахидоновую). Тетрамаг применяли инъекционно внутримышечно один раз каждые десять суток.

В группы были подобраны здоровые животные, своевременно прошедшие все необходимые ветеринарные мероприятия. В течение экспериментов за животными производилось систематическое клиническое наблюдение. Для оценки со-

стояния животных в начале эксперимента и на 60-е сутки производили взятие крови и молока для лабораторных исследований.

Морфофункциональные показатели крови оценивали на гематологическом ветеринарном анализаторе Mindray BC-2800 Vet. Подсчет лейкограммы, после предварительной окраски мазков по Папенгейму [1], проводили путем микроскопически общепринятыми способами.

При оценке биохимических параметров сыворотки крови в качестве маркеров использовали количественное определение общего белка, мочевины, креатинина, общего кальция, неорганического фосфора, глюкозы; активности аминотрансфераз: аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ). Определение количественных значений заявленных параметров производили на автоматическом биохимическом анализаторе Mindray BS-380 (КНР).

Определение фракционного состава сывороточных белков (α -, β - и γ -глобулинов, альбуминов) производили с использованием нефелометрии [10] на СФ Флюорат-02 АБЛФ-Т (Россия).

В качестве критерия оценки активности неспецифической резистентности организма использовали фагоцитарную активность нейтрофилов крови [8]. Молочную продуктивность подопытных животных учитывали по результатам контрольных замеров молока не реже одного раза в месяц. В молоке оценивалось количественное содержание сухого вещества, белка и жира. Исследования проводились на автоматическом анализаторе молока Milkoscan Minor (Foss, Дания).

Статистическая обработка полученных сведений, производилась на персональном компьютере при помощи приложения Microsoft Office Excel 2010 с использованием стандартных методов вариационной статистики. Для оценки достоверности применялся критерий Стьюдента [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Комплекс причин, в результате которых развивается остеодистрофическое состояние, складывается из дефицита комплекса минеральных, белковых и витаминных компонентов в рационе животных. Имеют значение технологические нарушения, стрессовые состояния, сезон года и т. д. Исходя из ранее проведенных исследований известно, что остеодистрофия алиментарного происхождения у молочных коров наиболее остро проявляется в период интенсивной лактации, что связано с систематической потерей организмом животных ряда био-

тических элементов и пластических составляющих в результате образования молока.

При формировании необходимых условий для проведения научного опыта учитывалась совокупность факторов, приводящих к нарушению минерального обмена. Интенсивность минерального обмена существенно зависит от долготы дня и поэтому чаще всего развитие алиментарной остеодистрофии приобретает массовый характер в зимне-весенний период года. Для оценки изменений

в ходе эксперимента учитывали морфофункциональные и биохимические показатели крови, имеющие значение в развитии нарушения минерального обмена.

Результаты исследования представлены в таблице. В результате проведенных исследований было установлено, что в количественном выражении морфофункциональные показатели крови у животных опытной группы были больше контрольных значений.

Таблица 1

Динамика показателей крови и молока коров ($M \pm m$; $n = 10$)

Показатели	Фоновые значения	Группы	
		Контрольная	Опытная
1	2	3	4
Морфофункциональные показатели крови			
Эритроциты, $10^{12}/л$	$6,1 \pm 0,23$	$5,7 \pm 0,27$	$6,2 \pm 0,36^*$
Гемоглобин, г/л	$93,6 \pm 1,59$	$80,6 \pm 5,60$	$107,4 \pm 6,67^{**}$
Средний объем эритроцитов, фл	$48,3 \pm 0,76$	$48,1 \pm 0,87$	$51,0 \pm 0,71^*$
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	$14,8 \pm 0,16$	$13,1 \pm 0,65$	$15,1 \pm 0,03$
Гематокрит, %	$29,4 \pm 0,93$	$27,9 \pm 1,14$	$32,9 \pm 1,84^*$
Тромбоциты, $10^9/л$	$382,8 \pm 35,46$	$408,7 \pm 34,41$	$500,3 \pm 19,27^*$
Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	$29,45 \pm 1,1$	$27,05 \pm 1,98$	$29,32 \pm 2,54$
Биохимические показатели крови			
Общий белок, г/л	$78,3 \pm 1,50$	$75,4 \pm 1,20$	$79,8 \pm 1,32$
Общий кальций, ммоль/л	$2,45 \pm 0,012$	$2,24 \pm 0,12$	$2,57 \pm 0,045^*$
Неорганический фосфор, ммоль/л	$2,15 \pm 0,45$	$2,40 \pm 0,070$	$1,98 \pm 0,174^*$
АСТ, Ед/л	$103,5 \pm 5,45$	$101,9 \pm 2,48$	$98,9 \pm 2,46$
АЛТ, Ед/л	$30,1 \pm 1,99$	$29,9 \pm 2,01$	$31,3 \pm 2,67$
Альбумины, %	$38,41 \pm 2,15$	$39,01 \pm 2,01$	$38,84 \pm 2,04$
α -глобулины, %	$15,13 \pm 1,16$	$15,12 \pm 2,53$	$14,83 \pm 1,56$
β -глобулины, %	$12,15 \pm 1,57$	$12,81 \pm 0,33$	$12,49 \pm 0,43$
γ -глобулины, %	$38,99 \pm 2,15$	$28,36 \pm 1,66$	$37,14 \pm 1,10$

Окончание табл. 1

1	2	3	4
Молочная продуктивность и биохимические показатели молока			
Продуктивность, кг	10,7 ± 0,05	10,3 ± 0,836	13,9 ± 0,53**
Жир, %	3,64 ± 0,63	3,49 ± 0,53	3,69 ± 0,19
Белок, %	3,36 ± 0,16	3,39 ± 0,12	3,53 ± 0,06
Сухие вещества, %	12,75 ± 0,48	12,80 ± 0,32	12,88 ± 0,78

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$ в сравнении с контрольной группой

В начале опыта в обеих группах количество эритроцитов соответствовало физиологическим нормам и составило $6,1 \pm 0,23 \cdot 10^{12}/л$. В процессе опыта отмечается устойчивое снижение показателей в группе контрольных животных относительно опытных значений. К концу опыта разница в количестве красных клеток крови в группе опытных животных к показателям контрольной группы равна 8,8 % ($P < 0,05$). При этом количество эритроцитов оставалось в пределах физиологической нормы.

Уровень гемоглобина в крови в начале исследования во всех группах был близок к минимальной границе нормы. В процессе наблюдения отмечалось снижение уровня этого параметра у животных в контрольной группе. Значение гемоглобина в конце опыта в опытной группе увеличилось относительно исходных значений на 14,7 % ($P < 0,05$), в контрольной группе данный показатель имел тенденцию к снижению. В итоге разница между значениями гемоглобина контрольной и опытной группой составила 33,2 % ($P < 0,01$) в пользу второй.

Большое значение имеют эритроцитарные индексы, они отражают функциональное взаимодействие эритроцитов, как отдельных клеток, с содержанием гемоглобина в крови. Одним из наиболее информативных считается среднее содержание гемоглобина в эритроците и средний объем эритроцита. В начале эксперимента средний объем эритроцитов у животных обеих групп находился в рамках референсных значений. У животных в контрольной группе к концу опыта показатель не имел выраженных отклонений.

Напротив, у животных опытной группы данный показатель в конце опыта увеличился. В результате средний объем эритроцитов был больше контрольных показателей в конце опыта на 6,0 % ($P < 0,05$). Среднее содержание гемоглобина в эри-

троците в начале опыта находилось в пределах физиологических значений. В конце экспериментальной работы в контрольной группе этот показатель имел тенденцию к уменьшению, а в опытной группе произошло его незначительное увеличение. В итоге опытные значения данного параметра были выше, чем у животных в контрольной группе на 15,2 %.

Гематокритная величина в начале опыта в обеих группах была ниже минимальных значений нормы. В процессе опыта в контрольной группе произошло несущественное снижение данного показателя. В опытной группе коров гематокритная величина к концу опытного периода имела тенденцию к увеличению. По отношению к показателям контрольной группы отличия составили 5 % ($P < 0,05$).

Вначале эксперимента содержание тромбоцитов в крови находилось в пределах допустимых границ. В ходе опыта в обеих группах присутствовала тенденция к увеличению количества кровяных пластинок, с выраженным приоритетом в группе опытных животных. В конце экспериментального периода количество тромбоцитов было больше в опытной группе по сравнению с контрольными значениями на 22,4 % ($P < 0,05$), а по отношению к фону — на 30,6 % ($P < 0,05$).

Анализ показателей белой крови позволил установить отсутствие выраженных изменений, связанных с использованием кормовой добавки. Количество лейкоцитов варьировало в обеих группах в пределах нормы ($7,5—8,2 \cdot 10^9/л$). В показателях лейкоцитарной формулы изменений не было выявлено.

При оценке результатов биохимических показателей сыворотки крови было установлено, что уровень общего белка в течение всего эксперимента находился в допустимых границах. В группе кон-

трольных коров показатели белка в конце опыта не имели существенных изменений. У коров в опытной группе в конце экспериментального цикла значения белка были больше показателей контрольных животных на 5,8 %.

При оценке метаболитов белкового обмена, таких как мочевины и креатинина, не было отмечено значимых изменений. Также не было установлено значимых изменений при оценке динамики глюкозы сыворотки крови. Данный показатель варьировал на уровне средних нормативных значений в пределах 3,39—3,98 ммоль/л.

В ходе исследования были установлены выраженные изменения показателей, характеризующих фосфорно-кальциевый обмен. Концентрация общего кальция в сыворотке крови в начале опыта был в пределах средних значений нормы ($2,45 \pm 0,012$ ммоль/л), тогда как показатели фосфора превышали верхние нормативные границы ($2,15 \pm 0,45$ ммоль/л). В итоге соотношение фосфора и кальция составило 1/1,14 при оптимальных значениях — 1/1,5, что говорит о состоянии, близком к нарушению обмена веществ.

К концу опыта в контрольной группе содержание общего кальция оказалось несколько ниже минимальных границ нормы. В опытной группе, наоборот, отмечалась устойчивая динамика роста показателя. В итоге у коров в опытной группе показатели общего кальция были больше значений контрольных аналогов — на 14,7 % ($P < 0,05$) и находились в пределах физиологических пределов.

Концентрация неорганического фосфора в крови к концу опыта в обеих группах имела обратную динамику. Через два месяца экспериментального периода в опытной группе происходит снижение данного показателя относительно изначальных значений, в контрольной же группе отмечалось его увеличение. При этом различия в значениях у животных контрольной и опытной групп составили 17,5 % ($P < 0,05$). Следует отметить, что показатели уровня неорганического фосфора у животных опытной группы в конце экспериментального периода находились на отметках максимальной границы нормы.

Полученные динамические изменения показателей концентрации кальция и фосфора в крови отразились на коэффициентах кальций фосфорного отношения. В конце опыта для контрольной группы оно составило 1/0,93, что критически ниже значений нормы, а для коров опытной группы — 1/1,4, что близко к средним значениям референсного показателя.

При оценке состояния ферментных систем была установлена следующая картина. Изначально в обеих группах регистрировалась высокая активность АсАТ ($103,5 \pm 5,45$ Ед/л) и, соответственно, высокий коэффициент де Ритиса (3,4), что весьма характерно для нарушения целостности кардиомиоцитов у коров на фоне интенсивной лактации. В конце эксперимента изменений у животных контрольной группы не было выявлено, а в группе опытных животных отмечается незначительное снижение показателя по отношению к контрольным и фоновым значениям. Таким образом, использование остеомина опосредованно создает условия для улучшения качества функционирования сердечной мышцы. Несмотря на то, что в данном случае отсутствует статистическая достоверность изменений, аналогичная картина наблюдалась в последовательности нескольких экспериментальных циклов.

Анализ соотношения фракций сывороточного белка показал, что они в процессе всех серий опыта имели взаимозависимые изменения. Различия между значениями у коров контрольной и опытной групп были несущественными, за исключением нескольких случаев.

Уровень альбуминов в обеих группах был на уровне референсных значений и колебался в пределах $38,41 \pm 2,15$ — $39,15 \pm 2,16$ %. Уровень бетаглобулинов оставался в пределах физиологической нормы, но имел тенденцию к увеличению. Учитывая стабильность тенденций по ряду других показателей в данном случае сложно заподозрить развитие патологической реакции. Данное изменение, вероятно, связано с активацией синтеза транспортных белков в клетках печени на фоне метаболических изменений. Альфа-глобулины, как белки острой фазы воспаления, оставались равнозначными в обеих группах и варьировали в пределах $14,93 \pm 1,25$ — $15,13 \pm 1,16$ %.

Наиболее показательными были изменения для γ -глобулинов. В начале опыта их процентная доля из всех сывороточных белков составили в контрольной группе $35,2 \pm 3,15$ %, а в группе опытных коров — $37,4 \pm 2,25$ %. В конце эксперимента у животных в контрольной группе показатель имел тенденцию к снижению, у животных опытной группы отмечалось незначительное повышение данного параметра. Таким образом, преимущественно, за счет снижения данного показателя в группе контрольных животных, у опытных аналогов доля γ -глобулинов стала больше на 8,78 %.

Белки крови из класса γ -глобулинов являются основными гуморальными факторами, которые

обеспечивают специфическую резистентность организма животных. Исходя из этого, использование экспериментальной минерально-белковой добавки способствует сохранению фракции γ -глобулинов на стабильному уровне.

Для оценки профилактического влияния используемой добавки на статус неспецифического иммунитета в качестве оценочного критерия использовали показатели активности фагоцитоза нейтрофилов. В начале исследования в обеих группах животных фагоцитарная активность нейтрофилов составила $29,5 \pm 1,15$ %. Через два месяца экспериментального периода в контрольной группе произошло снижение незначительное данного показателя, тогда как в группе опытных животных не было установлено выраженных изменений. В итоге, в конце опыта фагоцитарная активность нейтрофилов у животных употреблявших добавку остеомин была больше, чем у контрольных аналогов на $2,3$ %. Таким образом, использование экспериментального средства опосредованно оказывает стабилизирующее влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов крови.

Профилактическое использование минеральной добавки остеомин в рационе лактирующих коров в результате сохранения гомеостатического состояния животных в переходный сезон года положительно отразилось и на продуктивности животных. В начале экспериментального периода продуктивность животных составляла $10,7 \pm 0,05$ кг молока в сутки. В конце экспериментального периода показатели продуктивности у животных контрольной группы несколько снизились по отношению к исходным значениям. Тогда как в группе опытных животных, отмечалось увеличение показателя по отношению к фону на $3,2$ кг ($32,3$ %, $P < 0,01$), а по отношению к значениям контрольных животных — на $3,6$ кг ($35,0$ %, $P < 0,01$).

Вследствие оценки качественных составляющих молока было установлено, что в начале экспериментального периода уровень белка, жира и сухих веществ в молоке составил $3,36 \pm 0,057$ %, $3,64 \pm 0,63$ % и $12,75 \pm 0,28$ %. В конце опыта содержание данных параметров в молоке у животных в опытной группе данный показатель был существенно выше контрольных и фоновых значений. Несмотря на то, что изменения качественных показателей молока не имели статистически значимого характера, они устойчиво присутствовали для всех оцениваемых показателей.

По результатам исследования стало возможно оценить профилактическую эффективность

использования остеомин. Учитывая, что оценку клинической картины не всегда возможно выразить в точных значениях, для определения профилактического эффекта были использованы лабораторные показатели, по отклонениям которых были ранжированы здоровые и больные животные в группах. В итоге, заболеваемость на конец опыта в группе контроля составила 50 %, в опытной группе — $7,5$ %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из данного исследования видно, что внесение в рацион лактирующих коров минерально-белковой добавки для профилактики нарушения фосфорно-кальциевого обмена в течение шестидесяти дней способствует улучшению количественных и качественных показателей, характеризующих состояние красной крови, связанное с активацией процессов кроветворения. В частности, показателей гемоглобина, гематокритной величины и качественных изменений в эритроцитах.

Также можно засвидетельствовать сохранение устойчивого содержания γ -глобулинов в сыворотке крови и фагоцитарной активности нейтрофилов, что в совокупности отражает опосредованный характер механизма действия, связанный с улучшением пищеварительной функции, повышением качества усвоения питательных и минеральных веществ, нормализацией обмена веществ, обогащением рациона белками, природными макро- и микроэлементами. Это же качество способствует существенному улучшению параметров, отражающих фосфорно-кальциевый обмен и сохранению постоянства метаболизма на физиологическом уровне. Оптимизация метаболического статуса подопытных животных приводит к увеличению суточных надоев молока, повышению уровня молочного жира, белка и сухих веществ. В контрольной группе, в которой в качестве средства минерализации к рациону использовался только монокальцийфосфат и парентеральное введение жирорастворимых витаминов, отмечалось появление и последующее нарастание признаков нарушения минерального обмена. Таким образом, регулярное введение в рацион лактирующих коров минерально-белковой добавки остеомин, профилактирует развитие алиментарной остеодистрофии сезонного характера.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Аргунов А. В.* Клинико-гематологические и биохимические показатели крови северных оленей при эн-

демической остеодистрофии / А. В. Аргунов // Аграрный вестник Урала. — 2009. — № 3. — С. 68—69

2. Заманбеков Н. А. Влияние хвойно-энергетической добавки на динамику гематологических показателей дойных коров. / Н. А. Заманбеков, Б. А. Кошкинбай, Р. С. Саттарова, М. С. Баймурзаева // Сб. материалов III Межд научно-практич конф. «Вклад молодых ученых в развитие АПК в условиях четвертой промышленной революции», Алматы, 2018, 5—6.

3. Заманбеков Н. А. Влияние хвойноэнергетической добавки (ХЭД) на некоторые биохимические показатели крови дойных коров. / Н. А. Заманбеков, Б. А. Кошкинбай, С. Т. Сиябеков, Г. К. Омарбекова, Д. С. Оспангали // Материалы Межд научнопрактич конф. посвящ. 90-летию В. А. Киршина «Актуальные проблемы ветеринарии», 5—6.04.2018, Казань, 2018. — С. 301—304.

4. Коваленок Ю. К. Микроэлементозы крупного рогатого скота и свиней в Республике Беларусь: монография / Ю. К. Коваленок // — Витебск: ВГАВМ, 2013. — 196 с.

5. Костюк Д. В. Распространение остеодистрофии у коров при различных способах содержания. / Д. В. Костюк // В сборнике: Студенты — науке и практике АПК. материалы 104-й Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов. Витебская государственная академия ветеринарной медицины. — 2019. — С. 21—22.

6. Курилович А. М., Применение препарата «Витам» при лечении коров, больных остеодистрофией. / А. М. Курилович, Н. П. Коваленок // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2018. — № 4 (5) — С. 34—40

7. Кучинский М. П. Биоэлементы — фактор здоровья и продуктивности животных: монография / М. П. Кучинский // — Мн.: Бизнесофсет, 2007. — 372 с

8. Майорова О. В. Динамика фагоцитарной активности лейкоцитов в крови у свиней разных пород при

коррекции воднитом / О. В. Майорова, Г. В. Молянова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. — 2013. — № 1(21). — С. 88—92

9. Никитин Г. С., Использование корреляционного анализа для определения направления и количественного измерения связей в биометрии (на примере зооигиенической оценки скармливания различными кормами цыплят-бройлеров) / Г. С. Никитин, М. Г. Никитина // сб.: Практика использования естественнонаучных методов в прикладных социально-гуманитарных исследованиях. — Тольятти, 2014. — С. 281—287

10. Розанова Е. Н. Использование турбидиметрического метода для определения размеров молекул белка и комплексов меди с кератином, полученных деструкцией пера составами на основе сульфита натрия / Розанова Е. Н., Грехнева Е. В., Лопухина О. Н., Соболева Е. С., Еськова А. А. // Auditorium. — 2014. — № 4(4). — С. 36—42

11. Сиябеков С. Т. Влияние природного цеолита на некоторые биохимические показатели крови коров, больных остеодистрофией. / С. Т. Сиябеков, Б. Камбарова, Н. А. Заманбеков, Ж. У. Еспанов, Д. А. Сагынбаева / В сборнике: Актуальные вопросы в науке и практике. Сборник статей по материалам XII международной научно-практической конференции. 2018. С. 165—172.

12. Spotti, M. Aflatoxin B1 binding to sorbents in bovine ruminal fluid / Spotti M, Fracchiolla ML, Arioli F, Caloni F, Pompa G // Vet Res Commun. — 2005. — № 29 (6). — С. 507—15 Milan, Italy

13. Wacker, M. Vitamin D — effects on skeletal and extraskkeletal health and the need for supplementation / M. Wacker, M. F. Holick // Nutrients. — 2013. — Vol.5, № 1. — P. 111—148

14. Pryce, JE. Invited review: Opportunities for genetic improvement of metabolic diseases / JE Pryce, KL Parker Gaddis, A Koeck, Show more // J Dairy Sci. — 2016. — № 99 (9). P. 6855—6873

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. В. Савинков — доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой «Эпизоотология, патология и фармакология»;

Е. И. Лаптева — ветеринарный врач вивария, кандидат биологических наук;

Е. М. Наговицина — аспирант кафедры «Эпизоотология, патология и фармакология»;

И. Д. Пузиков — аспирант кафедры «Эпизоотология, патология и фармакология».

Статья поступила в редакцию 15.02.2023 г.

PREVENTIVE EFFICACY OF THE MINERAL AND PROTEIN ADDITIVE OSTEOMIN IN CASE OF ALIMENTARY OSTEODYSTROPHY IN LACTATING COWS

Aleksey Vladimirovich Savinkov*, Elena Igorevna Lapteva**✉,
Elena Mikhaylovna Nagovitsina*, Ivan Denisovich Puzikov*

*Samara State Agrarian University, Kinel, Russia

**Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russia,
Samara, Russia, e-mail: e.i.lapteva@samsmu.ru✉

Abstract. The aim of the research was to study the preventive effect of the mineral and protein feed additive osteomin in case of alimentary osteodystrophy of lactating cows in the winter-spring period of the year. For the study, two groups of cows were selected during the milking period, 50 animals in each. The animals of the control group received the basic diet and 100 g of the mineral additive monocalcium phosphate per day. The animals of the second group received the feed additive osteomin twice a day at a dose of 1 g/kg body weight in addition to the basic diet. The animals of both groups parenterally received Tetramag containing a group of fat-soluble vitamins every ten days. The duration of the experiment was 60 days. At the end of the experiment in the animals of the experimental group, the number of erythrocytes increased by 8.8 %, hemoglobin — by 33.2 %, hematocrit — by 5.0 %, the mean corpuscular volume — by 6.0 %, the mean corpuscular hemoglobin — by 15.2 %, total calcium — by 14.7 %, and the level of inorganic phosphorus decreased by 17.5 %.

In addition, such indicators as blood serum gamma globulins and neutrophil phagocytic activity in experimental cows were at a stable level throughout the experiment, while they decreased in the control animals. It was found that the cows of the experimental group increased their milk productivity by 35.0 %, and the amount of protein, fat and dry matter in milk increased. Thus, the systematic use of the mineral and protein additive osteomin in the diet of cows at the stage of intensive lactation prevents the development of alimentary osteodystrophy.

Keywords: alimentary osteodystrophy, lactating cows, mineral metabolism disorder, mineral and protein additive, milk productivity, blood biochemistry

According to the information from literary sources, alimentary osteodystrophy in lactating cows most often develops during the period of intensive milk flow and affects all spheres of life [2, 3]. This state significantly reduces the body's resistance to infectious diseases and contributes to the emergence of mass cases of gynecological pathology in adult animals and inevitably leads to a decrease in milk production [6]. When this disease develops, a combination of factors is considered as the causes: unfavorable environmental conditions, unsatisfactory microclimate parameters, lack of active movement. However, the main and primary reason is the imbalance of nutrients in the diets of animals, non-compliance with the developed standards for a complete and balanced diet. The stress associated with the violation of the keeping technology, the period of adaptation, feeding, etc. is also of great importance [5].

Despite the long development of this disease and the lack of clinical manifestations severity at the initial stages of the pathology development, alimentary osteodystrophy and systemic disturbance of mineral metabolism lead to a significant decrease in the productivity of sick animals, additional expenses for treatment, a long recovery period and the development of secondary pathological phenomena. Based on this, special attention should be paid to the timely prevention of mineral metabolism disorders, taking into account all the main risk factors [4, 7]. Based on this, the development of evidence-based, clinically and economically effective means of treating and preventing alimentary osteodystrophy of dairy cows is one of the urgent tasks of modern veterinary medicine [11].

The aim of the research is the improvement of preventive measures in case of alimentary osteodystrophy of dairy cows.

The objectives of the research were to study the preventive effect of the mineral and protein feed additive osteomin in case of alimentary osteodystrophy of lactating cows in the winter-spring period of the year.

MATERIAL AND METHODS

Osteomin is obtained by mixing the initial components: bentonite, monocalcium phosphate, fodder chalk, yeast autolysate.

For the study, two groups of cows were selected during the milking period, 50 animals in each group. Laboratory studies were carried out on 10 animals from each group. The experiment of studying the prophylactic efficacy of the additive osteomin continued 60 days.

The first group was defined as the control group. The animals of this group received only the feed of the main diet used at this enterprise, as well as 100 g of the mineral additive monocalcium phosphate per day. The animals of the second group received the feed additive osteomin to the main diet twice a day at a dose of 1 g/kg of body weight of the animal.

During the experimental period, the animals were vitaminized with the drug tetramag, which contains retinol, cholecalciferol, tocopherol and unsaturated fatty acids (linoleic, linolenic and arachidonic). Tetramag was administered intramuscularly once every ten days.

The groups were formed from healthy animals, timely passed all the necessary veterinary measures. During the experiments, the animals were subjected to systematic clinical observation. To assess the state of the animals at the beginning of the experiment and on day 60, blood and milk were taken for laboratory studies. Morphofunctional blood indicators were evaluated on a hematological veterinary analyzer Mindray-BC-2800 Vet. The counting of the leukogram, after preliminary staining of smears according to Papeinheim [1], was carried out microscopically with conventional methods. When assessing the biochemical blood serum indicators, quantitative determination of total protein, urea, creatinine, total calcium, inorganic phosphorus and glucose were used as markers; activity of aminotransferases: aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). The determination of the quantitative values of the declared parameters was carried out on an automatic biochemical analyzer Mindray BS-380 (PRC).

Fractional composition of serum proteins (α -, β - and γ -globulins, albumins) was determined using nephelometry [10] on SF Fluorat-02 ABLF-T (Russia).

The neutrophil phagocytic activity was used as a criterion for assessing the activity of nonspecific resistance of the organism [8].

The milk productivity of experimental animals was taken into account according to the results of control measurements of milk at least once a month. In milk, the quantitative content of dry matter, protein and fat was evaluated. The studies were carried out on an automatic milk analyzer Milkoscan Minor (Foss, Denmark).

Statistical processing of the obtained information was carried out on a personal computer using the Microsoft Office Excel 2010 application and standard methods of variation statistics. To assess the reliability, Student's t-test was used [9].

STUDY RESULTS

The complex of causes, as a result of which the osteodystrophic state develops, consists of a deficiency of a complex of mineral, protein and vitamin components in the diet of animals. Technological disturbances, stress states, the season of the year, etc. matter. Based on previous studies, it is known that osteodystrophy of alimentary origin in dairy cows is most acute during the period of intensive lactation, which is associated with the systematic loss of a number of biotic elements and plastic components by the body of animals as a result of milk formation.

When forming the necessary conditions for conducting a scientific experiment, a combination of factors leading to a violation of mineral metabolism was taken into account. The intensity of mineral metabolism significantly depends on the length of the day, and therefore, most often the development of alimentary osteodystrophy becomes widespread in the winter-spring period of the year. To assess changes during the experiment, morphofunctional and biochemical blood indicators, which are important in the development of mineral metabolism disorders, were taken into account.

The results of the study are presented in Table 1. As a result of the studies, it was found that in quantitative terms, the morphological and functional blood indicators in the animals of the experimental group were higher than the control values.

At the beginning of the experiment in both groups, the number of erythrocytes corresponded to physiological norms and amounted to $6.1 \pm 0.23 \cdot 10^{12}/L$. During the experiment, there was a steady decrease in indicators in the group of control animals relative to the experimental values. By the end of the experiment, the difference in the number of erythrocytes in the group of experimental animals compared to the control group was 8.8 % ($P < 0.05$). At the same time, the number of erythrocytes remained within the physiological norm.

Table 1

Dynamics of blood and milk indicators of cows (M ± m; n = 10)

Indicators	Baseline values	Groups	
		Control	Experimental
Morphofunctional blood indicators			
Erythrocytes, 10 ¹² /L	6.1 ± 0.23	5.7 ± 0.27	6.2 ± 0.36*
Hemoglobin, g/L	93.6 ± 1.59	80.6 ± 5.60	107.4 ± 6.67**
Mean corpuscular volume, fl	48.3 ± 0.76	48.1 ± 0.87	51.0 ± 0.71*
Mean corpuscular hemoglobin, pg	14.8 ± 0.16	13.1 ± 0.65	15.1 ± 0.03
Hematocrit, %	29.4 ± 0.93	27.9 ± 1.14	32.9 ± 1.84*
Platelets, 10 ⁹ /L	382.8 ± 35.46	408.7 ± 34.41	500.3 ± 19.27*
Neutrophil phagocytic activity, %	29.45 ± 1.1	27.05 ± 1.98	29.32 ± 2.54
Biochemical blood indicators			
Total protein, g/L	78.3 ± 1.50	75.4 ± 1.20	79.8 ± 1.32
Total calcium, mmol/L	2.45 ± 0.012	2.24 ± 0.12	2.57 ± 0.045*
Inorganic phosphorus, mmol/L	2.15 ± 0.45	2.40 ± 0.070	1.98 ± 0.174*
AST, U/L	103.5 ± 5.45	101.9 ± 2.48	98.9 ± 2.46
ALT, U/L	30.1 ± 1.99	29.9 ± 2.01	31.3 ± 2.67
Albumins, %	38.41 ± 2.15	39.01 ± 2.01	38.84 ± 2.04
α-globulins, %	15.13 ± 1.16	15.12 ± 2.53	14.83 ± 1.56
β-globulins, %	12.15 ± 1.57	12.81 ± 0.33	12.49 ± 0.43
γ-globulins, %	38.99 ± 2.15	28.36 ± 1.66	37.14 ± 1.10
Milk productivity and biochemical indicators of milk			
Productivity, kg	10.7 ± 0.05	10.3 ± 0.836	13.9 ± 0.53**
Fat, %	3.64 ± 0.63	3.49 ± 0.53	3.69 ± 0.19
Protein, %	3.36 ± 0.16	3.39 ± 0.12	3.53 ± 0.06
Dry matter, %	12.75 ± 0.48	12.80 ± 0.32	12.88 ± 0.78

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ in comparison with the control group

The level of hemoglobin in the blood at the beginning of the study in all groups was close to the minimum limit of normal. During the observation, a decrease in the level of this parameter in the animals of the control group was noted. The hemoglobin value at the end of the experiment in the experimental group increased relative to the initial values by 14.7 % ($P < 0.05$), in the control group this indicator tended to decrease. As a result, the difference between the values of hemoglobin in the control and experimental groups was 33.2 % ($P < 0.01$) in favor of the second group.

Erythrocyte indices are of great importance, they reflect the functional interaction of erythrocytes, as individual cells, with the blood content of hemoglobin. One of the most informative is the mean corpuscular hemoglobin and the mean corpuscular volume. At the beginning of the experiment, the mean corpuscular volume in animals of both groups was within the reference values. In the animals in the control group, the indicator had no pronounced deviations by the end of the experiment. On the contrary, in the animals of the experimental group, this indicator increased at the end of the experiment. As a result, the mean corpuscular volume was by 6.0 % more than the control values at the end of the experiment ($P < 0.05$). The mean corpuscular hemoglobin at the beginning of the experiment was within the physiological range. At the end of the experimental work in the control group, this indicator tended to decrease, and in the experimental group it slightly increased. As a result, the experimental values of this parameter were higher by 15.2 % than in the animals of the control group.

The hematocrit value at the beginning of the experiment in both groups was below the minimum normal values. During the experiment in the control group there was an insignificant decrease in this indicator. In the experimental group of cows, the hematocrit value tended to increase by the end of the experimental period. In relation to the indicators of the control group, the differences were 5 % ($P < 0.05$).

At the beginning of the experiment, the blood content of platelets was within acceptable limits. During the experiment in both groups there was a tendency to increase the number of platelets, with a pronounced priority in the group of experimental animals. At the end of the experimental period, the number of platelets in the experimental group was by 22.4 % ($P < 0.05$) higher, compared to the control values, and by 30.6 % ($P < 0.05$) in relation to the baseline values.

The analysis of white blood indicators made it possible to establish the absence of pronounced changes associated with the use of the feed additive. The num-

ber of leukocytes varied in both groups within the normal range ($7.5\text{—}8.2 \cdot 10^9/\text{L}$). The changes were not detected in the leukocyte formula indicators.

When evaluating the results of biochemical blood serum indicators, it was found that the level of total protein during the entire experiment was within acceptable limits. In the group of control cows, protein indicators at the end of the experiment did not have significant changes. In the cows of the experimental group at the end of the experimental cycle, the protein values were higher by 5.8 % than those of the control animals.

When evaluating metabolites of protein metabolism, such as urea and creatinine, no significant changes were noted. No significant changes were found when assessing the blood serum dynamics of glucose. This indicator varied at the level of mean standard values within 3.39—3.98 mmol/L.

In the course of the study, pronounced changes in indicators characterizing phosphorus-calcium metabolism were established. The blood serum concentration of total calcium at the beginning of the experiment was within the mean normal values (2.45 ± 0.012 mmol/L), while the phosphorus values exceeded the upper standard limits (2.15 ± 0.45 mmol/L). As a result, the calcium-phosphorus ratio was 1/1.14, while the optimal values were 1/1.5, which indicated a state close to metabolic disorders.

By the end of the experiment in the control group, the content of total calcium was slightly below the minimum limits of the norm. In the experimental group, on the contrary, there was a steady increase in the indicator. As a result, in the cows in the experimental group, the indicators of total calcium were higher than the values of the control analogues — by 14.7 % ($P < 0.05$) and were within the physiological limits.

The blood concentration of inorganic phosphorus by the end of the experiment in both groups had a reverse trend. Two months after the experimental period in the experimental group, this indicator decreased relative to the initial values, while in the control group, its increase was noted. At the same time, the differences in the values in the animals of the control and experimental groups amounted to 17.5 % ($P < 0.05$). It should be noted that the level of inorganic phosphorus in the animals of the experimental group at the end of the experimental period was at the maximum limit of the norm.

The obtained dynamic changes in the indicators of the blood concentration of calcium and phosphorus were reflected in the coefficients of the calcium-phosphorus ratio. At the end of the experiment, it was 1/0.93 for the control group, which was critically below the

norm, and for the cows of the experimental group — 1/1.4, which was close to the mean values of the reference indicator.

When assessing the state of enzyme systems, the following picture was established. Initially, high AST activity (103.5 ± 5.45 U/L) and a high de Ritis ratio (3.4) were recorded in both groups, which was very typical of violation of the integrity of cardiomyocytes in cows against the background of intensive lactation. At the end of the experiment, no changes were detected in the animals of the control group, and in the group of experimental animals there was a slight decrease in the indicator in relation to the control and baseline values. Thus, the use of osteomin indirectly creates conditions for improving the quality of the heart muscle functioning. Despite the fact that in this case there is no statistical significance of changes, a similar pattern was observed in the sequence of several experimental cycles.

The analysis of the ratio of serum protein fractions showed that they had interdependent changes during all series of experiments. Differences between the values in the cows of the control and experimental groups were not significant, with the exception of a few cases.

The level of albumins in both groups was at the level of reference values and fluctuated within 38.41 ± 2.15 — 39.15 ± 2.16 %. The level of beta-globulins remained within the physiological norm, but tended to increase. Considering the stability of trends in a number of other indicators, in this case it is difficult to suspect the pathological reaction development. This change is probably associated with the activation of the synthesis of transport proteins in liver cells against the background of metabolic changes. Alpha globulins, as proteins of the acute phase of inflammation, remained equivalent in both groups and varied within 14.93 ± 1.25 — 15.13 ± 1.16 %.

The most significant were the changes for γ -globulins. At the beginning of the experiment, their percentage of all serum proteins was 35.2 ± 3.15 % in the control group, and 37.4 ± 2.25 % in the group of experimental cows. At the end of the experiment in the animals in the control group, the indicator tended to decrease, in the animals of the experimental group there was a slight increase in this parameter. Thus, mainly due to a decrease in this indicator in the group of control animals, in the experimental analogues, the proportion of γ -globulins increased by 8.78 %.

Blood proteins from the class of γ -globulins are the main humoral factors that provide the specific resistance of the animal organism. Based on this, the use of an experimental mineral and protein additive con-

tributes to the preservation of the γ -globulin fraction at a stable level.

To assess the preventive effect of the additive used on the status of nonspecific immunity, indicators of the activity of neutrophil phagocytosis were used as an evaluation criterion. At the beginning of the study in both groups of animals, the phagocytic activity of neutrophils was 29.5 ± 1.15 %. Two months after the experimental period, a slight decrease in this indicator occurred in the control group, while no pronounced changes were found in the group of experimental animals. As a result, at the end of the experiment, neutrophil phagocytic activity in the animals that were given the additive osteomin was by 2.3 % higher than in the control analogues. Thus, the use of an experimental means indirectly has a stabilizing effect on the phagocytic activity of blood neutrophils.

The prophylactic use of the mineral additive osteomin in the diet of lactating cows, as a result of maintaining the homeostatic state of animals in the transitional season of the year, had a positive effect on the productivity of animals. At the beginning of the experimental period, the productivity of the animals was 10.7 ± 0.05 kg of milk per day. At the end of the experimental period, the productivity indicators in the animals of the control group slightly decreased in relation to the initial values. Whereas in the group of experimental animals there was an increase in the index in relation to the baseline one by 3.2 kg (32.3 %, $P < 0.01$), and in relation to the values of control animals — by 3.6 kg (35.0 %, $P < 0.01$).

As a result of assessing the quality components of milk, it was found that at the beginning of the experimental period, the level of protein, fat and dry matter in milk was 3.36 ± 0.057 %, 3.64 ± 0.63 % and 12.75 ± 0.28 %. At the end of the experiment, the content of these parameters in the milk of the animals in the experimental group, this indicator was slightly higher than the control and baseline values. Despite the fact that changes in the quality indicators of milk were not statistically significant, they were consistently present for all assessed indicators.

According to the results of the study, it became possible to evaluate the prophylactic efficacy of the use of osteomin. Taking into account that the assessment of the clinical picture is not always possible to express in exact values, laboratory indicators were used to determine the prophylactic effect, and healthy and sick animals in groups were ranked according to the deviations of them. As a result, at the end of the experiment, the incidence in the control group was 50 %, in the experimental group — 7.5 %.

CONCLUSION

From this study, it can be seen that the introduction of the mineral and protein feed additive into the diet of lactating cows to prevent violations of the phosphorus-calcium metabolism for sixty days improves the quantitative and qualitative indicators characterizing the state of red blood associated with the activation of hematopoietic processes. In particular, indicators of hemoglobin, hematocrit value and qualitative changes in erythrocytes. It is also possible to speak about the preservation of a stable content of γ -globulins in the blood serum and neutrophil phagocytic activity, which together reflects the indirect nature of the mechanism of action associated with improving the digestive function, improving the assimilation quality of nutrients and minerals, normalizing metabolism, enriching the diet with proteins, natural macro- and micronutrients. The same quality contributes to a significant improvement in the parameters reflecting the phosphorus-calcium metabolism and maintaining the constancy of metabolism at the physiological level. Optimization of the metabolic status of experimental animals leads to an increase in daily milk yield, an increase in the level of milk fat, protein and dry matter. In the control group, in which only monocalcium phosphate and parenteral administration of fat-soluble vitamins were used as a mineralization agent for the diet, the appearance and subsequent increase in signs of mineral metabolism disorders were noted. Thus, the regular introduction of the mineral and protein additive osteomin into the diet of lactating cows prevents the development of alimentary osteodystrophy of a seasonal nature.

REFERENCES

1. Argunov A. V. Clinical, hematological and biochemical blood indicators of reindeer in case of endemic osteodystrophy / A. V. Argunov // *Agrammy vestnik Urala* (Agrarian Bulletin of the Urals). — 2009. — No. 3. — P. 68—69
2. Zamanbekov N. A. Effect of the coniferous-energy additive on the dynamics of hematological indicators of dairy cows. / N. A. Zamanbekov, B. A. Koshkinbay, R. S. Sattarova, M. S. Baymurzaeva // *Collection of Materials of the III International Scientific and Practical Conf. "The contribution of young scientists to the development of the agroindustrial complex in the conditions of the fourth industrial revolution"*, Almaty, 2018, 5—6.
3. Zamanbekov N. A. Effect of the coniferous-energy additive (CED) on some biochemical blood indicators of dairy cows. / N. A. Zamanbekov, B. A. Koshkinbay, S. T. Siyabekov, G. K. Omarbekova, D. S. Ospangali // *Materials of the International Scientific and Practical Conf. dedicated to the 90th anniversary since the birth of V. A. Kirshin "Actual problems of veterinary medicine"*, 04.5—6.2018, Kazan, 2018. — P. 301—304.
4. Kovalenok Yu. K. Microelementoses of cattle and pigs in the Republic of Belarus: monograph / Yu.K. Kovalenok // — Vitebsk: VGAVM (VSAVM), 2013. — 196 p.
5. Kostyuk D. V. Spread of osteodystrophy in cows with different ways of keeping. / D. V. Kostyuk // *In the collection of papers: Students for the science and practice of the agroindustrial complex. Materials of the 104th International scientific and practical conference of students and undergraduates. Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine.* — 2019. — P. 21—22.
6. Kurilovich A. M., Use of the drug "Vitam" in the treatment of cows with osteodystrophy. / A. M. Kurilovich, N. P. Kovalenok // *Bulletin of Veterinary Pharmacology.* — 2018. — No. 4 (5) — P. 34—40
7. Kuchinskiy M. P. Bioelements — a factor in the health and productivity of animals: monograph / M. P. Kuchinskiy // — Minsk: Businessofset, 2007. — 372 p.
8. Mayorova O. V. Dynamics of leukocyte phagocytic activity in the blood of pigs of various breeds during correction with vodnit / O. V. Mayorova, G. V. Molyanov // *Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii* (Bulletin of Ulyanovsk State Agricultural Academy). — 2013. — No. 1 (21). — P. 88—92
9. Nikitin G. S. Using correlation analysis to determine the direction and quantitative measurement of relationships in biometrics (on the example of zoohygienic assessment of feeding broiler chickens with various feeds) / G. S. Nikitin, M. G. Nikitina // *Collection of papers: Practice of using natural science methods in applied social and humanitarian research.* — Tolyatti, 2014. — P. 281—287
10. Rozanova E. N. Using the turbidimetric method to determine the size of protein molecules and copper-keratin complexes obtained by the destruction of the feather with compositions based on sodium sulfite / Rozanova E. N., Grekhneva E. V., Lopukhina O. N., Soboleva E. S., Eskova A. A. // *Auditorium.* — 2014. — No. 4 (4). — P. 36—42
11. Siyabekov S. T. Effect of natural zeolite on some biochemical blood indicators of cows with osteodystrophy. / S. T. Siyabekov, B. Kambarova, N. A. Zamanbekov, Zh.U. Espanov, D. A. Sagynbaeva / *In the collection of papers: Topical issues in science and practice. Collection of articles based on the materials of the XII international scientific and practical conference.* 2018. P. 165—172.
12. Spotti, M. Aflatoxin B1 binding to sorbents in bovine ruminal fluid / Spotti M, Fracchiolla ML, Arioli F, Caloni F, Pompa G // *Vet Res Commun.* — 2005. — No. 29 (6). — P. 507—15 Milan, Italy
13. Wacker, M. Vitamin D — effects on skeletal and extraskelatal health and the need for supplementation / M. Wacker, M. F. Holick // *Nutrients.* — 2013. — Vol.5, No. 1. — P. 111—148
14. Pryce, JE. Invited review: Opportunities for genetic improvement of metabolic diseases / JE Pryce, KL Parker Gaddis, A Koeck, Show more // *J Dairy Sci.* — 2016. — No. 99 (9). P. 6855—6873

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. V. Savinkov — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Department of Epizootology, Pathology and Pharmacology;

E. I. Lapteva — Veterinarian of the Vivarium, Candidate of Biological Sciences;

E. M. Nagovitsina — Postgraduate Student of the Department of Epizootology, Pathology and Pharmacology;

I. D. Puzikov — Postgraduate Student of the Department of Epizootology, Pathology and Pharmacology.

The article was submitted 15.02.2023

СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ, ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

Научная статья

УДК 619:615.28:618.19—002.1:636.2

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.77

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНТАБИФЕРОНА-Б ПРИ МАСТИТЕ У КОРОВ

Василина Александровна Грицок[✉], Галина Анатольевна Востроилова,
Лилия Валерьевна Ческидова, Виталий Иванович Зимников

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, e-mail: vas.gritsuk@gmail.com[✉]*

Аннотация. В настоящее время иммунотерапия интерферонами используется при различных заболеваниях. Многочисленными опытами установлено, что при применении иммуотропных средств повышается эффективность этиотропного лечения мастита и антимикробных препаратов. Целью данного исследования было определение эффективности комплексного препарата Гентабиферон-Б, включающего гентамицин и рекомбинантные интерфероны, при терапии мастита у коров. В качестве контрольного препарата для инъекций использовали гентамицин 4 %. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что после лечения в обеих группах в пробах молока снижается степень микробной контаминации и количество соматических клеток до нормативных значений. Однако у животных, которым вводили Гентабиферон-Б эти изменения носили более выраженный характер. Терапевтическая эффективность Гентабиферона-Б при субклиническом мастите была выше препарата сравнения и составила 95,5 %, а при катаральном — 91,1 % при снижении кратности введения препарата. Повышение терапевтической эффективности при применении Гентабиферона-Б связано с наличием в препарате интерферонов, которые усиливают антимикробное действие гентамицина, увеличивают активность иммунных клеток и снижают воспалительную реакцию в молочной железе.

Ключевые слова: мастит, Гентабиферон-Б, гентамицин, терапевтическая эффективность, коровы

ВВЕДЕНИЕ

Мастит у коров является основной причиной экономических потерь в молочном скотоводстве во всем мире [6]. Не зависимо от течения мастита (скрытый или клинически выраженный) причиной его развития являются патогенная и условно-патогенная микрофлора. Среди грамположительных микроорганизмов наиболее распространены *Staph. aureus*, *Streptococcus uber*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, коагулазонегативный стафилококк, а среди грамотрицательных — *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и другие [8, 11, 14, 15]. По этой причине основным методом лечения мастита у коров является парентеральное и (или) интрацистернальное введение антибактериальных средств.

В настоящее время многие ученые считают, что необходим комплексный подход к изучению

механизмов развития воспалительного процесса в молочной железе. В частности, не стоит недооценивать взаимосвязь локальных факторов защиты вымени и иммунной системы организма, и при создании более эффективных препаратов следует учитывать иммунологические аспекты патогенеза мастита у коров.

Результаты испытаний, проведенных ранее показали, что применение больным маститом лактирующим коровам одного иммуностимулятора, является малоэффективным. Дальнейшими исследованиями было доказано, что при использовании комплексной терапии, включающей иммуотропные средства и антимикробные препараты, удается повысить эффективность проводимых лечебных мероприятий [3, 4].

Интерфероны представляют собой класс гликопротеинов, свойства которых включают проти-

© Грицок В. А., Востроилова Г. А., Ческидова Л. В., Зимников В. И., 2023

вовирусное, иммуномодулирующее и антипролиферативное действие. Способность интерферонов локально модулировать различные виды активности иммунных клеток может обеспечить специфическую защиту от широкого спектра организмов, которым постоянно подвергается молочная железа. В связи с этим, для снижения заболеваемости и даже летальности рекомендуется применение интерферонов [5].

В результате в ООО «Научно-Производственный Центр «ПроБиоТех» (Республика Беларусь) был разработан новый комплексный препарат Гентабиферон-Б, который в составе в качестве действующих веществ содержит 40 мг/мл гентамицина сульфат, не менее 10 000 МЕ/мл суммарной антивирусной активности смеси белков α - и γ -интерферонов бычьих рекомбинантных, а также витамины А, Е, С и вспомогательные вещества.

Целью нашего исследования было определение терапевтической эффективности комплексного препарата Гентабиферон-Б при субклиническом и клинически выраженном мастите у лактирующих коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытания эффективности применения препарата Гентабиферон-Б проведены на коровах больных маститом. После постановки диагноза животные были разделены по принципу аналогов на две группы. Коровам первой группы с субклиническим (44 головы) и клинически выраженным катаральным маститом (42 головы) внутримышечно вводили Гентамицин 4 % для инъекций в дозе 3 мг/1 кг массы тела каждые 12 часов в течение 3—5 суток в зависимости от тяжести протекания заболевания. Коров второй группы лечили Гентабифероном-Б. Препарат вводили внутримышечно в дозе 20 мл на животное с субклиническим (45 голов) и клинически выраженным катаральным маститом (44 головы) два раза в день.

Диагноз на мастит ставили комплексно с учетом анамнеза, общего клинического осмотра животных, оценки внешнего вида вымени и его пальпации, определения местной температуры, результатов пробного доения и лабораторного исследования молока [2]. Учет реакции проб секрета из долей молочной железы с диагностическим реактивом Масттест-АФ проводили по образованию желеобразного сгустка или изменению цвета смеси. Оценку эффективности лечения осуществляли на основании исследования молока, отобранного до и по-

сле завершения курса терапии, с диагностикумом, бактериологических исследований согласно утвержденным методикам и подсчета соматических клеток в сыром молоке с помощью экспресс-анализатора Фоссоматик [1, 2].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение опыта тщательно контролировали подготовку подопытных коров к доению, включающую массаж вымени, сдаивание первых струек молока, обработку сосков и поддержание соответствующего санитарного состояния молочных желез.

От 16 коров с диагнозом субклинический мастит (по 8 голов из каждой группы) до и после курса лечения брали пробы молока для изучения бактериосеменности и определения количества соматических клеток. Результаты бактериологического исследования секрета вымени коров (рис. 1) свидетельствуют о том, что после лечения Гентамицином 4 % степень микробной контаминации снизилась в 8,7 раза, а Гентабифероном-Б — в 10,1 раза.

Ряд авторов считает, что определенный уровень γ -интерферона может ингибировать размножение бактерий и снижать риск инфицирования молочной железы [9, 10]. В опытах Sordillo L. M. и др. (1991) γ -интерферон значительно увеличивал фагоцитарную и бактерицидную активность иммунных клеток [17]. Таким образом, снижение количества бактериальных клеток в молоке коров, которым применяли Гентабиферон-Б, по сравнению с группой, в которой применяли гентамицин, вероятно, связано с наличием в препарате γ -интерферона. Результаты подсчета соматических клеток в молоке коров до и после применения Гентамицина 4 % раствора и Гентабиферона-Б представлены на рис. 2. Как следует из полученных данных, у животных обеих групп при выздоровлении отмечали уменьшение количества соматических клеток: в первой группе в 6,6 раза, а во второй — в 9,8 раза, что соответствовало показателям здоровых животных.

Ряд авторов считает, что восстановление организма после заболевания включает в себя ряд сложных взаимодействий между специфическими клетками иммунной системы, многие из которых опосредованы цитокинами, которые могут активировать эти клетки для уничтожения или снижения скорости репликации патогена [5]. Другие полагают, что действие интерферонов основано на подавлении развития воспалительной реакции, что может уменьшить патологические изменения в паренхиматозной ткани молочной железы [16].

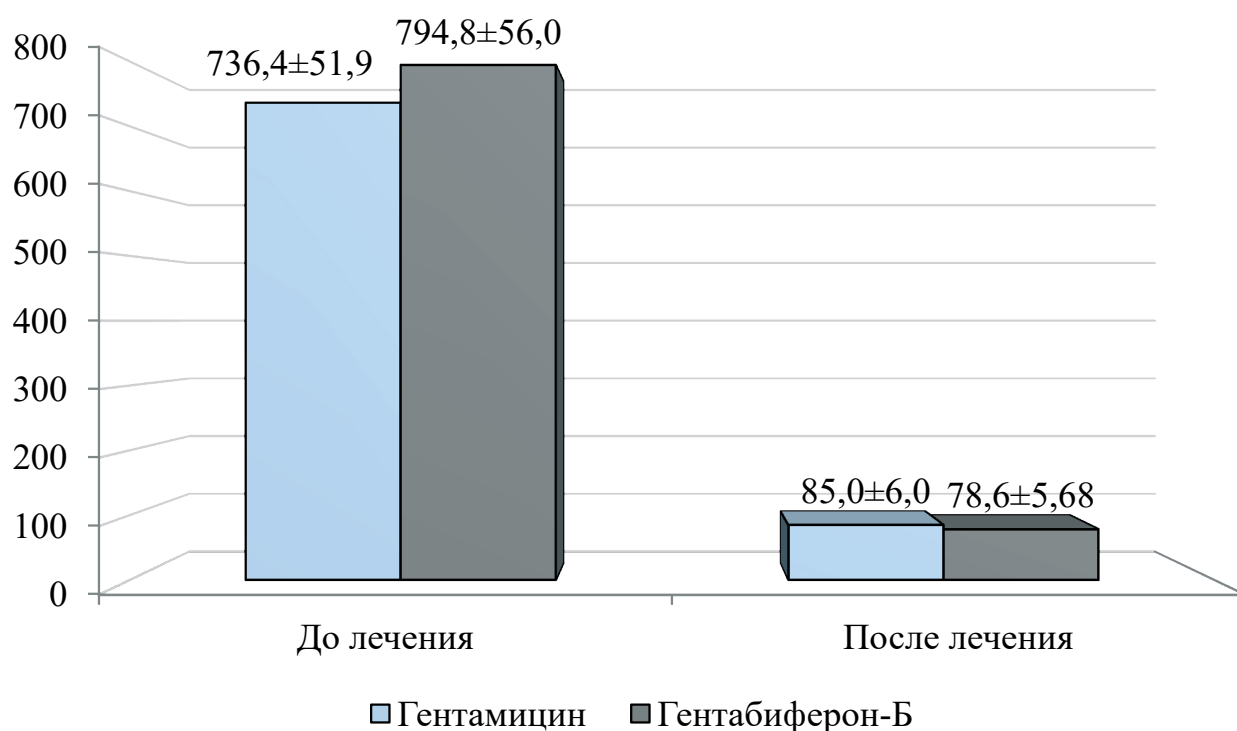


Рис. 1. Бактериальная обсемененность секрета вымени до и после лечения субклинического мастита (тыс. КОЕ/мл)

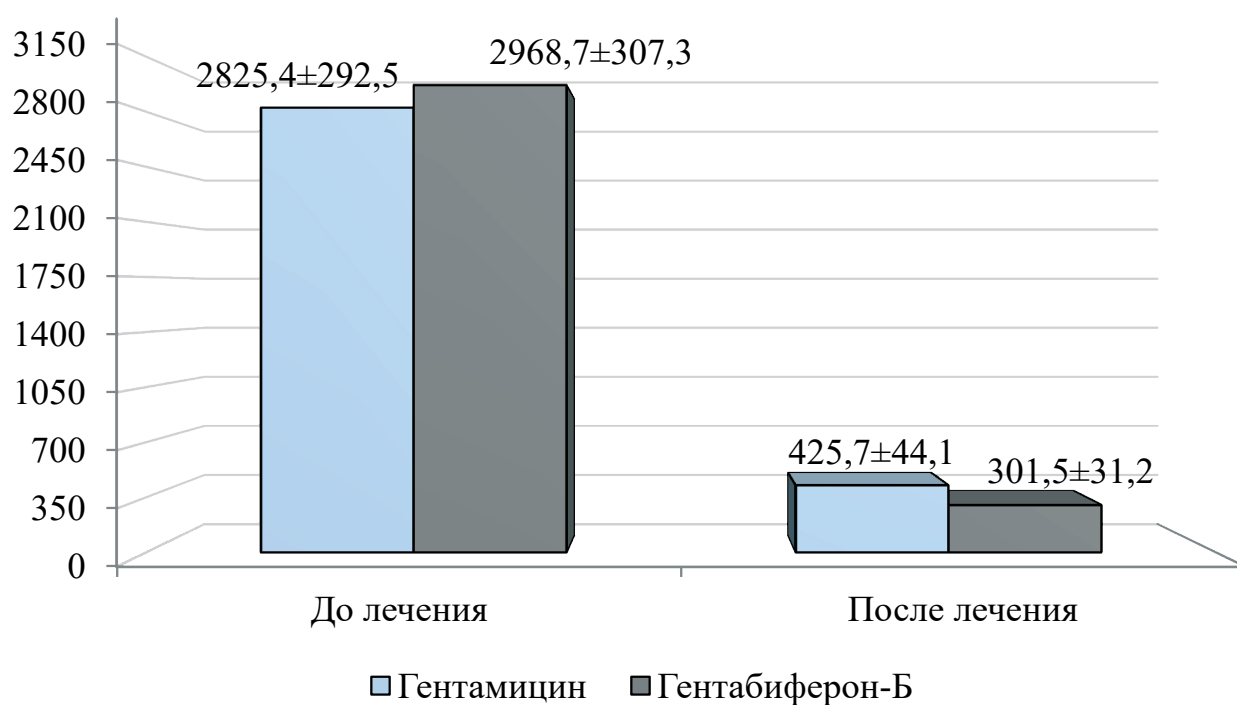


Рис. 2. Содержание соматических клеток в секрете вымени до и после лечения субклинического мастита (тыс./мл)

Таким образом, снижение количества соматических клеток в молоке коров второй группы по сравнению с первой на 29,2 %, возможно связано

с наличием интерферонов в Гентабифероне-Б, которые не только усиливают антимикробное действие препарата, но и снижают воспалительную

реакцию в молочной железе. В течение опыта за животными вели ежедневное клиническое наблюдение, выздоровевшими считали коров, у которых не регистрировали клинические признаки мастита, а также была отрицательной реакция молока с раствором Масттеста.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что при применении комплексного препарата выздоровление наступает быстрее. Так, на курс лечения коров первой опытной группы при суб-

клиническом мастите в среднем потребовалось $2,29 \pm 0,02$ введений Гентабиферона-Б, а при катаральном — $3,96 \pm 0,12$. В то же время Гентамицина 4 % раствор инъецировали в среднем $4,65 \pm 0,04$ и $6,51 \pm 0,15$ раза, что привело к увеличению кратности введений препарата в 2,0 и 1,6 раза соответственно.

Терапевтическая эффективность Гентабиферона-Б и Гентамицина 4 % раствора представлена на рис. 3.

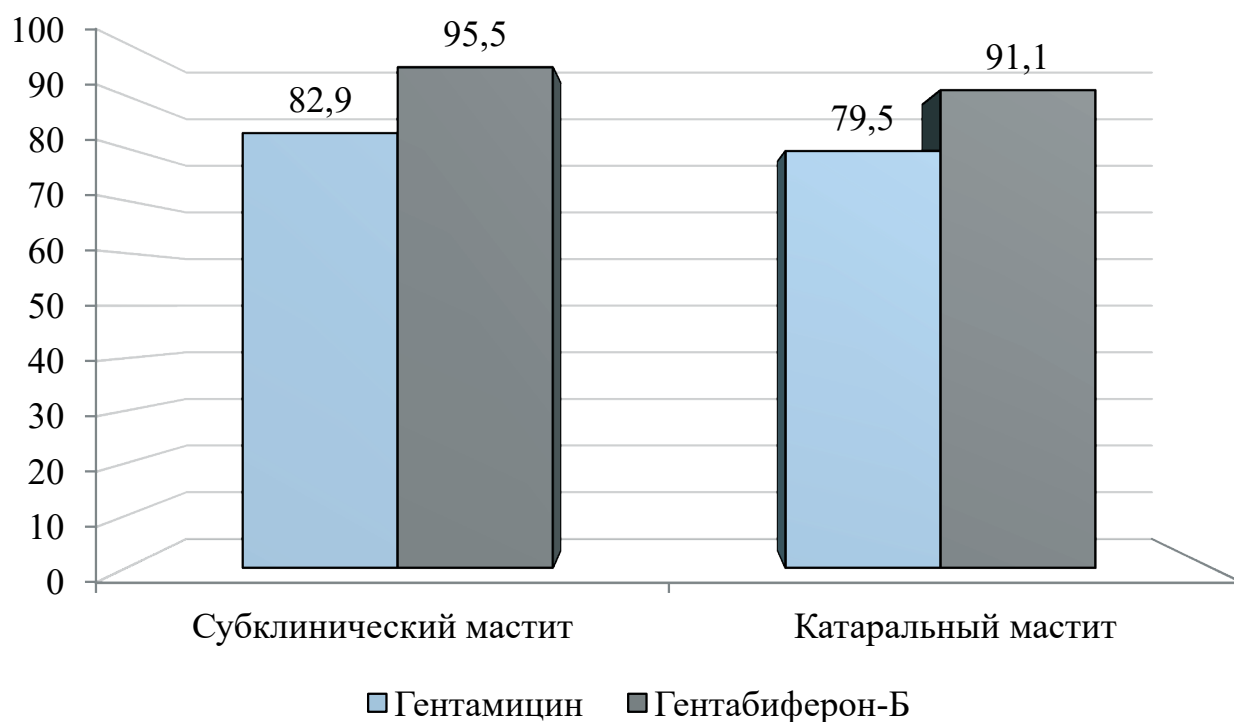


Рис. 3. Результаты производственных испытаний терапевтической эффективности Гентабиферона-Б при мастите у коров (%)

Как следует из представленных на рисунке 3 данных, терапевтическая эффективность Гентабиферона-Б при субклиническом мастите составила 95,5 %, а при катаральном — 91,1 %, что было выше препарата сравнения на 12,6 % и 11,6 % соответственно.

Таким образом, применение коровам для лечения мастита Гентабиферона-Б обеспечивает высокий терапевтический эффект при снижении сроков введения лекарственного препарата.

Полученные нами данные совпадают с рядом научных исследований по иммуномодулирующему действию интерферонов на общие и локальные факторы защиты молочной железы. Цитокины, вырабатываемые макрофагами и лимфоцитами, мобилизуют иммунную систему в ответ на инфек-

цию, а также играют роль в различных патофизиологических процессах в организме, что можно использовать для оценки повреждения тканей вымени, определения прогноза и исхода лечения [7, 13]. При этом многие авторы считают, что γ -интерферон действует как регуляторный цитокин [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что внутримышечное применение Гентабиферона-Б обеспечивает более высокий терапевтический эффект по сравнению с введением препарата, содержащего один антибиотик, а также способствует снижению микробной контаминации молока и нормализации в нем содержания соматических клеток. Таким образом, Гентабиферон-Б мо-

жет быть широко использован в производственных условиях животноводческих хозяйств при лечении мастита у коров.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. ГОСТ 32901—2014. «Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа». — М.: Стандартинформ, 2015. — 25 с.
2. Наставление по диагностике, терапии и профилактике мастита у коров № 13—5—2/1948. Утвержд. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 30 марта 2000 г. — М., 2000. — 27 с.
3. Слободяник В. И. Иммунокоррекция — современный подход повышения эффективности этиотропных средств / В. И. Слободяник // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2017. — № 1(1). — С. 34—38.
4. Слободяник В. И. Иммунологические аспекты борьбы с маститом коров / В. И. Слободяник, Н. Т. Климов, Л. В. Ческидова, Е. В. Зверев. — Воронеж: Издательство Истоки, 2020. — 222 с. — ISBN 978-5-4473-0284-9.
5. Babiuk L. A. Application of interferons in the control of infectious diseases of cattle / L. A. Babiuk, L. M. Sordillo, M. Campos, et al. // J Dairy Sci. — 1991. — v. 74 (12). — p. 4385—98. doi: 10.3168/jds.S0022—0302(91)78635—9.
6. De Vliegheer, S. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control / S. De Vliegheer, L. K. Fox, S. Piepers, et al. // J Dairy Sci. — 2012. — v. 95 (3). — p. 1025—40. doi: 10.3168/jds.2010—4074.
7. Duque-Madrid, P. C. Intramammary treatment using allogeneic pure platelet-rich plasma in cows with subclinical mastitis caused by Gram-positive bacteria / P. C. Duque-Madrid, J. Velasco-Bolaños, A. Ceballos-Márquez, et al. // Sci Rep. — 2021. — v. 11 (1). — p. 23737. doi: 10.1038/s41598-021-03067-4.
8. Exel C. E. Association of Staphylococcus aureus genotypes with milk or colonization of extramammary sites in Dutch dairy cattle indicates strain variation in reservoirs for intramammary infections / C. E. Exel, K. Gerritsen, M. Spaninks, et al. // Res Vet Sci. — 2023. — v. 154. — p. 138—144. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.12.010.
9. Faaz R. A. Expressions of IL4, IL10, and IFN γ cytokines genes during bacterial mastitis / R. A. Faaz, F. A. Abdullah // J Adv Vet Anim Res. — 2022 — v. 9 (1). — p. 42—52. doi: 10.5455/javar.2022.i567.
10. Liu, Y. Secretion of IFN- γ by Transgenic Mammary Epithelial Cells *in vitro* Reduced Mastitis Infection Risk in Goats / Y. Liu, H. Zhang, S. Dong, et al. // Front Vet Sci. — 2022. — v. 9. — p. 898635. doi: 10.3389/fvets.2022.898635.
11. Orsi, H. Characterization of mammary pathogenic Escherichia coli reveals the diversity of Escherichia coli isolates associated with bovine clinical mastitis in Brazil / H. Orsi, F. F. Guimarães, D. S. Leite, et al. // J Dairy Sci. — 2022. — Dec 23. — S0022—0302(22)00746—9. doi: 10.3168/jds.2022—22126.
12. Pestka, S. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors / S. Pestka, C. D. Krause, M. R. Walter // Immunol. Rev. — 2004. — v. 202. — p. 8—32.
13. Rodríguez, F. Differential cytokine expression in natural and experimental mastitis induced by Mycoplasma agalactiae in dairy goats / F. Rodríguez, P. Castro // Reprod Domest Anim. — 2015. — v. 50 (1). — p. 159—63. doi: 10.1111/rda.12457.
14. Rodriguez, Z. Evaluation of reticuloruminal temperature for the prediction of clinical mastitis in dairy cows challenged with Streptococcus uberis / Z. Rodriguez, Q. K. Kolar, K. C. Krogstad, et al. // J Dairy Sci. — 2022. — Dec 6. — S0022—0302(22)00712—3. doi: 10.3168/jds.2022—22421.
15. Saidi, R. Subclinical mastitis in cattle in Algeria: frequency of occurrence and bacteriological isolates / R. Saidi, D. Khelef, R. Kaidi // J S Afr Vet Assoc. — 2013. — v. 84(1). — E1—5. doi: 10.4102/jsava.v84i1.929.
16. Sordillo L. M. Controlling acute Escherichia coli mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gamma / L. M. Sordillo, L. A. Babiuk // Vet Microbiol. — 1991. — v. 28(2). — p. 189—98. doi: 10.1016/0378—1135(91)90092-t.
17. Sordillo L. M. Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following *in vitro* exposure to recombinant bovine interferon gamma / L. M. Sordillo, L. A. Babiuk // Vet Immunol Immunopathol. — 1991. — v. 27 (4). — p. 393—402. doi: 10.1016/0165—2427(91)90034-a.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- В. А. Грицюк** — докторант отдела экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем;
Г. А. Востроилова — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;
Л. В. Ческидова — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;
В. И. Зимников — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 23.01.2023 г.

.....

AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION, DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

.....

Original article

UDC 619:615.28:618.19—002.1:636.2

THERAPEUTIC EFFICACY OF GENTABIFERON-B IN CASE OF BOVINE MASTITIS

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

*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and
Therapy, Voronezh, Russia, e-mail: vas.gritsuk@gmail.com[✉]*

Abstract. Currently, immunotherapy with interferons is used in case of various diseases. Numerous experiments have established that the use of immunotropic agents increases the efficacy of the etiotropic treatment of mastitis and antimicrobial drugs. The objective of this research was to determine the efficacy of the complex drug Gentabiferon-B, including Gentamicin and recombinant interferons, in the treatment of bovine mastitis. Gentamicin 4 % was used as a control injection. The results of the conducted studies indicate that after the treatment in both groups, the degree of microbial contamination and the number of somatic cells in milk samples decrease to the normative values. However, in the animals treated with Gentabiferon-B, these changes were more pronounced. The therapeutic efficacy of Gentabiferon-B in case of subclinical mastitis was higher than the therapeutic efficacy of the reference drug and amounted to 95.5 %, and in case of catarrhal mastitis — 91.1 % with a decrease in the frequency of drug administration. The increase in therapeutic efficacy with the use of Gentabiferon-B is associated with the presence of interferons in the drug, which enhance the antimicrobial effect of Gentamicin, increase the activity of immune cells and reduce the inflammatory response in the mammary gland.

Keywords: mastitis, Gentabiferon-B, Gentamicin, therapeutic efficacy, cows

INTRODUCTION

Bovine mastitis is the main cause of economic losses in dairy farming worldwide [6]. Regardless of the course of mastitis (latent or clinically pronounced), the cause of its development is pathogenic and conditionally pathogenic microflora. Among gram-positive microorganisms, *Staph. aureus*, *Streptococcus uber*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, coagulase-negative staphylococcus are most widespread, and among gram-negative ones — *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* and others [8, 11, 14, 15]. For this reason, the main method of treating bovine mastitis is parenteral and (or) intracisternal administration of antibacterial agents.

Currently, many scientists believe that an integrated approach is needed to study the mechanisms of the inflammatory process development in the mammary gland. In particular, one should not underestimate the relationship between local udder protection factors and

the body's immune system, and when designing more effective drugs, one should take into account the immunological aspects of bovine mastitis pathogenesis.

The results of trials conducted earlier showed that the use of one immunostimulant for lactating cows with mastitis is ineffective. Further studies have shown that when using complex therapy, including immunotropic agents and antimicrobials, it is possible to increase the efficacy of ongoing therapeutic measures [3,4].

Interferons are a class of glycoproteins, the properties of which include antiviral, immunomodulatory and antiproliferative effects. The ability of interferons to locally modulate various types of immune cell activity can provide non-specific protection against a wide range of organisms to which the mammary gland is constantly exposed. In this regard, the use of interferons is recommended to reduce morbidity and even mortality [5].

As a result, LLC “Scientific and Production Center “ProBioTech” (Republic of Belarus) has designed

© Gritsyuk V. A., Vostroilova G. A., Cheskidova L. V., Zimnikov V. I., 2023

a new complex drug Gentabiferon-B, which contains 40 mg/ml of Gentamicin sulfate as active ingredients, at least 10000 IU/ml of the total antiviral activity of the mixture proteins of recombinant bovine interferons - α and - γ , as well as vitamins A, E, C and adjuvants.

The objective of our research was to determine the therapeutic efficacy of the complex drug Gentabiferon-B in case of subclinical and clinically pronounced mastitis in lactating cows.

MATERIAL AND METHODS

Trials of the efficacy of the use of the drug Gentabiferon-B were carried out on cows with mastitis. After the diagnosis was made, the animals were divided according to the principle of analogues into two groups. The cows of the first group with subclinical (44 cows) and clinically pronounced catarrhal mastitis (42 cows) were intramuscularly injected with Gentamicin 4 % for injection at a dose of 3 mg/1 kg of body weight every 12 hours for 3—5 days, depending on the severity of the disease course. The cows of the second group were treated with Gentabiferon-B. The drug was administered intramuscularly at a dose of 20 ml per animal with subclinical (45 cows) and clinically pronounced catarrhal mastitis (44 cows) twice a day.

Mastitis was diagnosed in a complex manner, taking into account the anamnesis, general clinical examination of animals, assessment of the udder appearance

and its palpation, determination of local temperature, results of test milking and laboratory testing of milk [2]. Accounting for the reaction of secretion samples from the mammary gland lobes with the diagnostic reagent Masttest-AF was carried out by the formation of a jelly-like clot or a change in the color of the mixture. The efficacy of treatment was assessed on the basis of a study of milk taken before and after the completion of the therapy course, with a diagnosticum, bacteriological studies according to approved methods, and counting somatic cells in raw milk using the Fossmatic express analyzer [1, 2].

RESULTS AND DISCUSSION

During the experiment, the preparation of experimental cows for milking was carefully controlled, including udder massage, milking of the first streams of milk, teat treatment and maintenance of the appropriate sanitary state of the mammary glands.

From 16 cows diagnosed with subclinical mastitis (8 cows from each group) before and after the course of treatment, milk samples were taken to study bacilli and to determine the number of somatic cells.

The results of a bacteriological study of cow udder secretion (Fig. 1) indicate that after treatment with Gentamicin 4 %, the degree of microbial contamination decreased by 8.7 times, and with Gentabiferon-B — by 10.1 times.

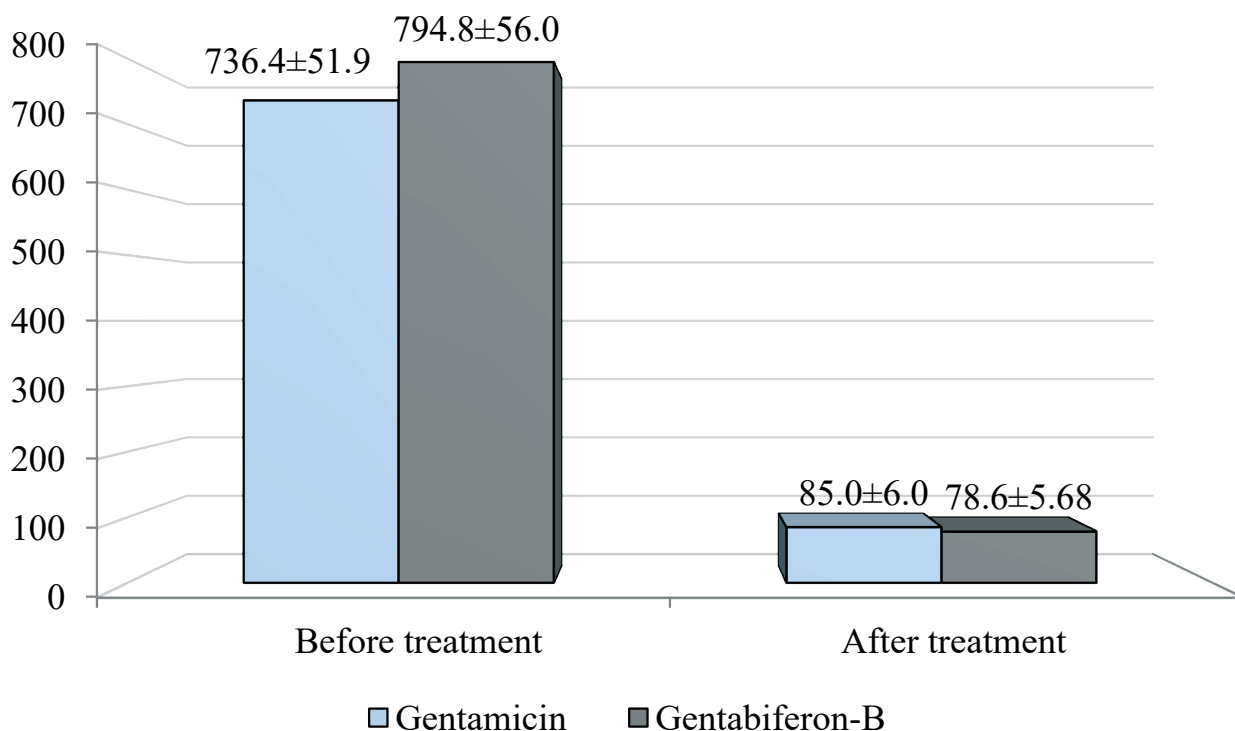


Fig. 1. Bacterial contamination of the udder secretion before and after treatment of subclinical mastitis (th. CFU/ml)

A number of authors believe that a certain level of interferon- γ can inhibit the reproduction of bacteria and reduce the risk of mammary gland infection [9, 10]. In the experiments of Sordillo L. M. et al. (1991) interferon- γ significantly increased the phagocytic and bactericidal activity of immune cells [17]. Thus, the decrease in the number of bacterial cells in the milk of

cows treated with Gentabiferon-B, compared with the group in which Gentamicin was used, is probably due to the presence of interferon- γ in the drug.

The results of counting somatic cells in cows' milk before and after the application of Gentamicin 4 % solution and Gentabiferon-B are shown in Fig. 2.

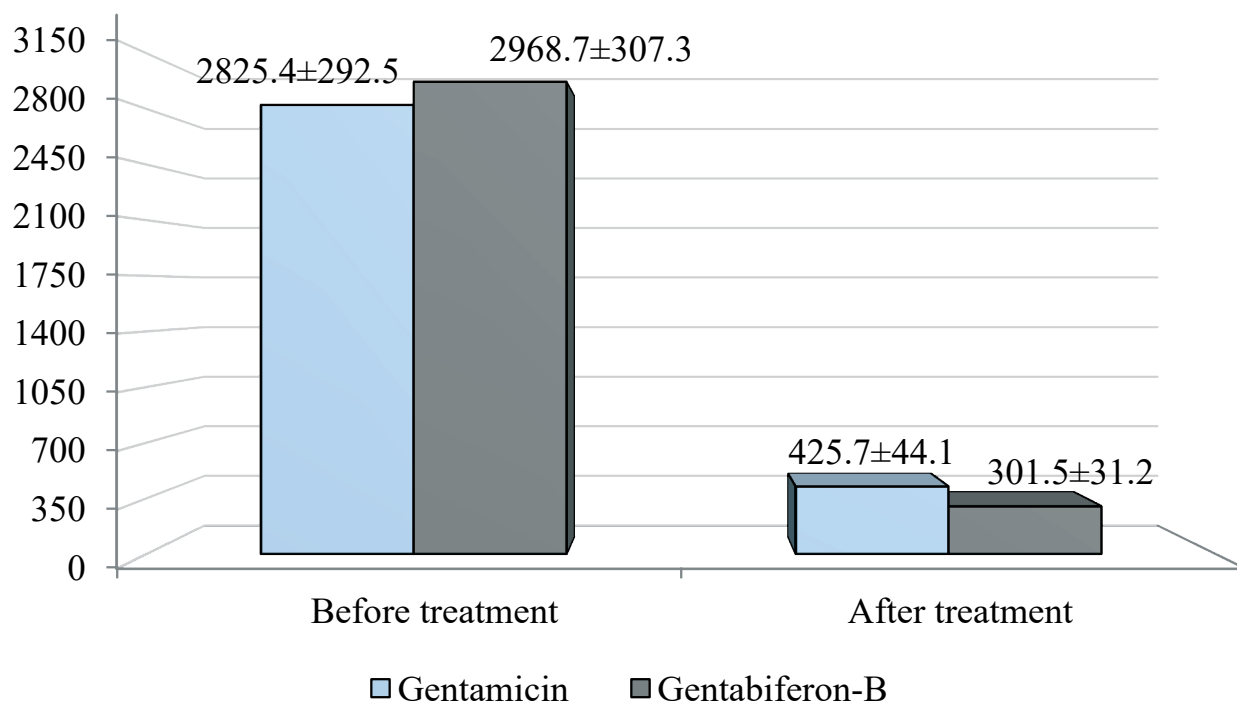


Fig. 2. Content of somatic cells in the udder secretion before and after treatment of subclinical mastitis (ths/ml)

As follows from the data obtained, in the animals of both groups during recovery, a decrease in the number of somatic cells was noted: in the first group — by 6.6 times, in the second — by 9.8 times, which corresponded to the indicators of healthy animals.

A number of authors believe that the recovery of the body after a disease involves a number of complex interactions between specific cells of the immune system, many of which are mediated by cytokines that can activate these cells to destroy or reduce the rate of pathogen replication [5]. Others believe that the action of interferons is based on the development suppression of an inflammatory reaction, which can reduce pathological changes in the parenchymal mammary gland tissue [16].

Thus, the decrease by 29.2 % in the number of somatic cells in the milk of cows of the second group compared to the first one is possibly due to the presence of interferons in Gentabiferon-B, which not only enhance the antimicrobial effect of the drug, but also reduce the inflammatory response in the mammary gland.

During the experiment, the animals were daily clinically observed, cows were considered recovered if clinical signs of mastitis were not registered in them, and if there also was a negative reaction of milk with the Masttest solution. Analyzing the data obtained, it should be noted that when using a complex drug, recovery occurs faster. Thus, for the course of treatment of cows of the first experimental group with subclinical mastitis, an average of 2.29 ± 0.02 injections of Gentabiferon-B was required, and with catarrhal — 3.96 ± 0.12 . At the same time, Gentamicin 4 % solution was injected on average 4.65 ± 0.04 and 6.51 ± 0.15 times, which led to an increase in the frequency of injections of the drug by 2.0 and 1.6 times, respectively.

The therapeutic efficacy of Gentabiferon-B and Gentamicin 4 % solution is shown in Fig. 3.

As follows from the data presented in Fig. 3, the therapeutic efficacy of Gentabiferon-B in case of subclinical mastitis was 95.5 %, and in case of catarrhal mastitis — 91.1 %, which was higher than the reference drug by 12.6 % and 11.6 %, respectively.

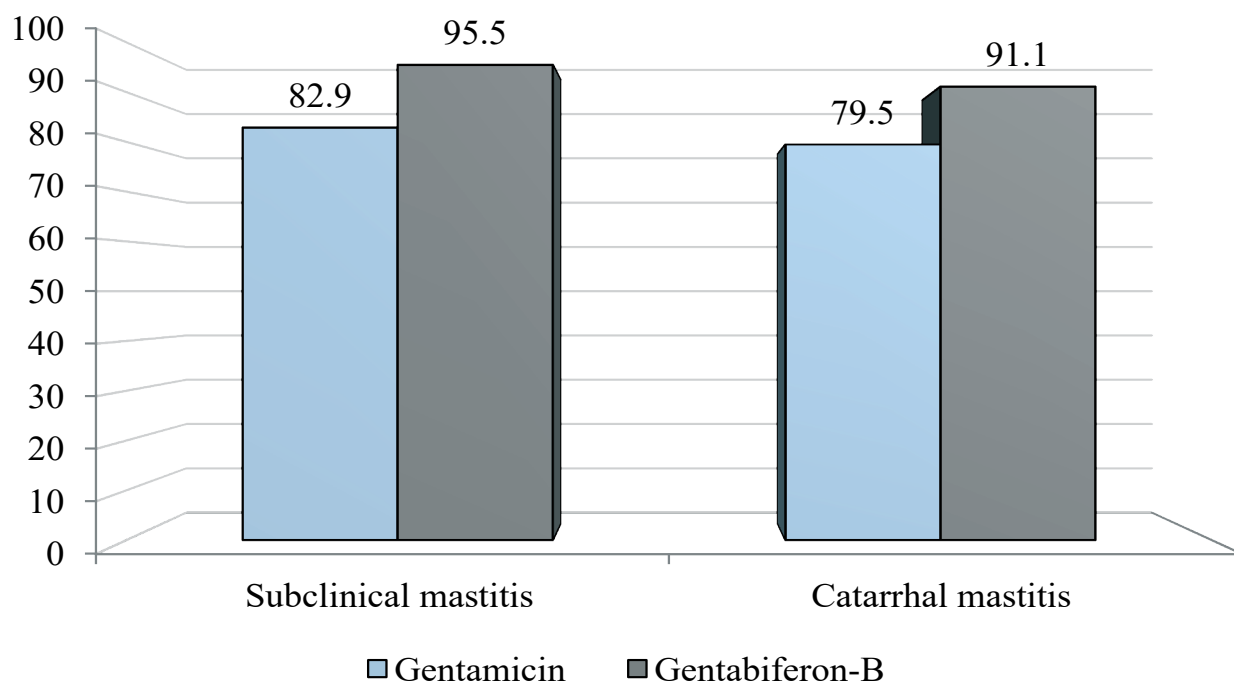


Fig. 3. Results of industrial trials of the therapeutic efficacy of Gentabiferon-B in case of bovine mastitis (%)

Thus, the use of Gentabiferon-B in cows for the treatment of mastitis provides a high therapeutic effect while reducing the period of drug administration.

The data obtained by us coincide with a number of scientific studies on the immunomodulatory effect of interferons on general and local mammary gland protection factors. Cytokines produced by macrophages and lymphocytes mobilize the immune system in response to infection, and also play a role in various pathophysiological processes in the body, which can be used to assess damage to udder tissues, determine the prognosis and outcome of treatment [7, 13]. At the same time, many authors believe that interferon- γ acts as a regulatory cytokine [12].

CONCLUSION

As a result of the studies, it has been found that the intramuscular use of Gentabiferon-B provides a higher therapeutic effect compared to the administration of a drug containing one antibiotic, and also helps to reduce the microbial contamination of milk and normalize the content of somatic cells in it. Thus, Gentabiferon-B can be widely used in the production conditions of livestock farms for the treatment of bovine mastitis.

REFERENCES

1. GOST 32901—2014. “Milk and dairy products. Methods of microbiological analysis”. — M.: Standartinform, 2015. — 25 p.

2. Manual on the diagnosis, therapy and prevention of bovine mastitis No. 13-5-2/1948. Approved by the Department of Veterinary Medicine of the Ministry of Agriculture and Food of Russia dtd. March 30, 2000 — M., 2000. — 27 p.

3. Slobodyanik V. I. Immunocorrection — a modern approach to increasing the efficacy of etiotropic drugs / V. I. Slobodyanik // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2017. — No. 1(1). — P. 34—38.

4. Slobodyanik V. I. Immunological aspects of the fight against bovine mastitis / V. I. Slobodyanik, N. T. Klimov, L. V. Cheskidova, E. V. Zverev. — Voronezh: Publishing house Istoki, 2020. — 222 p. — ISBN 978-5-4473-0284-9.

5. Babiuk L. A. Application of interferons in the control of infectious diseases of cattle / L. A. Babiuk, L. M. Sordillo, M. Campos, et al. // J Dairy Sci. — 1991. — v. 74 (12). — p. 4385—98. doi: 10.3168/jds.S0022—0302(91)78635—9.

6. De Vliegher, S. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control / S. De Vliegher, L. K. Fox, S. Piepers, et al. // J Dairy Sci. — 2012. — v. 95 (3). — p. 1025—40. doi: 10.3168/jds.2010—4074.

7. Duque-Madrid, P. C. Intramammary treatment using allogeneic pure platelet-rich plasma in cows with subclinical mastitis caused by Gram-positive bacteria / P. C. Duque-Madrid, J. Velasco-Bolaños, A. Ceballos-Márquez, et al. // Sci Rep. — 2021. — v. 11 (1). — p. 23737. doi: 10.1038/s41598-021-03067-4.

8. Exel C. E. Association of Staphylococcus aureus genotypes with milk or colonization of extramammary sites in Dutch dairy cattle indicates strain variation in reservoirs for intramammary infections / C. E. Exel, K. Gerritsen,

- M. Spaninks, et al. // *Res Vet Sci.* — 2023. — v. 154. — p. 138—144. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.12.010.
9. *Faaz R. A.* Expressions of IL4, IL10, and IFN γ cytokines genes during bacterial mastitis / R. A. Faaz, F. A. Abdullah // *J Adv Vet Anim Res.* — 2022 — v. 9 (1). — p. 42—52. doi: 10.5455/javar.2022.i567.
10. *Liu, Y.* Secretion of IFN- γ by Transgenic Mammary Epithelial Cells *in vitro* Reduced Mastitis Infection Risk in Goats / Y. Liu, H. Zhang, S. Dong, et al. // *Front Vet Sci.* — 2022. — v. 9. — p. 898635. doi: 10.3389/fvets.2022.898635.
11. *Orsi, H.* Characterization of mammary pathogenic *Escherichia coli* reveals the diversity of *Escherichia coli* isolates associated with bovine clinical mastitis in Brazil / H. Orsi, F. F. Guimarães, D. S. Leite, et al. // *J Dairy Sci.* — 2022. — Dec 23. — S0022—0302(22)00746—9. doi: 10.3168/jds.2022—22126.
12. *Pestka, S.* Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors / S. Pestka, C. D. Krause, M. R. Walter // *Immunol. Rev.* — 2004. — v. 202. — p. 8—32.
13. *Rodríguez, F.* Differential cytokine expression in natural and experimental mastitis induced by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats / F. Rodríguez, P. Castro // *Reprod Domest Anim.* — 2015. — v. 50 (1). — p. 159—63. doi: 10.1111/rda.12457.
14. *Rodríguez, Z.* Evaluation of reticuloruminal temperature for the prediction of clinical mastitis in dairy cows challenged with *Streptococcus uberis* / Z. Rodríguez, Q. K. Kolar, K. C. Krogstad, et al. // *J Dairy Sci.* — 2022. — Dec 6. — S0022—0302(22)00712—3. doi: 10.3168/jds.2022—22421.
15. *Saidi, R.* Subclinical mastitis in cattle in Algeria: frequency of occurrence and bacteriological isolates / R. Saidi, D. Khelef, R. Kaidi // *J S Afr Vet Assoc.* — 2013. — v. 84(1). — E1—5. doi: 10.4102/jsava.v84i1.929.
16. *Sordillo L. M.* Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gamma / L. M. Sordillo, L. A. Babiuk // *Vet Microbiol.* — 1991. — v. 28(2). — p. 189—98. doi: 10.1016/0378—1135(91)90092-t.
17. *Sordillo L. M.* Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following *in vitro* exposure to recombinant bovine interferon gamma / L. M. Sordillo, L. A. Babiuk // *Vet Immunol Immunopathol.* — 1991. — v. 27 (4). — p. 393—402. doi: 10.1016/0165—2427(91)90034-a.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

V. A. Gritsyuk — Doctoral Student of the Department of Experimental Pharmacology and Functioning of Living Systems;

G. A. Vostroilova — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;

L. V. Cheskidova — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;

V. I. Zimnikov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate.

The article was submitted 23.01.2023.

Научная статья

УДК 619:615.936.8

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.87

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕНОСИМОСТИ ПРЕПАРАТА ВЕТЛАН НА КОШКАХ

Александра Александровна Бушмина, Владимир Александрович Оробец✉

Ставропольский государственный аграрный университет,
Ставрополь, Россия, e-mail: orobets@yandex.ru✉

Аннотация. Заболевания кожи у мелких домашних животных являются актуальной проблемой в современной ветеринарной дерматологии, поэтому это требует особого внимания как плане развития диагностики, так и в плане совершенствования терапевтических методов лечения. Нарушения целостности кожных покровов при аллергическом дерматите не только влияют на внешний вид животного, но и причиняют значительный дискомфорт и могут служить причиной различных осложнений, например, возникновения пиодермы. Поэтому при дерматитах, сопровождающихся повреждением кожи в составе комплексной терапии используются наружные средства различных фармакологических групп. Препарат ВетЛан представляет собой мазевую композицию, включающую в себя гидрофильную гидроксипропилцеллюлозу марки В30К, наночастицы ZnO в качестве активного вещества и оксид лантана (La_2O_3). В результате проведенного исследования установлено, что применение препарата ВетЛан клинически здоровым кошкам в течение 14 дней не оказало отрицательного влияния на физиологический статус животных. По данным гематологических и биохимических исследований сыворотки крови не установлено статистически достоверных отличий определяемых показателей до и после применения препарата и отличий от показателей животных контрольной группы.

Ключевые слова: дерматиты, кошка, переносимость, морфологические, биохимические показатели, доклинические исследования

Дерматиты, связанные с реакциями гиперчувствительности, диагностируются у кошек довольно часто, сопровождаясь во многих случаях повреждением кожного покрова [1—3].

Основными препаратами выбора для контроля аллергических реакций у мелких домашних животных на данный момент являются глюкокортикостероиды (ГКС), циклоспорин, оклатациниб. ГКС являются высоко эффективными для купирования зуда и снятия воспалительной реакции, связанной с аллергиями и рекомендуется для использования на этапе диагностики короткими курсами. При необходимости длительных курсов лечения данной группой препаратов стоит рассмотреть альтернативные решения, позволяющие избежать побочных эффектов. Кошки, в отличие от собак, обычно более толерантны к терапии с глюкокортикостероидами, однако при длительном применении и использовании высоких доз побочные эффекты все же возможны. Использование циклоспорина может быть оправдано в случае постановки диагноза ко-

шачий атопический кожный синдром и обеспечивает хороший терапевтический эффект, но для достижения необходимого результата циклоспорин во многих случаях необходимо применять в течение 3—4 недель, что затрудняет снятие острой симптоматики. Оклациниб не лицензирован для кошек и при необходимости применяется вне инструкции, так как в исследованиях показал себя эффективным и безопасным для контроля зуда у данного вида животных [4—6].

Нарушения целостности кожных покровов при аллергическом дерматите не только влияют на внешний вид животного, но и причиняют значительный дискомфорт и могут служить причиной различных осложнений, например, возникновения пиодермы. Поэтому, при дерматитах, сопровождающихся повреждением кожи в составе комплексной терапии используются наружные средства различных фармакологических групп [7].

Местное применение препаратов может обеспечивать результат не только при локальном пора-

жении кожи, но и в значительной степени повышает эффективность комплексного лечения животных при дерматофитозе, бактериальной и дрожжеподобной инфекции кожи и при мультирезистентных штаммах микроорганизмов [8].

Наружные средства применяется дополнительно к системному лечению, сокращая сроки выздоровления и давая врачу возможность снизить дозы и частоту использования основного системного препарата. При возникновении кожных инфекций, как осложнения аллергического дерматита, у кошек предпочтительно использовать местное лечение локально, тем самым избегая назначения системных антибиотиков и снижая риски возникновения случаев устойчивой бактериальной инфекции.

Вместе с тем, местное применение антибактериальных препаратов может вызывать нежелательные эффекты в виде контактного дерматита, гиперемии и зуда. Кроме этого, при трансдермальном поступлении препарата в организм животных возможно его системное воздействие. Поэтому изучение переносимости новых лекарственных средств является необходимым и важным этапом определения безопасности их применения на целевых животных.

Нами был разработан препарат ВетЛан представляющий собой мазевую композицию, включающую в себя гидрофильную гидроксипропилцеллюлозу марки В30К, наночастицы ZnO в качестве активного вещества и оксид лантана (La_2O_3). Органические соединения лантана потенцируют в композиции противовоспалительное, бактерицидное и ранозаживляющее действие. Соединения лантана обладают осмотической активностью (подсушивающее действие, уменьшение отеков), ускоряют репарацию и заживление кожного покрова, обладают противозудным эффектом, что особенно важно в лечении дерматитов кошек. Ионы цинка, входящие в состав препарата, обеспечивают процессы регенерации поврежденной поверхности кожи.

В связи с этим, целью данного исследования было определение переносимости препарата ВетЛан на кошках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования на животных проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации согласно правилам, принятым Директивой 2010/63/еу Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года, по охране животных, используемых в научных це-

лях 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей [9].

При доклинических исследованиях препарата ВетЛан руководствовались Приказом МСХ РФ № 101 от 06.03.2018 г., руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (А. Н. Миронов, Н. Д. Бунатян и др. 2012) [10], Приказом Минсельхоза России № 4 от 10 января 2018 года.

Изучение переносимости препарата ВетЛан проводили на клинически здоровых беспородных кошках различного пола и возраста ($n = 10$). Животные были разделены по принципу аналогов, с учетом возраста, массы и пола на две группы по 5 кошек в каждой.

В период проведения опыта по изучению влияния препарата ВетЛан другие лекарственные средства животным не применяли. Препарат ВетЛан наносили кошкам на выстриженный участок тела, площадью 3×3 см в области спины в течение 14 дней — средний срок лечения местными препаратами и оценки динамики эффективности с возможной необходимостью продления курса с учетом особенностей течения заболевания и индивидуальных характеристик пациента по решению ветеринарного специалиста. Животным контрольной группы аналогично применяли изотонический раствор хлорида натрия.

В ходе проведения испытания препарата за животными вели ежедневное наблюдение, определяя общее клиническое состояние, поведение, аппетит, температуру тела, частоту пульса и дыхания. До начала применения препарата, затем через 14 и 21 день отбирали пробы крови для исследования морфологических и биохимических показателей. Морфологические исследования крови проводили на гематологическом ветеринарном анализаторе DF50 Vet (Dymind, Китай) с использованием метода кондуктометрии для определения RBC и PLT; фотометрического метода определения HGB и лазерной проточной цитометрии для определения WBC.

Биохимическое исследование крови животных выполнены с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора CHEM WELL 2910V (Awareness Technology, Inc. США) с неограниченным количеством устанавливаемых пользователем профилей животных. Достоверность результатов, полученных в ходе проведенных исследований обрабатывали с помощью статистических программ Microsoft Excel 2007, STATISTICA 7,0 при доверительной вероятности значений 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований было определено, что местное применение препарата ВетЛан клинически здоровым кошкам не повлияло на общее клиническое состояние животных опытной группы — активность, закрепленные поведенческие реакции, аппетит, диурез, дефекацию, реакцию на внешние раздражители. При использовании препарата местных — сухости, раздражения,

аллергического контактного дерматита, мацерации кожи, атрофии кожи и системных побочных реакций не установлено. При оценке функционального состояния (температура, частота дыхательных движений и сердечных сокращений) отклонений от нормы для данного вида животных не зафиксировано. Результаты морфологического анализа крови кошек до применения препарата, через 14 и 21 день представлены в таблице 1.

Таблица 1

Морфологические показатели крови кошек ($n = 10$), $M \pm m$

Показатель	До применения	Через 14 дней	Через 21 день
Опытная группа			
Гематокрит, %	36,8 ± 5,49	35,6 ± 4,07	35,6 ± 4,49
Гемоглобин, г/л	122,4 ± 5,42	123,8 ± 8,51	122,2 ± 8,93
Эритроциты, 10^{12} /л	7,21 ± 0,55	7,24 ± 0,73	7,53 ± 0,64
Лейкоциты, 10^9 /л	11,3 ± 2,78	11,1 ± 2,53	10,9 ± 2,38
Тромбоциты, 10^9 /л	388,9 ± 87,7	384,7 ± 92,6	377,4 ± 83,0
Эозинофилы, % от WBC	2,2 ± 0,74	2,0 ± 0,63	2,2 ± 0,75
Контрольная группа			
Гематокрит, %	33,6 ± 5,31	33,8 ± 5,11	33,8 ± 5,15
Гемоглобин, г/л	120,2 ± 17,51	120,2 ± 18,32	119,4 ± 18,09
Эритроциты, 10^{12} /л	6,88 ± 1,17	6,84 ± 1,15	6,90 ± 1,18
Лейкоциты, 10^9 /л	9,70 ± 3,22	9,63 ± 3,10	9,62 ± 2,92
Тромбоциты, 10^9 /л	407,8 ± 91,2	408,8 ± 86,3	413,4 ± 85,7
Эозинофилы, % от WBC	1,6 ± 1,01	1,8 ± 0,40	1,8 ± 1,16

При сопоставлении полученных данных общего анализа крови животных опытных и контрольных групп не установлено достоверных отличий по количеству гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, эозинофилов, процентному соотношению объема плазмы и эритроцитов, как в начале эксперимента, так и через 14 применения. Через 7 дней после последнего применения препарата по показателям количества гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, эозинофилов достоверных изменений зафиксировано не было.

В программе биохимического исследования определяли активность ферментов аланинамино-

трансферазы (АсАт) и аспаратаминотрансферазы (АлАт), количеств общего белка, общего билирубина, глюкозы, креатинина и мочевины. Выбор параметров исследования был определен с учетом необходимости исключения негативного воздействия испытуемого препарата на некоторые показатели биохимического профиля кошек (табл. 2).

Важным параметром для исключения патологии печени является определение активности аминотрансфераз. Аминотрансферазы катализируют межмолекулярный перенос аминокислот на кетокислоты, которые выступают источником энергии для многочисленных реакций в ор-

ганизме животных. При поражении печени повышается уровень активности обоих ферментов. При этом значение увеличения АсАт выше, чем АлАт. Вместе с тем, необходимо учитывать, что однозначным критерием поражения печени можно считать при увеличении активности этих ферментов

в 10—20 раз относительно референсных значений. В наших исследованиях через 7 дней после курса применения препарата ВетЛан показатели АсАт и АлАт в сыворотке крови кошек опытной группы достоверно не отличались от показателей животных контрольной группы.

Таблица 2

Биохимические показатели крови кошек ($n = 10$), $M \pm t$

Показатель	До применения	Через 14 дней	Через 21 день
Опытная группа			
АлАТ, Ед	24,8 ± 6,28	24,7 ± 7,09	25,5 ± 6,45
АсАТ, Ед	15,0 ± 5,72	15,3 ± 5,84	15,2 ± 5,74
Общий белок, г/л	62,9 ± 8,83	63,2 ± 9,18	62,7 ± 9,76
Общий билирубин, ммоль/л	5,44 ± 2,41	5,46 ± 2,13	5,64 ± 2,97
Глюкоза, ммоль/л	4,98 ± 0,92	5,05 ± 1,07	4,98 ± 0,97
Креатинин, мкмоль/л	96,4 ± 18,5	94,9 ± 16,07	93,8 ± 14,24
Мочевина, ммоль/л	7,29 ± 1,34	7,27 ± 1,29	7,19 ± 1,18
Контрольная группа			
АлАТ, Ед.	29,7 ± 6,21	29,8 ± 5,98	29,8 ± 6,26
АсАТ, Ед.	17,9 ± 5,17	18,1 ± 5,03	17,6 ± 5,02
Общий белок, г/л	59,7 ± 9,85	59,1 ± 10,67	59,4 ± 10,07
Общий билирубин, ммоль/л	6,40 ± 1,86	6,12 ± 1,55	6,20 ± 1,84
Глюкоза, ммоль/л	5,34 ± 1,21	5,48 ± 1,13	5,36 ± 1,22
Креатинин, мкмоль/л	98,4 ± 14,97	99,6 ± 16,39	99,2 ± 14,46
Мочевина, ммоль/л	7,70 ± 1,48	7,77 ± 1,48	7,60 ± 1,51

Показатель общего белка характеризует совокупность группы гетерогенных белков плазмы, 40—60 % которых составляет альбумин. В данном случае диагностическое значение может иметь абсолютная гипопроотеинемия, свидетельствующая о нарушении синтеза белка в гепатоцитах. Уровень общего белка у животных опытной группы через 7 дней после курса применения препарата составил 62,7 ± 9,76 г/л, что соответствует референсным значениям для данного вида животных. Для дифференциальной диагностики между относительным и абсолютным изменением этого показателя

при интерпретации содержания общего белка учитываем состояние водного обмена по процентному соотношению объема плазмы и эритроцитов. Показатель гематокрита во все дни исследования находился в пределах 35,6—36,8 %, что соответствует референсным значениям [11].

Основной пигмент — билирубин образуется в клетках ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) селезенки и печени в результате распада гемоглобина по истечению срока жизни эритроцитов.

Кроме этого источником образования билирубина являются другие гемосодержащие белки, ко-

торые распадаются в клетках РЭС. Повышение уровня билирубина наблюдается при нарушении функции гепатоцитов, когда затрудняется его разрушение с образованием моно- и дипиррольных соединений. По данным биохимического анализа сыворотки крови уровень билирубина находился в границах физиологической нормы — 3,0—12,0 ммоль/л [11].

Патология печени может сопровождаться также повышением концентрации глюкозы. При использовании препарата ВетЛан уровень глюкозы во все дни исследования и не имел достоверных отличий от показателей животных контрольной группы.

Известно, что конечными продуктами азотистого обмена млекопитающих являются креатинин и мочевины. По показателям содержания креатинина и мочевины можно судить о состоянии почек животного. Уровень креатинина в сыворотке крови опытных животных через 14 и 21 день после начала применения препарата ВетЛан не имел достоверных отличий от исходных значений и показателей животных контрольной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что применение препарата ВетЛан клинически здоровым кошкам в течение 14 дней не оказало отрицательного влияния на физиологический статус животных. По данным гематологических и биохимических исследований сыворотки крови не выявлено статистически достоверных отличий определяемых показателей до и после применения препарата и отличий от аналогичных показателей животных контрольной группы.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. А. Бушмина — аспирант кафедры терапии и фармакологии;

В. А. Оробец — доктор ветеринарных наук, профессор.

Статья поступила в редакцию 09.02.2023 г.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Герке А. Н. Эрозивно-язвенное поражение кожи у кошек. Диагностика и лечение // *VetPharma*. 2013. 1. С. 40—45.
2. Жуков В. М., Долгополова Т. С. Органопатология кожи кошек в условиях ветеринарной клиники города Барнаула // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2018. 5. С. 149—154.
3. Bajwa J. Atopic dermatitis in cats // *Can Vet J*. 2018. 59(3). P. 311—313.
4. Last R. D., Suzuki Y., Manning T., Lindsay D., Galipeau L., Whitbread T. J. A case of fatal systemic toxoplasmosis in a cat being treated with cyclosporin A for feline atopy // *Vet Dermatol*. 2004. 15 (3). P. 194—8.
5. Ferrer L., Carrasco I., Cristòfol C., Puigdemont A. A pharmacokinetic study of oclacitinib maleate in six cats // *Vet Dermatol*. 2020. 31(2). P. 134—137.
6. Lopes N. L., Campos D. R., Machado M. A., Alves M. S. R. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the safety of oclacitinib in cats // *BMC Vet Res*. 2019. 8. P. 137.
7. Герке А. Н. Pemphigus foliaceus // *VetPharma*. 2016. 5. P. 30—38.
8. Герке А. Н. Основные принципы местной антимикробной терапии в дерматологии // *VetPharma*. 2015. 1. С. 66—75.
9. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября. — Санкт-Петербург, 2012. — 48 с.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильев, О. Л. Верстакова, М. В. Журавлева [и др.]; под ред. А. Н. Миронова. Часть первая. — Москва: Гриф и К, 2012. 944 с.
11. Медведева М. Клиническая ветеринарная лабораторная диагностика. Справочник для ветеринарных врачей. Москва: Аквариум-Принт, 2020. 428 с.

VETLAN DRUG TOLERANCE DETERMINATION ON CATS

Aleksandra Aleksandrovna Bushmina, Vladimir Aleksandrovich Orobets✉

Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia, e-mail: orobets@yandex.ru✉

Abstract. Skin diseases in small pets are an urgent problem in modern veterinary dermatology, so this requires special attention both in terms of the diagnostics development and in terms of improving therapeutic methods of treatment. Violations of the skin integrity in case of allergic dermatitis not only affect the appearance of the animal, but also cause significant discomfort and can cause various complications, such as pyoderma. Therefore, in case of dermatitis accompanied by skin damage, external agents of various pharmacological groups are used as part of complex therapy. The drug VetLan is an ointment composition that includes hydrophilic hydroxyethyl cellulose grade B30K, ZnO nanoparticles as an active substance and lanthanum oxide (La_2O_3). As a result of the study, it was found that the use of VetLan in clinically healthy cats for 14 days did not adversely affect the physiological status of animals. According to hematological and biochemical blood serum studies, there were no statistically significant differences in the determined indicators before and after the use of the drug and differences from the indicators of animals in the control group.

Keywords: dermatitises, cat, tolerance, morphological, biochemical indicators, preclinical studies

Dermatitises associated with hypersensitivity reactions are diagnosed in cats quite often, accompanied by skin damage in many cases [1—3].

Currently, the main drugs of choice for controlling allergic reactions in small pets are glucocorticosteroids (GCs), cyclosporine, and oclacitinib. Corticosteroids are highly effective in relieving itching and relieving the inflammatory reaction associated with allergies and are recommended for use at the diagnostic stage in short courses. If a long-term treatment with this group of drugs is needed, alternative solutions to avoid side effects should be considered. Cats, unlike dogs, are usually more tolerant of glucocorticosteroid therapy, however, with long-term use and high doses, side effects are still possible. The use of cyclosporine may be justified in the case of a diagnosis of feline atopic skin syndrome and provides a good therapeutic effect, but to achieve the desired result, cyclosporine in many cases must be used for 3—4 weeks, which makes it difficult to relieve acute symptoms. Oclacitinib is not licensed for use in cats and is used without prescribing information when needed, as the studies have shown it to be effective and safe for controlling pruritus in this species [4—6].

Violations of the skin integrity in case of allergic dermatitis not only affect the appearance of the animal, but also cause significant discomfort and can cause various complications, such as pyoderma. Therefore,

for dermatitis accompanied by skin damage, external agents of various pharmacological groups are used as part of complex therapy [7].

Topical application of drugs can provide results not only in case of local skin lesions, but also significantly increase the efficacy of complex treatment of animals with dermatophytosis, bacterial and yeast-like skin infections, and with multidrug-resistant strains of microorganisms [8].

External agents are used in addition to systemic treatment, reducing the recovery time and giving the doctor the opportunity to reduce the dose and frequency of use of the main systemic drug. When skin infections occur as a complication of allergic dermatitis in cats, it is preferable to use topical treatment locally, thereby avoiding the prescription of systemic antibiotics and reducing the risk of cases of resistant bacterial infection. However, local application of antibacterial drugs can cause undesirable effects in the form of contact dermatitis, hyperemia and itching. In addition, when the drug enters the body of animals transdermally, its systemic effects are possible. Therefore, the study of the tolerability of new drugs is a necessary and important step in determining the safety of their use in target animals.

We have designed the drug VetLan, which is an ointment composition that includes hydrophilic hydroxyethyl cellulose grade B30K, ZnO nanoparticles

as an active substance, and lanthanum oxide (La₂O₃). Organic lanthanum compounds potentiate anti-inflammatory, bactericidal and wound healing effects in the composition. Lanthanum compounds have osmotic activity (drying effect, reduction of edema), accelerate the repair and healing of the skin, have an antipruritic effect, which is especially important in the treatment of cat dermatitis. Zinc ions, which are part of the drug, provide the processes of regeneration of the damaged skin surface.

In this regard, the objective of this study was to determine the tolerability of VetLan in cats.

MATERIAL AND METHODS

Animal studies were carried out in accordance with the legislation of the Russian Federation in accordance with the rules adopted by Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union dtd. September 22, 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes [9]. In preclinical studies of VetLan, we were guided by the Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation No. 101 dtd. March 6, 2018, the Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs (A. N. Mironov, N. D. Bunyatyan et al. 2012) [10], the Order of the Ministry of Agriculture of Russia No. 4 dtd. January 10, 2018.

The study of the tolerability of VetLan was carried out on clinically healthy outbred cats of different gender and age ($n = 10$). The animals were divided according to the principle of analogues, taking into account age, weight and gender into two groups of 5 cats each. During the experiment to study the effect of VetLan, no other drugs were used in animals. The drug VetLan was applied to cats on a shorn area of the body, with a back area of 3×3 cm for 14 days — the average duration of treatment with local drugs and evaluation of the efficacy dynamics with the possible need to extend the course, taking into account the characteristics of

the course of the disease and the individual characteristics of the animal, as decided by a veterinary specialist. The animals of the control group were similarly administered isotonic sodium chloride solution. During the trial of the drug, the animals were observed daily, determining the general clinical state, behavior, appetite, body temperature, pulse rate and respiration. Before the start of using the drug, then 14 and 21 days after, blood samples were taken for the study of morphological and biochemical indicators. Morphological blood analyses were performed on a DF50 Vet hematological veterinary analyzer (Dymind, China) using conductometry to determine RBC and PLT; photometric method for determining HGB and laser flow cytometry for determining WBC. Biochemical blood analysis was performed using an automatic biochemical and enzyme immunoassay analyzer CHEM WELL 2910V (Awareness Technology, Inc. USA) with an unlimited number of animal profiles set by the user. The reliability of the results obtained in the course of the studies was processed using the statistical programs Microsoft Excel 2007, STATISTICA 7.0 at a confidence level of 0.95.

STUDY RESULTS

As a result of the studies, it was determined that the local application of VetLan to clinically healthy cats did not affect the general clinical state of the animals of the experimental group — activity, fixed behavioral reactions, appetite, diuresis, defecation, reaction to external stimuli. When using the local drug, dryness, irritation, allergic contact dermatitis, skin maceration, skin atrophy and systemic adverse reactions have not been detected. When assessing the functional state (temperature, respiratory rate and heart rate), no deviations from the norm were recorded for this type of animal. The results of the morphological blood analysis of cats before the use of the drug, 14 and 21 days after are presented in Table 1.

Table 1

Morphological blood indicators of cats ($n = 10$), $M \pm m$

Indicator	Before the use	In 14 d	In 21 d
1	2	3	4
Experimental group			
Hematocrit, %	36.8 ± 5.49	35.6 ± 4.07	35.6 ± 4.49
Hemoglobin, g/L	122.4 ± 5.42	123.8 ± 8.51	122.2 ± 8.93
Erythrocytes, $10^{12}/L$	7.21 ± 0.55	7.24 ± 0.73	7.53 ± 0.64

Table 1 (the end)

1	2	3	4
Leukocytes, 10 ⁹ /L	11.3 ± 2.78	11.1 ± 2.53	10.9 ± 2.38
Platelets, 10 ⁹ /L	388.9 ± 87.7	384.7 ± 92.6	377.4 ± 83.0
Eosinophils, % of WBC	2.2 ± 0.74	2.0 ± 0.63	2.2 ± 0.75
Control group			
Hematocrit, %	33.6 ± 5.31	33.8 ± 5.11	33.8 ± 5.15
Hemoglobin, g/L	120.2 ± 17.51	120.2 ± 18.32	119.4 ± 18.09
Erythrocytes, 10 ¹² /L	6.88 ± 1.17	6.84 ± 1.15	6.90 ± 1.18
Leukocytes, 10 ⁹ /L	9.70 ± 3.22	9.63 ± 3.10	9.62 ± 2.92
Platelets, 10 ⁹ /L	407.8 ± 91.2	408.8 ± 86.3	413.4 ± 85.7
Eosinophils, % of WBC	1.6 ± 1.01	1.8 ± 0.40	1.8 ± 1.16

When comparing the data obtained from the general blood analysis of the animals from the experimental and control groups, no significant differences were found in the amount of hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, platelets, eosinophils, the percentage of plasma volume and erythrocytes, both at the beginning of the experiment and after 14 applications. In 7 days after the last use of the drug, no significant changes were recorded in terms of the amount of hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, platelets, eosinophils.

The enzyme activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), the amounts of total protein, total bilirubin, glucose, creatinine and urea were determined in the biochemical study program. The choice of study parameters was determined taking into account the need to exclude the negative effect of the test drug on some indicators of the biochemical profile of cats (Table 2).

An important parameter for excluding liver pathology is the determination of aminotransferase activity. Aminotransferases catalyze the intermolecular transfer of amino groups from amino acids to keto acids, which act as an energy source for numerous reactions in the animal body. With liver damage, the level of activity of both enzymes increases. At the same time, the value of the increase in AST is higher than that of ALT. At the same time, it should be taken into account that an unambiguous criterion for liver damage can be considered with an increase by 10—20 times in the activity of these enzymes relative to the reference values. In our studies, 7 days after the course of using

the drug VetLan, the indicators of AST and ALT in the blood serum of cats of the experimental group did not significantly differ from those of animals in the control group. The total protein index characterizes the totality of a group of heterogeneous plasma proteins, 40—60 % of which is albumin. In this case, absolute hypoproteinemia may be of diagnostic value, indicating a violation of protein synthesis in hepatocytes. The level of total protein in the animals of the experimental group 7 days after the course of the drug was 62.7 ± 9.76 g/L, which corresponded to the reference values for this type of animal. For differential diagnosis between the relative and absolute changes in this indicator, when interpreting the content of total protein, we take into account the state of water metabolism in terms of the percentage of plasma volume and erythrocytes. The hematocrit index on all days of the study was in the range of 35.6—36.8 %, which corresponded to the reference values [11].

The main pigment (bilirubin) is formed in the cells of the reticuloendothelial system (RES) of the spleen and liver as a result of the breakdown of hemoglobin after the expiration of the life of erythrocytes. In addition, other heme-containing proteins, which are degraded in RES cells, are a source of bilirubin formation. An increase in the level of bilirubin is observed when the function of hepatocytes is impaired, when its destruction with the formation of mono- and dipyrrole compounds is difficult. According to the biochemical blood serum analysis, the level of bilirubin was within the physiological norm — 3.0—12.0 mmol/L [11].

Table 2

Biochemical blood indicators of cats ($n = 10$), $M \pm m$

Indicator	Before the use	In 14 d	In 21 d
Experimental group			
ALT, U	24.8 ± 6.28	24.7 ± 7.09	25.5 ± 6.45
AST, U	15.0 ± 5.72	15.3 ± 5.84	15.2 ± 5.74
Total protein, g/L	62.9 ± 8.83	63.2 ± 9.18	62.7 ± 9.76
Total bilirubin, mmol/L	5.44 ± 2.41	5.46 ± 2.13	5.64 ± 2.97
Glucose, mmol/L	4.98 ± 0.92	5.05 ± 1.07	4.98 ± 0.97
Creatinine, μmol/L	96.4 ± 18.5	94.9 ± 16.07	93.8 ± 14.24
Urea, mmol/L	7.29 ± 1.34	7.27 ± 1.29	7.19 ± 1.18
Control group			
ALT, U	29.7 ± 6.21	29.8 ± 5.98	29.8 ± 6.26
AST, U	17.9 ± 5.17	18.1 ± 5.03	17.6 ± 5.02
Total protein, g/L	59.7 ± 9.85	59.1 ± 10.67	59.4 ± 10.07
Total bilirubin, mmol/L	6.40 ± 1.86	6.12 ± 1.55	6.20 ± 1.84
Glucose, mmol/L	5.34 ± 1.21	5.48 ± 1.13	5.36 ± 1.22
Creatinine, μmol/L	98.4 ± 14.97	99.6 ± 16.39	99.2 ± 14.46
Urea, mmol/L	7.70 ± 1.48	7.77 ± 1.48	7.60 ± 1.51

Liver pathology may also be accompanied by an increase in glucose concentration. When using the drug VetLan, on all days of the study, the glucose level did not have significant differences from the indicators of the animals in the control group.

It is known that the end products of nitrogen metabolism in mammals are creatinine and urea. According to the indicators of the creatinine and urea content, one can judge the state of the animal's kidneys. The blood serum level of creatinine in the experimental animals 14 and 21 days after the start of VetLan use did not have significant differences from the initial values and indicators of animals in the control group.

CONCLUSION

As a result of the study, it was found that the use of VetLan in clinically healthy cats for 14 days did not adversely affect the physiological status of animals. According to hematological and biochemical blood serum studies, there were no statistically significant differences in the determined indicators before and after

the use of the drug and differences from similar indicators in the animals of the control group.

REFERENCES

1. Gerke A. N. Erosive and ulcerative skin lesions in cats. Diagnosis and treatment // Vetpharma. 2013. 1. P. 40—45.
2. Zhukov V. M., Dolgopolova T. S. Skin organopathology of cats in a veterinary clinic in Barnaul // Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Bulletin of Altai State Agrarian University). 2018. 5. P. 149—154.
3. Bajwa J. Atopic dermatitis in cats // Can Vet J. 2018. 59(3). R. 311—313.
4. Last R. D., Suzuki Y., Manning T., Lindsay D., Galipeau L., Whitbread T. J. A case of fatal systemic toxoplasmosis in a cat being treated with cyclosporin A for feline atopy // Vet Dermatol. 2004. 15(3). R. 194—8.
5. Ferrer L., Carrasco I., Cristòfol C., Puigdemont A. A pharmacokinetic study of oclacitinib maleate in six cats // Vet Dermatol. 2020.31(2). P. 134—137.
6. Lopes N. L., Campos D. R., Machado M. A., Alves M. S. R. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the safety of oclacitinib in cats // BMC Vet Res. 2019. 8. R. 137.

7. Gerke A. N. *Pemphigus foliaceus* // *VetPharma*. 2016. 5. R. 30—38.
8. Gerke A. N. Basic principles of topical antimicrobial therapy in dermatology // *VetPharma*. 2015. 1. P. 66—75.
9. Directive of the European Parliament and the Council of the European Union 2010/63/EU dtd. September 22. — St. Petersburg, 2012. — 48 p.
10. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs / *N. D. Bunyatyan, A. N. Vasilyev, O. L. Verstakova, M. V. Zhuravleva* [et al.]; ed. by *A. N. Mironov*. Part one. — Moscow: Grif and K, 2012. 944 p.
11. *Medvedeva M.* Clinical veterinary laboratory diagnostics. Handbook for veterinarians. Moscow: Aquarium-Print, 2020. 428 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. A. Bushmina — Postgraduate Student of the Department of Therapy and Pharmacology;

V. A. Orobets — Doctor of Veterinary Sciences, Professor.

The article was submitted 09.02.2023

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОБИОХИМИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Научная статья

УДК 616—018

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.97

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕМЕННИКОВ БЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ЭСТРОГЕНОВ

Андрей Николаевич Квочко*✉, Римма Тагировна Сулайманова**

*Ставропольский государственный аграрный университет,
Ставрополь, Россия, e-mail: kvochko@yandex.ru✉

**Университет «РЕАВИЗ», Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Целью исследований был анализ экспрессии маркера Ki-67 при пренатальном воздействии различных доз синтетического аналога эстрогена синэстрола на семенники потомства белых беспородных лабораторных мышей. Эксперимент выполнен на потомстве мышей, матерям которых на 11 сутки беременности внутримышечно однократно вводили экспериментальные дозы синтетического аналога эстрогена синэстрола в виде 2 % масляного раствора. Полученное потомство разделили на группы по 5 животных в каждой: интактная группа — без воздействия, первая экспериментальная группа — синэстрол в дозе 25 мкг/кг «С-25», вторая экспериментальная группа — синэстрол в дозе 40 мкг/кг «С-40». Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков семенников потомства, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Иммуногистохимическим методом определяли маркер пролиферативной активности к белку Ki-67, на структурах семенников потомства: сперматогонии, сперматоциты, сперматиды, сперматозоиды, клетки Лейдига. Наблюдались изменения в сторону увеличения позитивно окрашенных клеток в сперматиде на 11,3 % ($p \leq 0,05$) и 4,1 %, соответственно по сравнению с интактной группой. А также отмечалось значимое уменьшение количества позитивно окрашенных клеток Лейдига на 52,0 % ($p \leq 0,05$) и 48,0 % ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с интактной группой. Результаты исследования свидетельствуют об актуальности проблемы лимитирования дозозависимого воздействия синтетического эстрогена синэстрола в период пренатального развития органов плода, что позволит избежать неблагоприятного эффекта на развитие и структурно-функциональную организацию семенников потомства.

Ключевые слова: белые беспородные лабораторные мыши, пренатальное введение, потомство, синэстрол, семенники, маркер Ki-67

ВВЕДЕНИЕ

Особое внимание в научной индустрии уделяется гормональному балансу и вопросу пренатального воздействия гормонов и их аналогов на человека и животных. Беременность вызывает физиологическое повышение гормонов, действие которых влияет не только на организм матери, но и влечет за собой изменения в функциональном развитии у формирующегося плода. Высокая концентрация гормонов и их производных в материнской крови не зависит от пола развивающегося плода [3].

У потомства при патогенном воздействии веществ различной природы истощаются компенса-

торные возможности, приводящие к невосполнимому распаду субклеточных структур, нарушению функций, дистрофическому процессу и гибели клеток [7]. Пренатальный стресс вызывает комплекс разнообразных морфологических, нейрохимических, эндокринных, метаболических изменений, проявляющихся в постнатальной жизни [6]. Пренатальная стероидная эстрогенная нагрузка сопровождается параллельным ростом значительно помолодевших случаев рака молочной железы, рака яичников, рака семенников, рака простаты и других стероидозависимых органов [12]. Рак яичка имеет пиковую частоту среди мужчин в возрасте от 25

до 34 лет. Существует гипотеза об этиологии рака семенников, которая гласит, что риск его развития в значительной степени или исключительно определяется внутриутробным периодом [13].

Решение проблемы репродуктивного мужского здоровья и долголетия является жизненно необходимой задачей [8, 14]. Концепция демографической политики Российской Федерации на период до 2025 года была утверждена Указом Президента № 1351 от 9 октября 2007 года, которая определила укрепление репродуктивного здоровья и института семьи в качестве приоритетных направлений государственной политики [10].

В современной биологии появилась возможность иммуноцитохимически (ИГХ) маркировать клетки при различных фазах клеточного цикла. Большое внимание уделяется изучению молекулярно-биологическим маркерам, характеризующие пролиферацию — белок Ki-67 [8].

Моделирование патологических состояний у лабораторных животных является важным разделом экспериментальной медицины, поскольку от качества и воспроизводимости модели зависит не только обоснованность фундаментальных выводов о механизмах развития заболеваний, но и результаты доклинических испытаний лекарственных препаратов [9].

В настоящее время количество существующих моделей провоцирующего действия веществ с эстрогеноподобным действием на организм человека и животных незначительно. Пренатальное воздействие препаратов с эстрогенной активностью, а также изучение последствий их применения на потомство, является актуальной и малоизученной проблемой.

Цель исследования: анализ экспрессии маркера Ki-67 при пренатальном воздействии различных доз синтетического аналога эстрогена синэстрола на семенники потомства белых беспородных лабораторных мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено с 2014 по 2020 год в условиях кафедры гистологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ. Эксперимент выполнен на потомстве белых беспородных лабораторных мышей, матерям которых на 11 сутки беременности внутримышечно однократно вводили экспериментальные дозы синтетического аналога эстрогена синэстрола в виде 2 % масляного рас-

твора. Полученное потомство разделили на группы по 5 животных в каждой: интактная группа — без воздействия, первой экспериментальной группе вводили — синэстрол в дозе 25 мкг/кг «С-25», второй экспериментальной групп вводили — синэстрол в дозе 40 мкг/кг «С-40». Расчеты эффективности доз препарата производили в соответствии с коэффициентами для перерасчета доз веществ в мкг/кг для мышей [2, 4, 11].

Вывод из эксперимента лабораторных животных производили в фазу диэструса на 90 сутки. Эстральный цикл у потомства определяли с использованием влажгалищных мазков, окрашенных по критериям М. С. Сора [15]. Исследованию подвергались семенники потомства лабораторных мышей, фиксация и гистологическая проводка осуществлялась по стандартной схеме. Подсчет структур семенников потомства производился под иммерсионным объективом на стандартных полях зрения 90× [1].

Экспериментальная часть исследования выполнена в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков семенников потомства, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Иммуногистохимическим методом определяли маркеры пролиферативной активности белка Ki-67. Использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия) для мыши (Mouse Monoclonal Antibody Ki-67 Antigen. Клон MIB-1; разведение: 1:300; Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein. Клон N-19, разведение: 1:300) по рекомендации производителя Santa Cruz Biotechnology (США).

Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). Оценку окрашенных препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica, в 10 полях зрения каждого образца при увеличении ×100 производили подсчет среднего числа иммунопозитивных клеток с положительной реакцией. Среднее число положительных к антигенам клеток вычисляли соотношением с клетками, в которых эти антигены не определялись (на 100 просчитанных клеток) [12]. Экспрессию антител оценивали в следующих клет-

ках семенников потомства: сперматогониях, сперматоцитах, сперматидах, сперматозоидах, клетках Лейдига.

Статистическую обработку осуществляли с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). По каждому параметру вычисляли среднее арифметическое значение и его стандартную ошибку ($M \pm SD$). Достоверность изменений оценивали с помощью метода Краскела — Уолиса, раз-

личия определяли при достигнутом уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия маркера Ki-67 семенников потомства лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении синтетического препарата синэстрол представлены в таблице 1 и на рисунках 1—3.

Таблица 1

Количество Ki-67иммунопозитивных клеток в семенниках потомства белых беспородных лабораторных мышах при пренатальном введении синтетического препарата синэстрол

Показатели	Интактная	С-25	С-40
Клетки сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца	27,6 ± 1,7	25,4 ± 1,8	29,4 ± 1,1
Клетки сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца	29,2 ± 1,3	29,6 ± 2,1	27,8 ± 1,5
Клетки сперматид в эпителии извитого семенного канальца	24,8 ± 0,8	27,6 ± 1,1*	25,8 ± 0,8
Клетки сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца	121,7 ± 0,3	120,9 ± 0,1	119,3 ± 0,4
Клетки Лейдига в соединительнотканной строме между извитыми семенными канальцами	5,0 ± 1,0	2,6 ± 0,5*	2,4 ± 0,5*

* В сравнении с интактной группой выявлены различия со статистической значимостью $p \leq 0,05$

В результате анализа экспрессии маркера Ki-67 в экспериментальных группах «С-25» и «С-40» позитивно окрашенных клеток в сперматогониях, по сравнению с интактной группой, значимых различий не выявлено. Сравнительный анализ интактной группы с экспериментальными группами «С-25» и «С-40» клетках сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца различий не показал. Уровень экспрессий маркера Ki-67 в клетках сперматидов в эпителии извитого семенного канальца в экспериментальных группах «С-25» и «С-40» увеличился на 11,3 % ($p \leq 0,05$) и 4,1 %, соответственно, по сравнению с интактной группой. В экспериментальных группах «С-25» и «С-40» позитивно окрашенных клеток сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца значимых различий не обнаружено. Степень экспрессии белка Ki-67 уменьшилась в экспериментальных группах «С-25» и «С-40» в клетках Лейдига в слоях соединительной ткани между извитыми семенными канальцами на 52,0 % ($p \leq 0,05$) и 48,0 % ($p \leq 0,05$) соответственно.

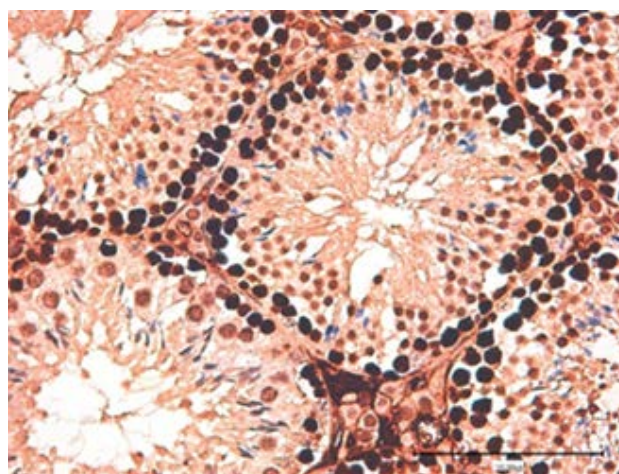


Рис. 1. Семенник потомства интактной группы. ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Докраска ядер гематоксилином. ×100

Таким образом, в результате морфометрического анализа ИГХ-маркера Ki-67 при введении синтетического препарата синэстрол в дозах 25

и 40 мкг/кг позитивно окрашенных клеток в сперматогониях, сперматоцитах и в сперматозоидах по сравнению с интактной группой различий не выявлено. Наблюдались изменения в сторону увеличения позитивно окрашенных клеток в сперматиде на 11,3 % ($p \leq 0,05$) и 4,1 %, соответственно по сравнению с интактной группой. А также отмечалось значимое уменьшение количества позитивно окрашенных клеток Лейдига на 52,0 % ($p \leq 0,05$) и 48,0 % ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с интактной группой.

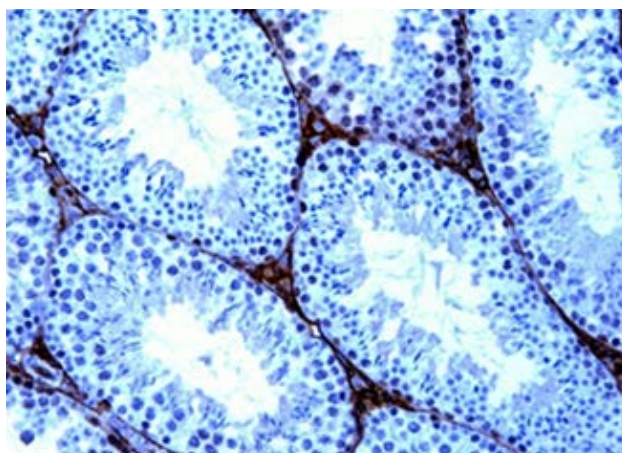


Рис. 2. Семенник потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг. ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Докраска ядер гематоксилином. $\times 100$

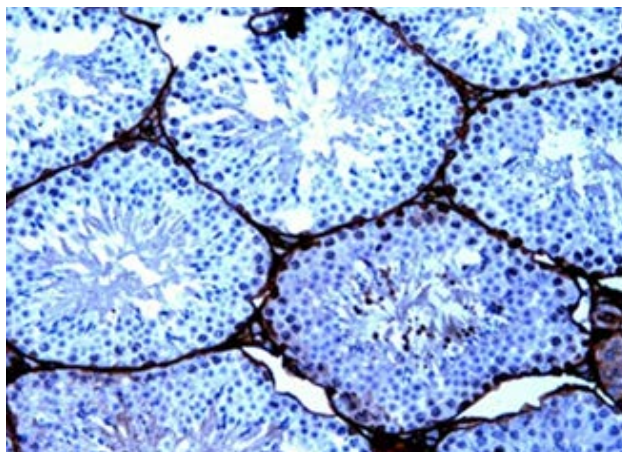


Рис. 3. Экспрессия белка Ki-67 в семенниках потомства экспериментальной группы С-40. Иммуногистохимическая реакция с моноклональным антителом Ki-67. Докраска ядер гематоксилином. $\times 100$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, структурные изменения в семенниках потомства белых беспородных лабораторных мышей определяются вводимой дозой

синтетического аналога эстрогена синэстрола, в период пренатального развития органов плода. Лимитирование дозозависимости вводимого препарата в пренатальный период позволит избежать неблагоприятного эффекта на развитие и структурно-функциональную организацию семенников потомства, о чем свидетельствует маркер Ki-67.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. Руководство. // М.: Медицина — 1990. — С. 384. ISBN5—225—00753—8
2. Арзамасцев Е. В., Гуськова Т. А., Березовская И. В. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. — Под ред. Хабриева Р. У. — М.: Медицина, 2005. — С. 41—54.
3. Внутритрубное развитие человека: руководство для врачей / под ред. А. П. Милованова, С. В. Савельева. — Москва: МВД, 2006. — 384 с.
4. Гуськова Т. А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований // Токсикологический вестник. — 2010. — № 5 (104). — С. 2—6.
5. Панченко И. А., Бруснев А. Б., Гармаш О. Н. Служба репродуктивного мужского здоровья на примере краевого специализированного центра / Экспериментальная и клиническая урология. — 2019. — № 2. — С. 20—25. — DOI 10.29188/2222-8543-2019-11-2-20-24.
6. Резников А. Г., Александр Григорьевич, Пишак В. П., Василий Павлович, Носенко Н. Д., Надежда Дмитриевна, Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология / А. Г. Резников, В. П. Пишак, Н. Д. Носенко [и др.]; (под общ. ред. чл.-корр. НАН и АМН Украины А. Г. Резникова). — Черновцы: Медакадемия, 2004. — 318 с.: ил., портр.; 24 см. — Библиогр.:
7. Сизоненко М. Л. Роль хронических экспериментальных поражений гепатобилиарной системы матери различного генеза в нарушении морфофункционального становления мужской репродуктивной системы потомства: дис. ... док. мед. наук: 03.03.04 / Сизоненко Максим Леонидович. — Челябинск, 2015. — 313 с.
8. Степанова Е. В., Барышников А. Ю., Никогосян С. О., Кузнецов В. В., Карапетян В. Л. Молекулярно-биологические факторы прогноза рака яичников начальных стадий. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2011; 22(1): 37—41. EDN: OOUFLZ
9. Тишевская Н. В., Максаков Д. А., Головнева Е. С. Морфологические особенности сульпиридной модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы у крыс // Экспериментальная и клиническая урология. — 2017. — № 2. — С. 16—19.
10. Указ Президента РФ от 9 октября 2007 г. № 1351 «Об утверждении Концепции демографической политики Российской Федерации на период до 2025 года»

(с изменениями и дополнениями). URL: <http://ivo.garant.ru/#/document/191961/paragraph/1:0>

11. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С. 49—51.

12. Шарафутдинова Л. А. Морфофункциональные изменения нервной, иммунной и репродуктивной систем при воздействии наноразмерного диоксида титана в форме рутила: дис. ... д-ра биол. наук: 03.03.04 / Шарафутдинова Люция Ахтямовна. — Казань, 2019. — 258 с.

13. A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer — expe-

riences of the son / M. B. Cook, O. Akre, D. Forman [et al.] // Int. J. Epidemiol. — 2010. — Vol. 39, № 6. — P. 1605—18.

14. Bhartiya D, Kaushik A. Testicular Stem Cell Dysfunction Due to Environmental Insults Could Be Responsible for Deteriorating Reproductive Health of Men. *Reprod Sci.* 2021 Mar;28(3):649—658. doi: 10.1007/s43032—020—00411—3.

15. Cora M. C., Kooistra L., Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears // *Toxicologic Pathology.* — 2015. — № 43(6). — С. 776—793

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. Н. Квочко — ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет, факультет ветеринарной медицины, заведующий кафедрой физиологии, хирургии и акушерства, доктор биологических наук;

Р. Т. Сулайманова — университет «Реавиз», г. Санкт-Петербург, заведующая кафедрой медико-биологических дисциплин, кандидат биологических наук.

Статья поступила в редакцию 08.02.2023 г.

.....

PATHOPHYSIOLOGY, PATHOBIOCHEMISTRY AND EXPERIMENTAL THERAPY

.....

Original article
UDC 616—018

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE TESTES OF WHITE LABORATORY MICE WITH PRENATAL ESTROGEN ADMINISTRATION

Andrey Nikolaevich Kvochko*✉, Rimma Tagirovna Sulaymanova**

*Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia, e-mail: kvochko@yandex.ru✉

**“REAVIZ” University, St. Petersburg, Russia

Abstract. The objective of the study was to analyze the expression of the Ki-67 marker during prenatal exposure to various doses of the synthetic estrogen analog synoestrol on the offspring testes of outbred laboratory mice. The experiment was performed on the offspring of mice, whose mothers on day 11 of gestation were injected intramuscularly with experimental doses of the synthetic estrogen analogue synoestrol in the form of a 2 % oil solution. The obtained offspring was divided into groups of 5 animals each: intact group — without exposure, the animals of the first experimental group were administered synoestrol at a dose of 25 µg/kg — S-25, the animals of the second experimental group were administered synoestrol at a dose of 40 µg/kg — S-40. Immunohistochemical analysis was performed on sections from paraffin blocks of offspring testes intended for standard morphological studies. An immunohistochemical method was used to determine the marker of proliferative activity to the Ki-67 protein on the structures of the offspring testes: spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa, Leydig cells. There were changes towards an increase in positively stained cells in spermatids by 11.3 % ($p \leq 0.05$) and 4.1 %, respectively, compared with the intact group. There was also a significant decrease in the number of positively stained Leydig cells by 52.0 % ($p \leq 0.05$) and 48.0 % ($p \leq 0.05$), respectively, compared with the intact group. The results of the study indicate the relevance of the problem of limiting the dose-dependent effect of the synthetic estrogen synoestrol during the prenatal development of the fetal organs, which will allow avoid an adverse effect on the development and structural and functional organization of the offspring testes.

Keywords: outbred laboratory mice, prenatal administration, offspring, synoestrol, testes, Ki-67 marker

INTRODUCTION

Particular attention in the scientific industry is paid to hormonal balance and the issue of prenatal effects of hormones and their analogues on humans and animals. Gestation causes a physiological increase in hormones, the action of which affects not only the mother's body, but also entails changes in the functional development of the fetus. The high concentration of hormones and their derivatives in maternal blood does not depend on the gender of the developing fetus [3].

In offspring, under the pathogenic effect of substances of various nature, compensatory capabilities are depleted, leading to irreparable decay of subcellular structures, dysfunction, dystrophic process and cell death [7]. Prenatal stress causes a complex of various morphological, neurochemical, endocrine and metabolic changes that manifest themselves in postna-

tal life [6]. Prenatal steroid estrogen load is accompanied by a parallel increase in significantly rejuvenated cases of mammary gland cancer, ovarian cancer, testicular cancer, prostate cancer and other steroid-dependent organs [12]. Testicular cancer has a peak incidence among men at the age ranging from 25 to 34. There is a hypothesis about the etiology of testicular cancer, which states that the risk of its development is largely or exclusively determined by the intrauterine period [13].

Solving the problem of male reproductive health and longevity is a vital task [8, 14]. The concept of the demographic policy of the Russian Federation for the period up to 2025 was approved by Presidential Decree No. 1351 dtd. October 9, 2007, which determined the strengthening of reproductive health and the institution of the family as priority areas of state policy [10].

In modern biology, it has become possible to label cells immunohistochemically (IHC) at different phases of the cell cycle. Much attention is paid to the study of molecular biological markers that characterize proliferation — the Ki-67 protein [8].

Modelling of pathological states in laboratory animals is an important branch of experimental medicine, since not only the validity of fundamental conclusions about the mechanisms of disease development, but also the results of preclinical trials of drugs depend on the quality and reproducibility of the model [9].

Currently, the number of existing models of the provocative action of substances with estrogen-like effects on the human body and animals is insignificant. The prenatal effect of drugs with estrogenic activity, as well as the study of the consequences of their use on offspring, is an urgent and insufficiently studied problem.

The objective of the study was to analyze the expression of the Ki-67 marker during prenatal exposure to various doses of the synthetic estrogen analog synoestrol on the offspring testes of outbred laboratory mice.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out from 2014 to 2020 at the Department of Histology of FSBEI HE “Bashkir State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation. The experiment was performed on the offspring of outbred laboratory mice, whose mothers on day 11 of gestation were once intramuscularly injected with experimental doses of the synthetic estrogen analogue synoestrol in the form of a 2 % oil solution. The obtained offspring was divided into groups of 5 animals each: the intact group — without exposure, the animals of the first experimental group were administered synoestrol at a dose of 25 µg/kg — S-25, the animals of the second experimental group were administered synoestrol at a dose of 40 µg/kg — S-40. Calculations of the efficacy of drug doses were made in accordance with the coefficients for recalculating doses of substances in µg/kg for mice [2, 4, 11].

The withdrawal of laboratory animals from the experiment was carried out in the diestrus phase on day 90. The estrous cycle in offspring was determined using vaginal swabs stained according to M. C. Cora [15]. The testes of the offspring of laboratory mice were subjected to the study, fixation and histological wiring were carried out according to the standard scheme. The structures of the offspring testes were counted under an immersion lens in a standard field of view of 90× [1].

The experimental part of the study was carried out in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes.

Immunohistochemical analysis was performed on sections from paraffin blocks of offspring testes intended for standard morphological studies. Paraffin sections were deparaffinized and rehydrated according to standard procedures. The markers of the proliferative activity of the Ki-67 protein were determined by the immunohistochemical method. We used an indirect streptavidin-biotin detection system Leica BOND (Novocastra™, Germany) for mice (Mouse Monoclonal Antibody Ki-67 Antigen. Clone MIB-1; dilution: 1:300; Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein. Clone N-19, dilution: 1:300), as recommended by the manufacturer Santa Cruz Biotechnology (USA). Histological sections 4 µm thick were stained with a Leica Microsystems Bond™ immunohistotainer (Germany). The evaluation of stained specimens was carried out using a Leica light microscope, in 10 fields of view of each specimen at a magnification of ×100, the average number of immunopositive cells with a positive reaction was counted. The average number of antigen-positive cells was calculated as the ratio with cells, in which these antigens were not detected (per 100 counted cells) [12].

The expression of antibodies was evaluated in the following cells of the offspring testes: spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa, Leydig cells.

Statistical processing was carried out using Statistica 7.0 program (StatSoft, USA). For each parameter, the arithmetic mean and its standard error ($M \pm SD$) were calculated. Significance of changes was assessed using the Kruskal — Wallis test; differences were determined at the achieved significance level $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The expression of the Ki-67 marker in the offspring testes of laboratory mice after prenatal single intramuscular administration of the synthetic drug synoestrol is presented in Table 1 and in Fig. 1—3.

As a result of the analysis of the expression of the Ki-67 marker in the experimental groups S-25 and S-40 of positively stained cells in spermatogonia, compared with the intact group, no significant differences were found. Comparative analysis of the intact group with the experimental groups S-25 and S-40 showed no differences in spermatocyte cells in the epithelium of the convoluted seminiferous tubule. The expression level of the Ki-67 marker in spermatid cells in the epithe-

lium of the convoluted seminiferous tubule in the experimental groups S-25 and S-40 increased by 11.3 % ($p \leq 0.05$) and 4.1 %, respectively, according to compared with the intact group. No significant differences were found in the experimental groups S-25 and S-40 of positively stained spermatozoa cells in the lumen

of the convoluted seminiferous tubule. The degree of expression of the Ki-67 protein decreased in the experimental groups S-25 and S-40 in Leydig cells in the connective tissue layers between the convoluted seminiferous tubules by 52.0 % ($p \leq 0.05$) and 48.0 % ($p \leq 0.05$), respectively.

Table 1

Number of Ki-67 immunopositive cells in the offspring testes of outbred laboratory mice after prenatal administration of the synthetic drug synoestrol

Indicators	Intact	S-25	S-40
Spermatogonian cells in the epithelium of the convoluted seminiferous tubule	27.6 ± 1.7	25.4 ± 1.8	29.4 ± 1.1
Spermatocyte cells in the epithelium of the convoluted seminiferous tubule	29.2 ± 1.3	29.6 ± 2.1	27.8 ± 1.5
Spermatid cells in the epithelium of the convoluted seminiferous tubule	24.8 ± 0.8	27.6 ± 1.1*	25.8 ± 0.8
Sperm cells in the lumen of the convoluted seminiferous tubule	121.7 ± 0.3	120.9 ± 0.1	119.3 ± 0.4
Leydig cells in the connective tissue stroma between the convoluted seminiferous tubules	5.0 ± 1.0	2.6 ± 0.5*	2.4 ± 0.5*

* In comparison with the intact group, there were differences with statistical significance $p \leq 0.05$

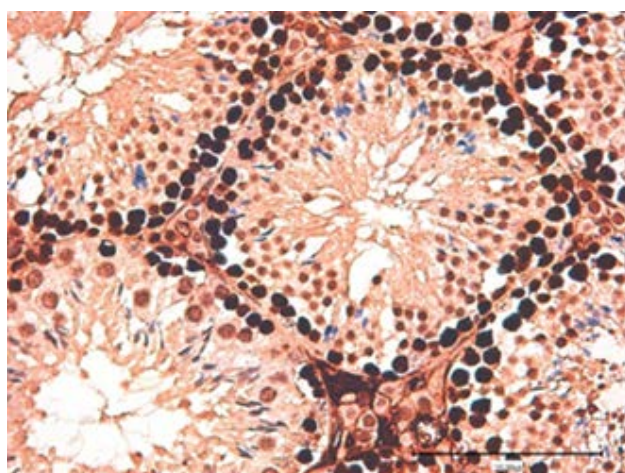


Fig. 1. Testis of the offspring of the intact group. IHC reaction to the Ki-67 marker. Nucleus staining with hematoxylin. ×100

Thus, as a result of the morphometric analysis of the IHC marker Ki-67, with the administration of the synthetic drug synoestrol at doses of 25 and 40 µg/kg, positively stained cells in spermatogonia, spermatocytes and spermatozoa, compared with the intact group, did not reveal any differences. There were changes to-

wards an increase in positively stained cells in spermatids by 11.3 % ($p \leq 0.05$) and 4.1 %, respectively, compared with the intact group. There was also a significant decrease in the number of positively stained Leydig cells by 52.0 % ($p \leq 0.05$) and 48.0 % ($p \leq 0.05$), respectively, compared with the intact group.

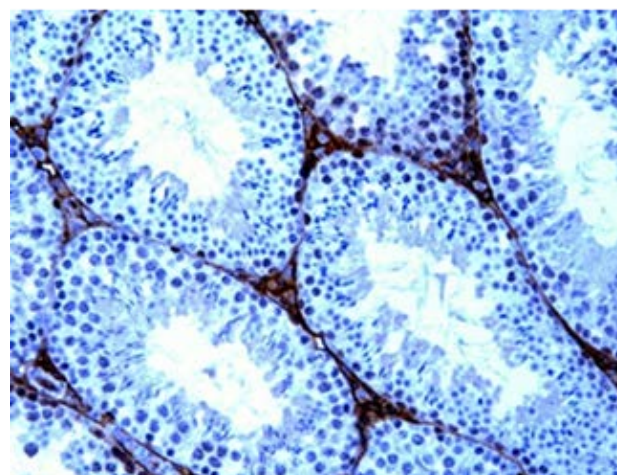


Fig. 2. Testis of the offspring of the experimental group S-25 µg/kg. IHC reaction to the Ki-67 marker. Nucleus staining with hematoxylin. ×100

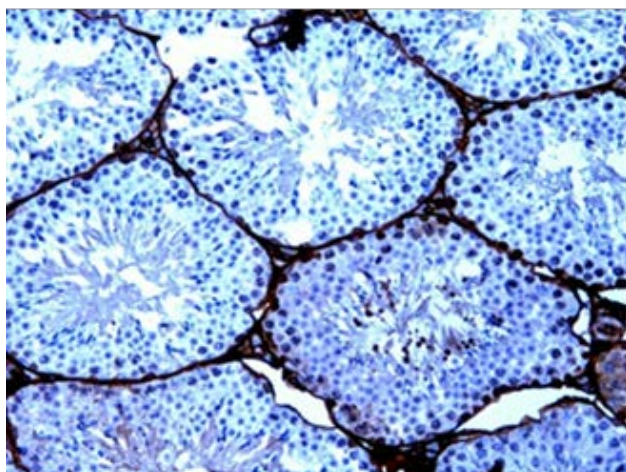


Fig. 3. Ki-67 protein expression in the offspring testes of the experimental group S-40. Immunohistochemical reaction with monoclonal antibody Ki-67. Nucleus staining with hematoxylin. $\times 100$

CONCLUSION

Thus, structural changes in the offspring testes of white outbred laboratory mice are determined by the administered dose of the synthetic estrogen analog synoestrol during the period of prenatal development of fetal organs. Limiting the dose-dependence of the administered drug in the prenatal period will allow avoid an adverse effect on the development and structural and functional organization of the offspring testes, as evidenced by the Ki-67 marker.

REFERENCES

1. *Avtandilov G. G.* Medical morphometry. Guidelines. // M.: Meditsina (Medicine) — 1990. — P. 384. ISBN5-225-00753-8
2. *Arzamastsev E. V., Guskova T. A., Berezovskaya I. V.* et al. Methodical guidelines for the study of the general toxic effect of pharmacological substances. — Ed. by *Khabriev R. U.* — M.: Meditsina (Medicine), 2005. — P. 41—54.
3. Human intrauterine development: guidelines for doctors / ed. by A. P. Milovanov, S. V. Savelyev. — Moscow: MVD, 2006. — 384 p.
4. *Guskova T. A.* Preclinical toxicological study of drugs as a guarantee of the safety of their clinical trials// *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Bulletin)*. — 2010. — No. 5 (104). — P. 2—6.
5. *Panchenko I. A., Brusnev A. B., Garmash O. N.* Reproductive male health service on the example of a regional specialized center / *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya (Experimental and clinical urology)*. — 2019. — No. 2. — P. 20—25. — DOI 10.29188/2222-8543-2019-11-2-20-24.
6. *Reznikov A. G., Pishak V. P., Nosenko N. D.*, Prenatal stress and neuroendocrine pathology / A. G. Reznikov, V. P. Pishak, N. D. Nosenko [et al.]; (under the general editorship of A. G. Reznikov, Corresponding Member of the National Academy of Sciences and the Academy of Medical Sciences of Ukraine). — Chernivtsi: Medakademiya, 2004. — 318 p.: ill., portr.; 24 cm. — Bibliography.
7. *Sizonenko M. L.* Role of chronic experimental lesions of the mother's hepatobiliary system of various genesis in the violation of the morphofunctional formation of the male reproductive system of the offspring: thesis ... Doc. of Med. Sciences: 03.03.04 / *Sizonenko Maksim Leonidovich*. — Chelyabinsk, 2015. — 313 p.
8. *Stepanova E. V., Baryshnikov A. Yu., Nikogossyan S. O., Kuznetsov V. V., Karapetyan V. L.* Molecular biological factors in the prognosis of early-stage ovarian cancer. *Bulletin of RONTs named after N. N. Blokhin of the RAMS*. 2011; 22(1): 37—41. EDN: OOUFLZ
9. *Tishevskaya N. V., Maksakov D. A., Golovneva E. S.* Morphological features of the sulphiride model of benign prostatic hyperplasia in rats. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya (Experimental and Clinical Urology)*. — 2017. — No. 2. — P. 16—19.
10. Presidential Decree dtd. October 9, 2007 No. 1351 “On approval of the Concept of the demographic policy of the Russian Federation for the period up to 2025” (with amendments and additions). URL: <http://ivo.garant.ru/#/document/191961/paragraph/1:0>
11. *Khabriev R. U.* Guidelines for the experimental study of new pharmacological substances. — M.: JSC “Publishing House “Medicine”, 2005. — P. 49—51.
12. *Sharafutdinova L. A.* Morphofunctional changes in the nervous, immune and reproductive systems under the effect of nanosized titanium dioxide in the form of rutile: thesis ... Doc. of Biol. Sciences: 03.03.04 / *Sharafutdinova Lyutsiya Akhtyamovna*. — Kazan, 2019. — 258 p.
13. A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer-experiences of the son / M. B. Cook, O. Akre, D. Forman [et al.] // *Int. J. Epidemiol.* — 2010. — Vol. 39, No. 6. — P. 1605—18.
14. *Bhartiya D, Kaushik A.* Testicular Stem Cell Dysfunction Due to Environmental Insults Could Be Responsible for Deteriorating Reproductive Health of Men. *Reprod Sci*. 2021 Mar;28(3):649—658. doi: 10.1007/s43032—020—00411—3.
15. *Cora M. C., Kooistra L., Travlos G.* Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears // *Toxicologic Pathology*. — 2015. — No. 43(6). — P. 776—793

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. N. Kvochko — Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Physiology, Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, FSBEI HE “SSAU”;

R. T. Sulaymanova — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Biomedical Disciplines, “REAVIZ” University.

The article was submitted 08.02.2023

Научная статья

УДК 636.5.082.474

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.107

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЦИТРАТА ЦИНКА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ У МОЛОДНЯКА КУР В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Татьяна Олеговна Азарнова*, Артем Станиславович Давлетов*✉,
Июсса Сергеевна Луговая**, Елена Александровна Золотухина***,
Дмитрий Вадимович Аншаков***

*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии —
МВА имени К. И. Скрябина, Москва, Россия, artemdavletov8@gmail.com✉

**Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов, Москва, Россия.

***Селекционно-генетический центр «Загорское экспериментальное племенное
хозяйство» — филиал Всероссийского научно-исследовательского и технологического
института птицеводства Российской академии наук, Сергиев Посад, Россия

Аннотация: Актуальность поиска наиболее перспективных способов гармонизации гомеостаза, через оптимизацию гематологического профиля организма птицы, как залога повышения результативности инкубации не вызывает сомнений. Высокую эффективность в этом отношении показали трансвариальные обработки инкубационных яиц различными биостимуляторами-антиоксидантами. Детальное изучение их свойств и механизмов действия с выявлением тех веществ, которые позволят получить наилучший результат — важная задача птицеводства. В этой связи коллективом авторов была поставлена цель: оценить влияние антиоксиданта — цитрата цинка на гематологический профиль у молодняка суточного возраста. Эксперимент был проведен на базе Селекционно-генетического центра Загорское Экспериментальное Племенное Хозяйство Всероссийского Научно-исследовательского и Технологического Института Птицеводства на курах кросса «Смена-9». Результаты проведенных исследований показали, что цитрат цинка в оптимальной концентрации вследствие участия в синтезе гема, повышения активности ряда ферментов (таких как карбоангидраза и альдолаза), а также оптимизации энергетических процессов за счет цитрата способствуют гармонизации гематологического профиля организма, создавая условия для стабилизации гомеостаза. Заявленное определило повышение эмбриональной жизнеспособности (выводимость яиц и вывод цыплят повысились на 4,42 % и на 3,59 %, соответственно) и качества молодняка суточного возраста (балльная оценка по шкалам ПАСГАР и ОПТИСТАРТ в опытной группе превосходила контроль на 2,4 и 2,2 балла, соответственно). Исходя из этого, коллектив авторов считает цитрат цинка перспективным биостимулятором эмбриогенеза кур.

Ключевые слова: гематологический фон, эмбриогенез, эмбрионы, антиоксидант, цитрат цинка, выводимость

Гематологический профиль во многом определяет состояние гомеостаза в организме, как животных, так и человека. Стабилизировать это состояние — важная задача ветеринарии и медицины. Это позволит организму реализовывать свои функции качественно и более полно. Не вызывает сомнений, что особую значимость стабилизация гомеостаза приобретает для эмбрионов, как наиболее уязвимых внешним воздействиям систем [1]. Как известно, качество и интенсивность развития

зародыша определяют его существование в дальнейшем онтогенезе, а вместе с тем степень реализации хозяйственно-полезных признаков.

Как было указано ранее, гематологический профиль определяет условия для стабилизации гомеостаза через ряд параметров. Так, только от адекватного синтеза и структуры гемоглобина зависит реализация функций поддержания рН, коллоидной защиты, газотранспортная, терморегуляции, иммунная и ряд других [9].

© Азарнова Т. О., Давлетов А. С., Луговая И. С., Золотухина Е. А., Аншаков Д. В., 2023

В этой связи, очевидно, что использование биостимуляторов, способных оптимизировать гематологический фон, а вместе с тем стабилизировать гомеостаз является перспективным направлением медицины, ветеринарии и производства животноводческой продукции.

Многими авторами доказано, что эмбрион птиц наиболее подвержен дестабилизации гомеостаза вследствие того, что яйцо после снесения от организма курицы существует независимо и поступление необходимых веществ в последствии в него невозможно.

В литературе описано много различных биостимуляторов эмбриогенеза, оказывающих благоприятное влияние на гематологические показатели с/х птицы, однако поиск наиболее перспективных и эффективных остается открытым.

Мотивацией к выбору цитрата цинка для использования в эмбриогенезе с/х птицы служило следующее. Как известно, заявленный металл необходим для форменных элементов крови, в частности, эритроцитов, что в первую очередь актуально для снабжения тканей кислородом, а вместе с тем, функционирования митохондриальной дыхательной цепи, как важнейшего процесса, определяющего синтез энергии [17]. Этот аспект также важен для профилактики задержки физиологически обусловленных гипоксических явлений, сопровождающих инкубацию в начале, когда еще не сформирован аллантаоис эмбриона и в конце- перед наклевом цыпленка.

Наряду с этим, заявленный металл входит в состав более 200 ферментов [14]. Так, например, цинк представлен в составе металлоферментов, в частности — карбоновых ангидраз [15]. Эти ферменты взаимопревращают угольную кислоту и углекислый газ: $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{CO}_2 \uparrow + \text{H}_2\text{O}$. Угольная кислота является ключевым компонентом бикарбонатного буфера, участвующем в поддержании pH крови в оптимальном диапазоне (для птиц 7,36—7,4) [18]. Также заявленный элемент входит в структуру альдолазы, катализирующей превращение фруктозо-1,6-дифосфата в дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат в процессе гликолиза, обеспечивая осуществление важнейшего процесса углеводно-энергетического обмена.

В свою очередь, лимонная кислота является интермедиатом цикла Кребса. Также цитрат способен аллостерически регулировать ацетил-КоА-карбоксилазу [19]. Этот фермент необходим для биосинтеза жирных кислот, так как катализирует реакцию синтеза малонил-КоА.

Рядом авторов было подтверждено позитивное влияние заявленного биостимулятора на с/х птицу в постэмбриогенезе. Так, добавление цитрата цинка, в качестве добавки к комбикорму птиц было осуществлено Манукьяном А. В. (2008) [11]. При этом были получены следующие результаты: увеличение среднесуточных приростов цыплят бройлеров составило — 12,4 %, снижение затрат корма на 1 кг прироста живой массы — 12,2 %. В свою очередь, Кочеткова Н. А. (2009) использовала в рационе цыплят-бройлеров различные хелатные комплексы цинка, что обусловило повышение сохранности птицы на 2—6 % [7]. Следует отметить, что данные о трансвариальном введении предложенной соли в научной литературе обнаружены не были.

Совокупность описанных свойств, как цинка, так и цитрата, а также исследовательские работы предшественников, осуществленные в постэмбриогенезе, несомненно, представляют интерес в разрезе оптимизации гематологического профиля и стабилизации гомеостаза, а вместе с тем, повышения интенсивности роста, качества и жизнеспособности особи.

В этой связи **цель работы:** оценить влияние цитрата цинка на гематологический профиль у молодняка кур в раннем онтогенезе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперимент был проведен на базе Селекционно-генетического центра Загорское экспериментальное племенное хозяйство Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства. При этом были сформированы 1 контрольная и 4 опытные партии по 252 яйца в каждой. Последние были подобраны от одного родительского стада кросса «Смена 9» по принципу аналогов с учетом: времени снесения, сроков хранения, массы. Опытные группы орошали растворами биостимулятора в концентрациях, допустимых для предынкубационной обработки [5]. Контрольную партию обработке не подвергли. В данной статье будут представлены результаты исследования лучшей по совокупности полученных биологических эффектов (качеству и жизнеспособности) и контрольной групп.

В ходе исследований был изучен широкий спектр различных показателей, в частности зоотехнических (биоконтроль инкубации) в соответствии с руководством Дядичкиной Л. Ф. [3], критерии ПАСГАР и ОПТИСТАРТ с использованием пособия Епимаховой Е. Э. [4].

У бройлеров лучшей опытной группы и контроля была взята кровь путем декапитации, при этом коллектив руководствовался принципами гуманности в соответствии с международной конвенцией «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 1986 года.

На основе проведенных гематологических исследований, были рассчитаны лейкоцитарные индексы, а именно: Кребса, лейкоцитарный интоксикации (ЛИИ), лимфоцитарно-грануло-цитарный (ИЛГ), кровно клеточный показатель (ККП) и ядерный Даштаянца [10].

Полученный в ходе эксперимента материал подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента с помощью программ Microsoft Excel. Результат считался достоверным при $p \leq 0.05$ ($* \leq 0.05$; $** \leq 0.01$)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ гематологических показателей указывает на тот факт, что биостимулятор оказывал позитивное воздействие на гематологический профиль организма молодняка суточного возраста, обуславливая стабилизацию гомеостаза (табл. 1).

Таблица 1

Показатели гематологического профиля крови цыплят суточного возраста ($n = 5$).

Показатели	Группы	
	Контрольная	Опытная
Гематокрит, %	24,42 ± 2,57	25,96 ± 3,01
Гемоглобин, г/л	98 ± 5	131 ± 8**
Эритроциты, 10 ¹² /л	4,5 ± 0,11	7,4 ± 0,15
МСН, пг	58,4 ± 1,12	65,2 ± 1,4
МСНС, %	44,6 ± 0,9	50,3 ± 1,5
MCV, мкм ³	13,1 ± 0,8	12,9 ± 0,55
RDW, %	14,5 ± 0,35	11,4 ± 0,2
Лейкоциты (WBC), 10 ⁹ /л	6,8 ± 0,7	4,8 ± 0,4**
Псевдоэозинофилы, % от WBC	42 ± 2,0	33 ± 2,5
Эозинофилы, % от WBC	2 ± 0	2 ± 0
Моноциты, % от WBC	3 ± 0	4 ± 1
Лимфоциты, % от WBC	53 ± 3	61 ± 2
Тромбоциты, % от WBC	86 ± 4	56 ± 4

** $p < 0,01$ (здесь и далее)

МСН — среднее содержание гемоглобина в эритроците; МСНС — средняя концентрация гемоглобина в эритроците; MCV — средний объем эритроцитов; RDW — степень разброса эритроцитов по объему

Заявленное выразилось в повышении в опытной группе в пределах референтных значений количества эритроцитов в 1,6 раза, что по данным Кузнецова В. В. (2012) свидетельствует об усилении эритропоэза и возможности лучшего насыщения кислородом клеток организма, а вместе с тем о возможности более быстрого и масштабного пе-

рехода от анаэробного к более энергетически выгодным — аэробному гликолизу, β -окислению жирных кислот в ранний поствыводной период. Заявленное также свидетельствует о возможности более эффективной и своевременной реализации механизмов адаптации, необходимых для коррекции стрессовых воздействий, сопровождающих молод-

няк в первые сутки жизни, а вместе с тем о стабилизации гомеостаза [8]. В свою очередь увеличение концентрации гемоглобина на 33,6 % подтверждает вышеприведенные утверждения, при этом также связано с интенсификацией синтеза гема вследствие непосредственного участия составляющих обсуждаемого биостимулятора [14]. Следует отметить, что повышение среднего содержания гемоглобина в эритроците (МСН) на 11,6 % наряду с ростом средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) на 12,8 % свидетельствует не только о количественном, но и о качественном составе эритроцитов, что определяет эффективность реализации, прежде всего, транспортных функций крови.

Факт оптимизации гематологического профиля также демонстрируют зафиксированные нами численные значения индексов белой крови. В представленном эксперименте ЛИИ был ниже контроля на 10,9 %, что в соответствии с работами А. И. Леткина (2022) свидетельствует об уменьшении, по сравнению с контролем, напряженности адаптационных реакций, при этом снижение ККП на 32,9 % обусловлено по данным того же автора функциональной активностью нейтрофилов и уменьшением количества лимфоцитов, что является важным показателем инактивации стресс-реакции [10].

В свою очередь рассчитанный нами индекс Кребса, снизившийся у представителей опытной группы по отношению к контролю на 31,6 %, свидетельствует о повышении реализационных возможностей адаптационных реакций (табл. 2).

Зафиксированные параметры гематологического профиля у особей опытной группы, очевидно, были более физиологически оправданными, так как ее представители были более жизнеспособны практически на всех этапах эмбриогенеза. Так, процент средней эмбриональной смертности (6—16 день) в виде замерших был ниже, на 2,78 и 1,98 % соответственно по сравнению с контролем. Заявленное обусловило повышение вывода цыплят и выводимости яиц на 4,42 % и 3,59 % соответственно (табл. 3).

Повышение эмбриональной жизнеспособности сопровождалось повышением качества получаемого молодняка суточного возраста. Балльная оценка по шкалам ПАСГАР и ОПТИСТАРТ в опытной группе превосходила контроль на 2,4 и на 2,2 соответственно. Наибольшие различия между опытом и контролем фиксировали по критериям: «рефлекс поведения» (0,8) (табл. 4), «плюсны пальцев» (0,8) (табл. 5), тогда как «клюв» и «мышечный тонус шеи» превосходили последний равнозначно на 0,6 соответственно.

Таблица 2

Лейкоцитарные индексы крови у цыплят-бройлеров

Группы птиц	Лейкоцитарные индексы				
	Индекс Кребса	ЛИИ	ИЛГ	ККП	ЯИ Даштаянца
Контроль	0,79	1,38	1,21	0,79	0,06
Опытная	0,54	1,23	1,56	0,53	0,12

Таблица 3

Биологический контроль инкубации ($M \pm m, n = 252$)

Партия	Неоплодотворенные яйца	Тумаки	Кровяные кольца	Замершие 1 периода	Замершие 2 периода	Задохлики	Слабые	Выводимость яиц		Вывод цыплят	
Контроль	2,78 ± 1,04	0	0	5,95 ± 1,49	3,57 ± 1,17	1,59 ± 0,79	0,40 ± 0,40	88,05 ± 2,07		85,71 ± 2,21	
Опытная	3,17 ± 1,10	0	0	3,17 ± 1,10	1,59 ± 0,79	1,98 ± 0,88	0,79 ± 0,56	92,47 ± 1,65**	4,42	89,3 ± 1,92**	3,59

Таблица 4

Качество цыплят суточного возраста по шкале ПАСГАР, баллы ($M \pm m$, $n = 10$)

	Рефлекс поведения	Пупочное кольцо	Плюсны пальцев	Клюв	Живот	Совокупный балл
Контроль	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1 ± 0	1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	6,6 ± 0,3
Опытная	2 ± 0**	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1*	9,0 ± 0,2

Таблица 5

Качество цыплят суточного возраста по шкале ОПТИСТАРТ, баллы ($M \pm m$, $n = 10$)

	Мышечный тонус шеи	Рефлекс поведения	Пупочное кольцо	Клюв	Живот	Совокупный балл
Контроль	1,2 ± 0,29	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	6,8 ± 0,2
Опытная	1,8 ± 0,2	2 ± 0**	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1*	9,0 ± 0,1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитрат цинка в оптимальной концентрации стимулирует эритропоэз, оптимизируя соотношение форменных элементов крови, определяя условия для стабилизации гомеостаза у особей опытной группы. Заявленное создает условия для более качественного развития эмбриона и более высокой его жизнеспособности.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Аршавский И. А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития / И. А. Аршавский. // М. — 1982. — С. 270.
2. Бородай В. П. Пути повышения качества инкубационных яиц мясной птицы / В. П. Бородай, А. А. Задорожный. // Новости науки Казахстана. — 2014. — № 4(122). — С. 82—91.
3. Дядичкина Л. Ф. Руководство по биологическому контролю при инкубации яиц сельскохозяйственной птицы: Метод, рекомендации / Л. Ф. Дядичкина, Н. С. Позднякова // Сергиев Посад, 2001. — С. 79.
4. Епимахова Е. Э., Морозов В. Ю., Селионова М. И. Воспроизводство сельскохозяйственной птицы // Ставрополь — 2015.
5. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И. П. Кондрахин. // М. — 2004. — С. 48—65.
6. Кочеткова Н. А. Биохимический статус бройлеров при использовании в их рационе комплексов железа, марганца и цинка с яблочной и лимонной кислотой / Н. А. Кочеткова, А. А. Шапошников // Современные научные исследования: теория и практика. — 2017. — С. 29—33.
7. Кочеткова Н. А. Влияние цитратов металлов на биохимические показатели тканей и органов цыплят-

бройлеров и качество получаемой продукции: автореферат дис. канд. биол. наук. — Белгород. — 2009. — 19 с.

8. Кузнецов В. В. Влияние препарата ЯП-4 на естественную и иммунологическую реактивность организма кроликов / В. В. Кузнецов, Е. А. Кузнецова, С. Д. Назаров // Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана. — 2012. — № 4.
9. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина. — 1968. — 324.
10. Леткин А. И. Лейкоцитарные индексы крови кур-несушек при неспецифическом стрессорном синдроме / А. И. Леткин // Вестник АГАУ. — 2020. — № 2 (184).
11. Манукян А. В. Применение органических форм марганца и цинка в комбикормах для цыплят бройлеров: автореферат дис. канд. с. — х наук. — Сергиев Посад. — 2008. — 25 с.
12. Найденский М. С. Экологически безопасные методы повышения вывода кондиционных цыплят / М. С. Найденский, В. В. Нестеров, Н. Ю. Лазарева // БИО. — 2007. — С. 23—24.
13. Станишевская О. И. Значение кислородной обеспеченности эмбрионов кур для реализации генетического потенциала мясных качеств / Сб. матер. Междунар. науч. практич. конф., посв. 150-летию со дня рождения проф. П. Н. Кулешова // 26—29 окт. 2004 г. — М — 2006.
14. Ткаченко А. В. Элемент здоровья — цинк и его определение в различных компонентах / А. В. Ткаченко, Д. В. Маковкина, О. М. Дробышева // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. — 2017. — Т. 19. — № 10. — С. 264—266.
15. Торшин И. Ю. Иерархия взаимодействий цинка и железа: физиологические, молекулярные и клинические аспекты / И. Ю. Торшин, О. А. Громова, Т. Р. Гри-

шина, К. В. Рудаков // Трудный пациент. — 2010. — Т. 8. — № 3. — С. 45—53.

16. Трошин А. А. Влияние новых комбинаций препаратов янтарной кислоты на эмбриогенез/ А. А. Трошин, А. В. Левченко//Ветеринария Кубани — 2016 — № 6.

17. Гармаза Ю. М. Клеточный гомеостаз цинка и развитие метаболических нарушений у кардиологических пациентов/ Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, Е. А. Медведева, Л. Г. Гелис, Е. И. Слобожанина// Биохимические инновации в условиях коррекции техногенеза биосферы: Труды Международного биогеохимиче-

ского Симпозиума, посвященного 125-летию со дня рождения академика А. П. Виноградова и 90-летию образования Приднестровского университета. В 2-х томах, Тирасполь, 05—07 ноября 2020 года. — 2020. — С. 271—275.

18. Полозюк О. Н. Гематология: учебное пособие / О. Н. Полозюк, Т. М. Ушакова // Донской ГАУ. — Персиановский: Донской ГАУ, 2019. — 159 с.

19. Martin D. B. The mechanism of tricarboxylic acid cycle regulation of fatty acid synthesis / D. B. Martin, P. R. Vagelos // The Journal of biological chemistry. — 1962. — № 237.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Т. А. Азарнова — доктор биологических наук, профессор кафедры химии имени проф. С. И. Афонского и А. Г. Малахова;

А. С. Давлетов — студент;

И. С. Луговая — кандидат биологических наук, главный специалист ФГБУ ВГНКИ;

Е. А. Золотухина — заместитель директора ФГБНУ ФНЦ «ВНИТИП» РАН;

Д. В. Аншаков — кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий ФГБНУ ФНЦ «ВНИТИП» РАН.

Статья поступила в редакцию 13.02.2023 г.

Original article
UDC 636.5.082.474

EVALUATION OF THE EFFECT OF ZINC CITRATE ON THE HEMATOLOGICAL PROFILE OF YOUNG HENS IN EARLY ONTOGENESIS

Tatyana Olegovna Azarnova*, Artem Stanislavovich Davletov*✉, Inessa Sergeevna Lugovaya**,
Elena Aleksandrovna Zolotukhina***, Dmitriy Vadimovich Anshakov***

*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Skryabin,
Moscow, Russia, e-mail: artemdavletov8@gmail.com✉

**The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russia.

***Breeding and Genetic Center “Zagorsk Experimental Breeding Farm” —
Branch of the All-Russian Poultry Research and Technological Institute of Poultry
Farming of the Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Russia

Abstract. The relevance of the search for the most promising ways to harmonize homeostasis, through the optimization of the hematological profile of the poultry's body, as a guarantee of increasing the efficacy of incubation, is beyond doubt. High efficacy in this regard was shown by transovarial treatments of hatching eggs with various biostimulants-antioxidants. A detailed study of their properties and mechanisms of action with the identification of those substances that will allow to get the best result is an important task for poultry farming. In this regard, a team of authors set an objective to evaluate the effect of the antioxidant (zinc citrate) on the hematological profile in young poultry at the age of one day. The experiment was carried out on the basis of the Breeding and Genetic Center “Zagorsk Experimental Breeding Farm” — the All-Russian Poultry Research and Technological Institute of Poultry Farming” on hens of the cross Smena-9. The results of the studies showed that zinc citrate at the optimal concentration for participation in the synthesis of heme, increased activity of a number of enzymes (such as carbonic anhydrase and aldolase), as well as optimization of energy processes, due to citrate contribute to the harmonization of the hematological profile of the body, creating conditions for homeostasis stabilization. The claimed determined the increase in embryonic viability (hatchability of eggs and hatching of chickens increased by 4.42 % and 3.59 %, respectively) and the quality of young poultry at the age of one day (points according the PASGAR and OPTISTART scales in the experimental group exceeded the control by 2.4 and 2.2 points, respectively). Based on this, the team of authors considers zinc citrate to be a promising biostimulator of hen embryogenesis.

Keywords: hematological background, embryogenesis, embryos, antioxidant, zinc citrate, hatchability

The hematological profile largely determines the state of homeostasis in the body, both animals and humans. Stabilizing this state is an important task of veterinary and medical science. This will allow the body to implement its functions qualitatively and more fully. There is no doubt that the stabilization of homeostasis acquires special significance for embryos, as systems most vulnerable to external influences [1]. As it is known, the quality and intensity of the embryo development determine its existence in further ontogenesis, and at the same time the degree of realization of economically useful traits.

As stated earlier, the hematological profile determines the conditions for stabilizing homeostasis

through a number of parameters. Thus, the implementation of the functions of maintaining pH, colloidal protection, gas transport, thermoregulation, immune and a number of others depends only on adequate synthesis and structure of hemoglobin [9]. In this regard, it is obvious that the use of biostimulants capable of optimizing the hematological background, and at the same time stabilizing homeostasis, is a promising direction in medicine, veterinary medicine and animal products.

Many authors have proved that the poultry embryo is most susceptible to destabilization of homeostasis due to the fact that the egg, after being laid, exists independently from the body of the hen, and subsequently it is impossible to add the necessary substances into it.

The literature describes many different biostimulants of embryogenesis that have a beneficial effect on the hematological indicators of poultry, but the search for the most promising and effective remains.

The motivation for choosing zinc citrate for use in poultry embryogenesis was the following. As you know, the claimed metal is necessary for blood cells, in particular, erythrocytes, which is primarily important for supplying tissues with oxygen, and at the same time, the functioning of the mitochondrial respiratory chain, as the most important process that determines energy synthesis [17]. This aspect is also important for preventing the delay of physiologically caused hypoxic phenomena accompanying incubation at the beginning, when the allantois of the embryo has not yet been formed, and at the end, before the chicken is pipping.

Along with this, the claimed metal is a part of more than 200 enzymes [14]. For example, zinc is present in the composition of metalloenzymes, in particular, carboxylic anhydrases [15]. These enzymes interconvert carbonic acid and carbon dioxide: $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{CO}_2 \uparrow + \text{H}_2\text{O}$. Carbonic acid is a key component of the bicarbonate buffer involved in maintaining blood pH in the optimal range (7.36—7.4 for poultry) [18]. The claimed element is also included in the structure of aldolase, which catalyzes the conversion of fructose-1,6-diphosphate into dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate during glycolysis, ensuring the implementation of the most important process of carbohydrate-energy metabolism.

In turn, citric acid is an intermediate of the Krebs cycle. Citrate is also able to allosterically regulate acetyl-CoA carboxylase [19]. This enzyme is necessary for the biosynthesis of fatty acids, as it catalyzes the malonyl-CoA synthesis reaction.

A number of authors confirmed the positive effect of the claimed biostimulator on poultry in postembryogenesis. So, the addition of zinc citrate, as an additive to the feed of poultry, was carried out by Manukyan A. V. (2008) [11]. At the same time, the following results were obtained: an increase in the average daily weight gain of broiler chickens was 12.4 %, a decrease in feed costs per 1 kg of live weight gain was 12.2 %. In turn, Kochetkova N. A. (2009) used various zinc chelate complexes in the diet of broiler chickens that led to an increase in the poultry's livability by 2—6 % [7]. It should be noted that the data on the transovarial administration of the proposed salt were not found in the scientific literature.

The combination of the described properties of both zinc and citrate, as well as the research work of predecessors carried out in postembryogenesis, is un-

doubtedly of interest in terms of optimizing the hematological profile and stabilizing homeostasis, and at the same time, increasing the intensity of growth, quality and viability of the individual.

In this regard, **the objective of the work** is to evaluate the effect of zinc citrate on the hematological profile in young chickens in early ontogenesis.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out on the basis of the Breeding and Genetic Center “Zagorsk Experimental Breeding Farm” — the All-Russian Poultry Research and Technological Institute of Poultry Farming”. At the same time, 1 control and 4 experimental batches of 252 eggs each were formed. The latter were selected from one parental flock of the cross Smena 9 according to the principle of analogues, taking into account the time of laying, storage periods, weight. The experimental groups were irrigated with biostimulant solutions at concentrations acceptable for pre-incubation treatment [5]. The control batch was not processed. This article will present the results of a study of the best in terms of the totality of biological effects obtained (quality and viability) and control groups.

In the course of the research, a wide range of various indicators was studied, in particular, zootechnical ones (biocontrol of incubation) in accordance with the guidance of Dyadichkina L. F. [3], PASGAR and OPTISTART criteria using E. E. Epimakhova's manual. [4].

Blood was taken from broilers of the best experimental group and control one by decapitation, and the team was guided by the principles of humanity in accordance with the international convention On the Protection of Vertebrate Animals used for Experiments or for other Scientific Purposes dtd.1986.

Based on the conducted hematological studies, leucocyte indices were calculated: the Krebs index, leucocyte intoxication index (LII), lymphocytic-granulocytic index (LGI), blood cell index (BCI) and the Dashtayants nuclear [10].

The material obtained during the experiment was subjected to statistical processing using Student's criterion using Microsoft Excel programs. The result was considered significant at $p \leq 0.05$ (* ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01)

STUDY RESULTS

The analysis of hematological indicators indicates the fact that the biostimulator had a positive effect on the hematological profile of the organism of young poultry at the age of one day, causing the stabilization of homeostasis (Table 1).

Table 1

Hematological blood profile indicators of day-old chickens (n = 5)

Indicators	Groups	
	Control	Experimental
Hematocrit, %	24.42 ± 2.57	25.96 ± 3.01
Hemoglobin, g/L	98 ± 5	131 ± 8**
Erythrocytes, 10 ¹² /L	4.5 ± 0.11	7.4 ± 0.15
MCH, pg	58.4 ± 1.12	65.2 ± 1.4
MCHC, %	44.6 ± 0.9	50.3 ± 1.5
MCV, μm ³	13.1 ± 0.8	12.9 ± 0.55
RDW, %	14.5 ± 0.35	11.4 ± 0.2
Leukocytes (WBC), 10 ⁹ /L	6.8 ± 0.7	4.8 ± 0.4**
Pseudo-eosinophils, % of WBC	42 ± 2.0	33 ± 2.5
Eosinophils, % of WBC	2 ± 0	2 ± 0
Monocytes, % of WBC	3 ± 0	4 ± 1
Lymphocytes, % of WBC	53 ± 3	61 ± 2
Platelets, % of WBC	86 ± 4	56 ± 4

** $p < 0.01$ (hereinafter)

MCH — mean cell hemoglobin; MCHC — mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV — mean erythrocyte volume; RDW — red blood cell (erythrocyte) distribution width

The declared resulted in an increase in the experimental group within the reference values of the number of erythrocytes by 1.6 times, which according to Kuznetsov V. V. (2012) indicates an increase in erythropoiesis and the possibility of better oxygenation of the body cells, and at the same time, the possibility of a faster and more extensive transition from anaerobic to more energetically beneficial — aerobic glycolysis, β -oxidation of fatty acids in early post-release period. The stated also indicates the possibility of a more effective and timely implementation of the adaptation mechanisms necessary to correct the stressful effects that accompany young poultry in the first day of life, and at the same time to stabilize homeostasis [8]. In turn, an increase in hemoglobin concentration by 33.6 % confirms the above statements, while it is also associated with the intensification of heme synthesis due to the direct participation of the components of the discussed biostimulator [14]. It should be noted that an increase in the mean cell hemoglobin (MCH) by 11.6 %, along with an increase in the mean corpuscular hemoglobin

concentration (MCHC) by 12.8 %, indicates not only the quantitative, but also the qualitative composition of erythrocytes that determines the effective realization of blood transport functions.

The fact of optimizing the hematological profile is also demonstrated by the numerical values of white blood indices recorded by us. In the presented experiment, the LII was lower by 10.9 % than the control, which in accordance with the works of A. I. Letkin (2022) indicates a decrease, compared to the control, in the intensity of adaptive reactions, while the decrease in the BCI by 32.9 % according to the same author is determined by the functional activity of neutrophils and a decrease in the number of lymphocytes, which is an important indicator of the stress response inactivation [10].

In turn, the Krebs index calculated by us, which decreased by 31.6 % in the representatives of the experimental group in relation to the control, indicates an increase in the implementation possibilities of adaptive reactions (Table 2).

Table 2

Leukocyte blood indicators in broiler chickens

Group of poultry	Leukocyte indices				
	Krebs index	LII	LGI	BCI	Dashtayants nuclear
Control	0.79	1.38	1.21	0.79	0.06
Experimental	0.54	1.23	1.56	0.53	0.12

The recorded parameters of the hematological profile in the individuals of the experimental group were obviously more physiologically justified, since its representatives were more viable at almost all stages of embryogenesis. Thus, the percentage of average embryonic mortality (6—16 days) in the form of dead-in-shell was lower by 2.78 and 1.98 %, respectively, compared to the control. The declared led to an increase in the hatching of chickens and the hatchability of eggs by 4.42 % and 3.59 % respectively (Table 3).

An increase in embryonic viability was accompanied by an increase in the quality of the resulting day-old young poultry. The points according to the PASGAR and OPTISTART scales in the experimental group exceeded the control by 2.4 and 2.2, respectively. The greatest differences between the experiment and the control were recorded according to the criteria: “behavior reflex” (0.8) (Table 4), “metatarsal pad” (0.8) (Table 5), while “beak” and “neck muscle tone” exceeded the latter by 0.6 respectively.

Table 3

Biological control of incubation (M ± m, n = 252)

Batch	Unfertilized eggs	Black rot	Blood rings	Dead-in-shell of period 1	Dead-in-shell of period 2	Dead-in-shell	Weak	Hatchability of eggs		Hatching of chickens	
Control	2.78 ± 1.04	0	0	5.95 ± 1.49	3.57 ± 1.17	1.59 ± 0.79	0.40 ± 0.40	88.05 ± 2.07		85.71 ± 2.21	
Experimental	3.17 ± 1.10	0	0	3.17 ± 1.10	1.59 ± 0.79	1.98 ± 0.88	0.79 ± 0.56	92.47 ± 1.65**	4.42	89.3 ± 1.92**	3.59

Table 4

Quality of day-old chickens according to the PASGAR scale, points (M ± m, n = 10)

	Behavior reflex	Umbilical ring	Metatarsal pad	Beak	Abdomen	Total points
Control	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1 ± 0	1 ± 0.1	1.8 ± 0.2	6.6 ± 0.3
Experimental	2 ± 0**	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.1*	9.0 ± 0.2

Table 5

Quality of day-old chickens according to the OPTISTART scale, points (M ± m, n = 10)

	Neck muscle tone	Behavior Reflex	Umbilical Ring	Beak	Abdomen	Total points
Control	1.2 ± 0.29	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1 ± 0.1	1.8 ± 0.2	6.8 ± 0.2
Experimental	1.8 ± 0.2	2 ± 0**	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.1*	9.0 ± 0.1

CONCLUSION

Zinc citrate in the optimal concentration stimulates erythropoiesis, optimizing the ratio of blood cells, determining the conditions for stabilizing homeostasis in individuals of the experimental group. The claimed creates conditions for better embryo development and its higher viability.

REFERENCES

1. *Arshavskiy, I. A.* Physiological mechanisms and patterns of individual development / I. A. Arshavskiy. // M. — 1982. — P. 270.
2. *Boroday V. P.* Ways to improve the quality of meat poultry's hatching eggs / V. P. Boroday, A. A. Zadorozhnyy. // *Novosti nauki Kazakhstana (Science News of Kazakhstan)*. — 2014. — No. 4 (122). — P. 82—91.
3. *Dyadichkina L. F.* Guidelines for biological control during the incubation of poultry eggs: Method, recommendations / L. F. Dyadichkina, N. S. Pozdnyakov // *Sergiev Posad*, 2001. — P. 79.
4. *Epimakhova E. E., Morozov V. Yu., Selionova M. I.* Reproduction of poultry // *Stavropol* — 2015.
5. *Kondrakhin I. P.* Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics / I. P. Kondrakhin. // M. — 2004. — P. 48—65.
6. *Kochetkova N. A.* Biochemical status of broilers when using iron, manganese and zinc complexes with malic and citric acid in their diet / N. A. Kochetkova, A. A. Shaposhnikov // *Modern scientific research: theory and practice*. — 2017. — P. 29—33.
7. *Kochetkova N. A.* Effect of metal citrates on the biochemical indicators of tissues and organs of broiler chickens and the quality of the products obtained: Abstract of a thesis. *Cand. of Biol. Sciences*. — Belgorod. — 2009. — 19 p.
8. *Kuznetsov V. V.* Effect of the drug YaP-4 on the natural and immunological reactivity of the organism of rabbits / V. V. Kuznetsov, E. A. Kuznetsova, S. D. Nazarov // *Uchenye zapiski KGAVM im. N. E. Bauman (Transactions of KSAVM named after N. E. Bauman)*. — 2012. — No. 4.
9. *Kushakovskiy M. S.* Clinical forms of hemoglobin damage. — 1968. — 324.
10. *Letkin A. I.* Leukocyte blood indices of laying hens with nonspecific stress syndrome / A. I. Letkin // *Vestnik AGAU (Bulletin of ASAU)*. — 2020. — No. 2 (184).
11. *Manukyan A. V.* Use of organic forms of manganese and zinc in compound feed for broiler chickens: Abstract of a thesis. *Cand. of Agricultural sciences*. — *Sergiev Posad*. — 2008. — 25 p.
12. *Naydenskiy M. S.* Ecologically safe methods of increasing the output of conditioned chickens / M. S. Naydenskiy, V. V. Nesterov, N. Yu. Lazareva // *BIO*. — 2007. — P. 23—24.
13. *Stanishevskaya O. I.* Value of oxygen supply of chicken embryos for the realization of the genetic potential of meat qualities / *Collection of materials of International scientific and practical conf., dedicated to the 150th anniversary since the birth of prof. P. N. Kuleshov* // October 26—29. 2004-M — 2006.
14. *Tkachenko A. V.* Element of health — zinc and its detection in various components / A. V. Tkachenko, D. V. Makovkina, O. M. Drobysheva // *Zhurnal nauchnykh statey Zdorovye i obrazovanie v XXI veke (Journal of scientific articles Health and Education in the XXI Century)*. — 2017. — V. 19. — No. 10. — P. 264—266.
15. *Torshin, I. Yu.* Hierarchy of zinc and iron interactions: physiological, molecular and clinical aspects / I. Yu. Torshin, O. A. Gromova, T. R. Grishina, K. V. Rudakov // *Trudnyy patsient (Complex patient)*. — 2010. — V. 8. — No. 3. — P. 45—53.
16. *Troshin A. A.* Effect of new combinations of succinic acid drugs on embryogenesis / A. A. Troshin, A. V. Levchenko // *Veterinariya Kubani (Veterinary Medicine of Kuban)* — 2016 — No. 6.
17. *Garmaza, Yu. M.* Cellular zinc homeostasis and the development of metabolic disorders in cardiac patients / Yu. M. Garmaza, A. V. Tamashevskiy, E. A. Medvedev, L. G. Gelis, E. I. Slobozhanin // *Biochemical innovations in the conditions of biosphere technogenesis correction: Proceedings of the International Biogeochemical Symposium dedicated to the 125th anniversary since the birth of Academician A. P. Vinogradov and the 90th anniversary of the formation of Pridnestrovian University*. In 2 volumes, Tiraspol, November 05—07, 2020. — 2020. — P. 271—275.
18. *Polozyuk O. N.* Hematology: textbook / O. N. Polozyuk, T. M. Ushakova // *Don State Agrarian University*. — *Persianovskiy: Donskoy GAU (Don SAU)*, 2019. — 159 p.
19. *Martin D. B.* The mechanism of tricarboxylic acid cycle regulation of fatty acid synthesis / D. B. Martin, P. R. Vagelos // *The Journal of biological chemistry*. — 1962. — No. 237.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

T. A. Azarnova — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Chemistry named after prof. S. I. Afonskiy and A. G. Malakhov;

A. S. Davletov — Student;

I. S. Lugovaya — Candidate of Biological Sciences, Chief Specialist of FSBI “RSCAF&DS&Q”;

E. A. Zolotukhina — Deputy Director of B&GC “ZEBF” — Branch of ARPR&TIPF” of the RAS;

D. V. Anshakov — Candidate of Agricultural Sciences, Head of B&GC “ZEBF” — Branch of ARPR&TIPF” of the RAS.

The article was submitted 13.02.2023

Научная статья

УДК 619:[612.12:618.11]:636.2

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.118

МОРФОБИОХИМИЧЕСКИЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС КРОВИ КОРОВ ПРИ ГИПОФУНКЦИИ ЯИЧНИКОВ

Егор Максимович Степанов*, Виталий Иванович Михалев*✉,
Владимир Николаевич Скориков*, Лариса Юрьевна Сашнина*,
Галина Германовна Чусова*, Сулейман Мухитдинович Сулейманов**,
Евгений Александрович Андрианов**

**Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, e-mail: mikhalevvit@yandex.ru*✉

***Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия*

Аннотация. В статье представлены материалы изучения морфобиохимического и иммунологического статуса крови коров после отела с полноценным проявлением половой цикличности, а также с гипофункциональным состоянием яичников, сопровождающимся явлениями анафродизии и ановуляции. Гипофункциональные состояния яичников характеризуются близкими по своему характеру морфологическими и иммунобиохимическими изменениями различной степени выраженности. Более значительные изменения происходят при гипофункции яичников, проявляющейся анафродизией, свидетельствующие о снижении интенсивности эритропоэза, гуморального и клеточного звена неспецифической резистентности, синтеза половых стероидов в 1,87—7,92 раза, содержания противовоспалительных цитокинов на 28,7—29,2 % при повышении уровня провоспалительных на 50,2—74,3 %. Гормональный статус коров с гипофункцией яичников, сопровождающейся ановуляцией, характеризуется снижением уровня половых стероидов в период проявления ановуляторного полового цикла в 1,33—4,11 раза, что клинически проявляется отсутствием в яичниках функционально активного желтого тела.

Ключевые слова: коровы, яичники, гипофункция, анафродизия, ановуляция, морфобиохимический и иммунологический статус

Высокая молочная продуктивность, являющаяся необходимым условием рентабельного ведения скотоводства, оказывает отрицательное влияние на воспроизводительную функцию животных, особенно состояние гормонального гомеостаза, определяемого функциональной деятельностью яичников. В большинстве случаев нарушения гормонопродуцирующей функции яичников у молочных коров клинически проявляются в форме их гипофункции — 32,7—42,9 %. Гипофункциональное состояние половых гонад наиболее часто диагностируется у коров-первотелок [1—3].

Широкое распространение дисфункциональных расстройств яичников у коров и наносимый ими значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам обуславливает необходимость детального изучения этиопатогенетических механизмов.

По мнению многочисленных исследователей, гипофункция яичников является полиэтиологической патологией. Вместе с тем, в основе развития гипофункциональных расстройств яичников является не только пониженная их функциональная активность, но и снижение гормонопоэза в гипоталамо-гипофизарной системе, сопровождающееся развитием ановуляторных половых циклов [4—7].

Кроме того, помимо гонадотропных гормонов, которым отводилась доминирующая роль в развитии дисфункциональных расстройств яичников, в этиологии гипофункции играют роль метаболические гормоны (инсулин, тироксин, инсулиноподобный фактор роста, кортизол), интерлейкины и др. [8, 9].

Алиментарные причины (обеспеченность основными питательными веществами, витаминами, минералами и др.) в этиологии гипофункции

© Степанов Е. М., Михалев В. И., Скориков В. Н., Сашнина Л. Ю., Чусова Г. Г., Сулейманов С. М., Андрианов Е. А., 2023

яичников у коров выступают в качестве предрасполагающих факторов. Вместе с тем, результаты биохимических исследований крови коров с гипофункциональным состоянием яичников свидетельствуют о глубоких нарушениях обмена веществ [10, 11].

Поэтому изучение показателей морфобиохимического и иммунологического статуса крови коров при гипофункциональном состоянии яичников является актуальным и требует дальнейшего изучения.

Цель исследований — изучить морфобиохимический и иммунологический статус крови коров при гипофункции яичников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований служили лактирующие бесплодные коровы через 40—45 дней после отела, которые по результатам анамнестических и клинико-эхографических исследований были разделены по принципу аналогов на три группы: проявляющие половую цикличность ($n = 12$), с гипофункцией яичников, сопровождающуюся анафродизией ($n = 12$), с гипофункцией яичников, сопровождающуюся ановуляцией фолликула ($n = 12$). За животными проводили наблюдение, учитывали все случаи проявления половой цикличности.

От животных, включенных в опыт (по 7—8 из каждой группы) отобраны пробы крови для проведения лабораторных исследований. В крови определено содержание эритроцитов, лейкоцитов, лейкоформула, гемоглобина, показатели гематокрита, общего белка и его фракций, общих иммуноглобулинов, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК), лизоцимную активность сыворотки крови (ЛАСК), фагоцитарную активность лейкоци-

тов (ФАК), фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ). Кроме того, в крови определено содержание прогестерона, эстрадиола, тестостерона, дегидроэпиандростерона сульфата (ДЭАС), кортизола, интерлейкина — 1β , 2, 4, 10 и фактора некроза опухоли альфа (ФНО $_{\alpha}$).

Морфологический состав крови изучен на гематологическом анализаторе «ABX MICRO S60», биохимические показатели — на анализаторе «Hitachi-902» и наборами фирмы «Витал» согласно установленным методикам, БАСК — по О. В. Смирновой и Т.А. Кузьминой (1966), ЛАСК — по К. Кагromanовой, З. В. Ермольевой (1966), ФАЛ — с антигеном *Staph. aureus* по В. С. Гостеву (1950). Содержание гормонов в сыворотке крови определено методом ИФА с использованием тест-систем ЗАО «НВО Иммунотех» (Россия), а уровень интерлейкинов — с использованием видоспецифичных тест-систем Elisa Kit (Cloud-Clone Corp., USA).

Полученный цифровой материал подвергли статистической обработке с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфологические показатели крови коров с различным функциональным состоянием яичников представлены в таблице 1.

Установлено, что в крови коров с гипофункцией яичников, сопровождающейся ановуляцией, содержание лейкоцитов больше на 9,8 % по сравнению с животными, проявляющими половую цикличность, в том числе палочкоядерных нейтрофилов — в 1,62 раза ($P < 0,001$), эозинофилов — в 2,68 раза ($P < 0,001$), моноцитов — в 2,31 раза ($P < 0,001$) при снижении уровня лимфоцитов на 12,8 % ($P < 0,05$) и величины гематокрита — на 16,9 % ($P < 0,05$).

Таблица 1

Морфологические показатели крови коров при различном функциональном состоянии яичников

Показатели	Проявляющие половую цикличность, $n = 8$	Гипофункция, сопровождающаяся анафродизией, $n = 7$	Гипофункция, сопровождающаяся ановуляцией, $n = 7$
1	2	3	4
Эритроциты, $10^{12}/л$	$6,48 \pm 0,31$	$5,94 \pm 0,29$	$6,32 \pm 0,24$
Гемоглобин, г/л	$121,6 \pm 6,7$	$110,2 \pm 7,9$	$114,3 \pm 10,2$
Гематокрит, %	$43,2 \pm 2,1$	$37,1 \pm 1,5^*$	$35,9 \pm 1,3^*$
Лейкоциты, $10^9/л$	$7,54 \pm 0,31$	$8,61 \pm 0,34^*$	$8,28 \pm 0,33$

Окончание табл. 1

1	2	3	4
палочкоядерные, %	5,5 ± 0,19	7,7 ± 0,21***	8,9 ± 0,23***
сегментноядерные, %	45,1 ± 2,1	41,5 ± 2,2	40,3 ± 1,9
Эозинофилы, %	2,2 ± 0,11	4,4 ± 0,14***	5,9 ± 0,16***
Моноциты, %	2,6 ± 0,13	4,8 ± 0,11***	6,0 ± 0,12***
Лимфоциты, %	44,6 ± 1,9	41,6 ± 1,9	38,9 ± 1,7*

* $P < 0,05$

*** $P < 0,001$ — по сравнению с животными, проявляющими половую цикличность

У животных с гипофункциональным состоянием яичников, сопровождающейся анафродизией, в крови установлено снижение уровня эритроцитов на 8,3 % по сравнению с коровами, проявляющих половую цикличность, гемоглобина — на 9,4 %, величины гематокрита — на 14,1 % ($P < 0,05$), что свидетельствует о снижении интенсивности эритропоэза. В то же время в крови этих животных установлено повышенное на 14,2 % ($P < 0,05$) содержание лейкоцитов, палочкоядерных нейтрофилов — на 40,0 % ($P < 0,001$), эозинофилов — в 2,0 раза ($P < 0,001$), моноцитов — в 1,85 раза ($P < 0,001$).

При изучении показателей клеточного и гуморального звена неспецифической резистентности установлено (табл. 2), что у животных с гипофункцией яичников, клинически сопровождающейся ановуляцией, фагоцитарная активность лейкоцитов ниже на 6,9 % ($P < 0,05$), чем у коров с полноценными половыми циклами, фагоцитарный ин-

декс — на 15,8 % ($P < 0,05$), фагоцитарное число — на 20,9 % ($P < 0,01$), БАСК — на 7,7 %, ЛАСК — на 10,7 % ($P < 0,05$), при повышении уровня общих иммуноглобулинов на 17,5 % ($P < 0,05$) и циркулирующих иммунных комплексов — в 1,86 раза ($P < 0,001$).

У животных с гипофункциональным состоянием половых гонад с явлением анафродизии изменения иммунологических показателей имеют более выраженный характер. Так, фагоцитарный индекс у них снижен на 19,7 % ($P < 0,01$), фагоцитарное число — на 24,2 % ($P < 0,001$), содержание общего белка — на 8,2 % ($P < 0,05$), БАСК — на 11,0 % ($P < 0,05$), ЛАСК — на 14,3 % ($P < 0,05$), при повышении концентрации α -глобулинов на 28,7 % ($P < 0,05$) и циркулирующих иммунных комплексов — на 50,0 % ($P < 0,001$), свидетельствующее о снижении гуморального и клеточного звена неспецифической резистентности.

Таблица 2

Показатели клеточного и гуморального звена неспецифической резистентности коров при различном функциональном состоянии яичников

Показатели	Проявляющие половую цикличность, $n = 8$	Гипофункция, сопровождающаяся анафродизией, $n = 7$	Гипофункция, сопровождающаяся ановуляцией, $n = 7$
1	2	3	4
ФАЛ, %	81,4 ± 1,6	76,5 ± 1,4*	75,8 ± 1,3*
ФИ	7,6 ± 0,21	6,1 ± 0,33**	6,4 ± 0,37*
ФЧ	6,2 ± 0,19	4,7 ± 0,21***	4,9 ± 0,26**
Общий белок, г/л	79,6 ± 2,1	73,1 ± 1,9*	77,8 ± 3,8
Альбумины, %	43,6 ± 1,9	38,1 ± 1,5*	42,7 ± 1,7

Окончание табл. 2

1	2	3	4
α-глобулины, %	10,8 ± 0,7	13,9 ± 1,1*	11,3 ± 0,7
β-глобулины, %	18,6 ± 0,9	19,9 ± 1,1	20,7 ± 1,3
γ-глобулины, %	27,0 ± 1,3	28,1 ± 1,5	25,3 ± 1,4
Общие Jg, г/л	22,8 ± 1,4	24,9 ± 1,3	26,8 ± 1,1*
ЦИК, г/л	0,22 ± 0,01	0,33 ± 0,01***	0,41 ± 0,02***
БАСК, %	84,4 ± 3,8	75,1 ± 2,9*	77,9 ± 3,1
ЛАСК, мкг/мл	2,8 ± 0,11	2,4 ± 0,13*	2,5 ± 0,09*

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$

*** $P < 0,001$ — по сравнению с животными, проявляющими половую цикличность

Цитокиновый профиль крови коров с различным проявлением половой цикличности представлен в таблице 3. Установлено, что гипофункциональное состояние яичников, проявляющееся ановуляцией, характеризуется повышением уровня ФНО-α на 19,1 % ($P < 0,05$), ИЛ-2 — на 30,4 % ($P < 0,05$), ИЛ-1β — на 24,6 % ($P < 0,05$), при снижении ИЛ-4 на 17,7 % ($P < 0,05$) и ИЛ-10 — на 19,4 % ($P < 0,05$).

У животных с явлениями анафродизии изменения цитокинового профиля имеют схожий характер. Так, в крови коров с гипофункцией яичников, клинически проявляющейся анафродизией, установлено повышение уровня провоспалительных (ФНО-α — на 50,2 %, $P < 0,001$; ИЛ-2 — на 74,3 %, $P < 0,001$; ИЛ-1β — на 57,9 %, $P < 0,001$) при снижении противовоспалительных (ИЛ-4 — на 29,2 %, $P < 0,001$, ИЛ-10 — на 28,7 %, $P < 0,01$) цитокинов.

Таблица 3

Содержание цитокинов в крови коров при различном функциональном состоянии яичников

Показатели	Проявляющие половую цикличность, $n = 8$	Гипофункция, сопровождающаяся анафродизией, $n = 7$	Гипофункция, сопровождающаяся ановуляцией, $n = 7$
ФНО-α, пг/мл	132,4 ± 6,6	198,8 ± 10,3***	157,7 ± 7,7*
ИЛ-2, пг/мл	42,1 ± 3,3	73,4 ± 4,1***	54,9 ± 3,4*
ИЛ-1β, пг/мл	18,3 ± 1,1	28,9 ± 1,9***	22,8 ± 1,2*
ИЛ-4, пг/мл	62,3 ± 3,5	44,1 ± 2,2***	51,3 ± 2,4*
ИЛ-10, пг/мл	66,9 ± 4,2	47,7 ± 3,1**	53,9 ± 2,2*

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$

*** $P < 0,001$ — по сравнению с животными, проявляющими половую цикличность

Гормональный статус коров с гипофункциональным состоянием яичников и полноценным проявлением половой цикличности представлен в таблице 4. Установлено, что у коров с гипофункцией яичников, клинически проявляю-

щейся анафродизией, содержание прогестерона ниже в 7,92 раза ($P < 0,001$), эстрадиола-17β — в 1,87 раза ($P < 0,001$), тестостерона — в 2,55 раза ($P < 0,001$), ДЭАС — в 2,84 раза ($P < 0,001$), кортизола — в 1,61 раза ($P < 0,001$), свидетельствующей

щее о полной депрессии функции половых желез. Гипофункция, сопровождающаяся ановуляцией, характеризуется снижением уровня прогестерона в период проявления ановуляторного полового цикла в 4,11 раза ($P < 0,001$), эстрадиола-17 β — в 1,33 раза ($P < 0,001$), тестостерона — в 1,51 раза

($P < 0,001$), ДЭАС — в 1,69 раза ($P < 0,001$) и кортизола — в 1,30 раза ($P < 0,01$). При проведении клинико-эхографических исследований этих животных на 6—8 дни после осеменения констатируется отсутствие в яичниках функционально активного желтого тела, что подтверждает явление ановуляции.

Таблица 4

Концентрация гормонов в крови коров при различном функциональном состоянии яичников

Показатели	Проявляющие половую цикличность, $n = 8$	Гипофункция, сопровождающаяся анафродизией, $n = 7$	Гипофункция, сопровождающаяся ановуляцией, $n = 7$
Прогестерон, нМоль/л	15,2 ± 1,0	1,92 ± 0,11***	3,7 ± 0,16***
Эстрадиол-17 β , нМоль/л	0,28 ± 0,01	0,15 ± 0,01***	0,21 ± 0,01***
Тестостерон, нМоль/л	1,07 ± 0,06	0,42 ± 0,02***	0,71 ± 0,04***
ДЭАС, нМоль/л	0,54 ± 0,03	0,19 ± 0,01***	0,32 ± 0,01***
Кортизол, нМоль/л	219,3 ± 12,4	135,9 ± 9,4***	168,4 ± 11,4**

** $P < 0,01$

*** $P < 0,001$ — по сравнению с животными, проявляющими половую цикличность

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гипофункциональные состояния яичников, сопровождающиеся явлениями анафродизии и ановуляции, характеризуются близкими по своему характеру морфологическими и иммунобиохимическими изменениями различной степени выраженности. Более значительные изменения происходят при гипофункции яичников, проявляющейся анафродизией, свидетельствующие о снижении интенсивности эритропоэза, гуморального и клеточного звена неспецифической резистентности, синтеза половых стероидов, содержания противовоспалительных цитокинов при повышении уровня провоспалительных.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Горпиченко Е. А. Факторы, способствующие возникновению функциональных расстройств родополового аппарата у коров / Е. А. Горпиченко, И. С. Коба, М. Н. Лифенцова // Научный журнал КубГАУ. — № 121 (07). — 2016. — С. 1818—1827.
2. Дорохова Я. Д. Влияние препарата «Маримикс» на уровень кальция в крови коров с гипофункцией яичников / Я. Д. Дорохова, Н. Б. Баженова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2016. — № 1. — С. 120—122.
3. Акчурина Е. С. Эффективность гомональных препаратов для стимуляции воспроизводительной способ-

ности коров при гипофункции яичников / Е. С. Акчурина // Дис. канд. вет. наук. — Саратов, 2017. — 117 с.

4. Нежданов А. Г. Половые стероиды в крови коров при гипофункции яичников / А. Г. Нежданов, Н. А. Соловьев // Ветеринария. — 1988. — № 5. — С. 41—43.

5. Синева А. М. Дегидроэпиандростерон, тестостерон и 17 β -эстрадиол в крови молочных коров при послеродовой гипофункции яичников / А. М. Синева, В. А. Лукина, М. И. Адодина // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2019. — № 4 (9). — С. 77—83.

6. Williams E. J. Uterine infection perturbs ovarian function in the postpartum dairy cow / E. J. Williams, D. P. Fischer, D. E. Noakes et al. // Theriogenology. — 2007. — V. 68. — P. 549—559.

7. Crowe M. A. Triennial lactation symposium: Effects of stress on postpartum reproduction in dairy cows / M. A. Crowe, E. J. Williams // Journal of Animal Science. — 2012. — V. 90 (5). — P. 1722—1727.

8. Лебедев В. А. Роль метаболических гормонов в регуляции функции яичников у коров / В. А. Лебедев, И. Ю. Лебедева, Т. И. Кузьмина, И. Ш. Шапиев // Сельскохозяйственная биология. — 2005. — № 2. — С. 14—21.

9. Зенкина В. Г. Современные представления об интраорганный регуляции фолликулогенеза в яичнике / В. Г. Зенкина, О. А. Солодкова, О. Н. Погукай, В. С. Каредина // Современные проблемы науки и образования. — 2012. — № 2. — С. 41—52.

10. Богданова Н. Е. Эффективность применения плацентарных и гипофизарных гонадотропных препа-

ратов для восстановления плодовитости коров при гипофункции яичников / Н. Е. Богданова // Автореф. дисс. канд. вет. наук. — Воронеж, 2006. — 22 с.

11. Семиволос А. М. Основные показатели гомеостаза крови коров при гипофункции яичников / А. М. Семиволос, И. И. Калужный, Е. В. Акчурина // Аграрный научный журнал. — 2016. — № 2. — С. 23—26.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. М. Степанов — аспирант;

В. И. Михалев — доктор ветеринарных наук, заведующий сектором;

В. Н. Скориков — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;

Л. Ю. Сашнина — доктор ветеринарных наук, заведующая лабораторией;

Г. Г. Чусова — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией;

С. М. Сулейманов — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры акушерства анатомии и хирургии;

Е. А. Андрианов — профессор кафедры технологического оборудования, процессов перерабатывающих производств, механизации сельского хозяйства и безопасности жизнедеятельности.

Статья поступила в редакцию 20.02.2023 г.

Original article

UDC 619:[612.12:618.11]:636.2

MORPHOBIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL BLOOD STATUS OF COWS WITH OVARIAN HYPOFUNCTION

Egor Maksimovich Stepanov*, Vitaliy Ivanovich Mikhalev*✉, Vladimir Nikolaevich Skorikov*, Larisa Yuryevna Sashnina*, Galina Germanovna Chusova*, Suleyman Mukhitdinovich Suleymanov**, Evgeniy Aleksandrovich Andrianov**

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, e-mail: mikhalevvit@yandex.ru

**Voronezh State Agricultural University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia

Abstract. The article presents the material on studying the morpho-biochemical and immunological blood status of cows after calving with a full manifestation of sexual cyclicality, as well as with a hypofunctional state of the ovaries, accompanied by the phenomena of anaphrodisia and anovulation. Hypofunctional states of the ovaries are characterized by similar morphological and immunobiochemical changes of varying severity. More significant changes occur in case of ovarian hypofunction, manifested by anaphrodisia, indicating a decrease in the intensity of erythropoiesis, humoral and cellular non-specific resistance, synthesis of sex steroids by 1.87—7.92 times, the content of anti-inflammatory cytokines — by 28.7—29.2 %, with an increase in the level of pro-inflammatory ones by 50.2—74.3 %. The hormonal status of cows with ovarian hypofunction accompanied by anovulation is characterized by a decrease in the level of sex steroids during the manifestation of the anovulatory sexual cycle by 1.33—4.11 times, which is clinically manifested by the absence of a functionally active corpus luteum in the ovaries.

Keywords: cows, ovaries, hypofunction, anaphrodisia, anovulation, morphobiochemical and immunological status

High milk productivity, which is a necessary condition for profitable livestock breeding, has a negative effect on the reproductive function of animals, especially the state of hormonal homeostasis, determined by the functional activity of the ovaries. In most cases, violations of the hormone-producing function of the ovaries in dairy cows are clinically manifested in the form of their hypofunction — 32.7—42.9 %. The hypofunctional state of the gonads is most often diagnosed in first-calf cows [1—3].

The widespread prevalence of dysfunctional ovarian disorders in cows and the significant economic damage they cause to livestock farms necessitates a detailed study of etiopathogenetic mechanisms.

According to numerous researchers, ovarian hypofunction is a polyetiological pathology. At the same time, the development of hypofunctional disorders of the ovaries is based not only on their reduced functional activity, but also on the decrease in hormonopoiesis in the hypothalamic-pituitary system, accompanied by the development of anovulatory sexual cycles [4—7].

Moreover, in addition to gonadotropic hormones, which were assigned the dominant role in the development of dysfunctional ovarian disorders, metabolic hormones (insulin, thyroxine, insulin-like growth factor, cortisol), interleukins, etc. play a role in the etiology of hypofunction [8, 9].

Alimentary causes (sufficiency of basic nutrients, vitamins, minerals, etc.) in the etiology of ovarian hypofunction in cows act as predisposing factors. At the same time, the results of biochemical blood studies of cows with a hypofunctional state of the ovaries indicate profound metabolic disorders [10, 11].

Therefore, the study of indicators of the morphobiochemical and immunological blood status of cows with a hypofunctional state of the ovaries is relevant and requires further study.

The objective of the research is to study the morphobiochemical and immunological blood status of cows with ovarian hypofunction.

MATERIAL AND METHODS

The object of the research was lactating infertile cows 40—45 days after calving, which, according to the results of anamnestic and clinical echographic studies, were divided according to the principle of analogues into three groups: exhibiting sexual cyclicity ($n = 12$); with ovarian hypofunction, accompanied by anaphrodisia ($n = 12$); with ovarian hypofunction, accompanied by anovulation of the follicle ($n = 12$). Animals were observed, all cases of manifestation of sexual cyclicity were taken into account.

Blood samples were taken from the animals included in the experiment (7—8 from each group) for laboratory tests. The content of erythrocytes, leukocytes, leukoformula, hemoglobin, hematocrit, total protein and its fractions, total immunoglobulins, circulating immune complexes (CIC), serum bactericidal activity (SBA), serum lysozyme activity (SLA) were determined in the blood, leukocyte phagocytic activity (LPA), phagocytic index (PhI), phagocytic number (PhN). In addition, the content of progesterone, estradiol, testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol, interleukin — 1 β , 2, 4, 10 and tumor necrosis factor alpha (TNF $_{\alpha}$) was determined in the blood.

The morphological blood composition was studied on an ABX MICRO S60 hematological analyzer, biochemical indicators — on a Hitachi-902 ana-

lyzer and Vital kits according to established methods, SBA — according to O. V. Smirnova and T. A. Kuzmina (1966), SLA — according to K. Kagromanova, Z. V. Ermolyeva (1966), LPA — with Staph. aureus antigen according to V. S. Gostev (1950). The serum content of hormones was determined by ELISA using the test systems of CJSC “NVO Immunotech” (Russia), and the level of interleukins was determined using the species-specific test systems Elisa Kit (Cloud-Clone Corp., USA).

The resulting digital material was subjected to statistical processing using the Statistica 6.0 software package.

STUDY RESULTS

Morphological blood indicators of cows with various functional state of the ovaries are presented in Table 1.

It has been found that in the blood of cows with ovarian hypofunction, accompanied by anovulation, the content of leukocytes is by 9.8 % higher compared to the animals exhibiting sexual cyclicity, including stab neutrophils — by 1.62 times ($P < 0.001$), eosinophils — by 2.68 times ($P < 0.001$), monocytes — by 2.31 times ($P < 0.001$), with a decrease in the level of lymphocytes by 12.8 % ($P < 0.05$) and hematocrit — by 16.9 % ($P < 0.05$).

Table 1

Morphological blood indicators of cows with a various functional state of the ovaries

Indicators	Exhibiting sexual cyclicity, $n = 8$	Hypofunction, accompanied by anaphrodisia, $n = 7$	Hypofunction, accompanied by anovulation, $n = 7$
Erythrocytes, $10^{12}/L$	6.48 \pm 0.31	5.94 \pm 0.29	6.32 \pm 0.24
Hemoglobin, g/L	121.6 \pm 6.7	110.2 \pm 7.9	114.3 \pm 10.2
Hematocrit, %	43.2 \pm 2.1	37.1 \pm 1.5*	35.9 \pm 1.3*
Leukocytes, $10^9/L$	7.54 \pm 0.31	8.61 \pm 0.34*	8.28 \pm 0.33
stab, %	5.5 \pm 0.19	7.7 \pm 0.21***	8.9 \pm 0.23***
segmented nuclear, %	45.1 \pm 2.1	41.5 \pm 2.2	40.3 \pm 1.9
Eosinophils, %	2.2 \pm 0.11	4.4 \pm 0.14***	5.9 \pm 0.16***
Monocytes, %	2.6 \pm 0.13	4.8 \pm 0.11***	6.0 \pm 0.12***
Lymphocytes, %	44.6 \pm 1.9	41.6 \pm 1.9	38.9 \pm 1.7*

* $P < 0.05$

*** $P < 0.001$ — compared to the animals exhibiting sexual cyclicity

In the animals with a hypofunctional state of the ovaries, accompanied by anaphrodisia, a decrease in the level of erythrocytes by 8.3 % was found in the blood compared to the cows exhibiting sexual cyclicity, hemoglobin — by 9.4 %, hematocrit — by 14.1 % ($P < 0.05$), which indicated a decrease in the intensity of erythropoiesis. At the same time, in the blood of these animals, the content of leukocytes increased by 14.2 % ($P < 0.05$), stab neutrophils — by 40.0 % ($P < 0.001$), eosinophils — by 2.0 times ($P < 0.001$), monocytes — 1.85 times ($P < 0.001$).

When studying the indicators of the cellular and humoral link of non-specific resistance, it has been found (Table 2) that in the animals with ovarian hypofunction, clinically accompanied by anovulation, the phagocytic activity of leukocytes is lower by 6.9 % ($P < 0.05$) than in the cows with full sexual cycles,

phagocytic index — by 15.8 % ($P < 0.05$), phagocytic number — by 20.9 % ($P < 0.01$), SBA — by 7.7 %, SLA — by 10.7 % ($P < 0.05$), with an increase in the level of total immunoglobulins by 17.5 % ($P < 0.05$) and circulating immune complexes — by 1.86 times ($P < 0.001$).

In the animals with a hypofunctional state of the gonads with the phenomenon of anaphrodisia, changes in immunological indicators are more pronounced. Thus, their phagocytic index is reduced by 19.7 % ($P < 0.01$), phagocytic number — by 24.2 % ($P < 0.001$), total protein content — by 8.2 % ($P < 0.05$), SBA — by 11.0 % ($P < 0.05$), SLA — by 14.3 % ($P < 0.05$), with an increase in the concentration of α -globulins by 28.7 % ($P < 0.05$) and circulating immune complexes — by 50.0 % ($P < 0.001$), indicating a decrease in the humoral and cellular link of non-specific resistance.

Table 2

Indicators of the cellular and humoral link of nonspecific resistance of cows in case of various functional states of the ovaries

Indicators	Exhibiting sexual cyclicity, $n = 8$	Hypofunction, accompanied by anaphrodisia, $n = 7$	Hypofunction, accompanied by anovulation, $n = 7$
LPA, %	81.4 ± 1.6	76.5 ± 1.4*	75.8 ± 1.3*
PhI	7.6 ± 0.21	6.1 ± 0.33**	6.4 ± 0.37*
PhN	6.2 ± 0.19	4.7 ± 0.21***	4.9 ± 0.26**
Total protein, g/L	79.6 ± 2.1	73.1 ± 1.9*	77.8 ± 3.8
Albumins, %	43.6 ± 1.9	38.1 ± 1.5*	42.7 ± 1.7
α -globulins, %	10.8 ± 0.7	13.9 ± 1.1*	11.3 ± 0.7
β -globulins, %	18.6 ± 0.9	19.9 ± 1.1	20.7 ± 1.3
γ -globulins, %	27.0 ± 1.3	28.1 ± 1.5	25.3 ± 1.4
General Jg, g/L	22.8 ± 1.4	24.9 ± 1.3	26.8 ± 1.1*
CIC, g/L	0.22 ± 0.01	0.33 ± 0.01***	0.41 ± 0.02***
SBA, %	84.4 ± 3.8	75.1 ± 2.9*	77.9 ± 3.1
SLA, μ g/ml	2.8 ± 0.11	2.4 ± 0.13*	2.5 ± 0.09*

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ — compared to the animals exhibiting sexual cyclicity

The cytokine blood profile of cows with various manifestations of sexual cyclicity is presented in Table 3. It has been established that the hypofunctional state of the ovaries, manifested by anovulation, is charac-

terized by an increase in the level of TNF- α by 19.1 % ($P < 0.05$), IL-2 — by 30.4 % ($P < 0.05$), IL-1 β — by 24.6 % ($P < 0.05$), with a decrease in IL-4 by 17.7 % ($P < 0.05$) and IL-10 — by 19.4 % ($P < 0.05$).

In the animals with anaphrodisia, changes in the cytokine profile are similar. Thus, in the blood of cows with ovarian hypofunction, clinically manifested by anaphrodisia, an increase in the level of pro-inflammatory (TNF- α — by 50.2 %, $P < 0.001$; IL-2 — by 74.3 %, $P < 0.001$; IL-1 β — by 57.9 %, $P < 0.001$) with a decrease in anti-inflammatory (IL-4 — by 29.2 %, $P < 0.001$, IL-10 — by 28.7 %, $P < 0.01$) cytokines.

The hormonal status of cows with a hypofunctional state of the ovaries and a full manifestation of sexual cyclicity is presented in Table 4. It has been found that in the cows with hypofunction of the ovaries, clinically manifested by anaphrodisia, the content of progesterone is by 7.92 times lower ($P < 0.001$), estradi-

ol-17 β — by 1.87 times ($P < 0.001$), testosterone — by 2.55 times ($P < 0.001$), DHEAS — by 2.84 times ($P < 0.001$), cortisol — by 1.61 times ($P < 0.001$), indicating a complete depression of the gonad function.

Hypofunction, accompanied by an anovulation, is characterized by a decrease in the level of progesterone during the manifestation of the anovulatory sexual cycle by 4.11 times ($P < 0.001$), estradiol-17 β — by 1.33 times ($P < 0.001$), testosterone — by 1.51 times ($P < 0.001$), DHEAS — by 1.69 times ($P < 0.001$) and cortisol — by 1.30 times ($P < 0.01$). When conducting clinical and echographic studies of these animals for 6—8 days after insemination, the absence of a functionally active corpus luteum in the ovaries is ascertained, which confirms the phenomenon of an anovulation.

Table 3

Blood content of cytokines in cows with various functional states of the ovaries

Indicators	Exhibiting sexual cyclicity, $n = 8$	Hypofunction, accompanied by anaphrodisia, $n = 7$	Hypofunction, accompanied by anovulation, $n = 7$
TNF- α , pg/ml	132.4 \pm 6.6	198.8 \pm 10.3***	157.7 \pm 7.7*
IL-2, pg/ml	42.1 \pm 3.3	73.4 \pm 4.1***	54.9 \pm 3.4*
IL-1 β , pg/ml	18.3 \pm 1.1	28.9 \pm 1.9***	22.8 \pm 1.2*
IL-4, pg/ml	62.3 \pm 3.5	44.1 \pm 2.2***	51.3 \pm 2.4*
IL-10, pg/ml	66.9 \pm 4.2	47.7 \pm 3.1**	53.9 \pm 2.2*

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ — compared to the animals exhibiting sexual cyclicity

Table 4

Blood concentration of hormones in cows with various functional states of the ovaries

Indicators	Exhibiting sexual cyclicity, $n = 8$	Hypofunction, accompanied by anaphrodisia, $n = 7$	Hypofunction, accompanied by anovulation, $n = 7$
Progesterone, nmol/L	15.2 \pm 1.0	1.92 \pm 0.11***	3.7 \pm 0.16***
Estradiol-17 β , nmol/L	0.28 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01***	0.21 \pm 0.01***
Testosterone, nmol/L	1.07 \pm 0.06	0.42 \pm 0.02***	0.71 \pm 0.04***
DHEAS, nmol/L	0.54 \pm 0.03	0.19 \pm 0.01***	0.32 \pm 0.01***
Cortisol, nmol/L	219.3 \pm 12.4	135.9 \pm 9.4***	168.4 \pm 11.4**

** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ — compared to the animals exhibiting sexual cyclicity

CONCLUSION

Hypofunctional states of the ovaries, accompanied by the phenomena of anaphrodisia and anovulation, are characterized by similar morphological and immunobiochemical changes of varying severity. More significant changes occur in case of ovarian hypofunction, manifested by anaphrodisia, indicating a decrease in the intensity of erythropoiesis, humoral and cellular nonspecific resistance, synthesis of sex steroids, and the content of anti-inflammatory cytokines with an increase in the level of pro-inflammatory ones.

REFERENCES

1. *Gorpichenko E. A.* Factors contributing to the emergence of functional disorders of the genitourinary apparatus in cows / *E. A. Gorpichenko, I. S. Koba, M. N. Lifentsova* // *Nauchnyy zhurnal KubGAU (Scientific journal of KubSAU)*. — No. 121 (07). — 2016. — P. 1818—1827.
2. *Dorokhova Ya.D.* Effect of the drug “Marimix” on the blood level of calcium in the cows with ovarian hypofunction / *Ya.D. Dorokhova, N. B. Bazhenova* // *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine)*. — 2016. — No. 1. — P. 120—122.
3. *Akchurina E. S.* Efficacy of hormonal drugs to stimulate the reproductive ability of cows with ovarian hypofunction / *E. S. Akchurina* // *Thesis Cand. of Vet. Sciences*. — Saratov, 2017. — 117 p.
4. *Nezhdanov A. G.* Sex steroids in the blood of cows with ovarian hypofunction / *A. G. Nezhdanov, N. A. Solovyev* // *Veterinariya (Veterinary medicine)*. — 1988. — No. 5. — P. 41—43.
5. *Sineva A. M.* Dehydroepiandrosterone, testosterone 17 β -estradiol in the blood of dairy cows with postpartum ovarian hypofunction / *A. M. Sineva, V. A. Lukina, M. I. Addodina* // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2019. — No. 4 (9). — P. 77—83.
6. *Williams E. J.* Uterine infection perturbs ovarian function in the postpartum dairy cow / *E. J. Williams, D. P. Fischer, D. E. Noakes et al.* // *Theriogenology*. — 2007. — V. 68. — P. 549—559.
7. *Crowe M. A.* Triennial lactation symposium: Effects of stress on postpartum reproduction in dairy cows / *M. A. Crowe, E. J. Williams* // *Journal of Animal Science*. — 2012. — V. 90 (5). — P. 1722—1727.
8. *Lebedev V. A.* Role of metabolic hormones in the regulation of ovarian function in cows / *V. A. Lebedev, I. Yu. Lebedeva, T. I. Kuzmina, I. Sh. Shapiev* // *Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology)*. — 2005. — No. 2. — P. 14—21.
9. *Zenkina V. G.* Modern concepts of intraorganic regulation of folliculogenesis in the ovary / *V. G. Zenkina, O. A. Solodkova, O. N. Pogukay, V. S. Karedina* // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya (Modern problems of science and education)*. — 2012. — No. 2. — P. 41—52.
10. *Bogdanova N. E.* Efficacy of the use of placental and pituitary gonadotropic drugs to restore the fertility of cows with ovarian hypofunction / *N. E. Bogdanova* // *Abstract of a thesis Cand. of Vet. Sciences*. — Voronezh, 2006. — 22 p.
11. *Semivolos A. M.* Main indicators of blood homeostasis in cows with ovarian hypofunction / *A. M. Semivolos, I. I. Kalyuzhnyy, E. V. Akchurina* // *Agrarnyy nauchnyy zhurnal (Agrarian scientific journal)*. — 2016. — No. 2. — P. 23—26.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- E. M. Stepanov** — Postgraduate Student;
V. I. Mikhalev — Doctor of Veterinary Sciences, Head of the Sector;
V. N. Skorikov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
L. Yu. Sashnina — Doctor of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory;
G. G. Chusova — Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory;
S. M. Suleymanov — Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Obstetrics, Anatomy and Surgery;
E. A. Andrianov — Doctor of Agricultural Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Technological Equipment, Processing Industries Processes, Agricultural Mechanization and Life Safety.

The article was submitted 20.02.2023

Научная статья

УДК 619:[577.175.14:618.7]:636.4

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.129

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У СВИНОМАТОК С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПОСЛЕРОДОВОЙ ПАТОЛОГИИ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ЦИКЛА

Алексей Гаврилович Шахов*, Лариса Юрьевна Сашнина*✉,
Юлия Юрьевна Владимирова*, Кристина Олеговна Акулова*,
Галина Васильевна Никоненко*, Евгений Александрович Андрианов**

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, e-mail: l.yu.sashnina@mail.ru✉

**Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия

Аннотация. В статье представлены результаты изучения цитокинового профиля у свиноматок в разные периоды репродуктивного цикла. В крови свиноматок помесных пород (крупная белая + ландрас + дюрок) 3—4 опороса за 5—7 дней до осеменения, на 37—39 и 78—80 сутки супоросности, 5—7 и 18—20 дни лактации определяли содержание провоспалительных цитокинов: интерлейкина — 1 β (IL-1 β), интерлейкина — 2 (IL-2), фактора некроза опухоли- α (TFN- α), γ -интерферона (IFN- γ) и противовоспалительных медиаторов: интерлейкина — 4 (IL-4), интерлейкина — 10 (IL-10). Установлено, что у животных с риском развития послеродовой патологии цитокиновый профиль по сравнению с таковым у клинически здоровых свиноматок до осеменения, в периоды супоросности и лактации характеризуется относительно высоким уровнем провоспалительных цитокинов и низким содержанием противовоспалительных медиаторов, свидетельствующими о воспалительных процессах в течение всего репродуктивного цикла, клинически проявляющихся после опороса.

Ключевые слова: свиноматки, осеменение, супоросность, лактация, цитокины, воспалительные процессы, послеродовые болезни

Изучению цитокинов, являющихся регуляторами многих иммунологических и физиологических процессов у человека и животных при поддержании гомеостаза и борьбе с патогенами, посвящены многочисленные исследования [1—6]. Участвуя в регуляции воспаления и иммунного ответа, цитокины защищают организм от инфекционных агентов и способствуют восстановлению поврежденных тканей [2, 7, 8].

Большое внимание уделяется роли цитокинов в системе мать-плацента-плод при физиологическом и патологическом течении беременности [9—12]. Установлены повышение экспрессии провоспалительных цитокинов в начальный период беременности [9, 13] и решающая роль противовоспалительных медиаторов ИЛ-4 и ИЛ-10 в обеспечении ее физиологического течения [14].

Что касается иммунологии репродукции, цитокинового профиля у животных, то по этой проблеме имеются лишь единичные сообщения. Исследо-

ваниями А. Н. Власовой и соавт. [15] установлено, что на ранних стадиях беременности у крупного рогатого скота происходят сложные гормональные и иммунные сдвиги и, в частности, повышается уровень цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-15, а в конце стельности отмечается иммуносупрессия и снижается количество ИФН- γ . А. Г. Шахов и соавт. [5] у свиноматок в конце физиологически протекающей супоросности регистрировали относительный дефицит ИЛ-1 β и ФНО- α , при котором наблюдается супрессия иммунной системы, и высокий уровень ИФН- γ , участвующего в родовой деятельности, а после опороса — восстановление содержания ИЛ-1 β , ФНО- α и ИФН- γ , снижение уровней ИЛ-2 и ИЛ-4, регулирующих соответственно клеточный и гуморальный иммунитет.

Установлены наличие цитокинов ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-4, ИФН- γ в молозиве опоросившихся свиноматок и передача их потомству [16—18].

Цель исследований — изучить цитокиновый профиль у клинически здоровых и свиноматок с риском развития послеродовой патологии в разные периоды репродуктивного цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в условиях промышленного свиноводческого комплекса Воронежской области на 12 свиноматках помесных пород (крупная белая + ландрас + дюрок) 3—4 опороса, взятых в опыт в послеотъемный период. Кормление и условия содержания животных соответствовали нормам, предусмотренным промышленной технологией.

Кровь для определения уровня цитокинов от свиноматок брали за 5—7 дней до осеменения, на 37—39 и 78—80 сутки супоросности, 5—7 и 18—20 дни лактации. Опыт проводили в соответствии с требованиями действующих международных и российских законодательных актов (Директива 2010/63/EU от 22.09.2010, Европейской конвенции (ETS123), Strasbourg, 1986), а также требований комиссии по биоэтике ФГБНУ «ВНИВИПФиТ».

Содержание интерлейкина — 1 β (IL-1 β), интерлейкина — 2 (IL-2), интерлейкина — 4 (IL-4), интерлейкина-10 (IL-10), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), γ -интерферона (IFN- γ) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с после-

дующим учетом результатов на спектрофотометре «Униплан-ТМ» в соответствии с утвержденными наставлениями к диагностическим наборам.

Результаты исследований подвергли ретроспективному анализу и в зависимости от характера течения у животных послеродового периода были разделены на 2 группы. В I группу ($n = 5$) отнесены результаты исследований крови от свиноматок, оставшихся клинически здоровыми, во II ($n = 7$) — от животных, у которых после опороса регистрировали послеродовые болезни: острый гнойно-катаральный эндометрит и ММА.

Статистический анализ полученных данных и достоверность различий осуществляли с помощью прикладных компьютерных программ Statistica 6.0 (Stat Soft Inc., США) и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитокиновый профиль у свиноматок с риском развития воспалительных процессов в репродуктивных органах по сравнению с таковым у клинически здоровых животных до осеменения характеризовался превышением количества провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 β на 17,9 %, ИЛ-2—4,9 %, интерферона- γ —4,3 % и ФНО- α на 16,0 %. Одновременно у них регистрировали относительно низкий уровень противовоспалительных цитокинов: ИЛ-4 на 19,2 % и ИЛ-10 на 9,2 % (табл. 1).

Таблица 1

Цитокиновый профиль у свиноматок до осеменения

Показатели	I группа	II группа
ИЛ-1 β , пг/мл	5,6 \pm 0,12	6,6 \pm 0,15***
ИЛ-2, пг/мл	6,1 \pm 0,18	6,4 \pm 0,12
ИЛ-4, пг/мл	6,1 \pm 0,29	5,2 \pm 0,22*
ИЛ-10, пг/мл	6,3 \pm 0,41	5,7 \pm 0,26
ФНО- α , пг/мл	2,5 \pm 0,50	2,9 \pm 0,03
ИФН- γ , пг/мл	102,2 \pm 0,22	106,6 \pm 1,16**

* $p < 0,05$

** $p < 0,005$

*** $p < 0,001$ относительно здоровых свиноматок

В период супоросности (37—39 дни) у свиноматок обеих групп отмечено (табл. 2) повышение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β на 24,8 и 28,3 %; ФНО- α на 24,7 и 36,4 %, ИФН- γ на

14,5 и 20,0 %, необходимое для имплантации и плацентации, при этом активируются процессы неоваскуляризации и кровоснабжения в эндометрии, формируются кровеносные сосуды для обеспече-

ния адекватного кровоснабжения плаценты и плода [9, 13].

При этом количество провоспалительных цитокинов у свиноматок II группы было выше, чем у клинически здоровых животных ИЛ-1 β на 27,6 %, ИЛ-2 на 5,6 %, ФНО- α на 28,3 % и ИФН- γ на 9,4 %.

Несмотря на общую тенденцию повышения у свиноматок обеих групп содержания противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 на 9,3 и 10,5 %, ИЛ-10 на 8,8 и 3,5 %, их количество у животных с риском развития послеродовой патологии было меньше на 21,2 и 20,6 %.

Таблица 2

Цитокиновый профиль у супоросных свиноматок

Показатели	37—39 сутки		78—80 сутки	
	I	II	I	II
ИЛ-1 β , г/мл	7,0 \pm 0,28	8,5 \pm 0,25**	6,4 \pm 0,36	7,6 \pm 0,26*
ИЛ-2, пг/мл	6,0 \pm 0,21	6,4 \pm 0,10	6,5 \pm 0,11	6,7 \pm 0,15
ИЛ-4, пг/мл	6,7 \pm 0,56	5,7 \pm 0,24	7,1 \pm 0,23	6,1 \pm 0,11**
ИЛ-10, пг/мл	6,8 \pm 0,27	5,9 \pm 0,30*	7,3 \pm 0,18	6,3 \pm 0,28*
ФНО- α , г/мл	3,0 \pm 0,19	3,9 \pm 0,33*	2,8 \pm 0,21	3,2 \pm 0,18*
ИФН- γ , пг/мл	117,0 \pm 3,66	128,0 \pm 1,20*	103,5 \pm 2,38	111,7 \pm 1,65*

* $p < 0,05$

** $p < 0,005$ относительно здоровых свиноматок

Во второй половине супоросности (78—80 дни) у свиноматок обеих групп отмечено (табл. 2) снижение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β на 11,7 и 9,7 %, ФНО- α на 17,9 и 12,2 %, ИФН- γ на 12,7 и 11,5 % на фоне повышения концентрации противовоспалительных медиаторов ИЛ-4 на 3,8 и 2,7 % и ИЛ-10 на 24,1 и 7,3 %, что указывает на смещение цитокинового баланса в сторону иммуносупрессивных медиаторов, ингибирующих реакции клеточного иммунитета, оказывающих протективное влияние на взаимоотношение матери и плода и способствующих физиологическому течению беременности [19, 20].

Однако у свиноматок II группы уровень провоспалительных цитокинов был выше — ИЛ-1 β на 25,5 %, ИЛ-2 на 2,9 %, ФНО- α на 19,9 % и ИФН- γ на 7,9 %, а противовоспалительных — ниже: ИЛ-4 на 18,8 % и ИЛ-10 на 7,7 %, свидетельствующий о преимущественно клеточных реакциях иммунитета, оказывающих цитотоксическое и цитостатическое действия, что можно расценивать как доклинический этап воспалительной реакции, проявляющейся при ослаблении защитных механизмов организма.

Клиническими исследованиями у свиноматок II группы после родов регистрировали острый гной-

но-катаральный эндометрит и ММА. В результате проведенной терапии животных по схеме, используемой в хозяйстве, к пятому дню лактационного периода у них отсутствовали признаки проявления послеродовой патологии.

При сравнительном анализе уровня цитокинов после опороса на 5—7 сутки у переболевших животных отмечено повышенное содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β на 18,0 %, ИЛ-2 на 16,7 %, ФНО- α на 23,5 %, ИФН- γ на 13,0 %, играющих ключевую роль в регуляции гуморального и клеточного опосредованного иммунного ответа, и определяющих функциональное взаимодействие клеток при реализации реакции воспаления (табл. 3), на фоне пониженной концентрации противовоспалительных медиаторов ИЛ-4 и ИЛ-10 на 3,1 % и 8,1 % соответственно, что свидетельствует о выраженном смещении баланса продукции цитокинов в сторону провоспалительных, а также о повышенной активности лимфоцитов Th-1 типа.

На 18—20 день лактации у свиноматок обеих групп снизилось содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β на 10,8 и 12,2 %, ИЛ-2 на 3,5 и 7,8 %, ФНО- α на 15,5 и 12,9 %, а у переболевших животных кроме того, ИФН- γ на 7,0 % и противовоспалительного медиатора ИЛ-4 на 25,9 % при не-

значительном повышении количества ИЛ-10. При этом у животных II группы уровень провоспалительных цитокинов был выше: ИЛ-1 β на 16,1 %, ИЛ-2 на 12,8 %, ФНО- α на 27,4 % и ИФН- γ на 5,9 %, а противовоспалительного ИЛ-4 ниже на 23,4 %, что указывает на активацию Т-лимфоцитов Th-1 типа и подавления секретирующей функ-

ции Т-лимфоцитов Th-2 типа и свидетельствует об остаточных явлениях перенесенных заболеваний. Вероятно для полного восстановления характера продукции про- и противовоспалительных медиаторов в иммунокомпетентных клетках и нормализации активности Т-хелперов требуется более длительный период.

Таблица 3

Цитокиновый профиль у свиноматок после опороса

Показатели	5—7 сутки лактации		18—20 день лактации	
	I	II	I	II
ИЛ-1 β , пг/мл	7,0 \pm 0,22	8,2 \pm 0,45*	6,2 \pm 0,23	7,2 \pm 0,28*
ИЛ-2, пг/мл	6,3 \pm 0,22	7,3 \pm 0,33*	6,1 \pm 0,18	6,8 \pm 0,29*
ИЛ-4, пг/мл	6,7 \pm 0,26	6,5 \pm 0,21	6,8 \pm 0,12	5,2 \pm 0,14***
ИЛ-10, пг/мл	7,4 \pm 0,38	6,8 \pm 0,32	7,2 \pm 0,21	7,0 \pm 0,17
ФНО- α , пг/мл	2,8 \pm 0,33	3,4 \pm 0,39	2,3 \pm 0,21	3,0 \pm 0,32
ИФН- γ , пг/мл	101,9 \pm 1,37	115,1 \pm 1,94***	101,6 \pm 1,91	107,6 \pm 1,50*

* $p < 0,05$

** $p < 0,005$

*** $p < 0,001$ относительно здоровых свиноматок

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями установлено, что у свиноматок с риском развития послеродовых заболеваний, таких как острый послеродовый эндометрит и метрит-мастит-агалактия, клинически проявившихся после опороса, в период супоросности имеются различия в цитокиновом статусе с клинически здоровыми животными в виде повышенного содержания провоспалительных медиаторов и сниженного уровня противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови.

Выявленные особенности цитокинового профиля в период супоросности могут служить маркерами развития послеродовой патологии и быть использованы для прогноза возникновения послеродовых болезней и разработки профилактических мер с применением препаратов для фармакокоррекции иммунного статуса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Парахонский А. П. Роль цитокинов в патогенезе заболеваний / А. П. Парахонский // Успехи современного естествознания. — 2005. — № 4. — С. 63—64. — EDN IJFNOP

2. Кетлинский С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев // - СПб: ООО «Издательство Фолиант». — 2008. — 552 с.

3. Литвинова Л. С. Особенности клеточного иммунитета и цитокинового репертуара у пациентов с метаболическим синдромом / Л. С. Литвинова, Е. В. Кириенкова, Н. Н. Аксенова, Н. Д. Газатова, П. А. Затолокин // Бюллетень сибирской медицины. — 2012. — Т. 11. — № 3. — С. 53—57.

4. Прокулевич В. А. Ветеринарные препараты на основе интерферона / В. А. Прокулевич, М. И. Потапович // Вестник БГУ. — 2011. — № 3. — С. 51—54.

5. Шахов А. Г. Клеточный иммунитет и цитокиновый профиль у свиноматок до опороса и в период лактации / А. Г. Шахов, С. В. Шабунин, Л. Ю. Сашнина [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2019. — № 3(30). — С. 15—22. — DOI 10.29326/2304—196X-2019—3—30—15—18.

6. Наровлянский А. Н. Интерфероны: Перспективные направления исследований / А. Н. Наровлянский, Ф. И. Ершов, А. Л. Гинцбург // Иммунология. — 2013. — № 4. — С. 168—172.

7. Симбирцев А. С. Цитокины: классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3. — № 2. — С. 16—22.

8. *Сташкевич Д. С.* Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения: учеб. пособие [Текст] / Д. С. Сташкевич, Ю. Ю. Филиппова, А. Л. Бурмистрова // — Челябинск: Цицеро. — 2016. — 82 с.
9. *Веропотвелян П. Н.* Цитокины в системе мать-плацента-плод при физиологическом и патологическом течении беременности / П. Н. Веропотвелян, И. В. Гужевская // *Здоровье женщины.* — 2013. — № 1. — С. 126—126.
10. *Нефедова Д. Д.* Иммунологические аспекты беременности (обзор литературы) / Д. Д. Нефедова, В. А. Линде, М. А. Левкович // *Медицинский вестник Юга России.* — 2013. — № 4. — С. 16—21.
11. *Шестопалов А. В.* Уровень провоспалительных (ИЛ-1, ФНО α) и противовоспалительных (ИЛ-1 β , ТФР β) цитокинов у женщин с физиологической беременностью, родоразрешенных путем кесарева сечения / А. В. Шестопалов, Ю. А. Мирошниченко, А. Н. Рымашевский, Н. М. Добаева // *Фундаментальные исследования.* — 2014. — № 4—2. — С. 402—406.
12. *Круглякова М. В.* Характеристика цитокинового профиля при физиологической и осложненной беременности / М. В. Круглякова, О. В. Смирнова, Н. М. Титова // *Международная научно-практическая конференция «Культура, наука, образование: проблемы и перспективы».* — 2021. — Т. 1. — № 1. — С. 548—555.
13. *Левкович М. А.* Иммунологические аспекты проблемы невынашивания беременности / М. А. Левкович, Д. Д. Нефедова, Л. Д. Цатурян, Е. М. Бердичевская // *Современные проблемы науки и образования.* — 2016. — № 3. — С. 186—186.
14. *Chatterjee P.* Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy / P. Chatterjee, V. L. Chiasson, K. R. Bounds, B. M. Mitchell // *Front. Immunol.* — 2014. — Sec. Inflammation. — V.5—6 p. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00253>
15. *Vlasova A. N.* Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle / *Vlasova A. N., Saif L. J.* // *Front. Immunol.* — 2021. — 12:643206. doi: 10.3389/fimmu.2021.643206
16. *Shakhov A.* Cytokine pattern in piglets in the early postnatal period / A. Shakhov, L. Sashnina, M. Adodina, E. Mikhaylov, M. Zheyne, *Kopytina K., Syromyatnikov M.* // *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* — 2021. — Т. 10. — № 1. — С. 120—125.
17. *Garofalo R.* Cytokines in human milk / R. Garofalo // *The Journal of pediatrics* — 2010. — Vol. 156. — Is. 2. — P. 36—40.
18. *Hlavova, K.* Phenotype and activation status of T and NK cells in porcine colostrum: central/effector memory cells / K. Hlavova, M. Faldyna, H. Stepanova // *Veterinary Journal.* — 2014. — V. 202 (3). — P. 477—482.
19. *Капталыян О. А., Ушакова Л. Ю.* Цитокины как универсальная система регуляции // *Медицинские новости.* — 2017. — № 9. — С. 3—7.
20. *Сашнина Л. Ю.* Роль цитокинов в обеспечении физиологического течения беременности / Л. Ю. Сашнина, А. Г. Шахов, Ю. Ю. Владимировна, Г. В. Никоненко // *Ветеринарный фармакологический вестник.* — 2022. — № 3(20). — С. 144—161. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2022.3.144. — EDN THSDBM.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- А. Г. Шахов** — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник;
- Л. Ю. Сашнина** — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;
- Ю. Ю. Владимировна** — младший научный сотрудник;
- К. О. Акулова** — младший научный сотрудник;
- Г. В. Никоненко** — младший научный сотрудник;
- Е. А. Андрианов** — профессор кафедры технологического оборудования, процессов перерабатывающих производств, механизации сельского хозяйства и безопасности жизнедеятельности.

Статья поступила в редакцию 06.02.2023 г.

CYTOKINE PROFILE IN SOWS WITH THE RISK OF THE POSTPARTUM PATHOLOGY DEVELOPMENT DURING DIFFERENT PERIODS OF THE REPRODUCTIVE CYCLE

Aleksey Gavrilovich Shakhov*, Larisa Yuryevna Sashnina*✉,
Yuliya Yuryevna Vladimirova*, Kristina Olegovna Akulova*, Galina Vasilyevna Nikonenko*,
Evgeniy Aleksandrovich Andrianov**

*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy,
Voronezh, Russia, e-mail: l.yu.sashnina@mail.ru✉

**Voronezh State Agricultural University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia

Abstract. The article presents the results of the study of the cytokine profile in sows at different periods of the reproductive cycle. In the blood of sows of cross breeds (Large White + Landrace + Duroc) with 3—4 farrowings, 5—7 days before insemination, on days 37—39 and 78—80 of gestation, 5—7 and 18—20 days of lactation, the content of pro-inflammatory cytokines was determined: interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and anti-inflammatory mediators: interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10). It has been established that in animals with a risk of the postpartum pathology development, the cytokine profile compared to that in clinically healthy sows before insemination, during periods of gestation and lactation, is characterized by a relatively high level of pro-inflammatory cytokines and a low content of anti-inflammatory mediators, indicating inflammatory processes throughout the entire reproductive cycle, clinically manifested after farrowing.

Keywords: sows, insemination, gestation, lactation, cytokines, inflammatory processes, postpartum diseases

Numerous researches have been devoted to the study of cytokines, which are regulators of many immunological and physiological processes in humans and animals while maintaining homeostasis and fighting pathogens [1—6]. Participating in the regulation of inflammation and immune response, cytokines protect the body from infectious agents and promote the restoration of damaged tissues [2, 7, 8].

Much attention is paid to the role of cytokines in the mother-placenta-fetus system during the physiological and pathological course of gestation [9—12]. An increase in the expression of pro-inflammatory cytokines in the initial period of gestation [9, 13] and the decisive role of anti-inflammatory mediators IL-4 and IL-10 in ensuring its physiological course have been established [14].

As for the immunology of reproduction, the cytokine profile in animals, there are only a few reports on this problem. A. N. Vlasov et al. [15] have found that in the early stages of gestation in cattle, complex hormonal and immune changes occur and, in particular, the level of cytokines IL-10 and IL-15 increases, and at the end of gestation, immunosuppression is not-

ed and the amount of IFN- γ decreases. A. G. Shakhov et al. [5] have found that in sows at the end of physiological gestation, a relative deficiency of IL-1 β and TNF- α has been recorded, in which suppression of the immune system is observed, and a high level of IFN- γ involved in farrowing, and after farrowing, restoration of IL-1 β , TNF- α and IFN- γ content, a decrease in IL-2 and IL-4 levels, which regulate cellular and humoral immunity, respectively.

The presence of cytokines IL-6, TNF- α , IL-10, IL-4, IFN- γ in the colostrum of farrowing sows and their transmission to offspring have been established [16—18].

The objective of the research is to study the cytokine profile in clinically healthy sows and sows with the risk of the postpartum pathology development in various periods of the reproductive cycle.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out on 12 sows of crossbred breeds (Large White + Landrace + Duroc) with 3—4 farrowings, taken in the experiment in the post-weaning period, in the conditions of an industri-

al pig-breeding complex in Voronezh region. Feeding and keeping conditions of the animals corresponded to the norms stipulated by the industrial technology.

Blood to determine the level of cytokines from sows was taken 5—7 days before insemination, on days 37—39 and 78—80 of gestation, 5—7 and 18—20 days of lactation. The experiment was carried out in accordance with the requirements of the current international and Russian legislative acts (Directive 2010/63/EU dtd. September 22, 2010, the European Convention (ETS123), Strasbourg, 1986), as well as the requirements of the Bioethics Commission of FSBSI “ARVRIPP&T”.

The content of interleukin-1 β (IL-1 β), 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), followed by taking into account the results on the Uniplan-TM spectrophotometer in accordance with the approved instructions for diagnostic kits.

The results of the studies were subjected to a retrospective analysis and, depending on the nature of the course in animals of the postpartum period, were divided into 2 groups. Group I ($n = 5$) included the results of blood tests from sows that remained clinically healthy, group II ($n = 7$) — from animals in which post-

partum diseases were recorded after farrowing (acute purulent-catarrhal endometritis and MMA).

Statistical analysis of the data obtained and the significance of differences were carried out using Statistica 6.0 software (Stat Soft Inc., USA) and Microsoft Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

The cytokine profile in sows with the risk of the inflammatory processes development in the reproductive organs, compared with that in clinically healthy animals before insemination, was characterized by an excess of pro-inflammatory cytokines: IL-1 β — by 17.9 %, IL-2—4.9 %, interferon- γ — 4.3 % and TNF- α — by 16.0 %. At the same time, they recorded a relatively low level of anti-inflammatory cytokines: IL-4 — by 19.2 % and IL-10 — by 9.2 % (Table 1).

During gestation (37—39 days) in sows of both groups, an increase in the level of pro-inflammatory cytokines IL-1 β — by 24.8 and 28.3 % was noted (Table 2); TNF- α — by 24.7 and 36.4 %, IFN- γ — by 14.5 and 20.0 %, necessary for implantation and placentation, while neovascularization and blood supply processes in the endometrium are activated, blood vessels are formed to ensure adequate blood supply to the placenta and fetus [9, 13].

Table 1

Cytokine profile in sows before insemination

Indicators	Group I	Group II
IL-1 β , pg/ml	5.6 \pm 0.12	6.6 \pm 0.15***
IL-2, pg/ml	6.1 \pm 0.18	6.4 \pm 0.12
IL-4, pg/ml	6.1 \pm 0.29	5.2 \pm 0.22*
IL-10, pg/ml	6.3 \pm 0.41	5.7 \pm 0.26
TNF- α , pg/ml	2.5 \pm 0.50	2.9 \pm 0.03
IFN- γ , pg/ml	102.2 \pm 0.22	106.6 \pm 1.16**

* $p < 0.05$

** $p < 0.005$

*** $p < 0.001$ relatively to healthy sows

At the same time, the amount of pro-inflammatory cytokines in the sows of group II was higher than in clinically healthy animals: IL-1 β — by 27.6 %, IL-2 — by 5.6 %, TNF- α — by 28.3 % and IFN- γ — by 9.4 %. Despite the general trend of increasing the content of anti-inflammatory cytokines IL-4 — by 9.3 and 10.5 %, IL-10 — by 8.8 and 3.5 % in sows of both

groups, their number in animals with the risk of the postpartum pathology development was less by 21.2 and 20.6 %.

In the second half of gestation (78—80 days), sows of both groups have shown (Table 2) a decrease in the level of pro-inflammatory cytokines IL-1 β — by 11.7 and 9.7 %, TNF- α — by 17.9 and 12.2 %, IFN- γ —

by 12.7 and 11.5 % against the background of an increase in the concentration of anti-inflammatory mediators IL-4 — by 3.8 and 2.7 % and IL-10 — by 24.1 and 7.3 %, which indicates a shift in the cytokine bal-

ance towards immunosuppressive mediators that inhibit cellular immune responses, have a protective effect on the relationship between mother and fetus and contribute to the physiological course of gestation [19, 20].

Table 2

Cytokine profile in farrowing sows

Indicators	d 37—39		d 78—80	
	I	II	I	II
IL-1β, g/ml	7.0 ± 0.28	8.5 ± 0.25**	6.4 ± 0.36	7.6 ± 0.26*
IL-2, pg/ml	6.0 ± 0.21	6.4 ± 0.10	6.5 ± 0.11	6.7 ± 0.15
IL-4, pg/ml	6.7 ± 0.56	5.7 ± 0.24	7.1 ± 0.23	6.1 ± 0.11**
IL-10, pg/ml	6.8 ± 0.27	5.9 ± 0.30*	7.3 ± 0.18	6.3 ± 0.28*
TNF-α, g/ml	3.0 ± 0.19	3.9 ± 0.33*	2.8 ± 0.21	3.2 ± 0.18*
IFN-γ, pg/ml	117.0 ± 3.66	128.0 ± 1.20*	103.5 ± 2.38	111.7 ± 1.65*

* $p < 0.05$

** $p < 0.005$ relatively to healthy sows

However, in the sows of group II, the level of pro-inflammatory cytokines was higher: IL-1β — by 25.5 %, IL-2 — by 2.9 %, TNF-α — by 19.9 % and IFN-γ — by 7.9 %; and the level of anti-inflammatory cytokines was lower: IL-4 — by 18.8 % and IL-10 — by 7.7 %, indicating predominantly cellular immune responses that have cytotoxic and cytostatic effects, which can be regarded as a preclinical stage of the inflammatory reaction that manifests itself when the body's defense mechanisms are weakened.

Clinical studies in the sows of group II after farrowing recorded acute purulent-catarrhal endometritis and MMA. As a result of the treatment of animals according to the scheme used at the farm, by day 5 of the lactation period, they had no signs of postpartum pathology.

In a comparative analysis of the level of cytokines after farrowing on days 5—7 in recovered animals, there was recorded an increased content of pro-inflammatory cytokines: IL-1β — by 18.0 %, IL-2 — by 16.7 %, TNF-α — by 23.5 %, IFN-γ — by 13.0 %, which play a key role in the regulation of the humoral and cellular mediated immune response, and determine the functional interaction of cells in the implementation of the inflammatory response (Table 3), against the background of a reduced concentration of anti-inflammatory mediators IL-4 and IL-10 — by 3.1 % and 8.1 %, respectively, which indicated a pronounced shift in the balance of cytokine production towards pro-inflammatory, as well as an increased activity of Th-1 type lymphocytes.

Table 3

Cytokine profile in sows after farrowing

Indicators	d 5—7 of lactation		d 18—20 of lactation	
	I	II	I	II
1	2	3	4	5
IL-1β, pg/ml	7.0 ± 0.22	8.2 ± 0.45*	6.2 ± 0.23	7.2 ± 0.28*
IL-2, pg/ml	6.3 ± 0.22	7.3 ± 0.33*	6.1 ± 0.18	6.8 ± 0.29*
IL-4, pg/ml	6.7 ± 0.26	6.5 ± 0.21	6.8 ± 0.12	5.2 ± 0.14***

Table 3 (the end)

1	2	3	4	5
IL-10, pg/ml	7.4 ± 0.38	6.8 ± 0.32	7.2 ± 0.21	7.0 ± 0.17
TNF-α, pg/ml	2.8 ± 0.33	3.4 ± 0.39	2.3 ± 0.21	3.0 ± 0.32
IFN-γ, pg/ml	101.9 ± 1.37	115.1 ± 1.94***	101.6 ± 1.91	107.6 ± 1.50*

* $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.001$ relatively to healthy sows

On day 18—20 of lactation in sows of both groups, the content of pro-inflammatory cytokines IL-1β decreased by 10.8 and 12.2 %, IL-2 — by 3.5 and 7.8 %, TNF-α — by 15.5 and 12.9 %, and in recovered animals, in addition, IFN-γ — by 7.0 % and anti-inflammatory mediator IL-4 — by 25.9 % with a slight increase in the amount of IL-10. At the same time, in the animals of group II, the level of pro-inflammatory cytokines was higher: IL-1β — by 16.1 %, IL-2 — by 12.8 %, TNF-α — by 27.4 % and IFN-γ — by 5.9 %, and anti-inflammatory IL-4 was lower by 23.4 %, which indicated the activation of Th-1 type T-lymphocytes and suppression of the secreting function of Th-2 type T-lymphocytes and indicated residual effects of past diseases. Probably, a longer period is required for the complete restoration of the nature of pro- and anti-inflammatory mediators production in immunocompetent cells and the normalization of the activity of T-helpers.

CONCLUSION

The studies have shown that in sows with the risk of the postpartum diseases development, such as acute postpartum endometritis and mastitis-metritis-agalactia, clinically manifested after farrowing, during gestation there are differences with clinically healthy animals in the cytokine status in the form of an increased content of pro-inflammatory mediators and a reduced serum levels of anti-inflammatory cytokines. The revealed features of the cytokine profile during gestation can serve as markers for the postpartum pathology development and can be used to predict the onset of postpartum diseases and develop preventive measures using drugs for the pharmacological correction of the immune status.

REFERENCES

1. Parakhonskiy A. P. Role of cytokines in the pathogenesis of diseases / A. P. Parakhonskiy // *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* (Successes of modern natural science). — 2005. — No. 4. — P. 63—64. — EDN IJFNOP

2. Ketlinskiy S. A. Cytokines / S. A. Ketlinskiy, A. S. Simbirtsev // St. Petersburg: Foliant Publishing LLC. — 2008. — 552 p.

3. Litvinova L. S. Peculiarities of cellular immunity and cytokine repertoire in patients with metabolic syndrome / L. S. Litvinova, E. V. Kirienkova, N. N. Aksenova, N. D. Gazatova, P. A. Zatolokin // *Bulletin of Siberian medicine*. — 2012. — V. 11. — No. 3. — P. 53—57.

4. Prokulevich V. A. Veterinary drugs based on interferon / V. A. Prokulevich, M. I. Potapovich // *Vestnik BGU* (Bulletin of BSU). — 2011. — No. 3. — P. 51—54.

5. Shakhov A. G. Cellular immunity and cytokine profile in sows before farrowing and during lactation / A. G. Shakhov, S. V. Shabunin, L. Yu. Sashnina [et al.] // *Veterinariya segodnya* (Veterinary science today). — 2019. — No. 3(30). — P. 15—22. — DOI 10.29326/2304-196X-2019-3-30-15-18.

6. Narovlyanskiy A. N. Interferons: Promising areas of research / A. N. Narovlyanskiy, F. I. Ershov, A. L. Gintsburg // *Immunologiya* (Immunology). — 2013. — No. 4. — P. 168—172.

7. Simbirtsev A. S. Cytokines: classification and biological functions / A. S. Simbirtsev // *Tsitokiny i vospalenie* (Cytokines and inflammation). — 2004. — V. 3. — No. 2. — P. 16—22.

8. Stashkevich D. S. Topical issues of immunology: cytokine system, biological significance, genetic polymorphism, methods of determination: textbook [Text] / D. S. Stashkevich, Yu. Yu. Filippova, A. L. Burmistrova // Chelyabinsk: Tsitsero. — 2016. — 82p.

9. Veropotvelyan P. N. Cytokines in the mother-placenta-fetus system in the physiological and pathological course of gestation / N. P. Veropotvelyan, I. V. Guzhevskaya // *Zdorovye zhenshchiny* (Women's health). — 2013. — No. 1. — P. 126—126.

10. Nefedova D. D. Immunological aspects of pregnancy (literature review) / D. D. Nefedova, V. A. Linde, M. A. Levkovich // *Meditinskiy vestnik Yuga Rossii* (Medical Bulletin of the South of Russia). — 2013. — No. 4. — P. 16—21.

11. *Shestopalov A. V.* The level of pro-inflammatory (IL-1, TNF α) and anti-inflammatory (IL-1ra, TFR β) cytokines in women with physiological pregnancy, with Cesarean delivery / A. V. Shestopalov, Yu. A. Miroshnichenko, A. N. Rymashevskiy, N. M. Dobaeva // *Fundamentalnye issledovaniya (Fundamental research)*. — 2014. — No. 4—2. — P. 402—406.
12. *Kruglyakova M. V.* Characteristics of the cytokine profile in case of physiological and complicated pregnancy / M. V. Kruglyakova, O. V. Smirnova, N. M. Titova // *International Scientific and Practical Conference "Culture, Science, Education: Problems and Prospects"*. — 2021. — Vol. 1. — No. 1. — P. 548—555.
13. *Levkovich M. A.* Immunological aspects of the problem of miscarriage / M. A. Levkovich, D. D. Nefedova, L. D. Tsaturyan, E. M. Berdichevskaya // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya (Modern problems of science and education)*. — 2016. — No. 3. — P. 186—186.
14. *Chatterjee P.* Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy / P. Chatterjee, V. L. Chiasson, K. R. Bounds, B. M. Mitchell // *Front. Immunol.* — 2014. — Sec. Inflammation. — V. 5—6 p. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00253>
15. *Vlasova A. N.* Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle / *Vlasova A. N., Saif L. J.* // *Front. Immunol.* — 2021. — 12:643206. doi: 10.3389/fimmu.2021.643206
16. *Shakhov A.* Cytokine pattern in piglets in the early postnatal period / A. Shakhov, L. Sashnina, M. Adodina, E. Mikhaylov, M. Zheyne, *Kopytina K., Syromyatnikov M.* // *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. — 2021. — V. 10. — No. 1. — P. 120—125.
17. *Garofalo R.* Cytokines in human milk / R. Garofalo // *The Journal of pediatrics* — 2010. — Vol. 156. — Is. 2. — P. 36—40.
18. *Hlavova, K.* Phenotype and activation status of T and NK cells in porcine colostrum: central/effector memory cells / K. Hlavova, M. Faldyna, H. Stepanova // *Veterinary Journal*. — 2014. — V. 202 (3). — P. 477—482.
19. *Kashtalyan O. A., Ushakova L. Yu.* Cytokines as a universal system of regulation // *Meditinskije novosti (Medical News)*. — 2017. — No. 9. — P. 3—7.
20. *Sashnina L. Yu.* Role of cytokines in a physiological course of pregnancy / L. Yu. Sashnina, A. G. Shakhov, Yu. Yu. Vladimirova, G. V. Nikonenko // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2022. — No. 3 (20). — P. 144—161. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2022.3.144. — EDN THSDBM.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- A. G. Shakhov** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Chief Scientific Associate;
- L. Yu. Sashnina** — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;
- Yu. Yu. Vladimirova** — Junior Scientific Associate;
- K. O. Akulova** — Junior Scientific Associate;
- G. V. Nikonenko** — Junior Scientific Associate;
- E. A. Andrianov** — Doctor of Agricultural Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Technological Equipment, Processing Industries Processes, Agricultural Mechanization and Life Safety.

The article was submitted 06.02.2023

Научная статья

УДК 535.343.32:577.322.5

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.1.139

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ КРЫС ПО ПАРАМЕТРАМ ОСМОТИЧЕСКИХ ЭРИТРОГРАММ

Аймен Аяд Вели, Валерий Юрьевич Сулин[✉], Алла Витальевна Мартынова,
Павел Андреевич Паршин, Галина Анатольевна Востроилова,
Татьяна Игоревна Ермакова, Елена Юрьевна Вели

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, e-mail: sulinvu@mail.ru[✉]*

Аннотация. С использованием спектрофотометрического метода проведены регистрация и анализ кинетики гипоосмотического гемолиза периферической крови 12 беспородных крыс-самцов. Гипоосмотические условия создавали путем половинного разведения исходной суспензии эритроцитов в изотоническом растворе с оптической плотностью $D = 0.8$ при $\lambda = 490$ нм растворами NaCl с концентрациями 0.10 %, 0.12 %, 0.14 %, 0.16 %, 0.18 %, 0.20 % и дистиллированной водой. Гемолиз эритроцитов регистрировали в течение 30 мин при длине волны $\lambda = 490$ нм с использованием аналого-цифрового преобразователя E-154 фирмы L—Card. Установлено, что критическая точка осмотической резистентности интактных эритроцитов периферической крови крыс соответствует 0.55 %-0.54 % растворам NaCl. В этих условиях эритроциты находятся в состоянии сферуляции (в предгемолитической стадии) и могут служить удобной биологической моделью для оценки активности фармакологических препаратов, мембрано- и цитотоксичности ксенобиотиков. По результатам однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) установлены достоверные различия в среднем относительном количестве гемолизированных клеток в инкубационных растворах разной гипоосмолярности. Выявленные различия гипоосмотической резистентности эритроцитов обусловлены их структурно-функциональными свойствами, могут служить критериями оценки их популяционного состава и накопленных скрытых повреждений плазмолеммы.

Ключевые слова: эритроциты, эритрограмма, периферическая кровь, структурно-функциональные свойства эритроцитов, плазмолемма, гипоосмотический гемолиз, гипоосмотическая резистентность, крысы

Изучение структурно-функциональных свойств эритроцитов крови лабораторных и сельскохозяйственных животных в настоящее время актуально, поскольку метаболические процессы, протекающие в форменных элементах крови, являются интегральным отражением реакции организма на действие стрессорных и патогенных факторов на клеточном и тканевом уровнях [6, 10].

В клинико-диагностических и фармакологических исследованиях эритроцит представляет собой удобную биологическую модель для проведения токсикологического анализа и изучения патогенетических механизмов при развитии разнообразных патологий [1, 4, 5, 7, 8].

По мнению ряда авторов, плазмолемма эритроцитов является структурным компонентом, вовлеченным во все процессы их жизнедеятельности. Морфологические и биохимические перестройки плазмолеммы в течение жизненного цикла эритроцита являются элементами адаптационных механизмов, позволяющих поддерживать клеточный гомеостаз и функциональную активность этих форменных элементов на протяжении их четырехмесячного пребывания в кровотоке [1].

Установлено, что структура и целостность цитоплазматической мембраны определяет вязкоэластические свойства эритроцитов, их деформируемость. Уникальную двояковогнутую форму

и пластические свойства нормоцитов обеспечивают особый цитоскелет, белки которого играют связующую роль с компонентами мембраны и цитоплазмы [14, 16, 20].

Белок полосы 3 (band3, анионообменник AE1, SLC4A1 — solute carrier family 4 member 1) является одним из основных белков цитоскелета. Цитоплазматический N-домен band3 через анкирин

связывает белки цитоскелета с цитоплазматической мембраной и имеет сайты связывания с оксигемоглобином и гликолитическими ферментами.

Мембранный C-домен может выполнять функции анионного канала (AE1, anion exchanger 1), обеспечивая обмен бикарбонат-ионов на Cl^- , а также транспорт O_2 , CO_2 , глюкозы, сульфатов, оксалатов, NO и воды [1, 18] (рис. 1).

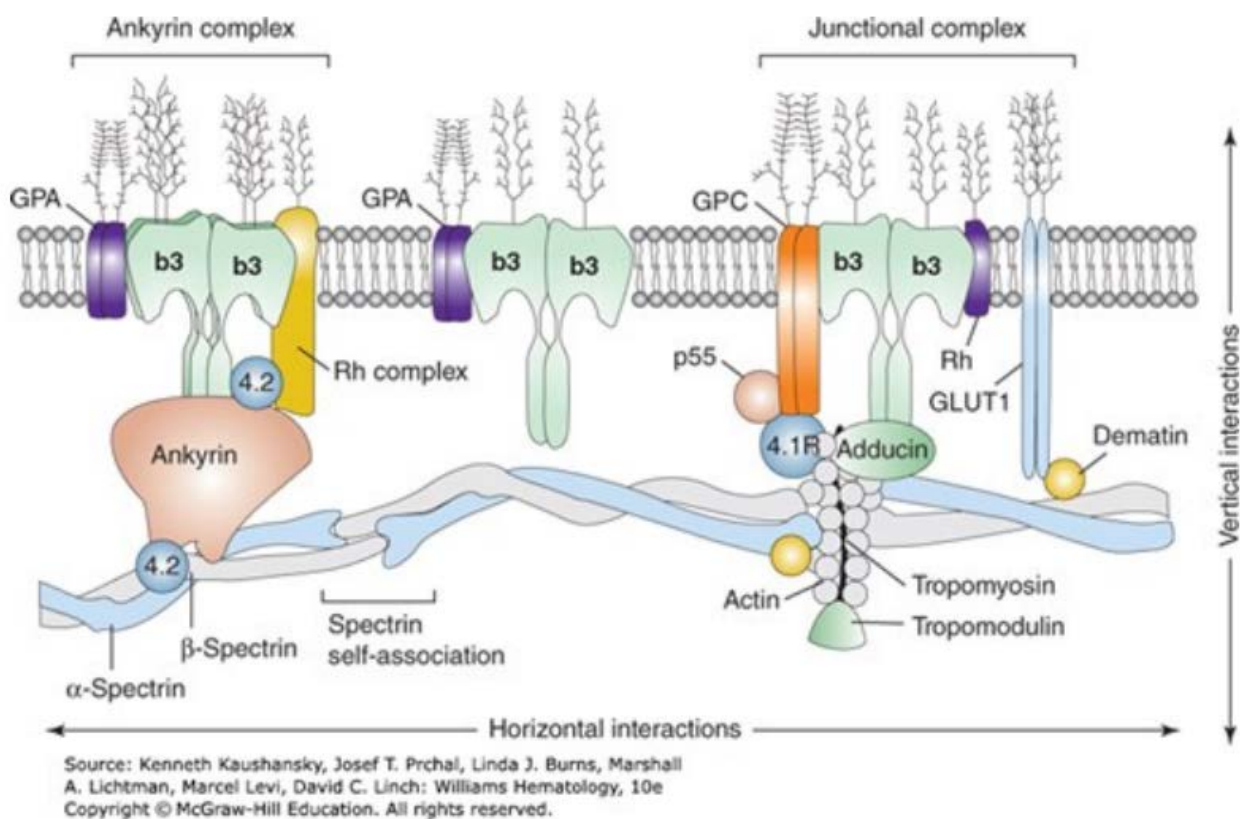


Рис. 1. Схема строения мембраны эритроцита [26, С. 1433]:

b3 — белок полосы 3, band3, AE1; GPA, GPC — гликофорины А и С; Rh complex — изоантиген резус-фактора; Glut1 — транспортер глюкозы; p55, 4.1, 4.2 — белки цитоскелета мембраны

Устойчивость эритроцитов к осмотическому давлению получила название осмотической резистентности. Согласно общепринятому представлению о коллоидно-осмотическом лизисе клеток, при помещении эритроцитов в гипосмотические условия сначала происходит их сферуляция (swelling), за которой следует собственно гемолиз (porring, лопание по Жау А.) при котором происходит высвобождение внутриклеточного материала (ионов и гемоглобина) через дефекты мембраны или отверстия [3, 18, 23, 24].

Как показали результаты исследований ряда авторов, процесс сферуляции (гидратации) эритроцитов определяется свойствами и активностью мембранных ионных транспортных систем (Na^+/K^+ -

АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы, Na^+/H^+ -помпы, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -транспортера, потенциал-зависимых анионных каналов) и аквапориновых водных каналов (AQP1 и AQP3) [15, 22]. Скорость гипоосмотического гемолиза зависит от исходного объема эритроцитов, площади поверхности и структурно-функциональных свойств плазмолеммы [17, 22].

На основе результатов исследования молекулярно-клеточных механизмов осмотической резистентности эритроцитов было сделано предположение, что гипотонический гемолиз клеток обусловлен формированием в эритроцитарных мембранах гемолитических пор размером не менее 300 нм, в образовании которых участвуют молекулы band3 (рис. 2) [11, 12, 23, 24].

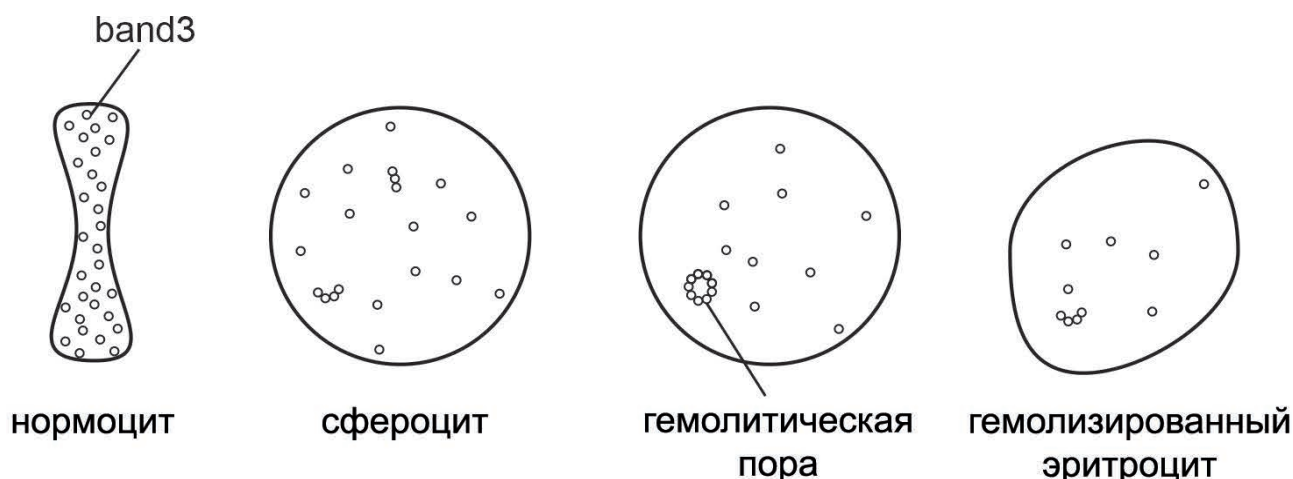


Рис. 2. Схема гипотонического гемолиза эритроцитов [по 23, с изменениями]

В современных исследованиях достаточно широко используется спектрофотометрический метод оценки структурно-функциональных свойств эритроцитов человека и животных по конечной точке (end point method): по степени гемолизированных клеток при их инкубации в течение 20—30 минут в гипотонических растворах с разной концентрацией NaCl [2, 7, 9].

Цель нашей работы заключалась в исследовании кинетических параметров гипотонического гемолиза эритроцитов цельной крови крыс с использованием цифровой спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 12 беспородных лабораторных крысах-самцах массой 180—200 г, которых содержали в виварии при свободном доступе к воде и пище.

Кровь в объеме до 100 мкл отбирали из хвостовой вены крысы с помощью инсулинового шприца, предварительно промытого гепарином (5000 ЕД/мл), и помещали в 100 мл физиологического раствора (0.9 % NaCl) с pH = 7.4.

Для создания оптимальной pH использовали 0.1 ммоль фосфатный буфер (K_2HPO_4 и KH_2PO_4). Суспензию эритроцитов доводили физиологическим раствором до оптической плотности, равной 0.8 при $\lambda = 490$ нм.

Кинетику осмотического гемолиза эритроцитов изучали с помощью методики автоматической регистрации интегральных эритрограмм. Для регистрации эритрограмм использовали аппаратно-программный комплекс, включающий:

— фотоэлектроколориметр ФЭК-56М со встроенным дифференциальным усилителем;

— аналого-цифровой преобразователь E-154 фирмы L—Card;

— ЭВМ;

— цифровой вольтметр Mastech Mas830L.

Частота опроса АЦП составляла 10 Гц, регистрацию и запись эритрограмм осуществляли с помощью программы LGraph2 фирмы L—Card.

Гемолиз эритроцитов осуществляли в кюветках с размерами $20 \times 40 \times 10$ мм и рабочим объемом 4 мл. Измерение светопропускания проводили при длине волны $\lambda = 490$ нм с использованием светофильтра N5, т. к. в этой области коэффициент молярной экстинкции HbO_2 минимален. При использовании данного спектрофотометрического метода регистрировали не сам гемолиз, а повреждение мембран эритроцитов: светорассеяние суспензии эритроцитов менялось за счет разрушения мембран и цитоскелета клеток.

Взвесь эритроцитов для изучения осмотической резистентности получали методом половинного разведения исходного раствора клеток крови в 0.9 % NaCl ($D = 0.8$ при $\lambda = 490$ нм) соответствующими гипотоническими растворами хлорида натрия (табл. 1) с помощью механического дозатора Biohit с постоянным объемом 2000 мкл.

За 100 % гемолиз принимали величину светорассеяния суспензии эритроцитов в 0.45 % (77.0 ммоль/л) растворе NaCl, которую измеряли через 5 мин. после добавления 100 мкл 0.1N раствора HCl. В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов в 0.9 % растворе NaCl.

Для анализа структурно-функциональных свойств эритроцитов использовали интегральную эритрограмму, которая отображает процесс изменения количества подвергнутых гемолизу клеток в единицу времени ($G = f(t)$, %, рис. 3).

Таблица 1

Получение инкубационных гипосмотических растворов путем половинного разведения исходного раствора эритроцитов

Концентрация исходного физиологического раствора (% / ммоль/л)	Концентрация гипосмотического раствора для разведения (%)	Концентрация инкубационного раствора (% , ммоль/л)
0,9 / 154,0	0,10	0,50 / 85,55
	0,12	0,51 / 87,26
	0,14	0,52 / 88,98
	0,16	0,53 / 90,69
	0,18	0,54 / 92,40
	0,20	0,55 / 94,11

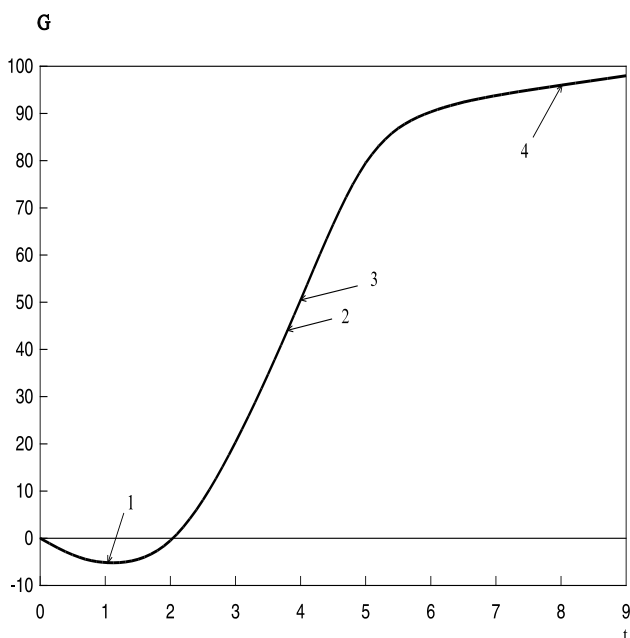


Рис. 3. Интегральная кривая осмотического гемолиза эритроцитов:

1 — фаза сферуляции, 2 — максимальная скорость гемолиза (V_{max}), 3 — время 50 % гемолиза (t_{50}), 4 — конечная фаза гемолиза. По оси абсцисс — время гемолиза (мин). По оси ординат — степень гемолиза эритроцитов (%)

Структурно-функциональное состояние эритроцитов оценивали по следующим параметрам интегральной эритрограммы:

$t_{лат}$ — латентное время гемолиза (с);

$G_{сф}$ — относительное количество сфероцитов (%);

G_{30} , G_{120} , G_{180} , G_{300} — относительное количество гемолизированных клеток за 30 с, 120 с, 180 с и 300 с инкубации (%);

$G_{ср}$ — среднее относительное количество гемолизированных клеток (%) за период инкубации в диапазоне 1200÷1800 с (20÷30 мин).

Данный метод позволяет регистрировать и анализировать изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов с высокой точностью ($G \pm 0.1\%$, с точностью до секунды).

Статистическая обработка зарегистрированных показателей включала расчет средних значений (M , mean) и среднего квадратического отклонения (SD , standard deviation, стандартного отклонения). Для определения статистически значимых различий между анализируемыми средними значениями использовали результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) [13]. Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенных исследований установлено, что при инкубации эритроцитов в 0.54 % растворе NaCl происходила сферуляция эритроцитов, которая в среднем составила около 4 % относительной величины светорассеяния. Степень сферуляции эритроцитов в 0.55 % гипосмотическом растворе NaCl не превышала одного процента (рис. 2).

За 30 минут инкубации эритроцитов крови крыс в гипосмотической среде средний процент гемолизированных эритроцитов ($G_{ср}$) составил 45.44 % в 0.50 % растворе NaCl, 23.20 % — в 0.51 % растворе NaCl; 15.74 % — в 0.52 % растворе NaCl и около 4 % — в 0.53 % растворе хлорида натрия (рис. 4).

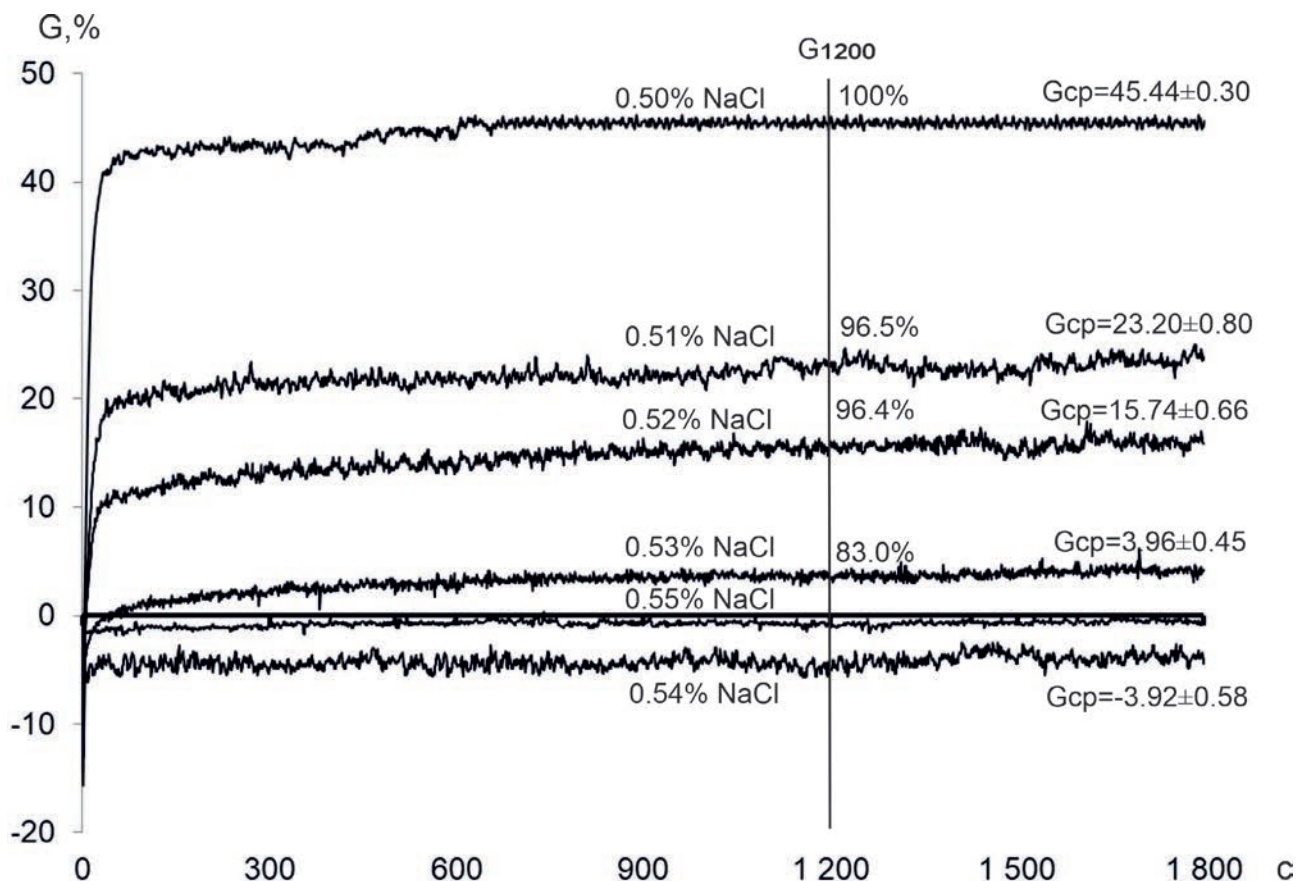


Рис. 4. Кинетика осмотического гемолиза эритроцитов крови крыс за 30 минут инкубации:

G_{cp} — среднее относительное количество гемолизированных клеток (%) за период инкубации в диапазоне 1200÷1800 с (10÷30 мин), G_{1200} — процент гемолизированных клеток за 20 мин инкубации относительно G_{cp}

По результатам проведенного однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) средних значений гемолизированных клеток в разных гипосмотических условиях расчетный F-критерий зна-

чительно превышал критическое значение F для уровня значимости $p < 0.001$ при соответствующих степенях свободы (df, табл. 2).

Таблица 2

Результаты однофакторного дисперсионного анализа средних значений гемолизированных эритроцитов крови исследуемых крыс

Источник вариации	SS	df	MS	F	F критическое
Между группами	22338,94	5	4467,79	44111,21	2,342
Внутри групп	7,29	72	0,101		
Итого	22346,23	77			

Обозначение: SS — сумма квадратов (Sum of Squares), df — степень свободы (degrees of freedom), MS — средняя суммы квадратов (Mean Square), F — критерий Фишера.

Следовательно, в диапазоне концентраций от 0.55 % до 0.50 % NaCl за 30 минут инкубации среднее относительное количество гемолизированных

клеток крови интактных крыс достоверно отличалось ($p < 0.001$) в зависимости от гипосмотических условий.

Анализируя кривую гемолиза, можно отметить, что в гипоосмотической среде в процесс гемолиза эритроциты крови крыс в основном вовлекались в первые 120 с от начала инкубации. Количество

гемолизированных эритроцитов (G_{120}) к этому моменту составило 93.9 %, 84.2 %, 67.2 % и 28.8 % от средних значений (G_{cp}) в диапазоне концентраций NaCl от 0.50 % до 0.53 %, соответственно (рис. 5).

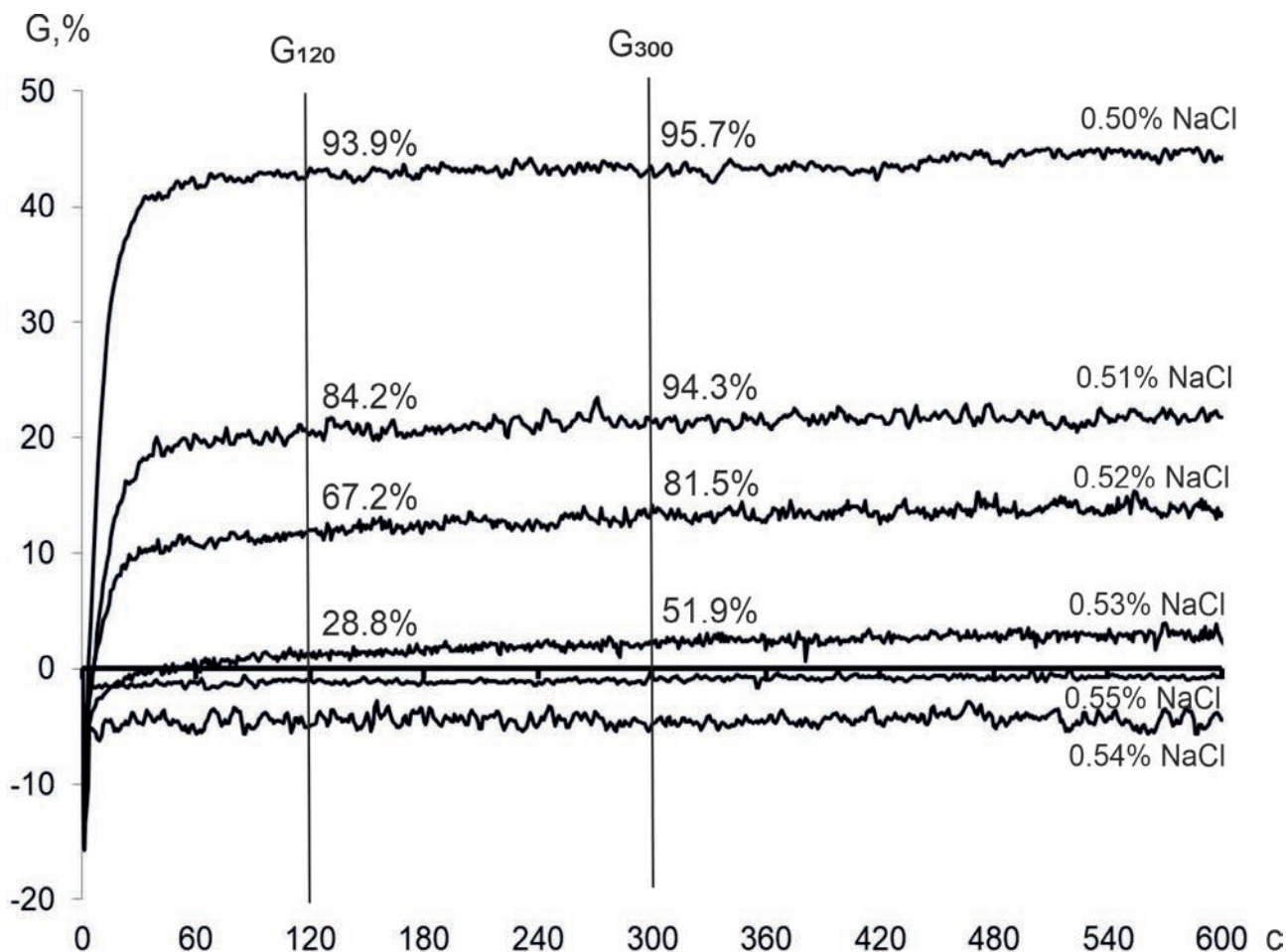


Рис. 5. Кинетика осмотического гемолиза эритроцитов крови крыс за 5 минут инкубации

Скорость гемолиза зависела от концентрации гипоосмотического раствора и была максимальной при 0.50 % NaCl.

Анализируя эритрограммы в начальный период гемолитического процесса (первые 30 с инкубации), установлено, что добавление гипоосмотических растворов к суспензии эритроцитов вызывало сферуляцию, степень которой зависела от величины снижения осмолярности раствора и была максимальной в 0.50 % растворе NaCl ($G_{сф} = -15.5$ %, рис. 6).

Время начала гемолиза ($t_{лат}$), которое является мерой стойкости эритроцитов, также зависело от концентрации гипоосмотических растворов и было минимально (составило 4 с) в 0.50 % растворе NaCl. В 0.53 % растворе хлорида натрия время начала гемолиза эритроцитов составляло 56—60 с.

За 30 с инкубации эритроцитов в гипоосмотических растворах процент разрушенных клеток от G_{cp} составил 87.9 % в 0.50 % NaCl, 71.8 % — в 0.51 % NaCl и 59.0 % — в 0.52 % NaCl.

Основные кинетические параметры гипоосмотического гемолиза нормальных эритроцитов крови крыс-самцов представлены в таблице 3.

На основе результатов анализа кинетических параметров осмотического гемолиза интактных эритроцитов периферической крови крыс можно выделить популяции низко-, средне- и высокостойких эритроцитов (рис. 7).

Таким образом, инкубация в гипоосмотических растворах с разной концентрации NaCl позволила дифференцировать и количественно оценить структурно-функциональные свойства эритроцитов по их степени осмотической резистентности.

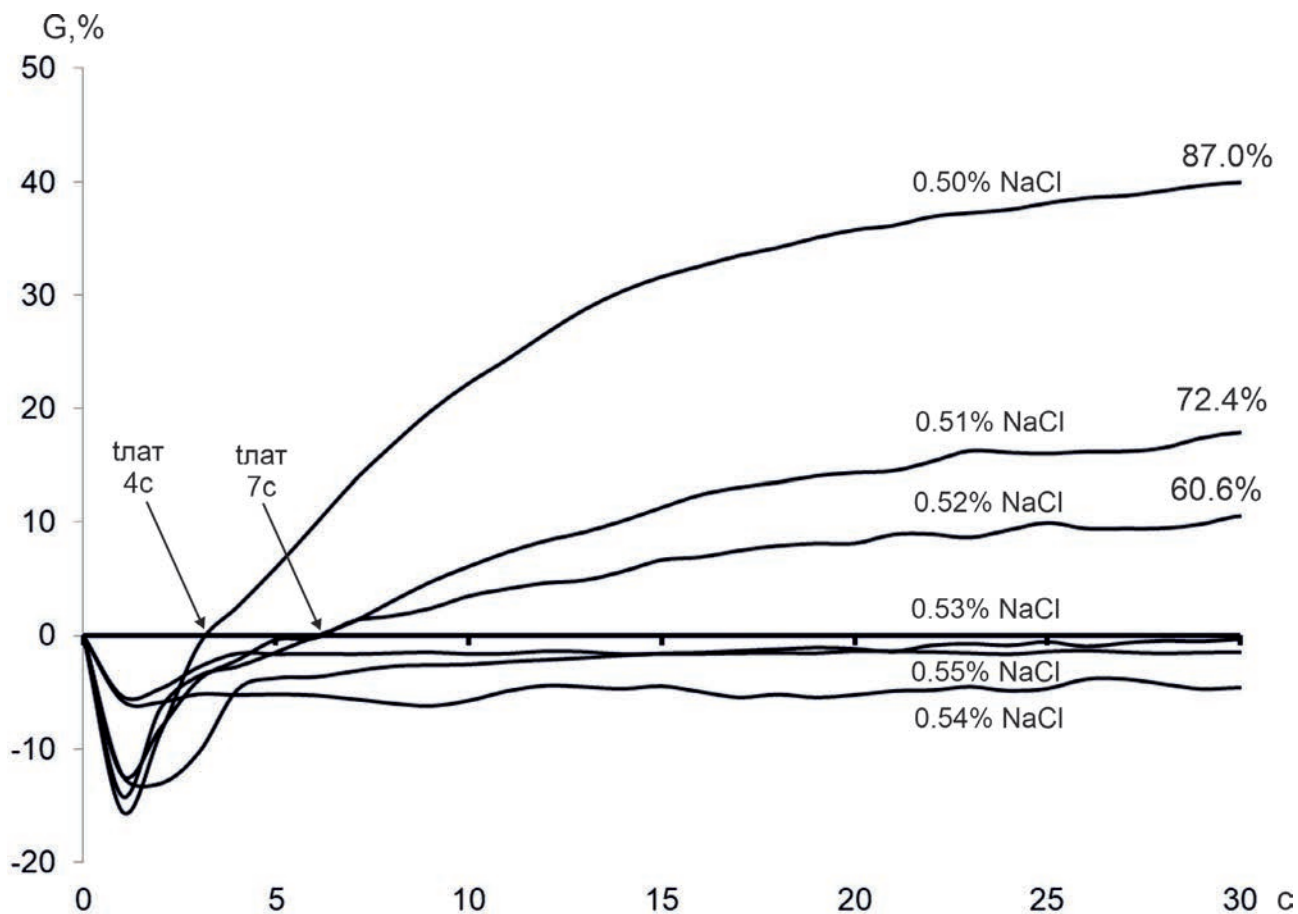


Рис. 6. Кинетика осмотического гемолиза эритроцитов крови крысы за 30 с инкубации

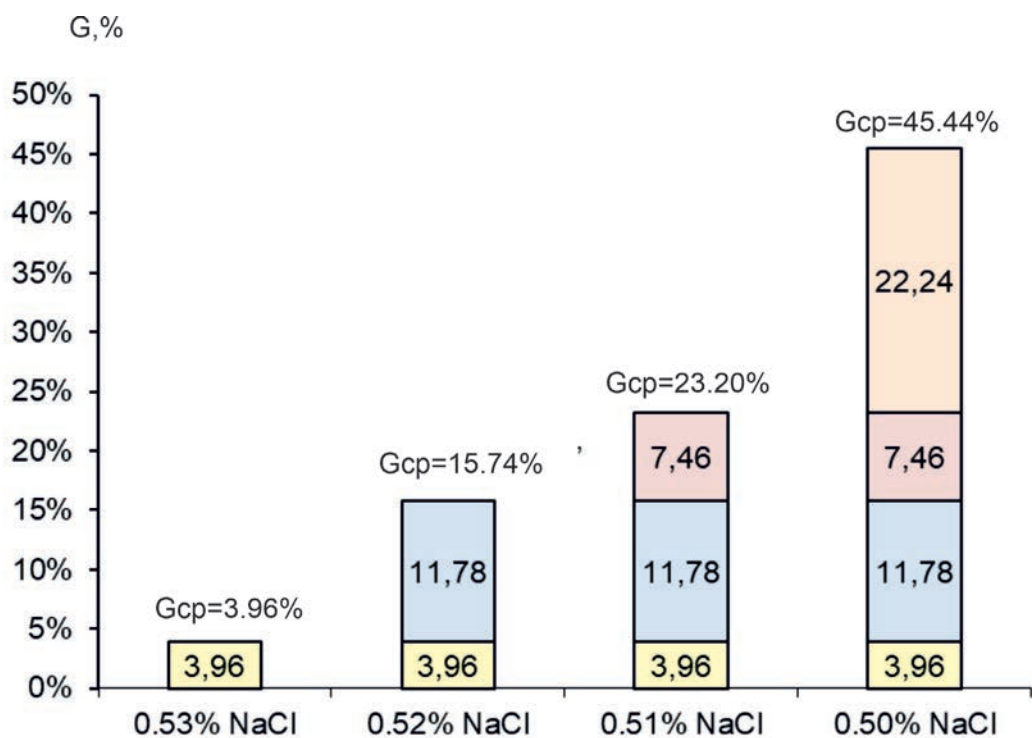


Рис. 7. Популяционный состав интактных эритроцитов периферической крови крысы по степени осмотической резистентности

Таблица 3

Основные кинетические параметры осмотического гемолиза нормальных эритроцитов

Раствор инкубации (%; ммоль/л)	$G_{сф\max}$ (%)	$T_{лат}$ (с)	$G_{30}/G_{30отн}$ (%/%)	$G_{120}/G_{120отн}$ (%/%)	$G_{180}/G_{180отн}$ (%/%)	$G_{300}/G_{300отн}$ (%/%)	$G_{ср}, G_{сф} \pm SE$ (%)
1	2	3	4	5	6	7	8
0.50 %, 85.55 ммоль/л	15,5	4	39,53/87,0	42,66/93,9	42,94/94,5	43,48/95,7	45,44 ± 0,30
0.51 %, 87.26 ммоль/л	14,2	7	16,87/72,4	19,72/85,0	20,30/87,5	21,88/94,3	23,20 ± 0,80
0.52 %, 88.98 ммоль/л	13,0	7	9,54/60,6	10,86/69,0	11,88/75,5	12,83/81,5	15,74 ± 0,66
0.53 %, 90.69 ммоль/л	12,3	52	—	1,34/34,0	1,57/39,6	2,06/51,9	3,96 ± 0,45
0.54 %, 92.40 ммоль/л	6,2	—	—	—	—	—	-3,92 ± 0,58
0.55 %, 94.11 ммоль/л	1,8	—	—	—	—	—	-0,65 ± 0,21

Примечание: $t_{лат}$ — время латентного периода гемолиза (с); $G_{сф\max}$ — максимальное количество сфероцитов (%); $G_{сф}$ — среднее количество сфероцитов (%); $G_{30}, G_{120}, G_{180}, G_{300}$ — количество гемолизированных клеток за 30 с, 120 с, 180 с и 300 с инкубации (%); $G_{30отн}, G_{120отн}, G_{180отн}, G_{300отн}$ — количество гемолизированных клеток за 30 с, 120 с, 180 с и 300 с инкубации в % от $G_{ср}$; $G_{ср}$ — среднее относительное количество гемолизированных клеток за период инкубации в диапазоне 1200÷1800 с (10÷30мин) (%)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам наших исследований инкубация суспензии эритроцитов периферической крови крыс в течение 30 мин в 0.50 % растворе NaCl не вызывала 100 % гемолиза. С одной стороны, это можно объяснить изменением осмомолярности инкубационного раствора в процессе гемолиза низко- и среднестойких клеток. С другой стороны, отсутствие гемолиза высокостойких эритроцитов может быть обусловлено таким структурно-функциональным состоянием плазмолеммы эритроцитов, при котором не происходит образования гемолитической поры за счет ассоциации молекул band3. Можно предположить, что высокорезистентными клетками являются молодые эритроциты, не имеющие структурно-функциональных повреждений.

Известно, что в течение 3—4 месячного периода жизни эритроцитов в кровотоке происходит их естественное старение, вызванное процессами свободно-радикального окисления, воздействием провосполительных и иных мембрано- и цитотоксических факторов [21, 25]. Учитывая, что ге-

молиз эритроцитов в наших исследованиях развивался в первые 120 с начала инкубации, можно предположить, что в гемолитический процесс вовлекались клетки, уже имеющие «скрытые» повреждения плазмолеммы или такие ее изменения, которые способствовали ассоциации band3 в гемолитическую пору. Таким образом, используемый нами кинетический метод определения осмотической резистентности клеток позволяет оценивать популяционный состав эритроцитов периферической крови с учетом их возрастных и иных физико-химических изменений.

По результатам наших исследований установлено, что критическая точка осмотической резистентности нормальных эритроцитов крови крыс соответствует 0.55—0.54 % растворам NaCl. Находясь в этих условиях в предгемолитическом состоянии, эритроциты обладают максимальной чувствительностью к действию различных физико-химических факторов и являются удобной биологической моделью для исследования мембрано- и цитотоксичности.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Боронихина Т. В.* Плазмолемма эритроцитов и ее изменения в течение жизни клеток / *Боронихина Т. В., Ломановская Т. А., Яцковский А. Н.* // Журнал анатомии и гистопатологии. 2021; 10(2): 62—72. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-62-72.
2. Влияние цефтриаксона на морфофункциональное состояние эритроцитов доноров / *А. К. Кондакова, Г. А. Семко, Е. В. Левицкая, В. Н. Цымбал* // Дерматология та венерология. — 2020. — № 2(88). — С. 35—37.
3. *Гительзон И. И.* Факторы, влияющие на стойкость эритроцитов в сосудистом русле / *И. И. Гительзон, И. А. Терсков* // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. — Красноярск, 1961. — Вып. 2. — С. 11—29.
4. *Голубева М. Г.* Осмотическая резистентность эритроцитов, методы определения и коррекции, значение при различных патологиях / *М. Г. Голубева* // Успехи современной биологии. — 2019. — Т. 139. — № 5. — С. 446—456.
5. Изучение структурных свойств эритроцитов крови у новорожденных при нарушении периода адаптации / *Н. А. Манылова, С. Г. Резван, К. В. Агаева, И. И. Логвинова* // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. — 2008. — Т. 7. — № 4. — С. 948—951.
6. Исследование спектров поглощения водных растворов гемоглобина новорожденных свиней / *В. В. Образцова, А. В. Вели, В. Ю. Сулин [и др.]* // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2022. — № 1(18). — С. 148—161. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2022.1.148.
7. *Ланкин В. З.* Гипоосмотический гемолиз эритроцитов активными формами карбониллов / *В. З. Ланкин, Е. М. Белова, А. К. Тихазе* // Биофизика. — 2017. — Т. 62. — № 2. — С. 325—329.
8. Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз / *С. П. Чумакова, О. И. Уразова, А. П. Зима, В. В. Новицкий* // Гематология и трансфузиология. — 2018. — Т. 63, № 4. — С. 343—351. — DOI 10.25837/HAT.2019.51.80.003.
9. *Петрова Н. Б.* Осмотическая резистентность эритроцитов человека при действии фуросемида и бета-адреноблокатора пропранолола / *Н. Б. Петрова, А. Е. Терентьева* // Вестник Сыктывкарского университета. Серия 2: Биология. Геология. Химия. Экология. — 2021. — № 3(19). — С. 18—25. — DOI 10.34130/2306—6229—2021—3—18.
10. Роль фактора HIF-1A в развитии гипоксии плода / *М. Ю. Сыромятников, Е. В. Михайлов, Н. В. Пасько [и др.]* // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 3(12). — С. 196—206. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.3.196.
11. *Руденко С. В.* Влияние некоторых β -блокаторов на гипотонический гемолиз эритроцитов / *С. В. Руденко, М. К. Саид, Е. Л. Воловельская* // Проблемы криобиологии. — 2010. — Т. 20, № 1. — С. 7—17.
12. *Тарасов П. А.* Определение характеристических параметров эритроцитов методами динамической проточной цитометрии: дис. ... канд. физ. — мат. наук: 03.00.02 / *П. А. Тарасов.* — Красноярск, 2005. — 110 с.
13. *Тюрин Ю. Н.* Анализ данных на компьютере: учебное пособие / *Ю. Н. Тюрин, А. А. Макаров.* — М.: МЦНМО, 2016. — 368 с.
14. Уремический синдром вызывает нарушение деформационно-функциональных характеристик эритроцитов у пациентов хронического гемодиализа / *Ю. А. Борисов, Ю. С. Судницына, Т. Д. Власов [и др.]* // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. — 2020. — Т. 106. — № 8. — С. 1025—1040. — DOI 10.31857/S0869813920080038.
15. *Gallagher P. G.* Disorders of erythrocyte hydration / *Patrick G. Gallagher* // Blood. — 2017. — Vol. 130, N. 2. — P. 2699—2708. — DOI 10.1182/blood-2017—04—590810
16. *Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W. W., Schiffelers R. M., Kaestner L., van Wijk R.* Squeezing for Life — Properties of Red Blood Cell Deformability. Front. Physiol. 9:656. 2018.
17. *Islah L.* Study of Incubation Conditions for Erythrocytes Osmotic Fragility Testing in Dromedary Camel (*Camelus dromedarius*) / *L. Islah [et al.]* // International Journal of Research in Environmental Science (IJRES). — 2016. — Vol. 2, N. 2. — P. 22—32. — <http://dx.doi.org/10.20431/2454—9444.0202004>
18. *Jay A. W., Rowlands S.* The stages of osmotic haemolysis // J. Physiol. — 1975. — Vol. 252, N3. — P. 817—832.
19. *Jennings M. L.* Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1 / *Michael L. Jennings* // Am J Physiol Cell Physiol. — 2021. — Vol. 321. — P. 1028—1059. — DOI:10.1152/ajpcell.00275.2021
20. *Liu L., Huang S., Xu X., Han J.* Study of individual erythrocyte deformability susceptibility to INFeD and ethanol using a microfluidic chip. Sci. Rep. 6: 22929. 2016.
21. *Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D.* The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. Science 227: 531—533, 1985. doi:10.1126/science.2578228.
22. *Pribush A.* Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media / *A. Pribush, D. Meyerstein, N. Meyerstein* // Biochimica et Biophysica Acta. — 2002. — Vol. 1558. — P. 119—132.
23. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes // Biol. Pharm. Bull. — 1993. — Vol. 16, N5. — P. 506—512.
24. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // Biol. Pharm. Bull. — 1993. — Vol. 16, N2. — P. 188—194.

25. *Thiagarajan P.* How do red blood cells die? / *P. Thiagarajan, C. J. Parker, J. T. Prchal* // *Front. Physiol.* — 2021. — Vol. 12. — P. 1—1-. — doi:10.3389/fphys.2021.655393.
26. *Williams Hematology, 10e* / *Kenneth Kaushansky, Josef T. Prchal, Linda J. Burns, Marshall A. Lichtman, Marcel Levi, David C. Linch.* — 2021. — 5012 p..

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. А. Вели — младший научный сотрудник отдела экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем ФГБНУ «ВНИВИПФиТ», ORCID ID0000—0002—9494—1148;

В. Ю. Сулин — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем ФГБНУ «ВНИВИПФиТ», ORCID ID0000-0001-9668-6702;

А. В. Мартынова — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем ФГБНУ «ВНИВИПФиТ»;

Г. А. Востроилова — доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем, зам. директора по науке;

П. А. Паршин — доктор ветеринарных наук, профессор, директор «ВНИВИПФиТ», ORCID ID0000-0002-8790-0540;

Т. И. Ермакова — кандидат биологических наук, Ученый секретарь ФГБНУ «ВНИВИПФиТ»;

Е. Ю. Вели — старший лаборант вивария отдела экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем.

Статья поступила в редакцию 28.02.2023 г.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF RAT BLOOD ERYTHROCYTES BY THE PARAMETERS OF OSMOTIC ERYTHROGRAMS

Aymen Ayad Veli, Valeriy Yuryevich Sulin[✉], Alla Vitalyevna Martynova, Pavel Andreevich Parshin, Galina Anatolyevna Vostroilova, Tatyana Igorevna Ermakova, Elena Yuryevna Veli

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, e-mail: sulinvu@mail.ru[✉]

Abstract. The spectrophotometric method was used to register and analyze the kinetics of hypoosmotic hemolysis of peripheral blood in 12 outbred male rats. Hypoosmotic conditions were created by half dilution of the initial suspension of erythrocytes in an isotonic solution with an optical density $D = 0.8$ at $\lambda = 490$ nm with NaCl solutions with concentrations of 0.10 %, 0.12 %, 0.14 %, 0.16 %, 0.18 %, 0.20 % and distilled water. Hemolysis of erythrocytes was recorded for 30 min at a wavelength of $\lambda = 490$ nm using ADC E-154 from L—Card. It has been established that the critical point of osmotic resistance of intact rat peripheral blood erythrocytes corresponds to 0.55 %-0.54 % NaCl solutions. Under these conditions, erythrocytes are in a state of spherulation (at the pre-hemolytic stage) and can serve as a convenient biological model for assessing the activity of pharmacological agents, membrane and cytotoxicity of xenobiotics. Based on the results of one-way analysis of variance (ANOVA), significant differences were established in the average relative number of hemolyzed cells in incubation solutions of different hypoosmolarity. The revealed differences in the hypoosmotic resistance of erythrocytes are due to their structural and functional properties and can serve as criteria for assessing their population composition and accumulated latent damages to the plasmolemma.

Keywords: erythrocytes, erythrogram, peripheral blood, structural and functional properties of erythrocytes, plasmolemma, hypoosmotic hemolysis, hypoosmotic resistance, rats

The study of the structural and functional properties of blood erythrocytes in laboratory and farm animals is currently relevant, since the metabolic processes occurring in blood cells are an integral reflection of the body's response to the action of stress and pathogenic factors at the cellular and tissue levels [6, 10].

In clinical diagnostic and pharmacological studies, an erythrocyte is a convenient biological model for conducting toxicological analysis and studying pathogenetic mechanisms of various pathologies development [1, 4, 5, 7, 8].

According to a number of authors, the erythrocyte plasmolemma is a structural component involved in all processes of their vital activity. Morphological and biochemical rearrangements of the plasmolemma during the life cycle of an erythrocyte are elements of adaptive mechanisms that allow maintaining cellular homeostasis and functional activity of these formed elements during their four-month stay in the bloodstream [1].

It has been established that the structure and integrity of the cytoplasmic membrane determines the viscoelastic properties of erythrocytes and their deformability. The unique biconcave shape and plastic properties of normocytes are provided by a special cytoskeleton, the proteins of which play a binding role with the components of the membrane and cytoplasm [14, 16, 20].

The band 3 protein (band3, anion exchanger AE1, SLC4A1 — solute carrier family 4 member 1) is one of the main proteins of the cytoskeleton. The cytoplasmic band3 N-domain binds cytoskeletal proteins to the cytoplasmic membrane through ankyrin and has binding sites for oxyhemoglobin and glycolytic enzymes.

The membrane C-domain can function as an anion channel (AE1, anion exchanger 1), providing the exchange of bicarbonate ions for Cl^- , as well as the transport of O_2 , CO_2 , glucose, sulfates, oxalates, NO and water [1, 18] (Fig. 1).

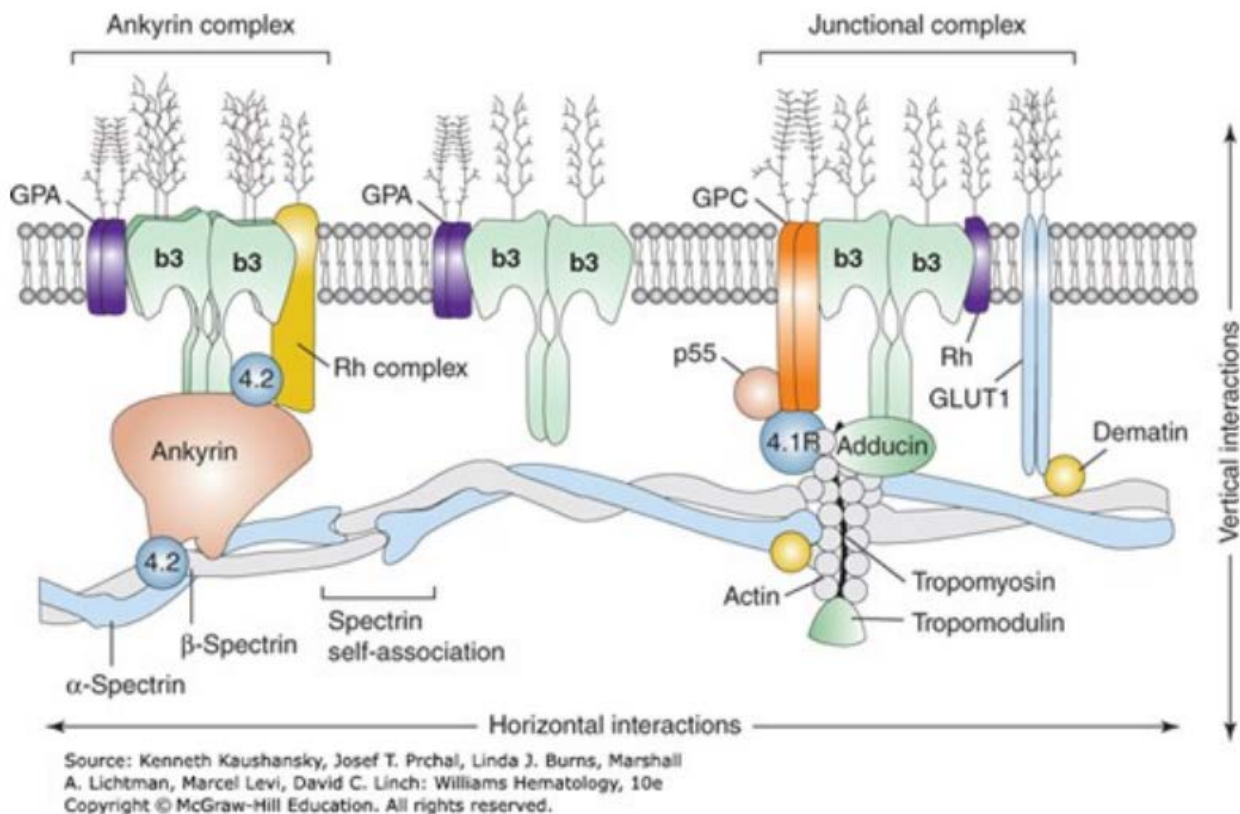


Fig. 1. Scheme of the erythrocyte membrane structure [26, p. 1433]:

b3 — band 3 protein, band3, AE1; GPA, GPC — glycophorins A and C; Rh complex — Rh factor isoantigen; Glut1 — glucose transporter; p55, 4.1, 4.2 — membrane cytoskeletal proteins

The resistance of erythrocytes to osmotic pressure is called osmotic resistance. According to the generally accepted concept of colloid-osmotic cell lysis, when erythrocytes are placed in hypoosmotic conditions, their spherulation (swelling) first occurs, followed by hemolysis itself (popping, bursting according to Jay A.), during which intracellular material (ions and hemoglobin) is released through membrane or hole defects [3, 18, 23, 24].

As the results of studies by a number of authors have shown, the process of spherulation (hydration) of erythrocytes is determined by the properties and activity of membrane ion transport systems (Na^+/K^+ -AT-Pase, Ca^{2+} -ATPase, Na^+/H^+ -pump, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}$ -transporter, voltage-dependent anion channels) and aquaporin water channels (AQP1 and AQP3) [15, 22]. The rate of hypoosmotic hemolysis depends on the initial volume of erythrocytes, surface area and structural and functional properties of the plasmolemma [17, 22].

Based on the results of studying the molecular and cellular mechanisms of osmotic resistance of erythrocytes, it has been suggested that hypotonic hemolysis of cells is due to the formation of hemolytic pores in erythrocyte membranes with a size of at least 300 nm,

in the formation of which band3 molecules are involved (Fig. 2) [11, 12, 23, 24].

In modern studies, the spectrophotometric method for assessing structural and functional properties of human and animal erythrocytes is widely used according to the end point (end point method): according to the degree of hemolyzed cells during their incubation for 20—30 minutes in hypoosmotic solutions with different concentrations of NaCl [2, 7, 9].

The objective of our work was to study the kinetic parameters of hypoosmotic hemolysis of rat whole blood erythrocytes using digital spectrophotometry.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out on 12 outbred laboratory male rats weighing 180—200 g, which were kept in a vivarium with free access to water and food. Blood in a volume of up to 100 μl was taken from the rat tail vein using an insulin syringe, pre-washed with heparin (5000 U/ml) and placed into 100 ml of saline (0.9 % NaCl) with pH = 7.4. To create the optimal pH, 0.1 mmol phosphate buffer (K_2HPO_4 and KH_2PO_4) was used. The erythrocyte suspension was adjusted with physiological saline to an optical density of 0.8 at $\lambda = 490$ nm.

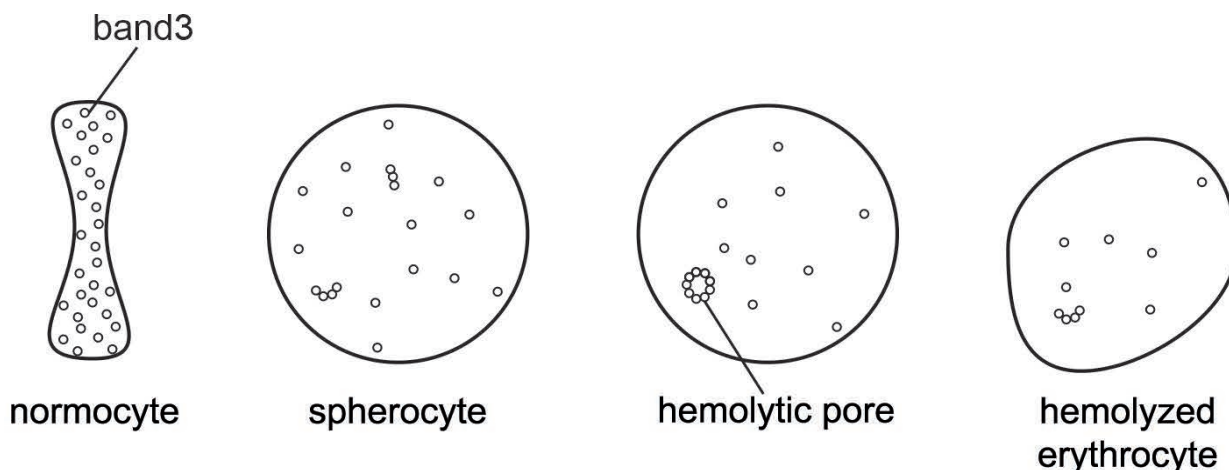


Fig. 2. Scheme of hypoosmotic hemolysis of erythrocytes [considering 23, with changes]

The kinetics of osmotic hemolysis of erythrocytes was studied using the method of automatic registration of integral erythrograms. To register erythrograms, a hardware-software complex was used, including:

- FEK-56M photoelectric colorimeter with built-in differential amplifier;
- ADC E-154 from L—Card;
- computer;
- digital voltmeter Mastech Mas830L.

The sampling rate of the ADC was 10 Hz; erythrograms were registered and recorded using the LGraph2 software from L—Card.

Hemolysis of erythrocytes was carried out in cuvettes with dimensions of 20 × 40 × 10 mm and a working volume of 4 ml. Light transmission has been

measured at a wavelength of $\lambda = 490$ nm using an N5 light filter, because in this region, the molar extinction coefficient of HbO₂ is minimal. When using this spectrophotometric method, it was not the hemolysis itself that was recorded, but damage to the erythrocyte membranes: the light scattering of the erythrocyte suspension changed due to the destruction of the membranes and the cytoskeleton of the cells.

A suspension of erythrocytes for the study of osmotic resistance was obtained by half dilution of the initial solution of blood cells in 0.9 % NaCl ($D = 0.8$ at $\lambda = 490$ nm) with the corresponding hypoosmotic sodium chloride solutions (Table 1) using a Bio-hit mechanical dispenser with a constant volume of 2000 μ l.

Table 1

Obtaining incubation hypoosmotic solutions by half dilution of the stock solution of erythrocytes

Concentration of stock physiological solution (% / mmol/L)	Concentration of hypoosmotic solution for dilution (%)	Concentration of incubation solution (% , mmol/L)
0.9 / 154.0	0.10	0.50 / 85.55
	0.12	0.51 / 87.26
	0.14	0.52 / 88.98
	0.16	0.53 / 90.69
	0.18	0.54 / 92.40
	0.20	0.55 / 94.11

The light scattering value of the erythrocyte suspension in 0.45 % (77.0 mmol/L) NaCl solution, which was measured in 5 min, was taken as 100 % hemolysis, after adding 100 μ l of 0.1N HCl solution. A sus-

pension of erythrocytes in 0.9 % NaCl solution was used as the control.

To analyze the structural and functional properties of erythrocytes, an integral erythrogram has been

used, which reflects the process of changing the number of cells subjected to hemolysis per unit time ($G = f(t)$, %, Fig. 3).

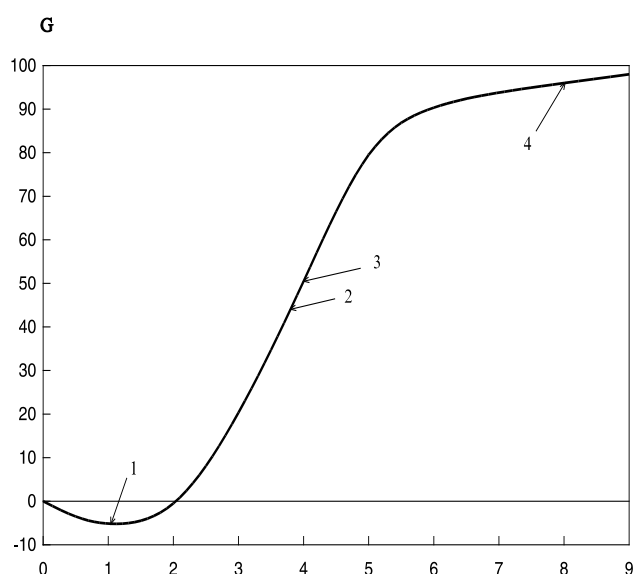


Fig. 3. Integral curve of osmotic hemolysis of erythrocytes:

1 — phase of spherulation, 2 — maximum rate of hemolysis (V_{max}), 3 — time of 50 % hemolysis (t_{50}), 4 — final phase of hemolysis. The x-axis shows the time of hemolysis (min). The y-axis shows the degree of hemolysis of erythrocytes (%)

The structural and functional state of erythrocytes was assessed by the following parameters of the integral erythrogram:

t_{lat} — latent time of hemolysis (s);

G_{sph} — relative number of spherocytes (%);

$G_{30}, G_{120}, G_{180}, G_{300}$ — relative amount of hemolyzed cells for 30 s, 120 s, 180 s and 300 s of incubation (%);

G_{av} — average relative number of hemolyzed cells (%) during the incubation period in the range of 1200÷1800 s (20÷30 min).

This method allows to register and analyze changes in the structural and functional properties of erythrocytes with high accuracy ($G \pm 0.1$ %, up to a second).

Statistical processing of the registered indicators included the calculation of mean values (M, mean) and standard deviation (SD, standard deviation, standard deviation). To determine statistically significant differences between the analyzed mean values, we used the results of one-way analysis of variance (ANOVA) [13]. Statistical processing was carried out using the Microsoft Excel software package.

RESULTS AND DISCUSSION

According to the results of the studies, it was found that during the incubation of erythrocytes in a 0.54 % NaCl solution, erythrocyte spherulation occurred, which on average amounted to about 4 % of the relative value of light scattering. The degree of erythrocyte spherulation in 0.55 % NaCl hypoosmotic solution did not exceed 1 % (Fig. 2).

For 30 minutes of incubation of rat blood erythrocytes in a hypoosmotic medium, the average percentage of hemolyzed erythrocytes (G_{av}) was 45.44 % in 0.50 % NaCl solution, 23.20 % — in 0.51 % NaCl solution, 15.74 % — in 0.52 % NaCl solution, and about 4 % — in 0.53 % sodium chloride solution (Fig. 4).

According to the results of the one-way analysis of variance (ANOVA) of the average values of hemolyzed cells under different hypoosmotic conditions, the calculated F-criterion significantly exceeded the critical value of F for the significance level $p < 0.001$ at the corresponding degrees of freedom (df, Table 2).

Therefore, in the concentration range from 0.55 % to 0.50 % NaCl for 30 minutes of incubation, the average relative amount of hemolyzed blood cells of intact rats differed significantly ($p < 0.001$) depending on hypoosmotic conditions.

Analyzing the curve of hemolysis, it can be noted that in the hypoosmotic medium, rat blood erythrocytes were mainly involved in the process of hemolysis in the first 120 s from the start of incubation. The number of hemolyzed erythrocytes (G_{120}) by this moment was 93.9 %, 84.2 %, 67.2 % and 28.8 % of the mean values (G_{av}) in the range of NaCl concentrations from 0.50 % to 0.53 %, respectively (Fig. 5).

Table 2

Results of the one-way analysis of variance of the mean blood values of hemolyzed erythrocytes in the studied rats

Source of Variation	SS	df	MS	F	F critical
Between groups	22338.94	5	4467.79	44111.21	2.342
Within groups	7.29	72	0.101		
Total	22346.23	77			

Notation: SS — sum of squares, df — degrees of freedom, MS — Mean Square, F — Fisher criterion

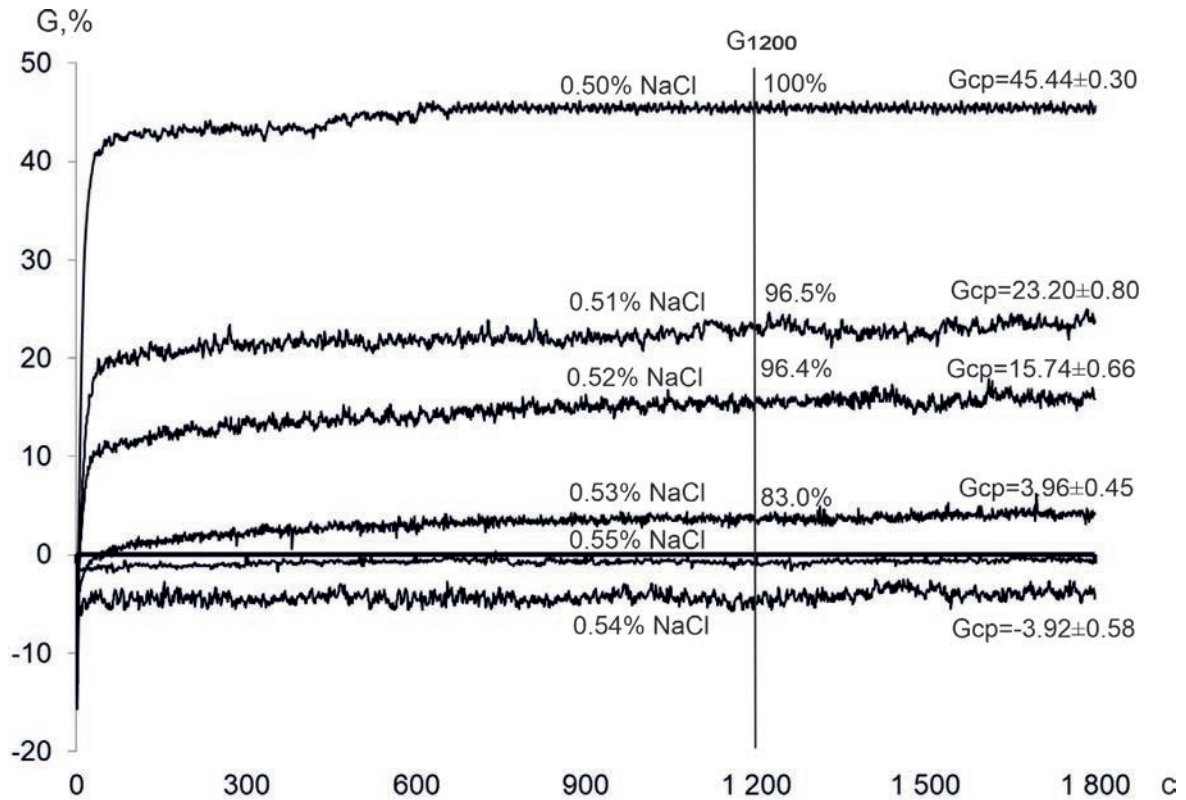


Fig. 4. Kinetics of osmotic hemolysis of rat blood erythrocytes for 30 minutes of incubation:

G_{av} — average relative number of hemolyzed cells (%) for the incubation period in the range of 1200÷1800 s (10÷30min),
 G_{1200} — percentage of hemolyzed cells for 20 min of incubation relative to G_{av}

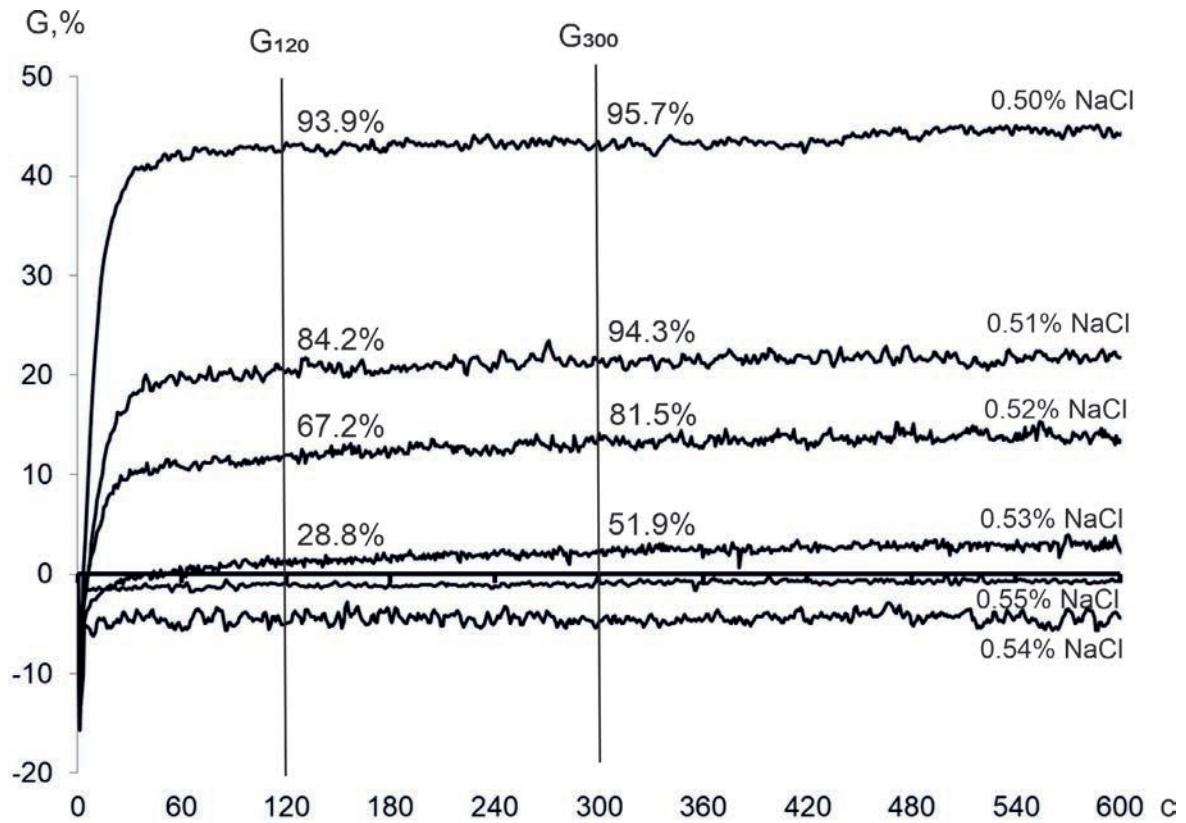


Fig. 5. Kinetics of osmotic hemolysis of rat blood erythrocytes for 5 minutes of incubation

The rate of hemolysis depended on the concentration of the hypoosmotic solution and was maximum at 0.50 % NaCl.

Analyzing erythrograms in the initial period of the hemolytic process (the first 30 s of incubation), it was

found that the addition of hypoosmotic solutions to the erythrocyte suspension caused spherulation, the degree of which depended on the magnitude of the decrease in the solution osmolarity and was maximum in 0.50 % NaCl solution ($G_{sph} = -15.5\%$, Fig. .6).

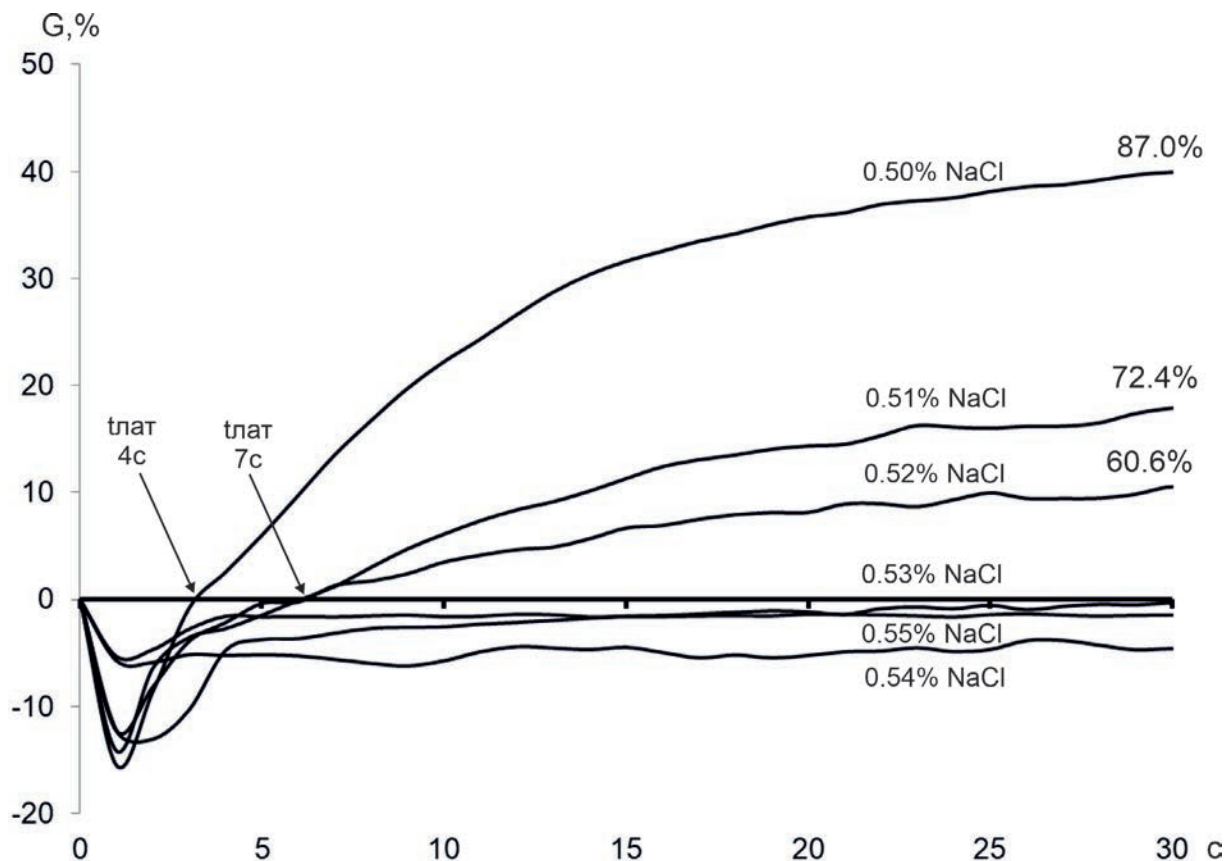


Fig. 6. Kinetics of osmotic hemolysis of rat blood erythrocytes for 30 s of incubation

The onset time of hemolysis (t_{lat}), which is a measure of erythrocyte resistance, also depended on the concentration of hypoosmotic solutions and was minimal (4 s) in 0.50 % NaCl solution. In 0.53 % sodium chloride solution, the onset of hemolysis of erythrocytes was 56–60 s. For 30 s of erythrocyte incubation in hypoosmotic solutions, the percentage of destroyed cells from G_{av} was 87.9 % in 0.50 % NaCl, 71.8 % — in 0.51 % NaCl, and 59.0 % — in 0.52 % NaCl.

The main kinetic parameters of hypoosmotic hemolysis of normal blood erythrocytes in male rats are presented in Table 3.

Based on the results of the analysis of the kinetic parameters of osmotic hemolysis of intact rat peripheral blood erythrocytes, populations of low-, medium-, and highly resistant erythrocytes can be distinguished (Fig. 7).

Thus, incubation in hypoosmotic solutions with different concentrations of NaCl made it possible to

differentiate and quantify the structural and functional properties of erythrocytes according to their degree of osmotic resistance.

CONCLUSION

According to the results of our studies, incubation of a suspension of rat peripheral blood erythrocytes for 30 min in a 0.50 % NaCl solution did not cause 100 % hemolysis. On the one hand, this can be explained by a change in the osmolarity of the incubation solution during the hemolysis of low- and medium-resistant cells. On the other hand, the absence of hemolysis of highly resistant erythrocytes may be due to such a structural and functional state of the erythrocyte plasmolemma, in which there is no formation of a hemolytic pore due to the association of band3 molecules. It can be assumed that highly resistant cells are young erythrocytes that do not have structural and functional damage.

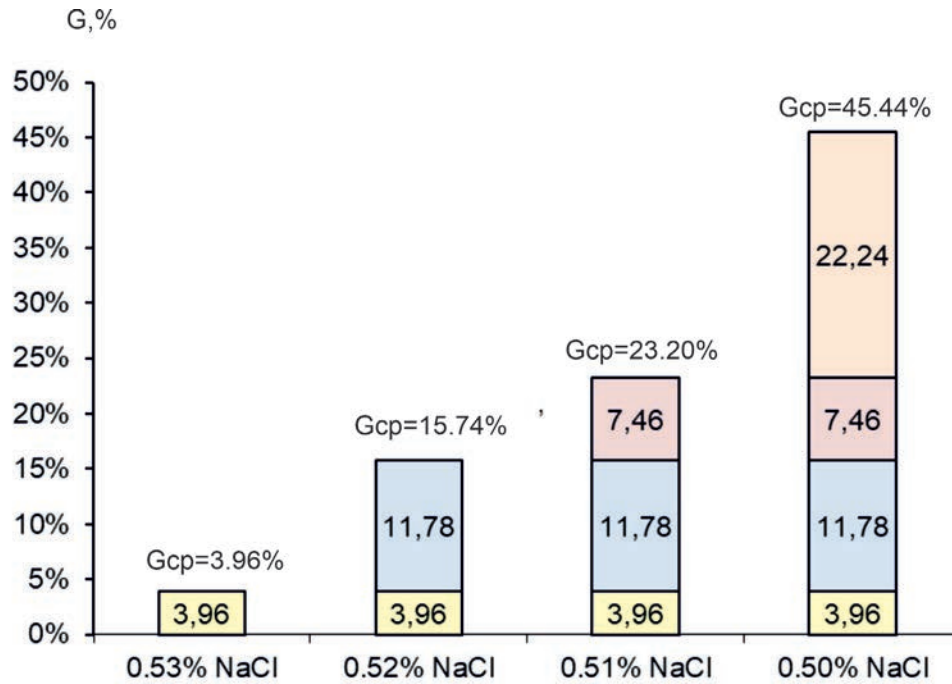


Fig. 7. Population composition of peripheral blood intact erythrocytes in rats according to the degree of osmotic resistance

Table 3

Basic kinetic parameters of osmotic hemolysis of normal erythrocytes

Incubation solution (% mmol/L)	G_{sphmax} (%)	T_{lat} (c)	G_{30}/G_{30rel} (%/%)	G_{120}/G_{120rel} (%/%)	G_{180}/G_{180rel} (%/%)	G_{300}/G_{300rel} (%/%)	$G_{av}, G_{sph} \pm SE$ (%)
1	2	3	4	5	6	7	8
0.50 %, 85.55 mmol/L	15.5	4	39.53/87.0	42.66/93.9	42.94/94.5	43.48/95.7	45.44 ± 0.30
0.51 %, 87.26 mmol/L	14.2	7	16.87/72.4	19.72/85.0	20.30/87.5	21.88/94.3	23.20 ± 0.80
0.52 %, 88.98 mmol/L	13.0	7	9.54/60.6	10.86/69.0	11.88/75.5	12.83/81.5	15.74 ± 0.66
0.53 %, 90.69 mmol/L	12.3	52	—	1.34/34.0	1.57/39.6	2.06/51.9	3.96 ± 0.45
0.54 %, 92.40 mmol/L	6.2	—	—	—	—	—	-3.92 ± 0.58
0.55 %, 94.11 mmol/L	1.8	—	—	—	—	—	-0.65 ± 0.21

Note: t_{lat} — time of the latent hemolysis period (s); G_{sphmax} — maximum number of spherocytes (%); G_{sph} — average number of spherocytes (%); $G_{30}, G_{120}, G_{180}, G_{300}$ — number of hemolyzed cells for 30 s, 120 s, 180 s and 300 s of incubation (%); $G_{30rel}, G_{120rel}, G_{180rel}, G_{300rel}$ — number of hemolyzed cells for 30 s, 120 s, 180 s and 300 s from incubation in % of G_{av} ; G_{av} — average relative number of hemolyzed cells during the incubation period in the range of 1200÷1800 s (10÷30 min) (%)

It is known that during 3—4-month period of erythrocyte life in the bloodstream, their natural aging occurs, caused by free-radical oxidation processes, exposure to pro-inflammatory and other membrane- and cytotoxic factors [21, 25]. Considering that hemolysis of erythrocytes in our studies developed in the first 120 s from the beginning of incubation, it can be assumed that the hemolytic process involved cells that already had “hidden” damage to the plasmalemma or such changes in it that contributed to band3 association into the hemolytic pore. Thus, the kinetic method used by us for determining the osmotic resistance of cells makes it possible to evaluate the population composition of peripheral blood erythrocytes, taking into account their age-related and other physicochemical changes.

According to the results of our studies, it has been found that the critical point of the osmotic resistance of normal rat blood erythrocytes corresponds to 0.55—0.54 % NaCl solutions. Being in these conditions in a pre-hemolytic state, erythrocytes have maximum sensitivity to the action of various physicochemical factors and are a convenient biological model for studying membrane and cytotoxicity.

REFERENCES

1. *Boronikhina T. V.* Erythrocyte plasmalemma and its changes during the life of cells / *Boronikhina T. V., Lomanovskaya T. A., Yatskovskiy A. N.* // *Zhurnal anatomii i gistopatologii* (Journal of anatomy and histopathology). 2021; 10(2): 62—72. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-62-72.
2. Effect of ceftriaxone on the morphofunctional state of donor erythrocytes / *A. K. Kondakova, G. A. Semko, E. V. Levitskaya, V. N. Tsymbal* // *Dermatologiya i venerologiya* (Dermatology and Venereology). — 2020. — No. 2 (88). — P. 35—37.
3. *Gitelzon I. I.* Factors affecting the resistance of erythrocytes in the vascular bed / *I. I. Gitelzon, I. A. Terskov* // *Voprosy biofiziki, biokhimii i patologii eritrotsitov* (Issues of biophysics, biochemistry and pathology of erythrocytes). — Krasnoyarsk, 1961. — Issue. 2. — P. 11—29.
4. *Golubeva M. G.* Osmotic resistance of erythrocytes, methods of determination and correction, significance in case of various pathologies / *M. G. Golubeva* // *Voprosy biofiziki, biokhimii i patologii eritrotsitov* (Successes of modern biology). — 2019. — V. 139. — No. 5. — P. 446—456.
5. Study of the structural properties of blood erythrocytes in newborns in violation of the period of adaptation / *N. A. Manylova, S. G. Rezvan, K. V. Agaeva, I. I. Logvinova* // *Sistemnyy analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh* (System analysis and management in biomedical systems). — 2008. — V. 7. — No. 4. — P. 948—951.
6. Study of light absorption spectra of aqueous solutions of hemoglobin in newborn pigs / *V. V. Obraztsova, A. A. Veli, V. Yu. Sulin* [et al.] // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2022. — No. 1(18). — P. 148—161. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2022.1.148.
7. *Lankin V. Z.*, Hypoosmotic hemolysis of erythrocytes by active forms of carbonyls / *V. Z. Lankin, E. M. Belova, A. K. Tikhaze* // *Biofizika* (Biophysics). — 2017. — V. 62. — No. 2. — P. 325—329.
8. Features of the physiology of erythrocytes. Hemolysis and eryptosis / *S. P. Chumakova, O. I. Urazova, A. P. Zima, V. V. Novitskiy* // *Gematologiya i transfuziologiya* (Hematology and transfusiology). — 2018. — V. 63, No.4. — P.343—351. — DOI 10.25837/HAT.2019.51.80.003.
9. *Petrova N. B.* Osmotic resistance of human erythrocytes under the action of furosemide and beta-blocker propranolol / *N. B. Petrova, A. E. Terentyeva* // *Vestnik Syktyvskarskogo universiteta* (Bulletin of Syktyvkar University). Series 2: Biology. Geology. Chemistry. Ecology. — 2021. — No. 3(19). — P. 18—25. — DOI 10.34130/2306—6229—2021—3—18.
10. The role of HIF-1 α factor in the development of fetal hypoxia / *M. Yu. Syromyatnikov, E. V. Mikhaylov, N. V. Pasko* [et al.] // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2020. — No. 3 (12). — P. 196—206. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.3.196.
11. *Rudenko S. V.* Effect of some β -blockers on hypotonic hemolysis of erythrocytes / *S. V. Rudenko, M. K. Said, E. L. Volovelskaya* // *Problemy kriobiologii* (Problems of cryobiology). — 2010. — V. 20, No. 1. — P. 7—17.
12. *Tarasov P. A.* Determination of the characteristic parameters of erythrocytes by dynamic flow cytometry: thesis ... Cand. of Phys. — Math. Sciences: 03.00.02 / *P. A. Tarasov*. — Krasnoyarsk, 2005. — 110 p.
13. *Tyurin Yu. N.* Computer data analysis: textbook / *Yu. N. Tyurin, A. A. Makarov*. — M.: MTsNMO, 2016. — 368 p.
14. Uremic syndrome causes a violation of the deformation-functional characteristics of erythrocytes in patients with chronic hemodialysis / *Yu. A. Borisov, Yu. S. Sudnitsyna, T. D. Vlasov* [et al.] // *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova* (Russian Physiological Journal named after I. M. Sechenov). — 2020. — V. 106. — No. 8. — P. 1025—1040. — DOI 10.31857/S0869813920080038.
15. *Gallagher P. G.* Disorders of erythrocyte hydration / *Patrick G. Gallagher* // *Blood*. — 2017. — Vol. 130, N. 2. — P. 2699—2708. — DOI 10.1182/blood-2017—04—590810
16. *Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W. W., Schiffelers R. M., Kaestner L., van Wijk R.* Squeezing for Life — Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front. Physiol.* 9:656. 2018.
17. *Islah L.* Study of Incubation Conditions for Erythrocytes Osmotic Fragility Testing in Dromedary Camel (*Camelus dromedarius*) / *L. Islah* [et al.] // *International Journal of Research in Environmental Science (IJRES)*. — 2016. — Vol. 2, N. 2. — P. 22—32. — <http://dx.doi.org/10.20431/2454—9444.0202004>

18. Jay A. W., Rowlands S. The stages of osmotic haemolysis // *J. Physiol.* — 1975. — Vol. 252, N3. — P. 817—832.
19. Jennings M. L. Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1 / Michael L. Jennings // *Am J Physiol Cell Physiol.* — 2021. — Vol. 321. — P. 1028—1059. — DOI:10.1152/ajpcell.00275.2021
20. Liu L., Huang S., Xu X., Han J. Study of individual erythrocyte deformability susceptibility to INF α and ethanol using a microfluidic chip. *Sci. Rep.* 6: 22929. 2016.
21. Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 227: 531—533, 1985. doi:10.1126/science.2578228.
22. Pribush A. Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media / A.r Pribush, D. Meyerstein, N. Meyerstein // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2002. — Vol. 1558. — P. 119—132.
23. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.* — 1993. — Vol. 16, N5. — P. 506—512.
24. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.* — 1993. — Vol. 16, N2. — P. 188—194.
25. Thiagarajan P. How do red blood cells die? / P. Thiagarajan, C. J. Parker, J. T. Prchal // *Front. Physiol.* — 2021. — Vol. 12. — P. 1—1-. — doi:10.3389/fphys.2021.655393.
26. Williams Hematology, 10e / Kenneth Kaushansky, Josef T. Prchal, Linda J. Burns, Marshall A. Lichtman, Marcel Levi, David C. Linch. — 2021. — 5012 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. A. Veli — Junior Scientific Associate of the Department of Experimental Pharmacology and Functioning of Living Systems;

V. Yu. Sulin — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate of the Department of Experimental Pharmacology and Functioning of Living Systems;

A. V. Martynova — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate of the Department of Experimental Pharmacology and Functioning of Living Systems;

P. A. Parshin — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of FSBSI “ARVRIPP&T”;

G. A. Vostroilova — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate of the Department of Experimental Pharmacology and Functioning of Living Systems, Deputy Director for Science;

T. I. Ermakova — Candidate of Biological Sciences, Scientific Secretary of FSBSI “ARVRIPP&T”;

E. Yu. Veli — Senior Laboratory Assistant of the Vivarium, Department of Experimental Pharmacology and Functioning of Living Systems.

The article was submitted 28.02.2023

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 статья, 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 авторе (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».

