

**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 постоянно 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](mailto: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 Vasilii 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 Agrotechnical 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 (FSBIS 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: 394 087 Lomonosova 114b, Voronezh, Russia

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

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

# ВЕТЕРИНАРНЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

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



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

№ 2 (23) • 2023

## К 85-летию профессора А. Г. Шахова

Шабунин С. В., Паршин П. А. . . . . . 8

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

### Исследование влияния митомицина на уровень повреждений митохондриальной ДНК у мышей *in vivo*

Шабанов Д. И., Востроилова Г. А., Михайлов Е. В., Сыромятников М. Ю.,  
Корчагина А. А., Селютин М. А. . . . . . 12

### Способ получения препаратов хромосом

Новгородова И. П. . . . . . 24

## КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

### Коррекция метаболического статуса у овец с остеодистрофией

Саврасов Д. А., Лопатин В. Т., Михайлов А. А., Паршин П. А.,  
Востроилова Г. А., Карташов С. С. . . . . . 37

### Применение витамина Е в комплексной терапии заболеваний животных и человека

Герунова Л. К., Анучина А. В. . . . . . 49

## СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ, ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

### Структура заболеваемости коров (нетелей) в третьем триместре беременности и значение гестоза в ее формировании

Алехин Ю. Н., Паршин П. А., Попова О. С., Лебедева А. Ю. . . . . . 61

### Актуальность разработки комбинированного ранозаживляющего препарата для ветеринарного применения и его перспективный компонентный состав

Парфенюк А. А., Сампиев А. М., Семенов М. П.,  
Семенов К. А. . . . . . 76

### Анализ ассортимента антисептических и дезинфицирующих средств для ветеринарного применения на российском рынке

Белоусов Е. А., Новикова Е. О., Белоусова О. В., Карасев М. М.,  
Ватников Ю. А., Сахно Н. В., Новиков О. О. . . . . . 91

## ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОБИОХИМИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

### Анализ адаптационного резерва клеточного и гуморального звеньев неспецифического иммунитета при лечении Т-2 токсикоза белых крыс

Мишина Н. Н., Семенов Э. И., Валиев А. Р., Сагдеева З. Х., Губеева Е. Г.,  
Перфилова К. В. . . . . . 105

### Цитокиновый профиль при формировании болевого синдрома у собак, больных острым гастроэнтеритом

Куприна Э. А., Руденко А. А., Луцай В. И., Руденко П. А. . . . . . 120

### Взаимосвязь гормональной и цитокиновой регуляции у супоросных свиноматок при возникновении послеродовых заболеваний

Сашнина Л. Ю., Шахов А. Г., Владимирова Ю. Ю., Никоненко Г. В.,  
Акулова К. О. . . . . . 131

### Патоморфологические изменения паренхиматозных органов телят при фибринозно-гнойной бронхопневмонии

Шабунин Б. В., Степанов Д. С., Рудь Д. Е., Толкачев И. С.,  
Шапошникова Ю. В., Михайлов Е. В. . . . . . 142

### Микроокружение телец Гассалья в ранний постнатальный период у поросят-гипотрофиков

Шабунин Б. В., Степанов Е. М., Некрасов А. В.,  
Михайлов Е. В. . . . . . 156

## К 95-летию профессора В. А. Парикова

Шабунин С. В., Паршин П. А. . . . . . 166

Условия публикации и правила оформления статей . . . . . 170

**BULLETIN  
OF VETERINARY  
PHARMACOLOGY**

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



Established  
in June, 2017

Published  
4 times a year

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

**No. 2 (23) • 2023**

**On the occasion of the 85th anniversary since the birth of  
Aleksy Gavrilovich Shakhov**

*Shabunin S. V., Parshin P. A. . . . . 10*

**EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY**

**Study of the effect of mitomycin on the level of mitochondrial  
DNA damage in mice *in vivo***

*Shabanov D. I., Vostroilova G. A., Mikhaylov E. V., Syromyatnikov M. Yu.,  
Korchagina A. A., Selyutina M. A. . . . . 18*

**Method of obtaining chromosome preparations**

*Novgorodova I. P. . . . . 31*

**CLINICAL PHARMACOLOGY**

**Correction of metabolic status in sheep with osteodystrophy**

*Savrasov D. A., Lopatin V. T., Mikhaylov A. A., Parshin P. A.,  
Vostroilova G. A., Kartashov S. S. . . . . 43*

**Use of vitamin E in complex therapy of animal and human  
diseases**

*Gerunova L. K., Anuchina A. V. . . . . 55*

**AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION,  
DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION**

**Incidence structure of cows (heifers) in the third trimester of  
gestation and significance of gestosis in its formation**

*Alekhin Yu. N., Parshin P. A., Popova O. S., Lebedeva A. Yu. . . . . 69*

**Relevance of the design of a combination wound healing drug  
for veterinary use and its potential component composition**

*Parfenyuk A. A., Sampiev A. M., Semenenko M. P.,  
Semenenko K. A. . . . . 84*

**Analysis of the assortment of antiseptics and disinfectants for  
veterinary use on the Russian market**

*Belousov E. A., Novikova E. O., Belousova O. V., Karasev M. M.,  
Vatnikov Yu. A., Sakhno N. V., Novikov O. O. . . . . 98*

**PATHOPHYSIOLOGY, PATHOBIOCHEMISTRY  
AND EXPERIMENTAL THERAPY**

**Analysis of the adaptive reserve of cellular and humoral links  
of non-specific immunity in the treatment of T-2 toxicosis in  
white rats**

*Mishina N. N., Semenov E. I., Valiev A. R., Sagdeeva Z. K., Gubeeva E. G.,  
Perfilova K. V. . . . . 113*

**Cytokine profile during the formation of pain syndrome in  
dogs with acute gastroenteritis**

*Kuprina E. A., Rudenko A. A., Lutsay V. I., Rudenko P. A. . . . . 126*

**Relationship of hormonal and cytokine regulation in pregnant  
sows with postpartum diseases**

*Sashnina L. Yu., Shakhov A. G., Vladimirova Yu. Yu., Nikonenko G. V.,  
Akulova K. O. . . . . 137*

**Pathomorphological changes in parenchymatous organs of  
calves in case of fibrinous purulent bronchopneumonia**

*Shabunin B. V., Stepanov D. S., Rud D. E., Tolkachev I. S.,  
Shaposhnikova Yu. V., Mikhaylov E. V. . . . . 149*

**Microenvironment of Hassall's corpuscles in hypotrophic  
piglets in the early postnatal period**

*Shabunin B. V., Stepanov E. M., Nekrasov A. V., Mikhaylov E. V. . . . . 161*

**On the occasion of the 95th anniversary since the birth of  
Vitaliy Aleksandrovich Parikov**

*Shabunin S. V., Parshin P. A. . . . . 168*

**Publishing terms and article formatting requirements. . . . . 170**

Персоналия  
УДК 619(092)

## К 85-ЛЕТИЮ ПРОФЕССОРА А. Г. ШАХОВА

**Сергей Викторович Шабунин, Павел Андреевич Паршин**

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

Алексею Гавриловичу Шахову — доктору ветеринарных наук, профессору, заслуженному деятелю науки Российской Федерации, член-корреспонденту РАН в 2023 году исполнилось 85 лет со дня рождения.

А. Г. Шахов родился 12 января 1938 года в Верхнем Мамоне Воронежской области. В 1955 году А. Г. Шахов поступил и в 1960 году с отличием окончил Воронежский зоотехническо-ветеринарный институт и работал до 1961 года ветеринарным врачом районной ветлечебницы с. Гремячье Воронежской области, с 1961 по 1963 год — заведующим ветеринарным участком в с. Костенки Воронежской области.

В 1966 году окончил очную аспирантуру при кафедре микробиологии, эпизоотологии Воронежского сельскохозяйственного института им. К. Д. Глинки. После окончания аспирантуры с 1966 года работал в должности ассистента этой кафедры и зам. декана ветеринарного факультета. Под руководством заведующего кафедрой заслуженного деятеля науки РСФСР, доктора ветеринарных наук, профессора, член-корреспондента Котова Василия Тимофеевича он выполнил и в 1966 году защитил кандидатскую диссертацию. В 1970 году был принят на должность и. о. зав. отделом Научно-исследовательской ветеринарной станции г. Воронежа. С 1971 по 1978 г. работал заведующим лабораторией болезней свиней Всесоюзного научно-исследовательского института незаразных болезней животных. С 1978 по 1994 г. зав. лабораторией микробиологии и одновременно заместителем директора по научной работе института Всесоюзного, а затем Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии. В 1994—1995 гг. — профессор кафедры эпизоотологии Воронежского государственного аграрного университета им. К. Д. Глинки. С 1995 по 2005 г. работал

директором Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии. С 2005 по 2015 г. заведующий отделом микробиологии, вирусологии и иммунологии Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии. В настоящее время главный научный сотрудник лаборатории иммунологии.

В 1986 году А. Г. Шахов защитил докторскую диссертацию на тему: «Пневмония свиней в хозяйствах с промышленной технологией», а в 1990 году ему присвоено звание профессора по специальности ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Шахов А. Г. внес огромный вклад в развитие ветеринарной эпизоотологии, микробиологии и вирусологии России, соавтор методических указаний по диагностике, профилактике и лечению пневмоний свиней, желудочно-кишечных и респираторных болезней поросят, желудочно-кишечных и респираторных болезней телят, болезней органов размножения и молочной железы свиней; наставлений по применению в ветеринарной практике фразидина, аэрозолей йодистого алюминия, ломадена и додеция, сульфалена и др. Руководил разработкой концепции эколого-адаптационной теории возникновения, развития массовой патологии и защиты здоровья животных в с.-х. производстве, комплексной экологически безопасной системы ветеринарной защиты здоровья животных. Является соавтором системы ведения агропромышленного производства Воронежской области до 2010 года, руководил коллективом по подготовке «Системы ведения животноводства». В соответствии с постановлением администрации Воронежской области до 2015 года входил в состав штаба по недопущению гриппа (классической чумы) птиц, африканской чумы свиней и чрезвычайной проти-

возпизоотической комиссии, являлся членом секции научного обеспечения развития отрасли животноводства НТС Департамента аграрной политики и Консультативного совета Управления ветеринарии Воронежской области. Более 58 лет постоянно оказывает научно-консультативную помощь животноводческим хозяйствам различных регионов и областей. Заслуженный деятель науки. Награжден знаком «Изобретатель СССР», медалями СССР и ВДНХ. Он является автором более 500 научных трудов, в том числе 24 книг и брошюр и 45 авторских свидетельств на изобре-

тения. Им подготовлено 40 кандидатов и 12 докторов наук. На протяжении многих лет является руководителем Государственных и ведомственных НИР. Профессор А. Г. Шахов на протяжении многих лет является членом Отделения сельскохозяйственных наук РАН, диссертационных советов по защите докторских и кандидатских диссертаций при ВНИВИ патологии фармакологии и терапии. Научная эрудиция, принципиальность и требовательность профессора А. Г. Шахова сочетаются с чуткостью и отзывчивостью, что снискало ему глубокое уважение коллег и широкую известность.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**С. В. Шабунин** — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, научный руководитель института;  
**П. А. Паршин** — доктор ветеринарных наук, профессор, директор института.

Статья поступила в редакцию 03.04.2023 г.

Personal article  
UDC 619(092)

## ON THE OCCASION OF THE 85<sup>TH</sup> ANNIVERSARY SINCE THE BIRTH OF ALEKSEY GAVRILOVICH SHAKHOV

**Sergey Viktorovich Shabunin, Pavel Andreevich Parshin**

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

Aleksey Gavrilovich Shakhov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, has celebrated his 85<sup>th</sup> birthday in 2023.

A. G. Shakhov was born on January 12, 1938 in Verkhniy Mamon, Voronezh region. In 1955, A. G. Shakhov entered and in 1960 graduated with honors from Voronezh Zootechnical Veterinary Institute and worked until 1961 as a veterinarian at the district veterinary clinic in Gremyachye village, Voronezh region. From 1961 to 1963, A. G. Shakhov was the Head of the Veterinary Department in Kostenki village, Voronezh region.

In 1966, he completed full-time postgraduate studies at the Department of Microbiology, Epizootology of Voronezh Agricultural Institute named after K. D. Glinka. After graduating from postgraduate school in 1966, he worked as a Teaching Assistant of this department and Deputy Dean of the Veterinary Faculty. Under the guidance of Kotov Vasily Timofeevich, Head of the Department, Honored Scientist of the RSFSR, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member, A. G. Shakhov defended his Candidate thesis. In 1970, he was accepted to the position of the Acting Head of the Department of the Research Veterinary Station in Voronezh. From 1971 to 1978, he worked as the Head of the Laboratory of Pig Diseases of the All-Union Scientific Research Institute of Noncontagious Animal Diseases. From 1978 to 1994, A. G. Shakhov was the Head of the Laboratory of Microbiology and at the same time Deputy Director for Scientific Work of the All-Union Institute, and then the All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy. In 1994—1995, A. G. Shakhov was a Professor of the Department of Epizootology, Voronezh State Agricultural University named after K. D. Glinka.

From 1995 to 2005, A. G. Shakhov worked as the Director of the All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy. From 2005 to 2015, he was the Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology of the All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy. Currently, A. G. Shakhov is a Chief Scientific Associate of the Laboratory of Immunology.

In 1986, A. G. Shakhov defended his Doctoral thesis on the topic Pig Pneumonia on the Farms with Industrial Technology, and in 1990 he was awarded the title of Professor in Veterinary Microbiology, Virology, Epizootology, Mycology with Mycotoxicology and Immunology.

A. G. Shakhov made a huge contribution to the development of veterinary epizootology, microbiology and virology in Russia, co-author of guidelines for the diagnosis, prevention and treatment of pneumonia in pigs, gastrointestinal and respiratory diseases of piglets, gastrointestinal and respiratory diseases of calves, diseases of the reproductive organs and mammary gland of pigs; instructions on the use of Fradizin, aerosols of aluminum iodide, lomaden and dodeconium, sulfalene and others in veterinary practice. He supervised the development of the concept of ecological-adaptive theory of the emergence, development of mass pathology and protection of animal health in the agricultural production, an integrated environmentally friendly system of veterinary animal health protection. A. G. Shakhov is a co-author of the system of conducting agro-industrial production in Voronezh region until 2010, led the team for the preparation of the Livestock Management System. In accordance with the decree of the administration of Voronezh Region, until 2015 he was a member of the staff for the prevention of influenza (classical plague) of poultry, African swine fever and the emergency an-

ti-epizootic commission, was a member of the scientific support section for the development of the livestock industry of the S&TC (NTS) of the Department of Agrarian Policy and the Advisory Council of the Veterinary Administration of Voronezh Region. For more than 58 years, A. G. Shakhov has been constantly providing scientific and advisory assistance to livestock farms in various regions. A. G. Shakhov is an Honored Worker of Science. A. G. Shakhov was awarded the badge Inventor of the USSR, medals of the USSR and VDNKh. He is the author of more than 500 scientific papers, including 24 books and brochures, and 45 copyright certificates for inventions. A. G. Shakhov

prepared 40 Candidates and 12 Doctors of Sciences. For many years he has been the Head of state and departmental researches.

For many years, Professor A. G. Shakhov is a member of the Department of Agricultural Sciences of the Russian Academy of Sciences, dissertation councils for the defense of doctoral and candidate theses at the All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy. Scientific erudition, adherence to principles and exactingness of Professor A. G. Shakhov are combined with sensitivity and responsiveness, which earned him a deep respect from his colleagues and a wide popularity.

### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**S. V. Shabunin** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Academician of the RAS, Academic Director of the Institute;

**P. A. Parshin** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of the Institute.

The article was submitted 03.04.2023.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МИТОМИЦИНА НА УРОВЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У МЫШЕЙ *IN VIVO*

Дмитрий Игоревич Шабанов<sup>\*✉</sup>, Галина Анатольевна Востроилова<sup>\*</sup>, Евгений Владимирович Михайлов<sup>\*</sup>, Михаил Юрьевич Сыромятников<sup>\*,\*\*</sup>, Анастасия Андреевна Корчагина<sup>\*</sup>, Мария Александровна Селютина<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, shabanoph@gmail.com<sup>✉</sup>

<sup>\*\*</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**Аннотация.** В данном исследовании нами проводилось изучение влияния противоопухолевого антибиотика — митомицина С (ММС) на целостность митохондриальной ДНК (мтДНК) клеток печени методом количественной полимеразной цепной реакции (Q-PCR) и частоту встречаемости эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей *in vivo*. В эксперименте участвовали 3 группы мышей: контрольная и две опытные, которые получали однократную внутривнутрибрюшинную инъекцию ММС в дозе 6,0 и 10,0 мг/кг ( $n = 6$  на каждую группу). Показано отсутствие влияния митомицина на уровень митохондриального биогенеза в клетках печени мышей при интраперитонеальном введении препарата в дозах 6,0 и 10,0 мг/кг. Обнаружено повышение количества повреждений мтДНК в 3,4 ( $p < 0,05$ ) и 6,4 ( $p < 0,05$ ) раза при амплификации фрагментов мтДНК в участках, кодирующих 12S и 16S рРНК и Д-петлю соответственно у мышей, получивших ММС в дозе 10,0 мг/кг. При этом введение ММС вызывало увеличение в 3,4 раза ( $p < 0,05$ ) частоты полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей уже в дозе 6,0 мг/кг. Полученные данные позволяют предполагать большую чувствительность клеток костного мозга к мутагенному действию ММС. Таким образом, показано повреждение мтДНК под действием ММС *in vivo*, что вносит дополнительный вклад в изучение механизмов мутагенной активности данного антибиотика.

**Ключевые слова:** Митомицин С; генотоксичность; печень; костный мозг; мышцы; митохондриальная ДНК, микроядерный тест

Поддержание целостности митохондриального генома является необходимым условием для правильного функционирования митохондрий. Из-за высокой концентрации активных форм кислорода (АФК), генерируемых путем окислительного фосфорилирования, митохондриальный геном сильно подвержен окислительному стрессу, что может вызывать повреждения митохондриальной ДНК (мтДНК) и митохондриальные болезни [1]. Митохондриальные болезни приводят к нарушениям синтеза АТФ, в результате чего в первую очередь страдают наиболее энергозависимые ткани, такие как нервная и мышечная [2]. Было показано, что повреждение митохондриальной ДНК

связано со старением, а также с многочисленными заболеваниями, включая нейродегенеративные расстройства и рак [1].

Митомицин С (ММС) — один из антибиотиков, получивших применение в клинической терапии пациентов с злокачественными новообразованиями [3]. Находясь во внутриклеточных компартментах, ММС метаболизируется восстановительными ферментами с образованием алкилированной ДНК и АФК посредством реакций окислительно-восстановительных циклов [4]. Активированный ММС алкилирует гуанин в N2-положении с образованием моноаддуктов ДНК и, как следствие, происходит формирование внутрицепочечных и межцепочечных сшивков ДНК аддуктов [5]. Другие макромолекулы, такие как РНК, белки или даже мтДНК также могут служить мишенью для ММС с результирующей цитотоксичностью [3]. ММС также может быть использован как модельный мутаген в исследованиях мутагенности и антимуутагенного действия новых лекарственных составов [6].

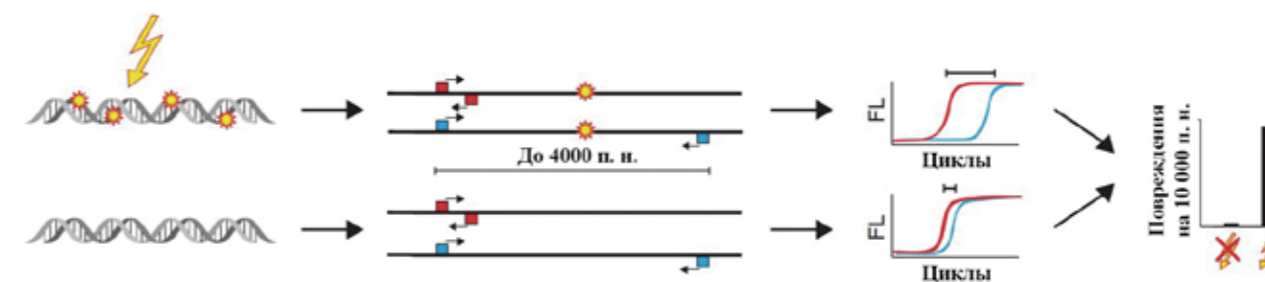
Хотя взаимодействие ММС с ядерной ДНК широко изучалось, взаимодействие мтДНК с ММС в настоящее время не достаточно изучено. В то время, как известно, что токсическое действие ММС, путем образования аддуктов ядерной ДНК с ММС не в полной степени объясняет цитотоксичность, опосредованную ММС. Таким образом, повреждение мтДНК может играть существенную роль в ММС-индуцированной цитотоксичности [7].

Кроме того, разработано несколько методов для обнаружения поврежденной мтДНК, но эти методы являются полуквантитативными и часто не обладают достаточной чувствительностью [1]. В связи с этим оценка относительного уровня повреждений мтДНК индуцируемого ММС с использованием амплификации полимеразной цепной реакции в реальном времени (Q-PCR) фрагментов мтДНК различной длины может представлять интерес в связи с уточнением токсичности и механизмов мутагенного действия противоопухолевого препарата *in vivo* [1]. Поэтому целью нашей работы явилось изучение повреждения мтДНК препаратом-алкилятором — митомицином С у мышей.

Для проведения экспериментальной работы было сформировано 3 группы белых беспородных мышей-самцов по 6 шт в каждой массой 18—20 г. Животные контрольной группы получали внутривнутрибрюшинную инъекцию изотонического раствора хлорида натрия в объеме 0,2 мл (группа I). Мышам группы II интраперитонеально вводили ММС в дозе 6,0 мг/кг в объеме 0,2 мл. В группе III мышам вводили внутривнутрибрюшинно ММС в дозе 10,0 мг/кг в объеме 0,2 мл. Через 24 ч после инъекции животных выводили из эксперимента передозировкой CO<sub>2</sub>. Отбирали ткани печени и костного мозга. Для определения уровня повреждений в мтДНК использовали модифицированный метод Q-PCR [9, 10]. Схематическое изображение принципа анализа представлено на рисунке 1. Данный метод позволяет проводить специфичное для последовательности обнаружение и точную количественную оценку повреждений в длинных участках митохондриальной ДНК [9, 10]. Для этого выделяли тотальную ДНК из 50 мг печени мышей исследуемых групп при помощи набора ПРОБА-ГС (ДНК-технология, Россия), следуя инструкции производителя.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная работа была проведена на базе лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем и вивария



**Рис. 1.** Схематическая иллюстрация анализа. Выделенная мтДНК, поврежденная (вверху) или неповрежденная (внизу). Неповрежденная последовательность мтДНК длиной 1000—4000 п. н. успешно амплифицируется, тогда как некоторые типы повреждений или модификаций ДНК нарушают или замедляют ПЦР реакцию, что выявляется по сниженной флуоресценции (FL). Короткие фрагменты размером 40—70 п. н. служат эталонными матрицами. Увеличение повреждений или модификаций мтДНК приводит к повышенным значениям ΔCq (справа) [9]

Количество поврежденных мтДНК измеряли с помощью Q-PCR длинных фрагментов с использованием ПЦР смеси 5x qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) на амплификаторе DTLite 4 («ДНК-технология», Россия) [10].

Расчет поврежденных мтДНК проводили в участках, кодирующих 12S и 16S рРНК (12S—16S) и D-петли (D-loop), проявлявших наибольшую чувствительность к повреждению, с использованием опубликованных ранее праймеров [10]. Количество поврежденных в мтДНК нормировали на 10 000 пар нуклеотидов (п. н.) по формуле:

$$D \text{ mtDNA} = (1 - 2^{-(\Delta\text{длинный} - \Delta\text{короткий})}) \times \text{длина фрагмента (п. н.)} / 10\,000,$$

где D mtDNA — количество поврежденных мтДНК на 10 000 п. н.;  $\Delta\text{длинный}$  — разница между Cq контрольных и опытных длинных фрагментов;  $\Delta\text{короткий}$  — разница между Cq контрольных и опытных коротких фрагментов [11]. За контрольный показатель Cq принимали количество поврежденных в мтДНК мышей из группы I. Расчет количества поврежденных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft; США).

Измерение количества копий мтДНК проводили с помощью Q-PCR, используя фрагмент мтДНК

«16S-Nd1» и ядерный ген Gapdh в качестве референса [10, 11]. Нормализованный уровень мтДНК относительно ядерной ДНК рассчитывался по формуле:  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  [11].

Приготовление препаратов клеток костного мозга для проведения микроядерного теста проводили согласно рекомендациям [8, 12]. Исследование микропрепаратов на частоту встречаемости полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (МЯПХЭ) проводили с помощью микроскопа Биоскоп-1 (ЛОМО, Россия) при увеличении  $\times 1000$ . Для определения частоты полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) подсчитывали 2000 клеток. Соотношение ПХЭ к нормохромным эритроцитам (ПХЭ/НЭ) определяли на 500 клеток [8].

Для сравнения исследуемых групп использовали U-тест Майна — Уитни с помощью программы STATISTICA 10 (Statsoft, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе эксперимента нами была определена копияность мтДНК в клетках печени мышей (рис. 2А). Исходя из полученных данных применение ММС в дозе 6,0 и 10,0 мг/кг статистически значимо не влияло на уровень митохондриального биогенеза в клетках печени мышей всех исследуемых групп.

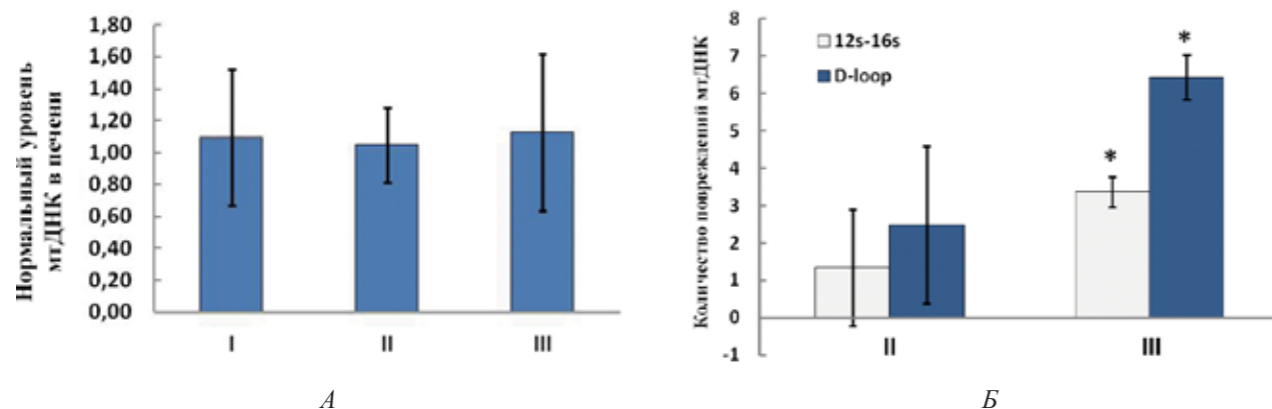


Рис. 2. Количество митохондрий в образцах печени мышей (А) и уровень поврежденных мтДНК на 10 000 п. н. относительно мышей группы контроля (Б):

I — животные группы негативного контроля (без ММС); II — мыши, получившие инъекцию ММС в дозе 6,0 мг/кг; III — мыши, получившие инъекцию ММС в дозе 10,0 мг/кг; 12S—16S — участок мтДНК, кодирующий гены 12S—16S рибосом; D-loop — участок мтДНК, кодирующий область D-петли; \* — статистически значимое отличие от негативного контроля (группа I) при  $p < 0,05$ ;  $M \pm SE$  — среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка

Исследование генотоксического действия ММС в дозе 10,0 мг/кг (группа III) выявило увеличение повреждения мтДНК (рис. 2Б). Так количество поврежденных мтДНК на 10 000 п. н. в группе III составило  $3,4 \pm 0,4$  ( $p < 0,05$ ) и  $6,4 \pm 0,6$  ( $p < 0,05$ ) отно-

сительно, принятого за ноль, уровня поврежденных мтДНК в группе контроля (группа I) во фрагментах 12S-16S и D-loop соответственно. При этом внутрибрюшинная инъекция ММС в дозе 6,0 мг/кг (группа II) не вызывала статистически значимого

повышения уровня поврежденных мтДНК во фрагменте 12S-16S, составившего  $1,3 \pm 1,5$ , и во фрагменте D-loop, равного  $2,5 \pm 2,1$ .

Для оценки дестабилизирующего влияния ММС на ядерный геном нами изучена частота МЯПХЭ в костном мозге мышей (Рис. 3А).

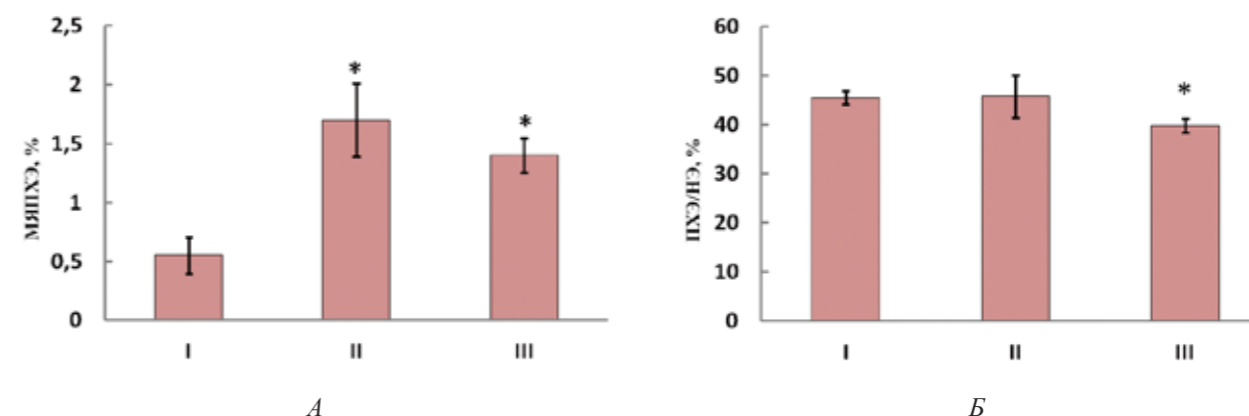


Рис. 3. Частота полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (А) и отношение полихроматофильных эритроцитов к нормохромным (Б) в костном мозге мышей, исследуемых групп:

I — животные группы негативного контроля (без ММС); II — мыши, получившие инъекцию ММС в дозе 6,0 мг/кг; III — мыши, получившие инъекцию ММС в дозе 10,0 мг/кг; МЯПХЭ — частота полихроматофильных эритроцитов с микроядрами, %; ПХЭ/НЭ — отношение полихроматофильных эритроцитов к нормохромным; \* — статистически значимое отличие от негативного контроля (группа I) при  $p < 0,05$ ;  $M \pm SE$  — среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка

Частота МЯПХЭ у животных из группы контроля (группа I) составляла  $0,5 \pm 0,1$  %. В группе II и III она возрастала в 3,4 ( $p < 0,05$ ) и 2,8 ( $p < 0,05$ ) раза до  $1,7 \pm 0,1$  % и  $1,4 \pm 0,2$  % соответственно относительно частоты МЯПХЭ контрольной группы. При этом ПХЭ/НЭ в группе III снижалось на 13,2 % ( $p < 0,05$ ) до  $39,9 \pm 3,8$  % относительно мышей группы I, у которых доля ПХЭ в костном мозге составляла  $45,5 \pm 1,3$  %. В группе II ПХЭ/НЭ составляло  $45,8 \pm 1,4$  % и не имело статистически значимых отличий от данного показателя у мышей группы II. Меньшее увеличение частоты МЯПХЭ в группе III относительно группы контроля может быть объяснено снижением доли ПХЭ в костном мозге в связи с токсическим действием ММС.

Ряд авторов полагают, что изменение копияности мтДНК может быть ответной реакцией на воздействие стрессовых факторов и служит маркером митохондриальной токсичности в тканях [13]. Поэтому близкие значения копияности мтДНК клеток печени мышей всех групп могут свидетельствовать об отсутствии влияния ММС в исследуемых дозах на уровень митохондриального биогенеза. Косвенно эти данные подтверждаются исследованиями, которые показывают, что ММС оказывает тканеспецифичное воздействие, оцениваемое по нарушению биоэнергетики и снижению уровня АТФ в клетках [7]. Так внутрибрюшинное введение

ММС не приводило к снижению уровня АТФ в тканях печени мышей при внутрибрюшинном введении ММС в дозе до 10,0 мг/кг, данный показатель достоверно уменьшался только при дозировке 20,0 мг/кг [7].

Полученные нами данные об увеличении количества поврежденных мтДНК в клетках печени мышей ММС частично находят подтверждение в некоторых исследованиях на культурах клеток. Так известно, что взаимодействие ММС с мтДНК приводит к изменению конформации от сверхскрученной к релаксированной кольцевой мтДНК в клетках карциномы молочной железы ЕМТ6 у мышей. Это взаимодействие может вызвать митохондриальную дисфункцию, приводящую к потере клеточного АТФ [14]. Релаксация мтДНК из суперспирализированной формы может происходить в результате одинарных или двойных разрывов ДНК под действием повреждающих нуклеиновые кислоты агентов или в результате работы систем репарации [15]. Однако другое исследование продемонстрировало близкий к нулевому уровень поврежденных мтДНК в культуре клеток рака молочной железы человека MCF-7 при их инкубации с ММС. При этом авторы делают заключение о не достаточной чувствительности применяемого ими метода Q-PCR с амплификацией фрагмента равного примерно половине молекулы мтДНК (8900 п. н.)



для обнаружения повреждений мтДНК, индуцированных ММС [16]. В то время, как амплифицируемые нами фрагменты меньшего размера ранее продемонстрировали свою чувствительность к повреждению мтДНК под действием свободных радикалов [11], что позволило детектировать увеличение уровня повреждений мтДНК в 3,4 и 6,4 раз относительно контрольной группы при введении ММС в дозе 10,0 мг/кг у мышей.

Остается неизвестным механизм повреждения мтДНК под действием ММС, поскольку используемый нами метод не позволяет определить тип повреждения ДНК [16]. Вместе с тем, установленная ранее высокая чувствительность участка мтДНК, содержащего Д-петлю к окислительному повреждению АФК [1], позволяет предполагать заметный вклад АФК, продуцируемых при метаболической активации ММС в повреждении мтДНК, что, однако требует подтверждения в дальнейших исследованиях.

При этом, микроядерный тест в клетках костного мозга мышей показал значимое увеличение МЯПХЭ при внутрибрюшинном введении ММС уже в дозе 6,0 мг/кг. Данное явление, вероятно, может быть связано с действием ММС на ядерную ДНК, образованием ковалентных сшивок между нитями ядерной ДНК и, как следствие, более высокой чувствительности ядерной ДНК к мутагенному действию ММС [3]. Поскольку формирование микроядер в клетках связано с невключением хромосом или их фрагментов в ядро дочерних клеток, кольцевые молекулы мтДНК не принимают участия в формировании микроядер [17]. Таким образом, микроядерный тест представляет дополнительную информацию об ММС-индуцированном повреждении генетического аппарата клеток [18]. Другой причиной может являться отличие в чувствительности различных тканей (костного мозга и печени) к повреждению, индуцированному ММС [7].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было проведено исследование влияния ММС на целостность мтДНК клеток печени и частоту эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей *in vivo*. Показано отсутствие влияния ММС на уровень митохондриального биогенеза в клетках печени мышей при интраперитонеальном введении препарата в дозах 6,0 и 10,0 мг/кг. Обнаружено повышение количества повреждений мтДНК в 3,4 и 6,4 раза при амплификации фрагментов мтДНК в участках, кодирующих 12S и 16S рРНК и Д-петлю соответственно у мышей получавших ММС в дозе

10,0 мг/кг. При этом введение ММС вызывало увеличение частоты МЯПХЭ в костном мозге мышей уже в дозе 6,0 мг/кг. Полученные данные позволяют предполагать большую чувствительность клеток костного мозга к токсическому действию ММС. Таким образом, методом Q-PCR нами показано повреждение мтДНК под действием ММС *in vivo*, что вносит дополнительный вклад в изучение механизмов мутагенного действия данного антибиотика. Кроме того, эти данные, вероятно, позволят использовать изучение целостности мтДНК при ММС индуцированной генетической нестабильности *in vivo* в качестве удобного инструмента оценки мутагенного и антимутагенного действия новых лекарственных средств. Однако достижение этой задачи требует дальнейших исследований для понимания механизмов ММС-индуцированного повреждения мтДНК и определения тканеспецифичности такого воздействия.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Rothfuss O. Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach / O. Rothfuss, T. Gasser, N. Patenge // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Vol. 38(4). — e24. — DOI: 10.1093/nar/gkp1082
2. Turnbull H. E. The mitochondrial brain: From mitochondrial genome to neurodegeneration / H. E. Turnbull, N. Z. Lax, D. Diodato, O. Ansorge, D. M. Turnbull // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2010. — Vol. 1802(1). — P. 111—121. — DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.07.010
3. Pazl M. M. Chapter Seven — The Molecular Toxicology of *Mitomycin C.* / M.M. Pazl, C. A. Pritsos // *Advances in Molecular Toxicology.* — 2012. — Vol. 6. — P. 243—299. — DOI: 10.1016/B978-0-444-59389-4.00007-0
4. Tomasz, M. Reductive metabolism and alkylating activity of mitomycin C induced by rat liver microsomes. / M. Tomasz, R. Lipman (1981) // *Biochemistry.* — 1981. — Vol. 20. — P. 5056—5061.
5. Tomasz M. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity / M. Tomasz, Y. Palom (1997) // *Pharmacol. Ther.* — 1997. — Vol. 76. — P. 73—87.
6. Shabunin S. Study of Mutagenic and Antitoxic Properties of Gentabiferon-B / S. Shabunin, V. Gritsyuk, G. Vostroilova [et al.] // *Macedonian Veterinary Review.* — 2022. — Vol. 45. — No 1. — P. 79—87. — DOI: 10.2478/macvetrev-2022-0016
7. Pritsos C. A. Disruption of normal cellular bioenergetics in Balb/c mice by mitomycin C / C. A. Pritsos, L. A. Briggs // *Br J Cancer Suppl.* — 1996. — Vol. 27. P. 15—18.
8. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. — М.: Гриф и К. — 2012. — 944с.

9. Lehle S. LORD-Q: a long-run real-time PCR-based DNA-damage quantification method for nuclear and mitochondrial genome analysis / S. Lehle, D. G. Hildebrand, B. Merz, P. N. Malak, M. S. Becker, P. Schmezer, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, O. Rothfuss // *Nucleic Acids Res.* — 2014. — Vol. 42(6). — P. e41. — DOI: 10.1093/nar/gkt1349

10. Gureev A. P. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors / A. P. Gureev, E. A. Shaforostova, A. A. Starkov, V. N. Popov // *Toxicology.* — 2017. — Vol. 382. — P. 67—74. — DOI: 10.1016/j.tox.2017.03.010

11. Хорольская В. Г. Влияние фенофибрат на генотоксичность в мозге и печени и на экспрессию генов, регулирующих метаболизм жирных кислот, у мышей / В. Г. Хорольская, А. П. Гуреев, Е. А. Шафоростова [и др.] // *Биомедицинская химия.* — 2019. — Т. 65. — № 5. — С. 388—397. — DOI: 10.18097/PBMC20196505388

12. Jain A. K., Pandey A. K. *In Vivo* Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow / A. K. Jain, A. K. Pandey // *Methods Mol Biol.* — 2019. — 2031. P. 135—146. — DOI: 10.1007/978-1-4939-9646-9\_7

13. Andreu A. L. Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors / A. L. Andreu, R. Martinez, R. Marti, E. Garcia-Arumi // *Mitochondrion.* — 2009. — Vol. 9(4). — P. 242—246. — DOI: 10.1016/j.mito.2009.02.006

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Г. А. Востроилова** — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;

**Е. В. Михайлов** — кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией инновационных препаратов рекомбинантной протеомики;

**М. Ю. Сыромятников** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики;

**А. А. Корчагина** — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;

**Д. И. Шабанов** — научный сотрудник;

**М. А. Селютина** — старший лаборант.

Статья поступила в редакцию 03.03.2023 г.

## EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY

Original article  
UDC 57.021:615.065

STUDY OF THE EFFECT OF MITOMYCIN ON THE LEVEL OF MITOCHONDRIAL DNA DAMAGE IN MICE *IN VIVO*

Dmitriy Igorevich Shabanov\*✉, Galina Anatolyevna Vostroilova\*,  
Evgeniy Vladimirovich Mikhaylov\*, Mikhail Yuryevich Syromyatnikov\*\*\*,  
Anastasiya Andreevna Korchagina\*, Mariya Aleksandrovna Selyutina\*

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

\*\*Voronezh State University, Voronezh, Russia

**Abstract.** In this research, we studied the effect of the antitumor antibiotic mitomycin C (MMC) on the integrity of mitochondrial DNA (mtDNA) of liver cells by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) and the frequency of occurrence of erythrocytes with micronuclei in the bone marrow of mice *in vivo*. The experiment included 3 groups of mice: control and two experimental, the animals of which were administered a single intraperitoneal injection of MMC at a dose of 6.0 and 10.0 mg/kg ( $n = 6$  for each group). Mitomycin was shown to have no effect on the level of mitochondrial biogenesis in mouse liver cells after intraperitoneal administration of the drug at doses of 6.0 and 10.0 mg/kg. An increase in the amount of mtDNA damage by 3.4 ( $p < 0.05$ ) and 6.4 ( $p < 0.05$ ) times was found during amplification of mtDNA fragments in the regions encoding 12S and 16S rRNA and the D-loop, respectively, in mice treated with MMC at a dose of 10.0 mg/kg. At the same time, the administration of MMC caused an increase by 3.4 times ( $p < 0.05$ ) in the frequency of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei in the bone marrow of mice already at a dose of 6.0 mg/kg. The data obtained suggest a greater sensitivity of bone marrow cells to the mutagenic action of MMC. Thus, mtDNA damage under the action of MMC *in vivo* has been shown, which makes an additional contribution to the study of the mechanisms of this antibiotic mutagenic activity.

**Keywords:** Mitomycin C, genotoxicity, liver, bone marrow, mice, mitochondrial DNA, micronucleus test

Maintaining the integrity of the mitochondrial genome is essential for the proper functioning of mitochondria. Due to the high concentration of reactive oxygen species (ROS) generated by oxidative phosphorylation, the mitochondrial genome is highly susceptible to oxidative stress, which can cause mitochondrial DNA (mtDNA) damage and mitochondrial diseases [1]. Mitochondrial diseases lead to disturbances in ATP synthesis, as a result of which the most energy-dependent tissues, such as nervous and muscle tissues, suffer first of all [2]. Mitochondrial DNA damage has been shown to be associated with aging as well as numerous diseases, including neurodegenerative disorders and cancer [1].

Mitomycin C (MMC) is one of the antibiotics that have been used in the clinical therapy of patients with malignant neoplasms [3]. Being in intracellular compartments, MMC is metabolized by reducing enzymes

with the formation of alkylated DNA and ROS through the reactions of redox cycles [4]. Activated MMC alkylates guanine at the N2 position with the formation of DNA monoadducts and, as a result, the formation of intrastrand and interstrand crosslinks of DNA adducts occurs [5]. Other macromolecules such as RNA, proteins or even mtDNA can also be targeted by MMC with resulting cytotoxicity [3]. MMC can also be used as a model mutagen in studies of mutagenicity and antimutagenic activity of new drug formulations [6].

Although the interaction of MMC with nuclear DNA has been widely studied, the interaction of mtDNA with MMC is currently not well understood. While it is known that the toxic effect of MMC, through the formation of adducts of nuclear DNA with MMC, does not fully explain the cytotoxicity mediated by MMC. Thus, mtDNA damage may play a significant role in MMC-induced cytotoxicity [7].

In addition, several methods have been developed to detect damaged mtDNA, but these methods are semi-quantitative and often lack sensitivity [1]. In this regard, the assessment of the relative level of mtDNA damage induced by MMC using real-time polymerase chain reaction (Q-PCR) amplification of mtDNA fragments of various lengths may be of interest in connection with the specification of the toxicity and mechanisms of the mutagenic action of the anticancer drug *in vivo* [1]. Therefore, the objective of our work was to study mtDNA damage by the alkylator drug mitomycin C in mice.

## 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 [8], as well as the requirements of the bioethical commission of the institute. As biological test systems, we used clinically healthy sexually mature white outbred male mice bred in the vivarium of FSBSI "ARVRIPP&T".

The objects under study were liver DNA samples and specimens of bone marrow cells from mice exposed to Mitomycin C (Kyowa, Japan).

For experimental work, 3 groups of white outbred male mice were formed, 6 animals each, weighing 18–20 g. The animals of the control group received an intraperitoneal injection of isotonic sodium chloride solution in a volume of 0.2 ml (group I). Mice of group II were intraperitoneally injected with MMC at a dose of 6.0 mg/kg in a volume of 0.2 ml. In group III, mice were injected intraperitoneally with MMC at a dose of 10.0 mg/kg in a volume of 0.2 ml. 24 h after the injection, the animals were taken out of the exper-

iment by an overdose of CO<sub>2</sub>. Liver and bone marrow tissues were collected.

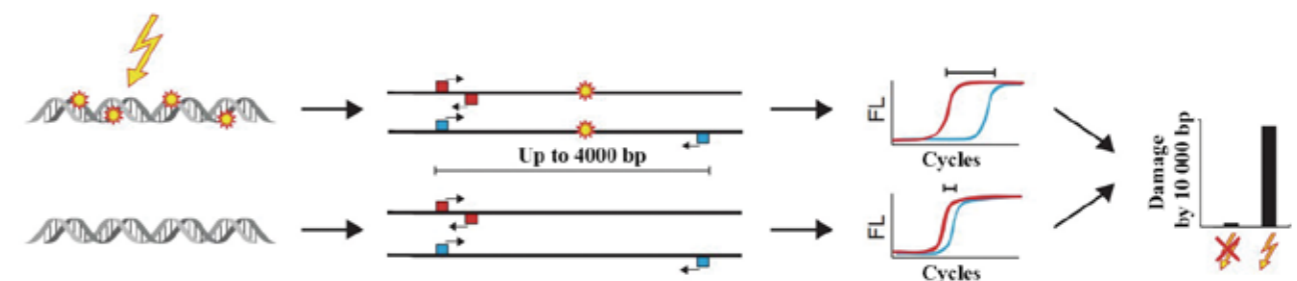
To determine the level of damage in mtDNA, a modified Q-PCR method was used [9, 10]. A schematic representation of the analysis principle is shown in Fig. 1. This method allows for sequence-specific detection and accurate quantification of damage in long regions of mitochondrial DNA [9, 10]. To do this, total DNA was isolated from 50 mg of the liver of mice of the studied groups using the PROBA-GS kit (DNA-technology, Russia), following the manufacturer's instructions. The amount of mtDNA damage was measured using Q-PCR of long fragments using PCR mixture 5x qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Russia) on a DTlite 4 amplifier (DNA-technology, Russia) [10].

Calculation of mtDNA damage was performed in regions encoding 12S and 16S rRNA (12S-16S) and D-loop, which showed the highest sensitivity to damage, using previously published primers [10]. The amount of damage in mtDNA was normalized per 10,000 base pairs (bp) according to the formula:

$$D \text{ mtDNA} = (1 - 2^{-(\Delta\text{long} - \Delta\text{short})}) \times \frac{\text{fragment length (bp)}}{10,000},$$

where D mtDNA is the amount of mtDNA damage per 10,000 bp;  $\Delta\text{long}$  is the difference between Cq of control and experimental long fragments;  $\Delta\text{short}$  is the difference between Cq of control and experimental short fragments [11]. The number of lesions in the mtDNA of mice from group I was taken as the control index Cq. The calculation of the number of lesions was performed using Microsoft Excel software (Microsoft; USA).

The mtDNA copy number was measured by Q-PCR using the mtDNA fragment "16S-Nd1" and the nuclear gene Gapdh as a reference [10, 11]. The normalized level of mtDNA relative to nuclear DNA was calculated using the formula:  $2^{-(\Delta\Delta\text{Cq})}$  [11].



**Fig. 1.** Schematic illustration of the analysis. Isolated mtDNA, damaged (top) or undamaged (bottom). Undamaged mtDNA sequence 1000–4000 bp long is successfully amplified, while some types of DNA damage or modification disrupt or slow down the PCR reaction, which is detected by reduced fluorescence (FL). Short fragments 40–70 bp in size serve as reference matrices. An increase in mtDNA damage or modification leads to increased  $\Delta\text{Cq}$  values (right) [9]

The preparation of bone marrow cell specimens for the micronucleus test was carried out according to the recommendations [8, 12]. The study of microspecimens for the frequency of occurrence of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei (MPCE) was carried out using a Bioscope-1 microscope (LOMO, Russia) at a magnification of  $\times 1000$ . To determine the frequency of polychromatophilic erythrocytes (PCE), 2000 cells were counted. The ratio of PChE to normochromic erythrocytes (PChE/NE) was determined per 500 cells [8].

The study groups were compared using the Mann-Whitney U-test using the STATISTICA 10 program (Statsoft, USA).

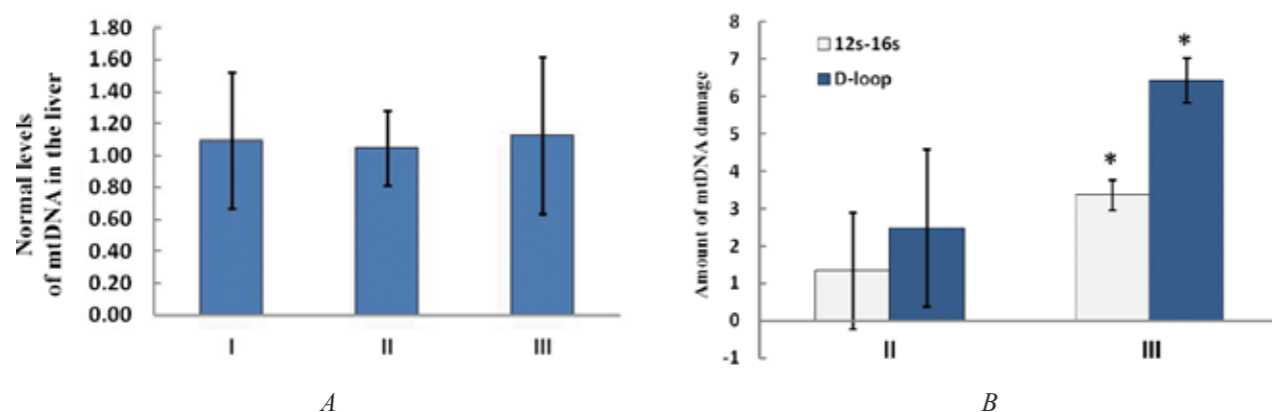
### STUDY RESULTS

During the experiment, we determined the copy number of mtDNA in mouse liver cells (Fig. 2A). Based on the data obtained, the use of MMC at a dose

of 6.0 and 10.0 mg/kg did not statistically significantly affect the level of mitochondrial biogenesis in the liver cells of mice of all studied groups.

A study of the genotoxic effect of MMC at a dose of 10.0 mg/kg (group III) revealed an increase in mtDNA damage (Fig. 2B). So the amount of mtDNA damage per 10,000 bp in group III was  $3.4 \pm 0.4$  ( $p < 0.05$ ) and  $6.4 \pm 0.6$  ( $p < 0.05$ ) relative to the level of mtDNA damage taken as zero in the control group (group I) in fragments 12S-16S and D-loop, respectively. At the same time, intraperitoneal injection of MMC at a dose of 6.0 mg/kg (group II) did not cause a statistically significant increase in the level of mtDNA damage in the 12S-16S fragment, which was  $1.3 \pm 1.5$ , and in the D-loop fragment, equal to  $2.5 \pm 2.1$ .

To assess the destabilizing effect of MMC on the nuclear genome, we studied the frequency of MPCE in the bone marrow of mice (Fig. 3A).



**Fig. 2.** Number of mitochondria in mouse liver samples (A) and the level of mtDNA damage per 10,000 bp relative to the mice of the control group (B):

I — animals of the negative control group (without MMC); II — mice injected with MMC at a dose of 6.0 mg/kg; III — mice injected with MMC at a dose of 10.0 mg/kg; 12S—16S, mtDNA region encoding 12S—16S ribosome genes; D-loop, mtDNA region encoding the D-loop region; \* — statistically significant difference from the negative control (group I) at  $p < 0.05$ ;  $M \pm SE$  — arithmetic mean  $\pm$  standard error

The frequency of MPCE in the animals from the control group (group I) was  $0.5 \pm 0.1$  %. In groups II and III, it increased by 3.4 ( $p < 0.05$ ) and 2.8 ( $p < 0.05$ ) times to  $1.7 \pm 0.1$  % and  $1.4 \pm 0.2$  %, respectively, relative to frequency of MPCE in the control group. At the same time, PChE/NE in group III decreased by 13.2 % ( $p < 0.05$ ) to  $39.9 \pm 3.8$  % relative to the mice of group I, in which the proportion of PChE in the bone marrow was  $45.5 \pm 1.3$  %. In group II, PChE/NE was  $45.8 \pm 1.4$  % and had no statistically significant differences from this indicator in mice of group I. A smaller increase in the frequency of MPCE in group III relative to the control group can be explained by a decrease in the proportion of PChE in the bone marrow

due to the toxic effect of MMC. Some authors believe that changes in the mtDNA copy number may be a response to stress factors and serve as a marker of mitochondrial toxicity in tissues [13].

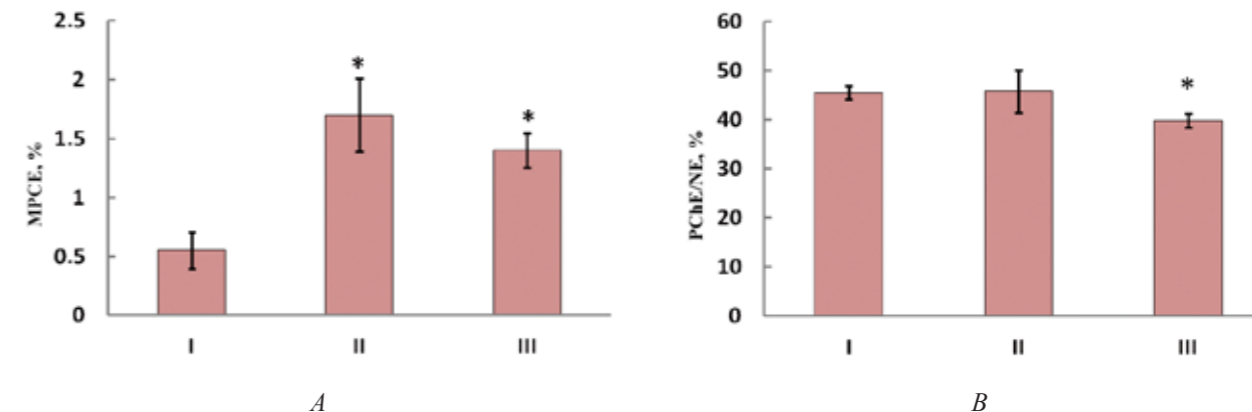
Therefore, similar values of the mtDNA copy number of mouse liver cells of all groups may indicate the absence of an effect of MMC at the studied doses on the level of mitochondrial biogenesis. Indirectly, these data are confirmed by studies that show that MMC has a tissue-specific effect, assessed by disruption of bioenergetics and a decrease in the level of ATP in cells [7]. Thus, intraperitoneal administration of MMC did not lead to a decrease in the level of ATP in the liver tissues of mice with intraperitoneal administration of

MMC at a dose of up to 10.0 mg/kg, this indicator significantly decreased only at a dosage of 20.0 mg/kg [7].

Our data on an increase in the amount of mtDNA damage in the liver cells of MMC mice are partially confirmed in some studies on cell cultures. Thus, the interaction of MMC with mtDNA is known to lead to a conformational change from hypercoiled to relaxed circular mtDNA in EMT6 mammary carcinoma cells in mice. This interaction can cause mitochondrial dysfunction leading to loss of cellular ATP [14]. Relaxation of mtDNA from a supercoiled form can occur as a result of single or double DNA breaks under the action of agents damaging nucleic acids or as a result of repair systems [15]. However, another study demonstrated near-zero mtDNA damage in cultured MCF-7 human breast cancer cells when incubated with MMC. At the same time, the authors conclude that their Q-PCR method with amplification of a fragment equal to ap-

proximately half of the mtDNA molecule (8900 bp) is not sufficiently sensitive to detect mtDNA damage induced by MMC [16]. While smaller fragments amplified by us previously demonstrated their sensitivity to mtDNA damage caused by free radicals [11], which made it possible to detect an increase in the level of mtDNA damage by 3.4 and 6.4 times relative to the control group when MMC was administered at a dose of 10.0 mg/kg in mice.

The mechanism of mtDNA damage under the action of MMC remains unknown, since the method we used does not allow one to determine the type of DNA damage [16]. At the same time, the previously established high sensitivity of the mtDNA region containing the D-loop to oxidative ROS damage [1] suggests a significant contribution of ROS produced during MMC metabolic activation to mtDNA damage, which, however, requires confirmation in further studies.



**Fig. 3.** Frequency of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei (A) and the ratio of polychromatophilic erythrocytes to normochromic ones (B) in the bone marrow of mice of the studied groups:

I — animals of the negative control group (without MMC); II — mice injected with MMC at a dose of 6.0 mg/kg; III — mice injected with MMC at a dose of 10.0 mg/kg; MPCE — frequency of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei, %; PChE/NE is the ratio of polychromatophilic erythrocytes to normochromic ones; \* — statistically significant difference from the negative control (group I) at  $p < 0.05$ ;  $M \pm SE$  — arithmetic mean  $\pm$  standard error

At the same time, a micronucleus test in mouse bone marrow cells showed a significant increase in MPCE with intraperitoneal administration of MMC already at a dose of 6.0 mg/kg. This phenomenon can probably be associated with the action of MMC on nuclear DNA, the formation of covalent crosslinks between nuclear DNA strands, and, as a result, a higher sensitivity of nuclear DNA to the mutagenic action of MMC [3]. Since the formation of micronuclei in cells is associated with the non-inclusion of chromosomes or their fragments in the nucleus of daughter cells, circular mtDNA molecules do not take part in the formation of micronuclei [17]. Thus, the micronucleus test provides additional information on MMC-induced

damage to the genetic apparatus of cells [18]. Another reason may be the difference in the sensitivity of different tissues (bone marrow and liver) to damage induced by MMC [7].

### CONCLUSION

We have studied the effect of MMC on the integrity of mtDNA of liver cells and the frequency of erythrocytes with micronuclei in the bone marrow of mice *in vivo*. MMC was shown to have no effect on the level of mitochondrial biogenesis in mouse liver cells after intraperitoneal administration of the drug at doses of 6.0 and 10.0 mg/kg. An increase in the amount of mtDNA damage by 3.4 and 6.4 times was found during am-

plification of mtDNA fragments in the regions encoding 12S and 16S rRNA and the D-loop, respectively, in mice treated with MMC at a dose of 10.0 mg/kg. At the same time, the introduction of MMC caused an increase in the frequency of MPCE in the bone marrow of mice already at a dose of 6.0 mg/kg. The data obtained suggest a greater sensitivity of bone marrow cells to the toxic effect of MMC. Thus, using the Q-PCR method, we have shown damage to mtDNA under the action of MMC *in vivo*, which makes an additional contribution to the study of the mechanisms of the mutagenic action of this antibiotic. In addition, these data are likely to make it possible to use the study of the integrity of mtDNA in MMC-induced genetic instability *in vivo* as a convenient tool for assessing the mutagenic and antimutagenic effects of new drugs. However, achieving this goal requires further research to understand the mechanisms of MMC-induced mtDNA damage and determine the tissue-specificity of such an effect.

## REFERENCES

1. Rothfuss O. Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach / O. Rothfuss, T. Gasser, N. Patenge // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Vol. 38(4). — e24. — DOI: 10.1093/nar/gkp1082
2. Turnbull H. E. The mitochondrial brain: From mitochondrial genome to neurodegeneration / H. E. Turnbull, N. Z. Lax, D. Diodato, O. Ansorge, D. M. Turnbull // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2010. — Vol. 1802(1). — P. 111—121. — DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.07.010
3. Pazl M. M. Chapter Seven — The Molecular Toxicology of Mitomycin C. / M.M. Pazl, C. A. Pritsos // *Advances in Molecular Toxicology.* — 2012. — Vol. 6. — P. 243—299. — DOI: 10.1016/B978-0-444-59389-4.00007-0
4. Tomasz, M. Reductive metabolism and alkylating activity of mitomycin C induced by rat liver microsomes. / M. Tomasz, R. Lipman (1981) // *Biochemistry.* — 1981. — Vol. 20. — P. 5056—5061.
5. Tomasz M. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity / M. Tomasz, Y. Palom (1997) // *Pharmacol. Ther.* — 1997. — Vol. 76. — P. 73—87.
6. Shabunin S. Study of Mutagenic and Antitoxic Properties of Gentabiferon-B / S. Shabunin, V. Gritsyuk, G. Vostroilova [et al.] // *Macedonian Veterinary Review.* — 2022. — Vol. 45. — No 1. — P. 79—87. — DOI: 10.2478/macvetrev-2022-0016
7. Pritsos C. A. Disruption of normal cellular bioenergetics in Balb/c mice by mitomycin C / C. A. Pritsos, L. A. Briggs // *Br J Cancer Suppl.* — 1996. — Vol. 27. P. 15—18.
8. Mironov A. N. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. — M.: Grif and K. — 2012. — 944 p.
9. Lehle S. LORD-Q: a long-run real-time PCR-based DNA-damage quantification method for nuclear and mitochondrial genome analysis / S. Lehle, D. G. Hildebrand, B. Merz, P. N. Malak, M. S. Becker, P. Schmezer, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, O. Rothfuss // *Nucleic Acids Res.* — 2014. — Vol. 42(6). — P. e41. — DOI: 10.1093/nar/gkt1349
10. Gureev A. P. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors / A. P. Gureev, E. A. Shaforostova, A. A. Starkov, V. N. Popov // *Toxicology.* — 2017. — Vol. 382. — P. 67—74. — DOI: 10.1016/j.tox.2017.03.010
11. Khorolskaya V. G. Effect of fenofibrate on genotoxicity in the brain and liver and on the expression of genes that regulate fatty acid metabolism in mice / V. G. Khorolskaya, A. P. Gureev, E. A. Shaforostova [et al.] // *Biomeditsinskaya khimiya (Biomedical Chemistry).* — 2019. — V. 65. — No. 5. — P. 388—397. — DOI: 10.18097/PBMC20196505388
12. Jain A. K., Pandey A. K. *In Vivo* Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow / A. K. Jain, A. K. Pandey // *Methods Mol Biol.* — 2019. — 2031. P. 135—146. — DOI: 10.1007/978-1-4939-9646-9\_7
13. Andreu A. L. Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors / A. L. Andreu, R. Martinez, R. Marti, E. Garcia-Arumi // *Mitochondrion.* — 2009. — Vol. 9(4). — P. 242—246. — DOI: 10.1016/j.mito.2009.02.006
14. Gustafson D. L. Mitochondrial-DNA damage induced by mitomycin C in EMT6 cells / D. L. Gustafson, C. A. Pritsos (1991) // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* — 1991. — Vol. 32. — P. 5.
15. Duprey A. The regulation of DNA supercoiling across evolution / A. Duprey, E. A. Groisman // *Protein Sci.* — 2021. — Vol. 30(10). — P. 2042—2056. — DOI: 10.1002/pro.4171
16. Boamah E. K. DNA adducts of decarbamoyl mitomycin C efficiently kill cells without wild-type p53 resulting from proteasome-mediated degradation of checkpoint protein 1. / E. K. Boamah, A. Brekman, M. Tomasz, N. Myeku, M. Figueiredo-Pereira, S. Hunter, J. Meyer, R. C. Bhoosle, J. Bargonetti // *Chem Res Toxicol.* — 2010. — Vol. 23(7). — P. 1151—1162. — DOI: 10.1021/tx900420k
17. Kasamoto S. *In vivo* micronucleus assay in mouse bone marrow and peripheral blood / S. Kasamoto, S. Masumori, M. Hayashi // *Methods Mol Biol.* — 2013. — Vol. 1044. — P. 179—189. — DOI: 10.1007/978-1-62703-529-3\_9
18. Ermakova T. I. The use of some genotoxic tests to assess the mutagenic properties of pharmacological agents / T. I. Ermakova, O. Yu. Fomenko, A. V. Turkina // *Bulletin of Veterinary Pharmacology.* — 2017. — No. 1(1). — P. 29—33.

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- D. I. Shabanov** — Scientific Associate;  
**G. A. Vostroilova** — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;  
**E. V. Mikhaylov** — Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics;  
**M. Yu. Syromyatnikov** — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics;  
**A. A. Korchagina** — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;  
**M. A. Selyutina** — Senior Laboratory Assistant.

The article was submitted 03.03.2023.

Научная статья

УДК 576.316.353.7:636

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.24

## СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ХРОМОСОМ

Инна Петровна Новгородова

*Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, о. Подольск, п. Дубровицы, Россия, e-mail: novg-inna2005@yandex.ru*

**Аннотация.** Цитогенетические исследования не теряют актуальности при использовании в животноводстве. В ходе работы были применены различные способы нанесения суспензии клеток хромосом на стекла (сухие, горячие и влажные охлажденные), необходимые для последующего проведения кариотипического исследования и анализа FISH у животных. Работа была выполнена на козах ( $n = 24$ ) и овцах ( $n = 32$ ), содержащихся на физиологическом дворе ФГБНУ ФИЦ ВИЖа им. Л. К. Эрнста. Материалом исследований служила кровь животных. Качество полученных метафазных пластинок оценивали при подсчете общего числа хромосом с четким изображением на каждом предметном стекле. Результаты исследований обрабатывали с использованием программы VideoTest Карио 3.1. Нанесение суспензии клеток на сухое стекло (1 вариант) иногда сопровождалось присутствием в образце обломков хромосом. Раскапывание жидкости на сухое стекло над пламенем спиртовки (2 вариант) не позволило получить желаемого результата, т. к. происходило сворачивание капель к ее центру. Использование влажных стекол, содержащихся в морозильной камере в 70 %-ом этиловом спирте до момента нанесения на них клеточной суспензии (3 вариант) позволило получить максимальное «распластывание» хромосом, хороший разброс на поверхности и отсутствие наложений. В зависимости от вида исследуемых животных качество, полученных препаратов отличалось и при использовании влажных стекол процентное соотношение у овец составило 91,95 %, а у коз — 96,45 %. Фактор получения препаратов хромосом оптимального качества составил 82,86 % ( $P < 0,001$ ). Таким образом, наилучшие результаты для приготовления метафазных пластинок оптимального качества было при нанесении суспензии клеток на влажную поверхность.

**Ключевые слова:** лимфоциты, культура клеток, кровь, овцы, козы, животные, хромосомы, цитогенетика, метафазные пластинки, FISH (флуоресцентная гибридизация).

**Благодарность:** работа выполнена в рамках ГЗ 0445-2021-0005 при финансовой поддержке фундаментальных научных исследований Минобрнауки РФ

Для картирования и сравнительных исследований использование FISH с зондами имеет ряд преимуществ [1, 2]. Немаловажное значение этот метод имеет для идентификации, а также определения регионов хромосом, приводящих к различным аномалиям [3, 4]. Новые молекулярные методы идентификации хромосом с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием локус-специфичных зондов позволяют определять транслокации как у людей, так и у животных. Получение препаратов хромосом необходимо для последующего проведения гибридизации *in situ* и, поэтому, особое внимание необходимо уделить именно этому факту. Данные о хромосомах успешно применяются в исследованиях, связанных с видовым родством или межвидовыми отношениями [5, 6]. Основная цель получения суспензии деля-

щихся клеток, содержащих метафазные хромосомы, заключается в приготовлении препаратов с большим числом хорошо расправленных хромосом [7—9]. Степень разброса хромосом на предметном стекле — основной критерий при подготовке препаратов. Немаловажным фактором, влияющим на качество и количество митотических пластинок, на этапе раскапывания препарата является скорость испарения, подогрева или охлаждения стекол. На данном этапе хромосомы могут быть вымыты со стекол [10]. Метафазное расположение хромосом в оптическом поле микроскопа и без наложений считается идеальным для исследований.

Цель нашего исследования направлена на выбор способа нанесения суспензии хромосом на стекло и получении максимального количества расправленных метафазных пластинок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ  
ИССЛЕДОВАНИЙ

Отбор проб крови. Исследования были проведены на козах ( $n = 24$ ) и овцах ( $n = 32$ ), содержащихся на физиологическом дворе Федерального исследовательского центра животноводства имени академика Л. К. Эрнста. Для проведения исследований предварительно отбирали кровь в одноразовые пробирки с гепарином вакуумной системы Vacuette («GreinerBio», Австрия) перед утренним кормлением животных путем прокола яремной вены. Образцы крови оставляли на 1,5—2 ч при 4 °С, затем центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин.

Получение культуры клеток лимфоцитов. Через 2 ч после взятия крови проводили подготовку для культивирования клеток лимфоцитов и осаждение клеток крови раствором фикола («Биолот», Россия). Отбирали 3 мл взвеси лимфоцитов и насливали на фикол (в количестве 1 мл). В ходе экспериментальной работы ранее были определены оптимальные условия, концентрации и растворы для культивирования и получения метафазных пластинок овец и коз [11]. Смесь для культивирования состоит из 5 мл питательной среды RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), 50 мкл ФГА и 55 мкл СоА, 40 мкл гентамицина («ПанЭко», Россия). После тщательного перемешивания в стерильные флаконы добавляли 2 мл взвеси лимфоцитов и помещали в термостат при температуре 37,4 °С на 72 ч. На 70 ч культивирования в культуральную смесь добавляли колхицин (80 мкл) («ПанЭко», Россия), затем проводили гипотоническую обработку (дистиллированной водой) и фиксацию клеточной взвеси раствором Карнуа (3 : 1 метанол и уксусная кислота («Химмед», Россия)).

Подготовка препаратов хромосом. В наших исследованиях было рассмотрено 3 варианта нанесения клеточной суспензии на стекло. *1 вариант:* чистое сухое стекло; *2 вариант:* чистое обезжиренное стекло удерживали над пламенем горелки до полного испарения жидкости; *3 вариант:* чистые стекла хранили в морозилке (при температуре –8 °С) в 70%-ном этиловом спирте и перед использованием их ополаскивали в холодной дистиллированной воде. Во всех случаях суспензию клеток наносили с высоты 30—40 см. После чего препараты высушивали на воздухе и проводили при необходимости окрашивание препаратов.

Идентификация хромосом. Идентификацию препаратов хромосом проводили в 20 метафазных пластинках на каждом предметном стекле и обрабатывали с использованием программы VideoTest Карио 3.1. Был проведен подсчет общего числа хро-

мосом с четким изображением на каждом предметном стекле. Фотосъемку осуществляли при помощи камеры Альтами 3М Пикс и микроскопа Альтами БИО1 (Россия), изображения обрабатывали с помощью программы AltamiStudio 3.4.0. (увеличение  $\times 100$ ).

Статистический анализ. Полученные данные были обработаны при помощи компьютерной программы SPSS Statistics 23.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ  
И ОБСУЖДЕНИЯ

Основная цель нашего эксперимента заключалась в способе нанесения суспензии на стекла при разных условиях (сухие, горячие и влажные охлажденные) для получения препаратов, используемых для цитогенетического анализа животных. Основное условие получения хороших и четких препаратов хромосом с максимальным количеством клеток заключается в хорошем сосредоточении на стекле, минимальном количестве наложений и максимальном их «распластывании». Нанесение клеточной суспензии на стекло при получении препаратов хромосом является одним из важных шагов. С этой целью необходимо оптимизировать условия, контролируемые влажность и температуру. Для определения качества хромосом определяли следующие критерии: не полный набор хромосом, отсутствие разброса хромосом, множественные наложения хромосом, препарат с единичными наложениями и метафазные пластинки оптимального качества (полный набор хромосом, хорошее распастьвание и отсутствие наложений).

Стоит отметить, что при 1 варианте (сухое стекло) при нанесении суспензии на стекло не всегда удавалось достичь ожидаемого результата. Наблюдалось образование белого налета в виде очертания высохшей капли, разброс хромосом был ограничен, в некоторых препаратах встречались множественные обломки метафазных пластинок, а также недостаточное количество метафаз (низкий митотический индекс).

Раскапывание жидкости во 2 варианте (на стекло наносили суспензию над пламенем горелки) иногда сопровождалось эффектом «сворачивания» капель (собирались в центр капли). При этом, как и при других вариантах нанесения культуры клеток, стекла были чистыми и обезжиренными.

Использование влажных стекол (3 вариант), содержащихся в морозильной камере в 70 %-ом этиловом спирте до момента нанесения на них клеточной суспензии, позволило достичь наилучших

результатов при получении метафазных пластин. При этом наблюдалось максимальное «распласты-

вание» хромосом, их хороший разброс на поверхности стекла и отсутствие наложений (рис. 1).

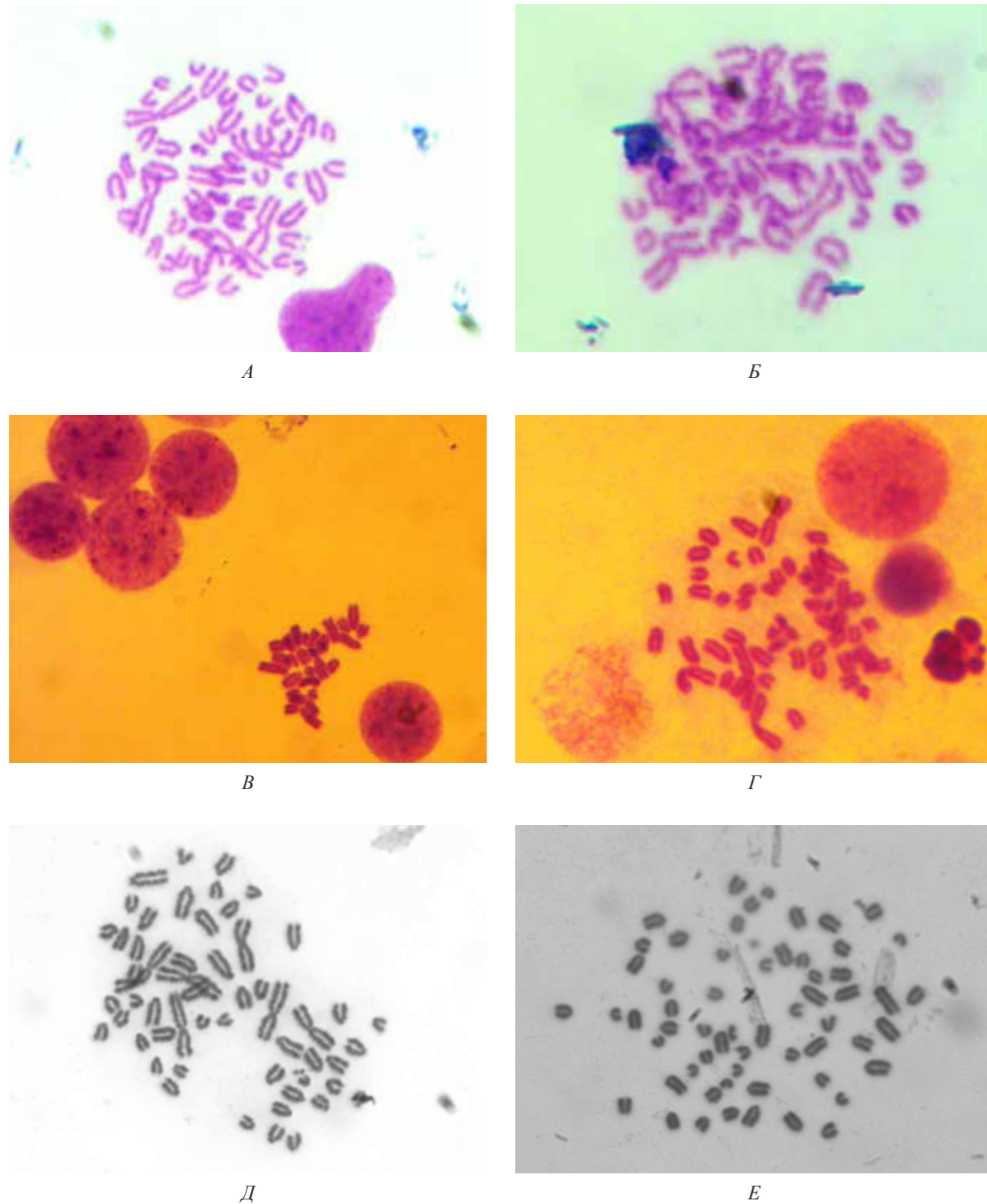


Рис. 1. Препараты хромосом (ув. X100, иммерсия):

незначительные наложения хромосом у овцы (А); множественные наложения хромосом у козы (Б); неполный набор хромосом у козы (В); неполный разброс хромосом у овцы (Г); препарат метафазных хромосом у овцы (Д); препарат хромосом у козла (Е)

Стоит также отметить, что в зависимости от вида исследуемых животных качество, полученных препаратов также отличалось. Так, при использовании 1 варианта (сухие стекла) препараты оптимального качества у овец составили 15,07 %, у коз 31,03 %; 2 варианта (нагревание над пламенем горелки) — 10,00 и 6,06 % и 3 варианта (влажные стекла) — 91,95 и 96,45 %.

При использовании горячих стекол процентное отношение метафазных пластинок было минимальным и у овец, и у коз, а также у них не встречались препараты с неполным набором. Использование влажных стекол исключало встречаемость множе-

ственных наложений. По результатам дисперсионного анализа были выявлены достоверные данные в зависимости от используемых вариантов стекол ( $P < 0,001$ ). Сила влияния в большей степени зависит от фактора получения препаратов хорошего качества (82,86 %).

Были проведены парные сравнения оптимального получения хромосом и с небольшими наложениями в зависимости от варианта использования стекол (табл. 1).

Достоверные значения были получены при использовании влажных стекол по этим изучаемым признакам ( $P < 0,05$ ).

Таблица 1

Парные сравнения качества препаратов в зависимости от способа получения стекол

Качество	Признак	Завис. перемен.	Разность средних	95 % доверит. интервал	
				мин.	макс.
Оптималь.	Сухие	Горячие	2,28 ± 1,64	1,29	5,85
		Влажные	12,75 ± 1,82*	8,79	16,71
	Сухие	10,47 ± 1,26*	7,73	13,22	
Оптималь. с небольш. налож.	Сухие	Горячие	1,83 ± 1,38	1,17	4,83
		Влажные	2,58 ± 1,06*	0,28	4,89
	Горячие	Влажные	0,75 ± 1,53	2,57	4,07

\*  $P < 0,05$

Коэффициент вариации качества препаратов в зависимости от используемого метода с оптимальным качеством при использовании влажных стекол составил 12, с небольшими наложениями — 54,86 (табл. 2). Показатели препаратов в зависимо-

сти от используемого способа представлены в таблице 2. Средние значения стекол оптимального качества у коз было выше (на 1,0), в то время как максимальные значения были практически одинаковыми у обоих видов.

Таблица 2

Показатели качества препаратов в зависимости от используемого метода

Качество	Способ	Средние значения	Стандартное отклонение
Оптимальный	Сухой	3,78	2,33
	Горячий	1,50	0,71
	Влажный	14,25	1,71
Оптимальный с небольш. наложениями	Сухой	4,33	2,06
	Горячий	2,50	0,71
	Влажный	1,75	0,96

В ходе эксперимента, направленного на улучшение качества препаратов хромосом и определения оптимальных условий нанесения на стекло, было выявлено, что наилучшие результаты были получены при использовании влажных холодных стекол.

Наиболее простым и быстрым способом, используемым при получении препаратов хромосом с целью анализа кариотипов животных, является культивирование клеток крови (лейкоцитов периферической крови). Для получения большого количества метафазных пластинок важен каждый этап кариологического анализа, в т. ч. подготовка тканей и стекол. С. W. Shao с другими исследователями (2010) рассматривали вопрос о необходимости разработки эффективного метода подготовки хромосом для цитогенетических исследований [12].

Метод получения препаратов митотических хромосом заключается в нанесении клеточной суспензии на поверхность предметных стекол с последующим высушиванием на воздухе. Нанесение клеточной суспензии на стекло при получении препаратов хромосом является одним из важных шагов. Некоторые исследователи помещают взвесь на предметное стекло и дают возможность фиксатору испариться. После этого хромосомы становятся неподвижными и хорошо зафиксированными на поверхности стекла. Испарение фиксатора влияет на качество фиксации клеточной взвеси и расположение хромосом на препарате. Именно, поэтому, необходимо оптимизировать условия, контролируемые влажность и температуру при получении препаратов хорошего качества.

На этапе нанесения клеточной суспензии на стекло было проведено несколько модификаций: сухие стекла, горячие стекла, высушенные над пламенем горелки и холодные влажные стекла, хранившиеся в 70 %-ом этиловом спирте в морозилке.

При падении капли клеточной суспензии на стекло происходит разрушение клеточных или ядерных оболочек и высвобождение хромосом. Высыхание препарата обеспечивает прикрепление хромосом к стеклу. Хромосомы должны располагаться в одной плоскости достаточно свободно одна от другой, быть контрастными и иметь четкие контуры. Для кариотипирования необходимо выбирать метафазные пластинки с минимальным числом наложений хромосом.

Г. Р. Di Meo с коллегами (2011) при сравнительных исследованиях генных карт овец, крупного рогатого скота и буйволов с использованием анализа FISH и сопоставлении их с хромосомами человека

(HSA2q, HSA3, HSA21 и HSA1q) применяли способ нанесения клеток на чистые и влажные стекла, которые затем высушивали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения гибридизации *in situ* [13].

С. Тулегенов (2011) в своей работе для приготовления препарата хромосом овец породы казахский архаромеринос наносил взвесь фиксированных клеток на охлажденное предметное стекло и после этого высушивал его над пламенем спиртовки [14]. Таким же протоколом пользовались А. Iannuzzi со своими исследователями (2013) при цитогенетических исследованиях овец, выращенных в южной Италии, и дальнейшего проведения метода FISH [15].

Для изучения цитогенетической характеристики овец Vizianagaram I. S. Kumar с другими учеными (2014) помещали суспензию хромосом на предварительно очищенные и высушенные на воздухе стекла [16].

А. Karami с коллегами (2015) для приготовления препаратов хромосом рыб наносили клеточную суспензию на влажное стекло, хранившееся в спирте. Максимального разброса хромосом добивались путем спиралевидного вращения стекла по часовой стрелке [8].

Г. Pandya с учеными (2016) при исследованиях, проводимых на буйволах, готовили препараты методом воздушной сушки над пламенем горелки. Суспензию клеток наносили на влажные стекла, затем быстро пропускали над пламенем горелки и окрашивали [17].

При цитогенетическом исследовании V. Genualdoa и других исследователей (2018) исчезающих пород свиней, проживающих в Южной Америке и Италии, клеточную суспензию наносили на влажные и теплые предметные стекла [18]. S. Albarella с коллегами (2019) проводили цитогенетический анализ овец по схожей методике [19].

Для проведения генетического анализа хромосом у коз породы Сандуро G. Ciptadi с другими исследователями (2019) использовали нанесение клеток культуры на чистые сухие стекла [20].

При сравнительном исследовании цитогенетического профиля крупных белых йоркширских помесных свиней V. Harshini с исследователями (2019) наносили гомогенную клеточную суспензию на влажные охлажденные стекла. При этом стекла удерживали под углом  $45^{\circ}$  [21].

Для обнаружения хромосомных aberrаций у коров А. Р. Amancio с другими учеными (2019) наносили суспензию клеток на предметное стекло над водяной баней (температура  $60^{\circ}\text{C}$ ). Это по-

зволило получить препараты хорошего качества для цитогенетических исследований при определении причин низкой репродуктивной функции животных [22].

Качество препаратов оценивают с учетом особенностей метафазных пластинок друг от друга, их целостности, четкой окраски хромосом, их средней степени конденсации, достаточного разброса в пределах метафазной пластинки и небольшого количества (1—2) взаимных поперечных наложений.

Проведенные нами исследования, указывают на то, что хороший разброс хромосом на препарате был получен при использовании следующей методики: нанесение суспензии клеток с высоты 40 см на влажные охлажденные стекла, хранившиеся в морозилке в 70 %-ном этиловом спирте с последующим высушиванием стекол на воздухе. С помощью метода, описанного выше, метафазные пластинки отличались хорошим распределением, позволяющим идентифицировать наборы хромосом и оптимальным митотическим индексом (10—15 метафаз на стекле).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные нами исследования, указывают на то, что наиболее эффективным способом раскапывания гомогенной клеточной суспензии на стекло для получения митотических клеток и визуализации хромосом являлось использование влажных охлажденных стекол, хранившихся в морозильной камере в 70 %-ом этиловом спирте с последующим высушиванием стекол на воздухе. Основным преимуществом этого метода является минимальная потеря хромосом во время приготовления препаратов, повышение процента метафазных пластинок и оптимальный разброс хромосом на стекле.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Di Meo G. P. An advanced sheep (*Ovis aries*,  $2n=54$ ) cytogenetic map and assignment of 88 new loci by fluorescent *in situ* hybridization and R-banding / G. P. Di Meo, A. Perucatti, S. Floriot, H. Hayes, L. Schibler, R. Rullo, D. Incarnato, L. Ferretti, N. Cockett, E. Crihiu, J. L. Williams, A. Eggen and L. Iannuzzi // *Animal Genetics* — 2007. — V.38. — P.233—240. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2007.01598.x.
2. Новгородова И. П. Цитогенетика в животноводстве // *Зоотехния*. — 2020. — № 10. — С. 2—5. DOI: 10.25708/ZT.2020.73.26.001
3. Molteni L. A new case of reciprocal translocation in a young bull: rcp(11;21)(q28;q12) / L. Molteni, A. Perucatti, A. Iannuzzi, G. Meo, L. De Lorenzi, A. De Giovanni // *Cytogenet. Genome Res.* — 2007. — V.116. — 80—84.
4. Iannuzzi L., Di Berardino D. Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal Cytogenetics // *J. Appl. Genet.* — 2008. — V.49(4). — P. 357—366. DOI:10.1007/BF03195634.
5. Mazzoleni S. Evolutionary insight on localization of 18S, 28S rDNA genes on homologous chromosomes in Primates genomes / S. Mazzoleni, M. Rovatsos, O. Schillaci and F. Dumas // *Comparative Cytogenetics*. — 2018. — V.12(1). — P. 27—40. <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v12i1.19381>.
6. Gorobeyko U. V. DNA-barcoding and a new data about the karyotype of *Myotis petax* (Chiroptera, Vespertilionidae) in the Russian Far East / U.V. Gorobeyko, I. V. Kartavtseva, I. N. Sheremetyeva, D. V. Kazakov, V. Yu. Guskov // *CompCytogen.* — 2020. — V.4(4). — P. 483—500. DOI: 10.3897/compcytogen.v14.i4.54955
7. Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир. 1986. — 268 с.
8. Karami A. Chromosome preparation in fish: effects of fish species and larval age / A. Karami, P. E. Araghi, M. A. Syed, S. P. Wilson. // *Int. Aquat. Res.* — 2015. — V.7. — P. 201—210. DOI 10.1007/s40071—015—0104-z.
9. McKinney S. An adaptable chromosome preparation methodology for use in invertebrate research organisms / S. McKinney, C. Guerrero-Hernández, L. Guo, M. Gibson, A. Accorsi, S. Sivagnanam S. et al. // *BMC Biol.* [Internet]. — 2018. — V.16(1). — P. 25.
10. Wood K. W. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target / K. W. Wood, W. D. Cornwell, J. R. Jackson // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2001. — V.1. — P. 370—377. DOI: 10.1016/s1471-4892(01)00064-9
11. Новгородова И. П. Сравнительный анализ гипотонических растворов для цитогенетических исследований животных // *Аграрная наука*. — 2021. — № 350 (6). — С. 24—26. DOI 10.28983/asj.y2021i7pp66—70 /
12. Shao C. W. Comparison of chromosome preparation methods for the different developmental stages of the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* / C. W. Shao, P. F. Wu, X. L. Wang, Y. S. Tian, S. L. Chen // *Micron*. — 2010. — V.41(1). — P. 47—50. DOI 10.1016/j.micron.2009.08.002.
13. Di Meo G. P. Extended Cytogenetic Maps of Sheep Chromosome 1 and Their Cattle and River Buffalo Homoeologues: Comparison with the OAR1 RH Map and Human Chromosomes 2, 3, 21 and 1q / G. P. Di Meo, T. Goldammer, A. Perucatti, V. Genualdo, A. Iannuzzi, D. Incarnato, A. Rebl, D. Di Berardino, L. Iannuzzi. // *Cytogenet. Genome Res.* — 2011. — V.133. — P. 16—24. DOI: 10.1159/000323796
14. Тулегенов С. Кариотип овец породы казахский архаромеринос // *Научный журнал Казахского национального аграрного университета*. — 2011. — № 5. — С. 30—33.

15. Iannuzzi A. Cytogenetic in vestigations in sheep reared in Southern-Italy by using both chromosome banding and FISH-mapping techniques / A. Iannuzzi, A. Perucatti, V. Genualdo, A. Caputi-Jambrenghi, V. Peretti, G. Vonghia, L. Iannuzzi // *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences*. — 2013. — V.8 (1). — P. 1—6. DOI:10.12816/0005013.
16. Kumar I. S. Cytogenetic characterization of Vizianagaram sheep / I. S. Kumar, B. P. Kumari, M. G. Prakash // *Indian J. Anim. Res.* — 2014. — V.48(6). — P. 532—536. DOI:10.5958/0976—0555.2014.00026.0.
17. Pandya G. Standard karyotype of surti buffalo from an organized farm / G. Pandya, N. Dangar, M. Janmeda // *International Journal of Science, Environment and Technology*. — 2016. — V.3(5). — P. 1108—1115.
18. Genualdo V. Cytogenetic investigation in two endangered pig breeds raised in Southern-Italy: Clinical and environmental aspects / V. Genualdo, A. Perucattia, D. Marlettab, B. Castiglionic, S. Bordonarob, M. Iannacconed, F. Ciotolae, V. Perettie, A. Iannuzzi // *Livestock Science*. — 2018. — V.216. — P. 36—43. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.07.005>.
19. Albarella S. Cytogenetic Analyses in Ewes with Congenital Abnormalities of the Genital Apparatus / S. Albarella, E. D'Anza, G. Galdiero, L. Esposito, D. De Biase, O. Paciello, F. Ciotola and V. Peretti // *Animals*. — 2019. — V.9. — P. 776. DOI:10.3390/ani9100776.
20. Ciptadi G. Phenotypic and Genetic Character Variations of a New Breed of Genetic Resource of Senduro Goat, Indonesia / G. Ciptadi, A.R.I. Putri, S. Rahayu, S. Wahjuningsih, M. Nasich, F. Rokhman, M. Mudawamah, S. Sarastina, E. Herwijanti, H. N. Karima and A. Budiarto // *The 9th International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC) and AJI from Ritsumeikan University AIP Conf. Proc.* — 2019. — P. 060007—1—060007—5. <https://doi.org/10.1063/1.5061916>.
21. Harshini V. A. comparative study on cytogenetic profile of Large White Yorkshire crossbred and non-descript pigs / V. Harshini, K. S. Devi, B. P. Kumari and J. Suresh // *Indian J. Anim. Res.* — 2019. — V.53(1). — P. 8—13. DOI: 10.18805/ijar.B-3462
22. Amancio A. P. Banded karyotype of Nelore cattle (*Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758) / A. P. Amancio, S. S. Moreira Duarte, R. C. Silva, A.S. da Cruz, D. C. Silva, C.C. da Silva, A.D. da Cruz // *Comp. Cytogen.* — 2019. — V.13(3). — P. 265—275. DOI: 10.3897/Comp-Cytogen.v13i3.36449

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

И. П. Новгородова — старший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 13.03.2023 г.

Original article  
UDC 576.316.353.7:636

## METHOD OF OBTAINING CHROMOSOME PREPARATIONS

Inna Petrovna Novgorodova

Federal Research Center for Animal Husbandry — VIZH named after Academician L. K. Ernst, v. Dubrovitsy, Podolsk, Russia, novg-inna2005@yandex.ru

**Abstract.** Cytogenetic studies do not lose their relevance when used in animal husbandry. In the course of the work, various methods of applying a suspension of chromosome cells to glasses (dry, hot and wet cooled) were used, which are necessary for subsequent karyotyping and FISH analysis in animals. The work was performed on goats ( $n = 24$ ) and sheep ( $n = 32$ ) kept in the physiological yard of Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academician L. K. Ernst. Animal blood served as the research material. The quality of the obtained metaphase plates was evaluated by counting the total number of chromosomes with a clear image on each slide. The research results were processed using the VideoTest Karyo 3.1 software. The application of a cell suspension on dry glass (variant 1) was sometimes accompanied by the presence of chromosome fragments in the sample. Pipetting the liquid onto dry glass over the flame of an alcohol lamp (variant 2) did not allow us to obtain the desired result, because droplets rolled toward its center. The use of wet glasses kept in a freezer in 70 % ethanol until the cell suspension was applied to them (variant 3) made it possible to obtain the maximum “spreading” of chromosomes, a good spread on the surface and the absence of overlaps. Depending on the type of animals studied, the quality of the preparations obtained differed, and when using wet glasses, the percentage ratio in sheep was 91.95 %, and in goats — 96.45 %. The factor for obtaining optimal quality chromosome preparations was 82.86 % ( $P < 0.001$ ). Thus, the best results for the preparation of metaphase plates of optimal quality were when applying the cell suspension to a wet surface.

**Keywords:** lymphocytes, cell culture, blood, sheep, goats, animals, chromosomes, cytogenetics, metaphase plates, FISH (fluorescent hybridization).

**Acknowledgment:** the work was carried out within the framework of the State Assignment 0445-2021-0005 with the financial support of fundamental scientific research of the Ministry of Education and Science of the RF

For mapping and comparative studies, the use of FISH with probes has a number of advantages [1, 2]. This method is of no small importance for the identification and determination of chromosome regions leading to various anomalies [3, 4]. New molecular methods for chromosome identification using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with locus-specific probes allow the detection of translocations in both humans and animals. Obtaining chromosome preparations is necessary for the subsequent *in situ* hybridization and, therefore, special attention must be paid to this fact.

Chromosome data are successfully used in studies related to species relationships or interspecies relationships [5, 6]. The main goal of obtaining a suspension of dividing cells containing metaphase chromosomes is to prepare preparations with a large number of well-arranged chromosomes [7—9]. The degree of scatter of chromosomes on a glass slide is the main criterion in the preparation of preparations. An important factor affecting the quality and quantity of mitot-

ic plates at the stage of pipetting the preparation is the rate of evaporation, heating or cooling of the glass. At this stage, the chromosomes can be washed from the slides [10]. The metaphase arrangement of chromosomes in the optical field of the microscope and without overlaps is considered ideal for research.

The objective of our study is to choose a method for applying a suspension of chromosomes to glass and obtaining the maximum number of straightened metaphase plates.

## MATERIAL AND METHODS

**Blood sampling.** The studies were carried out on goats ( $n = 24$ ) and sheep ( $n = 32$ ) kept in the physiological yard of Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academician L. K. Ernst. For research, blood was preliminarily taken into disposable tubes with heparin of the Vacuette vacuum system (GreinerBio, Austria) before the morning feeding of animals by puncturing the jugular vein. Blood sam-



ples were left for 1.5—2 h at 4 °C, then centrifuged for 10 min at 1000 rpm.

**Obtaining a culture of lymphocyte cells.** Two hours after blood sampling, preparation for culturing lymphocyte cells and sedimentation of blood cells with fikol solution (Biolot, Russia) were carried out. Three (3) ml of a suspension of lymphocytes were taken and layered on ficol (in the amount of 1 ml). In the course of experimental work, optimal conditions, concentrations and solutions for cultivating and obtaining metaphase plates of sheep and goats were previously determined [11]. The culture mixture consisted of 5 ml of RPMI 1640 nutrient medium (PanEco, Russia), 50 µl of PHA and 55 µl of CoA, and 40 µl of gentamicin (PanEco, Russia). After thorough mixing, 2 ml of a suspension of lymphocytes was added to sterile flasks and placed in a thermostat at a temperature of 37.4 °C for 72 hours. Colchicine (80 µl) (PanEco, Russia) was added to the culture mixture for 70 hours, then hypotonic treatment (with distilled water) and fixation of the cell suspension with Carnoy's solution (3 : 1 methanol and acetic acid (Khimmed, Russia).

**Preparation of chromosome preparations.** In our studies, we considered 3 variants for applying a cell suspension to glass. Variant 1: clean dry glass; Variant 2: clean, fat-free glass was held over the burner flame until the liquid completely evaporated; Variant 3: clean glasses were stored in a freezer (at –8 °C) in 70 % ethanol and rinsed in cold distilled water before use. In all cases, the cell suspension was applied from a height of 30—40 cm. After that, the preparations were dried in air and, if necessary, the preparations were stained.

**Identification of chromosomes.** Identification of chromosome preparations was carried out in 20 metaphase plates on each slide and processed using the VideoTest Karyo 3.1 program. The total number of chromosomes was counted with a clear image on each slide. Photography was carried out using the Altami 3M Pix camera and the Altami BIO1 microscope (Russia), images were processed using the AltamiStudio 3.4.0 software (magnification x100).

**Statistical analysis.** The obtained data were processed using the SPSS Statistics 23.0 computer program.

## RESULTS AND DISCUSSION

The main objective of our experiment was to apply the suspension on slides under different conditions (dry, hot and wet cooled) to obtain preparations used for cytogenetic analysis of animals. The main condition for obtaining good and clear preparations of chromosomes with the maximum number of cells is good

placing on the glass, the minimum number of overlaps and their maximum “spreading”. The application of the cell suspension to glass during the preparation of chromosome preparations is one of the important steps. To this end, it is necessary to optimize the conditions that control humidity and temperature. To determine the quality of chromosomes, the following criteria were determined: incomplete set of chromosomes, no scatter of chromosomes, multiple overlaps of chromosomes, preparation with single overlaps, and metaphase plates of optimal quality (complete set of chromosomes, good spreading and no overlaps).

It should be noted that in variant 1 (dry glass), when applying the suspension to glass, it was not always possible to achieve the expected result. The formation of white plaque in the form of an outline of a dried drop was observed, the scatter of chromosomes was limited, in some preparations there were multiple fragments of metaphase plates, as well as an insufficient number of metaphases (low mitotic index).

Pipetting the liquid in variant 2 (a suspension was applied to the glass over the flame of a burner) was sometimes accompanied by the effect of “folding” drops (they gathered in the center of the drop). In this case, as in other variants of cell culture application, the slides were clean and fat-free.

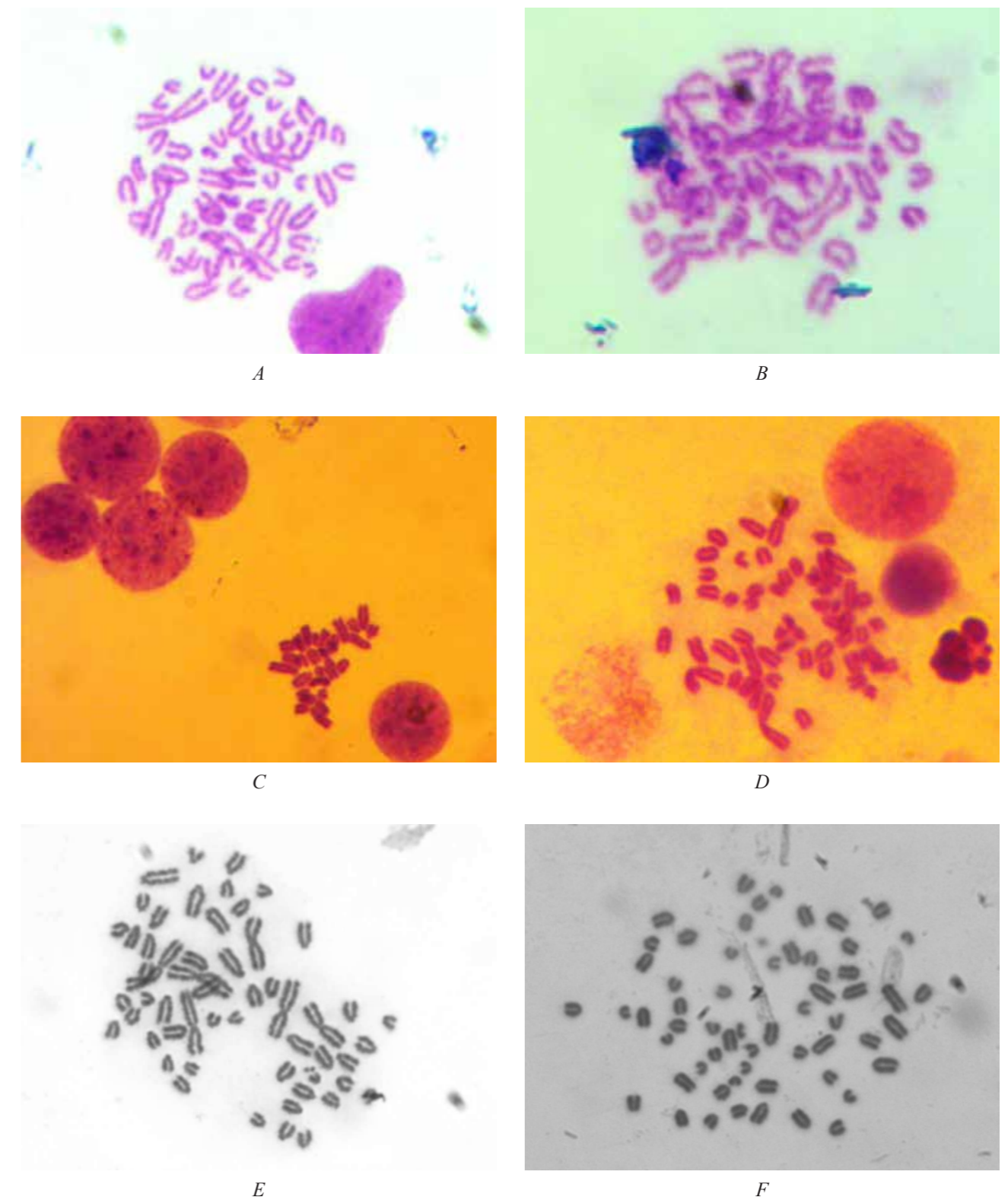
The use of wet glasses (variant 3), kept in a freezer in 70 % ethanol until the cell suspension was applied to them, made it possible to achieve the best results in obtaining metaphase plates. At the same time, the maximum “spreading” of chromosomes, their good spread on the glass surface and the absence of overlaps were observed (Fig. 1).

It is also worth noting that, depending on the type of animals studied, the quality of the preparations obtained also differed. So when using variant 1 (dry glasses), the optimal quality preparations in sheep amounted to 15.07 %, in goats — 31.03 %; variant 2 (heating over the burner flame) — 10.00 % and 6.06 %, and variant 3 (wet glasses) — 91.95 % and 96.45 %. When using hot glasses, the percentage of metaphase plates was minimal in both sheep and goats, and they did not meet preparations with an incomplete set. The use of wet glasses excluded the occurrence of multiple overlaps.

Based on the results of the analysis of variance, reliable data were revealed depending on the glass types used ( $P < 0.001$ ). The strength of influence largely depends on the factor of obtaining good quality drugs (82.86 %). Pairwise comparisons were made of optimal chromosome acquisition and with minor overlap depending on the use of the glass types (Table 1). Significant values were obtained using wet glasses for

these studied traits ( $P < 0.05$ ). The variation coefficient of the quality of preparations depending on the method

used with optimal quality when using wet glasses was 12, with minor overlaps — 54.86 (Table 2).



**Fig. 1.** Preparations of chromosomes (X 100, immersion): minor overlap of chromosomes in a sheep (A); multiple overlap of chromosomes in a goat (B); incomplete set of chromosomes in a goat (C); incomplete spread of chromosomes in a sheep (D); preparation of metaphase chromosomes in a sheep (E); preparation of chromosomes in a goat (F)

**Table 1**  
Paired comparisons of the quality of preparations depending on the method of obtaining glasses

Quality	Feature	Depend. variab.	Mean difference	95 % confidence interval	
				min.	max.
Optimal	Dry	Hot	2.28 ± 1.64	1.29	5.85
	Wet	Hot	12.75 ± 1.82*	8.79	16.71
		Dry	10.47 ± 1.26*	7.73	13.22
Optimal with minor overlaps	Dry	Hot	1.83 ± 1.38	1.17	4.83
		Wet	2.58 ± 1.06*	0.28	4.89
	Hot	Wet	0.75 ± 1.53	2.57	4.07

\*  $P < 0.05$

The indicators of preparations, depending on the method used, are presented in Table 2. The average values of glasses of optimal quality in goats were higher (by 1.0), while the maximum values were almost the same in both species.

In the course of an experiment aimed at improving the quality of chromosome preparations and determining the optimal conditions for applying to glass, it was found that the best results were obtained when using wet cold glasses.

**Table 2**  
Quality indicators of preparations depending on the method used

Quality	Method	Mean value	Standard deviation
Optimal	Dry	3.78	2.33
	Hot	1.50	0.71
	Wet	14.25	1.71
Optimal with minor overlaps	Dry	4.33	2.06
	Hot	2.50	0.71
	Wet	1.75	0.96

The simplest and fastest method used in obtaining chromosome preparations for the analysis of animal karyotypes is the cultivation of blood cells (leukocytes of peripheral blood). To obtain a large number of metaphase plates, each stage of karyological analysis is important, including fabric and glass preparation. C. W. Shao et al. (2010) considered the need to develop an effective method for preparing chromosomes for cytogenetic studies [12].

The method of obtaining preparations of mitotic chromosomes consists in applying a cell suspension to the surface of glass slides, followed by drying in air. The application of the cell suspension to glass during

the preparation of chromosome preparations is one of the important steps. Some researchers place the suspension on a glass slide and allow the fixative to evaporate. After that, the chromosomes become immobile and well fixed on the glass surface. Evaporation of the fixative affects the quality of fixation of the cell suspension and the arrangement of chromosomes on the preparation. That is why it is necessary to optimize the conditions that control humidity and temperature in order to obtain good quality preparations.

Several modifications were made at the stage of applying the cell suspension to the slides: dry slides, hot slides dried over a burner flame, and cold wet slides

stored in 70 % ethanol in a freezer. When a drop of cell suspension falls on glass, the cell or nuclear membranes are destroyed and chromosomes are released. Drying of the preparation ensures the attachment of chromosomes to the glass.

Chromosomes should be located in the same plane rather freely from one another, be contrasting and have clear contours. For karyotyping, it is necessary to choose metaphase plates with a minimum number of chromosome overlaps.

G. P. Di Meo et al. (2011), in comparative studies of sheep, cattle and buffalo gene maps using FISH analysis and matching them to human chromosomes (HSA2q, HSA3, HSA21 and HSA1q), used the method of applying cells to clean and damp slides, which then dried and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until *in situ* hybridization [13].

S. Tulegenov (2011) applied a suspension of fixed cells to a cooled glass slide and then dried it over the flame of an alcohol lamp to prepare a preparation of chromosomes from Kazakh Archaromerinos sheep [14]. The same protocol was used by A. Iannuzzi et al. (2013) during cytogenetic studies of sheep raised in southern Italy and further FISH method [15].

To study the cytogenetic characteristics of Vizianagaram sheep, I. S. Kumar et al. (2014) placed a suspension of chromosomes on previously cleaned and air-dried glasses [16].

A. Karami et al. (2015) applied a cell suspension to wet glass kept in alcohol to prepare preparations of fish chromosomes. The maximum scatter of chromosomes was achieved by clockwise spiral rotation of the glass [8].

G. Pandya et al. (2016) in the studies conducted on buffaloes prepared preparations by air drying over a burner flame. The cell suspension was applied to wet glasses, then quickly passed over a burner flame and stained [17].

In a cytogenetic study by V. Genualdia et al. (2018) of endangered pig breeds living in South America and Italy, the cell suspension was applied to wet and warm glass slides [18]. S. Albarella et al. (2019) performed a cytogenetic analysis of sheep using a similar technique [19].

To conduct a genetic analysis of chromosomes in Sanduro goats, G. Ciptadi et al. (2019) used the application of culture cells on clean dry glasses [20].

In a comparative study of the cytogenetic profile of large white Yorkshire crossbred pigs, V. Harshini et al. (2019) applied a homogeneous cell suspension to wet chilled slides. In this case, the glasses were held at an angle of  $45^{\circ}$  [21].

To detect chromosome aberrations, A. P. Amancio et al. (2019) applied the cell suspension to a glass slide over a water bath (temperature  $60^{\circ}\text{C}$ ). This made it possible to obtain good quality preparations for cytogenetic studies in determining the causes of low reproductive function of animals [22].

The quality of preparations is assessed taking into account the isolation of metaphase plates from each other, their integrity, clear coloration of chromosomes, their average degree of condensation, sufficient spread within the metaphase plate and a small number (1—2) of mutual transverse overlaps.

Our studies indicate that a good scatter of chromosomes on the preparation was obtained using the following technique: applying a cell suspension from a height of 40 cm to wet chilled slides stored in a freezer in 70 % ethanol, followed by drying the slides in air. Using the method described above, the metaphase plates were well distributed, allowing the identification of chromosome sets and an optimal mitotic index (10—15 metaphases on glass).

## CONCLUSION

Thus, our studies indicate that the most effective method of pipetting a homogeneous cell suspension onto glass to obtain mitotic cells and visualize chromosomes was to use wet chilled glasses stored in a freezer in 70 % ethanol, followed by drying the glasses on air. The main advantage of this method is the minimal loss of chromosomes during the preparation of preparations, the increase in the percentage of metaphase plates and the optimal spread of chromosomes on the slide.

## REFERENCES

1. Di Meo G. P. An advanced sheep (*Ovis aries*,  $2n=54$ ) cytogenetic map and assignment of 88 new loci by fluorescent *in situ* hybridization and R-banding / G. P. Di Meo, A. Perucatti, S. Floriot, H. Hayes, L. Schibler, R. Rullo, D. Incarnato, L. Ferretti, N. Cockett, E. Cribiu, J. L. Williams, A. Eggen and L. Iannuzzi // *Animal Genetics* — 2007. — V. 38. — P. 233—240. DOI:10.1111/j.1365—2052.2007.01598.x.
2. Novgorodova I. P. Cytogenetics in animal husbandry // *Zootechniya (Zootechnics)*. — 2020. — No. 10. — P. 2—5. DOI: 10.25708/ZT.2020.73.26.001
3. Molteni L. A new case of reciprocal translocation in a young bull:  $rcp(11;21)(q28;q12)$  / L. Molteni, A. Perucatti, A. Iannuzzi, G. Meo, L. De Lorenzi, A. De Giovanni // *Cytogenet. Genome Res.* — 2007. — V.116. — 80—84.
4. Iannuzzi L., Di Bernardino D. Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal Cytogenetics // *J. Appl. Genet.* — 2008. — V.49(4). — P. 357—366. DOI:10.1007/BF03195634.

5. *Mazzoleni S.* Evolutionary insight on localization of 18S, 28S rDNA genes on homologous chromosomes in Primates genomes / S. Mazzoleni, M. Rovatsos, O. Schillaci and F. Dumas // *Comparative Cytogenetics*. — 2018. — V.12(1). — P. 27—40. <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v12i1.19381>.
6. *Gorobeyko U. V.* DNA-barcoding and a new data about the karyotype of *Myotis petax* (Chiroptera, Vespertilionidae) in the Russian Far East / U. V. Gorobeyko, I. V. Kartavtseva, I. N. Sheremetyeva, D. V. Kazakov, V. Yu. Guskov // *CompCytogen*. — 2020. — V.4(4). — P. 483—500. DOI: 10.3897/compcytogen.v14.i4.54955
7. *McGregor G., Varley J.* Methods of working with animal chromosomes. M.: Mir. 1986. — 268 p.
8. *Karami A.* Chromosome preparation in fish: effects of fish species and larval age / A. Karami, P. E. Araghi, M. A. Syed, S. P. Wilson. // *Int. Aquat. Res.* — 2015. — V.7. — P. 201—210. DOI 10.1007/s40071—015—0104-z.
9. *McKinney S.* An adaptable chromosome preparation methodology for use in invertebrate research organisms / S. McKinney, C. Guerrero-Hernández, L. Guo, M. Gibson, A. Accorsi, S. Sivagnanam S. et al. // *BMC Biol.* [Internet]. — 2018. — V.16(1). — P. 25.
10. *Wood K. W.* Past and future of the mitotic spindle as an oncology target / K. W. Wood, W. D. Cornwell, J. R. Jackson // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2001. — V.1. — P. 370—377. DOI: 10.1016/s1471-4892(01)00064-9
11. *Novgorodova I. P.* Comparative analysis of hypotonic solutions for cytogenetic studies of animals // *Agrarnaya nauka (Agrarian science)*. — 2021. — No. 350 (6). — P. 24—26. DOI: 10.28983/asj.y2021i7pp66—70/
12. *Shao C. W.* Comparison of chromosome preparation methods for the different developmental stages of the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* / C. W. Shao, P. F. Wu, X. L. Wang, Y. S. Tian, S. L. Chen // *Micron*. — 2010. — V.41(1). — P. 47—50. DOI: 10.1016/j.micron.2009.08.002
13. *Di Meo G. P.* Extended Cytogenetic Maps of Sheep Chromosome 1 and Their Cattle and River Buffalo Homoeologues: Comparison with the OAR1 RH Map and Human Chromosomes 2, 3, 21 and 1q / G. P. Di Meo, T. Goldammer, A. Perucatti, V. Genualdo, A. Iannuzzi, D. Incarnato, A. Rebl, D. Di Berardino, L. Iannuzzi. // *Cytogenet Genome Res.* — 2011. — V.133. — P. 16—24. DOI: 10.1159/000323796
14. *Tulegenov S.* Karyotype of Kazakh Arharomerinos sheep // *Nauchnyy zhurnal Kazakhskogo natsionalnogo agrarnogo universiteta (Scientific journal of Kazakh National Agrarian University)*. — 2011. — No. 5. — P. 30—33.
15. *Iannuzzi A.* Cytogenetic in investigations in sheep reared in Southern-Italy by using both chromosome banding and FISH-mapping techniques / A. Iannuzzi, A. Perucatti, V. Genualdo, A. Caputi-Jambrenghi, V. Peretti, G. Vonghia, L. Iannuzzi // *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences*. — 2013. — V.8 (1). — P. 1—6. DOI:10.12816/0005013.
16. *Kumar I. S.* Cytogenetic characterization of Vizianagaram sheep / I. S. Kumar, B. P. Kumari, M. G. Prakash // *Indian J. Anim. Res.* — 2014. — V.48(6). — P. 532—536. DOI:10.5958/0976—0555.2014.00026.0.
17. *Pandya G.* Standard karyotype of surti buffalo from an organized farm / G. Pandya, N. Dangar, M. Janmeda // *International Journal of Science, Environment and Technology*. — 2016. — V.3(5). — P. 1108—1115.
18. *Genualdo V.* Cytogenetic investigation in two endangered pig breeds raised in Southern-Italy: Clinical and environmental aspects / V. Genualdo, A. Perucattia, D. Marlettab, B. Castiglioni, S. Bordonarob, M. Iannacconed, F. Ciotolae, V. Perettie, A. Iannuzzi // *Livestock Science*. — 2018. — V.216. — P. 36—43. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.07.005>.
19. *Albarella S.* Cytogenetic Analyses in Ewes with Congenital Abnormalities of the Genital Apparatus / S. Albarella, E. D'Anza, G. Galdiero, L. Esposito, D. De Biase, O. Paciello, F. Ciotola and V. Peretti // *Animals*. — 2019. — V.9. — P. 776. DOI:10.3390/ani9100776.
20. *Ciptadi G.* Phenotypic and Genetic Character Variations of a New Breed of Genetic Resource of Senduro Goat, Indonesia / G. Ciptadi, A.R.I. Putri, S. Rahayu, S. Wahjuningsih, M. Nasich, F. Rokhman, M. Mudawamah, S. Sarastina, E. Herwijanti, H. N. Karima and A. Budiarto // *The 9th International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC) and AJI from Ritsumeikan University AIP Conf. Proc.* — 2019. — P. 060007—1—060007—5. <https://doi.org/10.1063/1.5061916>.
21. *Harshini V. A.* comparative study on cytogenetic profile of Large White Yorkshire crossbred and non-descript pigs / V. Harshini, K. S. Devi, B. P. Kumari and J. Suresh // *Indian J. Anim. Res.* — 2019. — V.53(1). — P. 8—13. DOI: 10.18805/ijar.B-3462
22. *Amancio A. P.* Banded karyotype of Nelore cattle (*Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758) / A. P. Amancio, S. S. Moreira Duarte, R. C. Silva, A.S. da Cruz, D. C. Silva, C.C. da Silva, A.D. da Cruz // *Comp. Cytogen.* — 2019. — V.13(3). — P. 265—275. DOI: 10.3897/CompCytogen.v13i3.36449

## INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

**I. P. Novgorodova** — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientific Associate of the Laboratory of Cell Engineering.

The article was submitted 13.03.2023.

## КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 577.171.4:636.3:636.087.7

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.37

КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА  
У ОВЕЦ С ОСТЕОДИСТРОФИЕЙ

Дмитрий Александрович Саврасов\*✉, Виталий Тимофеевич Лопатин\*,  
Александр Андреевич Михайлов\*, Павел Андреевич Паршин\*\*,  
Галина Анатольевна Востроилова\*\*, Станислав Сергеевич Карташов\*

\*Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия

\*\*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, [dmitrij-savrasov@yandex.ru](mailto:dmitrij-savrasov@yandex.ru)✉

**Аннотация.** В статье представлены результаты эффективности применения препарата «ХроМакс» для коррекции метаболического статуса у овец с остеодистрофией. «ХроМакс» является источником хрома, который играет важную роль в энергетическом обмене, в частности, участвует в контроле рецепторов инсулина и обмене глюкозы, является активатором обмена белков и ферментов, регулирующих выработку энергии из углеводов, жиров и белков. Испытания проводились на овцах кучугуровской породы с клиническими признаками нарушения обмена веществ — остеодистрофия. В результате проведенных испытаний, у овец с остеодистрофией было установлено купирование анемии, что сопровождалось увеличением содержания гемоглобина и эритроцитов, оптимизирование минерального обмена, за счет повышения содержания кальция и уменьшения количества неорганического фосфора и уровня щелочной фосфатазы. Нормализация сокращения рубца, pH рубцового содержимого, общая кислотность и подвижность инфузорий, что свидетельствовало о восстановлении его функционального состояния у овец. Таким образом, применение «ХроМакс» в течение 30 дней в дозе 5 г на голову привело к стабилизации метаболического статуса (минерального обмена) у овец с остеодистрофией.

**Ключевые слова:** овца, метаболизм, остеодистрофия, ацидоз, хром, рубец

Сохранение продуктивного здоровья сельскохозяйственных животных реализуется в количестве, качестве и биологической полноценности продуктов животноводства. Это определяет экономическую эффективность ведения животноводства, благополучие, здоровье населения и, в целом, продовольственную безопасность страны. Здоровье и продуктивность овец непосредственно связано с интенсивным течением процессов обмена веществ и поэтому главными критериями оценки состояния их здоровья являются показатели интенсивности процессов всех видов обмена веществ, выявление ранних доклинических (донозологических) нарушений их течения, определение истинных причин для их своевременного устранения и восстановления здоровья [1—5, 7—10, 12].

Нарушения обмена веществ у животных — одна из острых проблем в современном животноводстве многих стран. Нарушения метаболизма

вызывают структурные изменения во всех органах и системах и снижают способность к реализации свойственных им физиологических функций. Для своевременного предупреждения и устранения расстройств в обмене веществ и обеспечения оптимального метаболического статуса и продуктивного здоровья животных, необходим постоянный контроль за состоянием животного, проведение профилактических, в случаях клинического проявления — диспансеризация. Широко распространенным заболеванием нарушения обмена веществ у продуктивных животных является остеодистрофия. Патогенез остеодистрофии связан с нарушением обмена кальция и фосфора, и сложным механизмом регуляции метаболизма этих элементов, в котором важную роль играет кальциферол, гормоны щитовидной железы (паратиреоидин, кальцитонин), функциональные состояния кишечника, почек, печени, и ряд других факторов. Нарушение

© Саврасов Д. А., Лопатин В. Т., Михайлов А. А., Паршин П. А., Востроилова Г. А., Карташов С. С., 2023

регуляции фосфорного обмена влечет за собой нарушение кальциевого и наоборот. При скармливании кислых кормов и избыточном поступлении с кормами фосфора развивается ацидозная форма остеодистрофии. В этом случае в крови увеличивается содержание ионов  $\text{HPO}_4$ , что сопровождается ацидозом и повышением гормональной активности паращитовидных желез. Под влиянием паратормона уменьшается реабсорбция фосфатов почечными канальцами и увеличивается выделение их с мочой. Гомеостаз поддерживается в этом случае мобилизацией фосфатов из костной ткани. Однако вместе с фосфором из костной ткани извлекается и кальций, содержание которого в крови может оказаться весьма высоким. Под влиянием парат-гормона разрушаются остециты и остеобласты, и увеличивается количество остеокластов, что ведет к резорбции и деминерализации костной ткани [3, 10, 11].

Существует множество лечебно-профилактических средств, применение которых дает положительный эффект в нормализации обменных процессов, одним из которых является кормовая хромсодержащая добавка «ХроМакс». Состав кормовой добавки «ХроМакс»: пропионат хрома 0,4—0,6 %, пропионовая кислота более 7,0 %, пропиленгликоль 0,1—0,5 % и наполнитель — оксид кремния до 100 %. Содержание хрома не менее 1000 мг/кг. Хром образует амфотерные соединения, т. е. может проявлять как щелочные, так и кислотные свойства. Наиболее устойчивыми природными считаются формы трех- и шестивалентного хрома. Только трехвалентный хром  $\text{Cr}^{+3}$  представляет собой незаменимый элемент питания организма животных и человека, а шестивалентный  $\text{Cr}^{+6}$  обладает токсическим действием. В условиях стресса степень усвоения хрома падает на 50—70 %; при недостатке магния и кальция степень усвоения хрома пропорционально снижается. Каждая молекула фермента поджелудочной железы трипсина содержит один атом трехвалентного хрома. Элемент участвует в кишечном пищеварении, являясь активным центром трипсина. Входит в состав органического комплекса — олигопептидахромодулин (LMWCr) [14, 15, 18—21, 23, 24].

Хромодулин — это составная часть белка сывортки крови, который получен путем конкурирующего включения в трансферин вместо железа атома хрома. Хром, как активная часть хромодулина связывается с рецепторами поверхности клеток и образует АТР протонную помпу, которая способствует проникновению внутрь клетки большой по

размеру молекулы инсулина. Это приводит к существенному возрастанию чувствительности клеток к действию инсулина и усиливает проникновение глюкозы в клетку. Хром участвует в синтезе белков, накапливается в РНК клетках печени, обеспечивает регуляцию синтеза жирных кислот и холестерина. Усиливает утилизацию небелкового азота в организме жвачных и синтез иммунных белков, позитивно влияя на иммунные реакции животных [6, 13, 22].

Введение биодоступного хрома в рацион сельскохозяйственных животных, птицы и растущего молодняка, способствует более эффективному использованию энергии кормов, впоследствии, увеличению продуктивности и привесов, а также улучшению показателей здоровья и воспроизводства [6, 9, 14, 16, 17, 21—23].

Целью нашего исследования явилось изучение влияния препарата «ХроМакс» на метаболический статус у овец с остеодистрофией.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в условиях кафедры терапии и фармакологии, учебно-научно-исследовательского центра животноводства факультета ветеринарной медицины и технологии животноводства Воронежского государственного аграрного университета имени императора Петра I и ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии».

Для проведения опыта была сформирована группа овец кучугуровской породы ( $n = 10$ ) с клиническими признаками нарушения обмена веществ (остеодистрофия), массой 30—35 кг в возрасте 11—12 месяцев. Животные содержались в типовых помещениях вивария скученно, без активного движения. На время эксперимента животные были помещены в отдельные секции. Кормление осуществлялось с применением силосно-жомового и бардяного типов.

Постановку диагноза осуществляли комплексно с учетом данных анамнеза, клинической картины и лабораторных исследований крови и рубцового содержимого. В течение 30 суток в рацион овцам (в смеси с пшеничными отрубями) ежедневно добавляли 5 г на голову кормовой добавки «ХроМакс». Ежедневно в ходе опыта за овцами вели наблюдения. Клиническое состояние животных оценивали по аппетиту, упитанности, активности, жвачки и числу рубцовых сокращений.

Для изучения обмена веществ у овец нами были проанализированы морфологические и биохимические показатели крови опытных животных до и после скармливания кормовой добавки, согласно методам, представленным в «Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / под ред. Проф. И. П. Кондрахина. — М.: Колос, 2004. — 520 с.». Количество эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина на гематологическом анализаторе «АВХ Micros 60». Определение глюкозы, АсАт, АлАт, холестерин, мочевины проводили химическим методом с помощью наборов Vital-диагностик на спектрофотометре ПЭ-5300В, кальция и неорганического фосфора на биохимическом анализаторе HumaStar 600, общий белок с помощью рефрактометра RHC-200/АТС, СОЭ методом по Панченкову.

Рубцовое содержимое получали методом зондирования. Для оценки физических и химических свойств рубцового пищеварения отбирали содержимое рубца, опытных животных, в объеме 100 мл для каждой пробы до и после скармливания изучаемой кормовой добавки. Оценивали цвет содержимого, запах, консистенцию — органолептически, рН-метром рН-150МИ, общую кислотность — титрованием с помощью 1 % спиртового

раствора фенолфталеина и 0,1 н. раствором едкого натра, активность рубцовой микрофлоры по Дирксену и Хофиреку, микроскопией определяли размер и подвижность инфузорий.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ

У овец опытной группы отмечалось угнетение (апатия), снижение и извращение аппетита, скрежетание зубами, упитанность удовлетворительная, алопеции на отдельных участках тела, шерстный покров матовый, непроизвольные сокращения отдельных групп мышц, гипотония рубца (1—2 сокр. за 2 мин.), наблюдалось замедление жвачки, сокращение количества жвачных периодов и появление поноса (консистенция каловых масс — 1,2 балла). До скармливания кормовой добавки «ХроМакс» некоторые показатели крови опытных животных имели отклонения от физиологических границ. Так, у овец с остеодистрофией содержание гемоглобина и эритроцитов находилось на нижних границах референсных значений, что указывает на возможное развитие гипохромной анемии легкой степени, количество лейкоцитов было ниже на 27,4 %, СОЭ у овец до скармливания «ХроМакс» находилось в пределах физиологических границ (табл. 1).

Таблица 1

Гематологические показатели крови овец до и после применения «ХроМакс»

Показатели	До применения препарата	После применения препарата на 30 день	Референсные значения (по И. П. Кондрахину)
Гемоглобин, г/л	78,8 ± 2,2	111,2 ± 2,3	79—119
Эритроциты, $10^{12}/л$	6,7 ± 1,5	9,6 ± 1,4	7,0—12,0
Лейкоциты, $10^9/л$	4,7 ± 0,7	7,5 ± 0,8	6,0—14,0
СОЭ, мм/час	0,62 ± 0,25	0,85 ± 0,27	0,5—1,5

При анализе биохимических показателей крови у овец с остеодистрофией выявлено повышенное в 2,6 раза содержание неорганического фосфора и пониженное на 22,6 % количество кальция (табл. 2). Выявленное нарушение кальциево-фосфорного отношения обусловлено антагонистическим свойством фосфора — препятствовать всасыванию кальция.

У овец с нарушением минерального обмена отмечено повышение ферментативной активности АсАТ на 39,3 % и АлАТ на 42,5 %. Умеренное развитие синдрома цитолиза, который характеризуется повышенной проницаемостью клеточных мембран

гепатоцитов или их разрушением, подтверждало нарушение функционального состояния печени.

До скармливания кормовой добавки «ХроМакс» пробы рубцового содержимого характеризовались коричнево-бурым цветом, кислым, гнилостным запахом, с наличием примеси корма (табл. 3). Отмечено понижение рН на 18,2 %, повышение общей кислотности на 20,7 %, и низкая активность микроорганизмов рубца, преобладание инфузорий мелких и средних размеров, с пониженной подвижностью, что указывает на нарушение рубцового пищеварения и развитие ацидозной формы остеодистрофии.

Таблица 2

Биохимические показатели крови овец до и после скармливания «ХроМакс»

Показатели	До применения препарата	После применения препарата на 30 день	Референсные значения (по И. П. Кондрахину)
Общий белок, г/л	69,5 ± 2,2	74,9 ± 3,4	65—75
Глюкоза, моль/л	2,0 ± 0,4	3,2 ± 0,5	2,2—3,3
Холестерин, ммоль/л	1,63 ± 0,20	1,35 ± 0,23	1,56—3,36
Мочевина, ммоль/л	3,40 ± 0,30	3,32 ± 0,36	3,3—5,8
Са, ммоль/л	2,09 ± 0,13	2,90 ± 0,16	2,50—3,13
Р, ммоль/л	4,53 ± 2,23	1,79 ± 1,13	1,45—1,84
Са/Р	1 : 2	2,9 : 1,8	2 : 1
ЩФ, об.%СО <sub>2</sub>	0,85 ± 0, 01	0,45 ± 0,02	0,4—0,8
АсАТ, мМ/л·ч	2,09 ± 0,04	0,49 ± 0,06	0,4—1,5
АлАТ, мМ/л·ч	1,14 ± 0,053	0,54 ± 0,03	0,3—0,8

После применения препарата у овец были отмечены следующие изменения: нормализовался аппетит и жвачка, повысилась упитанность, шерстный покров приобрел равномерный и блестящий вид. У животных установлено увеличение содержание гемоглобина и эритроцитов на 39,4 и 43,2 % соответственно, лейкоцитов на 37,3 %, глюкозы на 37,5 %, снижение количества неорганического фосфора в 2,5 раза, достигнув тем самым референсных значений, уровня щелочной фосфатазы в 1,9 раза, повышение концентрации кальция на 32,6 %, что способствовало нормализации кальциево-фосфорного отношения (табл. 2). В результате применения «ХроМакс» отмечено снижение уровня АсАТ и АлАТ в 4,3 и 2,1 раза соответственно, что указывало на оптимизацию функционального состояния печени. Во время проведения исследований пока-

затели общего белка, холестерина и мочевины находились в пределах референсных значений.

Анализируя полученные результаты, считаем, что кормовая добавка «ХроМакс», с действующим веществом в виде хрома, через стимуляцию энергетического обмена повышает биологическую доступность кальция, оказывая тем самым положительный терапевтический эффект на метаболический статус овец с остеодистрофией, что согласуется с литературными данными [1, 4, 18, 20, 21]. На 30-й день применения кормовой добавки «ХроМакс» физические и химические показатели рубцового пищеварения достигли физиологических параметров. Восстановлена сократительная способность рубца, содержимое его у овец стало буро-зеленым цветом, кашицеобразной консистенции, кисло-пряным запахом, с примесью частиц корма (табл. 3).

Таблица 3

Физико-химические свойства рубцового содержимого овец до и после применения «ХроМакс»

Показатели	До применения препарата	После применения препарата на 30 день	Референсные значения (по И. П. Кондрахину)
1	2	3	4
Количество сокращений рубца за 2 мин.	2,0 ± 0,1	6,5 ± 0,2	3—6
Цвет	Коричнево-бурый	Буро-зеленый	Буро-зеленый
Консистенция	Кашицеобразная	Кашицеобразная	Кашицеобразная

Окончание табл. 3

1	2	3	4
Запах	Кислый, гнилостный	Кисло-пряный	Кисло-пряный
Примеси	Корм	Корм	Частицы корма
рН	5,5 ± 0,18	6,9 ± 0,32	6,5—7,2
Общая кислотность в ед. титра	11,1 ± 1,34	7,2 ± 2,31	0,6—9,2
Активность рубцовой микрофлоры, мин	> 3	< 3	3

Отмечено повышение рН рубцового содержимого на 25,5 %, снижение на 35,1 % общей кислотности, увеличение в 2 раза подвижности инфузо-

рий с преобладанием крупных форм (табл. 4), что указывало на нормализацию функционального состояния рубца у овец.

Таблица 4

Микроскопия рубцового содержимого овец до и после применения «ХроМакс»

Показатели	До применения препарата	После применения препарата на 30 день	Референсные значения (по И. П. Кондрахину)
Размер инфузорий	Мелкие и средние	Средние и крупные	Крупные
Подвижность инфузорий, баллы	2,5 ± 0,23	4,8 ± 0,26	5

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение кормовой добавки «ХроМакс» сопровождалось увеличением содержание гемоглобина и эритроцитов, нормализацией минерального обмена, восстановлением функционального состояния рубца, обусловленное нормализацией его сокращений, рН — содержимого, общей кислотности и подвижности инфузорий.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Бетин А. Н. Пропионат хрома в рационе молодняка свиней / А. Н. Бетин // Комбикорма. — 2014. — № 1. — С. 75—78.
2. Влияние наночастиц хрома на потери живой массы бычков черно-пестрой породы при технологических стрессах / В. Н. Никулин [и др.] // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2018. — № 6 (74). — С. 208—210.
3. Алиментарная остеодистрофия овцематок и корригирующая терапия / З. М. Джамбулатов, М. Г. Зухрабов, Б. М. Гаджиев [и др.] // Известия Дагестанского ГАУ. — 2020. — № 2(6). — С. 67—72. — EDN IPDVMG.
4. Кислякова Е. М. Влияние добавок органического хрома на продуктивные и репродуктивные показатели

коров черно-пестрой породы / Е. М. Кислякова, А. А. Ломаева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2017. — Т. 232. — № 4. — С. 76—80.

5. Кишечное пищеварение и биохимия крови у кур-несушек (*Gallus gallus* L.) при введении в рационы микро-добавки хрома / В. И. Фисинин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. — 2019. — Т. 54. — № 4. — С. 810—819.

6. Кучинский М. П. Определение острой токсичности препарата «хромарцин» / М. П. Кучинский, Г. П. Цируль // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. — 2020. — № 23—2. — С. 207—214.

7. Лопатин В. Т. Сравнительная терапевтическая эффективность диспепсии ягнят / В. Т. Лопатин, Д. А. Саврасов, А. А. Михайлов, С. С. Карташов // Овцы, козы, шерстяное дело. — 2018. — № 2. — С. 46—47.

8. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / Под ред. Проф. И. П. Кондрахина. — М.: КолосС, 2004. — 520 с.

9. Москвичева А. Б. Использование органической хромкомпенсирующей добавки в рационах коров / А. Б. Москвичева, Е. М. Кислякова, А. А. Ломаева // Вестник Казанского государственного аграрного университета. — 2016. — Т. 11. — № 2 (40). — С. 25—28.

10. Остеодистрофия овец в условиях Республики Бурятия / В. В. Токарь, С. П. Ханхасыков, И. Р. Кильметова [и др.] // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2018. — № 6(74). — С. 159—161.
11. Редкозубова Л. Профилактика и лечение ацидоза /Л.Редкозубова// Животноводство России. — 2018. — № 1. — С. 34—37.
12. Ani M, Moshtaghie A. A. 1992. The effect of chromium on parameters related to iron metabolism. Biological Trace Element Research, 32, 57—64.
13. Arvizu R R, Domínguez I A, Rubio M S, Bórquez J L, González M, Jaramillo G. 2011. Effects of genotype, level of supplementation and organic chromium on growth performance, carcass, and meat traits grazing lambs. Meat Science, 88, 404—408.
14. Domínguez V I A, Haro G F, Martínez H G. 1999. Evaluation and growth performance and carcass characteristics of sheep supplemented with the complex organic chromium L-methionine. In: Memories of X National Congress of Sheep Production. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, University of Veracruz, AMTEO, Mexico. pp. 6—10. (in Spanish)
15. Estrada A A, Valdés Y S, Carrillo M O, Castro P B I, Barreras A, López S M A, Plasencia A, Dávila R H, Rios F G, Zinn R A. 2014. Effects of feeding different levels of chromium-enriched live yeast in hairy lambs fed a corn-based diet: Effects on growth performance, dietary energetics, carcass traits and visceral organ mass. Animal Production Science, 53, 308—315.
16. Gardner G E, Pethick D W, Smith G. 1998. Effect of chromium chelative supplementation on the metabolism of glycogen and lipid in adult Merino sheep. Australian Journal of Agricultural Research, 49, 137—145. Gentry L R, Fernández J M, Ward T L, White T W, Southern L Laura Moreno-Camarena et al. Journal of Integrative Agriculture 2015, 14(3): 567—574 573
17. Kraidess M S, Al-Haidary I A, Mufarrej S I, Al-Saiady M Y, Metwally H M, Hussein M S. 2009. Effects of supplemental chromium levels on performance, digestibility and carcass characteristics of transport-stressed lambs. Asian Australasian Journal of Animal Science, 22, 1124—1132.
18. McNamara J P, Valdez F. 2005. Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate. Journal of Dairy Science, 88, 498—507.
19. da Rocha X J F, Rodrigues A A, Gonçalves N A, Moraes F E M, Vilmar K G, de Vargas A C, D'Avila F L, da Silva C M, do Rego L M L. 2013. Metabolism, intake, and digestibility of lambs supplemented with organic chromium. Biological Trace Element Research, 156, 130—133.
20. Uyanik F. 2001. The effects of dietary chromium supplementation on some blood parameters in sheep. Biological Trace Element Research, 84, 93—101.
21. Yan X, Zhang F, Li D, Zhu X, Jia Z. 2010. Effects of chromium on energy metabolism in lambs fed with different protein levels. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 23, 205—212.
22. Yan X, Zhang W, Cheng J, Wang, Kleemann D O, Zhu X, Jia Z. 2008. Effects of chromium yeast on performance, insulin activity and lipid metabolism in lambs fed different dietary protein levels. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 21, 853—860.
23. Zhou B, Wang H, Luo G, Niu R, Wang J. 2013. Effect of dietary yeast chromium and L-carnitine on lipid metabolism sheep. Biological Trace Element Research, 155, 221—227.
24. Ziyad T A. 2013. Effect of different levels of chromium yeast on performance and some carcass characteristics of local Awassi lambs. International Journal of Advanced Biological Research, 3, 191—194

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- Д. А. Саврасов — кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующий кафедрой;  
В. Т. Лопатин — кандидат ветеринарных наук, доцент;  
А. А. Михайлов — кандидат ветеринарных наук, доцент;  
П. А. Паршин — доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник;  
Г. А. Востроилова — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;  
С. С. Карташов — старший преподаватель.

Статья поступила в редакцию 02.03.2023 г.

## CLINICAL PHARMACOLOGY

Original article

UDC 577.171.4:636.3:636.087.7

### CORRECTION OF METABOLIC STATUS IN SHEEP WITH OSTEODYSTROPHY

Dmitriy Aleksandrovich Savrasov\*✉, Vitaliy Timofeevich Lopatin\*, Aleksandr Andreevich Mikhaylov\*, Pavel Andreevich Parshin\*\*, Galina Anatolyevna Vostroilova\*\*, Stanislav Sergeevich Kartashov\*

\*Voronezh State Agricultural University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia, dmitrij-savrasov@yandex.ru✉

\*\*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia

**Abstract.** The article presents the results of the efficacy of the use of the drug “ChroMax” for the correction of the metabolic status in sheep with osteodystrophy. “ChroMax” is a source of chromium, which plays an important role in energy metabolism, in particular, is involved in the control of insulin receptors and glucose metabolism, is an activator of protein metabolism and enzymes that regulate energy production from carbohydrates, fats and proteins. The tests were carried out on sheep of the Kuchugurov breed with clinical signs of metabolic disorders — osteodystrophy. As a result of the tests, in sheep with osteodystrophy, anemia relief was found, which was accompanied by an increase in the content of hemoglobin and erythrocytes, optimization of mineral metabolism, by increasing the calcium content and reducing the amount of inorganic phosphorus and the level of alkaline phosphatase. Normalization of rumen contraction, pH of rumen content, general acidity and mobility of ciliates, which indicated the restoration of its functional state in sheep. Thus, the use of “ChroMax” for 30 days at a dose of 5 g per animal led to the stabilization of the metabolic status (mineral metabolism) in sheep with osteodystrophy.

**Keywords:** sheep, metabolism, osteodystrophy, acidosis, chromium, rumen

#### INTRODUCTION

Preservation of the productive health of farm animals is realized in the quantity, quality and biological full-value of livestock products. This determines the economic efficacy of animal husbandry, well-being, health of the population and, in general, the food security of the country. The health and productivity of sheep is directly related to the intensive course of metabolic processes, and therefore the main criteria for assessing the state of their health are indicators of the intensity of processes of all types of metabolism, the identification of early preclinical (donosological) disorders of their course, the determination of the true causes for their temporary elimination and restoration of health [1—5, 7—10, 12].

Metabolic disorders in animals are one of the most acute problems in modern animal husbandry in many countries. Metabolic disorders cause structural changes in all organs and systems and reduce the ability to implement their physiological functions. For the timely prevention and elimination of disorders in the metab-

olism and ensuring the optimal metabolic status and productive health of animals, constant monitoring of the animal's state is necessary, as well as prophylactic, in cases of clinical manifestation, medical examination. Osteodystrophy is a widespread metabolic disorder in productive animals. The pathogenesis of osteodystrophy is associated with impaired calcium and phosphorus metabolism, and a complex mechanism for regulating the metabolism of these elements, in which calciferol, thyroid hormones (parathyroidin, calcitonin), the functional state of the intestines, kidneys, liver and a number of other factors play an important role. Violation of the regulation of phosphorus metabolism entails a violation of calcium and vice versa. When feeding acidic feeds and excessive intake of phosphorus with feeds, an acidic form of osteodystrophy develops. In this case, the content of HPO<sub>4</sub> ions in the blood increases, which is accompanied by acidosis and an increase in the hormonal activity of the parathyroid glands. Under the effect of parathyroid hormone, the reabsorption of phosphates by the renal tubules

decreases and their excretion in the urine increases. Homeostasis is maintained in this case by the mobilization of phosphates from bone tissue. However, together with phosphorus, calcium is also extracted from the bone tissue, the content of which in the blood can be very high. Under the effect of parathyroid hormone, osteocytes and osteoblasts are destroyed, and the number of osteoclasts increases, which leads to resorption and demineralization of bone tissue [3, 10, 11].

There are many therapeutic and prophylactic agents, the use of which has a positive effect on the normalization of metabolic processes, one of which is the chromium-containing feed additive “ChroMax”. The composition of the feed additive “ChroMax”: chromium propionate 0.4–0.6 %, propionic acid more than 7.0 %, propylene glycol 0.1–0.5 % and filler — silicon oxide up to 100 %. The content of chromium is not less than 1000 mg/kg. Chromium forms amphoteric compounds, i. e. can exhibit both alkaline and acidic properties. The most stable natural forms are considered to be trivalent and hexavalent chromium. Only trivalent chromium Cr<sup>+3</sup> is an indispensable element in the nutrition of the organism of animals and humans, and hexavalent Cr<sup>+6</sup> has a toxic effect. Under stress, the degree of absorption of chromium drops by 50–70 %; with a lack of magnesium and calcium, the degree of absorption of chromium decreases proportionally. Each molecule of the pancreatic enzyme trypsin contains one trivalent chromium atom. The element is involved in intestinal digestion, being the active center of trypsin. Included in the organic complex — oligopeptide chromodulin (LMWCr) [14, 15, 18–21, 23, 24].

Chromodulin is a component of the blood serum protein, which is obtained by competing incorporation of a chromium atom into transferrin instead of iron. Chromium, as the active part of chromodulin, binds to cell surface receptors and forms an ATP proton pump, which facilitates the penetration of a large insulin molecule into the cell. This leads to a significant increase in the sensitivity of cells to the action of insulin and enhances the penetration of glucose into the cell. Chromium is involved in the synthesis of proteins, accumulates in RNA cells of the liver, and regulates the synthesis of fatty acids and cholesterol. It enhances the utilization of non-protein nitrogen in the body of ruminants and the synthesis of immune proteins, positively affecting the immune responses of animals [6, 13, 22].

The introduction of bioavailable chromium into the diet of farm animals, poultry and rearing young animals contributes to a more efficient use of feed energy,

subsequently, an increase in productivity and weight gain, as well as an improvement in health and reproduction indicators [6, 9, 14, 16, 17, 21–23].

The objective of our research was to study the effect of “ChroMax” on the metabolic status of sheep with osteodystrophy.

#### MATERIAL AND METHODS

The work was carried out in the conditions of the Department of Therapy and Pharmacology of the Educational and Research Center for Animal Husbandry of the Faculty of Veterinary Medicine and Livestock Technology of Voronezh State Agricultural University named after Emperor Peter the Great and FSBSI “All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy”.

For the experiment, a group of sheep of the Kuchugurov breed (*n* = 10) with clinical signs of metabolic disorders (osteodystrophy), weighing 30–35 kg at the age of 11–12 months, was formed. The animals were kept crowded in standard vivarium rooms without active exercise. For the duration of the experiment, the animals were placed in separate sections. Feeding was carried out with the use of a silage-pulp type.

The diagnosis was made in a complex manner, taking into account the history, clinical picture and laboratory tests of blood and rumen contents. For 30 days, 5 g of the feed additive “ChroMax” per animal was added to the diet of sheep (mixed with wheat bran) daily. Every day during the experiment, the sheep were observed. The clinical state of the animals was assessed by appetite, fatness, activity, cud and the number of rumen contractions.

To study the metabolism in sheep, we analyzed the morphological and biochemical blood indicators of experimental animals before and after feeding the feed additive, according to the methods presented in the “Methods of Veterinary Clinical Laboratory Diagnostics: Handbook / ed. by Prof. I. P. Kondrakhin. — M.: Kolos, 2004. — 520 p.”. The number of erythrocytes, leukocytes, hemoglobin — on the hematological analyzer “ABX Micros 60”. The determination of glucose, AST, ALT, cholesterol, urea was carried out by a chemical method using Vital diagnostic kits on the PE-5300V spectrophotometer, calcium and inorganic phosphorus — on the HumaStar 600 biochemical analyzer, total protein — using the RHC-200/ATC refractometer, ESR-method according to Panchenkov.

Rumen contents were obtained by probing. To assess the physical and chemical properties of rumen digestion, the rumen contents of the experimental ani-

mals were taken in a volume of 100 ml for each sample before and after feeding the studied feed additive. The color of the contents, smell, texture were assessed organoleptically, with a pH meter pH-150MI, total acidity — by titration with a 1 % alcohol solution of phenolphthalein and 0.1 N. sodium hydroxide solution, the activity of rumen microflora — according to Dirksen and Hofirek, microscopy determined the size and mobility of ciliates.

#### STUDY RESULTS AND DISCUSSION

In the sheep of the experimental group, depression (apathy), a decrease and perversion of appetite, gnashing of teeth, satisfactory fatness, alopecia in cer-

tain parts of the body, dull coat, involuntary contractions of individual muscle groups, rumen hypotension (1–2 contr. for 2 min.), there was a slowdown in cud, a reduction in the number of cud periods, diarrhea (the consistency of feces was 1.2 points). Before feeding the feed additive “ChroMax”, some blood indicators of the experimental animals had deviations from the physiological limits. So in sheep with osteodystrophy, the content of hemoglobin and erythrocytes was at the lower limits of the reference values, which indicated the possible development of mild hypochromic anemia, the number of leukocytes was lower by 27.4 %, ESR in sheep before feeding “ChroMax” was within the physiological limits (Table 1).

Table 1

Hematological blood indicators of sheep before and after “ChroMax” application

Indicators	Before using the drug	After using the drug on day 30	Reference values (according to I. P. Kondrakhin)
Hemoglobin, g/L	78.8 ± 2.2	111.2 ± 2.3	79–119
Erythrocytes, 10 <sup>12</sup> /L	6.7 ± 1.5	9.6 ± 1.4	7.0–12.0
Leukocytes, 10 <sup>9</sup> /L	4.7 ± 0.7	7.5 ± 0.8	6.0–14.0
ESR, mm/h	0.62 ± 0.25	0.85 ± 0.27	0.5–1.5

When analyzing the biochemical blood indicators of sheep with osteodystrophy, a 2.6-fold increase in the content of inorganic phosphorus and a 22.6 % decrease in the amount of calcium were revealed (Table 2). The revealed violation of the calcium-phosphorus ratio is due to the antagonistic property of phosphorus — to prevent the absorption of calcium.

In sheep with impaired mineral metabolism, an increase in the enzymatic activity of AST by 39.3 % and ALT by 42.5 % was noted. Moderate development of cytolysis syndrome, which is characterized by increased permeability of hepatocyte cell membranes or their destruction, confirmed the violation of the functional state of the liver.

Table 2

Biochemical blood indicators of sheep before and after feeding “ChroMax”

Indicators	Before using the drug	After using the drug on day 30	Reference values (according to I. P. Kondrakhin)
1	2	3	4
Total protein, g/L	69.5 ± 2.2	74.9 ± 3.4	65–75
Glucose, mol/L	2.0 ± 0.4	3.2 ± 0.5	2.2–3.3
Cholesterol, mmol/L	1.63 ± 0.20	1.35 ± 0.23	1.56–3.36
Urea, mmol/L	3.40 ± 0.30	3.32 ± 0.36	3.3–5.8
Ca, mmol/L	2.09 ± 0.13	2.90 ± 0.16	2.50–3.13
P, mmol/L	4.53 ± 2.23	1.79 ± 1.13	1.45–1.84

Table 2 (the end)

1	2	3	4
Ca/P	1 : 2	2.9 : 1.8	2 : 1
ALP, vol.% CO <sub>2</sub>	0.85 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.4—0.8
AST, mM/L·h	2.09 ± 0.04	0.49 ± 0.06	0.4—1.5
ALT, mM/L·h	1.14 ± 0.053	0.54 ± 0.03	0.3—0.8

Before feeding the feed additive “ChroMax”, the samples of rumen contents were characterized by a chestnut-brown color, sour, putrid smell, with the presence of feed impurities (Table 3). There was a decrease in pH by 18.2 %, an increase in total acidity by 20.7 %, and a low activity of ruminal microorganisms, the predominance of small and medium-sized ciliates with reduced mobility, which indicates a violation of ruminal digestion and the development of acidosis form of osteodystrophy.

After the application of the drug in sheep, the following changes were noted: appetite and cud returned to normal, fatness increased, the coat acquired a uniform and shiny appearance. In animals, an increase in the content of hemoglobin and erythrocytes by 39.4 and 43.2 %, respectively, leukocytes — by 37.3 %, glucose — by 37.5 %, a decrease in the amount of inorganic phosphorus by 2.5 times, thereby reaching the reference values, the level of alkaline phosphatase — by 1.9 times, an increase in calcium concentration by 32.6 %, which contributed to the normalization of

the calcium-phosphorus ratio (Table 2). As a result of the use of “ChroMax”, a decrease in the level of AST and ALT by 4.3 and 2.1 times, respectively, was noted, which indicated the optimization of the functional state of the liver. During the studies, the indicators of total protein, cholesterol and urea were within the reference values.

Analyzing the obtained results, we believe that the feed additive “ChroMax”, with the active substance in the form of chromium, through the stimulation of energy metabolism, increases the biological availability of calcium, thereby providing a positive therapeutic effect on the metabolic status of sheep with osteodystrophy, which is consistent with the literature data [1, 4, 18, 20, 21].

On the thirtieth day of using the feed additive “ChroMax”, the physical and chemical indicators of ruminal digestion reached physiological parameters. The contractility of the rumen was restored, its contents in sheep became brown-green, mushy, with sour-spicy smell, with an admixture of feed particles (Table 3).

Table 3

Physical and chemical properties of the rumen contents of sheep before and after “ChroMax” application

Indicators	Before using the drug	After using the drug on day 30	Reference values (according to I. P. Kondrakhin)
Number of rumen contractions for 2 minutes.	2.0 ± 0.1	6.5 ± 0.2	3—6
Color	Chestnut-brown	Brown-green	Brown-green
Consistency	Mushy	Mushy	Mushy
Smell	Sour, putrid	Sour-spicy	Sour-spicy
Impurities	Feed	Feed	Feed particles
pH	5.5 ± 0.18	6.9 ± 0.32	6.5—7.2
Total acidity in units. of titre	11.1 ± 1.34	7.2 ± 2.31	0.6—9.2
Activity of rumen microflora, min	> 3	< 3	3

There were noted an increase in the pH of the rumen content by 25.5 %, a decrease in the total acidity by 35.1 %, a 2-fold increase in the mobility of ciliates

with a predominance of large forms (Table 4), which indicated the normalization of the functional state of the rumen in sheep.

Table 4

Microscopy of rumen contents of sheep before and after “ChroMax” application

Indicators	Before using the drug	After using the drug on day 30	Reference values (according to I. P. Kondrakhin)
Size of ciliates	Small and medium	Small and medium	Large
Mobility of ciliates, points	2.5 ± 0.23	4.8 ± 0.26	5

### CONCLUSION

Thus, the use of the feed additive “ChroMax” was accompanied by an increase in the content of hemoglobin and erythrocytes, normalization of mineral metabolism, restoration of the functional state of the rumen, due to the normalization of its contractions, pH of its content, total acidity and mobility of ciliates.

### REFERENCES

1. Betin A. N. Chromium propionate in the diet of young pigs / A. N. Betin // *Kombikorma (Compound feeds)*. — 2014. — No. 1. — P. 75—78.
2. Effect of chromium nanoparticles on the loss of live weight of Black-Motley bulls under technological stresses / V. N. Nikulin [et al.] // *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Proceedings of Orenburg State Agrarian University)*. — 2018. — No. 6 (74). — P. 208—210.
3. Alimentary osteodystrophy of ewes and corrective therapy / Z. M. Dzhabulatov, M. G. Zukhrabov, B. M. Gadzhiev [et al.] // *Izvestiya Dagestanskogo GAU (Proceedings of Dagestan State Agrarian University)*. — 2020. — No. 2(6). — P. 67—72. — EDN IPDVMG.
4. Kislyakova E. M. Effect of additives of organic chromium on the productive and reproductive performance of Black-Motley cows / E. M. Kislyakova, A. A. Lomaeva // *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Bauman (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman)*. — 2017. — V. 232. — No. 4. — P. 76—80.
5. Intestinal digestion and blood biochemistry in laying hens (*gallusgallus* L.) with the introduction of chromium microadditives into diets / V. I. Fisinin [et al.] // *Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology)*. — 2019. — V. 54. — No. 4. — P. 810—819.
6. Kuchinskiy M. P. Determination of acute toxicity of the drug “chromarcin” / M. P. Kuchinskiy, G. P. Tsurul // *Aktualnye problemy intensivnogo razvitiya zhivotnovodstva (Actual problems of intensive development of animal husbandry)*. — 2020. — No. 23—2. — P. 207—214.

7. Lopatin V. T. Comparative therapeutic efficacy of dyspepsia in lambs / V. T. Lopatin, D. A. Savrasov, A. A. Mikhaylov, S. S. Kartashov // *Ovtsy, kozy, sherstyanoe delo (Sheep, goats, woolen business)*. — 2018. — No. 2. — P. 46—47.

8. Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: Handbook / Ed. by Prof. I. P. Kondrakhin. — M.: Kolos, 2004. — 520 p.

9. Moskvicheva A. B. Use of an organic chromium-compensating additive in the diets of cows / A. B. Moskvicheva, E. M. Kislyakova, A. A. Lomaeva // *Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Bulletin of Kazan State Agrarian University)*. — 2016. — V. 11. — No. 2 (40). — P. 25—28.

10. Osteodystrophy of sheep in the conditions of the Republic of Buryatia / V. V. Tokar, S. P. Khankhasykov, I. R. Kilmetova [et al.] // *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Proceedings of Orenburg State Agrarian University)*. — 2018. — No. 6 (74). — P. 159—161.

11. Redkozubova L. Prevention and treatment of acidosis / L. Redkozubova // *Zhivotnovodstvo Rossii (Livestock in Russia)*. — 2018. — No. 1. — P. 34—37.

12. Ani M, Moshtaghie A. A. 1992. The effect of chromium on parameters related to iron metabolism. *Biological Trace Element Research*, 32, 57—64.

13. Arvizu R R, Domínguez I A, Rubio M S, Bórquez J L, González M, Jaramillo G. 2011. Effects of genotype, level of supplementation and organic chromium on growth performance, carcass, and meat traits grazing lambs. *Meat Science*, 88, 404—408.

14. Domínguez V I A, Haro G F, Martínez H G. 1999. Evaluation and growth performance and carcass characteristics of sheep supplemented with the complex organic chromium L-methionine. In: *Memories of X National Congress of Sheep Production*. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, University of Veracruz, AMTEO, Mexico. pp. 6—10. (in Spanish)

15. Estrada A A, Valdés Y S, Carrillo M O, Castro P B I, Barreras A, López S M A, Plasencia A, Dávila R H, Rios F G, Zinn R A. 2014. Effects of feeding different levels of



chromium-enriched live yeast in hairy lambs fed a corn-based diet: Effects on growth performance, dietary energetics, carcass traits and visceral organ mass. *Animal Production Science*, 53, 308—315.

16. Gardner G E, Pethick D W, Smith G. 1998. Effect of chromium chelative supplementation on the metabolism of glycogen and lipid in adult Merino sheep. *Australian Journal of Agriculture Research*, 49, 137—145. Gentry L R, Fernandez J M, Ward T L, White T W, Southern L, Laura Moreno-Camarena et al. *Journal of Integrative Agriculture* 2015, 14(3): 567—574 573

17. Kraidess M S, Al-Haidary I A, Mufarrej S I, Al-Saidy M Y, Metwally H M, Hussein M S. 2009. Effects of supplemental chromium levels on performance, digestibility and carcass characteristics of transport-stressed lambs. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 22, 1124—1132.

18. McNamara J P, Valdez F. 2005. Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate. *Journal of Dairy Science*, 88, 498—507.

19. da Rocha X J F, Rodrigues A A, Gonçalves N A, Moraes F E M, Vilmar K G, de Vargas A C, D'Avila F L, da Silva C M, do Rego L M L. 2013. Metabolism, intake, and

digestibility of lambs supplemented with organic chromium. *Biological Trace Element Research*, 156, 130—133.

20. Uyanik F. 2001. The effects of dietary chromium supplementation on some blood parameters in sheep. *Biological Trace Element Research*, 84, 93—101.

21. Yan X, Zhang F, Li D, Zhu X, Jia Z. 2010. Effects of chromium on energy metabolism in lambs fed with different protein levels. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 23, 205—212.

22. Yan X, Zhang W, Cheng J, Wang, Kleemann D O, Zhu X, Jia Z. 2008. Effects of chromium yeast on performance, insulin activity and lipid metabolism in lambs fed different dietary protein levels. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 21, 853—860.

23. Zhou B, Wang H, Luo G, Niu R, Wang J. 2013. Effect of dietary yeast chromium and L-carnitine on lipid metabolism sheep. *Biological Trace Element Research*, 155, 221—227.

24. Ziyad T A. 2013. Effect of different levels of chromium yeast on performance and some carcass characteristics of local Awassi lambs. *International Journal of Advanced Biological Research*, 3, 191—194

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**D. A. Savrasov** — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Head of a Department;

**V. T. Lopatin** — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;

**A. A. Mikhaylov** — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;

**P. A. Parshin** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Chief Scientific Associate;

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

**S. S. Kartashov** — Senior Lecturer.

The article was submitted 02.03.2023.

Научная статья

УДК 577.161.3

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.49

## ПРИМЕНЕНИЕ ВИТАМИНА Е В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Людмила Карповна Герунова, Алевтина Викторовна Анучина<sup>✉</sup>

Омский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина, Россия, Омск, the-first157@yandex.ru<sup>✉</sup>

**Аннотация.** Витамин Е — физиологический антиоксидант. Синтетически получаемый витамин является смесью 8 стереоизомеров (альфа-, бета-, гамма-, дельта-токоферолов и альфа-, бета-, гамма-, дельта-токотриенолов), однако наибольший интерес представляет природный RRR-альфа-токоферол, обладающий более высокой активностью [1, 2]. Цель обзора — обобщить опыт применения альфа-токоферола как мощного антиоксиданта с низкой токсичностью для лечения и профилактики различных заболеваний. Многочисленные исследования доказали, что оксидантный стресс играет важную роль в патогенезе многих заболеваний, приводит к истощению антиоксидантных систем и накоплению продуктов перекисного окисления липидов. В связи с этим оправдано применение антиоксидантов в клинической практике. Препараты витамина Е широко применяются в медицине и ветеринарии. Понимание их механизма действия и особенностей метаболизма необходимо для получения желаемого терапевтического эффекта и предотвращения развития нежелательных эффектов. Доказана эффективность альфа-токоферола при нарушении сперматогенеза и овогенеза, хронической почечной недостаточности, нефролитиазе, бронхиальной астме, атопическом дерматите и акне у человека. Животным препараты витамина Е назначают при нарушении репродуктивной функции, гепатодистрофии, заболеваниях щитовидной железы и других патологических состояниях. При недостатке витамина Е страдает прежде всего репродуктивная система, а также органы и ткани, которые в наибольшей степени подвержены окислительному стрессу: центральная нервная система, скелетная мускулатура, эндокринная система, сердце, печень и кровь. Передозировка альфа-токоферола характеризуется возникновением слабости, сонливости, тошноты, рвоты и диареи, кровоизлияний в сетчатку глаза или мозг, развитием энтероколита и сепсиса.

**Ключевые слова:** витамин Е, альфа-токоферол, антиоксидант, клиническое применение, гиповитаминоз, передозировка

Немаловажную роль в патогенезе различных заболеваний животных и человека играет окислительный стресс. Повышенное образование свободных радикалов в организме вызывает повреждение биологических мембран, изменяет структуру органических соединений, что ведет к нарушению функционального состояния клеток. Повреждающему действию свободных радикалов противостоит антиоксидантная система [3]. Недостаток антиоксидантов может привести к нарушению метаболизма и работы отдельных органов и систем.

Доказано, что нарушение баланса свободнорадикального окисления приводит к росту заболеваемости [3] и даже гибели организма. Активизация антиоксидантных систем предотвращает возникновение тяжелых последствий и улучшает состояние организма при уже имеющейся патологии [4].

В связи с этим тема антиоксидантной терапии остается актуальной как для врачей-практиков, так и для исследователей. Витамин Е, являющийся естественным антиоксидантом, оказывает не только антиоксидантное действие, но и участвует в синтезе гема и гемсодержащих ферментов (цитохромов, каталазы, пероксидазы), а также гемоглобина и миоглобина. При этом он участвует в тканевом дыхании, пролиферативных и метаболических процессах. Стимулируя синтез структурных, ферментных и сократительных белков мышечной ткани, улучшает сократимость миокарда, снижает потребность в кислороде. Цель обзора — обобщить опыт применения витамина Е в комплексной терапии заболеваний животных и человека.

Витамин Е (токоферол) — природный антиоксидант [5] с низкой токсичностью [6]. Он представ-

© Герунова Л. К., Анучина А. В., 2023

ляет собой группу из восьми жирорастворимых соединений: альфа-, бета-, гамма-, дельта-токоферолов и альфа-, бета-, гамма-, дельта-токотриенолов [7]. Методом химического синтеза витамин получен в 1938 году.

Токотриенолы отличаются от токоферолов наличием двойных связей в боковой цепи (рис. 1) [2].

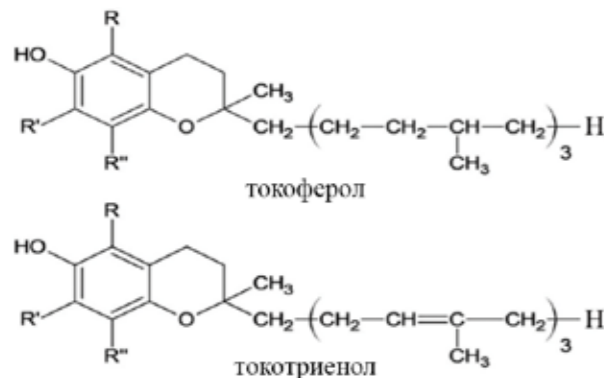


Рис. 1. Структура токоферола и токотриенола

Однако наибольшей активностью обладает RRR-альфа-токоферол (рис. 2).



Рис. 2. Структура RRR-альфа-токоферола

**Гиповитаминоз Е.** Основным проявлением недостатка витамина Е в организме является повышение проницаемости клеточных мембран, в которых накапливаются продукты перекисного окисления липидов. В крови при этом повышается уровень ферментов (аланинаминотрансферазы, креатинфосфокиназы, аспаратаминотрансферазы и др.).

Клиническая картина авитаминоза Е очень разнообразна — от мышечной дистрофии, бесплодия [8], анемии [6] до некроза печени [9] с энцефаломалицией [8]. Так как сердце является мышечным органом, то при недостатке витамина Е возникает дистрофия не только скелетных мышц, но и миокарда. Существенные нарушения происходят со стороны нервной и эндокринной систем, в том числе щитовидной железы [8].

Согласно медицинской статистике, от недостатка витамина Е чаще всего страдают люди, находящиеся на территориях, которые загрязнены

радионуклидами, или же постоянно контактирующие с химическими токсикантами, так как при этом в их организме повышается уровень свободных радикалов [6]. Очень редко встречается авитаминоз Е, в основном при гипотрофии, когда очень плохо развита подкожная клетчатка, где данный витамин и накапливается. Основным клиническим симптомом гиповитаминоза является гемолиз эритроцитов с последующей анемией [6].

**Гипервитаминоз Е.** В связи с тем, что белки печени, которые связывают токоферол (токоферол-связывающие белки), имеют определенный предел по связыванию витамина и его включению в состав ЛПОНП (липопротеинов очень низкой плотности), витамин обладает крайне низкой токсичностью при значительном превышении доз и длительности введения (10—20-кратном к суточной потребности) [6].

К основным клиническим проявлениям отравления токоферола ацетатом относятся мышечная слабость [10], повышение кровяного давления [6], кровоизлияния в различные органы [10]. Эмоциональные нарушения и болезненность молочных желез могут возникнуть вследствие изменения уровня ряда гормонов, например, тиреоидных [11]. Кроме того, при длительном применении витамина Е в больших дозах возможно развитие тромбозов и повышение уровня холестерина в крови [11].

**Метаболизм витамина Е.** Витамин Е поступает в желудочно-кишечный тракт и подвергается гидролизу эстеразой и липазой, после чего он всасывается в кишечнике и в составе хиломикронов (Хм) поступает в кровь и лимфу. Токоферолы транспортируются в печень, где RRR-альфа-токоферол, обладающий наибольшей активностью, соединяется с ТФ-связывающими (токоферол-связывающими) белками. Данные белки вновь выводят этот витамин в кровь в составе ЛПОНП. В плазме крови происходит обмен витамином Е между ЛПОНП и ЛПНП, а также ЛПВП, что обеспечивает баланс концентрации витамина Е в крови. В ткани же витамин может поступать через рецепторно-опосредованный механизм — в составе ЛПНП, взаимодействуя с соответствующими рецепторами; а также через ферментативно-опосредованный механизм, который зависит от ЛПЛ (липопротеинлипазы). Данный фермент высвобождает витамин из хиломикронов и ЛПОНП, после чего RRR-альфа-токоферол поступает в экстрапеченочные ткани и органы путем пассивной диффузии [12]. Не всосавшиеся в кишечнике токоферолы удаляются из организма (рис. 3) [6].

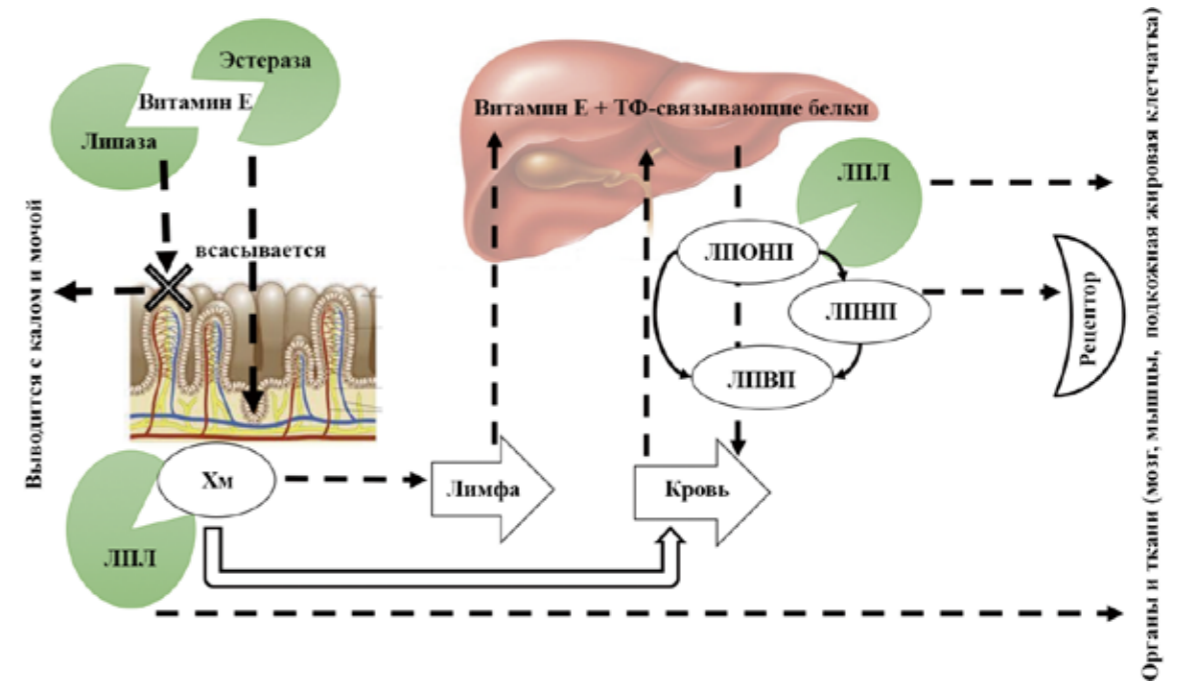


Рис. 3. Метаболизм витамина Е [6]

Нарушение липидного спектра крови, ферментопатии, обусловленные патологическим процессом или генетическими особенностями организма, а также дозы и длительность курса лечения могут влиять на метаболизм и усвоение витамина Е, изменяя его общий эффект и результат терапии [13].

**Альфа-токоферол как компонент комплексной терапии.** В настоящее время доказана эффективность применения препаратов витамина Е в комплексной терапии различных патологических состояний у людей и животных.

Так, например, при изучении динамики свободнорадикальных процессов окислительной модификации белков в плазме крови у крыс при стрессогенном воздействии установлен выраженный антиоксидантный эффект альфа-токоферола в комплексе с циклофероном. При этом в стрессированной группе отмечено снижение количества альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов. По мнению авторов, циклоферон в условиях комплексной терапии оказывает протективное действие на антиоксидантную систему [14].

При нарушении репродуктивной функции возникает вопрос о возможной нехватке витамина Е в организме, так как опыты на животных доказывают, что гиповитаминоз Е приводит к абортam у самок и поражению семенников у самцов. Восполнение недостатка витамина Е нормализует состояние данной системы организма. Этот научный факт был установлен еще в 19 веке, когда при

кормлении крыс цельным молоком и зерновыми культурами с зелеными листьями воспроизведение потомства сохранялось, в то время как у крыс, питающихся только цельным молоком, было отмечено снижение репродуктивной функции, что было связано с отсутствием в нем витамина Е [8].

Доказана эффективность как наружного, так и внутреннего применения витамина Е в комплексной терапии атопического дерматита и акне у детей [15, 16], включающей антигистаминные и седативные препараты. По мнению ряда авторов [15], эффективность крема, содержащего высокий процент витамина Е, обусловлена биологическими свойствами данного витамина. Альфа-токоферол является жирорастворимым соединением, благодаря чему проникает внутрь клеток, стабилизирует мембраны, стимулирует репаративные процессы и синтез ряда ферментов (пероксидазы, каталазы и др.).

При проведении исследований по оценке эффективности применения полиненасыщенных жирных кислот и антиоксидантов при акне у пациентов отмечено увеличение в сыворотке крови концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, а также снижение уровня глутатионпероксидазы и каталазы до начала лечения, что свидетельствует о развитии «окислительного стресса» при данном заболевании. При приеме витамина Е и полиненасыщенных жирных кислот у пациентов с легким и среднетяжелым течением

болезни наблюдалось улучшение состояния: длительность лечения сократилась, а качество жизни в процессе приема препаратов и после выздоровления улучшилось [16].

Включение альфа-токоферола в комплексную терапию сифилиса по 0,2 г два раза в день вместе с иммуномодулятором неовиром и экстенциллином способствовало улучшению клинических симптомов заболевания уже на 4 день, в то время как при терапии только антибиотиком результат лечения отмечали в более поздний срок [17].

При изучении возможности коррекции свободнорадикального статуса при бронхиальной астме установлено, что применение токоферола следует считать успешным при легком течении заболевания, тогда как при более тяжелом течении бронхиальной астмы свободнорадикальный статус не удавалось полностью скорректировать, что требовало назначения других антиоксидантов в сочетании с внутрисосудистым лазерным облучением крови. Авторы считают оправданным включение витамина Е в комплексную терапию среднетяжелой формы бронхиальной астмы лишь пациентам со стажем заболевания свыше 10 лет, у которых снижено содержание витамина Е, общего пула и активных антиоксидантов [18].

В медицине известны случаи успешного применения витамина Е в комплексной терапии больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности, у которых выявлены мембранодеформирующие нарушения. При введении альфа-токоферола («Эвитол» KRKA) в дозах по 200 мг и 300 мг в сутки в течение 4 недель у пациентов, получающих заместительную терапию, выявлено уменьшение выраженности основных клинических синдромов (астено-вегетативного, диспепсического, геморрагического), снижение интенсивности перекисного окисления липидов, улучшение переносимости гемодиализа [19].

У крыс линии Wistar моделировали нефролитиаз путем перорального введения 1 % этиленгликоля, после чего крысы получали ежедневно внутрь масляный раствор альфа-токоферола ацетата в дозе 300 мг/кг. При изучении морфологической структуры почек и активности процессов свободно-радикального окисления установлено, что введение альфа-токоферола ацетата при нефролитиазе облегчает течение заболевания, так как уменьшает окислительный стресс в тканях почек, способствует регенерации и улучшению функциональной активности уротелия, уменьшает число и размеры камней в почках [20].

Экспериментально подтверждена роль витамина Е в предотвращении гиперагрегации тромбоцитов, которая может привести к развитию атеросклероза. Витамин Е уменьшает выработку тромбоксана, который вызывает слипание тромбоцитов [21]. При этом антиоксидантная роль витамина Е в предотвращении неблагоприятных исходов при сердечно-сосудистых заболеваниях является спорной, так как одни исследователи подтверждают ее, а другие отвергают [22].

Доказано кардиопротективное действие альфа-токоферола при гипотиреозе. На лабораторных крысах Вистар, подвергнутых тиреоидэктомии, установлено, что при введении витамина Е такие изменения в миокарде, как нарушение гемодинамики, трофики и структуры кардиомиоцитов, снижение процессов репарации и дезорганизация со стороны соединительной ткани, интерстициальный отек появлялись позже на две недели, чем у животных, не получавших данный препарат после тиреоидэктомии [23].

А. Л. Ясенявская с соавторами (2014) изучала влияние витамина Е и эмоксипина на морфологию щитовидной железы в условиях иммобилизационного стресса. В результате исследования отмечено, что при стрессовой ситуации у крыс происходит снижение высоты тиреоидного эпителия и площади тироцитов, увеличение площади фолликулов и фолликулярного коллоида, что свидетельствует об угнетении функций щитовидной железы. После применения альфа-токоферола и эмоксипина высота тиреоидного эпителия и площадь тироцитов увеличились, а площадь фолликулов и фолликулярного коллоида, напротив, уменьшилась. Активность щитовидной железы возросла [24].

Заслуживают внимания исследования Л. Д. Эркеновой (2013). После тиреоидэктомии у крыс проведен анализ терапевтической эффективности различных антиоксидантов с гистологической оценкой гипоталамуса. При применении антиоксидантов первые признаки гипотиреоза появлялись позже, чем у животных, которые их не получали, полная картина гипотиреоза также развивалась позднее, что говорит о снижении тяжести повреждения гипоталамуса и нейропротекторном действии препаратов, в том числе витамина Е [25].

Имеются данные, что витамин Е обладает и противовоспалительным действием [26]. Он восстанавливает клеточные иммунные реакции и выработку интерлейкина-2, а в высоких дозах стимулирует пролиферацию Т-хелперов [27]. Исследование синдрома приобретенного иммунодефицита у мышей

с использованием 15-кратного увеличения содержания витамина Е в рационе показало нормализацию показателей иммунного статуса [28]. В настоящее время доказано, что витамин Е стимулирует гуморальный и клеточный иммунный ответ, повышает фагоцитарную функцию, активизирует выработку антител при вакцинации [21].

По мнению ряда авторов [29], введение витамина Е в рацион продуктивных животных позволяет повысить их продуктивность и улучшить качество продуктов животного происхождения, так как при этом снижается окисление липидов в мышцах, яйцах и молочных продуктах. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что биодоступность продуктов животного происхождения, обогащенных витамином Е, может служить неопределимым преимуществом для потребителей, особенно в регионах с ограниченными ресурсами, где высока степень риска недостатка витамина Е.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты многочисленных исследований, представленные в литературе, свидетельствуют о том, что дефицит витамина Е у животных и человека встречается довольно редко. Причиной этого чаще служат приобретенные заболевания, при которых ухудшается усвоение витамина или нарушается жировой обмен с утратой способности к усвоению жира. При введении в организм витамин Е действует как первая линия защиты от перекисного окисления липидов. Благодаря своей активности по удалению перекисных радикалов он также защищает полиненасыщенные жирные кислоты, присутствующие в мембранных фосфолипидах и липопротеинах плазмы [30]. Наряду с антиоксидантным действием витамин Е выполняет другие важные функции в организме: поддерживает мышечный тонус, остроту зрения, иммунную реактивность, регулирующую функцию нервной системы и репродуктивную способность. Отсутствие доступных биомаркеров потребления и статуса витамина Е затрудняет оценку связи его содержания в организме с возможными клиническими исходами [21]. Однако, несмотря на некоторую противоречивость данных, преимущества витамина Е при включении его в комплексную терапию заболеваний существенно превышают риск нежелательных эффектов.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Galli, F. Vitamin E: Emerging aspects and new directions / F. Galli, A. Azzi, M. Birringer, J. M. Cook-Mills,

M. Eggersdorfer, J. Frank, G. Cruciani, S. Lorkowski, N. K. Özer // Free Radic. Biol. Med. — 2017. — No. 102. — P. 16—36. — DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017

2. Khallouki, F. Vitamin E: An overview / F. Khallouki, R. W. Owen, M. Akdad, E. B. Bouhali, S. Silvente-Poirot, M. Poirot // In Molecular Nutrition; Chapter 3. — Academic Press. — 2020. — P. 51—66. — DOI: 10.1016/B978-0-12-811907-5.00001-4

3. Miyazawa, T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions / T. Miyazawa, G. C. Burdeos, M. Itaya, K. Nakagawa, T. Miyazawa // IUBMB Life. — 2019. — Vol. 71 (4). — P. 430—441. — DOI: 10.1002/iub.2008

4. Jiang, Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and antiinflammatory activities and their role in disease prevention and therapy / Q. Jiang // Free Radic Biol Med. — 2014. — No. 72. — P. 76—90. — DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035

5. Szewczyk, K. Tocotrienols: Tocopherols and Tocotrienols-Bioactive Dietary Compounds; What Is Certain, What Is Doubt? / K. Szewczyk, A. Chojnacka, M. Górnicka // Int J Mol Sci. — 2021. — Vol. 22. — P. 6222. — DOI: 10.3390/ijms22126222

6. Морозкина Т. С. Витамины / С. Т. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. — Минск: Асар, 2002. — 66 с.

7. Jaafar, F. Cellular Uptake and Bioavailability of Tocotrienol-Rich Fraction in SIRT1-Inhibited Human Diploid Fibroblasts / F. Jaafar, A. Abdullah, S. Makpol // Sci. Rep. — 2018. — Vol. 8. — No. 1. — P. 10471. — DOI: 10.1038/s41598-018-28708-z

8. Балабаева Е. С. Витамины Е и К и их применение в клинической практике / Е. С. Балабаева, Л. Р. Муртазина // БМИК. — 2020. — № 1. — С. 13—14.

9. Бондарь Т. В. Показатели качества и безопасности продуктов убоя свиней при использовании белково-витаминно-минеральной добавки и растительного гепатопротектора для профилактики и лечения у молоднячка животных токсической гепатодистрофии / Т. В. Бондарь, М. М. Алексин, Л. Л. Руденко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. — 2011. — № 14. — С. 215—221.

10. Справочник MSD, профессиональная версия [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://www.merckmanuals.com/en-pr/professional/nutritional-disorders/vitamin-deficiency>, — dependency, — and-toxicity/vitamin-e-toxicity (дата обращения: 11.12.2022).

11. Лучинина. Е. В. Витамины — опасность избыточного потребления / Е. В. Лучинина, Т. В. Шелехова, М. Р. Зайцева // Актуальные проблемы и достижения в медицине. — 2016. — № 3. — С. 205—209.

12. Reboul, E. Vitamin E bioavailability: Mechanisms of intestinal absorption in the spotlight / E. Reboul // Antioxidants. — 2017. — Vol. 6. — No. 4. — P. 95.

13. Regner-Nelke, L. Enjoy Carefully: The Multifaceted Role of Vitamin E in Neuro-Nutrition / L. Regner-Nelke, C. Nelke, S. G. Meuth // Int J Mol Sci. — 2021. — No. 18. — P. 95. — DOI: 10.3390/ijms221810087

14. Хужахметова Л. К. Влияние  $\alpha$ -токоферола-ацетата и циклоферона на окислительную модификацию белков у стрессированных крыс / Л. К. Хужахметова, Л. Г. Сентюрова // Астраханский медицинский журнал. — 2011. — № 2. — С. 237—238.
15. Короткий Н. Г. Эффективность средств «VEA» с высоким содержанием токоферола ацетата (витамина E) в наружной терапии атопического дерматита у детей / Н. Г. Короткий, Б. Н. Гамаюнов // Медицинский совет. — 2008. — № 9. — С. 71—72.
16. Родин А. Ю. Применение полиненасыщенных незаменимых жирных кислот и антиоксидантов в терапии акне / А. Ю. Родин, Т. Н. Замятова // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2014. — № 2. — С. 44—48.
17. Ахмедов Ш. К. Эффективность влияния антиоксидантов и иммуностимуляторов на иммунологический статус больных сифилисом / Ш. К. Ахмедов, М. Р. Баратова, Р. А. Орипов, Л. А. Саламова, Н. Х. Исламов // Достижения науки и образования. — 2020. — № 1 (55). — С. 111—114.
18. Ракица Д. П. Свободнорадикальный статус у больных бронхиальной астмой и возможности его коррекции / Д. П. Ракица, В. А. Луныков, О. М. Урясьев, В. Я. Гармаш // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. — 2000. — № 1—2. — С. 77—84.
19. Жмуров В. А. Клинико-биохимическая эффективность  $\alpha$ -токоферола в комплексной терапии больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности, получающих программный гемодиализ / В. А. Жмуров, Т. В. Решетникова, Д. Е. Ковальчук, А. Б. Фролова, Г. Ю. Сыпачева // Нефрология. — 2004. — № 2. — С. 54—59.
20. Жариков А. Ю. Роль антиоксидантной терапии в фармакологической коррекции экспериментального нефролитиаза / А. Ю. Жариков, О. С. Талалаева, Я. Ф. Зверев, В. В. Лампатов, О. В. Азарова, А. В. Кудинов, Ю. Г. Мотин // Нефрология. — 2010. — № 1—2. — С. 77—84.
21. Rizvi, S. The role of vitamin e in human health and some diseases / S. Rizvi, S. T. Raza, F. Ahmed // Sultan Qaboos Univ Med J. — 2014. — No. 14. — P. 157.
22. Shah, S. A Systematic Review of Effects of Vitamin E on the Cardiovascular System / S. Shah, Y. Shiekh, J. A. Lawrence, F. Ezekwueme, M. Alam, S. Kunwar, D. K. Gordon // Cureus. — 2021. — No.13. — e15616. — DOI: 10.7759/cureus.15616
23. Боташева В. С. Результаты гистологического исследования кардиопротекторного эффекта альфа-токоферола при экспериментальном гипотиреозе / В. С. Боташева, М. А. Долгашова, Н. И. Самойлова // Здоровье и образование в XXI веке. — 2019. — № 1. — С. 31—36.
24. Ясневская А. Л. Влияние антиоксидантов на морфометрические показатели щитовидной железы разновозрастных крыс в условиях иммобилизационного стресса / А. Л. Ясневская, М. А. Самотруева, С. А. Лужнова // Биомедицина. — 2014. — № 3. — С. 78—82.
25. Эркенова Л. Д. Особенности морфологических изменений в ядрах гипоталамуса при экспериментальном гипотиреозе и протекторное действие антиоксидантов / Л. Д. Эркенова // Наука. Инновации. Технологии. — 2013. — № 4. — С. 41—46.
26. Alcalá, M. Vitamin E reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, and oxidative stress and improves metabolic profile in obesity / M. Alcalá, I. Sánchez-Vera, J. Seviliano, L. Herrero, D. Serra, M. P. Ramos, M. Viana // Obesity. — 2015. — Vol. 23. — No 8. — P. 1598—1606. — DOI: 10.1002/oby.21135
27. Ganser, A. Azidothymidine in the treatment of AIDS / A. Ganser, J. Greher, B. Volkers, A. Staszewski, D. Hoelzer // N Engl J Med. — 1988. — No. 17 (4). — P. 250—251.
28. Graham S. M. Higher pre-infection vitamin E levels are associated with higher mortality in HIV-1-infected Kenyan women: A prospective study / S. M. Graham, J. M. Baeten, B. A. Richardson, D. D. Bankson, L. Lavreys, J. O. Ndinya-Achola, K. Mandaliya, J. Overbaugh, R.S. McClelland // BMC Infect Dis. — 2007. — Vol. 7. — P 63.
29. Idamokoro E. M. Multifunctional activity of vitamin E in animal and animal products: A review / E. M. Idamokoro, A. B. Falowo, C. E. Oyeagu, A. J. Afolayan // Anim Sci J. — 2020. — Vol. 91. — No. 1. — P. 13352. — DOI: 10.1111/asj.13352.
30. Tran, K. Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells / K. Tran, J. T. Wong, E. Lee, A. C. Chan, P. C. Choy // Biochem J. — 1996. — No. 319 (2). — P. 385—391.

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Л. К. Герунова — д. в. н., профессор;  
А. В. Анучина — аспирант.

Статья поступила в редакцию 13.03.2023 г.

Original article  
UDC 577.161.3

## USE OF VITAMIN E IN COMPLEX THERAPY OF ANIMAL AND HUMAN DISEASES

Lyudmila Karpovna Gerunova, Alevtina Viktorovna Anuchina

Omsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin, Russia, Omsk, the-first157@yandex.ru

**Abstract.** Vitamin E is a physiological antioxidant. Synthetically obtained vitamin is a mixture of 8 stereoisomers (alpha-, beta-, gamma-, delta-tocopherols and alpha-, beta-, gamma-, delta-tocotrienols), however, natural RRR-alpha-tocopherol, which has a higher activity, is of greatest interest [1, 2]. The objective of the review is to summarize the experience of using alpha-tocopherol as a powerful antioxidant with low toxicity for the treatment and prevention of various diseases. Numerous studies have shown that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of many diseases, leads to the depletion of antioxidant systems and the accumulation of lipid peroxidation products. In this regard, the use of antioxidants in clinical practice is justified. Vitamin E drugs are widely used in medicine and veterinary medicine. Understanding their mechanism of action and metabolic characteristics is necessary to obtain the desired therapeutic effect and prevent the development of undesirable effects. The efficacy of alpha-tocopherol in case of violation of spermatogenesis and oogenesis, chronic renal failure, nephrolithiasis, bronchial asthma, atopic dermatitis and acne in humans has been proven. Vitamin E drugs are prescribed for animals in case of reproductive function violation, hepatodystrophy, thyroid diseases and other pathological states. With a lack of vitamin E, the reproductive system suffers primarily, as well as organs and tissues that are most susceptible to oxidative stress: the central nervous system, skeletal muscles, endocrine system, heart, liver and blood. An overdose of alpha-tocopherol is characterized by the occurrence of weakness, drowsiness, nausea, vomiting and diarrhea, hemorrhages in the retina or brain, the development of enterocolitis and sepsis.

**Keywords:** vitamin E, alpha-tocopherol, antioxidant, clinical use, hypovitaminosis, overdose

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of various animal and human diseases. The increased formation of free radicals in the body causes damage to biological membranes, changes the structure of organic compounds, which leads to a violation of the functional state of cells. The damaging action of free radicals is opposed by the antioxidant system [3].

The lack of antioxidants can lead to disruption of the metabolism and functioning of individual organs and systems.

It has been proven that the imbalance of free radical oxidation leads to an increase in morbidity [3] and even death of the organism. Activation of antioxidant systems prevents the occurrence of severe consequences and improves the state of the body with an existing pathology [4].

In this regard, the topic of antioxidant therapy remains relevant for both practitioners and researchers. Vitamin E, which is a natural antioxidant, not only has an antioxidant effect, but also participates in the synthesis of heme and heme-containing enzymes (cyto-

chromes, catalase, peroxidase), as well as hemoglobin and myoglobin. At the same time, it participates in tissue respiration, proliferative and metabolic processes. By stimulating the synthesis of structural, enzymatic and contractile proteins of muscle tissue, it improves myocardial contractility and reduces the need for oxygen. The objective of the review is to summarize the experience of using vitamin E in the complex therapy of animal and human diseases.

Vitamin E (tocopherol) is a natural antioxidant [5] with low toxicity [6]. It is a group of eight fat-soluble compounds: alpha, beta, gamma, delta tocopherols and alpha, beta, gamma, delta tocotrienols [7]. The vitamin was obtained by chemical synthesis in 1938.

Tocotrienols differ from tocopherols by the presence of double bonds in the side chain (Fig. 1) [2].

However, RRR-alpha-tocopherol has the highest activity (Fig. 2).

**Hypovitaminosis E.** The main manifestation of vitamin E deficiency in the body is an increase in the permeability of cell membranes, in which lipid peroxidation products accumulate. In the blood, this increas-

es the level of enzymes (alanine aminotransferase, creatine phosphokinase, aspartate aminotransferase, etc.).

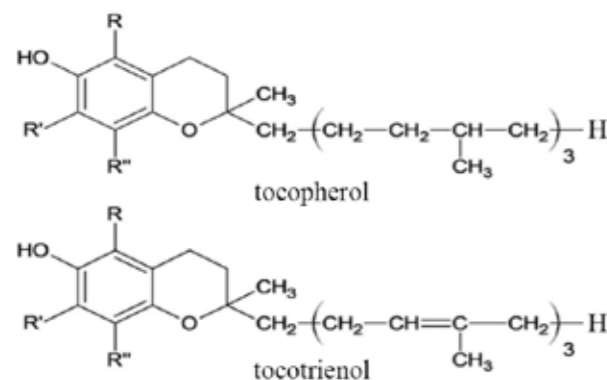


Fig. 1. Structure of tocopherol and tocotrienol

The clinical picture of hypovitaminosis E is very diverse — from muscular dystrophy, infertility [8], anemia [6] to liver necrosis [9] with encephalomalacia [8]. Since the heart is a muscular organ, with a lack of vitamin E, dystrophy occurs not only in skeletal muscles, but also in the myocardium. Significant disturbances occur in the nervous and endocrine systems, including the thyroid gland [8].

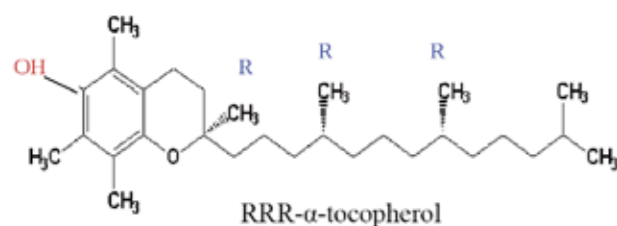


Fig. 2. Structure of RRR- $\alpha$ -tocopherol

According to medical statistics, vitamin E deficiency most often affects people who are in areas that are contaminated with radionuclides, or who are constantly in contact with chemical toxicants, as this increases the level of free radicals in their body [6]. Vitamin E deficiency is very rare, mainly in case of hypotrophy, when subcutaneous tissue, where this vitamin accumulates, is very poorly developed. The main clinical symptom of hypovitaminosis is erythrocyte hemolysis followed by anemia [6].

**Hypervitaminosis E.** Due to the fact that liver proteins that bind tocopherol (tocopherol-binding proteins) have a certain limit on the binding of the vitamin and its inclusion in the composition of VLDL (very low density lipoproteins), the vitamin has extremely low toxicity with a significant excess of doses and duration of administration (10–20 times to the daily requirement) [6].

The main clinical manifestations of tocopherol acetate poisoning include muscle weakness [10], increased blood pressure [6], and hemorrhages in various organs [10]. Emotional disorders and soreness of the mammary glands can occur due to changes in the level of a number of hormones, such as thyroid [11]. In addition, with long-term use of vitamin E in large doses, thrombosis and an increase in blood cholesterol levels may develop [11].

**Metabolism of vitamin E.** Vitamin E enters the gastrointestinal tract and undergoes hydrolysis by esterase and lipase, after which it is absorbed in the intestine and enters the blood and lymph as part of chylomicrons (Chm).

Tocopherols are transported to the liver, where the most active RRR- $\alpha$ -tocopherol combines with TPh-binding (tocopherol-binding) proteins. These proteins again bring this vitamin into the blood as part of VLDL. In blood plasma, vitamin E is exchanged between VLDL and LDL, as well as HDL, which ensures the balance of vitamin E blood concentration. In tissues, the vitamin can enter through a receptor-mediated mechanism — as part of LDL, interacting with the corresponding receptors; and also through an enzyme-mediated mechanism that depends on LPL (lipoprotein lipase). This enzyme releases the vitamin from chylomicrons and VLDL, after which RRR- $\alpha$ -tocopherol enters extrahepatic tissues and organs by passive diffusion [12]. Tocopherols not absorbed in the intestine are removed from the body (Fig. 3) [6].

Violation of the blood lipid spectrum, fermentopathy caused by a pathological process or genetic characteristics of the body, as well as the dose and duration of treatment can affect the metabolism and absorption of vitamin E, changing its overall effect and the result of therapy [13].

**Alpha-tocopherol as a component of complex therapy.** At present, the efficacy of the use of vitamin E in the complex therapy of various pathological states in humans and animals has been proven.

For example, when studying the dynamics of free radical processes of oxidative modification of proteins in blood plasma in rats under stress exposure, a pronounced antioxidant effect of alpha-tocopherol in combination with cycloferon was established. At the same time, in the stressed group, a decrease in the amount of aldehyde and ketone dinitrophenylhydrazones was noted. According to the authors, cycloferon under conditions of complex therapy has a protective effect on the antioxidant system [14].

In case of the reproductive function violation, there arises the question of a possible lack of vitamin E in

the body, since experiments on animals prove that hypovitaminosis E leads to abortion in females and damage to the testes in males. Compensation for the lack of vitamin E normalizes the state of this body system. This scientific fact was established in the 19<sup>th</sup> century, when feeding rats with whole milk and cereals with green leaves, the reproduction of offspring was maintained, while in rats fed only whole milk, a decrease in reproductive function was noted, which was associated with a lack of vitamin E [8].

The efficacy of both external and internal use of vitamin E in the complex therapy of atopic dermatitis and acne in children [15, 16], including antihistamines and sedatives, has been proven. According to some authors [15], the efficacy of a cream containing a high percentage of vitamin E is due to the biological properties of this vitamin. Alpha-tocopherol is a fat-solu-

ble compound, due to which it penetrates into cells, stabilizes membranes, stimulates reparative processes and the synthesis of a number of enzymes (peroxidase, catalase, etc.).

When conducting studies to evaluate the efficacy of the use of polyunsaturated fatty acids and antioxidants in patients with acne, an increase in the blood serum concentration of malondialdehyde and diene conjugates was noted, as well as a decrease in the level of glutathione peroxidase and catalase before the start of treatment, which indicated the development of “oxidative stress” in case of this disease. When taking vitamin E and polyunsaturated fatty acids in patients with mild and moderate course of the disease, an improvement was observed: the duration of treatment was reduced, and the quality of life during the administration of drugs and after recovery improved [16].

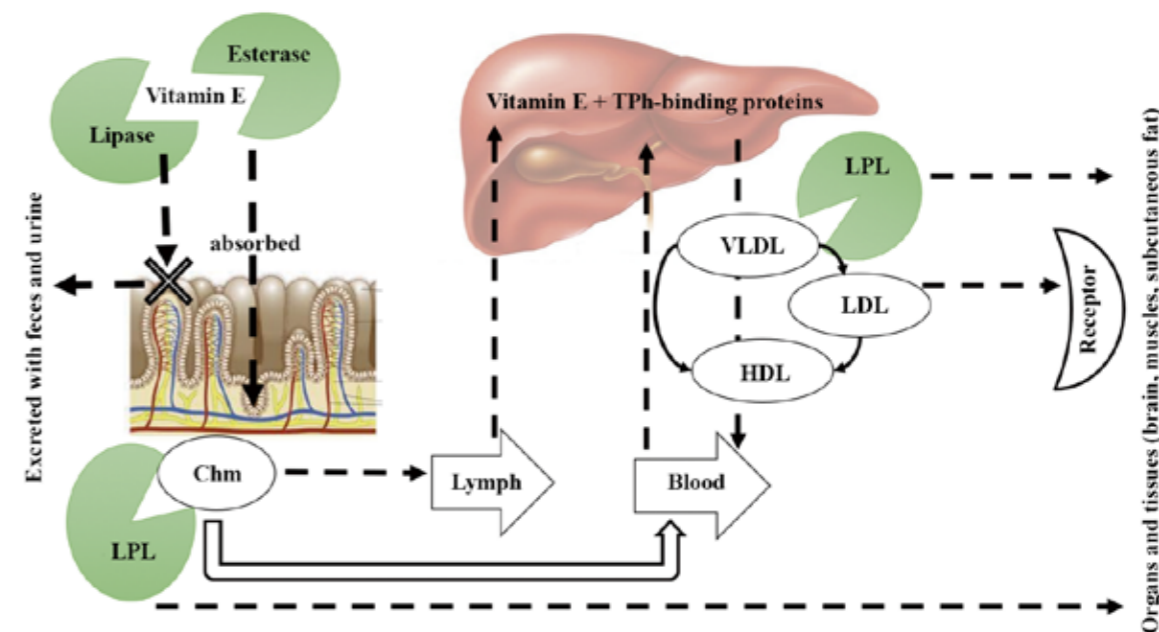


Fig. 3. Metabolism of vitamin E [6]

The inclusion of alpha-tocopherol in the complex therapy of syphilis at a dose of 0.2 g twice a day, together with the immunomodulator neovir and extencillin, contributed to the improvement of the clinical symptoms of the disease already on day 4, while with antibiotic therapy alone, the result of treatment was noted at a later date [17].

When studying the possibility of correcting the free radical status in case of bronchial asthma, it has been found that the use of tocopherol should be considered successful in case of the mild course of the disease, while in case of the more severe course of bronchial asthma, the free radical status could not be complete-

ly corrected, which required the appointment of other antioxidants in combination with intravascular laser blood irradiation. The authors consider it justified to include vitamin E in the complex therapy of moderate bronchial asthma only in patients with a disease experience of more than 10 years, who have a reduced content of vitamin E, the total pool and active antioxidants [18].

In medicine, there are cases of successful use of vitamin E in the complex therapy of patients with end-stage chronic renal failure, who have membrane-destabilizing disorders. With the introduction of alpha-tocopherol (“Evitol” KRKA) at doses of 200 mg and

300 mg per day for 4 weeks in patients receiving replacement therapy, a decrease in the severity of the main clinical syndromes (astheno-vegetative, dyspeptic, hemorrhagic), a decrease in the intensity lipid peroxidation, improved hemodialysis tolerance [19].

In Wistar rats, nephrolithiasis was simulated by peroral administration of 1 % ethylene glycol, after which the rats received an oily solution of alpha-tocopherol acetate at a dose of 300 mg/kg daily perorally. When studying the morphological structure of the kidneys and the activity of free-radical oxidation processes, it has been found that the introduction of alpha-tocopherol acetate in case of nephrolithiasis facilitates the course of the disease, as it reduces oxidative stress in the tissues of the kidneys, promotes regeneration and improves the functional activity of the urothelium, reduces the number and size of kidney stones [20].

The role of vitamin E in the prevention of platelet hyperaggregation, which can lead to the development of atherosclerosis, has been experimentally confirmed. Vitamin E reduces the production of thromboxane, which causes platelet aggregation [21]. At the same time, the antioxidant role of vitamin E in preventing adverse outcomes in case of cardiovascular diseases is controversial, since some researchers confirm it, while others reject it [22].

The cardioprotective effect of alpha-tocopherol in case of hypothyroidism has been proven. On Wistar laboratory rats subjected to thyroidectomy, it was found that with the introduction of vitamin E, such changes in the myocardium as a violation of hemodynamics, trophism and structure of cardiomyocytes, a decrease in repair processes and disorganization of the connective tissue, interstitial edema appeared two weeks later than in the animals who did not receive this drug after thyroidectomy [23].

A. L. Yasenyavskaya et al. (2014) studied the effect of vitamin E and emoxypine on thyroid gland morphology under conditions of immobilization stress. As a result of the study, it has been noted that under a stressful situation in rats, there is a decrease in the height of the thyroid epithelium and the area of thyrocytes, an increase in the area of follicles and follicular colloid, which indicates inhibition of thyroid gland functions. After the use of alpha-tocopherol and emoxypine, the height of the thyroid epithelium and the area of thyrocytes increased, while the area of follicles and follicular colloid, on the contrary, decreased. The activity of the thyroid gland increased [24].

The studies of L. D. Erkenova (2013) deserve attention. After thyroidectomy in rats, the analysis of the

therapeutic efficacy of various antioxidants was carried out with a histological assessment of the hypothalamus. When using antioxidants, the first signs of hypothyroidism appeared later than in the animals that did not receive them; the full picture of hypothyroidism also developed later, which indicated a decrease in the severity of hypothalamus damage and the neuroprotective effect of drugs, including vitamin E [25].

There is evidence that vitamin E also has an anti-inflammatory effect [26]. It restores cellular immune responses and the production of interleukin-2, and at high doses stimulates the proliferation of T-helpers [27]. A study of the acquired immunodeficiency syndrome in mice using a 15-fold increase in the content of vitamin E in the diet showed normalization of the immune status [28]. It has now been proven that vitamin E stimulates the humoral and cellular immune response, increases phagocytic function and activates the production of antibodies during vaccination [21].

According to a number of authors [29], the introduction of vitamin E into the diet of productive animals can increase their productivity and improve the quality of animal products, since lipid oxidation in muscles, eggs and dairy products is reduced. Evidence suggests that the bioavailability of animal products fortified with vitamin E can be an invaluable benefit to consumers, especially in resource-limited areas where there is a high risk of vitamin E deficiency.

### CONCLUSION

Thus, the results of numerous studies presented in the literature indicate that vitamin E deficiency in animals and humans is quite rare. The reason for this is more often acquired diseases, in case of which the absorption of the vitamin worsens or fat metabolism is disturbed with a loss of the ability to absorb fat. When administered to the body, vitamin E acts as the first line of defense against lipid peroxidation. Due to its peroxide radical scavenging activity, it also protects polyunsaturated fatty acids present in membrane phospholipids and plasma lipoproteins [30]. Along with the antioxidant action, vitamin E performs other important functions in the body: it maintains muscle tone, visual acuity, immune reactivity, regulates the function of the nervous system and reproductive capacity. The lack of available biomarkers of vitamin E intake and status makes it difficult to assess the association of its content in the body with possible clinical outcomes [21]. However, despite some inconsistency of data, the benefits of vitamin E when included in the complex therapy of diseases significantly exceed the risk of undesirable effects.

### REFERENCES

1. *Galli, F.* Vitamin E: Emerging aspects and new directions / F. Galli, A. Azzi, M. Birringer, J. M. Cook-Mills, M. Eggersdorfer, J. Frank, G. Cruciani, S. Lorkowski, N. K. Özer // *Free Radic. Biol. Med.* — 2017. — No. 102. — P. 16—36. — DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017
2. *Khallouki, F.* Vitamin E: An overview / F. Khallouki, R. W. Owen, M. Akdad, E. B. Bouhali, S. Silvente-Poirot, M. Poirot // *In Molecular Nutrition; Chapter 3.* — Academic Press. — 2020. — P. 51—66. — DOI: 10.1016/B978-0-12-811907-5.00001-4
3. *Miyazawa, T.* Vitamin E: Regulatory Redox Interactions / T. Miyazawa, G. C. Burdeos, M. Itaya, K. Nakagawa, T. Miyazawa // *IUBMB Life.* — 2019. — Vol. 71 (4). — P. 430—441. — DOI: 10.1002/iub.2008
4. *Jiang, Q.* Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and antiinflammatory activities and their role in disease prevention and therapy / Q. Jiang // *Free Radic Biol Med.* — 2014. — No. 72. — P. 76—90. — DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035
5. *Szewczyk, K.* Tocotrienols: Tocopherols and Tocotrienols-Bioactive Dietary Compounds; What Is Certain, What Is Doubt? / K. Szewczyk, A. Chojnacka, M. Górnicka // *Int J Mol Sci.* — 2021. — Vol. 22. — P. 6222. — DOI: 10.3390/ijms22126222
6. *Morozkina T. S.* Vitamins / S. T. Morozkina, A. G. Moiseyonok. — Minsk: Asar, 2002. — 66 p.
7. *Jaafar, F.* Cellular Uptake and Bioavailability of Tocotrienol-Rich Fraction in SIRT1-Inhibited Human Diploid Fibroblasts / F. Jaafar, A. Abdullah, S. Makpol // *Sci. Rep.* — 2018. — Vol. 8. — No. 1. — P. 10471. — DOI: 10.1038/s41598-018-28708-z
8. *Balabaeva E. S.* Vitamins E and K and their use in clinical practice / E. S. Balabaeva, L. R. Murtazina // *BMIK.* — 2020. — No. 1. — P. 13—14.
9. *Bondar T. V.* Indicators of quality and safety of pig slaughter products when using a protein-vitamin-mineral additive and a plant hepatoprotector for the prevention and treatment of toxic hepatodystrophy in young animals / T. V. Bondar, M. M. Aleksin, L. L. Rudenko // *Aktualnye problemy intensivnogo razvitiya zhivotnovodstva (Actual problems of intensive development of animal husbandry).* — 2011. — No. 14. — P. 215—221.
10. MSD Manual, Professional Edition [Electronic Resource] — Access Mode: <https://www.merckmanuals.com/en-pr/professional/nutritional-disorders/vitamin-deficiency>, — dependency, — and-toxicity/vitamin-e-toxicity (date of access: 11.12.2022).
11. *Luchinina E. V.* Vitamins — the danger of excessive consumption // E. V. Luchinina, T. V. Shelekhova, M. R. Zaytseva // *Aktualnye problemy i dostizheniya v meditsine (Actual problems and achievements in medicine).* — 2016. — No. 3. — P. 205—209.
12. *Reboul, E.* Vitamin E bioavailability: Mechanisms of intestinal absorption in the spotlight / E. Reboul // *Antioxidants.* — 2017. — Vol. 6. — No. 4. — P. 95.
13. *Regner-Nelke, L.* Enjoy Carefully: The Multifaceted Role of Vitamin E in Neuro-Nutrition / L. Regner-Nelke, C. Nelke, S. G. Meuth // *Int J Mol Sci.* — 2021. — No. 18. — P. 95. — DOI: 10.3390/ijms221810087
14. *Khuzhakhmetova L. K.* Effect of  $\alpha$ -tocopherol-acetate and cycloferon on oxidative modification of proteins in stressed rats / L. K. Khuzhakhmetova, L. G. Sentyurova // *Astrakhan medical journal (Astrakhan Medical Journal).* — 2011. — No. 2. — P. 237—238.
15. *Korotkiy N. G.* Efficacy of “VEA” products with a high content of tocopherol acetate (vitamin E) in the external therapy of atopic dermatitis in children / N. G. Korotkiy, B. N. Gamayunov // *Meditsinskiy sovet (Medical Council).* — 2008. — No. 9. — P. 71—72.
16. *Rodin, A. Yu.* Use of polyunsaturated essential fatty acids and antioxidants in acne therapy / A. Yu. Rodin, T. N. Zaklyakova // *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney (Russian Journal of Skin and Venereal Diseases).* — 2014. — No. 2. — P. 44—48.
17. *Akhmedov, Sh. K.* Efficacy of the effect of antioxidants and immunostimulants on the immunological status of patients with syphilis / Sh. K. Akhmedov, M. R. Baratova, R. A. Oripov, L. A. Salamova, N. Kh. Islamov // *Dostizheniya nauki i obrazovaniya (Achievements of science and education).* — 2020. — No. 1 (55). — P. 111—114.
18. *Rakita D. R.* Free radical status in patients with bronchial asthma and the possibility of its correction / D. R. Rakita, V. A. Lunyakov, O. M. Uryasyev, V. Ya. Garmash // *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I. P. Pavlova (Russian Medical Biological Bulletin named after Academician I. P. Pavlov).* — 2000. — No. 1—2. — P. 77—84.
19. *Zhmurov V. A.* Clinical and biochemical efficacy of alpha-tocopherol in the complex therapy of patients with end-stage chronic renal failure receiving program hemodialysis / V. A. Zhmurov, T. V. Reshetnikova, D. E. Kovalchuk, A. B. Frolova, G. Yu. Sypacheva // *Nefrologiya (Nephrology).* — 2004. — No. 2. — P. 54—59.
20. *Zharikov, A. Yu.* Role of antioxidant therapy in the pharmacological correction of experimental nephrolithiasis / A. Yu. Zharikov, O. S. Talalaeva, Ya. F. Zverev, V. V. Lampatov, O. V. Azarova, A. V. Kudinov, Yu. G. Motin // *Nefrologiya (Nephrology).* — 2010. — No. 1—2. — P. 77—84.
21. *Rizvi, S.* Role of vitamin E in human health and some diseases / S. Rizvi, S. T. Raza, F. Ahmed // *Sultan Qaboos Univ Med J.* — 2014. — No. 14. — P. 157.
22. *Shah, S.* A Systematic Review of Effects of Vitamin E on the Cardiovascular System / S. Shah, Y. Shiekh, J. A. Lawrence, F. Ezekwueme, M. Alam, S. Kunwar, D. K. Gordon // *Cureus.* — 2021. — No.13. — e15616. — DOI: 10.7759/cureus.15616
23. *Botasheva V. S.* Results of histological study of the cardioprotective effect of alpha-tocopherol in case of experimental hypothyroidism / V. S. Botasheva, M. A. Dolgashova, N. I. Samoylova // *Zdorovye i obrazovanie v XXI veke*

(Health and education in the XXI century). — 2019. — No. 1. — P. 31—36.

24. *Yasenyavskaya A. L.* Effect of antioxidants on the morphometric indicators of the thyroid gland in rats of different ages under conditions of immobilization stress / A. L. Yasnevskaya, M. A. Samotrueva, S. A. Luzhnova, *Biomeditsina (Biomedicine)*. — 2014. — No. 3. — P. 78—82.

25. *Erkenova L. D.* Features of morphological changes in the nuclei of the hypothalamus in case of experimental hypothyroidism and the protective effect of antioxidants / L. D. Erkenova // *Nauka. Innovatsii. Tekhnologii. (Science. Innovation. Technologies.)*. — 2013. — No. 4. — P. 41—46.

26. *Alcalá, M.* Vitamin E reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, and oxidative stress and improves metabolic profile in obesity / M. Alcalá, I. Sánchez-Vera, J. Sevillano, L. Herrero, D. Serra, M. P. Ramos, M. Viana // *Obesity*. — 2015. — Vol. 23. — No. 8. — P. 1598—1606. — DOI: 10.1002/oby.21135

27. *Ganser, A.* Azidothymidine in the treatment of AIDS / A. Ganser, J. Greher, B. Volkers, A. Staszewski, D. Hoelzer // *N Engl J Med*. — 1988. — No. 17 (4). — P. 250—251.

28. *Graham S. M.* Higher pre-infection vitamin E levels are associated with higher mortality in HIV-1-infected Kenyan women: A prospective study / S. M. Graham, J. M. Baeten, B. A. Richardson, D. D. Bankson, L. Lavreys, J. O. Ndinya-Achola, K. Mandaliya, J. Overbaugh, R.S. McClelland // *BMC Infect Dis*. — 2007. — Vol. 7. — P. 63.

29. *Idamokoro E. M.* Multifunctional activity of vitamin E in animal and animal products: A review / E. M. Idamokoro, A. B. Falowo, C. E. Oyeagu, A. J. Afolayan // *Anim Sci J*. — 2020. — Vol. 91. — No. 1. — P. 13352. — DOI: 10.1111/asj.13352.

30. *Tran, K.* Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells / K. Tran, J. T. Wong, E. Lee, A. C. Chan, P. C. Choy // *Biochem J*. — 1996. — No. 319 (2). — P. 385—391.

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**A. V. Anuchina** — Postgraduate Student;

**L. K. Gerunova** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Diagnostics, Internal Noncommunicable Diseases, Pharmacology, Surgery and Obstetrics.

The article was submitted 13.03.2023.

## СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ, ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

Научная статья

УДК 57.021:615.065

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.61

### СТРУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРОВ (НЕТЕЛЕЙ) В ТРЕТЬЕМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ И ЗНАЧЕНИЕ ГЕСТОЗА В ЕЕ ФОРМИРОВАНИИ

**Юрий Николаевич Алехин\***<sup>✉</sup>, **Павел Андреевич Паршин\***, **Ольга Сергеевна Попова\*\***,  
**Анастасия Юрьевна Лебедева\***

\**Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, exteapari@yandex.ru*<sup>✉</sup>

\*\**Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

**Аннотация.** С целью изучения структуры заболеваемости патологии третьего триместра беременности проведено обследование нетелей ( $n = 225$ ) и коров ( $n = 507$ ) со сроком период до родов и 60 дней после. Общая заболеваемость животных в течение третьего триместра беременности составила 37,2 %, при этом монозоология наблюдается у 13,0 %, а полизоология соответственно у 24,2 % обследованных. Гестоз диагностировали у 12,4 % от всех обследованных животных. При этом гестоз констатировали в виде монозоологии у 1,6 % и в сочетании с другими патологиями — у 10,8 % животных. Данная патология может возникать как у здоровых, так и на фоне уже существующих заболеваний, на практике это преимущественно болезни печени, почек и системы крови. При этом, неблагоприятный анамнез значительно повышает риск развития гестоза, а тяжесть течения и исход его в значительной степени зависит от наличия и выраженности сопутствующих патологий, т. е. его коморбидности. Выявлено, что гестоз участвует в формировании сложной многоуровневой патофизиологической межсистемной интеграции в организме, лежащей в основе развития коморбидной патологии.

**Ключевые слова:** коровы, нетели, беременность, структура заболеваемости, коморбидность, гестоз, экстрагенитальная патология

Здоровье животных является основным фактором, лимитирующим уровень их продуктивности и эффективность целевых инвестиций. При этом особое хозяйственно-экономическое значение имеют патологии, возникающие в результате нарушения обмена веществ в системе мать-плацента-плод, одной из форм проявления которого является гестоз (преэклампсия) [1—4]. Несмотря на очевидные достижения в области изучения патогенеза, диагностики и профилактики преэклампсии наблюдается прогрессирование данной проблемы, что, вероятно, обусловлено интенсификацией скотоводства, которое сопровождается повышением функциональной нагрузки на организм животных с соответствующим риском морфофункциональных нарушений системы мать-плацента-плод [5]. Очевидна необ-

ходимость расширения трактовки патогенеза гестоза и поиска новых подходов к решению данной проблемы. Одним из перспективных направлений научного поиска базируется на том, что ведущим симптомом токсикоза беременных является полиорганная недостаточность, т. е. данная патология имеет полиморбидный характер [6—8]. Для разработки соответствующего инновационного подхода необходимо расширение наших знаний структуры заболеваемости беременных и механизмах формирования коморбидного профиля перинатальной патологии. Для разработки соответствующего инновационного подхода необходимо расширение наших знаний структуры заболеваемости беременных и механизмах формирования коморбидного профиля перинатальной патологии.

© Алехин Ю. Н., Паршин П. А., Попова О. С., Лебедева А. Ю., 2023

Целью работы являлось изучение структуры заболеваемости нетелей и коров третьего триместра беременности и оценки в ее формировании роли гестоза.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью изучения структуры патологических состояний беременных третьего триместра была проведена углубленная диспансеризация коров в 12 сельскохозяйственных предприятиях, специализирующихся на производстве молока и расположенных в Белгородской, Воронежской, Липецкой и Псковской областях. В обследованных хозяйствах содержатся животные наиболее распространенных в указанных регионах РФ пород: красно-пестрая и голштинская черно-пестрая. В период с 15.11.2021 г. по 25.02.2022 г. 732 животных, в т. ч., 225 нетелей и 507 коров со сроком беременности 7 месяцев подвергались комплексному обследованию, которое затем повторялось с интервалом 10 дней до родов. С целью оценки клинического значения гестоза помимо обследования в период беременности, клиническое наблюдение сохранялось еще 60 дней после отела.

При проведении обследования животных использовали традиционные клинические и инструментальные методы исследования. Лабораторные исследования крови, мочи и содержимого рубца проведены в БелИЛ ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Белгород), ФГБОУ ВО «СПбГУВМ» (г. Санкт-Петербург) и ФГБНУ «ВНИВИПФиТ» (г. Воронеж). Для снижения риска клинической ошибки проводили комиссионное обследование с участием ветеринарных специалистов с опытом работы не менее 3 лет и научных сотрудников узкой специализации, а также использовали соответствующую методическую литературу [9—12]. Дифференциация большинства заболеваний осуществляли на основании специфических клинических симптомов или синдромов, но при выявлении анемии, гестоза, патологии печени, почек и преджелудков также учитывали результаты инструментальных исследований и лабораторного анализа биоматериала. Так, наличие гестоза констатировали при сочетании отеков, повышения содержания белка в моче ( $\geq 0,3$  г/л), систолического ( $\geq 135,0$  мм рт. ст.) и диастолического ( $\geq 55,0$  мм рт. ст.) артериального давления. Гепатоз диагностировали у коров с повышенным содержанием общего билирубина ( $\geq 18,0$  мкм/л), холестерина ( $\geq 5,5$  мм/л), активности в крови аспартатаминотрансфераза ( $\geq 100,0$  Е/л), аланинаминотрансфераза ( $\geq 40,0$  Е/л), гаммаглутаминтрансферазы

( $\geq 25,0$  Е/л), щелочной фосфатазы ( $\geq 200,0$  Е/л) и сорбитолдегидрогеназы ( $\geq 1,5$  Е/л). На заболевание почек указывало наличие в нецентрифугированной моче бактериурии (нитритов  $\geq 1,6$  мм/л), повышенный уровень лейкоцитов ( $\geq 10,0$  кл/мкл), эритроцитов ( $\geq 5,0$  кл/мкл), увеличение концентрации в крови креатинина ( $\geq 150,0$  мкм/л) и/или изменение соотношения азота мочевины и креатинина ( $\geq 100$  или  $\leq 40$ ). Наличие анемии констатировали при уменьшении в крови показателей гематокрита ( $\leq 25,0$ ), гемоглобина ( $\leq 85,0$  г/л) и его содержания в эритроцитах ( $\leq 16,0$  пг). Нарушение функций рубца с ацидотической тенденцией диагностировали при уменьшении частоты сокращений рубца ( $< 2,0/2$  мин), величины рН ( $\leq 5,0$  ед) и количества инфузорий ( $\leq 80,0$  тыс/мл), но увеличения содержания молекул средней массы ( $\geq 2,0$  усл. ед.) в содержимом рубца. При остеодистрофии помимо соответствующих клинических признаков наблюдали уменьшение содержания кальция в крови ( $\leq 1,8$  мм/л) и увеличение активности щелочной фосфатазы ( $\geq 200,0$  Е/л). На наличие кетоза указывало повышенный уровень кетоновых тел в крови ( $\geq 0,08$  г/л) и моче ( $\geq 0,06$  г/л).

Результаты обследования животных были подвергнуты статистической обработке, в рамках которой определяли долю (%) конкретной патологии в анализируемой выборке. Анализ клинического значения гестоза проводили с помощью статистических методов оценки риска с расчетом относительного риска, его диапазона и достоверности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура заболеваемости коров (нетелей) в третьем триместре беременности представлена в таблице 1, из данных которой видно, что общая заболеваемость животных составила 37,2 %, при этом монозоология наблюдается у 13,0 % всех обследованных или у 34,9 % больных, а полизоология у 24,2 % и 65,1 % соответственно.

У нетелей общая заболеваемость составляет 29,8 %, одну патологию диагностировали у 43,3 % больных. При этом наиболее часто встречаются анемия (13,4 % от всех больных), болезни органов дыхания (9,0 %) и печени (9,0 %). У 56,7 % нетелей отмечено наличие нескольких самостоятельных болезней. Из числа наиболее распространенных сочетаний можно отметить болезни органов дыхания + анемия + гепатоз (11,9 % от всех больных), гепатоз + гестоз (10,4 %), анемия + гепатоз (7,5 %) и болезни почек + гестоз (7,5 %).

Таблица 1

Результаты клинического обследования нетелей и коров 7—9 месяцев беременности

Состояние здоровья	Нетели (n = 225)	Коровы (n = 507)
Клинически здоровые, гол	158	302
Больные всего, гол	67	205
Структура заболеваемости		
Монозоология, гол		
Болезни печени (гепатоз)	6	14
Гестоз	4	8
Остеодистрофия	0	5
Болезни органов дыхания (эмфизема, бронхит, пневмония)	6	7
Анемия	9	11
Болезни сердца (миокардоз, миокардиофиброз)	0	6
Болезни преджелудков (ацидоз рубца, гипотония преджелудков)	2	9
Болезни почек (нефрит, нефроз, уроцистит)	2	3
Другие патологии	1	3
Полизоология		
Болезни органов дыхания, гепатоз и анемия	8	9
Болезни органов дыхания, и почек	4	5
Анемия и гепатоз	5	35
Гепатоз и гестоз	7	23
Гепатоз, гестоз и анемия	4	18
Анемия, болезни сердца	0	15
Болезни почек (нефрит, нефроз, уроцистит), гестоз	5	3
Болезни почек (нефрит, нефроз, уроцистит), гепатоз и гестоз	3	16
Болезни преджелудков (ацидоз рубца, гипотония преджелудков), гепатоз	2	11
Другие сочетания	0	4

У коров в возрасте от 3,0 до 8,5 лет в период запуска (7 месяцев беременности) общая заболеваемость оказалась равна 40,4 %. При этом монозоологию диагностировали у 31,2 % больных.

У них наиболее часто встречались болезни печени (6,8 % от всех больных), анемия (5,4 %), болезни преджелудков (4,4 %) и гестоз (3,9 %), реже — болезни органов дыхания (3,4 %) и сердца (2,9 %).



Коморбидный профиль патологии был отмечен у 67,8 % больных, у которых наиболее часто отмечали сочетание анемия + гепатоз (17,0 % от всех больных), гепатоз + гестоз (11,2 %), гепатоз + гестоз + анемия (8,8 %), гестоз + гепатоз + болезни почек (7,8 %), и анемия + болезни сердца (7,3 %).

Гестоз диагностировали у 12,4 % от всех обследованных. Данную патологию констатировали в виде мононозологии у 1,6 % и в сочетании с другими патологиями — у 10,8 % животных. Гестоз диагностировали у 10,2 % всех обследованных нетелей и у 34,3 % от числа больных. В виде монопатологии преэклампсию констатировали у 1,8 % всех нетелей и 6,0 % от числа больных, а в сочетании с другими болезнями соответственно у 8,4 и 28,4 % животных. У коров общая заболеваемость

гестозом составила 13,4 %. Доля патологии в структуре заболеваемости была равна 33,2 %, при этом в виде отдельной патологии ее диагностировали у 1,6 % всех обследованных и у 3,9 % больных, а его сочетание с другими болезнями наблюдали соответственно у 11,8 и 29,3 %.

Результаты ретроспективного анализа состояния животных в период наблюдения представлены в таблице 2, из данных которой видно, что при беременности осложненной гестозом, в 9,6 раза возрастает заболеваемость кетозом. В дальнейшем у этих животных в 11 раз чаще констатируют патологические роды, а в первые два месяца лактации выше риск гибели в 35,4 раза, развития гинекологических и ортопедических заболеваний соответственно в 11,4 и 9,3 раза.

Таблица 2

Результаты ретроспективного анализа клинического значения гестоза у нетелей и коров со сроком беременности 7—9 месяцев

Состояние здоровья / кол-во гол.	Всего, гол.	Физиологическое состояние								
		Беременность 7—9 месяцев			Отел		Лактация 0—60 день			
		Н	К	Гб	Н	ПР	Н	ГП	ОП	Гб
Клинически здоровые	460	451	9	0	450	10	430	18	11	1
Больных гестозом	91	74	16	1	54	36	23	40	20	7
Структура заболеваемости гестозом (по основному заболеванию)										
Гестоз	12	11	1	0	9	3	8	4	0	0
Болезни печени (гепатоз) и гестоз	30	25	5	0	19	11	11	12	5	2
Гепатоз, гестоз и анемия	22	18	4	0	11	11	0	13	7	2
Болезни почек (нефрит, нефроз, уроцистит), гестоз	8	7	1	0	6	2	4	3	1	0
Болезни почек (нефрит, нефроз, уроцистит), печени и гестоз	19	13	5	1	9	9	0	8	7	3
Сопоставимые варианты нозологической структуры										
Гепатоз	20	18	2	0	18	2	15	2	3	0
Анемия	20	20	0		19	1	16	0	4	0
Анемия и гепатоз	40	37	5	0	30	10	15	12	12	1

**Примечание:** К — кетоз, Гб — гибель животного, Н — норма, здоровые, ГП — гинекологическая патология (метриты, субинволюция матки), ПР — патология родов (задержание последа, дискоординированная родовая деятельность), ОП — болезни дистального отдела конечностей (пододерматит, болезнь Мортелларо)

При этом следует отметить, что роль гестоза зависит от наличия и характера сопутствующих патологий. Так, у больных только гестозом не отмечено существенных изменений клинического статуса в период беременности, но во время родов у 25 % из их числа отмечены патологические роды в виде задержания последа (16,7 %) и затяжных родов (8,3 %).

У 33,3 % новотельных животных отмечено развитие метритов и субинволюции матки. При этом 25 % случаев это следствие сбоя родовой деятельности, но у 8,3 %, вероятно, имело место негативное влияние гестоза.

Гестоз в сочетании с другими болезнями оказал более выраженное влияние на клиническое состояние животных. Так, в сравнении с неосложненным гестозом возрастает частота случаев кетоза при его сочетании с гепатозом в 2 раза, с болезнями почек — на 50,6 %, с гепатозом и анемией — в 2,2 раза и с анемией, болезнями печени и почек — в 3,2 раза.

Число патологических родов у животных перенесших коморбидный гестоз в 2,0 раза выше, чем после неосложненной его формы. Сочетание гестоза с гепатозом увеличивает частоту случаев метритов и субинволюции матки на 20,1 %, с гепатозом и анемией — на 77,5 %, с болезнями почек — на 12,6 %, с болезнями печени и почек — на 33,3 %.

Заболеваемость конечностей у коров перенесших коморбидный гестоз значительно выше, чем после неосложненной формы данной патологии. Однако столь же высокая заболеваемость отмечена у животных с анемией и гепатозом. Поэтому нет основания для констатации роли гестоза в развитии ортопедической патологии, риск ее появления возрастает при наличии анемии и гепатоза.

В нашем опыте мы не наблюдали случаев смерти при неосложненном гестозе. Однако риск гибели возрастал у больных с коморбидной патологией, в частности, у животных, перенесших гестоз, осложненный гепатозом и анемией.

Полученные нами результаты показали, что, нетели и коровы в начале третьего триместра беременности имеют разное исходное состояние здоровья, на фоне которого у некоторых из них развивается гестоз, который является фактором риска возникновения «новых» патологий во время беременности, родов и первых месяцев лактации.

Однако гипотеза о том, что возникновение дополнительной патологии негативно влияет на клиническое состояние больного не вызывает сомнения, но представленная формулировка не дает нам никакой информации о степени вероятности проявления новых заболеваний и соответственно нет обоснованности лечебных или профилактических действий. Поэтому было проведено сравнение совокупностей по качественным признакам — рассчитали относительный риск с 95 % доверительным интервалом [13].

На основании данных о структуре заболеваемости сформировали четырехпольные таблицы сопряженности дихотомических признаков. При этом фактором риска во всех расчетных случаях был гестоз, дифференциальным фактором — наличие или отсутствие «новых» патологий (новых признаков).

В таблице 3 представлен пример конструкции сопряженных признаков. При этом выбрав дифференциальным признаком наличие или отсутствие в период беременности кетоза имеем две выборки: А — больные осложненным и неосложненным гестозом, Б — клинически здоровые, С — имеется кетоз, Д — отсутствует кетоз.

Таблица 3

Показатели сопряженности признаков для расчета относительного риска возникновения кетоза у больных неосложненным и осложненным гестозом

Наличие или отсутствие фактора риска (гестоз)	Наличие или отсутствие дополнительного клинического состояния (кетоз)	
	С. Имеется кетоз	Д. Отсутствует кетоз
А. Фактор риска имеется (больные гестозом)	17	73
Б. Фактор риска отсутствует (здоровые)	9	451

Проведя расчеты, выявили, что относительный риск (RR) возникновения кетоза у животных с гестозом (осложненный и неосложненный) равен

$9,65 \pm 0,396$ , т. е., в 9,65 раз выше, чем у здоровых беременных. Доверительный интервал (ДИ) составил 4,44—20,97, что указывает на достоверную ста-

тистическую (клиническую) значимость ( $p \leq 0,05$ ) и подтверждает высокий уровень вероятности развития новой патологии (кетоз) при наличии фактора риска (гестоз). Относительный риск возникновения патологии родов и гинекологических заболеваний у больных с не дифференцируемым гестозом составил соответственно  $18,40 \pm 0,338$  и  $12,29 \pm 0,258$ , а доверительный интервал 9,480—35,714 и 7,418—20,358, что указывает на достоверную статистическую (клиническую) значимость ( $p \leq 0,05$ ) и подтверждает высокий уровень вероятности развития указанных патологий при наличии фактора риска (гестоз). Вероятность гибели коров в течение первых 60 дней лактации перенесших гестоз в 35,7 раза выше ( $RR = 35,70 \pm 1,063$ ), чем среди животных после неосложненной беременности. Уровень достоверности изучаемого влияния соответствует  $p < 0,05$ , так как доверительный интервал не включает в себя единицу [14].

Относительный риск развития кетоза у животных с сочетанием гестоза и гепатоза оказался равен  $1,67 \pm 0,785$ , т. е., в 1,67 раза выше, чем у больных, только с патологией печени. Однако, доверительный интервал (0,358—7,768) включает единицу, что указывает на недостоверный ( $p \geq 0,05$ ) уровень статистической зависимости. Близкие значения относительного риска ( $1,53 \pm 0,617$ ), доверительного интервала (0,456—5,119) и достоверности ( $p \geq 0,05$ ) с соответствующим низким уровнем клинического значения были получены при оценке роли гестоза в развитии кетоза при его наличии у больных с сочетанием гепатоза и анемии.

У животных, перенесших осложненный гестоз, выявлено, что появление данной патологии у больных гепатозом в 1,46 раза ( $RR = 1,467 \pm 0,364$ ) выше вероятность возникновения патологических родов. Однако данная зависимость оказалась недостоверна ( $p \geq 0,05$ ), так как 95 % ДИ (0,718—2,994). У больных, у которых диагностировали сочетание гестоза, гепатоза и анемии относительный риск составил  $2,00 \pm 0,347$ , а ДИ 1,013—3,949, что указывает на достоверное ( $p \leq 0,05$ ) клиническое значение гестоза в развитие патологии родов у животных с указанным коморбидным профилем болезни.

Вероятность возникновения гинекологических заболеваний у животных, у которых ранее диагностировали сочетание гестоза с гепатозом и с гепатозом и анемией достоверно ( $p \leq 0,05$  %) соответственно в 4,29 ( $RR = 4,29 \pm 0,705$ , ДИ 1,075—17,080) и 2,11 ( $RR = 2,11 \pm 0,291$ , ДИ 1,195—3,736) раз выше, чем у больных без токсикоза беременных.

В течение первых 60 дней лактации риск ухудшения клинического состояния и гибели коров больных анемией и гепатозом выше, если у них в период беременности помимо указанных патологий имело место гестоз. Однако, несмотря на то, что показатель относительного риска у этих животных составил  $3,64 \pm 1,196$  диапазон его границ оказался в пределах от 0,349 до 37,880, т. е., влияние гестоза на риск неблагоприятного исхода больных анемией и гепатозом — недостоверно ( $p \geq 0,05$ ).

Таким образом, полученные нами данные показали, что в третьем триместре беременности у нетелей и коров общая заболеваемость составила 37,2 %, при этом наиболее часто встречаются болезни печени (21,6 %), анемия (15,6 %), гестоз (12,4 %), нефропатии (5,6 %) и дисфункции преджелудков (3,3 %). В большинстве случаев патология протекает в коморбидной форме. Гестоз в сочетании с другими заболеваниями встречается в 6,6 раза чаще, чем в виде отдельной патологии. Наиболее широко распространены его сочетания с анемией, болезнями печени и почек. При этом наличие гестоза у нетелей и коров, здоровых и больных анемией и/или гепатозом увеличивает вероятность возникновения в период беременности кетоза, во время отела — патологии родов (задержание последа, дискоординированная родовая деятельность), в течение первых 60 дней лактации — гинекологической патологии (метриты, субинволюция матки) и гибели животных. Проведя с помощью методов оценки риска анализ полученных данных, было уточнено клиническое значение гестоза как фактора определяющего вероятность возникновения вторичных патологий. Показано, что риск развития кетоза на фоне осложненного и неосложненного гестоза, а так же патологии родов и гинекологических заболеваний у коров ранее перенесших гестоз достоверно выше, чем у здоровых животных. Наличие у нетелей и коров в начале третьего триместра беременности анемии, и ее сочетания с патологией печени, оказывает существенное влияние на риск развития указанных вторичных патологий. Возникновение у этих животных гестоза достоверно повышает уровень риска развития гинекологических заболеваний, а у больных с сочетанием анемии и гепатоза чаще встречается патология родов. Не подтвердилось достоверность клинического значения токсикоза беременных в патогенезе кетоза на фоне анемии и патологии печени, а также в возникновении патологии родов у больных гепатозом. Несмотря на выявленное влияние как «чистого», так и осложненного гестоза на клиниче-

ское состояние беременных животных, мы не выявили достоверного увеличения рисков их смерти. Также не отмечено танатологического значения перенесенного гестоза у коров после отела, хотя после коморбидной его формы летальность составила 7,7 %, в то время как данный показатель среди больных только анемией и гепатозом был равен 1,25 %.

Результаты статистической обработки показателей структуры заболеваемости гестоза показали, различный уровень его клинической значимости в возникновении вторичных патологий беременности, родов и послеродового периода. Однако во всех анализируемых вариантах влияние токсикоза имело место. Поэтому провели расчет интегральной клинической значимости. При этом фактором риска было наличие или отсутствие коморбидного профиля гестоза. Сопоставимые выборки состояли из групп с наличием или отсутствием вторичных патологий (табл. 2). Результаты расчета показали, что в случаях коморбидного профиля гестоза риск возникновения кетоза во время беременности и патологии родов, а в послеродовом периоде гинекологических и ортопедических заболеваний, а также угроза ухудшения клинического состояния и гибели животных в 1,874 раза выше, чем у больных с неосложненным гестозом ( $RR = 1,874 \pm 0,314$ , ДИ 1,013—3,469,  $p \leq 0,05$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования по изучению распространенности и форм проявления гестоза у коров. Показано, что данная патология может возникать как у здоровых, так и на фоне уже существующих заболеваний, на практике это преимущественно болезни печени, почек и системы крови. При этом, неблагоприятный анамнез значительно повышает риск развития гестоза, а тяжесть течения и исход его в значительной степени зависит от наличия и выраженности сопутствующих патологий, т. е., его коморбидности. В свою очередь развитие «позднего» токсикоза на фоне анемии и болезней печени повышает риск возникновением вторичных патологий во время беременности, например, кетоза, и отдаленных последствий в виде акушерско-гинекологических заболеваний. Очевидно, что гестоз участвует в формировании сложной многоуровневой патофизиологической межсистемной интеграции, изучение процессов возникновения которой является перспективным направлением ветеринарной науки. Так, выявив механизма межсистемной патогенетической интеграции и нивелировав их, снизится риск генерализации гестоза,

прогрессирования ранее имеющихся и возникновением новых (вторичных) заболеваний.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. D'occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G. 2019. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: a review. *Theriogenology*. 125:277—284.
2. Michael J. D'occhio, Pietro S. Baruselli & Giuseppe Campanile (2019) Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review, *Italian Journal of Animal Science*, 18:1, 858—867, DOI: 10.1080/1828051X.2019.1600385
3. Rook J. S. Pregnancy toxemia of ewes, does, and beef cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2000, 16(2): 293—317 (DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30107-9)
4. Перерядкина С. П. Ангиогенез плаценты крупного рогатого скота при гестозе беременных / С. П. Перерядкина [и др.] // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование. — 2016. — № 2 (42). — С. 170—176.
5. Шабунин С. В., Алехин Ю. Н., Нежданов А. Г. Перинатальная патология у крупного рогатого скота — актуальная проблема ветеринарной медицины. *Ветеринария*, 2015, 1:3—10.
6. Глухова Т. Н., Чеснокова Н. П., Рогожина И. Е., Сергеева О. Н. Современные представления о патогенезе гестоза как совокупности типовых патологических процессов и патологических состояний, осложняющих течение беременности // Научное обозрение. Медицинские науки. — 2016. — № 2. — С. 12—32.
7. Скориков В. Н. Некоторые показатели системы пол-аоз у коров с физиологическим и осложненным течением беременности и послеродового периода / Скориков В. Н., Михалев В. И., Ермолова Т. Г. // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2021, 4 (17). — С. 54—64.
8. Нежданов А. Г. Клинико-гематологический и биохимический статус коров при гестозе. / А. Г. Нежданов, М. И. Рецкий, Ю. Н. Алехин, В. А. Сафонов, В. И. Шушлебин, Н. Е. Папин, Т. П. Брехов и Е. В. Шишкина // Сельскохозяйственная биология, 2010, № 4. — С. 118—123.
9. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и терапии гепатопатий у крупного рогатого скота / Ю. Н. Алехин, С. В. Шабунин., М. И. Рецкий, Г. Н. Близначева, И. Р. Сидельникова, Д. Б. Чусов, И. А. Никулин, Б. В. Уша, И. А. Шкуратова. — Воронеж, 2009. — 88 с.
10. Методические рекомендации по диагностике и терапии гестоза у молочных коров и свиноматок / А. Г. Нежданов, С. В. Шабунин, В. Д. Мисайлов, В. Н. Коцарев, Ю. Н. Алехин, М. И. Рецкий, В. И. Михалев, С. М. Сулейманов, Г. Н. Близначева, В. А. Сафонов, Т. П. Брехов, Н. А. Горохов, Е. В. Шишкина,

Д. А. Ерин, С. В. Чупрын, Л. В. Растриженкова, В. Ю. Боев. — Воронеж, 2009. — 32 с.

11. Методы диагностики перинатальной патологии у крупного рогатого скота / Ю. Н. Алехин: методическое пособие. — Воронеж, 2013. — 25 с.

12. Алехин Ю. Н. Эндогенные интоксикации у животных и их диагностика. Методические рекомендации. Воронеж: ГНУ ВНИВИПФиТ, 2000.

13. Гржибовский А. М. Выбор статистического критерия для проверки гипотез // Экология человека. 2008. № 11. — С. 48—57.

14. Тихова Г. П. Расчет и интерпретация относительного риска и других статистических параметров, полученных из четырехпольной таблицы частот. Регионарная анестезия и лечение острой боли. 2012; 6(3): 69—75.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ю. Н. Алехин — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;

П. А. Паршин — доктор ветеринарных наук, профессор;

О. С. Попова — кандидат ветеринарных наук, доцент;

А. Ю. Лебедева — младший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 13.03.2023 г.

## AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION, DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

Original article

UDC 57.021:615.065

### INCIDENCE STRUCTURE OF COWS (HEIFERS) IN THE THIRD TRIMESTER OF GESTATION AND SIGNIFICANCE OF GESTOSIS IN ITS FORMATION

Yuriy Nikolaevich Alekhin\*✉, Pavel Andreevich Parshin\*, Olga Sergeevna Popova\*\*,  
Anastasiya Yuryevna Lebedeva\*

\*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology  
and Therapy, Voronezh, Russia, exterapi@yandex.ru✉

\*\*St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia

**Abstract.** To study the incidence structure of the third trimester pathology of gestation, there were examined heifers ( $n = 225$ ) and cows ( $n = 507$ ) with a period before calving and 60 days after. The overall incidence of animals during the third trimester of gestation was 37.2 %, while mononosology was observed in 13.0 %, and polynosology in 24.2 % of the examined animals, respectively. Gestosis was diagnosed in 12.4 % of all examined animals. At the same time, gestosis was stated as mononosology in 1.6 % and in combination with other pathologies in 10.8 % of animals. This pathology can occur both in healthy animals and against the background of already existing diseases; in practice, these are mainly diseases of the liver, kidneys and blood system. At the same time, an unfavorable anamnesis significantly increases the risk of gestosis development, and the severity of the course and its outcome largely depend on the presence and severity of comorbidities. It has been revealed that gestosis is involved in the formation of a complex multilevel pathophysiological intersystem integration in the body, which underlies the comorbid pathology development.

**Keywords:** cows, heifers, gestation, incidence structure, comorbidity, gestosis, extragenital pathology

#### INTRODUCTION

Animal health is the main factor limiting the level of their productivity and the efficacy of targeted investments. At the same time, pathologies resulting from metabolic disorders in the mother-placenta-fetus system, one of the manifestations of which is gestosis are of particular economic importance [1—4]. Despite the obvious achievements in the field of studying the pathogenesis, diagnosis and prevention of gestosis, this problem is progressing, which is probably due to the intensification of cattle breeding, which is accompanied by an increase in the functional load on the animal body with a corresponding risk of morphological and functional disorders of the mother-placenta-fetus system [5]. There is an obvious need to expand the interpretation of gestosis pathogenesis and search for new approaches to solving this problem. One of the promising areas of scientific research is based on the fact that the cardinal symptom of toxicosis of pregnant an-

imals is multiple organ failure, i. e., this pathology has a polymorbid character [6—8]. To develop an appropriate innovative approach, it is necessary to expand our knowledge of the incidence structure of pregnant animals and the mechanisms of formation of the comorbid profile of perinatal pathology. To develop an appropriate innovative approach, it is necessary to expand our knowledge of the incidence structure in pregnant animals and the formation mechanisms of the comorbid profile of perinatal pathology.

The objective of the work was to study the incidence structure of the heifers and cows in the third trimester of gestation and to assess the role of gestosis in its formation.

#### MATERIAL AND METHODS

In order to study the structure of pathological states of pregnant animals of the third trimester, an in-depth medical examination of cows was carried out at 12 ag-

ricultural enterprises specializing in milk production and located in Belgorod, Voronezh, Lipetsk and Pskov regions. The surveyed farms contain animals of the most common breeds in these regions of the Russian Federation: Red-Motley and Holstein Black-Motley. From November 15, 2021 to February 25, 2022, 732 animals, including 225 heifers and 507 cows with a gestational age of 7 months, were subjected to a comprehensive examination, which was then repeated at an interval of 10 days before calving. In order to assess the clinical significance of gestosis, in addition to examination during gestation, clinical observation was maintained for another 60 days after calving.

During the examination of animals, traditional clinical and instrumental research methods were used. Laboratory studies of blood, urine, and rumen contents were carried out at BelTL FSBI "Federal Center for Animal Health" (FGBI "ARRIAH") (Belgorod), FSBEI HE "SPbSUVM" (St. Petersburg) and FSBSI "ARVRIPP&T" (Voronezh). To reduce the risk of clinical error, a commission examination was conducted with the participation of veterinary specialists with at least 3 years of experience and researchers of a narrow specialization, and also the relevant methodological literature was used [9–12]. Differentiation of most diseases was carried out on the basis of specific clinical symptoms or syndromes, but when anemia, gestosis, pathology of the liver, kidneys and forestomach were detected, the results of instrumental studies and laboratory analysis of the biomaterial were also taken into account. Thus, the presence of gestosis was noted with a combination of edema, increased protein content in the urine ( $\geq 0.3$  g/L), systolic ( $\geq 135.0$  mm Hg) and diastolic ( $\geq 55.0$  mm Hg) blood pressure. Hepatosis was diagnosed in cows with elevated levels of total bilirubin ( $\geq 18.0$   $\mu$ M/L), cholesterol ( $\geq 5.5$  mM/L), aspartate aminotransferase activity in the blood ( $\geq 100.0$  U/L), alanine aminotransferase ( $\geq 40.0$  U/L), gammaglutamine transferase ( $\geq 25.0$  U/L, alkaline phosphatase ( $\geq 200.0$  U/L) and sorbitol dehydrogenase ( $\geq 1.5$  U/L). Kidney disease was indicated by the presence of bacteriuria in non-centrifuged urine (nitrites  $\geq 1.6$  mM/L), an increased level of leukocytes ( $\geq 10.0$  cells/ $\mu$ l), erythrocytes ( $\geq 5.0$  cells/ $\mu$ l), an increase in the blood concentration of creatinine ( $\geq 150.0$   $\mu$ M/L) and/or a change in the ratio of urea nitrogen and creatinine ( $\geq 100$  or  $\leq 40$ ). The presence of anemia was stated with a decrease in blood levels of hematocrit ( $\leq 25.0$ ), hemoglobin ( $\leq 85.0$  g/L) and cellular hemoglobin content ( $\leq 16.0$  pg). Violation of the rumen functions with an acidotic tendency was diagnosed with a decrease in the frequency of rumen contractions ( $< 2.0/2$  min),

the pH value ( $\leq 5.0$  units) and the number of ciliates ( $\leq 80.0$  ths/ml), but an increase in the content of medium-weight molecules ( $\geq 2.0$  c. u.) in the rumen contents. In case of osteodystrophy, in addition to the corresponding clinical signs, a decrease in blood calcium ( $\leq 1.8$  mM/L) and an increase in alkaline phosphatase activity ( $\geq 200.0$  U/L) were observed. The presence of ketosis was indicated by an increased level of ketone bodies in the blood ( $\geq 0.08$  g/L) and urine ( $\geq 0.06$  g/L).

The results of the examination of animals were subjected to statistical processing, within which the proportion (%) of a specific pathology in the analyzed sampling was determined. The analysis of the clinical significance of gestosis was carried out using statistical risk assessment methods with the calculation of the relative risk, its range and reliability.

### STUDY RESULTS AND DISCUSSION

The incidence structure of cows (heifers) in the third trimester of gestation is presented in Table 1, from the data of which it can be seen that the overall incidence of animals was 37.2 %, while mononosology was observed in 13.0 % of all examined or in 34.9 % of sick animals, and polynosology in 24.2 % and 65.1 %, respectively. In heifers, the overall incidence was 29.8 %, one pathology was diagnosed in 43.3 % of sick animals. At the same time, anemia (13.4 % of all sick animals), diseases of the respiratory organs (9.0 %) and liver (9.0 %) are most common. 56.7 % of heifers had several independent diseases. Among the most common combinations, respiratory diseases + anemia + hepatosis (11.9 % of all sick animals), hepatosis + gestosis (10.4 %), anemia + hepatosis (7.5 %) and kidney diseases + gestosis (7.5 %). In cows aged 3.0 to 8.5 years during the cow drying off period (7 months of gestation), the overall incidence was 40.4 %. At the same time, mononosology was diagnosed in 31.2 % of sick animals. They most often had liver diseases (6.8 % of all sick animals), anemia (5.4 %), diseases of the forestomach (4.4 %) and gestosis (3.9 %), less often respiratory (3.4 %) and heart diseases (2.9 %). A comorbid pathology profile was noted in 67.8 % of sick animals, in which the combination of anemia + hepatosis (17.0 % of all sick animals), hepatosis + gestosis (11.2 %), hepatosis + gestosis + anemia (8.8 %), gestosis + hepatosis + kidney diseases (7.8 %) and anemia + heart diseases (7.3 %) were most often noted.

Gestosis was diagnosed in 12.4 % of all examined animals. This pathology was stated as mononosology in 1.6 % and in combination with other pathologies in 10.8 % of animals. Gestosis was diagnosed in 10.2 % of all examined heifers and in 34.3 % of the number

of sick animals. In the form of monopatology, gestosis was noted in 1.8 % of all heifers and 6.0 % of the number of sick animals, and in combination with other diseases in 8.4 and 28.4 % of animals, respectively. In cows, the overall incidence of gestosis was 13.4 %.

The share of pathology in the incidence structure was 33.2 %, while as a separate pathology it was diagnosed in 1.6 % of all examined and in 3.9 % of sick animals, and its combination with other diseases was observed in 11.8 and 29.3 %, respectively.

Table 1

Results of a clinical examination of heifers and cows with a gestational age of 7–9 months

Health status	Heifers (n = 225)	Cows (n = 507)
Clinically healthy, animals	158	302
Total number of sick animals	67	205
Incidence structure		
Mononosology, animals		
Liver disease (hepatosis)	6	14
Gestosis	4	8
Osteodystrophy	0	5
Respiratory diseases (emphysema, bronchitis, pneumonia)	6	7
Anemia	9	11
Heart disease (myocardosis, myocardiofibrosis)	0	6
Diseases of the forestomach (ruminal acidosis, hypotension of the forestomach)	2	9
Kidney diseases (nephritis, nephrosis, urocystitis)	2	3
Other pathologies	1	3
Polynosology		
Respiratory diseases, hepatosis and anemia	8	9
Respiratory and kidney diseases	4	5
Anemia and hepatitis	5	35
Hepatosis and gestosis	7	23
Hepatosis, gestosis and anemia	4	18
Anemia, heart disease	0	15
Kidney diseases (nephritis, nephrosis, urocystitis), gestosis	5	3
Kidney diseases (nephritis, nephrosis, urocystitis), hepatosis and gestosis	3	16
Diseases of the forestomach (ruminal acidosis, hypotension of the forestomach), hepatosis	2	11
Other combinations	0	4

The results of a retrospective analysis of the state of animals during the observation period are presented in Table 2, from the data of which it can be seen that during gestation complicated by gestosis, the incidence of ketosis increases by 9.6 times. In the future, these

animals are by 11 times more likely to have pathological calvings, and in the first two months of lactation, the risk of death is by 35.4 times higher, the risk of developing gynecological and orthopedic diseases is by 11.4 and 9.3 times higher, respectively.

**Table 2**

*Results of a retrospective analysis of the clinical significance of gestosis in heifers and cows with a gestational age of 7–9 months*

State of health / number of animals	Total, animals	Physiological state								
		Gestation 7–9 mths			Calving		Lactation, d 0–60			
		N	K	Da	N	CP	N	GP	OII	Da
Clinically healthy	460	451	9	0	450	10	430	18	11	1
Animals with gestosis	91	74	16	1	54	36	23	40	20	7
Structure of the incidence of gestosis (according to the underlying disease)										
Gestosis	12	11	1	0	9	3	8	4	0	0
Liver diseases (hepatosis) and gestosis	30	25	5	0	19	11	11	12	5	2
Hepatosi s, gestosis and anemia	22	18	4	0	11	11	0	13	7	2
Kidney diseases (nephritis, nephrosis, urocystitis), gestosis	8	7	1	0	6	2	4	3	1	0
Kidney diseases (nephritis, nephrosis, urocystitis), liver and gestosis	19	13	5	1	9	9	0	8	7	3
Comparable variants of the nosological structure										
Hepatosi s	20	18	2	0	18	2	15	2	3	0
Anemia	20	20	0		19	1	16	0	4	0
Anemia and hepatosis	40	37	5	0	30	10	15	12	12	1

**Note.** K — ketosis, Da — death of the animal, N — normal, healthy, GP — gynecological pathology (metritis, uterine subinvolution), CP — calving pathology (retained placenta, disordinated labor activity), OP — diseases of the distal portion of the limbs (pododermatitis, Mortellaro disease)

It should be noted that the role of gestosis depends on the presence and nature of comorbidities. So in the sick animals with gestosis alone, there were no significant changes in the clinical status during gestation, but during calving, 25 % of them had pathological calving in the form of retained placenta (16.7 %) and prolonged calving (8.3 %).

In 33.3 % of newly calved animals, the development of metritis and uterine subinvolution was noted. At the same time, in 25 % of cases this is a conse-

quence of a labor activity failure, but in 8.3 %, there was probably a negative effect of gestosis.

Gestosis in combination with other diseases had a more pronounced effect on the clinical state of animals. So in comparison with uncomplicated gestosis, the incidence of ketosis increases when it is combined with hepatosis by 2 times, in case of kidney diseases — by 50.6 %, in case of hepatosis and anemia — by 2.2 times, and in case of anemia, liver and kidney diseases — by 3.2 times.

The number of pathological calvings in animals undergoing comorbid gestosis is by 2.0 times higher than after its uncomplicated form. The combination of gestosis with hepatosis increases the incidence of metritis and uterine subinvolution by 20.1 %, in case of hepatosis and anemia — by 77.5 %, in case of kidney diseases — by 12.6 %, in case of liver and kidney diseases — by 33.3 %.

The incidence of limb diseases in cows that suffered comorbid gestosis is significantly higher than after an uncomplicated form of this pathology. However, the same high incidence was noted in the animals with anemia and hepatosis. Therefore, there is no reason to state the role of gestosis in the development of orthopedic pathology, the risk of its occurrence increases in the presence of anemia and hepatosis.

In our experiment, we did not observe deaths in case of uncomplicated gestosis. However, the risk of death increased in the sick animals with comorbid pathology, in particular, in the animals that had gestosis complicated by hepatosis and anemia.

Our results have shown that heifers and cows at the beginning of the third trimester of gestation have a different initial state of health, against the background of

which gestosis develops in some of them that is a risk factor for the occurrence of “new” pathologies during gestation, calving and the first months of lactation.

However, the hypothesis that the occurrence of an additional pathology negatively affects the clinical state of the sick animal is beyond doubt, but the presented formulation does not give us any information about the degree of probability of new diseases manifestation and, accordingly, there is no justification for therapeutic or preventive actions. Therefore, the populations were compared by qualitative characteristics — the relative risk was calculated with a 95 % confidence interval [13].

Based on the data on the incidence structure, four-field tables of contingency of dichotomous signs were formed. At the same time, the risk factor in all calculated cases was gestosis, the differential factor was the presence or absence of “new” pathologies (new signs).

Table 3 shows an example of the construction of linked features. At the same time, having chosen the presence or absence of ketosis during gestation as a differential sign, we have two samples: A — sick animals with complicated and uncomplicated gestosis, B — clinically healthy, C — ketosis, D — no ketosis.

**Table 3**

*Indicators of linked features for calculating the relative risk of ketosis in the animals with uncomplicated and complicated gestosis*

The presence or absence of a risk factor (gestosis)	Presence or absence of an additional clinical state (ketosis)	
	C. Presence of ketosis	D. No ketosis
A. Presence of a risk factor (animals with gestosis)	17	73
B. No risk factor (healthy)	9	451

After calculations, it has been found that the relative risk (RR) of ketosis in the animals with gestosis (complicated and uncomplicated) is  $9.65 \pm 0.396$ , i. e., by 9.65 times higher than in healthy pregnant animals. The confidence interval (CI) was 4.44–20.97, which indicated a significant statistical (clinical) significance ( $p \leq 0.05$ ) and confirmed the high probability of a new pathology (ketosis) development in the presence of a risk factor (gestosis). The relative risk of calving pathology and gynecological diseases in the animals with non-differentiated gestosis was  $18.40 \pm 0.338$  and  $12.29 \pm 0.258$ , respectively, and the confidence interval was 9.480–35.714 and 7.418–20.358, which indicated a significant statistical (clinical) significance ( $p \leq 0.05$ ) and confirmed the high probability of these

pathologies development in the presence of a risk factor (gestosis). The probability of death of cows, which underwent gestosis, during the first 60 days of lactation was by 35.7 times higher ( $RR = 35.70 \pm 1.063$ ) than among animals after uncomplicated gestation. The significance level of the studied effect corresponds to  $p < 0.05$ , since the confidence interval does not include unity [14].

The relative risk of ketosis development in the animals with a combination of gestosis and hepatosis was  $1.67 \pm 0.785$ , i. e., by 1.67 times higher than in the animals with only liver pathology. However, the confidence interval (0.358–7.768) includes unity, which indicates an unreliable ( $p \geq 0.05$ ) level of statistical dependence. Close values of the relative risk

(1.53 ± 0.617), confidence interval (0.456—5.119) and significance ( $p \geq 0.05$ ) with a corresponding low level of clinical significance were obtained when assessing the role of gestosis in the development of ketosis, if present in the animals with the combination of hepatitis and anemia.

In the animals that suffered complicated gestosis, it has been found that the occurrence of this pathology in the animals with hepatitis is by 1.46 times (RR = 1.467 ± 0.364) higher than the probability of pathological calving. However, this relationship was not significant ( $p \geq 0.05$ ), since 95 % CI (0.718—2.994). In the sick animals which were diagnosed with a combination of gestosis, hepatitis and anemia, the relative risk was 2.00 ± 0.347, and CI was 1.013—3.949, which indicated a significant ( $p \leq 0.05$ ) clinical significance of gestosis in the development of calving pathology in the animals with the indicated comorbid disease profile.

The probability of gynecological diseases occurrence in the animals that were previously diagnosed with a combination of gestosis with hepatitis and with hepatitis and anemia was significantly higher ( $p \leq 0.05$  %) by 4.29 (RR = 4.29 ± 0.705, CI 1.075—17.080) and 2.11 (RR = 2.11 ± 0.291, CI 1.195—3.736) times, respectively, than in the animals without gestational toxicosis.

During the first 60 days of lactation, the risk of worsening the clinical state and death of cows with anemia and hepatitis was higher, if they had gestosis during gestation in addition to these pathologies. However, despite the fact that the relative risk index in these animals was 3.64 ± 1.196, the range of its boundaries was in the range from 0.349 to 37.880, i. e., the effect of gestosis on the risk of an unfavorable outcome in the animals with anemia and hepatitis was not significant ( $p \geq 0.05$ ).

Thus, our data showed that in the third trimester of gestation in heifers and cows, the overall incidence was 37.2 %, with the most common liver diseases (21.6 %), anemia (15.6 %), gestosis (12.4 %), nephropathy (5.6 %) and dysfunction of the forestomach (3.3 %). In most cases, the pathology proceeds in a comorbid form. Gestosis in combination with other diseases occurs 6.6 times more often than in the form of a separate pathology. Its combinations with anemia, diseases of the liver and kidneys are most widespread. At the same time, the presence of gestosis in heifers and cows, healthy and sick animals with anemia and/or hepatitis, increases the likelihood of ketosis during gestation, during calving — pathology of calving (retained placenta, disordinated labor activ-

ity), during the first 60 days of lactation — gynecological pathology (metritis, uterine subinvolution) and death of animals.

After analyzing the data obtained using risk assessment methods, the clinical significance of gestosis as a factor determining the likelihood of secondary pathologies was clarified. It has been shown that the risk of ketosis development against the background of complicated and uncomplicated gestosis, as well as the pathology of calving and gynecological diseases in the cows that have previously suffered gestosis is significantly higher than in healthy animals.

The presence of anemia in heifers and cows at the beginning of the third trimester of gestation, and its combination with liver pathology, has a significant effect on the risk of these secondary pathologies development. The occurrence of gestosis in these animals significantly increases the risk of gynecological diseases development, and in the animals with a combination of anemia and hepatitis, calving pathology is more common. The reliability of the clinical significance of toxicosis of pregnant animals in the pathogenesis of ketosis against the background of anemia and liver pathology, as well as in the occurrence of pathology of calving in the animals with hepatitis, was not confirmed.

Despite the revealed effect of both “pure” and complicated gestosis on the clinical state of pregnant animals, we did not reveal a significant increase in the risks of their death. There was also no thanatological significance of the previous gestosis in cows after calving, although after its comorbid form, mortality was 7.7 %, while this indicator among the animals with only anemia and hepatitis was 1.25 %.

The results of statistical processing of indicators of the incidence structure of gestosis showed a different level of its clinical significance in the occurrence of secondary pathologies of gestation, calving and the postpartum period. However, in all analyzed variants, the effect of toxicosis took place. Therefore, we calculated the integral clinical significance. The risk factor was the presence or absence of a comorbid profile of gestosis. Comparable samples consisted of groups with or without secondary pathologies (Table 2). The calculation results showed that in cases of a comorbid profile of gestosis, the risk of ketosis during gestation and pathology of calving, and in the postpartum period of gynecological and orthopedic diseases, as well as the threat of worsening the clinical state and death of animals was by 1.874 times higher than in the animals with uncomplicated gestosis (RR = 1.874 ± 0.314, CI 1.013—3.469,  $p \leq 0.05$ ).

## CONCLUSION

Researches have been carried out to study the prevalence and forms of gestosis manifestation in cows. It has been shown that this pathology can occur both in healthy animals and against the background of already existing diseases; in practice, these are mainly diseases of the liver, kidneys and blood system. At the same time, an unfavorable anamnesis significantly increases the risk of gestosis, and the severity of the course and its outcome largely depend on the presence and severity of comorbidities. In turn, the development of “late” toxicosis against the background of anemia and liver disease increases the risk of secondary pathologies during gestation, such as ketosis, and long-term consequences in the form of obstetric and gynecological diseases. It is obvious that gestosis is involved in the formation of a complex multilevel pathophysiological intersystem integration, the study of the processes of the occurrence of which is a promising area of veterinary science. So, by identifying the mechanism of intersystem pathogenetic integration and leveling them, the risk of gestosis generalization, progression of previously existing and the emergence of new (secondary) diseases will decrease.

## REFERENCES

1. D'Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G. 2019. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: a review. *Theriogenology*. 125:277—284.
2. Michael J. D'Occhio, Pietro S. Baruselli & Giuseppe Campanile (2019) Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review, *Italian Journal of Animal Science*, 18:1, 858—867, DOI: 10.1080/1828051X.2019.1600385
3. Rook J. S. Pregnancy toxemia of ewes, does, and beef cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2000, 16(2): 293—317 (DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30107-9)
4. Pereryadkina S. P. Angiogenesis of the bovine placenta in case of gestosis of pregnant animals / S. P. Pereryadkina [et al.] // *Izvestiya Nizhnevolzhskogo agrouniversitetskogo kompleksa: nauka i vysshee professionalnoe obrazovanie* (Proceedings of the Nizhnevolzhskiy agrouniversity complex: science and higher professional education). — 2016. — No. 2 (42). — P. 170—176.

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- Yu. N. Alekhin** — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;  
**P. A. Parshin** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor;  
**O. S. Popova** — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;  
**A. Yu. Lebedeva** — Junior Scientific Associate.

The article was submitted 13.03.2023.

5. Shabunin S. V., Alekhin Yu.N., Nezhdanov A. G. Perinatal pathology in cattle is an actual problem of veterinary medicine. *Veterinariya (Veterinary medicine)*, 2015, 1: 3—10.

6. Glukhova T. N., Chesnokova N. P., Rogozhina I. E., Sergeeva O. N. Modern ideas about the gestosis pathogenesis as a set of typical pathological processes and pathological states that complicate the course of gestation // *Nauchnoe obozrenie. Meditsinskie nauki. (Scientific Review. Medical Sciences)*. — 2016. — No. 2. — P. 12—32.

7. Skorikov V. N. Some indicators of the LPO-AOD system in cows with physiological and complicated course of gestation and postpartum period / Skorikov V. N., Mikhailov V. I., Ermolova T. G. // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2021, 4 (17). — P. 54—64.

8. Nezhdanov A. G. Clinical-hematological and biochemical status of cows with gestosis. / A. G. Nezhdanov, M. I. Retskiy, Yu.N. Alekhin, V. A. Safonov, V. I. Shushlebin, N. E. Papin, T. P. Brekhov and E. V. Shishkina // *Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology)*, 2010, No. 4. — P. 118—123.

9. Methodical recommendations for the diagnosis, prevention and treatment of hepatopathies in cattle / Yu.N. Alekhin, S. V. Shabunin., M. I. Retskiy, G. N. Bliznetsova, I. R. Sidelnikova, D. B. Chusov, I. A. Nikulin, B. V. Usha, I. A. Shkuratov. — Voronezh, 2009. — 88 p.

10. Methodical recommendations for the diagnosis and treatment of gestosis in dairy cows and sows / A. G. Nezhdanov, S. V. Shabunin, V. D. Misaylov, V. N. Kotsarev, Yu.N. Alekhin, M. I. Retskiy, V. I. Mikhailov, S. M. Suleymanov, G. N. Bliznetsova, V. A. Safonov, T. P. Brekhov, N. A. Gorokhov, E. V. Shishkina, D. A. Erin, S. V. Chupryn, L. V. Rastrizhenkova, V. Yu. Boev. — Voronezh, 2009. — 32 p.

11. Methods for diagnosing perinatal pathology in cattle / Yu.N. Alekhin: methodological guide. — Voronezh, 2013. — 25 p.

12. Alekhin Yu.N. Endogenous intoxications in animals and their diagnosis. Methodical recommendations. Voronezh: GNU VNIVIPFiT (SSI ARVRIPP&T), 2000.

13. Grzhibovskiy A. M. Choice of a statistical criterion for testing hypotheses // *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2008. No. 11. — P. 48—57.

14. Tikhova G. P. Calculation and interpretation of relative risk and other statistical parameters obtained from the four-field frequency table. *Local anesthesia and treatment of acute pain*. 2012; 6(3): 69—75.

Научная статья

УДК 619:615.21/.26:617.5

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.76

## АКТУАЛЬНОСТЬ РАЗРАБОТКИ КОМБИНИРОВАННОГО РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ И ЕГО ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ

Алина Андреевна Парфенюк<sup>✉</sup>, Абдулмуталип Магаметович Сампиев,  
Марина Петровна Семеновна, Ксения Андреевна Семеновна

*Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии,  
Краснодар, Россия, e-mail: sever291@mail.ru<sup>✉</sup>*

**Аннотация.** Зарегистрированные ранозаживляющие средства для ветеринарного применения составляют крайне незначительную долю в общем ассортименте препаратов — всего 2,2 %, с преобладанием внутри этой фармакотерапевтической группы монопрепаратов с ограниченными возможностями воздействия на многозвеньевой раневой процесс. При этом преобладающим и востребованным видом лекарственной формы для ранозаживляющих препаратов служит мазь (почти 32 %). В статье показаны актуальность, преимущества и целесообразность разработки комбинированного препарата в виде мази с полифункциональными свойствами на основе веществ природного и синтетического происхождения и потенциально способных воздействовать одновременно на многие патогенетические звенья раневого процесса. Представлены наиболее перспективные для включения в состав разрабатываемого препарата активные компоненты — носители антимикробных, противовоспалительных, некролитических, антиоксидантных, регенерирующих свойств. Для отдельных видов растительного сырья, используемого в качестве компонентов разрабатываемой мази и не представленного фармацевтическими субстанциями, предварительно были получены экстракты.

**Ключевые слова:** рана, ранозаживляющие средства, комбинированный препарат, мазь, экстракт, растительное сырье, биологически активные вещества

Одним из актуальных направлений в ветеринарной фармакологии является создание и внедрение доступных и высокоэффективных отечественных средств для лечения распространенных среди животных заболеваний. Анализ статистического материала показал, что в структуре заболеваемости как сельскохозяйственных, так и мелких домашних животных, значимое место занимают повреждения отдельных частей тела, приводящие к нарушению целостности анатомических структур в виде ран. Так, при общем уровне травматизма сельскохозяйственных животных, на раны приходится до 40 %, а среди дерматологических заболеваний, раневые патологии составляют 10—13 % [1].

По своей этиологии типы ран очень разнообразны: резаные, колотые, рубленые, ушибленные, размозженные, рваные, скальпированные, укушенные, отравленные, огнестрельные (пулевые, осколочные) и другие [2].

Для создания ранозаживляющих лекарственных средств, характеризующихся широким спектром фармакологического действия на разные звенья раневого процесса, важно понимание закономерностей регенерации ран у животных [3].

Раны, являясь сложной биологической системой, проходят в своем развитии определенные фазы: I — фаза воспаления, подразделяемая на период сосудистых изменений и период очищения раны от некротических тканей; II — фаза регенерации, образования и созревания грануляционной ткани; III — фаза реорганизации рубца и эпителизации [4].

Задачами лечения в I фазе раневого процесса являются отторжение некроза, эвакуация раневого отделяемого, улучшение трофики тканей, борьба с инфекцией. На этом этапе следует применять средства, обладающие гидрофильными, некролитическими, антибактериальными свойствами.

Задачами лечения во II фазе раневого процесса являются борьба с инфекцией, защита грануляций, стимуляция репаративных процессов. В III фазе раневого процесса необходимо стимулировать процессы репарации и эпителизации. При появлении признаков перехода раневого процесса в третью фазу используются репаративные средства с незначительной осмотической активностью [5].

Раны не только снижают качество жизни животного, сопровождаясь такими симптомами, как боль, ограничение подвижности отдельных частей тела, но и опасны такими осложнениями, как острая кровопотеря, травматический шок, глубокие повреждения жизненно важных органов, вторичное инфицирование или инфекционные осложнения [6].

Все случайно полученные раны являются первично бактериально загрязненными. В этой связи, при фармакокоррекции раневой инфекции ветеринарные специалисты преимущественно используют химиотерапевтические средства, как местного, так и системного действия. Однако препараты, имеющиеся в арсенале государственного реестра лекарственных средств для ветеринарного использования, имеют узкий спектр применения. Так, гипертонические растворы или однокомпонентные сорбенты обладают хорошими сорбционными свойствами, но незначительным антимикробным действием. Напротив, антибиотики и антисептические препараты, с высокими антимикробными свойствами, не обладают осмотическим или некролитическим действием. При этом клинический поиск фармакологических средств должен осуществляться не только по оптимальному составу препаратов, но и по их лекарственным формам. Препараты в виде мягких лекарственных форм (мази) имеют меньше побочных эффектов, в том числе системного характера, благодаря чему, их чаще выбирают для лекарственной терапии [7].

В связи с вышперечисленным, целью настоящего исследования явилось обоснование целесообразности разработки потенциально перспективного состава нового комбинированного ранозаживляющего средства для животных, в том числе на основе маркетинговых исследований рынка ветеринарных препаратов соответствующей фармакотерапевтической группы.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения мониторинга имеющихся на рынке ранозаживляющих лекарственных средств использованы справочники официальной инфор-

мации: Государственный реестр лекарственных средств для ветеринарного применения, VIDAL ветеринария, данные об ассортименте лекарственных средств в ветеринарных аптеках г. Краснодара. Обработка данных производилась с помощью пакета программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016.

Методы исследования: анализ современных источников научной литературы по фармакологии природных и синтетических компонентов, маркетинговые исследования, контент-анализ, структурный, сравнительный, графический, методы статистического и математического анализов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Маркетинговым исследованием рынка ветеринарных препаратов в Российской Федерации, включенных в Государственный реестр лекарственных средств ветеринарного применения, установлено 47 зарегистрированных ранозаживляющих лекарственных препаратов для внутреннего и наружного применения, что составляет 2,2 % от всех зарегистрированных ветеринарных препаратов в РФ.

Сегментация рынка лекарственных средств для лечения ран у животных представлена производителями из 7 стран и включает 19,1 % импортных препаратов (рис. 1).

Несмотря на значительную долю лекарственных средств отечественных производителей (80,9 %), емкость рынка ранозаживляющих препаратов, в целом, остается низкой. На рынке ветеринарных ранозаживляющих препаратов преобладают монокомпонентные средства преимущественно синтетического происхождения (82,9 %). Препараты обладают узким спектром действия и ограничиваются отдельными терапевтическими эффектами: антимикробным, антисептическим, противовоспалительным или репаративным (табл. 1).

Установлено, что наиболее популярной и востребованной в ветеринарной практике лекарственной формой являются мази (31,9 %) (рис. 2).

Такая форма характеризуется удобством режима применения, высокой высвобождаемостью активных веществ, простотой нанесения, длительностью сроков хранения. Активные компоненты из мази, являющейся лекарственной формой для наружного применения, в незначительном количестве попадают в кровоток и всасываются в организм животного. Это позволяет снизить масштабы возниконовения и распространения устойчивости животных к противомикробным препаратам, а также

обеспечить безопасность производства пищевых продуктов (мяса, молока), если речь идет о применении ранозаживляющих средств в промышленном животноводстве. Более того, местная аппликация препарата более эффективна, чем общее

системное воздействие при лечении ран. В этой связи, целесообразна разработка нового, обладающего разносторонним терапевтическим воздействием лекарственного ранозаживляющего средства именно в форме мази.

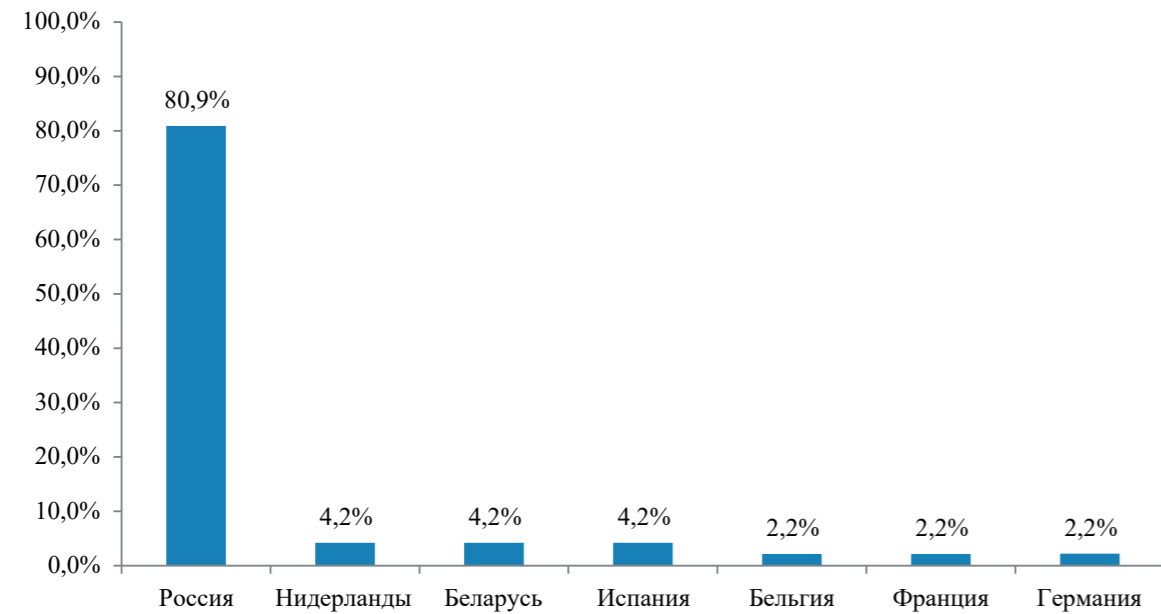


Рис. 1. Страны-производители лекарственных средств для лечения ран у животных, представленные на рынке РФ

Таблица 1

Ранозаживляющие препараты в РФ, включенные в Государственный реестр лекарственных средств для ветеринарного применения

Международное непатентованное наименование активного компонента	Частота встречаемости активного компонента в готовых лекарственных средствах	Примеры торговых наименований
1	2	3
Хлоргексидин	4	Касептурин, Гексидерм, Шампунь хлоргексидиновый, ОКВЕТ® Шампунь лечебный с хлоргексидином
Йод	1	Раствор йода спиртовой 5 %
Цинка оксид	1	Мазь цинковая 10 %
Диоксометилтетрагидро-пиримидин, хлорамфеникол	3	Мазь «Левомеколь», Мазь «Левомеколь-вет», Мазь Левомеколь
Фармайод	1	Мазь фармайодная® антисептическая
Протеолитический ферментный комплекс	1	Имозимаза
Тополь черный	2	Гемпотин, гемпотин

Окончание табл. 1

1	2	3
Бензилпенициллин	1	Пеникел 15 + 15 ЛА
Энрофлоксацин	1	Неофлорек таблетки
Бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония хлорид моногидрат	1	МИСТИН®
Белково-пептидный комплекс, полученный из кондиционной среды при культивировании мезенхимальных стволовых клеток лошади	1	УльтраСелл-Хорс®
Хлортетрациклин	4	Цикло спрей, Хипратопик спрей, Чеми спрей, Фортиклин спрей
Комплекс белков, продуцируемый мезенхимными стволовыми клетками	1	Репарин-Хелпер®
Ихтиол	2	Мазь ихтиоловая 10 %, Мазь ихтиоловая 10 % и 20 %
Стрептоцид	1	Мазь стрептоцидовая
Живица сосновая	1	Пихтоин®
Масло пихтовое	1	Мазь Яхалимп®
Алюминия окись	2	Алюспрей, алюмиспрей
Фурацилин, этоний	1	Ранозоль
Софора японская, крапива двудомная	1	Сафродерм настойка
Сульфаниламид	2	Тетрацилин, Присыпка Эдис
Эхинацея пурпурная, календула	1	Травма-гель
Карбетопендециния бромид	1	Септифорт спрей
Биомасса живых бактерий	1	Биосептин
Раствор Рингера-Локка	1	Раствор Рингера-Локка
Тетрациклин, окситетрациклин	4	Мазь тетрациклиновая 3 %, Террамицин, Лимоксин-25 спрей, Террамицин аэрозоль Спрей
Мирамистин	1	МИГСТИМ®
АСД-2Ф, АСД-3Ф	2	Бальзам Дороговой®, АСД-3Ф — Антисептик-стимулятор Дорогова фракция 3
Бензилпенициллин, стрептомицин, сульфаниламид	1	Трициллин
Хлорамфеникол, метилурацил, лидокаин	3	Раносан® порошок, Раносан® мазь, Мизофен®



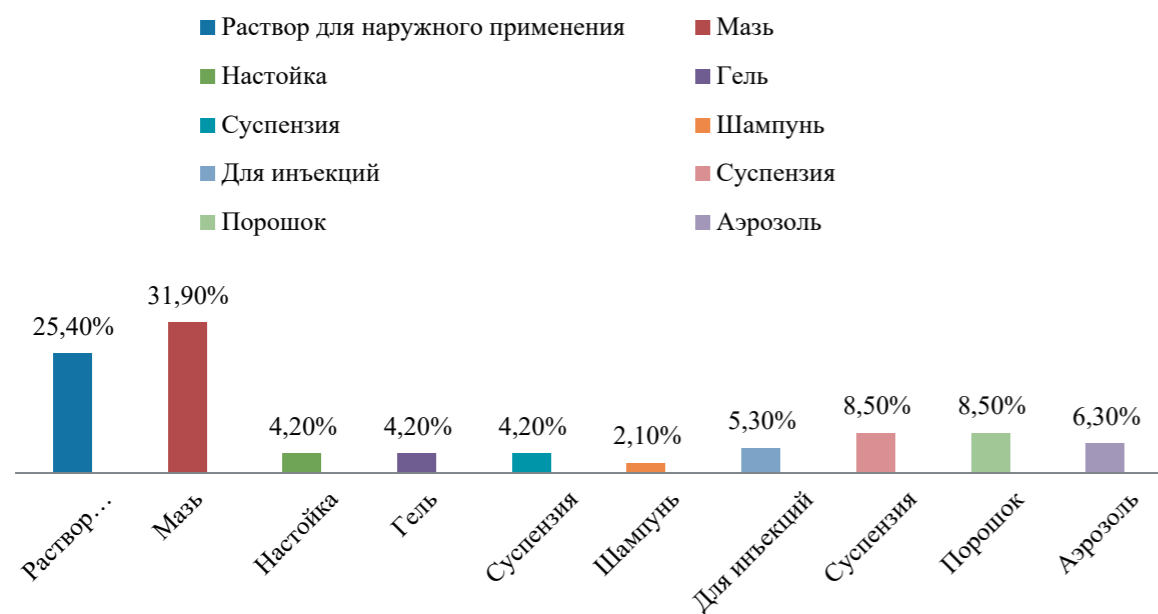


Рис. 2. Сегментирование ассортимента по лекарственным формам

Комбинированные препараты занимают в общей структуре порядка 30 % от всей группы ранозаживляющих средств. Вместе с тем, этот сегмент средств ветеринарной фармакологии должен развиваться более активно. Ведь именно комбинация сочетающихся между собой фармацевтически и фармакодинамически активных веществ может придать новому разрабатываемому лекарственному продукту полифункциональные свойства и способность воздействовать на различные звенья патологического раневого процесса.

Нами был проанализирован компонентный состав зарегистрированных ранозаживляющих средств. Анализ показал, что для производства 78,7 % лекарственных препаратов использовались синтетические компоненты, и лишь в структуре 21,3 % средств вошли натуральные компоненты растительного или животного происхождения. Вместе с тем, естественные природные соединения обладают рядом преимуществ. Так, фитопрепараты по сравнению с синтетическими лекарственными средствами, обладают мягким умеренным воздействием на организм, постепенно, но стойко развивающимся терапевтическим эффектом, имеют малое число противопоказаний, не вызывают привыкания. На данный момент известны природные соединения растительного происхождения, такие как дубильные вещества, терпеноиды, алкалоиды, флавоноиды, которые продемонстрировали антибактериальные, противовоспалительные и регенерирующие эффекты. Сырье животного

происхождения также представляет определенную ценность для ветеринарии, оказывая антикоагулирующее, противовоспалительное, противотромботическое, тромболитическое и другие виды действия. Поэтому натуральные сырьевые компоненты должны стать привлекательным сегментом для драг-дизайна ветеринарных препаратов.

Выполненный контент-анализ ассортимента зарегистрированных ветеринарных препаратов для лечения ран по производителям, лекарственным формам и составу показал, что номенклатура ветеринарных лекарственных средств при воспалительных и раневых поражениях весьма ограничена. Препараты, оказывающие комплексное воздействие на различные этапы лечения раневого процесса практически отсутствуют. Имеет место ограниченный ассортимент препаратов на основе веществ животного и растительного происхождения. При этом наиболее удобной, эффективной и востребованной лекарственной формой является мазь.

В этой связи, разработка нового лекарственного препарата, обладающего выраженным ранозаживляющим действием и сочетающего в себе комбинацию различных по своим фармакологическим свойствам и желательным видам действия компонентов, является актуальной и своевременной задачей ветеринарной фармакологии и фармации. Такой препарат, на наш взгляд, должен обладать антимикробным действием, в связи с ключевой ролью бактерий в развитии раневого процесса, про-

тивовоспалительным действием, включать в себя антиэкссудативный компонент для снятия отека, способствовать ускоренной грануляции и быстрому заживлению раны.

Для создания препарата, сокращающего сроки лечения и комплексно действующего на различные фазы раневого процесса, в отделе фармакологии Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института — обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии» был рассмотрен ряд веществ и источников их выделения растительного и животного происхождения, потенциально приемлемых для решения этой задачи.

В частности, к перспективному источнику биологически активных веществ (БАВ) можно отнести тополь черный (*Populus nigra* L.), почки которого оказывают выраженное антибактериальное действие. В рамках ряда исследований почки тополя черного были рекомендованы для использования в медицинской практике для лечения ран различной этиологии [10].

Востребованным в медицине БАВ является природный биофлавоноид дигидрокверцетин, выделяемый из коры древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb). Спектр фармакологических свойств дигидрокверцетина впечатляет, поскольку он обладает антиоксидантным, ангиопротекторным, регенерирующим, противоотечным действием. Этот биофлавоноид тормозит процессы перекисного окисления липидов клеточных мембран, препятствует их разрушению и оказывает капилляропротекторное действие [11].

В медицине известна способность БАВ плодов софоры японской (*Styphnolobium japonicum*) ускорять лечение ран. Входящий в состав плодов софоры японской рутин, как и другие биофлавоноиды, обладает обширным спектром действия, в числе которых капилляроукрепляющее и антиоксидантное. Путем связывания свободных радикалов, рутин оказывает защитное действие при повреждении тканей, может использоваться в качестве противовоспалительного средства. В этой связи, рутин может быть эффективен как регенеративное средство [12, 13].

Широким спектром терапевтического действия, представляющим интерес с точки зрения лечения ран, обладают не только БАВ растительного происхождения, но и животного. В частности, лауриновая кислота в виде липидного концентрата неко-

торых насекомых, обладает антибактериальными свойствами. Антибактериальный эффект лауриновой кислоты был протестирован со статистически положительным результатом на различных видах патогенных бактерий, поражающих растения, что позволяет предположить его эффективность и при лечении ран животных [14, 15].

Другим примером вещества животного происхождения, заслуживающим внимание в контексте рассматриваемой задачи, является желудочный фермент пепсин, обладающий высокой протеолитической активностью. Он катализирует расщепление белков и полипептидов. Благодаря этому пепсин благоприятно влияет на раневой патологический процесс, и снижает риск гнойных осложнений [16].

Наряду с перечисленными выше индивидуальными веществами или источниками получения БАВ природного происхождения, представляется оправданным включение в состав разрабатываемого комбинированного средства компонента регенерирующего действия, например, выделенного из алоэ, облепихи, мумие.

Приведенные выше и другие природные БАВ могут быть рассмотрены в качестве активных компонентов комбинированного ранозаживляющего препарата, возможно, в сочетании с синтетическими фармакологически активными ингредиентами. Среди последних наибольшую значимость могут представлять антибактериальные средства широкого спектра действия, обладающие устойчивостью к микробной резистентности. При этом не следует исключать возможность использования в составе препарата таких растительных источников БАВ с выраженными антимикробными свойствами, как эвкалипт, крапива, чистотел, шалфей, маклея, при условии отсутствия у них местно-раздражающего действия.

Вместе с тем, следует отметить, что далеко не у всех видов лекарственного растительного сырья, несмотря на всю ценность содержащихся в них БАВ, есть выпускаемые серийно и готовые к введению в лекарственную форму фармацевтические субстанции. Это обстоятельство ограничивает саму возможность рассматривать эти фитообъекты в качестве источника активного компонента в конструируемом ранозаживляющем препарате. В частности, это относится к таким значимым для включения в рассматриваемый драг-дизайн ранозаживляющего препарата видам растительного сырья, как плоды софоры и почки тополя. В этой связи, и с учетом планируемого вида лекарственной формы — мазь и удобства введения в нее ак-

тивных компонентов, из этих двух фитообъектов нами были разработаны экстракты, для чего в лабораторных условиях была применена последовательная обработка растительного сырья глицерином фармакопейного качества и рафинированном дезодорированном подсолнечным маслом для извлечения полярных и неполярных соединений.

Экспериментально установлены следующие условия и параметры проведения экстракционного процесса: способ экстрагирования — мацерация, коэффициент поглощения экстрагента — 2,3 и 2,6 (по первому экстрагенту — глицерину) для софоры и тополя, соответственно; гидромодуль по глицерину 1 : 1, по маслу — 1 : 9 для обоих фитообъектов; температура и время экспозиции с экстрагентами — плюс 50 °С и 24 часа (интенсификацией ультразвуковой обработкой с частотой 20 кГц и мощностью 250 Вт экстракционной системы в последние 10 мин. процесса). Средний выход продукта после освобождения от растительного шрота составил около 10 частей на 1 часть взятого растительного сырья, поскольку используемые экстрагенты из извлечения не удаляются.

Таким образом, с помощью двухфазной экстракции, были получены готовые к введению в мазь экстракты с широким спектром БАВ из плодов софоры и почек тополя.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный контент-анализ зарегистрированных ранозаживляющих средств выявил незначительную долю этой фармакотерапевтической группы в общем ассортименте препаратов ветеринарного применения — всего 2,2 %. Внутри ассортиментный анализ группы ранозаживляющих средств показал, что преобладающими в ней являются монопрепараты с соответствующим ограниченным спектром воздействия на многосвязанный раневой процесс. При этом установлено, что востребованным видом лекарственной формы для ранозаживляющих средств служит мазь (почти 32 %), что оправдано с точки зрения регионарности заболевания, целесообразностью локального терапевтического воздействия, низкой степени всасывания активных веществ и риска нежелательных фармакотоксикологических общесистемных проявлений.

На основании проведенного критического анализа рынка зарегистрированных для ветеринарного применения лекарственных средств ранозаживляющего действия показаны актуальность, преимущества и целесообразность разработки комбинированных препаратов, сочетающих в себе активные

вещества природного и синтетического происхождения и потенциально способных воздействовать одновременно на многие патогенетические звенья раневого процесса. К разработке комбинированного ранозаживляющего препарата представлены наиболее перспективные для включения в его состав активные компоненты — носители антимикробных, противовоспалительных, некролитических, регенерирующих и антиоксидантных свойств. При этом для отдельных видов растительного сырья, используемого в качестве компонентов разрабатываемой мази и не представленного фармацевтическими субстанциями, предварительно были получены экстракты.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Околелова А. И.* Применение препарата «Клемавет» при открытых механических повреждениях у животных с секвестрационным типом очищения ран / А. И. Околелова, Е. А. Бобина, А. М. Пешкова // Ветеринарные науки. — 2020 (57). — С. 6—7.
2. *Луногов А. М.* Лечение гнойных ран / А. М. Луногов, В. Д. Соколов, В. Д. Войтенко // Иппология и ветеринария. — 2016. — № 2 (20). — С. 96—98.
3. *Великанов В. И.* Лекарственные средства, применяемые в ветеринарной медицине: учебное пособие для вузов / В. И. Великанов, Е. А. Елизарова; под общей редакцией В. И. Великанова. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 176 с.
4. *Билан А. М.* Клинико-экспериментальное обоснование способа лечения инфицированных ран у животных: дис. на соискание ученой степени канд. вет. наук: 06.02.04. — ЮУр аграрный гос. университет, Троицк, 2020. — 145 с.
5. *Ивануса С. Я.* Современные принципы лечения гнойных ран: учебное пособие для слушателей факультета подготовки врачей и ординаторов по специальности «Хирургия» / П. Н. Зубарев, Б. В. Рисман, О. А. Литвинов. — Санкт-Петербург: «Онли-Пресс». — 2017. — 36 с.
6. *Чуев Н. А.* Хирургическое лечение септических ран у собак / Н. А. Чуев, О. В. Колосова // Научный журнал «Ceteris paribus». — 2022. — № 7. — С. 29—31.
7. *Барышев В. А.* Применение геля на основе хлоргексидина при лечении ран у собак / В. А. Барышев, Н. Л. Андреева, В. М. Матвеев // Международный вестник ветеринарии. — 2018. — № 3. — С. 72—76.
8. *Бойко Н. Н.* Фитопрепараты, анализ фармацевтического рынка Российской Федерации / Н. Н. Бойко, А. В. Бондарев, [и др.] / Научный результат. Серия «Медицина и фармация». — 2017. — Т. 3. — № 4(14). — С. 30—38.
9. *Самбукова Т. В.* Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии / Б. В. Овчинников, В. П. Ганапольский, и др. / Обзоры по кли-

нической фармакологии и лекарственной терапии. — 2017. — Т. 15. — № 2. — С. 56—63.

10. *Куприянова Е. А.* Антимикробная активность настоек почек и побегов тополя черного / Е. А. Куприянова, В. А. Куркин [и др.] / Фармация. — 2019. — Т. 68. — № 3. — С. 44—48.

11. *Олифирова О. С.* Значение антиоксидантов и гипербарической оксигенации в лечении ожоговых ран / О. С. Олифирова, А. А. Козка // Новости хирургии. — 2017. — Т. 25. — № 2. — С. 148—154.

12. *Афонюшкина Е. Ю.* Применение растения софора японская (*Stiphonolobium japonicum*) / Е. Ю. Афонюшкина, А. И. Марахова // В сборнике: Advances in Science and Technology. Сборник статей XXIX Международной научно-практической конференции. — 2020. — С. 55—56.

13. *Луанова И. А.* Изучение противовоспалительной и гастропротективной активности плодов софоры

японской (*Sophora Japonica L.*) / Е. Н. Курманова, Е. В. Ферубко, О. Л. Сайбель // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. — 2020. — № 3. — С. 45—54.

14. *Коноплева М. М.* Лекарственное сырье животного происхождения и природные продукты / М. М. Коноплева // Вестник фармации. — 2012. — № 2 (56). — С. 81—88.

15. *Владимцева И. В.* Изучение антимикробной активности моноглицерида лауриновой кислоты / А. А. Тихонова, А. Н. Разумова // Сборник материалов IV Международной научно-практической конференции. — 2022. — С. 115—118.

16. Порошок для местного лечения гнойных долго незаживающих обширных поверхностных ран / И. Н. Астахова, Р. В. Галикеев, И. З. Салихов, Р. Г. Каланов. — Пат. 2311902С1, Рос. Федерация N2006131608/15; заявл. 01.09.2006; опубл. 10.12.2007 № 34.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**А. А. Парфенюк** — аспирант отдела фармакологии;

**А. М. Сампиев** — доктор фармацевтических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела фармакологии;

**М. П. Семенов** — доктор ветеринарных наук, доцент, заведующая отделом фармакологии;

**К. А. Семенов** — кандидат экономических наук, старший научный сотрудник отдела фармакологии.

Статья поступила в редакцию 19.03.2023 г.

## RELEVANCE OF THE DESIGN OF A COMBINATION WOUND HEALING DRUG FOR VETERINARY USE AND ITS POTENTIAL COMPONENT COMPOSITION

Alina Andreevna Parfenyuk, Abdulmutalip Magametovich Sampiev, Marina Petrovna Semenenko<sup>✉</sup>, Kseniya Andreevna Semenenko

Krasnodar Scientific Center for Zootechnics and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia, sever291@mail.ru<sup>✉</sup>

**Abstract.** Registered wound healing agents for veterinary use make up an extremely small share in the total range of drugs (only 2.2 %), with a predominance of monodrugs with limited effects on the multi-link wound process within this pharmacotherapeutic group. At the same time, ointment is the predominant and popular type of dosage form for wound healing drugs (almost 32 %). The article shows the relevance, advantages and expediency of designing a combination drug in the form of an ointment with polyfunctional properties based on substances of natural and synthetic origin and potentially able to act simultaneously on many pathogenetic links of the wound process. The most promising active components for inclusion in the composition of the designed drug are presented — carriers of antimicrobial, anti-inflammatory, necrolytic, antioxidant, regenerating properties. For certain types of plant materials used as components of the designed ointment and not represented by pharmaceutical substances, extracts were previously obtained.

**Keywords:** wound, wound healing agents, combination drug, ointment, extract, plant material, biologically active substances

One of the current trends in veterinary pharmacology is the design and implementation of affordable and highly effective domestic drugs for the treatment of diseases common among animals. An analysis of the statistical material showed that in the structure of the incidence of both farm and small domestic animals, a significant place is occupied by damage to individual parts of the body, leading to a violation of the integrity of the anatomical structures in the form of wounds. So with the general level of injuries of farm animals, wounds account for up to 40 %, and among dermatological diseases, wound pathologies account for 10—13 % [1].

According to their etiology, the types of wounds are very diverse: cut, stab, chopped, bruised, crushed, torn, scalped, bitten, poisoned, gunshot (bullet, shrapnel) and others [2].

To design wound healing drugs characterized by a wide range of pharmacological effects on different parts of the wound process, it is important to understand the patterns of wound regeneration in animals [3].

Wounds, being a complex biological system, go through certain phases in their development: I — the phase of inflammation, subdivided into the period of

vascular changes and the period of cleansing the wound from necrotic tissues; II — phase of regeneration, formation and maturation of granulation tissue; III — the phase of scar reorganization and epithelialization [4].

The objectives of treatment in the first phase of the wound process are the rejection of necrosis, the evacuation of wound discharge, the improvement of tissue trophism, and the fight against infection. At this stage, agents with hydrophilic, necrolytic, antibacterial properties should be used. The tasks of treatment in the II phase of the wound process are the fight against infection, the protection of granulations and the stimulation of reparative processes. In the III phase of the wound process, it is necessary to stimulate the processes of reparation and epithelization. When signs of the transition of the wound process to the third phase appear, reparative agents with insignificant osmotic activity are used [5].

Wounds not only reduce the quality of life of the animal, accompanied by symptoms such as pain, limited mobility of certain parts of the body, but also dangerous complications such as acute blood loss, traumatic shock, deep damage to vital organs, secondary infection or infectious complications [6].

All accidental wounds are primarily bacterially contaminated. In this regard, when pharmacocorrecting a wound infection, veterinary specialists mainly use chemotherapeutic agents, both local and systemic. However, the drugs available in the arsenal of the state register of medicinal products for veterinary use have a narrow range of applications. Thus, hypertonic solutions or one-component sorbents have good sorption properties, but a slight antimicrobial effect. In contrast, antibiotics and antiseptics, with high antimicrobial properties, do not have an osmotic or necrolytic effect.

At the same time, the clinical search for pharmacological agents should be carried out not only in terms of the optimal composition of drugs, but also in terms of their dosage forms. Drugs in the form of soft dosage forms (ointments) have fewer side effects, including systemic ones, due to which they are more often chosen for drug therapy [7].

In connection with the above, the objective of this study was to substantiate the feasibility of designing a potentially promising composition of a new combined wound healing agent for animals, including on the basis of marketing research on the market of veterinary drugs of the corresponding pharmacotherapeutic group.

### MATERIAL AND METHODS

To monitor wound healing medicines available on the market, reference books of official information were used: the State Register of Medicines for

Veterinary Use, VIDAL Veterinary Medicine, the data on the range of medicines in veterinary pharmacies in Krasnodar. Data processing was carried out using the Microsoft Office Excel 2016 software package.

Research methods: analysis of modern sources of scientific literature on the pharmacology of natural and synthetic components, marketing research, content analysis, structural, comparative, graphic, methods of statistical and mathematical analysis.

### STUDY RESULTS

A marketing study of the veterinary drugs market in the Russian Federation included in the State Register of Veterinary Medicines identified 47 registered wound healing drugs for internal and external use, which was 2.2 % of all registered veterinary drugs in the Russian Federation.

The market segmentation of medicines for the treatment of wounds in animals is represented by manufacturers from 7 countries and includes 19.1 % of imported drugs (Fig. 1).

Despite a significant share of medicines of domestic manufacturers (80.9 %), the market capacity of wound healing drugs, in general, remains low. The market of veterinary wound healing drugs is dominated by monocomponent drugs of predominantly synthetic origin (82.9 %). The drugs have a narrow spectrum of action and are limited to individual therapeutic effects: antimicrobial, antiseptic, anti-inflammatory or reparative (Table 1).

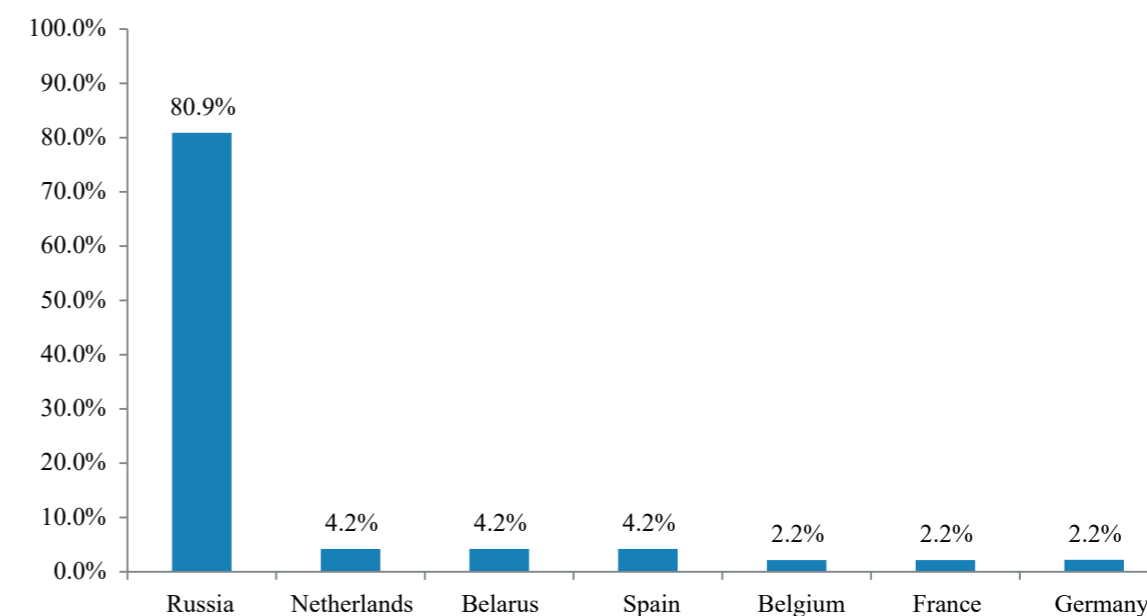


Fig. 1. Producing countries of medicines for the treatment of wounds in animals, represented on the Russian market

**Table 1**

Wound healing drugs in the Russian Federation included in the State Register of Medicinal Products for Veterinary Use

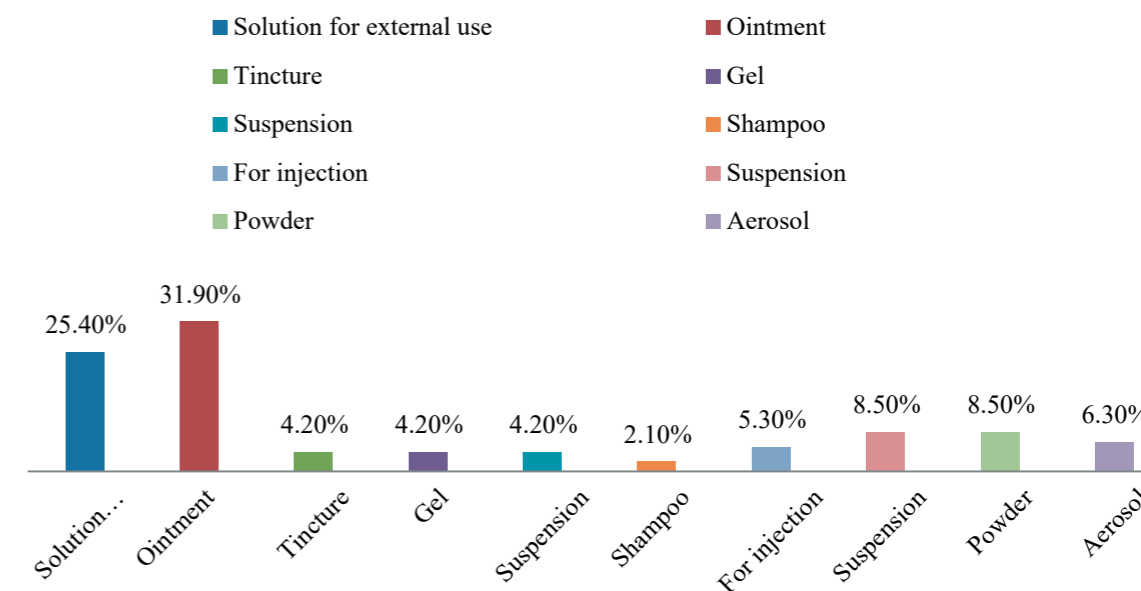
International non-proprietary name of active ingredient	Frequency of the active ingredient occurrence in finished medicinal products	Trade name examples
1	2	3
Chlorhexidine	4	Casepturine, Hexiderm, Chlorhexidine shampoo, OKVET® Medicated shampoo with chlorhexidine
Iodine	1	Alcoholic iodine solution 5 %
Zinc oxide	1	Ointment zinc 10 %
Dioxomethyltetrahydro-pyrimidine, chloramphenicol	3	Ointment «Levomekol», Ointment «Levomekol-vet», Ointment Levomekol
Pharmaiod	1	Pharmaiodic ointment® antiseptic
Proteolytic enzyme complex	1	Imosimasa
Poplar black	2	Gempotin, gempotin
Benzympenicillin	1	Penikel 15 + 15 LA
Enrofloxacin	1	Neoflox tablets
Benzyldimethyl[3-(myristoylamino)propyl]ammonium chloride monohydrate	1	MISTIN®
Protein-peptide complex obtained from a conditioned medium by culturing horse mesenchymal stem cells	1	UltraCell-Horse®
Chlortetracycline	4	Cyclo Spray, Hipratopic Spray, Chemi Spray, Forticline Spray
Complex of proteins produced by mesenchymal stem cells	1	Reparin-Helper®
Ichthyol	2	Ichthyol ointment 10 %, Ichthyol ointment 10 % and 20 %
Streptocide	1	Streptocid ointment
Pine resin	1	Pihtoinum®
Fir oil	1	Ointment Jahalimp®
Aluminum oxide	2	aluspray, aluminumspray
Furatsilin, ethonium	1	Ranosol

**Table 1 (the end)**

1	2	3
Sophora japonica, stinging nettle	1	Safroderm-tincture
Sulfanilamide	2	Tetracilin, Edis Powder
Echinacea purpurea, calendula	1	Trauma gel
Carbetopendecinium bromide	1	Septifort spray
Biomass of living bacteria	1	Bioseptin
Ringer-Locke solution	1	Ringer-Locke solution
Tetracycline, oxytetracycline	4	Tetracycline ointment 3 %, Terramycin, Limoxin-25 Spray, Terramycin Aerosol Spray
Miramistin	1	MIGSTIM®
ASD-2F, ASD-3F	2	Balm Dorogovoy®, ASD-3F — Antiseptic-stimulant Road faction 3
Benzympenicillin, streptomycin, sulfanilamide	1	Tricillin
Chloramphenicol, methyluracil, lidocaine	3	Ranosan® powder, Ranosan® ointment, Mizofen®

It has been established that the most popular and demanded dosage form in veterinary practice are ointments (31.9 %) (Fig. 2).

This form is characterized by the convenience of the application mode, high release of active substances, ease of application, and long shelf life.



**Fig. 2.** Segmentation of the assortment by dosage forms

The active ingredients from the ointment, which is a dosage form for external use, enter the bloodstream in a small amount and are absorbed into the animal's body. This makes it possible to reduce the scale of the emergence and spread of animal resistance to antimicrobial drugs, as well as to ensure the safety of food production (meat, milk), when it comes to the use of wound healing agents in industrial animal husbandry. Moreover, local application of the drug is more effective than the general systemic effect in the treatment of wounds. In this regard, it is expedient to design a new medicinal wound healing agent with a versatile therapeutic effect in the form of an ointment.

Combination drugs occupy about 30 % of the entire group of wound healing agents in the overall structure. At the same time, this segment of veterinary pharmacology products should develop more actively. After all, it is the combination of pharmaceutically and pharmacodynamically active substances that combine with each other that can give a new drug product being designed multifunctional properties and the ability to influence various parts of the pathological wound process.

We have analyzed the component composition of the registered wound healing agents. The analysis showed that synthetic components were used for the production of 78.7 % of drugs, and only 21.3 % of drugs included natural components of plant or animal origin. However, natural compounds have a number of advantages. Thus, phytodrugs, in comparison with synthetic drugs, have a mild, moderate effect on the body, a gradually but steadily developing therapeutic effect, have a small number of contraindications, and are not addictive. At the moment, natural compounds of plant origin are known, such as tannins, terpenoids, alkaloids, flavonoids, which have demonstrated antibacterial, anti-inflammatory and regenerating effects. Raw materials of animal origin are also of some value for veterinary medicine, providing anticoagulant, anti-inflammatory, antithrombotic, thrombolytic and other types of action. Therefore, natural raw materials should become an attractive segment for veterinary drug design.

The performed content analysis of the range of registered veterinary drugs for the treatment of wounds by manufacturers, dosage forms and composition has shown that the range of veterinary drugs for inflammatory and wound lesions is very limited. There are practically no drugs that have a complex effect on various stages of the wound process treatment. There is a limited range of drugs based on substances of animal and plant origin. At the same time, the most convenient, effective and popular dosage form is an ointment.

In this regard, the design of a new drug that has a pronounced wound healing effect and combines a combination of components that differ in their pharmacological properties and desirable types of action is an urgent and timely task of veterinary pharmacology and pharmacy. Such a drug, in our opinion, should have an antimicrobial effect, due to the key role of bacteria in the development of the wound process, anti-inflammatory action, include an anti-exudative component to relieve edema, promote accelerated granulation and rapid wound healing.

To design a drug that reduces the duration of treatment and has a complex effect on various phases of the wound process, a number of substances and sources of their isolations of plant and animal origin, potentially acceptable for this task were considered at Krasnodar Research Veterinary Institute — a separate structural subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution “Krasnodar Scientific Center for Zootechnics and Veterinary Medicine”.

In particular, black poplar (*Populus nigra* L.), the buds of which have a pronounced antibacterial effect, can be attributed to a promising source of biologically active substances (BAS). In a number of studies, black poplar buds were recommended for the use in medical practice for the treatment of wounds of various etiologies [10].

BAS in demand in medicine is the natural bioflavonoid dihydroquercetin, isolated from the bark of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb). The range of pharmacological properties of dihydroquercetin is impressive, since it has an antioxidant, angioprotective, regenerating, anti-edematous effect. This bioflavonoid inhibits the processes of lipid peroxidation of cell membranes, prevents their destruction and has a capillary-protective effect [11].

In medicine, the ability of biologically active substances of Japanese Sophora (*Styphnolobium japonicum*) fruits to accelerate the healing of wounds is known. Rutin, which is part of the Japanese Sophora fruit, like other bioflavonoids, has a wide spectrum of action, including capillary-strengthening and antioxidant. By binding free radicals, rutin has a protective effect on tissue damage and can be used as an anti-inflammatory agent. In this regard, rutin can be effective as a regenerative agent [12, 13].

A wide range of therapeutic action, which is of interest from the point of view of wound treatment, is possessed not only by biologically active substances of plant origin, but also of animal origin. In particular, lauric acid, in the form of a lipid concentrate of some insects, has antibacterial properties. The antibacterial

effect of lauric acid was tested with a statistically positive result on various types of pathogenic bacteria that infect plants, which suggests its efficacy in the treatment of animal wounds [14, 15].

Another example of a substance of animal origin that deserves attention in the context of the problem under consideration is the gastric enzyme pepsin, which has a high proteolytic activity. It catalyzes the breakdown of proteins and polypeptides. Due to this, pepsin favorably affects the wound pathological process and reduces the risk of purulent complications [16].

Along with the above individual substances or sources of obtaining biologically active substances of natural origin, it seems justified to include a regenerating component in the composition of the designed combined agent, for example, isolated from aloe, sea buckthorn, mummy.

The above and other natural biologically active substances can be considered as active components of a combination wound healing drug, possibly in combination with synthetic pharmacologically active ingredients. Among the latter, broad-spectrum antibacterial agents with resistance to microbial resistance may be of the greatest importance. At the same time, the possibility of using plant sources of biologically active substances with pronounced antimicrobial properties, such as eucalyptus, nettle, celandine, sage, mallow, should not be excluded as part of the drug, provided that they do not have a local irritating effect.

At the same time, it should be noted that not all types of medicinal plant raw materials, despite the value of the biologically active substances contained in them, have mass-produced and ready-to-use pharmaceutical substances. This circumstance limits the very possibility of considering these phytoobjects as a source of the active component in the designed wound healing drug. In particular, this applies to such important types of plant raw materials for inclusion in the drug design under consideration, such as the fruits of sophora and poplar buds. In this regard, and taking into account the planned type of dosage form — an ointment and the convenience of introducing active components into it, we designed extracts from these two phytoobjects, for which, under laboratory conditions, sequential processing of plant materials with glycerin of pharmacopoeial quality and refined deodorized sunflower oil was used to extract polar and non-polar compounds.

The following conditions and parameters of the extraction process were experimentally established: extraction method — maceration, absorption coefficient of the extractant — 2.3 and 2.6 (according to the first extractant — glycerin) for sophora and poplar, re-

spectively; hydromodulus for glycerin 1 : 1, for oil — 1 : 9 for both phytoobjects; temperature and exposure time with extractants — plus 50 °C and 24 hours (intensification by ultrasonic treatment with a frequency of 20 kHz and a power of 250 W of the extraction system in the last 10 minutes of the process). The average yield of the product after being freed from vegetable meal was about 10 parts per 1 part of the taken plant material, since the extractants used are not removed from the extract.

Thus, with the help of a two-phase extraction, extracts with a wide range of biologically active substances from the fruits of sophora and poplar buds, ready for introduction into the ointment, were obtained.

## CONCLUSIONS

The content analysis of registered wound healing agents revealed an insignificant share of this pharmacotherapeutic group in the total range of veterinary drugs — only 2.2 %. Within the assortment analysis of the group of wound healing agents showed that monodrugs with a correspondingly limited range of effects on the multi-link wound process are predominant in it. At the same time, it has been found that an ointment (almost 32 %) is a popular type of dosage form for wound healing agents, which is justified from the point of view of the regionality of the disease, the expediency of local therapeutic effects, a low degree of absorption of active substances and the risk of undesirable pharmacotoxicological system-wide manifestations.

Based on the critical analysis of the market of wound healing drugs registered for veterinary use, the relevance, advantages and expediency of designing combination drugs that combine active substances of natural and synthetic origin and are potentially capable of simultaneously affecting many pathogenetic links of the wound process are shown. For the design of a combination wound healing drug, the most promising active components for inclusion in its composition are presented — carriers of antimicrobial, anti-inflammatory, necrolytic, regenerating and antioxidant properties. At the same time, for certain types of plant materials used as components of the designed ointment and not represented by pharmaceutical substances, extracts were previously obtained.

## REFERENCES

1. Okolelova A. I. Use of “Klemavet” in case of open mechanical injuries in animals with a sequestration type of wound cleansing / A. I. Okolelova, E. A. Bobina, A. M. Peshkova // *Veterinarnye nauki* (Veterinary sciences). — 2020 (57). — P. 6—7.

2. Lunegov A. M. Treatment of purulent wounds / A. M. Lunegov, V. D. Sokolov, V. D. Voytenko // Ippologiya i veterinariya (Hippology and veterinary medicine). — 2016. — No. 2 (20). — P. 96—98.
3. Velikanov V. I. Drugs used in veterinary medicine: textbook for universities / V. I. Velikanov, E. A. Elizarova; under the general editorship of V. I. Velikanova. — St. Petersburg: Lan, 2020. — 176 p.
4. Bilan A. M. Clinical and experimental substantiation of the method of treating infected wounds in animals: thesis ... Cand. of Vet. Sciences: 06.02.04. — Yuzhno-Uralskiy gosudarstvennyy agrarnyy universitet (South Ural State Agrarian University), Troitsk, 2020. — 145 p.
5. Ivanusa S. Ya. Modern principles of the treatment of purulent wounds: textbook for students of the faculty of training doctors and residents in the specialty "Surgery" / P. N. Zubarev, B. V. Risman, O. A. Litvinov. — St. Petersburg: "Only-Press". — 2017. — 36 p.
6. Chuev N. A. Surgical treatment of septic wounds in dogs / N. A. Chuev, O. V. Kolosova // Nauchnyy zhurnal "Ceteris paribus" (Scientific journal "Ceteris paribus"). — 2022. — No. 7. — P. 29—31.
7. Baryshev V. A. Application of a gel based on chlorhexidine in the treatment of wounds in dogs / V. A. Baryshev, N. L. Andreeva, V. M. Matveev // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii (International Veterinary Bulletin). — 2018. — No. 3. — P. 72—76.
8. Boyko N. N. Phytopreparations, analysis of the pharmaceutical market of the Russian Federation / N. N. Boyko, A. V. Bondarev, [et al.] / Nauchnyy rezultat. Seriya "Meditsina i farmatsiya" (Scientific result. Series "Medicine and Pharmacy"). — 2017. — V. 3. — No. 4 (14). — P. 30—38.
9. Sambukova T. V. Prospects for the use of herbal remedies in modern pharmacology / B. V. Ovchinnikov, V. P. Ganapolskiy, et al. / Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii (Reviews of clinical pharmacology and drug therapy). — 2017. — V. 15. — No. 2. — P. 56—63.
10. Kupriyanova E. A. Antimicrobial activity of tinctures of buds and scions of black poplar / E. A. Kupriyanova, V. A. Kurkin [et al.] / Pharmacy. — 2019. — V. 68. — No. 3. — P. 44—48.
11. Olifirova O. S., Significance of antioxidants and hyperbaric oxygenation in the treatment of burn wounds / O. S. Olifirova, A. A. Kozka // Novosti khirurgii (News of Surgery). — 2017. — V. 25. — No. 2. — P. 148—154.
12. Afonyushkina E. Yu. Application of the Japanese Sophora plant (Stiphnolobium japonicum) / E. Yu. Afonyushkina, A. I. Marakhova // In the collection of papers: Advances in Science and Technology. Collection of articles of XXIX international scientific and practical conference. — 2020. — P. 55—56.
13. Lupanova I. A. The study of anti-inflammatory and gastroprotective activity of the Japanese Sophora fruits (Sophora Japonica L.) / E. N. Kurmanova, E. V. Ferubko, O. L. Saybel // Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennykh sredstv (Problems of ensuring the quality of medicines). — 2020. — No. 3. — P. 45—54.
14. Konopleva M. M. Medicinal raw materials of animal origin and natural products / M. M. Konopleva // Vestnik farmatsii (Bulletin of Pharmacy). — 2012. — No. 2 (56). — P. 81—88.
15. Vladimtseva I. V. Studying the antimicrobial activity of lauric acid monoglyceride / A. A. Tikhonova, A. N. Razumova // Collection of materials of the IV International Scientific and Practical Conference. — 2022. — P. 115—118.
16. Powder for local treatment of purulent long non-healing extensive superficial wounds / I. N. Astakhova, R. V. Galikeev, I. Z. Salikhov, R. G. Kalanov. — Pat. 2311902C1, Rus. Federation N2006131608/15; appl. 01.09.2006; publ. 10.12.2007 No. 34.

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**A. A. Parfenyuk** — Postgraduate Student of the Department of Pharmacology;  
**A. M. Sampiev** — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Principal Scientific Associate;  
**M. P. Semenenko** — Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor, Head of a Department;  
**K. A. Semenenko** — Candidate of Economic Sciences, Senior Scientific Associate of a Department.

The article was submitted 19.03.2023.

Научная статья

УДК 619:615.1

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.91

## АНАЛИЗ АССОРТИМЕНТА АНТИСЕПТИЧЕСКИХ И ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ НА РОССИЙСКОМ РЫНКЕ

**Евгений Александрович Белоусов\***<sup>✉</sup>, **Екатерина Олеговна Новикова\*\***,  
**Ольга Викторовна Белоусова\***, **Михаил Михайлович Карасев\*\*\***,  
**Юрий Анатольевич Ватников\*\***, **Николай Владимирович Сахно\*\*\*\***,  
**Олег Олегович Новиков\*\***

\*Белгородский государственный национальный исследовательский университет Белгород, Россия

\*\*Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

\*\*\*Орловский государственный университет им. И. С. Тургенева, Орел, Россия

\*\*\*\*Орловский государственный университет им. Н. В. Парахина, Орел, Россия, belousova@mail.ru<sup>✉</sup>

**Аннотация.** В статье представлены результаты фрагментарного маркетингового исследования ассортимента антисептических и дезинфицирующих средств для ветеринарного применения, существующих в настоящее время на профильном рынке Российской Федерации. Данное исследование проведено для обеспечения потребности целевого потребительского рынка. Проведен анализ рынка изучаемых препаратов по фармакотерапевтическим группам, числу входящих в состав целевых продуктов активных веществ, отношению к стране производителя, компании-производителю, виду лекарственной формы, периоду регистрации и объектам ветеринарного применения. Полученные данные позволяют обеспечить информированность профильных специалистов, расширить их профессиональный кругозор и, как следствие, улучшить координацию материальных, трудовых и финансовых активов ветеринарной организации и ее деятельности в целом.

**Ключевые слова:** антисептические средства, дезинфицирующие средства, маркетинговые исследования

### ВВЕДЕНИЕ

Маркетинговое исследование рынка лекарственных и родственных продуктов чрезвычайно значимы для ветеринарии, т. к. они позволяют обеспечить информированность профильных специалистов. Происходит расширение их профессионального кругозора, что напрямую улучшает координацию материальных, трудовых и финансовых активов ветеринарной организации, содействует улучшению деятельности ветеринарных фирм в целом.

Следует напомнить, что в соответствии с Федеральным законом от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», ветеринарная аптечная организация — организация, структурное подразделение ветеринарной организации, осуществляющие розничную торговлю лекарственными препаратами, в т. ч. дистанционным

способом, хранение, изготовление и отпуск лекарственных препаратов для ветеринарного применения и родственных продуктов [1].

На сегодняшний день год в России зарегистрировано 2022 ветеринарных лекарственных препарата, 3414 кормовых добавок и 127 фармацевтических субстанций для изготовления ветеринарных препаратов [2]. Россия располагает всеми отечественными аналогами востребованных ветеринарных препаратов, их ввоз в 2022 году не ограничивался [3].

В свою очередь, реалиями настоящего времени являются высокий темп роста поголовья сельскохозяйственных и домашних животных. Вместе с тем закономерно растет спрос на весь спектр ветеринарных препаратов, в т. ч. антисептических и дезинфицирующих средств. Рост потребления названной продукции для ветеринарии, в свою очередь, определяет развитие целевой промыш-

© Белоусов Е. А., Новикова Е. О., Белоусова О. В., Карасев М. М., Ватников Ю. А., Сахно Н. В., Новиков О. О., 2023

ленной инфраструктуры [4, 5, 6]. С 1 января по 1 июля 2022 года в России произведено 107 миллионов упаковок ветеринарных препаратов, включая антисептики и дезинфектанты (на 30 % больше, чем год назад) [3].

Существует традиционный набор однокомпонентных антисептиков и дезинфектантов, имеющих определенные ограничения при использовании из-за высокой токсичности, а также современные многокомпонентные препараты широкого спектра действия. Эффективность и широта применения антисептических и дезинфицирующих средств напрямую зависит от числа активных субстанций в препарате. При использовании многокомпонентных средств устойчивость микроорганизмов к ним минимизируется [7, 8]. Так, разработаны дезинфицирующие препараты с пролонгированным действием, которые реально увеличивают эмбриональную жизнеспособность птицы [8, 9]. Следует отметить, что до настоящего времени неизученным остается ассортимент целевых продуктов.

Таким образом, целью данной работы явилось исследование ассортимента антисептических средств и дезинфектантов для ветеринарного применения, зарегистрированных на территории Российской Федерации, для обеспечения потребности целевого потребительского рынка.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведены исследования ассортимента антисептических и дезинфицирующих средств для ветеринарного применения, зарегистрированных на территории Российской Федерации и поступающих в оптовую и розничную аптечную сеть страны в период с 2012 по 2022 гг.

В рамках исследования использованы традиционные подходы к сбору информации: так называемое «кабинетное исследование» или анализ источников информации открытого доступа — деловые и специализированные СМИ (печатные и электронные), рекламные и информационные материалы «игроков» профильного рынка, аналитические и обзорные статьи, данные ранее проведенных маркетинговых исследований в предметной области, материалы отраслевых учреждений, опубликованные данные государственных органов [2, 10—16].

В исследовании применены следующие методы:

- Контент-анализ — количественный анализ текстов и текстовых массивов с целью последую-

щей содержательной интерпретации выявленных числовых закономерностей [17].

- Структурный анализ — исследование системы с помощью ее графического модельного представления, которое начинается с общего обзора и затем детализируется, приобретая иерархическую структуру со все большим числом уровней [18].

- Графический анализ — представление данных в графическом виде и их последующая интерпретация [19]. В исследовании в т. ч. использован инструмент «Лепестковая диаграмма» для построения многокритериальной модели.

- Аналитическое исследование — детальное исследование происходящих процессов и явлений, путь познания складывающихся тенденций и закономерностей [20].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антисептические и дезинфицирующие средства с 2020 года стали одной из наиболее востребованных категорий товаров и резко увеличившимся рынком для производителей.

Из-за пандемии они явились категорией товаров первой необходимости во всех сферах, в т. ч. в ветеринарии.

Какие тенденции рынка этой категории продуктов сегодня, как меняется сегментация рынка и на прочие вопросы, отвечают представленные ниже результаты проведенного фрагментарного маркетингового исследования.

В ходе исследования сформирован информационный массив данных об антисептических и дезинфицирующих средствах. Выявлено, что структуру ассортимента формируют 37 фармацевтических компаний и 80 торговых наименований (ТН), все из которых являются препаратами безрецептурного отпуска.

Исследован ассортимент препаратов по числу активных субстанций, присутствующих в составе (рис. 1).

Установлено, что монокомпонентные препараты составляют 63 ТН — 79 %; комбинированные (многокомпонентные) — 17 ТН — 21 %. Таким образом, подтвержден факт приоритетности монокомпонентных антисептических средств и дезинфекторов на отечественном рынке.

Проанализирован ассортимент антисептических и дезинфицирующих средств, используемых в ветеринарной практике, в зависимости от страны производителя (рис. 2).

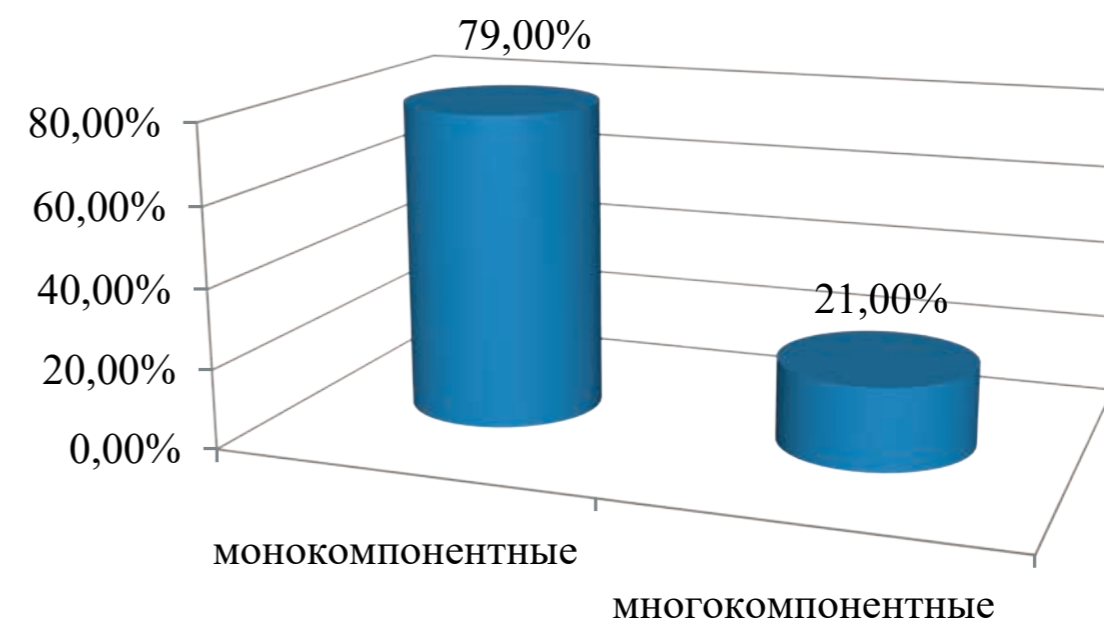


Рис. 1. Распределение целевых средств в зависимости от числа фармакологически активных субстанций в составе, %

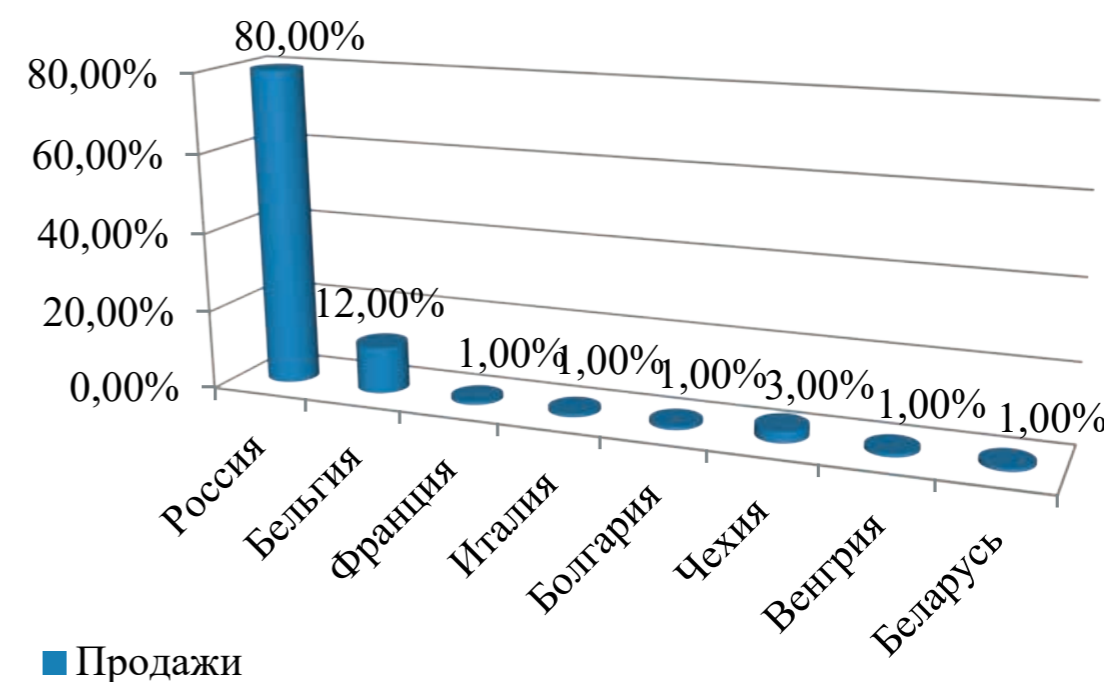


Рис. 2. Сегментация рынка целевых средств в зависимости от страны производителя, %

Выявлено, что лекарственные препараты Российского производства составляют 54 ТН — 80 %; Бельгии — 9 ТН — 12 %; Франции — 1 ТН — 1 %; Италии — 1 ТН — 1 %; Болгарии — 1 ТН — 1 %; Чехии — 2 ТН — 3 %; Венгрии — 1 ТН — 1 %; Республики Беларусь — 1 ТН — 1 %. Таким образом, определено доминирование рос-

сийских целевых препаратов на отечественном потребительском рынке, что кардинально отличается от ситуации трехлетней давности [21].

На наш взгляд, сложившаяся картина прежде всего определена внешнеполитической ситуацией — санкционной политикой ряда недружественных стран.

По этой причине российский рынок лишился части профильных импортных продуктов, но в противовес этому активизировались отечественные производители антисептических и дезинфицирующих средств, произошло расширение их «портфеля товаров» и наращивание объемов выпускаемой продукции.

Далее был исследован сегодняшний ассортимент антисептических и дезинфекторов, используемых в ветеринарной практике, в зависимости от компании-производителя (рис. 3).

Выявлено, что АО завод «Ветеринарные препараты» производит 13 ТН занимает 16 % ассортимента; компания «DeLavalNV» — 6 ТН — 7 %; ООО «НИТА-ФАРМ» и ООО «НВЦ Агроветзащита С-П» — 4 ТН — 5 %; фармацевтические компании: АО «Агробιοпром», «CID LINES NV/SA», ООО «НПО «Ликом», ЗАО «НПП «Фармакс», ООО НПП «Агрофарм», ООО «СПАЗ-фарм» — 3 ТН — 4 %;

фармацевтические компании: ФКП «Армавирская биофабрика», ООО «Группа Фокина», ЗАО Пчеловодный комбинат «Коломенский», ООО Фирма «БиоХимФарм», ООО «Ветторг», ЗАО «БиоПро», «Bioveta, a. s.», ЗАО «Росветфарм» — 2 ТН — 3 % исследованного ассортимента; фармацевтические компании: ООО «АВЗ С-П», ООО «Гиппократ», ООО «Авиценна», ООО «САНВЕТПРЕПАРАТ-ПЛЮС», ООО «Торговый дом «БиАгро», ООО «Агросервис», ООО «Цамакс», «VETOQUINOL S.A.», ООО «ТОП-ВЕТ», ИП «ВИК — здоровье животных», «VETPROМ AD», «Pernix Pharma Gyogyszergyarto Kft.», ООО «ФармПромВет», ООО «Био Фарм Гарант», ЗАО «Виватон», «HauptPharmaLatinaS.r.l.», ООО «Фармбиомедсервис», АО «МЕДХИМ», ООО «Оргполимерсинтез СПб» представлены одним торговым наименованием и занимают по 1 % от ассортимента.

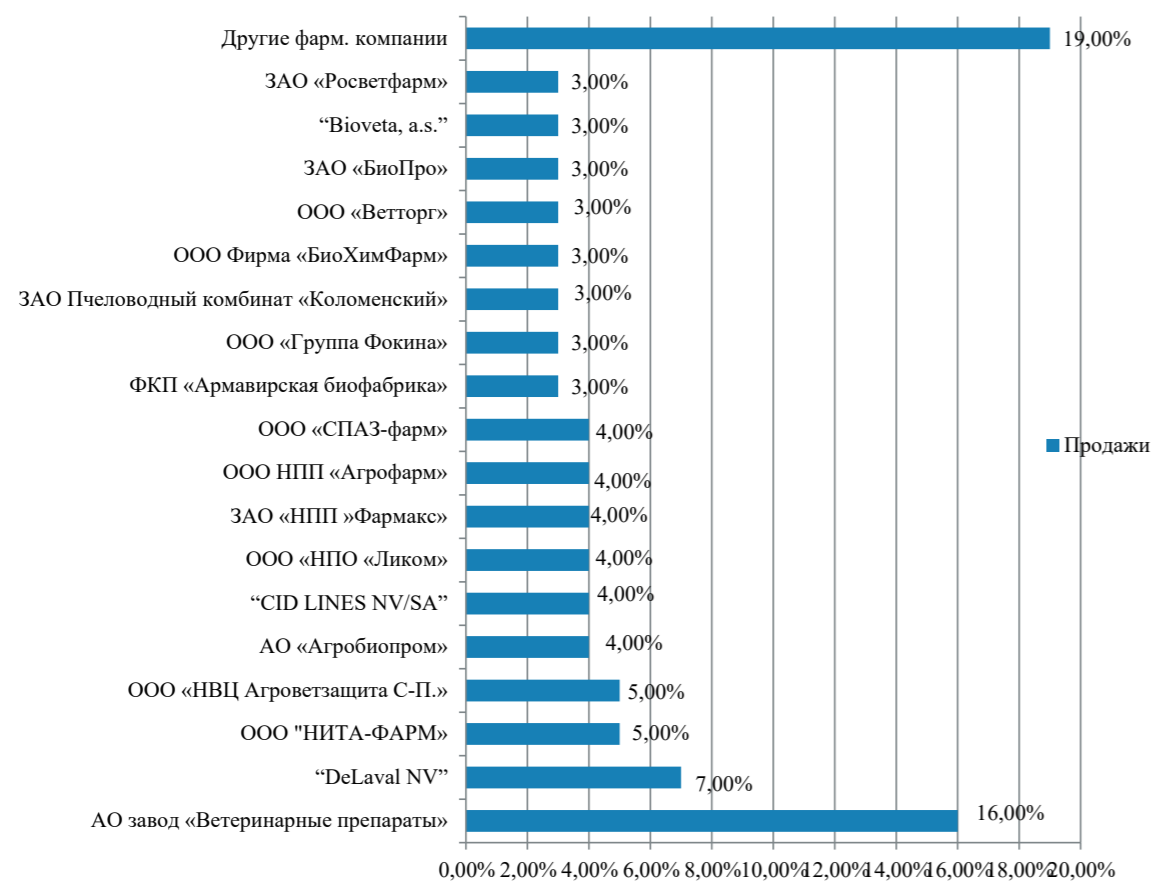


Рис. 3. Сегментация рынка целевых средств в зависимости от компании-производителя, %

Таким образом, АО завод «Ветеринарные препараты» на сегодняшний день является абсолютным лидером целевого продуктового рынка. И, видимо, это не случайно. Сегодня завод — в лидерах

ветеринарной промышленности и неоднократный победитель конкурса «Экспортер года», а ряд препаратов, производимых данным предприятием, входят в «Сто лучших товаров России» [22].

Следующим шагом был проведен анализ номенклатуры антисептических и дезинфицирующих средств по виду форм. Установлено, что мягкие формы составляют 33 ТН — 41 %; жидкие 42 ТН — 52 %; твердые 3 ТН — 4 %; газообразные 2 ТН — 3 % от общего количества исследуемого ассортимента. Доминирование мягких и жидких форм несомненно связано с удобством их использования.

На наш взгляд, следует отметить, что для понимания структуры каждого сегмента требуется детальное изучение выявленных доминант. Изучение ассортимента мягких форм определило следующие результаты: мази составляют 27 ТН — 82 %; суппозитории — 4 ТН — 12 %; гели — 2 ТН, что составляет 6 % от общего количества мягких форм. Мази оказались более предпочтительными по той же причине — удобство в применении.

Углубленное изучение ассортимента жидких форм выявил следующие результаты. Так, экстракты для наружного применения составляют 1 ТН — 2,5 %; суспензии — 1 ТН — 2,5 %; шампуни — 3 ТН — 7 %; растворы для местного и наружного применения — 34 ТН — 80,5 %; капли

ушные — 1 ТН — 2,5 %; растворы для парентерального применения — 1 ТН — 2,5 %; настойки для наружного применения — 1 ТН или 2,5 % от общего количества ассортимента исследуемых форм.

Доминирование растворов для наружного применения, на наш взгляд, определено их сравнительно невысокой стоимостью.

По периоду регистрации антисептических и дезинфицирующих средств в РФ определены следующие результаты (рис. 4).

Больше всего антисептических и дезинфицирующих средств было зарегистрировано в 2018 году — 13 ТН — 16 %; наименьшее количество зарегистрировано в 2022 году — 2 ТН — 3 %; в 2021 году — 10 ТН — 13 %; в 2015 году — 9 ТН — 11 %; в 2013, 2015 и 2019 годах — по 8 ТН — 10 %; в 2014 году — 7 ТН — по 9 %; в 2020 году — 6 ТН — 7 %; в 2017 году — 5 ТН — 6 %; в 2012 году — 4 ТН — 5 %.

Начиная с 2018 года наметилась тенденция к снижению процесса расширения существующей номенклатуры целевых препаратов, но картина изменилась с укреплением антиковидных мер.

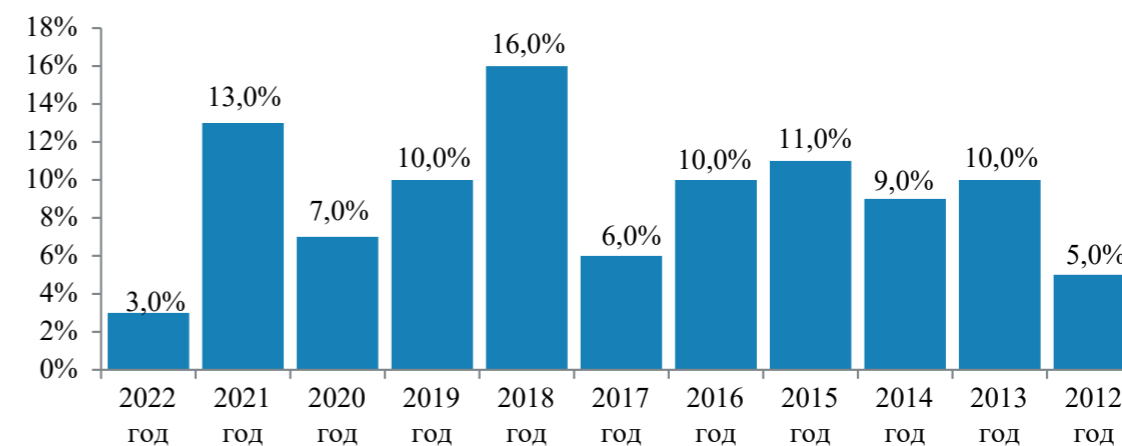


Рис. 4. Сегментация рынка целевых средств по годам их регистрации, %

В свою очередь, проведено исследование частоты использования тех или иных целевых препаратов при ветеринарном обслуживании сельскохозяйственных, домашних и других типов животных. Выявлено, что препараты для сельскохозяйственных животных составляют 27 ТН — 34,0 %; для домашних и сельскохозяйственных — 44 ТН — 55,0 %; только для домашних 6 ТН — 7,5 %; не вошедших в первые три группы — 3 ТН — 3,5 %. Подобная картина, по нашему мнению, полностью зависит от формы целевого продукта, определяю-

щей возможность и удобство его использования. Для визуализации полученных результатов была построена лепестковая диаграмма (рис. 5).

На представленном графике видно, что показатели «Безрецептурный отпуск», «Многокомпонентные составы», «Растворы для наружного применения», «Мази» и, что особенно важно в условиях импортозамещения, «Российского производства» можно уверенно считать стабильными значениями рынка антисептических и дезинфицирующих средств Российской Федерации.



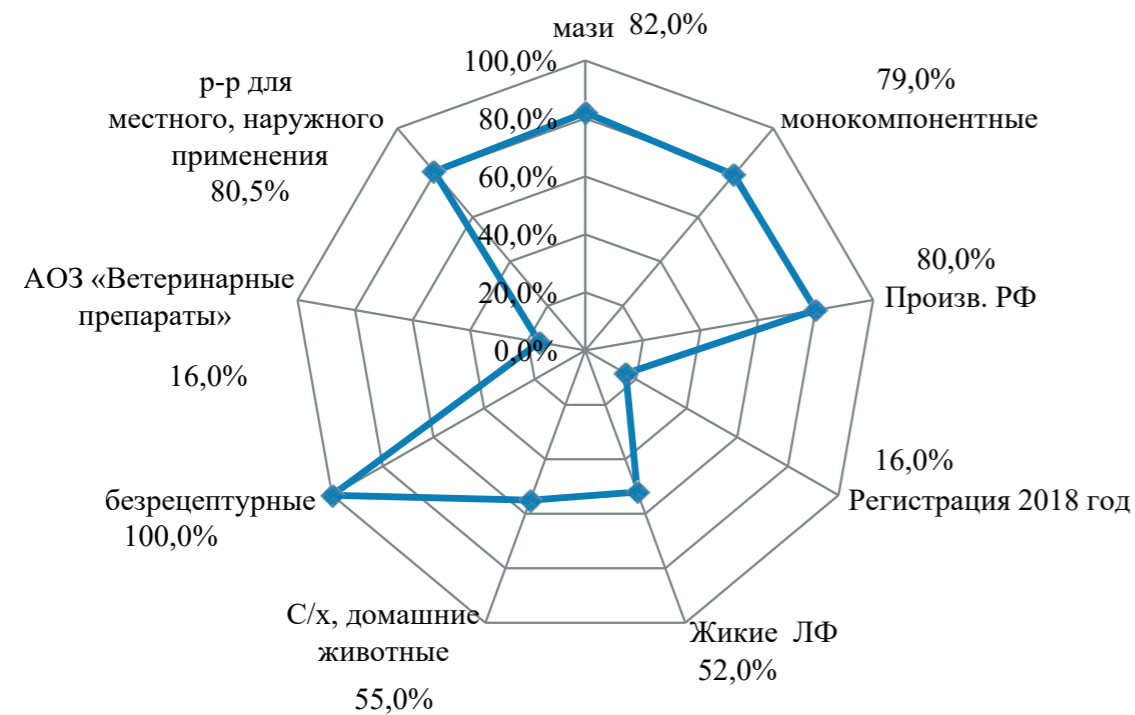


Рис. 5. Распределение исследованных показателей, %

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что на сегодняшний день основная доля отечественного рынка антисептических средств и дезинфекторов занята продуктами российского производства — 80 % (производитель-лидер — АО завод «Ветеринарные препараты»). Большинство из них (79 %) являются монокомпонентными (по действующему веществу) жидкими и мягкими формами (52 % и 41 % соответственно) с доминированием растворов для местного и наружного применения — 80,5 %. Среди целевых продуктов существуют препараты, используемые для сельскохозяйственных животных (34,0 %), для домашних и сельскохозяйственных (55,0 %), только для домашних (7,5 %) и др.

Прирост новых зарегистрированных препаратов данных групп в 2022 году составил 3 %, что существенно ниже максимума 2018 года (16 %).

Проведенное фрагментарное маркетинговое исследование российского рынка антисептических и дезинфицирующих средств для ветеринарного применения по фармакотерапевтическим группам, числу входящих в состав целевых продуктов активных веществ, отношению к стране производителя, компании-производителю, виду лекарственной формы, периоду регистрации и объектам ветеринарного применения позволяет обеспечить

информированность профильных специалистов, расширить их профессиональный кругозор и, как следствие, улучшить координацию материальных, трудовых и финансовых активов ветеринарной организации и ее деятельности в целом.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_99350/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/) Дата обращения — 19.10.2022.
2. Государственный реестр лекарственных средств для животных Электронный ресурс: <https://irena.vetrf.ru/irena> Дата обращения — 19.10.2022.
3. В России есть все нужные ветпрепараты... Электронный ресурс: <https://ria.ru/20220913/preraty-1816389523.html> Дата обращения — 19.10.2022.
4. Белоусова О. В., Карасев М. М., Белоусов Е. А. Маркетинговый анализ ассортимента гомеопатических препаратов для ветеринарного применения // Державинский форум. — 2021. — Т. 5. — № 20. — С. 167—174.
5. Белоусов Е. А., Белоусова О. В., Карасев М. М. Анализ ассортимента антигельминтных препаратов для ветеринарного применения // Державинский форум. — 2022. — Т. 6. — № 20. — С. 178—189.
6. Белоусов Е. А., Белоусова О. В., Карасев М. М., Костенко Е. И., Петухова Е. П. Исследование ассортимента ненаркотических анальгетиков для ветеринарного применения // Научный журнал «Экономика. Социо-

логия. Право». Брянск: БГУ. — 2022. — № 1 (25). — С. 9—15.

7. Актуальные аспекты выбора дезинфицирующих средств: проблемы и решения. Электронный ресурс: <https://cyberleninka.ru/article/n/kontent-analiz-kak-metod-issledovaniya-dostoinstva-i-ogranicheniya> Дата обращения — 17.11.2022.

8. Зотов А. А. Продуктивность цыплят-бройлеров в зависимости от режимов прединкубационной обработки яиц. Электронный ресурс: [http://www.vnitip.ru/netcat\\_files/78/203/diss41\\_d.pdf](http://www.vnitip.ru/netcat_files/78/203/diss41_d.pdf) Дата обращения — 17.11.2022.

9. Кошеч И. И., Найденский М. С., Бушина О. А., Пуговкина Н. В. Применение бактерицидного средства нового поколения «Бицин» для дезинфекции инкубационных яиц кур и объектов ветеринарных клиник. Электронный ресурс: <https://cyberleninka.ru/article/n/primeniye-bakteritsidnogo-sredstva-novogo-pokoleniya-bitsin-dlya-dezinfektsii-inkubatsionnyh-yaits-kur-i-obektov-veterinarnyh-klinik> Дата обращения — 17.11.2022.

10. Анализ рынка дезинфицирующих средств в России в 2017—2021 гг., прогноз на 2022—2026 гг. Потенциал импортозамещения и новые рынки сбыта. Электронный ресурс: [https://businessstat.ru/images/demo/disinfectants\\_russia\\_demo\\_businessstat.pdf](https://businessstat.ru/images/demo/disinfectants_russia_demo_businessstat.pdf) Дата обращения — 17.11.2022.

11. Исследование рынка антисептиков и гигиенических средств в условиях пандемии коронавируса: пик спроса пройден, но рост сохранится. Электронный ресурс: [https://www.megaresearch.ru/news\\_in/issledovanie-rynka-antiseptikov-i-gigienicheskikh-sredstv-v-usloviyah-pandemii-koronavirusa-pik-sprosa-proyden-no-rost-sohranitsya-1544](https://www.megaresearch.ru/news_in/issledovanie-rynka-antiseptikov-i-gigienicheskikh-sredstv-v-usloviyah-pandemii-koronavirusa-pik-sprosa-proyden-no-rost-sohranitsya) Дата обращения — 18.11.2022.

12. Ибрагимова Г. Я. Маркетинговое исследование средств индивидуальной защиты: антисептические средства / Г. Я. Ибрагимова, Г. Р. Иксанова, А. Д. Муратолieva // Вестник современной клинической медицины. — 2021. — Т. 14, вып. 2. — С. 21—25.

13. Антисептики и дезинфектанты: обзор рынка препаратов. Электронный ресурс: <https://zooinform.ru/busi->

[ness/articles/antiseptiki-i-dezinfektanty-obzor-rynka-preparatov/](https://zooinform.ru/busi-ness/articles/antiseptiki-i-dezinfektanty-obzor-rynka-preparatov/) Дата обращения — 17.11.2022.

14. Глобальный анализ рынка антисептиков и дезинфицирующих средств. Электронный ресурс: <https://alfahimgroup.ru/blog/2020/05/29/globalnyj-analiz-rynka-antiseptikov-i-dezinficiruyushih-sredstv/> Дата обращения — 18.11.2022.

15. Текущее состояние рынка дезсредств. Электронный ресурс: <http://dezreestr.ru/dddusl.html> Дата обращения — 18.11.2022.

16. Исследование рынка дезинфицирующих средств и антисептиков. Электронный ресурс: <https://www.mazm.ru/article/a-1979.php> Дата обращения — 18.11.2022.

17. Контент-анализ как метод исследования: преимущества и достижения. Электронный ресурс: <https://cyberleninka.ru/article/n/kontent-analiz-kak-metod-issledovaniya-dostoinstva-i-ogranicheniya> Дата обращения — 19.10.2022.

18. Структурный анализ. Электронный ресурс: [https://forecasting.svetunkov.ru/etextbook/forecasting\\_toolbox/data-analysis/](https://forecasting.svetunkov.ru/etextbook/forecasting_toolbox/data-analysis/) Дата обращения — 19.10.2022.

19. Современное прогнозирование. Электронный ресурс: [https://studopedia.ru/2\\_109925\\_strukturniy-analiz.html](https://studopedia.ru/2_109925_strukturniy-analiz.html) Дата обращения — 19.10.2022.

20. Задачи, функции и методика проведения аналитических исследований. Электронный ресурс: <https://cyberleninka.ru/article/n/zadachi-funktsii-i-metodika-provedeniya-analiticheskikh-issledovaniy> Дата обращения — 19.10.2022.

21. Производство ветеринарных препаратов в России: проблемы и перспективы. Электронный ресурс: <https://pticainfo.ru/news/proizvodstvo-veterinarnykh-preparatov-v-rossii-problemy-i-perspektivy/> Дата обращения — 19.10.2022.

22. Завод «Ветеринарные препараты» — преемственность поколений и стабильность качества. Электронный ресурс: <https://zebra-tv.ru/novosti/biznes/zavod-veterinarnye-preparaty-preemstvennost-pokoleniy-i-stabilnost-kachestva/> Дата обращения — 18.11.2022.

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. А. Белоусов — кандидат фармацевтических наук, доцент;

Е. О. Новикова — студент;

О. В. Белоусова — кандидат фармацевтических наук, преподаватель;

М. М. Карасев — кандидат фармацевтических наук, доцент;

Ю. А. Ватников — доктор ветеринарных наук, профессор, директор департамента;

Н. В. Сахно — доктор ветеринарных наук, доцент, профессор;

О. О. Новиков — доктор фармацевтических наук, профессор.

Статья поступила в редакцию 20.03.2023 г.

## ANALYSIS OF THE ASSORTMENT OF ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS FOR VETERINARY USE ON THE RUSSIAN MARKET

Evgeniy Aleksandrovich Belousov<sup>\*✉</sup>, Ekaterina Olegovna Novikova<sup>\*\*</sup>,  
Olga Viktorovna Belousova<sup>\*</sup>, Mikhail Mikhaylovich Karasev<sup>\*\*\*</sup>, Yuriy Anatolyevich Vatnikov<sup>\*\*</sup>,  
Nikolay Vladimirovich Sakhno<sup>\*\*\*\*</sup>, Oleg Olegovich Novikov<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, belousovea@mail.ru<sup>✉</sup>

<sup>\*\*</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>\*\*\*</sup>Orel State University named after I. S. Turgenev, Orel, Russia

<sup>\*\*\*\*</sup>Orel State Agrarian University named after N. V. Parakhin, Orel, Russia

**Abstract.** The article presents the results of a fragmentary marketing research of the assortment of antiseptics and disinfectants for veterinary use currently existing on the profile market of the Russian Federation. This study was conducted to meet the needs of the target consumer market. The analysis of the market of the studied drugs was carried out by pharmacotherapeutic groups, the number of active substances included in the target products, the relation to the country of manufacture, the manufacturing company, the type of dosage form, the period of registration and objects of veterinary use. The data obtained will ensure the awareness of specialists, expand their professional horizons and, as a result, improve the coordination of material, labor and financial assets of the veterinary organization and its activities as a whole.

**Keywords:** antiseptics, disinfectants, marketing researches

### INTRODUCTION

Marketing researches of the market of medicinal and related products is extremely important for veterinary medicine, because they allow to ensure the awareness of specialists. There is an expansion of their professional horizons, which directly improves the coordination of material, labor and financial assets of the veterinary organization, contributes to the improvement of the activities of veterinary firms as a whole.

It should be recalled that in accordance with the Federal Law dtd. April 12, 2010 No. 61-FZ “On the Circulation of Medicines”, a veterinary pharmacy organization is an organization, a structural unit of a veterinary organization that retails medicines, including by remote means, storage, manufacture and dispensing of medicinal products for veterinary use and related products [1].

To date, 2022 veterinary medicinal products, 3414 feed additives and 127 pharmaceutical substances for the manufacture of veterinary drugs have been registered in Russia [2]. Russia has all domestic analogues of popular veterinary drugs, their import in 2022 was

not limited [3]. In turn, the realities of the present time are the high growth rate of the livestock of farm and domestic animals. At the same time, the demand for the entire assortment of veterinary drugs, including antiseptics and disinfectants, is naturally growing. The growth in consumption of these products for veterinary medicine, in turn, determines the development of the target industrial infrastructure [4–6]. From January 1, 2022 to July 1, 2022, 107 million packages of veterinary drugs, including antiseptics and disinfectants, were produced in Russia (30 % more than a year ago) [3].

There is a traditional set of single-component antiseptics and disinfectants that have certain limitations in use due to high toxicity, as well as modern multi-component drugs with a wide spectrum of action. The efficacy and scope of application of antiseptics and disinfectants directly depends on the number of active substances in the drug. When using multi-component agents, the resistance of microorganisms to them is minimized [7, 8]. Thus, disinfectants with prolonged action have been designed that actually in-

crease the embryonic viability of the poultry [8, 9]. It should be noted that the assortment of target products remains unexplored so far.

Thus, the objective of this work was to study the assortment of antiseptics and disinfectants for veterinary use, registered in the Russian Federation, to meet the needs of the target consumer market.

### STUDY METHODS

The studies have been carried out on the assortment of antiseptics and disinfectants for veterinary use registered in the Russian Federation and supplied to the wholesale and retail pharmacy network of the country in the period from 2012 to 2022.

The study used traditional approaches to collecting information: the so-called “desk research” or analysis of open access information sources — business and specialized media (print and electronic), advertising and information materials of the profile market “players”, analytical and review articles, given earlier conducted marketing research in the subject area, material of industry institutions, published data of state bodies [2, 10–16].

The following methods were used in the study.

- Content analysis — quantitative analysis of texts and text arrays for the purpose of subsequent meaningful interpretation of the identified numerical patterns [17].
- Structural analysis — study of the system with the help of its graphical model representation, which

begins with a general overview and then details, acquiring a hierarchical structure with an increasing number of levels [18].

• Graphical analysis — presentation of data in a graphical form and their subsequent interpretation [19]. In the study, among other things, the “Petal diagram” tool was used to build a multi-criteria model.

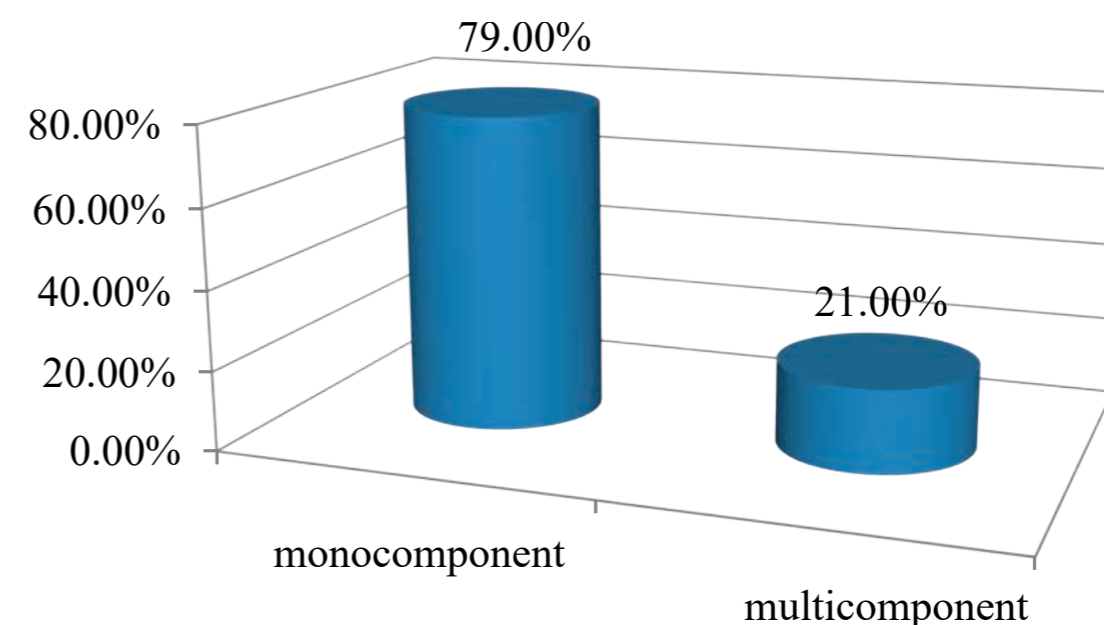
• Analytical study — a detailed study of ongoing processes and phenomena, the way of understanding emerging trends and patterns [20].

### RESULTS AND DISCUSSION

Since 2020, antiseptics and disinfectants have become one of the most sought-after product categories and a sharply increased market for manufacturers. Due to the pandemic, they have become a category of essential goods in all areas, including veterinary medicine. What are the market trends for this category of products today, how is the market segmentation changing and other questions, are answered by the results of the fragmented marketing research presented below.

In the course of the study, an information array of data on antiseptics and disinfectants was formed. It has been revealed that the assortment structure is formed by 37 pharmaceutical companies and 80 trade names (TN), all of which are OTC drugs.

The assortment of drugs was studied according to the number of active substances present in the composition (Fig. 1).



**Fig. 1.** Distribution of target funds, depending on the number of pharmacologically active substances in the composition, %

It has been established that monocomponent drugs account for 63 TN — 79 %; combined (multicomponent) — 17 TN (21 %). Thus, the fact of the priority of monocomponent antiseptics and disinfectants on the domestic market has been confirmed.

The assortment of antiseptics and disinfectants used in veterinary practice was analyzed depending on the country of manufacture (Fig. 2).

It has been revealed that Russian-made drugs account for 54 TN (80 %); Belgium — 9 TN (12 %); France — 1 TN (1 %); Italy — 1 TN (1 %); Bulgaria — 1 TN (1 %); Czech Republic — 2 TN (3 %);

Hungary — 1 TN (1 %); the Republic of Belarus — 1 TN (1 %). Thus, the dominance of Russian targeted drugs on the domestic consumer market has been determined, which is fundamentally different from the situation three years ago [21]. In our opinion, the current picture is primarily determined by the foreign policy situation — the sanctions policy of a number of unfriendly countries. For this reason, the Russian market has lost some of its core imported products, but in contrast to this, domestic manufacturers of antiseptics and disinfectants have become more active, their “product portfolio” has expanded and output has increased.

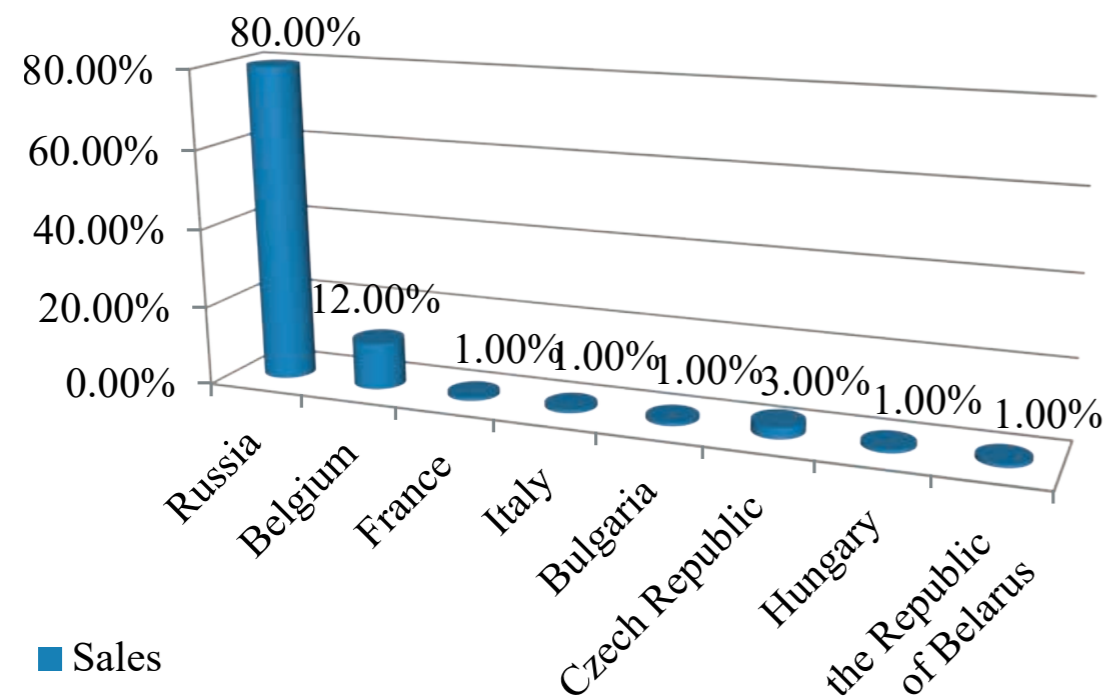


Fig. 2. Segmentation of the target funds market, depending on the country manufacturer, %

Next, the current assortment of antiseptics and disinfectants used in veterinary practice was studied, depending on the manufacturing company (Fig. 3).

It was revealed that JSC plant “Veterinary drugs” produces 13 TN and occupies 16 % of the assortment; company “DeLaval NV” — 6 TH (7 %); “NITA-FARM” LLC and “NVTs Agrovetzashchita S-P” LLC — 4 TN (5 %); pharmaceutical companies: JSC “Agrobioprom”, “CID LINES NV/SA”, “NPO ‘Likom’” LLC, CJSC “NPP ‘Farmaks’”, NPP “Agrofarm” LLC, “SPAZ-pharm” LLC — 3 TN (4 %); pharmaceutical companies: FKP “Armavir Biofactory”, “Fokin Group” LLC, CJSC Beekeeping Plant “Kolomenskiy”, “BioKhimFarm” Firm LLC, “Vettorg” LLC, CJSC “BioPro”, “Bioveta, a. s.”,

CJSC “Rosvetfarm” — 2 TN (3 %) of the studied assortment; pharmaceutical companies: “AVZ S-P” LLC, “Hippocrates” LLC, “Avicenna” LLC, “SANVETPREPARAT-PLUS” LLC, “Trade House ‘BiAgro’” LLC, “Agroservice” LLC, “Tsamaks” LLC, “VETOQUINOL S.A.”, “TOP-VET” LLC, “VIK — Animal Health” IE, “VETPROMAD”, “Pernix Pharma Gyogyszergyarto Kft.”, “PharmPromVet” LLC, “Bio Pharm Garant” LLC, CJSC “Vivaton”, “Haupt Pharma Latina S.r.l.”, “Pharmbiomedservice” LLC, JSC “MEDHIM”, “Orgpolimersintez SPb” LLC are represented by one trade name and occupy 1 % of the assortment.

Thus, JSC plant “Veterinary drugs” today is the absolute leader in the target food market. And, apparent-

ly, this is not accidental. Today, the plant is one of the leaders in the veterinary industry and is a multiple winner of the Exporter of the Year competition, and a number of drugs manufactured by this enterprise are included in the “One Hundred Best Goods of Russia” [22].

The next step was the analysis of the nomenclature of antiseptics and disinfectants by type of form. It has been established that soft forms make up 33 TN (41 %); liquid 42 TN — 52 %; solid 3 TN — 4 %; gaseous 2 TN — 3 % of the total amount of the studied assort-

ment. The dominance of soft and liquid forms is undoubtedly associated with the convenience of their use.

In our opinion, it should be noted that in order to understand the structure of each segment, a detailed study of the identified dominants is required. The study of the assortment of soft forms determined the following results: ointments are 27 TN — 82 %; suppositories — 4 TN — 12 %; gels — 2 TN, which was 6 % of the total number of soft forms. Ointments turned out to be more preferable for the same reason — ease of use.

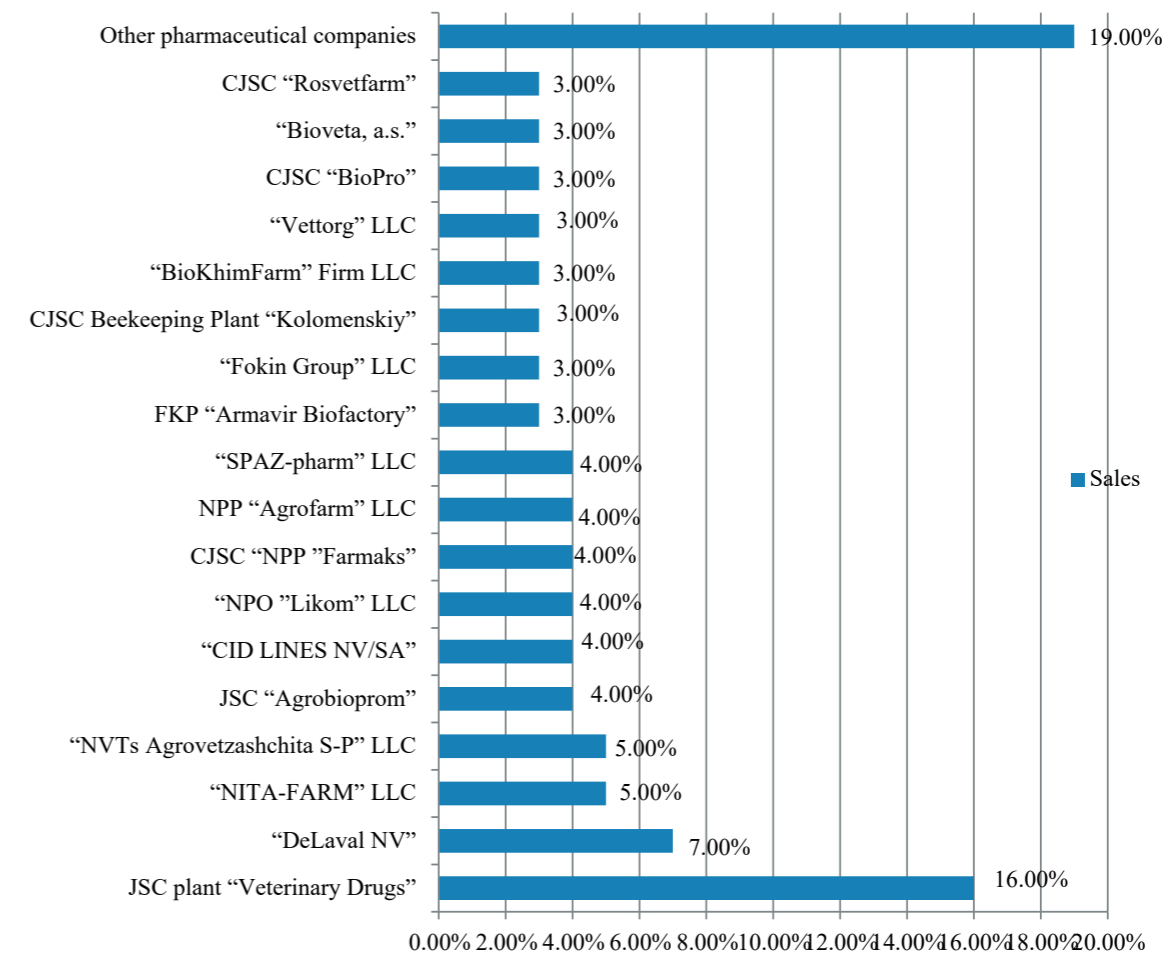


Fig. 3. Segmentation of the target funds market, depending on manufacturer, %

An in-depth study of the assortment of liquid forms revealed the following results. So, extracts for external use are 1 TN (2.5 %); suspensions — 1 TN (2.5 %); shampoos — 3 TN (7 %); solutions for local and external use — 34 TN (80.5 %); ear drops — 1 TN (2.5 %); solutions for parenteral use — 1 TN (2.5 %); tinctures for external use — 1 TN or 2.5 % of the total assortment of studied forms. The dominance of solutions for external use, in our opinion, is determined by their relatively low cost. According to the period of registration of antiseptics and disinfectants in the Russian

Federation, the following results were determined (Fig. 4). Most of all antiseptics and disinfectants were registered in 2018—13 TN (16 %); the smallest number was registered in 2022—2 TN (3 %); in 2021—10 TN (13 %); in 2015—9 TN (11 %); in 2013, 2015 and 2019—8 TN each (10 %); in 2014—7 TN (9 %) each; in 2020—6 TN (7 %); in 2017—5 TN (6 %); in 2012—4 TN (5 %). Since 2018, there has been a downward trend in the process of expanding the existing assortment of targeted drugs, but the picture has changed with the strengthening of anti-COVID measures.

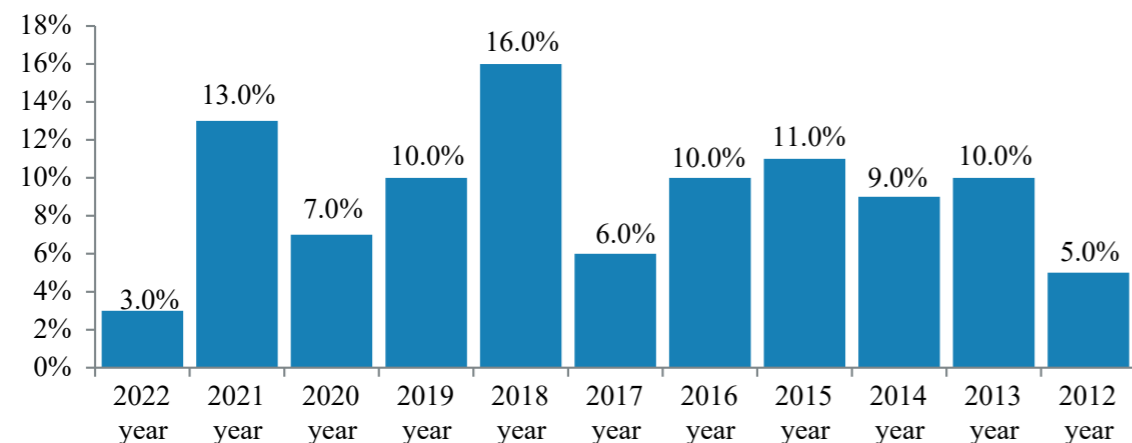


Fig. 4. Segmentation of the target funds market by the years of their registration, %

In turn, there was made a study of the frequency of use of certain targeted drugs in veterinary care for farm, domestic and other types of animals. It has been revealed that drugs for farm animals account for 27 TN (34.0 %); for domestic and farm — 44 TN (55.0 %); only for domestic — 6 TN (7.5 %); not included in the first three groups — 3 TN (3.5 %). Such a picture, in our opinion, completely depends on the form of the target product, which determines the possibility and con-

venience of its use. To visualize the results obtained, a Petal diagram was constructed (Fig. 5).

The presented graph shows that the indicators “OTC”, “Multicomponent formulations”, “Solutions for external use”, “Ointments” and, which is especially important in the context of import substitution, “Russian production” can be confidently considered stable values of the antiseptic and disinfectant market of the Russian Federation.

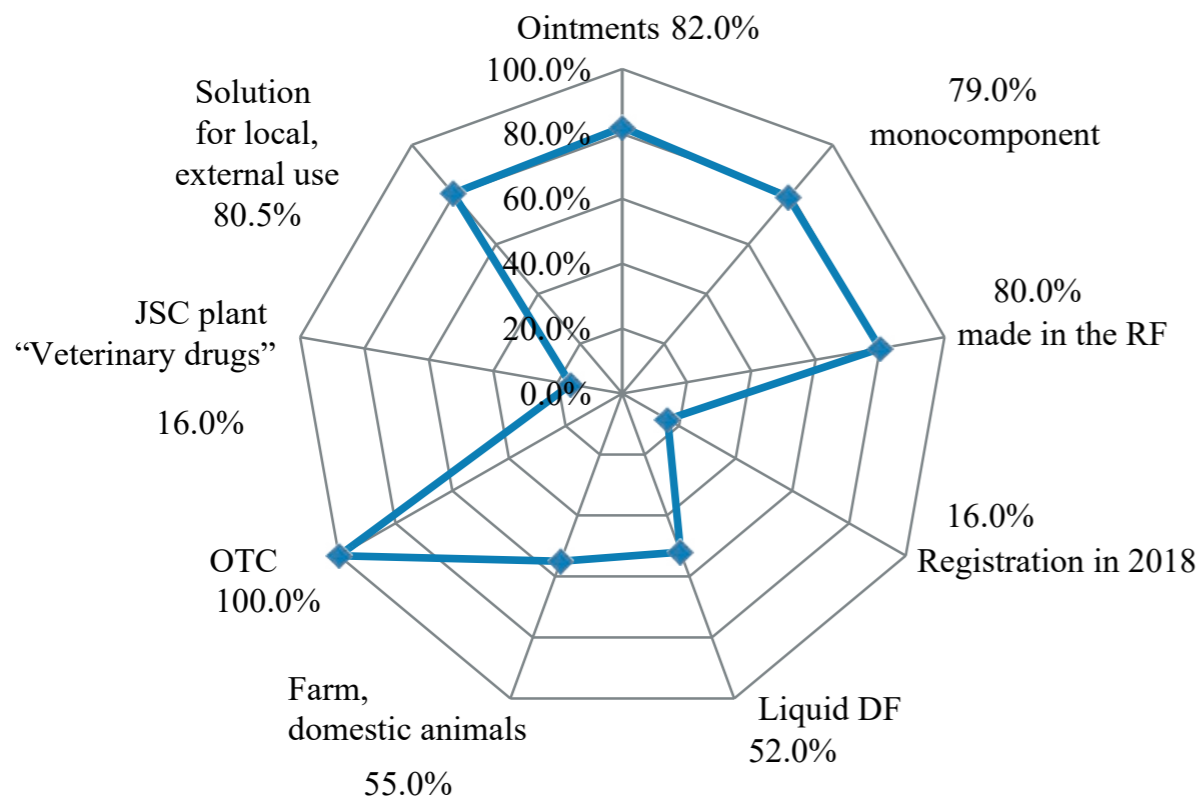


Fig. 5. Distribution of the studied indicators, %

### CONCLUSION

Summarizing the above, it should be noted that today the main share of the domestic market of antiseptics and disinfectants is occupied by Russian-made products — 80 % (leading manufacturer — JSC plant “Veterinary drugs”). Most of them (79 %) are monocomponent (according to the active substance) liquid and soft forms (52 % and 41 %, respectively) with the dominance of solutions for local and external use — 80.5 %. Among the target products, there are drugs used for farm animals (34.0 %), for domestic and farm (55.0 %), only for domestic (7.5 %), etc.

The increase in new registered drugs in these groups in 2022 was 3 %, which was significantly lower than the maximum in 2018 (16 %).

The conducted fragmentary marketing research of the Russian market of antiseptics and disinfectants for veterinary use by pharmacotherapeutic groups, the number of active substances included in the target products, the relation to the country of manufacture, the manufacturing company, the type of dosage form, the period of registration and objects of veterinary use allows to ensure the awareness of specialists, expand their professional horizons and, as a result, improve the coordination of material, labor and financial assets of the veterinary organization and its activities as a whole.

### REFERENCES

1. Federal Law dtd. April 12, 2010 No. 61-FZ “On the Circulation of Medicines” [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_99350/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/) Date of access — 19.10.2022.
2. State Register of Medicines for Animals Electronic resource: <https://irena.vetr.ru/irena> Date of access — 19.10.2022.
3. Russia has all the necessary veterinary drugs... Electronic resource: <https://ria.ru/20220913/preparaty-1816389523.html> Date of access — 19.10.2022.
4. Belousova O. V., Karasev M. M., Belousov E. A. Marketing analysis of the assortment of homeopathic drugs for veterinary use // Derzhavinskiy Forum. — 2021. — V. 5. — No. 20. — P. 167—174.
5. Belousov E. A., Belousova O. V., Karasev M. M. Analysis of the assortment of anthelmintic drugs for veterinary use // Derzhavinskiy Forum. — 2022. — V. 6. — No. 20. — P. 178—189.
6. Belousov E. A., Belousova O. V., Karasev M. M., Kostenko E. I., Petukhova E. P. Study of the assortment of non-narcotic analgesics for veterinary use // Nauchnyy zhurnal “Ekonomika. Sotsiologiya. Pravo” (Scientific journal “Economics. Sociology. Law”). Bryansk: BGU (BSU). — 2022. — No. 1 (25). — P. 9—15.
7. Actual aspects of the choice of disinfectants: problems and solutions. Electronic resource: <https://cyberleninka.ru/article/n/kontent-analiz-kak-metod-issledovaniya-dostoinstva-i-ogranicheniya> Date of access — 17.11.2022.
8. Zotov A. A. The productivity of broiler chickens depending on the modes of pre-hatching processing of eggs. Electronic resource: [http://www.vnitip.ru/netcat\\_files/78/203/diss41\\_d.pdf](http://www.vnitip.ru/netcat_files/78/203/diss41_d.pdf) Date of access — 17.11.2022.
9. Koshich I. I., Naydenskiy M. S., Bushina O. A., Pugovkina N. V. Use of a new generation bactericidal agent “Bitsin” for the disinfection of hatching eggs of chickens and objects of veterinary clinics. Electronic resource: <https://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-bakteritsidnogo-sredstva-novogo-pokoleniya-bitsin-dlya-dezinfektsii-inkubatsionnyh-yaits-kur-i-obektov-veterinarnyh-klinik> Date of access — 17.11.2022.
10. Market analysis of disinfectants in Russia in 2017—2021, forecast for 2022—2026 Import substitution potential and new sales markets. Electronic resource: [https://businessstat.ru/images/demo/disinfectants\\_russia\\_demo\\_businessstat.pdf](https://businessstat.ru/images/demo/disinfectants_russia_demo_businessstat.pdf) Date of access — 17.11.2022.
11. Market research for antiseptics and hygiene products in the context of the coronavirus pandemic: the peak of demand has passed, but growth will continue. Electronic resource: [https://www.megaresearch.ru/news\\_in/issledovanie-rynka-antiseptikov-i-gigienicheskikh-sredstv-v-usloviyah-pandemii-koronavirusa-pik-sprosa-proyden-no-rost-sohranitsya-1544](https://www.megaresearch.ru/news_in/issledovanie-rynka-antiseptikov-i-gigienicheskikh-sredstv-v-usloviyah-pandemii-koronavirusa-pik-sprosa-proyden-no-rost-sohranitsya-1544) Date of access — 18.11.2022.
12. Ibragimova, G. Ya. Marketing research of personal protective equipment: antiseptic agents / G. Ya. Ibragimova, G. R. Iksanova, A. D. Muratolieva // Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny (Bulletin of modern clinical medicine). — 2021. — V. 14, no. 2. — P. 21—25.
13. Antiseptics and disinfectants: a review of the drug market. Electronic resource: <https://zooinform.ru/business/articles/antiseptiki-i-dezinfektanty-obzor-rynka-preparatov/> Date of access — 17.11.2022.
14. Global market analysis of antiseptics and disinfectants. Electronic resource: <https://alfahimgroup.ru/blog/2020/05/29/globalnyj-analiz-rynka-antiseptikov-i-dezinficiruyushhih-sredstv/> Date of access — 18.11.2022.
15. Current state of the market for disinfectants. Electronic resource: <http://dezreestr.ru/dddusl.html> Date of access — 18.11.2022.
16. Market research of disinfectants and antiseptics. Electronic resource: <https://www.mazm.ru/article/a-1979.php> Date of access — 18.11.2022.
17. Content analysis as a research method: advantages and achievements. Electronic resource: <https://cyberleninka.ru/article/n/kontent-analiz-kak-metod-issledovaniya-dostoinstva-i-ogranicheniya> Date of access — 19.10.2022.
18. Structural analysis. Electronic resource: [https://forecasting.svetunkov.ru/etextbook/forecasting\\_toolbox/data-analysis/](https://forecasting.svetunkov.ru/etextbook/forecasting_toolbox/data-analysis/) Date of access — 19.10.2022.
19. Modern forecasting. Electronic resource: [https://studopedia.ru/2\\_109925\\_strukturniy-analiz.html](https://studopedia.ru/2_109925_strukturniy-analiz.html) Date of access — 19.10.2022.

20. Tasks, functions and methods of analytical research. Electronic resource: <https://cyberleninka.ru/article/n/zadachi-funktsii-i-metodika-provedeniya-analiticheskikh-issledovaniy> Date of access — 19.10.2022.

21. Production of veterinary drugs in Russia: problems and prospects. Electronic resource: <https://pticainfo.ru/news/>

proizvodstvo-veterinarykh-preparatov-v-rossii-problemy-i-perspektivy/ Date of access — 19.10.2022.

22. Plant “Veterinary drugs” — continuity of generations and stability of quality. Electronic resource: <https://zembra-tv.ru/novosti/biznes/zavod-veterinarye-preparaty-preemstvennost-pokoleniy-i-stabilnost-kachestva/> Date of access — 18.11.2022.

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**E. A. Belousov** — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor;

**E. O. Novikova** — Student;

**O. V. Belousova** — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Lecturer;

**M. M. Karasev** — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor;

**Yu. A. Vatnikov** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of the Department;

**N. V. Sakhno** — Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor;

**O. O. Novikov** — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor.

The article was submitted 20.03.2023.

## ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОБИОХИМИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Научная статья

УДК 619:615.9:616—097

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.105

### АНАЛИЗ АДАПТАЦИОННОГО РЕЗЕРВА КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНЬЕВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ Т-2 ТОКСИКОЗА БЕЛЫХ КРЫС

Наиля Наримановна Мишина<sup>✉</sup>, Эдуард Ильясович Семенов,  
Алмаз Рафаильевич Валиев, Зухра Халимовна Сагдеева, Елена Георгиевна Губеева,  
Ксения Витальевна Перфилова

*Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, Россия, mishinanailyan@yandex.ru<sup>✉</sup>*

**Аннотация.** Распространенной и сложно решаемой проблемой, приводящей к возникновению экономического ущерба в современном сельском хозяйстве всего мира, по-прежнему остается загрязнение продовольственных культур микотоксинами. Существует ряд особо опасных микотоксинов, в число которых входит трихотеценовый микотоксин — Т-2 токсин. В связи с нарушением технологий переработки, заготовки, транспортировки и хранения кормов данный микотоксин может попасть через продукцию животноводства и птицеводства в организм человека, что представляет для него угрозу. Воздействие Т-2 токсина на организм в целом приводит к клеточной гибели в кроветворных и иммунокомпетентных органах, что сопровождается изменениями гематологической картины крови, угнетением иммунитета. Вследствие этого, целью исследования является изучение состояния естественной резистентности белых крыс под действием Т-2 токсина при лечении сывороткой, содержащей поликлональные антитела. В ходе исследования способа профилактики и лечения микотоксикоза, на основании анализа лейкоцитограммы, морфологического анализа селезенки, параметров неспецифической резистентности, была установлена эффективность применения сыворотки, содержащей поликлональные антитела на конъюгат Т-2-БСА.

**Ключевые слова:** микотоксины, Т-2 токсин, поликлональные антитела, сыворотка, крысы, неспецифический иммунитет

По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (ФАО), около 25 % продовольственных культур во всем мире заражены микотоксинами [1—7], что приводит к значительным экономическим потерям. Т-2 токсин относится к трихотеценовым микотоксинам типа А и является одним из самых опасных токсинов для здоровья животных [8, 9]. Данный микотоксин представляет угрозу и для людей, попадая по пищевой цепи в их организм, что впоследствии через ингибирование синтеза белка вызывает поражение желудочно-кишечного тракта токсической алеутской болезнью и болезнью Кашина-Бека [10]. Т-2 токсин также вызывает апоптоз клеток, в том числе в кроветворных и иммунокомпе-

тентных органах — тимусе и селезенке [11—14]. Данный процесс сопровождается изменениями гематологической картины крови (лейкоцитопения, анемия, тромбоцитопения и др.) и проявлением иммуносупрессорной активности [15, 16]. Как и большинство микотоксинов, Т-2 токсин нарушает структуру слизистых оболочек, опосредованно отрицательно влияет на состояние общей резистентности животных к патогенным микроорганизмам и специфическим агентам, которую определяют неспецифические гуморальные и клеточные факторы. Ученые во всем мире ищут эффективные способы лечения и профилактики Т-2 токсикоза животных. В ходе поиска разработаны различные методы снижения количества как самих микотоксинов в кор-

мах, так и вызванных ими токсических эффектов в организме, в том числе и на иммунную систему. Среди данных научных разработок нет способов профилактики и лечения, основой которых является сыворотка, содержащая специфические компоненты именно к самому Т-2 токсину. К таким компонентам можно отнести поликлональные антитела с бычьим сывороточным альбумином, полученные к Т-2 токсину, что и определило цель наших исследований.

Целью исследования явилось изучение состояния естественной резистентности белых крыс под действием Т-2 токсина при лечении сывороткой, содержащей поликлональные антитела.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для получения сыворотки, содержащей поликлональные антитела, самцов белых крыс иммунизировали конъюгатом Т-2 токсина с бычьим сывороточным альбумином (БСА) по трехкратной схеме иммунизации с интервалом 3 недели. Для первой иммунизации готовили суспензию, состоящую из конъюгата Т-2-БСА, раствора Рингера, полного адьюванта Фрейнда.

Для последующих иммунизаций использовали неполный адьювант Фрейнда. На 14 сутки от последней инъекции от исследуемых крыс методом декапитации отбирали кровь, а также отделяли сыворотку стандартным методом.

Для постановки эксперимента было сформировано 4 группы белых крыс массой 130,0—140,0 г по принципу аналогов, используя в качестве критерия формирования массу тела с разницей  $\pm 10\%$ , по 8 животных в каждой. Животные были получены из питомника ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и перед введением в эксперимент проходили двухнедельный период акклиматизации в условиях вивария. Во время акклиматизации и эксперимента крысы имели свободный доступ к воде и корму. Содержание, кормление и манипуляции проводили в соответствии с принципами лабораторной практики в Российской Федерации [17].

Первая группа животных была контрольная, крысам второй группы вводили Т-2 токсин в дозе 1/10 ЛД<sub>50</sub>, третья опытная группа получала микотоксин в той же дозе и лечение — инъекции сыворотки 0,3 см<sup>3</sup> на кг массы тела, содержащей поликлональные антитела в начале опыта и повторно на 10 и 20 сутки эксперимента, четвертой инъекцировали сыворотку от интактных белых крыс в аналогичной дозе и по той же схеме.

В конце эксперимента по 6 крыс с группы умерщвляли методом декапитации и отбирали кровь для гематологических и иммунологических исследований, а также образцы внутренних органов для проведения гистологических исследований. Для гистологических исследований образцы органов фиксировали в буферном растворе 10%-ного формалина, затем обезживали и осуществляли заливку в парафин по схеме Волковой — Елецкова (1996). Окраску гистопрепаратов проводили гематоксилин-эозином по Ганзену [18]. Гистологические срезы просматривали в световом микроскопе Leica DM 1000 с цифровой камерой Leica DFC320 (Германия).

Для заправки животных использовали Т-2 токсин кристаллической формы производства Sigma-Aldrich (США). Морфологический анализ крови проводили на гематологическом анализаторе «Mythic 18 Vet» (Франция). Бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) определяли по методике Смирновой О. В., Кузьминовой Т. А. (1966) [19], лизоцимную активность (ЛАСК) нефелометрическим методом по Дорофейчуку В. Г. (1968) [20], фагоцитарную активность лейкоцитов (ФА), индекс (ФИ) по методике Кост С. А., Стенко М. И. (1968) [21]. Лейкоцитарную формулу определяли путем подсчета отдельных форм лейкоцитов в окрашенных по Романовскому-Гимзе мазках крови, затем рассчитывали лейкоцитарные индексы [22].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали общепринятым методом вариационной статистики с применением критерия достоверности по Стьюденту с использованием специальных программ [23, 24].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Большую роль в сохранении вне- и внутриклеточного гомеостаза организма животных играют лейкоциты, участвующие в обезвреживании различных токсинов как экзогенного, так и эндогенного происхождения.

Анализ данных лейкоцитарного профиля крови (в том числе лейкоцитарных индексов) является одним из инструментов оценки степени выраженности эндогенной интоксикации в организме животных и человека, и позволяет судить о работе иммунной системы, состоянии формирования неспецифических адаптационных реакций [25]. Но помимо значения числа лейкоцитов, важным специфическим маркером активности воспалительного процесса является исследование других показате-

телей лейкоцитарного звена, которые могут быть более чувствительными и специфичными [26].

В таблице 1 представлены данные лейкограммы и подсчета лейкоцитарных индексов в крови белых крыс в условиях экспериментального микотоксикоза на фоне лечения сыворотками, содержащими поликлональные антитела.

В лейкограмме наблюдали значительные изменения, что свидетельствует о воздействии микотоксина на клетки крови и органы лейкопоза, а также говорит о наличии признаков эндогенной интоксикации в организме крыс.

Индекс Кребса (ИК) или нейтрофильно-лимфоцитарный индекс — это отношение общего числа нейтрофилов к числу лимфоцитов крови. Индекс отражает соотношение неспецифической и специфической защиты организма. Т-2 токсин разрушающе действует на клетки крови и органы лейкопоза, при этом возникает состояние иммунодефицита, имеет место быть как массивная гибель лимфо-

цитов, так и нарушение процесса лимфопоэза [27, 28]. Так, индекс Кребса во второй группе был в 3,4 раза выше ( $p < 0,01$ ), чем в группе контроля, при применении терапии в третьей группе данный показатель был выше в 1,47 раза, четвертой — 1,6 раза ( $p < 0,05$ ).

Нейтрофилы играют одну из ключевых ролей в реализации неспецифической резистентности организма и нарушение их содержания можно рассматривать как одну из причин хронизации воспаления. Изменение количества нейтрофильных гранулоцитов приводит к дегенеративному ядерному сдвигу влево и лейкоцитарному сдвигу клеток крови, являясь следствием развития эндогенной интоксикации. Истощение основной популяции лейкоцитов периферической крови — сегментоядерных нейтрофилов приводит к активации второй линии защиты — лимфоцитов. Резерв лимфоцитарного звена не безграничен, что провоцирует уменьшение содержания лимфоцитов в периферической крови.

Таблица 1

Лейкограмма крови белых крыс в ходе эксперимента ( $M \pm m; n = 6$ )

Показатель	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	14,00 ± 1,00	9,32 ± 1,10**	11,56 ± 0,90*	9,80 ± 0,80*
Базофилы, %	0	0	0	0
Эозинофилы, %	1,22 ± 0,29	2,22 ± 0,43*	3,20 ± 0,64**	2,4 ± 0,47*
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0 ± 0	7 ± 2,15**	3,2 ± 1,18*	6 ± 2,46*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	34,8 ± 3,84	56,4 ± 5,12**	40,00 ± 0,05	51,00 ± 6,23*
Лимфоциты, %	60 ± 0,79	32 ± 6,12**	50,6 ± 7,29	38 ± 8,15*
Моноциты, %	4 ± 0,81	2,4 ± 0,69*	3,0 ± 1,12	2,6 ± 0,98
ИК	0,58 ± 0,01	1,98 ± 0,42**	0,85 ± 1,06	1,50 ± 0,37*
ЛИИ	0,53 ± 0,01	1,73 ± 0,35**	0,76 ± 0,82	1,33 ± 0,36*
ЯИ	0,11 ± 0,05	0,17 ± 0,02**	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,02*
ИСЛК	0,56 ± 0,07	1,91 ± 0,38**	0,87 ± 0,54	1,46 ± 0,39*
ЛИ	1,72 ± 0,06	0,50 ± 0,26**	1,17 ± 0,28	0,67 ± 0,33*
ИСНМ	8,70 ± 0,46	26,42 ± 5,51**	14,40 ± 8,12	21,92 ± 3,18**
ИСЛМ	15,00 ± 0,33	13,33 ± 0,41*	15,87 ± 0,49	14,62 ± 0,52

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$  — в сравнении с группой контроля

Лейкоцитарный индекс (ЛИ) — это обратный показатель индексу Кребса и представляет собой отношение количества (%) лимфоцитов к нейтрофилам (палочкоядерные, сегментоядерные), а также отражает взаимоотношения гуморального и клеточного звеньев иммунной системы. Дисбаланс данного взаимоотношения был менее выражен в группе, где проводили терапию сывороткой.

Так, ЛИ в лейкограмме крыс второй группы относительно данных контроля был ниже в 3,44 раза ( $p < 0,01$ ), третьей в 1,47, четвертой — 2,58 раза ( $p < 0,05$ ).

Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) (%) представляет собой отношение клеток, уровень которых повышается при воспалительных процессах (нейтрофильных лейкоцитов), к клеткам, количество которых при этих процессах снижается (лимфоцитам, моноцитам, эозинофилам). Повышение показателя ЛИИ на фоне низкого уровня лейкоцитарного индекса относительно группы контроля указывает на развитие иммунодефицитного состояния и повышении степени эндогенной интоксикации у животных, отравленных микотоксинами. ЛИИ в лейкограмме крыс второй группы был выше относительно данных контроля в 3,26 раза ( $p < 0,01$ ), третьей в 1,43, четвертой — 2,5 раза ( $p < 0,05$ ).

Ядерный индекс Даштаянца Г. Д. (ЯИ) — это отношение общего количества (%) моноцитов и палочкоядерных нейтрофилов к уровню сегментоядерных нейтрофилов. Цитолиз сегментоядерных нейтрофилов и регенерация палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов приводит к омоложению популяции нейтрофилов. Но молодые формы нейтрофилов не могут полноценно функционировать, продуцировать андезины, но содержат меньше специфических гранул, которые включают в свой состав антимедиаторы и соответственно снижают эффективность фагоцитоза, что способствует хронизации воспаления. При сравнении ЯИ животных опытных и контрольной групп установлено, что данный показатель статистически значимо возрастает в группах крыс, где травил микотоксином без лечения ( $p < 0,01$ ), и где лечили микотоксикоз интактной сывороткой на 54 % ( $p < 0,05$ ), в то время как, где лечили поликлональной сывороткой, данное значение было выше на 45 % по сравнению с данными контроля.

Лимфоцито- и моноцитопения также сказалась на индексе сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК), что привело к его увеличению. ИСЛК представляет собой отношение суммы эозинофилов, базофилов

и нейтрофилов (палочкоядерные + сегментоядерные) к сумме моноцитов и лимфоцитов (%) и характеризует соотношение гранулоцитов и агранулоцитов. При микотоксикозе регистрировали увеличение данного показателя из-за развития интоксикации. Так, величина ИСЛК 2 группы превышала показатель группы контроля в 1,6—3,4 раза ( $p < 0,01$ ), где максимальное значение было в группе без лечения.

В нашем эксперименте при микотоксикозе наблюдали лимфоцито- и моноцитопению, тем интереснее данные по индексу соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ), который отражает взаимоотношения афекторного и эффекторного звеньев иммунологического процесса и представляет собой баланс между лимфоцитами и моноцитами. Моноциты при действии токсинов мигрируют в ткани организма и дифференцируются в макрофаги, и совместно с лимфоцитами участвуют в процессе распознавания антигенов. Значение данного показателя при микотоксикозе составило  $13,33 \pm 0,41$  ( $p < 0,05$ ) и группе лечения интактной сывороткой при микотоксикозе  $14,62 \pm 0,52$ , против  $15,00 \pm 0,33$  в группе контроля, при лечении поликлональной сывороткой изменения носили менее выраженный характер.

Индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов (ИСНМ) говорит о соотношении компонентов микрофагально-макрофагальной системы. Величина ИСНМ достоверно изменялась в ходе экспериментального микотоксикоза во второй группе в сторону увеличения по сравнению со значением контроля в 3 раза ( $p < 0,01$ ), в третьей при лечении поликлональной сывороткой в 1,7 раза, и при лечении интактной сывороткой — 2,5 раза ( $p < 0,01$ ). Вероятно, это обусловлено тем, что ведущую роль в реализации воспалительного процесса играли нейтрофилы.

Лейкоцитограмма и рассчитанные лейкоцитарные индексы у леченных животных говорят о снижении уровня эндотоксинов, восстановлении функциональных возможностей системы иммунитета.

Гуморальные и клеточные звенья неспецифического иммунитета являются первой линией защиты и действуют в течение всего периода борьбы организма с токсинами. От их состояния зависят клинический статус и продуктивность животных. Для анализа состояния гуморальной активности естественного иммунитета были исследованы такие показатели как лизоцимная, бактерицидная и фагоцитарная активности и фагоцитарный индекс (табл. 2).

Таблица 2

Показатели неспецифической резистентности белых крыс в ходе эксперимента ( $M \pm m; n = 6$ )

Показатель	Группа			
	1	2	3	4
ФА, %	$64,30 \pm 3,22$	$51,88 \pm 3,24^*$	$57,74 \pm 3,96$	$54,53 \pm 2,99^*$
ФИ	$7,15 \pm 0,74$	$5,75 \pm 0,72$	$6,45 \pm 0,84$	$6,09 \pm 0,78$
ЛАСК, %	$40,56 \pm 2,16$	$33,75 \pm 1,92^*$	$37,40 \pm 2,00$	$35,94 \pm 2,18$
БАСК, %	$22,44 \pm 0,81$	$17,86 \pm 0,74^{**}$	$20,17 \pm 0,82$	$18,76 \pm 0,90^{**}$

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$  — в сравнении с группой контроля

Под действием Т-2 токсина у фагоцитарных клеток происходило нарушение функциональных свойств, что проявилось в изменении у них миграционной, хемотаксической, адгезивной, ферментативной и бактерицидной активности. Увеличение незавершенности фагоцитоза способствовало снижению фагоцитарного индекса. Нейтрофилы крыс, получавших Т-2 токсин, показали значительное снижение фагоцитарной активности по сравнению с таковой у крыс контрольной группы на 19,3 % ( $p < 0,05$ ), применение лечения приводило к восстановлению данного показателя. Аналогичная тенденция прослеживалась при определении фагоцитарного индекса.

Лизоцим представляет собой фермент (ацетилмурамидаза), который участвует с секреторными иммуноглобулинами в формировании местного иммунитета, стимуляции фагоцитоза нейтрофилов и макрофагов, проявляет антимикробное действие через разрушение липополисахаридных поверхностных слоев клеточных стенок бактерий.

Активность лизоцима в сыворотке крови животных токсической (второй) группы по сравнению с контрольной группой была ниже на 16,8 % ( $p < 0,05$ ) в группе, где лечили сывороткой с поликлональными антителами на 7,8 %. Так как лизоцим при инфекционных заболеваниях стимулирует процессы фагоцитоза, соответственно его снижение обуславливает иммуносупрессивное действие микотоксинов.

Из-за действия микотоксина на белковые компоненты, такие как простые белки (трансферрин, интерферон, лизоцим, интерлейкин-1, -6, -8, лактоферрин, фактор некроза опухоли, фибронектины, фактор активации тромбоцитов), белки острой фазы воспаления (фибриноген, гаптоглобин,

С-реактивный белок и др.), сложные белки (комplement, фибринопептиды), происходит снижение бактерицидной активности сыворотки (БАСК), которая восстанавливается на фоне лечения. Так, снижение БАСК имело отличие от значения группы контроля во второй группе на 20,4 % ( $p < 0,01$ ), в третьей — 10,1 %, четвертой 16,4 % ( $p < 0,01$ ).

При микотоксикозе происходит мобилизация адаптационных механизмов в организме, что приводит к деструктивным изменениям в кроветворных органах. При исследовании гистологических препаратов селезенки крыс 2 группы выявлено снижение полнокровия красной пульпы, белая пульпа разрежена вокруг сосудов, скопление лимфоцитов, единичные фолликулоподобные структуры (рис. 1).

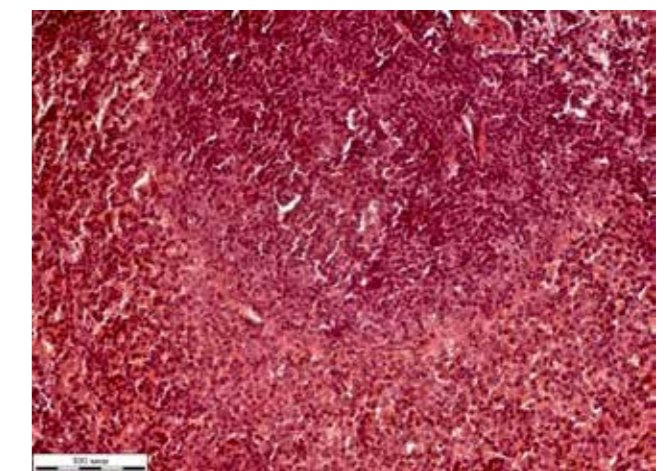
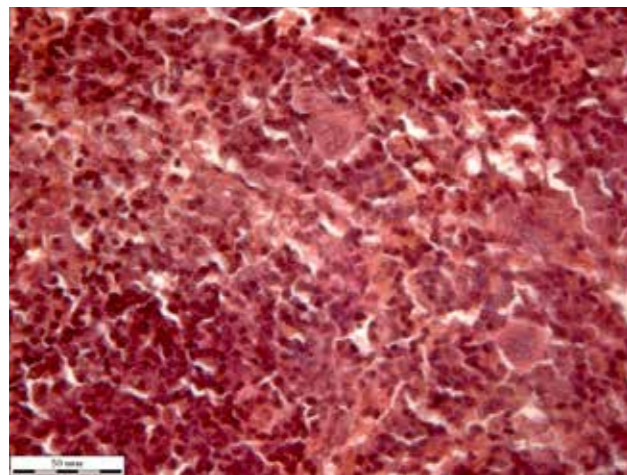


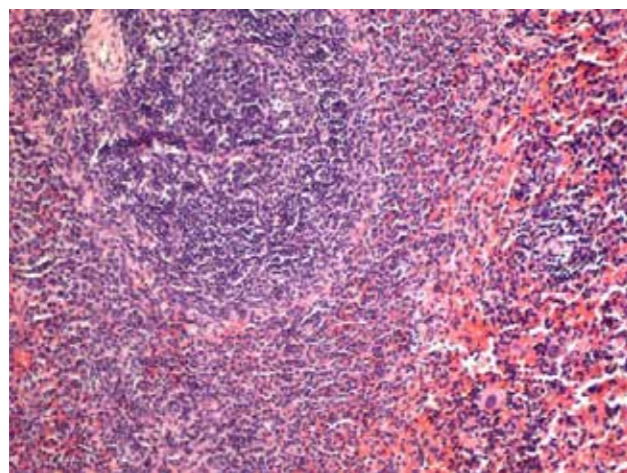
Рис. 1. Селезенка крысы при Т-2 микотоксикозе, окраска гематоксилином Эрлиха и эозином водным. Увеличение  $\times 20$

Аналогичные изменения прослеживались в группе крыс, где микотоксикоз лечили интактной сывороткой (рис. 2).



**Рис. 2.** Селезенка крысы при Т-2 микотоксикозе на фоне лечения интактной сывороткой, окраска гематоксилином Эрлиха и эозином водным. Увеличение x20

В селезенке крыс первой и третьей групп наблюдаются признаки полнокровия красной пульпы, в белой пульпе признаков разрежения структуры не обнаружено (рис. 3, 4).

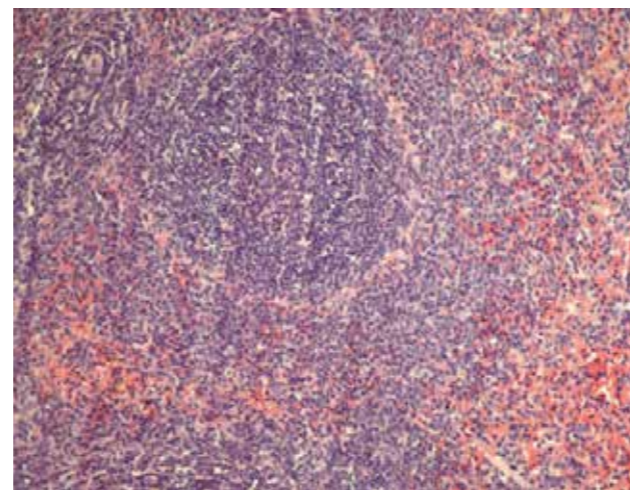


**Рис. 3.** Селезенка при Т-2 микотоксикозе на фоне лечения сыворотки, содержащей поликлональные антитела. Окраска гематоксилином Эрлиха, эозином водным. Увеличение x20

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашем исследовании были подтверждены данные о иммунодепрессивном действии Т-2 токсина, проявляющимся угнетением факторов клеточного и гуморального иммунитета. Показана значимость прогнозирования нарушений иммунной системы по результатам оценки лейкоцитарных индексов. Установлена эффективность применения сыворотки, содержащей поли-

клональные антитела к конъюгату Т-2 — БСА на основании анализа лейкоцитограммы, морфологического анализа селезенки, параметров неспецифической резистентности.



**Рис. 4.** Селезенка крысы биологического контроля. Окраска гематоксилином Эрлиха, эозином водным. Увеличение x20

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Wild C. P. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue / C. P. Wild, Y. Y. Gong // *Carcinogenesis*. — 2010. — Vol. 31. — P. 71—82.
2. Eskola M. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited «FAO estimate» of 25 % / M. Eskola, G. Kos, C. T. Elliott [et al.] // *Critical reviews in food science and nutrition*. — 2020. — Vol. 60 (16). — P. 2773—2789.
3. Тарасова Е. Ю. Изучение сорбционной активности нанотрубок галлуазита по отношению к зеараленону и охратоксину А / Е. Ю. Тарасова // *Вестник Марийского государственного университета. Серия Сельскохозяйственные науки. Экономические науки*. — 2021. — Т. 7. — № 1. — С. 71—76.
4. Сагдеев Д. Р. Токсичность свинца и Т-2 токсина при их совместном поступлении в организм животных / Д. Р. Сагдеев // *Ветеринарный врач*. — 2021. — № 6. — С. 61—65.
5. Сагдеева З. Х. Оценка общей токсичности кормов Республики Татарстан / З. Х. Сагдеева, О. К. Ермолаева, А. Р. Валиев [и др.] // *Ветеринарный врач*. — 2020. — № 5. — С. 59—65.
6. Мишина Н. Н. Профилактическая эффективность лигнин- и полисахаридсодержащих энтеросорбентов при сочетанном Т-2 и афлатоксикозе: специальность 16.00.04 «Ветеринарная фармакология с токсикологией»: дис. ... канд. биол. наук / Мишина Наиля Наримановна; Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных. — Казань, 2008. — 156 с.

7. Мишина Н. Н. Применение конъюгата Т-2 токсина с полилизинном для обнаружения Т-2 токсина в конкурентном ИФА / Н. Н. Мишина, Э. И. Семенов, К. Х. Папуниди // *Ветеринарный врач*. — 2017. — № 4. — С. 33—40.

8. Mclachlan A. Production of trichothecene mycotoxins by Australian *Fusarium* species / A. Mclachlan, K. J. Shaw, A. D. Hocking [et al.] // *Food additives contaminants*. — 1992. — Vol. 9. — P. 631—638.

9. Тарасова Е. Ю. Изыскание средств для лечения животных при Т-2 микотоксикозе: специальность 06.02.03 «Ветеринарная фармакология с токсикологией», 06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология микология с микотоксикологией и иммунология»: дис. ... канд. биол. наук / Тарасова Евгения Юрьевна; ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных». — Казань, 2010. — 209 с.

10. Lei R. Prevalence of selenium, T-2 Toxin, and deoxynivalenol in Kashin-Beck disease areas in Qinghai Province, Northwest China. / R. Lei, N. Jiang, Q. Zhang [et al.] // *Biological trace element research*. — 2016. — Vol. 171. — P. 34—40.

11. Semenov E. I. Effect of bee brood and zeolite on broiler chickens exposed by mycotoxin T-2 / E. I. Semenov, N. N. Mishina, V. R. Saitov [et al.] // *Natural volatiles and essential oils*. — 2021. — Т. 8. — № 4. — С. 3520—3531.

12. Перфилова К. В. Обоснование компонентного состава комплексного средства «Цеапитокс» в отношении Т-2 токсина в опытах *in vitro* / К. В. Перфилова, Н. Н. Мишина, Э. И. Семенов // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. — 2021. — Т. 247. — № 3. — С. 208—212.

13. Идиятов И. И. Изучение токсического действия трихотеценового микотоксина продуцента *Fusarium sporotrichioides* в опыте на свиньях / И. И. Идиятов, И. Р. Кадиков, В. Р. Сaitov [и др.] // *Юг России: экология, развитие*. — 2022. — Т. 17. — № 1 (62). — С. 62—79.

14. Семенов Э. И. Фармако-токсикологические аспекты применения энтеросорбентов при сочетанных микотоксикозах: специальность 06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология микология с микотоксикологией и иммунология», 06.02.03 «Ветеринарная фармакология с токсикологией»: дис. ... д-ра ветеринар. наук / Семенов Эдуард Ильясевич; ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринар. медицины имени Н. Э. Баумана». — Казань, 2019. — 317 с.

15. Influence of low-level exposure to fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine / B. A. Rotter, B. K. Thompson, M. Lessard [et al.] // *Fundamental and Applied toxicology*. — 1994. — Vol. 23. — No 1. — P. 117—124.

16. Bondy G. S. Immunomodulation by fungal toxins / G. S. Bondy, J. J. Pestka // *Journal of toxicology and envi-*

*ronmental health. Part B*. — 2000. — Vol. 3. — No 2. — P. 109—143.

17. *ГОСТ 33044—2014*. Межгосударственный стандарт. Принципы надлежащей лабораторной практики = Principles of good laboratory practice: национальный стандарт Российской Федерации: внесен Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии: принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 20 октября 2014 г. N71-П): дата введения 2015—08—01 / Подготовлен Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5. — М.: Стандартинформ, 2019. — 16 с.

18. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. — Л.: Медицина, 1996. — 423 с.

19. Смирнова О. В. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейлометрии / О. В. Смирнова, Т. А. Кузьмина // *ЖМЭИ*. — 1966. — № 4. — С. 8—11.

20. Дорофейчук В. Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом / В. Г. Дорофейчук // *Лаб. дело*. — 1968. — № 1. — С. 28—30.

21. Кост С. А. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов / С. А. Кост, М. И. Стенко // *Клиническая гематология животных*. — М.: Колос, 1974. — С. 99—100.

22. Сперанский И. И. Общий анализ крови — все ли его возможности исчерпаны? Интегральные индексы интоксикации, как критерии оценки тяжести течения эндогенной интоксикации, ее осложнений и эффективности проводимого лечения / И. И. Сперанский, Г. Е. Самойленко, М. В. Лобачева // *Острые и неотложные состояния в практике врача*. — 2009. — № 6 (19). — С. 3—12.

23. *ГОСТ 34100.1—2017*. Неопределенность измерения. Введение в руководства по выражению неопределенности измерения. (ISO/IEC Guide 98—1:2009, Uncertainty of measurement — Part 1: Introduction to the expression of uncertainty in measurement, IDT: внесен Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт): принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 14 июля 2017 г. No 101 -П) / Подготовлен Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 125 «Статистические методы в управлении качеством продукции» на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии международного документа, указанного в пункте 5. — М.: Стандартинформ, 2018. — 28 с.

24. *ГОСТ Р 8.736—2011*. Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов из-



мерений. Основные положения: разработан Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева» (ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»): внесен Управлением метрологии Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии: утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. N1045-ст: введен впервые. — М.: Стандартинформ, 2013. — 24 с.

25. Шахов А. Г. Влияние интерферонсодержащих препаратов на гематологическое звено иммунитета у поросят в ранний постнатальный период / А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, Ю. Ю. Владимирова // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2022. — № 1(18). — С. 115—126. — DOI: 10.17238/issn2541-8203.2022.1.115

26. Использование интегральных лейкоцитарных индексов для оценки воспалительного процесса, эндо-

генной интоксикации и иммунологической реактивности у поросят при желудочно-кишечных болезнях и эффективности проводимой терапии / С. В. Шабунин, А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2022. — № 4. — С. 35—42. — DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202204004

27. Дерхо М. А. Интегральные индексы интоксикации как критерий оценки уровня эндогенной интоксикации при бабезиозе / М. А. Дерхо, Е. С. Самойлова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2011. — Т. 207. — С. 170—177.

28. Гринь В. К. Интегральные гематологические показатели лейкоцитарной формулы как критерий оценки тяжести течения ожоговой болезни, ее осложнений и эффективности проводимого лечения / В. К. Гринь, Э. Я. Фисталь, И. И. Сперанский [и др.] // Комбустиология. — 2006. — № 27.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Н. Н. Мишина** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, и. о. заведующего лабораторией;

**Э. И. Семенов** — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;

**А. Р. Валиев** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;

**З. Х. Сагдеева** — аспирант, младший научный сотрудник;

**Е. Г. Губеева** — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник;

**К. В. Перфилова** — кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 06.03.2023 г.

## PATHOPHYSIOLOGY, PATHOBIOCHEMISTRY AND EXPERIMENTAL THERAPY

Original article

UDC 619:615.9:616—097

### ANALYSIS OF THE ADAPTIVE RESERVE OF CELLULAR AND HUMORAL LINKS OF NON-SPECIFIC IMMUNITY IN THE TREATMENT OF T-2 TOXICOSIS IN WHITE RATS

**Nailya Narimanovna Mishina**<sup>✉</sup>, **Eduard Ilyasovich Semenov**, **Almaz Rafailyevich Valiev**,  
**Zukhra Khalimovna Sagdeeva**, **Elena Georgievna Gubeeva**, **Kseniya Vitalyevna Perfilova**

*Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia, mishinanailyan@yandex.ru*<sup>✉</sup>

**Abstract.** Contamination of food crops with mycotoxins remains a common and difficult problem that leads to economic damage in modern agriculture around the world. There are a number of particularly dangerous mycotoxins, including trichothecene mycotoxin — T-2 toxin. Due to the violation of the technologies for processing, harvesting, transporting and storing feeds, this mycotoxin can enter the human body through livestock and poultry products, which poses a threat to it. The effect of T-2 toxin on the body as a whole leads to cell death in hematopoietic and immunocompetent organs, which is accompanied by changes in the hematological blood picture and suppression of immunity. Therefore, the objective of the research is to study the state of natural resistance of white rats under the effect of T-2 toxin when treated with serum containing polyclonal antibodies. During the study of the method for the prevention and treatment of mycotoxicosis, based on the analysis of leukocytogram, morphological analysis of the spleen, parameters of nonspecific resistance, the efficacy of the use of serum containing polyclonal antibodies to the T-2-BSA conjugate was established.

**Keywords:** mycotoxins, T-2 toxin, polyclonal antibodies, serum, rats, nonspecific immunity

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), about 25 % of food crops worldwide are contaminated with mycotoxins [1—7], which leads to significant economic losses. T-2 toxin belongs to type A trichothecene mycotoxins and is one of the most dangerous toxins for animal health [8, 9]. This mycotoxin also poses a threat to humans, entering their body through the food chain, which subsequently causes damage to the gastrointestinal tract by toxic Aleutian disease and Kashin-Beck disease through inhibition of protein synthesis [10]. T-2 toxin also causes cell apoptosis, including in hematopoietic and immunocompetent organs (thymus and spleen) [11—14]. This process is accompanied by changes in the hematological blood picture (leukocytopenia, anemia, thrombocytopenia, etc.) and the manifestation of immunosuppressive activity [15, 16]. Like most mycotoxins, T-2 toxin disrupts the structure of mucous membranes, indirectly negatively affects the general resistance of animals to pathogenic microorganisms and specific agents, which is determined by nonspecific

humoral and cellular factors. Scientists around the world are looking for effective ways to treat and prevent T-2 toxicosis in animals. During the search, various methods have been developed to reduce the amount of both mycotoxins themselves in feed and the toxic effects they cause in the body, including on the immune system. Among these scientific developments, there are no methods of prevention and treatment, the basis of which is serum containing specific components specifically for T-2 toxin itself. These components include polyclonal antibodies with bovine serum albumin obtained to T-2 toxin, which determined the purpose of our research.

The objective of the research was to study the state of natural resistance of white rats under the effect of T-2 toxin in the treatment with serum containing polyclonal antibodies.

#### MATERIAL AND METHODS

To obtain serum containing polyclonal antibodies, male albino rats were immunized with a conjugate of

T-2 toxin with bovine serum albumin (BSA) according to a three-fold immunization scheme with an interval of 3 weeks. For the first immunization, a suspension was prepared consisting of T-2-BSA conjugate, Ringer's solution, complete Freund's adjuvant. Freund's incomplete adjuvant was used for subsequent immunizations. On day 14 from the last injection, blood was taken from the studied rats by the decapitation method, and the serum was also separated by the standard method.

For the experiment, 4 groups of white rats (8 animals in each) weighing 130.0—140.0 g were formed according to the principle of analogues, using body weight with a difference of  $\pm 10\%$  as a criterion for formation. The animals were obtained from the breeding nursery of FSBSI "ARVRIPP&T" and before being introduced into the experiment, they underwent a two-week period of acclimatization in vivarium conditions. During acclimatization and the experiment, the rats had free access to water and food. Keeping, feeding and manipulations were carried out in accordance with the principles of laboratory practice in the Russian Federation [17].

The first group of animals was a control group, the rats of the second group were injected with T-2 toxin at a dose of  $1/10 LD_{50}$ , the third experimental group received mycotoxin at the same dose and treatment — injections of serum  $0.3 \text{ cm}^3$  per kg of body weight containing polyclonal antibodies at the beginning of the experiment and again on days 10 and 20 of the experiment, the fourth was injected with serum from intact white rats at a similar dose and according to the same scheme.

At the end of the experiment, 6 rats per group were sacrificed by decapitation and blood was taken for hematological and immunological studies, as well as samples of internal organs for histological studies. For histological studies, organ samples were fixed in a buffer solution of  $10\%$  formalin, then dehydrated and embedded in paraffin according to the Volkova-Eletskov scheme (1996). Histological specimens were stained with hematoxylin-eosin according to Hansen [18]. Histological sections were examined under a Leica DM 1000 light microscope with a Leica DFC320 digital camera (Germany).

For priming the animals, T-2 toxin of the crystalline form manufactured by Sigma-Aldrich (USA) was used. Morphological blood analysis was performed on a Mythic 18 Vet hematological analyzer (France). The serum bactericidal activity (SBA) was determined by the method of Smirnova O. V., Kuzminova T. A. (1966) [19], lysozyme activity (SLA) — by the neph-

elometric method according to Dorofeychuk V. G. (1968) [20], leukocyte phagocytic activity (LPA), phagocytic index (PhI) — according to the method of Kost S. A., Stenko M. I. (1968) [21]. The leukocyte formula was determined by counting individual forms of leukocytes in blood smears stained according to Romanowsky-Giemsa, then leukocyte indices were calculated [22].

The obtained experimental data were processed by the generally accepted method of variation statistics according to the Student's criterion of reliability using special programs [23, 24].

### STUDY RESULTS

An important role in maintaining extra- and intracellular homeostasis of the animal body is played by leukocytes involved in the neutralization of various toxins, both exogenous and endogenous origin.

The analysis of blood leukocyte profile data (including leukocyte indices) is one of the tools for assessing the severity of endogenous intoxication in the body of animals and humans, and makes it possible to judge the work of the immune system, the state of formation of nonspecific adaptive reactions [25]. But in addition to the value of the number of leukocytes, an important specific marker of the activity of the inflammatory process is the study of other indicators of the leukocyte link, which may be more sensitive and specific [26].

Table 1 presents the data of the leukogram and the calculation of leukocyte indices in the blood of white rats under conditions of experimental mycotoxicosis during treatment with sera containing polyclonal antibodies.

Significant changes have been observed in the leukogram, which indicates the effect of mycotoxin on blood cells and leukopoiesis organs, and also indicates the presence of signs of endogenous intoxication in the body of rats.

The Krebs index (KI) or neutrophil-lymphocyte index is the ratio of the total number of neutrophils to the number of blood lymphocytes. The index reflects the ratio of nonspecific and specific body defense. T-2 toxin has a destructive effect on blood cells and organs of leukopoiesis, resulting in a state of immunodeficiency, both massive death of lymphocytes and a violation of the process of lymphopoiesis [27, 28].

Thus, the Krebs index in the second group was by 3.4 times higher ( $p < 0.01$ ) than in the control group; with the use of therapy in the third group, this indicator was by 1.47 times higher, the fourth — by 1.6 times ( $p < 0.05$ ).

Table 1

Blood leukogram of white rats during the experiment ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ )

Indicators	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Leukocytes, $10^9/L$	$14.00 \pm 1.00$	$9.32 \pm 1.10^{**}$	$11.56 \pm 0.90^*$	$9.80 \pm 0.80^*$
Basophils, %	0	0	0	0
Eosinophils, %	$1.22 \pm 0.29$	$2.22 \pm 0.43^*$	$3.20 \pm 0.64^{**}$	$2.4 \pm 0.47^*$
Stab neutrophils, %	$0 \pm 0$	$7 \pm 2.15^{**}$	$3.2 \pm 1.18^*$	$6 \pm 2.46^*$
Segmented neutrophils, %	$34.8 \pm 3.84$	$56.4 \pm 5.12^{**}$	$40.00 \pm 0.05$	$51.00 \pm 6.23^*$
Lymphocytes, %	$60 \pm 0.79$	$32 \pm 6.12^{**}$	$50.6 \pm 7.29$	$38 \pm 8.15^*$
Monocytes, %	$4 \pm 0.81$	$2.4 \pm 0.69^*$	$3.0 \pm 1.12$	$2.6 \pm 0.98$
KI	$0.58 \pm 0.01$	$1.98 \pm 0.42^{**}$	$0.85 \pm 1.06$	$1.50 \pm 0.37^*$
LII	$0.53 \pm 0.01$	$1.73 \pm 0.35^{**}$	$0.76 \pm 0.82$	$1.33 \pm 0.36^*$
NI	$0.11 \pm 0.05$	$0.17 \pm 0.02^{**}$	$0.16 \pm 0.03$	$0.17 \pm 0.02^*$
LSI	$0.56 \pm 0.07$	$1.91 \pm 0.38^{**}$	$0.87 \pm 0.54$	$1.46 \pm 0.39^*$
LI	$1.72 \pm 0.06$	$0.50 \pm 0.26^{**}$	$1.17 \pm 0.28$	$0.67 \pm 0.33^*$
INMR	$8.70 \pm 0.46$	$26.42 \pm 5.51^{**}$	$14.40 \pm 8.12$	$21.92 \pm 3.18^{**}$
ILMR	$15.00 \pm 0.33$	$13.33 \pm 0.41^*$	$15.87 \pm 0.49$	$14.62 \pm 0.52$

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$  — in comparison with the control group

Neutrophils play one of the key roles in the implementation of nonspecific resistance of the body and the violation of their content can be considered as one of the causes of chronic inflammation. A change in the number of neutrophilic granulocytes leads to a degenerative nuclear shift to the left and a leukocyte shift of blood cells, and is a consequence of the development of endogenous intoxication. Depletion of the main population of peripheral blood leukocytes (segmented neutrophils) leads to the activation of the second line of defense — lymphocytes. The reserve of the lymphocyte link is not unlimited, which provokes a decrease in the content of lymphocytes in the peripheral blood.

The leukocyte index (LI) is the inverse of the Krebs index and is the ratio of the number (%) of lymphocytes to neutrophils (stab, segmented), and also reflects the relationship between the humoral and cellular links of the immune system. The imbalance in this relationship was less pronounced in the serum group. Thus, LI in the leukogram of the rats of the second group compared to the control data was by 3.44 times low-

er ( $p < 0.01$ ), the third — by 1.47 times, the fourth — by 2.58 times ( $p < 0.05$ ).

Leukocyte intoxication index (LII) (%) is the ratio of cells, the level of which increases during inflammatory processes (neutrophilic leukocytes), to cells, the number of which decreases during these processes (lymphocytes, monocytes, eosinophils). An increase in the LII index against the background of a low level of the leukocyte index relative to the control group indicates the development of an immunodeficiency state and an increase in the degree of endogenous intoxication in the animals poisoned with mycotoxins. LII in the leukogram of rats of the second group was by 3.26 times higher than the control data ( $p < 0.01$ ), the third — by 1.43, the fourth — by 2.5 times ( $p < 0.05$ ).

Nuclear index of Dashtayants G. D. (NI) is the ratio of the total number (%) of monocytes and stab neutrophils to the level of segmented neutrophils. Cytolysis of segmented neutrophils and regeneration of stab neutrophils and monocytes leads to the rejuvenation of the neutrophil population. But young forms of neutrophils

cannot fully function, produce defensins, but contain fewer specific granules, which include antimediators in their composition and, accordingly, reduce the efficacy of phagocytosis, which contributes to chronic inflammation. When comparing the NI of the animals from the experimental and control groups, it was found that this indicator increased statistically significantly in the groups of rats, where mycotoxin was inoculated without treatment ( $p < 0.01$ ), and where mycotoxicosis was treated with intact serum by 54 % ( $p < 0.05$ ). At the same time, in the treatment with polyclonal serum, this value was higher by 45 %, compared to the control data.

Lymphocyto- and monocytopenia also affected the blood leukocyte shift index (LSI), which led to its increase. LSI is the ratio of the sum of eosinophils, basophils and neutrophils (stab + segmented) to the sum of monocytes and lymphocytes (%) and characterizes the ratio of granulocytes and agranulocytes. In case of mycotoxicosis, an increase in this indicator was recorded due to the development of intoxication. Thus, the value of LSI in group 2 exceeded that of the control group by 1.6–3.4 times ( $p < 0.01$ ), where the maximum value was in the group of animals without treatment.

In our experiment, in case of mycotoxicosis, lymphocyto- and monocytopenia was observed, the more interesting are the data on the index of the lymphocyte-to-monocytes ratio (ILMR), which reflects the relationship between the effector and effector links of the immunological process and represents a balance between lymphocytes and monocytes. Monocytes under the action of toxins migrate into body tissues and differentiate into macrophages, and together with lymphocytes participate in the process of antigen recognition. The value of this indicator in mycotoxicosis was by  $13.33 \pm 0.41$  ( $p < 0.05$ ) and in the treatment group with intact serum in case of mycotoxicosis —

by  $14.62 \pm 0.52$ , against  $15.00 \pm 0.33$  in the control group, in the treatment of polyclonal serum changes were less pronounced.

The index of neutrophil-to-monocyte ratio (INMR) indicates the ratio of the components of the microphage-macrophage system. The value of INMR significantly changed in the course of experimental mycotoxicosis in the second group towards an increase in comparison with the control value by 3 times ( $p < 0.01$ ), in the third group when treating with polyclonal serum — by 1.7 times, and when treating with intact serum — by 2.5 times ( $p < 0.01$ ). This is probably due to the fact that neutrophils played a leading role in the implementation of the inflammatory process.

The leukocytogram and calculated leukocyte indices in the treated animals indicate a decrease in the level of endotoxins, restoration of the functionality of the immune system.

Humoral and cellular links of nonspecific immunity are the first line of defense and act throughout the entire period of the body's struggle with toxins. The clinical status and productivity of animals depend on their state. To analyze the state of humoral activity of nonspecific immunity, such indicators as serum lysozyme, bactericidal and phagocytic activity and phagocytic index were studied (Table 2).

Under the effect of T-2 toxin, functional properties of phagocytic cells were impaired, which manifested itself in a change in their migratory, chemotactic, adhesive, enzymatic and bactericidal activity. An increase in the incompleteness of phagocytosis contributed to a decrease in the phagocytic index. Neutrophils of rats treated with T-2 toxin showed a significant decrease in phagocytic activity compared to that in control rats by 19.3 % ( $p < 0.05$ ), treatment led to the restoration of this indicator. A similar trend was observed when determining the phagocytic index.

**Table 2**

Indicators of nonspecific resistance of white rats during the experiment ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ )

Indicator	Group			
	1	2	3	4
LPA, %	$64.30 \pm 3.22$	$51.88 \pm 3.24^*$	$57.74 \pm 3.96$	$54.53 \pm 2.99^*$
PhI	$7.15 \pm 0.74$	$5.75 \pm 0.72$	$6.45 \pm 0.84$	$6.09 \pm 0.78$
SLA, %	$40.56 \pm 2.16$	$33.75 \pm 1.92^*$	$37.40 \pm 2.00$	$35.94 \pm 2.18$
SBA, %	$22.44 \pm 0.81$	$17.86 \pm 0.74^{**}$	$20.17 \pm 0.82$	$18.76 \pm 0.90^{**}$

\*  $p < 0.05$

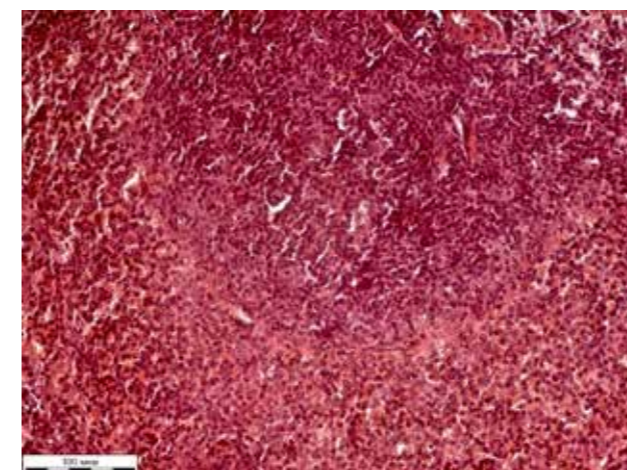
\*\*  $p < 0.01$  — in comparison with the control group

Lysozyme is an enzyme (acetylmuramidase), which is involved with secretory immunoglobulins in the formation of local immunity, stimulation of phagocytosis of neutrophils and macrophages, exhibits an antimicrobial effect through the destruction of lipopolysaccharide surface layers of bacterial cell walls.

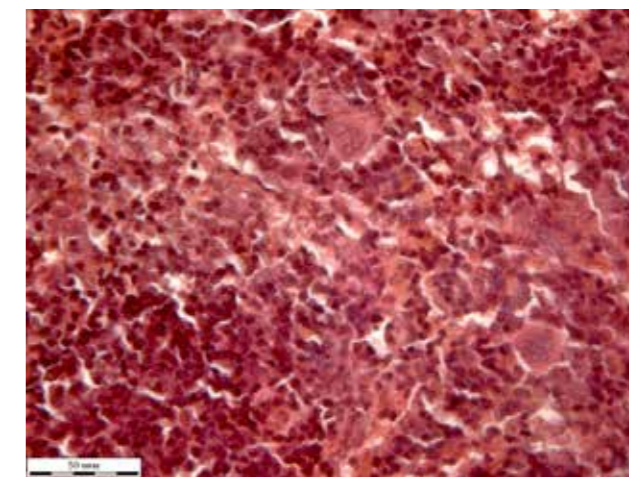
The serum lysozyme activity of animals of the second group (T-2 toxicosis) was lower by 16.8 % ( $p < 0.05$ ), compared with the control group. In the group of rats treated with serum with polyclonal antibodies it was lower by 7.8 %. Since lysozyme in case of infectious diseases stimulates the processes of phagocytosis, its decrease causes the immunosuppressive effect of mycotoxins, respectively.

Due to the action of mycotoxin on protein components such as simple proteins (transferrin, interferon, lysozyme, interleukin-1, —6, —8, lactoferrin, tumor necrosis factor, fibronectins, platelet activating factor), acute phase proteins of inflammation (fibrinogen, haptoglobin, C-reactive protein, etc.), complex proteins (complement, fibrinopeptides), there is a decrease in the bactericidal activity of serum, which is restored during treatment. Thus, the decrease in SBA in the animals of group 2 differed from that of the control group by 20.4 % ( $p < 0.01$ ), in the third — by 10.1 %, the fourth — by 16.4 % ( $p < 0.01$ ).

In case of mycotoxicosis, adaptation mechanisms are mobilized in the body, which leads to destructive changes in the hematopoietic organs. In the study of histological specimens of the spleen of rats of group 2, a decrease in the plethora of the red pulp was revealed, the white pulp was rarefied around the vessels, the accumulation of lymphocytes, and single follicle-like structures (Fig. 1).



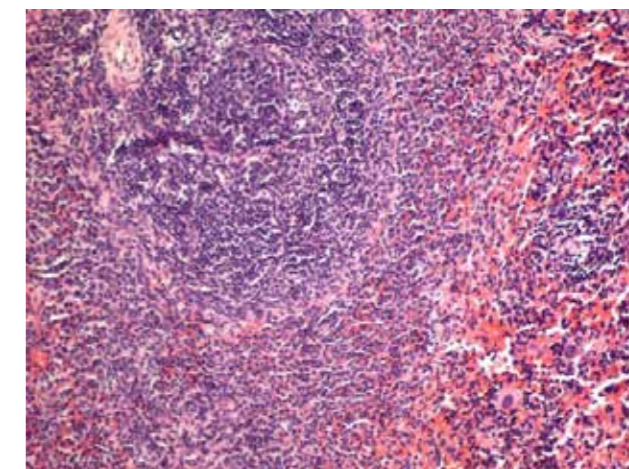
**Fig. 1.** Rat spleen with T-2 mycotoxicosis, stained with Ehrlich's hematoxylin and aqueous eosin. x20 magnification



**Fig. 2.** Rat spleen in case of T-2 mycotoxicosis against the background of treatment with intact serum, stained with Ehrlich's hematoxylin and aqueous eosin. x20 magnification

Similar changes were observed in the group of rats where mycotoxicosis was treated with intact serum (Fig. 2).

In the spleen of the rats of the first and third groups, signs of plethora of the red pulp are observed, in the white pulp there are no signs of rarefaction of the structure (Fig. 3, 4).

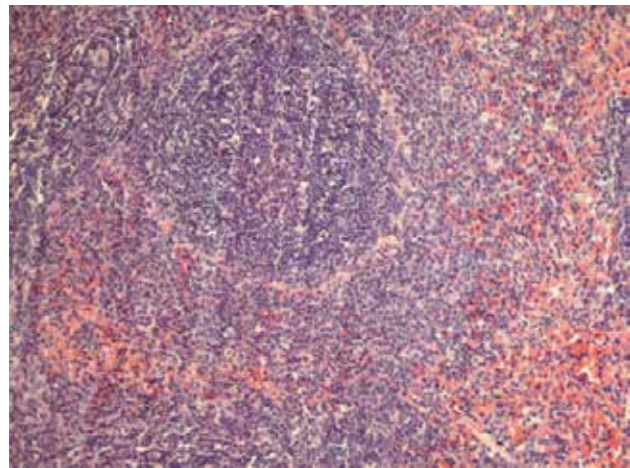


**Fig. 3.** Spleen in case of T-2 mycotoxicosis against the background of treatment with serum containing polyclonal antibodies. Stained with Ehrlich's hematoxylin and aqueous eosin. x20 magnification

### CONCLUSION

Thus, our study confirmed the data on the immunosuppressive effect of T-2 toxin, manifested by the inhibition of factors of cellular and humoral immunity. The importance of predicting disorders of the immune system based on the results of the assessment

of leukocyte indices is shown. The efficacy of the use of serum containing polyclonal antibodies to T-2-BSA conjugate was established based on the analysis of leukocytogram, morphological analysis of the spleen, parameters of nonspecific resistance.



**Fig. 4.** Rat spleen of biological control. Stained with Ehrlich's hematoxylin and aqueous eosin. x20 magnification

#### REFERENCES

1. Wild C. P. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue / C. P. Wild, Y. Y. Gong // *Carcinogenesis*. — 2010. — Vol. 31. — P. 71—82.
2. Eskola M. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited “FAO estimate” of 25 % / M. Eskola, G. Kos, C. T. Elliott [et al.] // *Critical reviews in food science and nutrition*. — 2020. — Vol. 60 (16). — P. 2773—2789.
3. Tarasova E. Yu. Study of the sorption activity of a galloisite nanotube in relation to zearalenone and ochratoxin A / E. Yu. Tarasova // *Vestnik Mariyskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Selskokhozyaystvennyye nauki. Ekonomicheskie nauki (Bulletin of Mari State University. Agricultural Sciences series. Economic sciences)*. — 2021. — Vol. 7. — No. 1. — P. 71—76.
4. Sagdeev D. R. Toxicity of lead and T-2 toxin when they enter the body of animals together / D. R. Sagdeev // *Veterinarian (Veterinarnyy vrach)*. — 2021. — No 6. — P. 61—65.
5. Sagdeeva Z. H. Assessment of the general toxicity of feeds of the Republic of Tatarstan / Z. Kh. Sagdeeva, O. K. Ermolaeva, A. R. Valiev [et al.] // *Veterinarian (Veterinarnyy vrach)*. — 2020. — No 5. — P. 59—65.
6. Mishina N. N. Preventive efficacy of lignin- and polysaccharide-containing enterosorbents in case of combined T-2 and aflatoxicosis: speciality 16.00.04 “Veterinary pharmacology with toxicology”: thesis ... Cand. of Biol. Sciences / Nailya Narimanovna Mishina; Federal Center for Toxicological and Radiation Safety of Animals. — Kazan, 2008. — 156 p.
7. Mishina N. N. Use of T-2 toxin conjugate with polylysine for the detection of T-2 toxin in competitive ELISA / N. N. Mishina, E. I. Semenov, K. H. Papunidi // *Veterinarian (Veterinarnyy vrach)*. — 2017. — No 4. — P. 33—40.
8. Mclachlan A. Production of trichothecene mycotoxins by Australian *Fusarium* species / A. Mclachlan, K. J. Shaw, A. D. Hocking [et al.] // *Food additives contaminants*. — 1992. — Vol. 9. — P. 631—638.
9. Tarasova E. Yu. Finding means for the treatment of animals with T-2 mycotoxicosis: 06.02.03 “Veterinary pharmacology with toxicology”, 06.02.02 “Veterinary microbiology, virology, epizootology mycology with mycotoxicology and immunology”: thesis ... Cand. of Biol. Sciences / Evgeniya Yuryevna Tarasova; FSI “Federal Center for Toxicological and Radiation Safety of Animals”. — Kazan, 2010. — 209 p.
10. Lei R. Prevalence of selenium, T-2 Toxin, and deoxynivalenol in Kashin–Beck disease areas in Qinghai Province, Northwest China. / R. Lei, N. Jiang, Q. Zhang [et al.] // *Biological trace element research*. — 2016. — Vol. 171. — P. 34—40.
11. Semenov E. I. Effect of bee brood and zeolite on broiler chickens exposed by mycotoxin T-2 / E. I. Semenov, N. N. Mishina, V. R. Saitov [et al.] // *Natural volatiles and essential oils*. — 2021. — V. 8. — No. 4. — P. 3520—3531.
12. Perfilova K. V. Substantiation of the component composition of the complex agent “Zeapitox” in relation to T-2 toxin in in vitro experiments / K. V. Perfilova, N. N. Mishina, E. I. Semenov // *Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman (Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Baumana)* — 2021. — Vol. 247. — No 3. — P. 208—212.
13. Idiyatov I. I. Study of the toxic effect of trichothecene mycotoxin producer *Fusarium sporotrichioides* in the experiment on pigs / I. I. Idiyatov, I. R. Kadikov, V. R. Saitov [et al.] // *South of Russia: ecology, development. (Yug Rossii: ekologiya, razvitie)*. — 2022. — Vol. 17. — No 1 (62). — P. 62—79.
14. Semenov E. I. Pharmacotoxicological aspects of the use of enterosorbents in case of combined mycotoxicosis: speciality 06.02.02 “Veterinary microbiology, virology, epizootology mycology with mycotoxicology and immunology”, 06.02.03 “Veterinary pharmacology with toxicology”: thesis ... Doc. of Vet. Sciences / Semenov Eduard Ilyasovich. — Kazan, 2019. — 317 p.
15. Rotter B. A. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine / B. A. Rotter, B. K. Thompson, M. Lessard [et al.] // *Fundamental and Applied toxicology*. — 1994. — Vol. 23. — No 1. — P. 117—124.
16. Bondy G. S. Immunomodulation by fungal toxins / G. S. Bondy, J. J. Pestka // *Journal of toxicology and environmental health. Part B*. — 2000. — Vol. 3. — No 2. — P. 109—143.
17. GOST 33044—2014. Interstate standard. Principles of good laboratory practice: National Standard of the Russian Federation: introduced by the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology: adopted by the Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification (Protocol dtd. October 20, 2014 N71-P) date of introduction 2015—08—01 / Prepared by the Federal State Unitary Enterprise “All-Russian Research Center for Standardization, Information and Certification of Raw Materials, Materials and Substances” (FSUE “VNITSMV”) on the basis of its own translation of the English version of the document specified in paragraph 5 into Russian. — M.: Standartinform, 2019. — 16 p.
18. Merkulov G. A. Course of pathohistological technique / G. A. Merkulov. — L.: Meditsina (Medicine), 1996. — 423 p.
19. Smirnova O. V. Determination of serum bactericidal activity by photonephelometry method / O. V. Smirnova, T. A. Kuzmina // *ZhMEI* — 1966. — No. 4. — P. 8—11.
20. Dorofeychuk V. G. Determination of lysozyme activity by nephelometric method / V. G. Dorofeychuk // *Laboratornoe delo (Laboratory science)*. — 1968. — No 1. — P. 28—30.
21. Kost S. A. Determination of the phagocytic activity of leukocytes / S. A. Kost, M. I. Stenko // *Klinicheskaya gematologiya zhivotnykh (Clinical hematology of animals)*. — M.: Kolos, 1974. P. 99—100.
22. Speranskiy I. I. General blood test — are all its possibilities exhausted? Integral indices of intoxication as criteria for assessing the severity of endogenous intoxication, its complications and the efficacy of treatment / I. I. Speranskiy, G. E. Samoylenko, M. V. Lobacheva // *Ostrye i neotlozhnye sostoyaniya v praktike vracha (Acute and urgent states in the practice of a doctor)*. — 2009. — No. 6 (19) — P. 3—12.
23. GOST 34100.1—2017. Measurement uncertainty. Introduction to guidelines for expressing measurement uncertainty. (ISO/IEC Guide 98—1:2009, Uncertainty of measurement — Part 1: Introduction to the expression of uncertainty in measurement, IDT: Introduced by the Federal Agency For Technical Regulation And Metrology (Rosstandart): Adopted by the interstate council for standardization, metrology and certification (Protocol dtd. July 14, 2017 No. 101-P) / Prepared by the interstate technical committee for standardization of the ITC125 “Statistical methods in product quality management” based on its own translation of the English version of the international document specified in paragraph 5 into Russian. — M.: Standartinform, 2018. — 28 p.
24. GOST R 8.736—2011. The State system of ensuring the uniformity of measurements (SSM/GSI). Direct multiple measurements. Methods of processing measurement results. Main provisions: Developed by the Federal State Unitary Enterprise “All-Russian Scientific Research Institute for Metrology named after D. I. Mendeleev” (VNIIM): Introduced by the department of metrology of the Federal Agency For Technical Regulation And Metrology: Approved and put into effect by the order of the Federal Agency For Technical Regulation And Metrology dtd. December 13, 2011 N1045-st: introduced for the first time. — M.: Standartinform, 2013. — 24 p.
25. Shakhov A. G. Effect of interferon-containing drugs on the hematological link of immunity in piglets in the early postnatal period / A. G. Shakhov, L. Yu. Sashnina, Yu. Yu. Vladimirova // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2022. — No 1(18). — P. 115—126. — DOI: 10.17238/issn2541-8203.2022.1.115
26. The use of integral leukocyte indices to assess the inflammatory process, endogenous intoxication and immunological reactivity in piglets with gastrointestinal diseases and the efficacy of therapy / S. V. Shabunin, A. G. Shakhov, L. Y. Sashnina [et al.] // *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya (Veterinary medicine, animal science and biotechnology)*. — 2022. — No. 4. — P. 35—42. — DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202204004
27. Derkho M. A. Integral intoxication indices as a criterion for assessing the level of endogenous intoxication in case of babesiosis / M. A. Derkho, E. S. Samoylova // *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Baumana (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman)*. — 2011. — Vol. 207. — P. 170—177.
28. Grin V. K. Integral hematological indicators of the leukocyte formula as a criterion for assessing the severity of the course of burn disease, its complications and the treatment efficacy / V. K. Grin, E. Ya. Fistal, I. I. Speranskiy [et al.] // *Kombustologiya*. — 2006. — No 27.

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**N. N. Mishina** — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate, Acting Head of the Laboratory;  
**E. I. Semenov** — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;  
**A. R. Valiev** — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientific Associate;  
**Z. Kh. Sagdeeva** — Postgraduate Student, Junior Scientific Associate;  
**E. G. Gubeeva** — Candidate of Medical Sciences, Principal Scientific Associate;  
**K. V. Perfilova** — Candidate of Veterinary Sciences, Junior Scientific Associate.

The article was submitted 06.03.2023.

Научная статья

УДК 636.09:616.34—002.153:636.7

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.120

## ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БОЛЕВОГО СИНДРОМА У СОБАК, БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ГАСТРОЭНТЕРИТОМ

Элиза Артуровна Куприна\*, Андрей Анатольевич Руденко\*, Владимир Иванович Луцай\*, Павел Анатольевич Руденко\*\*✉

\*Российский биотехнологический университет», Москва, Россия

\*\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. К. Скрыбина» Российской академии наук, Пуцино, Россия, pavelrudenko76@yandex.ru✉

**Аннотация.** Статья посвящена изучению уровня цитокинового профиля собак, больных острым гастроэнтеритом, в зависимости от наличия болевого синдрома. Исследования проведены на базе клиники ветеринарной медицины «Ветмастер» на собаках, которым на основании комплексной диагностики был поставлен диагноз острый гастроэнтерит алиментарной природы. Животные распределены на три группы: первая (контрольная) — клинически здоровые ( $n = 15$ ), вторая — животные с гастроэнтеритом, без болевого синдрома ( $n = 14$ ), третья — животные с гастроэнтеритом, осложненным болевым синдромом ( $n = 17$ ). Повреждение тканей желудочно-кишечного тракта при остром гастроэнтерите у собак запускает процессы синтеза провоспалительных цитокинов и формирование местных и системных воспалительных реакций. Показано, что у больных острым гастроэнтеритом собак, осложненных болевым синдромом, происходит выраженное достоверное изменение цитокинового профиля, по сравнению с контрольной группой. У больных собак с наличием болевого синдрома установлено достоверное повышение провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкина-4, интерлейкина-6, интерферона- $\gamma$ , интерлейкина-1 $\alpha$  и интерлейкина-8. В этой связи степень повышения уровня цитокинов у больных гастроэнтеритом собак можно использовать как маркер степени тяжести течения болезни.

**Ключевые слова:** собаки, острый гастроэнтерит, цитокиновый профиль, патогенез, диагностика

Острый гастроэнтерит представляет собой воспалительный процесс, охватывающий слизистую оболочку и другие ткани желудка и тонкого отдела кишечника, которое сопровождается нарушением процессов пищеварения, моторной, всасывательной, секреторной, защитной и экскреторной функций, болевым синдромом, дегидратацией и интоксикацией [1—5]. Данная болезнь довольно часто регистрируется у собак, особенно молодого возраста и связана с алиментарными этиологическими факторами. В диагностическом процессе при данной патологии важно констатировать неинфекционную природу, путем исключения возможных инфекционных и паразитарных заболеваний (например, парвовирусный энтерит, кишечная форма чумы плотоядных, токсокароз, токсокаридоз и т. д.) [2, 6—9].

Воспалительный процесс, который возникает в желудочно-кишечном тракте имеет не только

локальный характер, но и системно воздействует на весь организм. Воспалительные продукты и медиаторы вызывают синдром эндогенной интоксикации у больных животных [10]. Нейроэндокринная и иммунная система также вовлекается в патологический процесс [6, 11].

Интерлейкины играют важную роль в активации и дифференцировке иммунных клеток, а также в пролиферации, созревании, миграции и адгезии [12—15]. Они также обладают провоспалительными и противовоспалительными свойствами [16]. Следовательно, одна из основных функций интерлейкинов заключается в модуляции роста, дифференцировки и активации клеток-предшественниц лейкоцитопоза, тромбоцитопоза, эритроцитопоза во время воспалительных и иммунных реакций. Интерлейкины состоят из большой группы белков, которые могут вызывать множество реакций в клетках и тканях путем связывания с высокоаффинны-

ми рецепторами на поверхности клеток. Они обладают как паракринной, так и аутокринной функцией. Таким образом, любой воспалительный процесс не обходится без активного вовлечения в патогенез основной болезни иммунной системы [17, 18].

Активизация системы цитокинов играет важное значение в патогенезе развития гастроэнтерита, при этом осложнение гастроэнтерита у собак острым болевым синдромом может оказывать дополнительное стимулирующее влияние на цитокиновый профиль. Следует отметить, что исследования по изучению цитокинового профиля у больных у собак острым гастроэнтеритом ранее не проводились. Детальное изучение данных патогенетических особенностей иммунновоспалительных реакций при острых воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта будет создавать основу для внедрения новых диагностических и терапевтических стратегий в практическую ветеринарную медицину.

*Цель исследования* — изучить цитокиновый профиль сывороток крови собак, больных острым гастроэнтеритом, в зависимости от наличия осложнения в виде болевого синдрома.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены на базе клиники ветеринарной медицины «Ветмастер» (Московская область, г. Раменское). Модель исследования — клиническое наблюдательное, тип «случай-контроль». Объектом исследования служили собаки, которым на основании комплексной диагностики был поставлен диагноз острый гастроэнтерит алиментарной природы. Диагностический поиск при остром гастроэнтерите осуществляли комплексно с учетом данных анамнестических данных, тщательного физикального обследования, морфологического и биохимического анализа крови, обзорной абдоминальной рентгенографии и ультрасонографии. Исследования проведены на трех группах собак: первая (контрольная) — клинически здоровые ( $n = 15$ ), вторая — животные с гастроэнтеритом, без болевого синдрома ( $n = 14$ ), а третья — животные с гастроэнтеритом, осложненным болевым синдромом ( $n = 17$ ). В опытные и контрольную группы включены собаки с использованием принципа аналогов (возраст 2—5 лет, представители карликовых и мелких пород, масса тела 3—6 кг). Животных подбирали в исследование по мере поступления их ветеринарную клинику с обязательным учетом критериев включения и исключения.

Критерии включения: алиментарные факторы риска (нарушения режима кормления, резкая смена рациона, поедание грубого корма, костей и т. д.), наличие клинических, лабораторных, ультрасонографических, рентгенографических признаков острого гастроэнтерита.

Критерии исключения: аутоиммунные нарушения желудочно-кишечного тракта, хронические формы гастроэнтерита, инфекции (парвовирус, энтеритная форма чумы плотоядных, коронавирус), положительные паразитологические копрологические тесты, синдром мальдигестии и мальабсорбции, кормовая аллергия, вторичный гастроэнтерит, возникший на фоне инородных тел или опухолей желудка и кишечника.

Клиническое обследование проводили по стандартной методике. Оценку болевого синдрома проводили по 4-балльной шкале [16].

Исследования цитокинового профиля проводили на планшетном фотометре Multiskan FC со встроенным шейкером на 96 лунок при спектральном диапазоне 450 нм с использованием иммуноферментных тест систем для определения концентрации фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкина-4, интерлейкина-6, интерферона- $\gamma$ , интерлейкина-1 $\alpha$ , интерлейкина-8 (ООО «Цитокин», Российская Федерация).

Все статистические расчеты проводили в программе Statistica 7.0. На первом этапе цифровой материал подвергали оценке на нормальность по методу Шапиро — Уилкса. На втором этапе оценивали стандартные данные описательной статистики ( $M$  — среднееарифметическое,  $m$  — среднеквадратическая ошибка, 95 % ДИ — 95 % доверительный интервал). На третьем этапе осуществляли попарное сравнение групп по методу Манна — Уитни. Разницу между показателями кошек различных групп считали достоверной при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основная жалоба владельцев больных собак была связана с развитием острого желудочно-кишечного расстройства. У собак первой группы острый алиментарный (неинфекционный) гастроэнтерит характеризовался следующей клинической картиной: вялость (100 %), умеренное угнетение (85,7 %) или беспокойство (14,3 %), диарея (100 %), рвота (100 %), субфебрильная (57,1 %) или фебрильная лихорадка (42,9 %), снижением тургора кожи (92,9 %), а также умеренной тахикардией (42,9 %). У животных данной групп отмечали лег-

кое напряжение тела, дрожь, незначительный дискомфорт при пальпации брюшной стенки и поскуливание. У животных второй группы острый гастроэнтерит проявлялся резким болевым синдромом. Отмечали резкое угнетение (100 %), отсутствие реакции на внешние раздражители (88,2 %), значительное напряжение мышц брюшного пресса при пальпации органов брюшной полости, вынужденную лежачую позу. Некоторые животные этой группы (11,8 %) проявляли агрессию при пальпа-

ции и аускультации брюшной стенки. У всех собак отмечали умеренную тахикардию, тахипноэ, снижение тургора кожи, рвоту и диарею, анорексию, потерю массы тела. У 76,5 % собак второй группы констатировали фебрильную и у 23,5 % субфебрильную лихорадку.

Результаты исследования по изучению сывороточной концентрации цитокинов у собак больных острым гастроэнтеритом, в зависимости от наличия болевого синдрома, приведены в таблице.

Таблица

Цитокиновый профиль при гастроэнтерите собак в зависимости от степени выраженности болевого синдрома

Показатель	Статистические параметры	1 опытная группа (n = 15)	2 опытная группа (n = 14)	3 опытная группа (n = 17)
Фактор некроза опухоли- $\alpha$ , пг/см <sup>3</sup>	M $\pm$ m	5,3 $\pm$ 0,7	19,9 $\pm$ 1,7***	34,6 $\pm$ 2,5*** °°°
	95 % ДИ	3,9—6,8	16,3—23,6	29,3—39,9
Интерлейкин-4, пг/см <sup>3</sup>	M $\pm$ m	177,3 $\pm$ 14,9	594,9 $\pm$ 30,3***	1021,0 $\pm$ 76,4*** °°°
	95 % ДИ	145,3—209,2	529,5—660,4	859,0—1182,9
Интерлейкин-6, пг/см <sup>3</sup>	M $\pm$ m	248,3 $\pm$ 12,6	722,4 $\pm$ 34,8***	1598,1 $\pm$ 74,1*** °°°
	95 % ДИ	221,3—275,4	647,3—797,5	1440,9—1755,2
Интерферон- $\gamma$ , пг/см <sup>3</sup>	M $\pm$ m	56,1 $\pm$ 6,8	188,8 $\pm$ 7,6***	291,6 $\pm$ 10,1*** °°°
	95 % ДИ	41,6—70,6	172,4—205,2	270,1—313,1
Интерлейкин-1 $\alpha$ , пг/см <sup>3</sup>	M $\pm$ m	1,3 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,1***	5,5 $\pm$ 0,3*** °°°
	95 % ДИ	0,6—1,9	2,4—3,0	4,8—6,2
Интерлейкин-8, пг/см <sup>3</sup>	M $\pm$ m	1,1 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,3***	14,2 $\pm$ 0,9*** °°°
	95 % ДИ	0,8—1,4	4,7—5,9	12,3—16,0

**Примечание:** M — среднее арифметическое, m — среднеквадратическую ошибку, 95 % ДИ — 95 % доверительный интервал

\*  $p \leq 0,05$

\*\*  $p \leq 0,01$

\*\*\*  $p \leq 0,001$  — достоверность разницы между опытными группами и контролем (критерий Манна — Уитни)

°  $p \leq 0,05$

°°  $p \leq 0,01$

°°°  $p \leq 0,001$  достоверность разницы между опытными группами (критерий Манна — Уитни)

Из данных таблицы, видно, что у больных острым гастроэнтеритом собак, неосложненным болевым синдромом, по сравнению с контрольной группой, происходило достоверное ( $p \leq 0,001$ ) повышение концентрации фактора некроза опухоли- $\alpha$  (в 3,75 раза), интерлейкина-4 (3,35 раза), интерлейкина-6 (2,91 раза), интерферона- $\gamma$  (3,37 раза), интерлейкина-1 $\alpha$  (в 2,08 раза) и интерлейкина-8 (в 4,81 раза).

В сыворотках крови больных острым гастроэнтеритом собак с выраженным болевым, по сравнению с контрольной группой, установлено более выраженное изменение цитокинового профиля: фактор некроза опухоли- $\alpha$  повысился в 6,52 раза ( $p \leq 0,001$ ), интерлейкин-4 — в 5,78 раза ( $p \leq 0,001$ ), интерлейкин-6 — в 6,43 раза ( $p \leq 0,001$ ), интерферон- $\gamma$  — в 5,20 раза ( $p \leq 0,001$ ), интерлейкин-1 $\alpha$  - в 4,23 раза ( $p \leq 0,001$ ) и интерлейкин-8 — в 12,9 раза ( $p \leq 0,001$ ). У больных собак с наличием болевого синдрома, по сравнению с таковыми с безболевыми формами гастроэнтерита, установлены более высокие значения фактора некроза опухоли- $\alpha$  (в 1,74 раза), интерлейкина-4 (1,72 раза), интерлейкина-6 (2,21 раза), интерферона- $\gamma$  (1,54 раза), интерлейкина-1 $\alpha$  (в 2,04 раза) и интерлейкина-8 (в 2,68 раза) в сыворотке крови при наивысшем уровне статистической значимости ( $p \leq 0,001$ ).

Гастроэнтерит у собак является распространенной проблемой, связанной с алиментарными факторами риска (резкое изменение рациона кормления, нарушения режима приема корма, грубые корма, поедание костей, разгрызание палочек и т. д.). Травмирующий повреждающий фактор приводит к активизации и размножению условно-патогенных микроорганизмов. Системная воспалительная реакция и дегидратация организма являются важными патогенетическими звеньями развития острого гастроэнтерита [1, 10, 14].

У собак, больных гастроэнтеритом, происходит достоверное увеличение сывороточной концентрации фактора некроза опухоли- $\alpha$ , биологические эффекты которого включают активацию других клеток (макрофагов, Т-клеток, В-клеток), выработку провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1 и -6) и хемокинов (интерлейкина-8), экспрессию молекулы адгезии, ингибирование регуляторных Т-клеток, продукцию матриксной металлопротеиназы и индукцию апоптоза [16].

Болевой синдром является одним из признаков воспаления и, очевидно, положительно коррелирует со степенью тяжести повреждения тканей. Болевой синдром при гастроэнтерите приводит

к более высоким концентрациям фактора некроза опухоли- $\alpha$  в сыворотке крови больных собак.

У собак при остром гастроэнтерите в сыворотке крови достоверно повышается концентрация интерлейкина-4. Следует отметить, что Т-лимфоциты синтезируют интерлейкин-4, который действует как на В-, так и, собственно, на Т-клетки. Помимо этого, интерлейкин-4 являясь фактором роста В-клеток вызывает выбор изотипов Ig E и Ig G1. Интерлейкин-4 также обуславливает дифференцировку и пролиферацию Th2, ингибирует, опосредованную интерфероном, активацию макрофагов [1, 6]. Нами показано, что осложнение острого гастроэнтерита болевым синдромом приводит к более высокой продукции интерлейкина-4.

Интерлейкин-6 достоверно повышается в сыворотке крови собак, больных острым гастроэнтеритом. Т- и В-лимфоциты, фибробласты и макрофаги вырабатывают интерлейкин-6. В-лимфоциты и гепатоциты являются его основными мишенями. Первичные эффекты данного цитокина включают дифференцировку В-клеток и стимуляцию белков острой фазы [11].

При воспалительном и иммунном ответе макрофаги, крупные гранулярные лимфоциты, В-клетки, эндотелий, фибробласты и астроциты секретируют интерлейкин-1, который вызывает активацию лимфоцитов, стимуляцию макрофагов, повышенную адгезию лейкоцитов / эндотелия, повышение температуры из-за стимуляции гипоталамуса и выделения белков острой фазы печени [14]. В нашем исследовании установлено, что у собак, больных гастроэнтеритом наблюдается достоверное повышение концентрации интерлейкина-1 $\alpha$ , при этом болевой синдром приводит к более высокой его продукции. Интерфероны проявляют иммуномодулирующие эффекты, инициируя сигнальные каскады, которые приводят к экспрессии генных продуктов, таких как главный комплекс гистосовместимости класса 1, микроглобулин B2 и другие [10].

У собак при остром гастроэнтерите нами выявлено достоверное повышение концентрации интерферона- $\gamma$ . Болевой синдром оказывает более выраженное стимулирующее влияние на синтез интерферона- $\gamma$  у больных гастроэнтеритом собак.

У собак, больных острым гастроэнтеритом достоверно повышается концентрация интерлейкина-8, который вырабатывают моноциты и фибробласты. Его основными мишенями являются нейтрофилы, базофилы, тучные клетки, макрофаги и кератиноциты. Он вызывает хемотаксис нейтрофилов, ангиогенез, высвобождение суперок-

сида и высвобождение гранул гистамина базофилами [6].

Таким образом, повреждение тканей желудочно-кишечного тракта при остром гастроэнтерите у собак запускает процессы синтеза провоспалительных цитокинов и формирования местных и системных воспалительных реакций. Болевой синдром является одним из признаков воспаления и коррелирует со степенью тяжести повреждения тканей. Очевидно, что агрессивный выброс провоспалительных цитокинов у больных гастроэнтеритом собак при осложнении острым болевым синдромом свидетельствует о более интенсивном повреждении тканей и вовлечении иммунных и аутоиммунных процессов в патологический процесс, что требует более детального дальнейшего изучения. Степень повышения уровня цитокинов у больных гастроэнтеритом собак можно использовать как маркер степени тяжести течения болезни.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В патогенетическом профиле развития острого неинфекционного гастроэнтерита у собак особое место занимает активизация провоспалительных цитокинов. Необходимо отметить, что осложнение гастроэнтерита у собак острым болевым синдромом может вносить дополнительное стимулирующее влияние на цитокиновый профиль сывоток крови.

Так, в сыворотках крови больных острым гастроэнтеритом собак, осложненным болевым синдромом, констатировали более выраженное достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение цитокинового профиля: фактор некроза опухоли- $\alpha$  повысился в 6,52 $\uparrow$  раза, интерлейкин-4 — в 5,78 $\uparrow$  раза, интерлейкин-6 — в 6,43 $\uparrow$  раза, интерферон- $\gamma$  — в 5,20 $\uparrow$  раза, интерлейкин-1 $\alpha$  — в 4,23 $\uparrow$  раза, интерлейкин-8 — в 12,9 $\uparrow$  раза, при сравнении с контрольной группой. Отмечено, что у больных собак третьей опытной группы, при сравнении с животными второй группы, происходит более интенсивный ( $p \leq 0,001$ ) выброс провоспалительных цитокинов: фактор некроза опухоли- $\alpha$  (в 1,74 раза $\uparrow$ ), интерлейкин-4 (1,72 раза $\uparrow$ ), интерлейкин-6 (2,21 раза $\uparrow$ ), интерферон- $\gamma$  (1,54 раза $\uparrow$ ), интерлейкин-1 $\alpha$  (в 2,04 раза $\uparrow$ ), интерлейкин-8 (в 2,68 раза $\uparrow$ ). В этой связи полученные данные дополняют патогенетическую картину при острых воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта у собак, что создает предпосылки для внедрения новых диагностических и терапевтических критериев в практическую ветеринарную гастроэнтерологию.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Malewska K.* Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) in dogs and cats / K. Malewska, A. Rychlik, R. Nieradka, M. Kander // *Pol. J. Vet. Sci.* — 2011. — v. 14(1). — p. 165—171. — DOI: 10.2478/v10181-011-0026-7
2. *Allenspach K.* Current diagnostics for chronic enteropathies in dogs / K. Allenspach, J. P. Mochel // *Vet. Clin. Pathol.* — 2022. — v. 50(Suppl 1). — p. 18—28. — DOI: 10.1111/vcp.13068
3. *Клюкин С. Д.* Динамика клинико-биохимических показателей крови при коррекции болевого синдрома препаратами «Габапентин» и «Флекспрофен» / С. Д. Клюкин, В. В. Салаутин, Н. А. Пудовкин, С. Е. Салаутина // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана.* — 2021. — Т. 245. — № 1. — С. 76—81. — DOI: 10.31588/2413-4201-1883-245-1-76-82
4. *Юлдашбаев Ю. А.* Особенности функционального состояния организма овец при стрессе / Ю. А. Юлдашбаев, Ю. А. Ватников, П. А. Руденко, А. А. Руденко // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство.* — 2022. — Т. 17. — № 2. — С. 193—202. — DOI: 10.22363/2312-797X-2022-17-2-193-202
5. *Rudenko P.* Characteristic, evolution and influence on epizootic process of microorganisms in biocenoses of livestock farms / P. Rudenko, A. Strizhakov, A. Rudenko, I. Bondareva, E. Notina, I. Bykova, T. Dryemova, V. Lutsay, N. Ivanov, N. Sakhno, P. Meshcheryakov // *European Journal of Molecular & Clinical Medicine.* — 2021. — 8(2). — p. 1865—1877.
6. *Unterer S.* Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome in Dogs / S. Unterer, K. Busch // *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* — 2021. — v. 51(1). — p. 79—92. — DOI: 10.1016/j.cvsm.2020.09.007
7. *Walker D.* Canine inflammatory bowel disease / D. Walker, O. Garden, K. Allenspach // *Vet. Rec.* — 2007. — v. 160(16). — 560. — DOI: 10.1136/vr.160.16.560-a
8. *Павлова А. В.* Антибиотикорезистентность бактериальных патогенов, изолированных от животных в условиях ветеринарных клиник Луганска / А. В. Павлова, Н. В. Пименов // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология.* — 2020. — № 2. — С. 38—43. — DOI: 10.26155/vet.zoo.bio.202002006
9. *Эль-Себаей А. М.* Циркуляционная гепатоцитная производная микроРНК как диагностический биомаркер желчнокаменной болезни у собак / А. М. Эль-Себаей, П. Н. Абрамов // *Ветеринарный врач.* — 2020. — № 2. — С. 64—73. — DOI: 10.33632/1998-698X.2020-2-64-73
10. *Alves F.* Canine parvovirus: a predicting canine model for sepsis / F. Alves, S. Prata, T. Nunes, J. Gomes, S. Aguiar, F. Aires da Silva, L. Tavares, V. Almeida, S. Gil // *BMC Vet. Res.* — 2020. — v. 16(1). — 199. — DOI: 10.1186/s12917-020-02417-0

11. *Dinesh N.* Preliminary evaluation of serum zonulin in canine chronic enteropathies / N. Dinesh, J. E. Slovak, C. Kogan, J. J. Kopper // *J. Small Anim. Pract.* — 2022. — v. 63(9). — p. 679—685. — DOI: 10.1111/jsap.13506
12. *Ватников Ю. А.* Клинико-терапевтическое значение микробиоты при гнойно-воспалительных процессах у животных / Ю. А. Ватников, П. А. Руденко, А. А. Руденко, Е. В. Куликов, В. И. Кузнецов, С. Б. Селезнев // *Международный вестник ветеринарии.* — 2021. — № 1. — С. 286—291. — DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.286
13. *Gainor K.* Novel Cyclovirus Species in Dogs with Hemorrhagic Gastroenteritis / K. Gainor, Y. S. Malik, S. Ghosh // *Viruses.* — 2021. — v. 13(11). — 2155. — DOI: 10.3390/v13112155
14. *Amorim I.* Canine Gastric Pathology: A Review / I. Amorim, M. A. Taulescu, M. J. Day, C. Catoi, C. A. Reis, F. Carneiro, F. Gärtner // *J. Comp. Pathol.* — 2016. — v. 154(1). — p. 39—37. — DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.10.181

15. *Dema A.* A comprehensive molecular survey of viral pathogens associated with canine gastroenteritis / A. Dema, M. R. Tallapally, V. K. Ganji, B. Buddala, H. Kodi, A. Ramidi, N. R. Yella, K. Putty // *Arch. Virol.* — 2023. — v. 168(2). — 36. — DOI: 10.1007/s00705-022-05674-6
16. *Kołodziejaska-Sawerska A.* Cytokines in canine inflammatory bowel disease / A. Kołodziejaska-Sawerska, A. Rychlik, A. Depta, M. Wdowiak, M. Nowicki, M. Kander // *Pol. J. Vet. Sci.* — 2013. — v. 16(1). — p. 165—171. — DOI: 10.2478/pjvs-2013-0025
17. *Ватников Ю. А.* Оценка эффективности терапии компенсированного дисбактериоза кишечника у кошек / Ю. А. Ватников, П. А. Руденко, Н. С. Бугров, А. А. Руденко // *Аграрная наука.* — 2022. — № 1. — С. 24—29. — DOI: 10.32634/0869-8155-2022-355-1-24-29
18. *Schmitz S. S.* Value of Probiotics in Canine and Feline Gastroenterology / S. S. Schmitz // *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* — 2021. — v. 51(1). — p. 171—217. — DOI: 10.1016/j.cvsm.2020.09.011

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- Э. А. Куприна** — аспирант;  
**А. А. Руденко** — доктор ветеринарных наук, профессор;  
**В. И. Луцай** — доктор ветеринарных наук, профессор;  
**П. А. Руденко** — доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 20.03.2023 г.

Original article

UDC 636.09:616.34—002.153:636.7

## CYTOKINE PROFILE DURING THE FORMATION OF PAIN SYNDROME IN DOGS WITH ACUTE GASTROENTERITIS

Eliza Arturovna Kuprina\*, Andrey Anatolyevich Rudenko\*, Vladimir Ivanovich Lutsay\*, Pavel Anatolyevich Rudenko\*\*✉

\*Russian Biotechnological University, Moscow, Russia

\*\*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Skryabin, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, pavelrudenko76@yandex.ru✉

**Abstract.** The article is devoted to the study of the level of the cytokine profile of dogs with acute gastroenteritis, depending on the presence of pain. The studies were carried out on the basis of “Vetmaster” clinic of veterinary medicine on dogs that, on the basis of complex diagnostics, were diagnosed with acute gastroenteritis of an alimentary nature. The animals were divided into three groups: the first (control) — clinically healthy ( $n = 15$ ), the second — the animals with gastroenteritis without pain ( $n = 14$ ), the third — the animals with gastroenteritis complicated by pain ( $n = 17$ ). Damage to the tissues of the gastrointestinal tract in case of acute gastroenteritis in dogs triggers the synthesis of pro-inflammatory cytokines and the formation of local and systemic inflammatory reactions. It has been shown that in the dogs with acute gastroenteritis, complicated by pain, there is a pronounced significant change in the cytokine profile, compared with the control group. In the sick dogs with pain, a significant increase in pro-inflammatory cytokines was found: tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-4, interleukin-6, interferon- $\gamma$ , interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-8. In this regard, the degree of increase in the level of cytokines in dogs with gastroenteritis can be used as a marker of the disease severity.

**Keywords:** dogs, acute gastroenteritis, cytokine profile, pathogenesis, diagnosis

Acute gastroenteritis is an inflammatory process that involves the mucous membrane and other tissues of the stomach and small intestine, which is accompanied by a violation of the digestive processes, motor, absorption, secretory, protective and excretory functions, pain syndrome, dehydration and intoxication [1—5]. This disease is often recorded in dogs, especially young ones, and is associated with alimentary etiological factors. In the diagnostic process for this pathology, it is important to ascertain the non-infectious nature by excluding possible infectious and parasitic diseases (for example, parvovirus enteritis, the intestinal form of canine distemper, toxocarosis, toxascariasis, etc.) [2, 6—9].

The inflammatory process that occurs in the gastrointestinal tract is not only local in nature, but also systemically affects the entire body. Inflammatory products and mediators cause endogenous intoxication syndrome in sick animals [10]. The neuroendocrine and immune systems are also involved in the pathological process [6, 11].

Interleukins play an important role in the activation and differentiation of immune cells, as well as in prolif-

eration, maturation, migration and adhesion [12—15]. They also have pro-inflammatory and anti-inflammatory properties [16]. Therefore, one of the main functions of interleukins is to modulate the growth, differentiation and activation of precursor cells of leukocytopoiesis, thrombocytopoiesis and erythrocytopoiesis during inflammatory and immune responses. Interleukins consist of a large group of proteins that can cause a variety of reactions in cells and tissues by binding to high affinity receptors on the surface of cells. They have both paracrine and autocrine functions. Thus, any inflammatory process is not complete without active involvement in the pathogenesis of the underlying disease of the immune system [17, 18].

Activation of the cytokine system plays an important role in the pathogenesis of the gastroenteritis development, while the complication of gastroenteritis in dogs with acute pain syndrome can have an additional stimulating effect on the cytokine profile. It should be noted that researches on the study of the cytokine profile in dogs with acute gastroenteritis have not been previously conducted. A detailed study of these pathogenetic features of immune-inflammatory reactions in

case of acute inflammatory diseases of the gastrointestinal tract will form the basis for the introduction of new diagnostic and therapeutic strategies in practical veterinary medicine.

The objective of the research was to study the blood sera cytokine profile of dogs with acute gastroenteritis, depending on the presence of a complication in the form of pain syndrome.

### MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out on the basis of “Vetmaster” clinic of veterinary medicine (Moscow region, Ramenskoe). The study model is clinical observational, case-control type. The object of the study were dogs, which, on the basis of complex diagnostics, were diagnosed with acute gastroenteritis of an alimentary nature. Diagnostic search for acute gastroenteritis was carried out in a complex manner, taking into account the data of anamnestic data, a thorough physical examination, morphological and biochemical blood tests, plain abdominal radiography and ultrasonography. The studies were carried out on three groups of dogs: the first (control) — clinically healthy ( $n = 15$ ); the second — the animals with gastroenteritis, without pain ( $n = 14$ ); and the third — the animals with gastroenteritis complicated by pain ( $n = 17$ ). The dogs were included in the experimental and control groups using the principle of analogues (age 2—5 years, representatives of dwarf and small breeds, body weight 3—6 kg). The animals were selected for the study as they were admitted to the veterinary clinic, subject to mandatory inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria: alimentary risk factors (violations of the feeding regimen, abrupt change in diet, eating roughage, bones, etc.), the presence of clinical, laboratory, ultrasonographic, radiographic signs of acute gastroenteritis.

Exclusion criteria: autoimmune disorders of the gastrointestinal tract, chronic forms of gastroenteritis, infections (parvovirus, enteritis form of canine distemper, coronavirus), positive parasitological scatological tests, maldigestion and malabsorption syndrome, food allergy, secondary gastroenteritis caused by foreign bodies or tumors of the stomach and intestines.

Clinical examination was carried out according to the standard method. The pain syndrome was assessed on a 4-point scale [16].

Cytokine profile studies were performed on a Multiskan FC plate photometer with a built-in shaker for 96 wells at a spectral range of 450 nm using enzyme immunoassay systems to determine the concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-4, inter-

leukin-6, interferon- $\gamma$ , interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-8 (LLC “Tsitokin”, Russian Federation).

All statistical calculations were performed using the Statistica 7.0 program. At the first stage, the digital material was evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. At the second stage, standard data of descriptive statistics were evaluated (M - arithmetic mean, m — standard error, 95 % CI — 95 % confidence interval). At the third stage, pairwise comparison of groups was carried out according to the Mann-Whitney method. The difference between the indices of cats of different groups was considered significant at  $p < 0.05$ .

### RESULTS AND DISCUSSION

The main complaint of owners of sick dogs was associated with the development of acute gastrointestinal disorder. In the dogs of the first group, acute alimentary (non-infectious) gastroenteritis was characterized by the following clinical picture: lethargy (100 %), moderate depression (85.7 %) or anxiety (14.3 %), diarrhea (100 %), vomiting (100 %), subfebrile (57.1 %) or febrile fever (42.9 %), decreased skin turgor (92.9 %) and moderate tachycardia (42.9 %). In the animals of this group, slight body tension, trembling, slight discomfort during palpation of the abdominal wall and whining were noted. In the animals of the second group, acute gastroenteritis was manifested by a sharp pain syndrome. A sharp depression (100 %), no response to external stimuli (88.2 %), significant tension of the abdominal muscles during palpation of the abdominal organs, and a forced lying posture were noted. Some animals of this group (11.8 %) showed aggression during palpation and auscultation of the abdominal wall. All dogs had moderate tachycardia, tachypnea, decreased skin turgor, vomiting and diarrhea, anorexia and weight loss. In 76.5 % of the dogs of the second group, febrile fever and in 23.5 % subfebrile fever were noted.

The results of the research on the study of the serum concentration of cytokines in the dogs with acute gastroenteritis, depending on the presence of pain, are shown in the Table.

From the table data, it can be seen that in the dogs with acute gastroenteritis, uncomplicated pain syndrome, compared with the control group, there was a significant ( $p \leq 0.001$ ) increase in the concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$  (by 3.75 times), interleukin-4 (by 3.35 times), interleukin-6 (by 2.91 times), interferon- $\gamma$  (by 3.37 times), interleukin-1 $\alpha$  (by 2.08 times) and interleukin-8 (by 4.81 times). In the blood sera of the dogs with acute gastroenteritis with severe pain,



compared with the control group, a more pronounced change in the cytokine profile was found: tumor necrosis factor- $\alpha$  increased by 6.52 times ( $p \leq 0.001$ ), interleukin-4 — by 5.78 times ( $p \leq 0.001$ ), interleukin-6 — by 6.43 times ( $p \leq 0.001$ ), interferon- $\gamma$  — by 5.20 times ( $p \leq 0.001$ ), interleukin-1 $\alpha$  — by 4.23 times ( $p \leq 0.001$ ) and interleukin-8 — by 12.9 times ( $p \leq 0.001$ ). In sick

dogs with the presence of pain, compared with those with painless forms of gastroenteritis, higher values of tumor necrosis factor- $\alpha$  (by 1.74 times), interleukin-4 (by 1.72 times), interleukin-6 (by 2.21 times), interferon- $\gamma$  (by 1.54 times), interleukin-1 $\alpha$  (by 2.04 times) and interleukin-8 (by 2.68 times) in serum at the highest level of statistical significance ( $p \leq 0.001$ ).

Table

Cytokine profile in case of canine gastroenteritis depending on the pain syndrome severity

Indicator	Statistical parameters	Experimental group 1 (n = 15)	Experimental group 2 (n = 14)	Experimental group 3 (n = 17)
Tumor necrosis factor- $\alpha$ , pg/cm <sup>3</sup>	M $\pm$ m	5.3 $\pm$ 0.7	19.9 $\pm$ 1.7***	34.6 $\pm$ 2.5*** □□□
	95 % CI	3.9—6.8	16.3—23.6	29.3—39.9
Interleukin-4, pg/cm <sup>3</sup>	M $\pm$ m	177.3 $\pm$ 14.9	594.9 $\pm$ 30.3***	1021.0 $\pm$ 76.4*** □□□
	95 % CI	145.3—209.2	529.5—660.4	859.0—1182.9
Interleukin-6, pg/cm <sup>3</sup>	M $\pm$ m	248.3 $\pm$ 12.6	722.4 $\pm$ 34.8***	1598.1 $\pm$ 74.1*** □□□
	95 % CI	221.3—275.4	647.3—797.5	1440.9—1755.2
Interferon- $\gamma$ , pg/cm <sup>3</sup>	M $\pm$ m	56.1 $\pm$ 6.8	188.8 $\pm$ 7.6***	291.6 $\pm$ 10.1*** □□□
	95 % CI	41.6—70.6	172.4—205.2	270.1—313.1
Interleukin-1 $\alpha$ , pg/cm <sup>3</sup>	M $\pm$ m	1.3 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.1***	5.5 $\pm$ 0.3*** □□□
	95 % CI	0.6—1.9	2.4—3.0	4.8—6.2
Interleukin-8, pg/cm <sup>3</sup>	M $\pm$ m	1.1 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.3***	14.2 $\pm$ 0.9*** □□□
	95 % CI	0.8—1.4	4.7—5.9	12.3—16.0

Note. M — arithmetic mean, m — standard error, 95 % CI — 95 % confidence interval

\*  $p \leq 0.05$

\*\*  $p \leq 0.01$

\*\*\*  $p \leq 0.001$  — significant difference between the experimental groups and control (Mann — Whitney test)

□  $p \leq 0.05$

□□  $p \leq 0.01$

□□□  $p \leq 0.001$  significant difference between the experimental groups (Mann — Whitney test)

Gastroenteritis in dogs is a common problem associated with nutritional risk factors (drastic change in diet, eating disorders, roughage, eating bones, chewing sticks, etc.). A traumatic damaging factor leads to the activation and reproduction of conditionally pathogenic microorganisms. Systemic inflammatory response

and body dehydration are important pathogenetic links in the development of acute gastroenteritis [1, 10, 14]. In the dogs with gastroenteritis, there is a significant increase in the serum concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$ , the biological effects of which include the activation of other cells (macrophages, T-cells, B-cells),

the production of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 and -6) and chemokines (interleukin-8), expression of the adhesion molecule, inhibition of regulatory T cells, production of matrix metalloproteinase, and induction of apoptosis [16]. Pain is one of the signs of inflammation and, obviously, positively correlates with the severity of tissue damage. Pain syndrome in case of gastroenteritis results in higher serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in sick dogs.

In the dogs with acute gastroenteritis, the blood serum concentration of interleukin-4 is significantly increased. It should be noted that T-lymphocytes synthesize interleukin-4, which acts both on B- and, in fact, on T-cells. In addition, interleukin-4, being a B-cell growth factor, causes the selection of Ig E and Ig G1 isotypes. Interleukin-4 also causes differentiation and proliferation of Th2, inhibits interferon-mediated activation of macrophages [1, 6]. We have shown that pain syndrome complication of acute gastroenteritis leads to higher production of interleukin-4.

Interleukin-6 significantly increases in the blood serum of the dogs with acute gastroenteritis. T- and B-lymphocytes, fibroblasts and macrophages produce interleukin-6. B-lymphocytes and hepatocytes are its main targets. The primary effects of this cytokine include B cell differentiation and stimulation of acute phase proteins [11].

In an inflammatory and immune response, macrophages, large granular lymphocytes, B cells, endothelium, fibroblasts and astrocytes secrete interleukin-1, which causes lymphocyte activation, macrophage stimulation, increased leukocyte/endothelial adhesion, fever due to hypothalamic stimulation, and release of acute phase proteins by the liver [14]. In our study, it has been found that in the dogs with gastroenteritis, there is a significant increase in the concentration of interleukin-1 $\alpha$ , while the pain syndrome leads to its higher production. Interferons exhibit immunomodulatory effects by initiating signaling cascades that lead to the expression of gene products such as class 1 major histocompatibility complex, microglobulin B2 and others [10].

In the dogs with acute gastroenteritis, we found a significant increase in the concentration of interferon- $\gamma$ . Pain syndrome has a more pronounced stimulating effect on the synthesis of interferon- $\gamma$  in the dogs with gastroenteritis.

In the dogs with acute gastroenteritis, the concentration of interleukin-8, which is produced by monocytes and fibroblasts, significantly increases. Its main targets are neutrophils, basophils, mast cells, macrophages and keratinocytes. It induces neutrophil che-

motaxis, angiogenesis, superoxide release, and release of histamine granules by basophils [6].

Thus, damage to the tissues of the gastrointestinal tract in case of acute gastroenteritis in dogs triggers the synthesis of pro-inflammatory cytokines and the formation of local and systemic inflammatory reactions. Pain is one of the signs of inflammation and correlates with the severity of tissue damage. Obviously, the aggressive release of pro-inflammatory cytokines in the dogs with gastroenteritis complicated by acute pain syndrome indicates more intense tissue damage and the involvement of immune and autoimmune processes in the pathological process, which requires more detailed further study. The degree of cytokine elevation in the dogs with gastroenteritis can be used as a marker of the disease severity.

## CONCLUSION

In case of the pathogenetic profile of the development of acute non-infectious gastroenteritis in dogs, activation of pro-inflammatory cytokines occupies a special place. It should be noted that the complication of gastroenteritis in the dogs with acute pain syndrome can introduce an additional stimulating effect on the cytokine profile of blood sera. Thus, in the blood serum of the dogs with acute gastroenteritis complicated by pain, a more pronounced significant ( $p \leq 0.001$ ) change in the cytokine profile was noted: tumor necrosis factor- $\alpha$  increased by 6.52 $\uparrow$  times, interleukin-4 — by 5.78 $\uparrow$  times, interleukin-6 — by 6.43 $\uparrow$  times, interferon- $\gamma$  — by 5.20 $\uparrow$  times, interleukin-1 $\alpha$  — by 4.23 $\uparrow$  times, interleukin-8 — by 12.9 $\uparrow$  times, when compared with the control group. It was noted that in the sick dogs of the third experimental group, when compared with the animals of the second group, there was a more intense ( $p \leq 0.001$ ) release of pro-inflammatory cytokines: tumor necrosis factor- $\alpha$  (by 1.74 times $\uparrow$ ), interleukin-4 (by 1.72 times $\uparrow$ ), interleukin-6 (by 2.21 times $\uparrow$ ), interferon- $\gamma$  (by 1.54 times $\uparrow$ ), interleukin-1 $\alpha$  (by 2.04 times $\uparrow$ ), interleukin-8 (by 2.68 times $\uparrow$ ). In this regard, the data obtained complement the pathogenetic picture in case of acute inflammatory diseases of the gastrointestinal tract in dogs, which creates prerequisites for the introduction of new diagnostic and therapeutic criteria in practical veterinary gastroenterology.

## REFERENCES

1. Malewska K. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) in dogs and cats / K. Malewska, A. Rychlik, R. Nieradka, M. Kander // Pol. J. Vet. Sci. — 2011. — v. 14(1). — p. 165—171. — DOI: 10.2478/v10181-011-0026-7

2. Allenspach K. Current diagnostics for chronic enteropathies in dogs / K. Allenspach, J. P. Mochele // Vet. Clin. Pathol. — 2022. — v. 50(Suppl. 1). — p. 18—28. — DOI: 10.1111/vcp.13068
3. Klyukin S. D. Dynamics of clinical and biochemical blood indicators during the correction of pain syndrome with drugs “Gabapentin” and “Fleksoprofen” / S. D. Klyukin, V. V. Salautin, N. A. Pudovkin, S. E. Salautina // Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Bauman (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman). — 2021. — V. 245. — No. 1. — P. 76—81. DOI: 10.31588/2413-4201-1883-245-1-76-82
4. Yuldashbaev Yu. A. Features of the functional state of the organism of sheep under stress / Yu. A. Yuldashbaev, Yu. A. Vatnikov, P. A. Rudenko, A. A. Rudenko // Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstvo (Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Series: Agronomy and animal husbandry). — 2022. — V. 17. — No. 2. — P. 193—202. — DOI: 10.22363/2312-797X-2022-17-2-193-202
5. Rudenko P. Characteristic, evolution and influence on epizootic process of microorganisms in biocenoses of livestock farms / P. Rudenko, A. Strizhakov, A. Rudenko, I. Bondareva, E. Notina, I. Bykova, T. Dryemova, V. Lutsay, N. Ivanov, N. Sakhno, P. Meshcheryakov // European Journal of Molecular & Clinical Medicine. — 2021. — 8(2). — p. 1865—1877.
6. Unterer S. Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome in Dogs / S. Unterer, K. Busch // Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. — 2021. — v. 51(1). — p. 79—92. — DOI: 10.1016/j.cvsm.2020.09.007
7. Walker D. Canine inflammatory bowel disease / D. Walker, O. Garden, K. Allenspach // Vet. Rec. — 2007. — v. 160(16). — 560. — DOI: 10.1136/vr.160.16.560-a
8. Pavlova A. V. Antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from animals in the conditions of veterinary clinics in Lugansk / A. V. Pavlova, N. V. Pimenov // Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya (Veterinary science, zootechnics and biotechnology). — 2020. — No. 2. — P. 38—43. — DOI: 10.26155/vet.zoo.bio.202002006
9. El-Sebaey A. M. Circulating hepatocyte derivative of miRNA as a diagnostic biomarker of cholelithiasis in dogs / A. M. El-Sebaey, P. N. Abramov // Veterinarnyy vrach (Veterinarian). — 2020. — No. 2. — P. 64—73. — DOI: 10.33632/1998-698X.2020-2-64-73
10. Alves F. Canine parvovirus: a predicting canine model for sepsis / F. Alves, S. Prata, T. Nunes, J. Gomes, S. Aguiar, F. Aires da Silva, L. Tavares, V. Almeida, S. Gil // BMC Vet. Res. — 2020. — v. 16(1). — 199. — DOI: 10.1186/s12917-020-02417-0
11. Dinesh N. Preliminary evaluation of serum zonulin in canine chronic enteropathies / N. Dinesh, J. E. Slovak, C. Kogan, J. J. Kopper // J. Small Anim. Pract. — 2022. — v. 63(9). — p. 679—685. — DOI: 10.1111/jsap.13506
12. Vatnikov Yu. A. Clinical and therapeutic significance of microbiota in case of purulent-inflammatory processes in animals / Yu. A. Vatnikov, P. A. Rudenko, A. A. Rudenko, E. V. Kulikov, V. I. Kuznetsov, S. B. Seleznev // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii (International Bulletin of Veterinary Medicine). — 2021. — No. 1. — P. 286—291. — DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.286
13. Gainor K. Novel Cyclovirus Species in Dogs with Hemorrhagic Gastroenteritis / K. Gainor, Y. S. Malik, S. Ghosh // Viruses. — 2021. — v. 13(11). — 2155. — DOI: 10.3390/v13112155
14. Amorim I. Canine Gastric Pathology: A Review / I. Amorim, M. A. Taulescu, M. J. Day, C. Catoi, C. A. Reis, F. Carneiro, F. Gärtner // J. Comp. Pathol. — 2016. — v. 154(1). — p. 39—37. — DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.10.181
15. Dema A. A comprehensive molecular survey of viral pathogens associated with canine gastroenteritis / A. Dema, M. R. Tallapally, V. K. Ganji, B. Buddala, H. Kodi, A. Ramidi, N. R. Yella, K. Putty // Arch. Virol. — 2023. — v. 168(2). — 36. — DOI: 10.1007/s00705-022-05674-6
16. Kołodziejska-Sawerska A. Cytokines in canine inflammatory bowel disease / A. Kołodziejska-Sawerska, A. Rychlik, A. Depta, M. Wdowiak, M. Nowicki, M. Kander // Pol. J. Vet. Sci. — 2013. — v. 16(1). — p. 165—171. — DOI: 10.2478/pjvs-2013-0025
17. Vatnikov Yu. A. Evaluation of the efficacy of therapy for compensated intestinal dysbacteriosis in cats / Yu. A. Vatnikov, P. A. Rudenko, N. S. Bugrov, A. A. Rudenko // Agrarnaya nauka (Agrarian science). — 2022. — No. 1. — P. 24—29. — DOI: 10.32634/0869-8155-2022-355-1-24-29
18. Schmitz S. S. Value of Probiotics in Canine and Feline Gastroenterology / S. S. Schmitz // Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. — 2021. — v. 51(1). — p. 171—217. — DOI: 10.1016/j.cvsm.2020.09.011

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**E. A. Kuprina** — Postgraduate student;  
**A. A. Rudenko** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor;  
**V. I. Lutsay** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor;  
**P. A. Rudenko** — Doctor of Veterinary Sciences, Principal Scientific Associate.

The article was submitted 20.03.2023.

Научная статья  
 УДК 619:[571.17:577.175.14:618.7]:636.4  
 DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.131

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ГОРМОНАЛЬНОЙ И ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ У СУПОРОСНЫХ СВИНОМАТОК ПРИ ВОЗНИКНОВЕНИИ ПОСЛЕРОДОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Лариса Юрьевна Сашнина<sup>✉</sup>, Алексей Гаврилович Шахов,  
 Юлия Юрьевна Владимирова, Галина Васильевна Никоненко,  
 Кристина Олеговна Акулова

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Российская Федерация, e-mail: l.yu.sashnina@mail.ru<sup>✉</sup>

**Аннотация.** В статье представлены результаты изучения взаимосвязи провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1β, фактора некроза опухоли-α, противовоспалительных медиаторов: интерлейкина-4, интерлейкина-10 и гормонов: кортизола, прогестерона и эстрадиола у супоросных свиноматок клинически здоровых и заболевших после опороса. Кровь для исследований брали за 5—7 дней до осеменения и на 38—40, 78—81 дни супоросности. После опороса по результатам ретроспективного анализа животные были разделены на 2 группы: клинически здоровые и с послеродовой патологией. В результате проведенного корреляционного анализа по Спирмену у свиноматок обеих групп установлена достоверная взаимосвязь между изученными показателями. В группе свиноматок с послеродовой патологией между показателями цитокинового и гормонального статуса выявлена положительная корреляция прогестерона с ФНО-α, отрицательная между эстрадиолом и ИЛ-4 и отсутствие ассоциаций между кортизолом и цитокинами ИЛ-1β и ИЛ-10, прогестероном и ИЛ-4, эстрадиолом и ИЛ-1β. Полученные данные свидетельствуют о нарушении взаимодействия иммунной и эндокринной систем, баланса про- и противовоспалительных цитокинов у свиноматок с послеродовой патологией.

**Ключевые слова:** свиноматки, супоросность, цитокины, стероидные гормоны, кортизол, послеродовая патология, корреляция

Ведущую роль в обеспечении физиологического течения супоросности играет иммуноэндокринная регуляция, компоненты которой взаимодействуют по принципу прямой и обратной связи, и обеспечивают морфологические, иммунологические и адаптационно-компенсаторные изменения, направленные на создание условий для развития плодов [1]. При этом тесная связь иммунных и эндокринных механизмов регуляции гомеостаза определяет клинические проявления развившихся нарушений, в том числе и возникновение послеродовой патологии.

Ключевую роль в развитии воспалительного процесса играют цитокины — медиаторы межсистемного взаимодействия, участвующие в регуляции процесса оплодотворения, формирования и развития органов плодов, подготовки к опоросу. В течение супоросности каждому периоду соответствует определенный цитокиновый профиль,

отражающий взаимоотношения в системе «мать-плод» и механизмы нейрогуморальной регуляции. В настоящее время установлено, что в начале супоросного периода для успешной имплантации и плацентации необходима повышенная выработка провоспалительных цитокинов и преобладание Th1 клеточного иммунитета, в дальнейшем цитокиновый баланс смещается в сторону иммуносупрессорных медиаторов, индуцирующих Th2 иммунный ответ [2, 3].

Наряду с цитокинами значительное регуляторное влияние оказывают стероидные гормоны: кортизол, прогестерон, эстрадиол, которые вырабатываются с участием фетоплацентарного комплекса. Они обеспечивают функциональную дифференциацию эндометриальных структур, мобилизацию энергетических ресурсов и иммуносупрессию в формирующейся системе мать-зародыш-плод, необходимых для имплантации и плацентации эмбриона [4].

© Сашнина Л. Ю., Шахов А. Г., Владимирова Ю. Ю., Никоненко Г. В., Акулова К. О., 2023

Многочисленные работы в области гуманной медицины по изучению взаимосвязи между цитокинами и гормонами, а также между про- и противовоспалительными медиаторами, продуцируемыми различными субпопуляциями Т-клеток (Th1/Th2) [5—7], указывают на актуальность аналогичных исследований в ветеринарии.

В связи с вышесказанным целью исследований стала оценка гормонального и цитокинового статуса свиноматок в периоды до осеменения и супоросности и изучение корреляционных связей между про- (ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ ) и противовоспалительными (ИЛ-4, ИЛ-10) цитокинами и гормонами: кортизолом, прогестероном, эстрадиолом у свиноматок клинически здоровых и с развившейся патологией после опороса.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения исследований были подобраны клинически здоровые свиноматки помесных пород 3—4 опороса ( $n = 12$ ) в период после отъема поросят. 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» (протокол № 1-02/23 от 10.02.2023 г.). Уровень цитокинов: интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-10 (ИЛ-10), и гормонов: кортизола, прогестерона и эстрадиола определяли в крови от свиноматок за 5—7 дней до осеменения, на 38—40 и 78—81 сутки супоросности методом иммуноферментного анализа (ИФА) с последующим учетом результатов на спектрофотометре «Униплан-ТМ» в соответствии с утвержденными наставлениями к диагностическим наборам.

После получения результатов был проведен ретроспективный анализ, в ходе которого, в зависимости от характера течения у свиноматок послеродового периода, животных разделили на 2 группы: I ( $n = 7$ ) — свиноматки, оставшиеся клинически здоровыми, II ( $n = 5$ ) — животные, у которых после опороса регистрировали острый гнойно-катаральный эндометрит и ММА (метрит-мастит-агалактию).

Статистический анализ полученных данных и достоверность различий осуществляли с помощью прикладных компьютерных программ «Statistica 10.0» (Stat Soft Inc., США) и Microsoft

Excel. Результаты исследований представлены в формате Me (Q25 %; Q75 %), где Me — медиана, Q25 % и Q75 % — квартили. Оценивалась значимость различий внутри групп и между группами с помощью критерия Манна — Уитни. Наиболее важными считали различия между показателями со степенью достоверной вероятности 95 % и выше ( $p < 0,05$ ).

Между всеми исследуемыми показателями определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена, показывающий степень зависимости одного признака от другого. Для оценки силы взаимосвязи использовали шкалу Чеддока, при которой  $r_s = 0,7—1,0$  — соответствует высокой силе корреляции,  $r_s = 0,3—0,7$  — средней,  $r_s = 0,1—0,3$  — слабой силе корреляции.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе содержания цитокинов установлено, что уже до осеменения у свиноматок с послеродовой патологией уровни провоспалительных цитокинов и противовоспалительных медиаторов отличались от их содержания у клинически здоровых животных (табл. 1).

Так количество ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , являющихся ключевыми цитокинами воспаления, было выше на 17,9 и 16,0 %, а ИЛ-4 и ИЛ-10, оказывающих противовоспалительное действие, ниже на 14,1 и 9,5 %. Выявленные различия сохранялись и в период супоросности: на 38—40 дни уровни ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  превышали аналогичные показатели животных первой группы на 21,4 и 30,0 %, а на 78—81 сутки: на 18,8 и 18,5 %. Концентрации ИЛ-4 и ИЛ-10 оставались ниже на 14,8 и 13,2 % (38—40 дни); и на 14,9 и 13,7 % (78—81 сутки) соответственно.

Преобладание цитокинов, индуцирующих развитие воспаления и дифференцировку лимфоцитов по Th-1- фенотипу над медиаторами, обеспечивающими активацию иммуносупрессорных Th-2 — лимфоцитов у заболевших свиноматок повлияло на повышение значения цитокинового индекса во все периоды исследования в 2,7; 1,4 и 1,5 раза по сравнению с его значением у здоровых свиноматок.

Гормональный статус, находящийся в тесной взаимосвязи с цитокиновым профилем, у свиноматок с послеродовой патологией, по сравнению с таковым у здоровых животных, характеризовался повышенным количеством кортизола на 14,6 % до осеменения и снижением его концентрации на 8,9 и 10,8 % на 38—40 и 78—81 дни супоросности соответственно (табл. 2).

Таблица 1

#### Цитокиновый профиль свиноматок

Показатели	Группа	До осеменения	Срок супоросности, сутки	
			38—40	78—81
ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл	I	5,6 [3,4; 4,5]	7,0 [6,9;7,3] <sup>+</sup>	6,4 [5,9;6,7]
	II	6,6 [6,33;7,2] <sup>*</sup>	8,5 [8,4;8,5] <sup>++</sup>	7,6 [7,4;7,7] <sup>++</sup>
ФНО- $\alpha$ , пг/мл	I	2,5 [1,8; 2,2]	3,0 [2,7;3,6]	2,7 [1,8;3,4]
	II	2,9 [2,8;2,9]	3,9 [3,8;4,0] <sup>++</sup>	3,2 [3,0;3,7] <sup>*</sup>
ИЛ-4, пг/мл	I	6,1 [5,9;6,4]	6,7 [5,4;8,1]	7,1 [6,5;7,6]
	II	5,2 [4,8;5,6] <sup>*</sup>	5,7 [5,0;6,5]	6,1 [6,0;6,5] <sup>*</sup>
ИЛ-10, пг/мл	I	6,3 [5,9;6,6]	6,8 [6,3;7,2]	7,3 [6,7;8,1]
	II	5,7 [5,4;5,9]	5,9 [5,2;6,0] <sup>*</sup>	6,3 [6,1;6,7] <sup>*</sup>
ЦИ Th1/ Th2	I	0,6 [0,4;0,5]	0,8 [0,7;0,8] <sup>+</sup>	0,6 [0,6;0,7] <sup>+</sup>
	II	1,6 [1,9;2,0] <sup>*</sup>	1,1 [1,0;1,2] <sup>++</sup>	0,9 [0,8;0,9] <sup>++</sup>

**Примечание:** значения представлены в виде Me [Q25;Q75]

I группа — здоровые животные; II группа — заболевшие после опороса свиноматки

<sup>\*</sup>  $p < 0,05—0,001$  относительно здоровых животных

<sup>+</sup>  $p < 0,05—0,001$  относительно предыдущего периода

Таблица 2

#### Гормональный статус свиноматок

Показатели	Группа	До осеменения	Срок супоросности, сутки	
			38—40	78—81
Прогестерон, нмоль/л	I	6,4 [5,7;7,2]	81,0 [74,6;89,7] <sup>+</sup>	107,1 [103,2;111,4] <sup>+</sup>
	II	6,1 [5,6;6,9]	75,8 [71,9;79,6] <sup>+</sup>	96,2 [90,4;101,2] <sup>+</sup>
Эстрадиол, нмоль/л	I	3,3 [2,9;4,0]	3,2 [2,7;3,6]	3,8 [3,6;3,9]
	II	2,6 [2,7;3,2] <sup>*</sup>	2,7 [2,4;3,1]	2,7 [2,1;3,0] <sup>*</sup>
Прогестерон/эстрадиол	I	1,8 [1,7;2,0]	26,3 [22,1;28,8] <sup>+</sup>	29,9 [29,2;30,4]
	II	2,5 [1,9;3,1]	28,3 [25,6; 29,4] <sup>+</sup>	36,4 [29,0;41,4]
Кортизол, нмоль/л	I	198,8 [155;232]	265,3 [197;313] <sup>+</sup>	273,9 [197;329]
	II	227,9 [182;268] <sup>*</sup>	241,6 [236;275]	244,2 [231;257]

**Примечание:** значения представлены в виде Me [Q25; Q75]

I группа — здоровые животные; II группа — заболевшие после опороса свиноматки

<sup>\*</sup>  $p < 0,05—0,001$  относительно здоровых животных

<sup>+</sup>  $p < 0,05—0,001$  относительно предыдущего периода

Кортизол, активно участвующий в поддержании нейроэндокринной регуляции полового цикла [8], способствует физиологическому течению беременности, оказывает регулирующее воздействие на сосудистую систему, оберегает организм от возникновения воспалительных процессов и воздействия стрессов [7]. Снижение количества кортизола у заболевших свиноматок может свидетельствовать об угнетении обменных процессов и фетоплацентарной недостаточности, а также способствовать возникновению патологий во время супоросности и после опороса.

Содержание прогестерона, обеспечивающего в физиологических концентрациях секреторную и трофическую функцию матки, и эстрадиола, необходимого для сохранения и поддержания супоросности, у свиноматок с послеродовой патологией было ниже во все сроки исследования на 4,7; 6,4; 10,2 % и на 15,6; 21,2; 28,9 % соответственно, по

сравнению с их количеством у здоровых свиноматок. При этом значение соотношения прогестерон/эстрадиол у них было выше на 38,9; 7,6 и 38,9 % соответственно, что указывает на преобладание прогестерона в изученные периоды.

Для установления существующих взаимосвязей исследуемых показателей провели ранговый корреляционный анализ по Спирмену (рис. 1), который показал наличие отрицательной корреляционной связи в обеих группах между кортизолом и эстрадиолом ( $r = -0,72$  и  $-0,40$ ), кортизолом и прогестероном ( $r = -0,54$  и  $-0,58$ ), и положительной ассоциации между прогестероном и эстрадиолом ( $r = 0,70$  и  $0,54$ ). Однако, у заболевших свиноматок степень выраженности корреляции между кортизолом и эстрадиолом, а также прогестероном и эстрадиолом была ниже на 44,4 и 22,9 % соответственно по сравнению с показателями здоровых животных



Рис. 1. Взаимосвязь гормональной и цитокиновой регуляции в период супоросности ( $p < 0,05$ )

Примечание: (+) — положительная корреляция  
(-) — отрицательная корреляция

При оценке влияния уровня гормонов на экспрессию цитокинов в течение супоросности у здоровых свиноматок установлена положительная взаимосвязь кортизола с ИЛ-1 $\beta$  ( $r = 0,47$ ) и ИЛ-10 ( $r = 0,30$ ); прогестерона с ИЛ-4 ( $r = 0,41$ ) и отрицательная корреляция между эстрадиолом и ИЛ-1 $\beta$  ( $r = -0,36$ ). В тоже время у заболевших после опороса свиноматок между данными показателями отсутствовала выраженная взаимосвязь, при этом у них была выявлена положительная корреляция между прогестероном и ФНО- $\alpha$  ( $r = 0,32$ ) и отрицательная — между эстрадиолом и ИЛ-4 ( $r = -0,40$ ).

При изучении взаимосвязей цитокинового профиля у здоровых и впоследствии заболевших жи-

вотных отмечено наличие положительной корреляции между ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  ( $r = 0,36$ ;  $r = 0,30$ ), ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-10 ( $r = 0,51$ ;  $r = 0,50$ ) соответственно. При этом у здоровых свиноматок установлена прямая взаимосвязь ИЛ-4 с ИЛ-1 $\beta$  ( $r = 0,51$ ), ФНО- $\alpha$  ( $r = 0,67$ ) и ИЛ-10 ( $r = 0,55$ ); и ФНО- $\alpha$  с ИЛ-10 ( $r = 0,64$ ).

У животных обеих групп выявлена отрицательная корреляция срока супоросности с концентрацией кортизола ( $r = -0,75$ ;  $r = -0,49$ ) и положительная связь с содержанием прогестерона ( $r = 0,70$ ;  $r = 0,54$ ) и эстрадиола ( $r = 0,94$ ;  $r = 0,81$ ), которые были наиболее выраженные у здоровых животных. Кроме того, у клинически здоровых свиноматок

установлена обратная корреляция между количеством ИЛ-1 $\beta$  и сроком супоросности ( $r = -0,30$ ), что соответствует концепции «беременность как феномен Th-2» при которой отмечается доминирование противовоспалительных цитокинов и снижение содержания провоспалительных медиаторов с течением беременности [2, 3].

Выявленный повышенный уровень провоспалительных и пониженное содержание противовоспалительных цитокинов до осеменения и в период супоросности у впоследствии заболевших свиноматок свидетельствует о предрасположенности к развитию воспалительных процессов. Иммуные механизмы играют решающую роль во взаимоотношениях «мать-плод», при этом гормоны беременности индуцируют изменения в популяциях и функциях иммунных клеток, способствуя иммунной толерантности, снижая экспрессию основных белков гистосовместимости трофобластом, ремоделирование тканей и ангиогенез [9, 10]. Гормональные и иммунные сдвиги, регистрирующиеся в процессе супоросности у здоровых животных, в частности увеличение концентрации ИЛ-4 и стабильно высокие уровни прогестерона приводят к сдвигу иммунного баланса в сторону Th-2 и его поддержанию до перинатального периода.

Выявленные корреляционные взаимосвязи между изменениями в уровнях кортизола и цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-10 у клинически здоровых свиноматок и отсутствие их у заболевших животных, обусловлены способностью кортизола отвечать функциональной активацией на повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  и зависит от состояния иммунной системы [11].

Появление прямой взаимосвязи между прогестероном и ФНО- $\alpha$  и обратной корреляции между эстрадиолом и ИЛ-4 у свиноматок с послеродовой патологией также свидетельствует о наличии воспалительного процесса в организме, поскольку у клинически здоровых свиноматок установленные взаимосвязи не выявлялись.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о выраженной взаимосвязи цитокиновой и эндокринной регуляции во время супоросности. При этом у клинически здоровых свиноматок отмечены прямые и обратные корреляции заметной и высокой степени, а у животных с послеродовой патологией выявлены в основном умеренные и слабые корреляции. Нарушение или отсутствие корреляционных связей в цитокиновом и гормональном профиле у заболевших после опороса свиноматок свиде-

тельствует о проявлении иммунодефицитного состояния, способствующего к возникновению послеродовой патологии.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. След А. Н. Лейкоциты и особенности их взаимосвязей с кортизолом и прогестероном в организме устойчивых коров / А. Н. След, М. А. Дерхо // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2019. — № 1 (75). — С. 133—136.
2. 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.
3. Сашнина Л. Ю. Роль цитокинов в обеспечении физиологического течения беременности / Л. Ю. Сашнина, А. Г. Шахов, Ю. Ю. Владимиров, Г. В. Никоненко // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2022. — № 3(20). — С. 144—161. — DOI: 10.17238/issn2541-8203.2022.3.144
4. Нежданов А. Г. Гормональный и цитокиновый профиль крови молочных коров в ранний период гестации / А. Г. Нежданов, С. В. Шабунин, В. И. Михалев, Н. В. Пасько, В. А. Сафонов // Российская сельскохозяйственная наука. — 2020. — № 2. — С. 70—73. DOI: 10.31857/S2500-2627-2020-2-70-73
5. Газиева И. А. Иммунопатогенетические механизмы формирования плацентарной недостаточности и ранних репродуктивных потерь: автореферат дис. ... доктора биологических наук: 14.03.09 / Газиева Ирина Александровна; [Место защиты: Юж. — Ур. гос. мед. ун-т]. — Челябинск, 2014. — 45 с.
6. Репина М. А. Прогестерон и беременность / М. А. Репина // Акушерство и женские болезни. — 2011. — Т. LX. Вып. 3. — С. 130—136.
7. Довжикова И. В. Кортизол при беременности / И. В. Довжикова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2010. — № 6 (76). — Ч. 1. — С. 226—229.
8. Гончаров Н. П. Кортикостероиды: метаболизм, механизм действия и клиническое применение / Н. П. Гончаров, Г. С. Колесников // М.: Адамант — 2002. — 203 с.
9. Ширшев С. В. Молекулярные механизмы гормонального и гормонально-цитокинового контроля иммунной толерантности при беременности / С. В. Ширшев // Биологические мембраны. — 2014. — Т. 31, № 5. — С. 303. — DOI: 10.7868/S0233475514050089
10. Ott T. L. Symposium review: Immunological detection of the bovine conceptus during early pregnancy / Ott T. L. // Journal of dairy science. — 2019. — Т. 102. — № 4. — С. 3766—3777.
11. Монастирський В. О. Динаміка вмісту інтерлейкіну-1 $\beta$  та кортизолу в плазмі крові хворих на ішемічний інсульт / Монастирський В. О. // Український вісник психоневрології. — 2010. — Т. 18. — № 1. — С. 23—25.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Л. Ю. Сашнина** — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;  
**А. Г. Шахов** — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник;  
**Ю. Ю. Владимирова** — кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник;  
**Г. В. Никоненко** — младший научный сотрудник;  
**К. О. Акулова** — младший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 24.03.2023 г.

Original article

UDC 619:[571.17:577.175.14:618.7]:636.4

**RELATIONSHIP OF HORMONAL AND  
CYTOKINE REGULATION IN PREGNANT  
SOWS WITH POSTPARTUM DISEASES**

**Larisa Yuryevna Sashnina<sup>✉</sup>, Aleksey Gavrillovich Shakhov, Yuliya Yuryevna Vladimirova,  
Galina Vasilyevna Nikonenko, Kristina Olegovna Akulova**

*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology  
and Therapy, Voronezh, Russia, l.yu.sashnina@mail.ru<sup>✉</sup>*

**Abstract.** The article presents the results of studying the relationship of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ), anti-inflammatory mediators (interleukin-4, interleukin-10) and hormones (cortisol, progesterone and estradiol) in clinically healthy pregnant sows and diseased after farrowing. Blood for research was taken 5—7 days before insemination and on days 38—40, 78—81 of gestation. After farrowing, according to the results of a retrospective analysis, the animals were divided into 2 groups: clinically healthy and with postpartum pathology. As a result of the correlation analysis according to Spearman, a significant relationship between the studied indicators was established in sows of both groups. In the group of sows with postpartum pathology, a positive correlation of progesterone with TNF- $\alpha$  was revealed between the indicators of cytokine and hormonal status, a negative correlation between estradiol and IL-4 and no associations between cortisol and cytokines IL-1 $\beta$  and IL-10, progesterone and IL-4, estradiol and IL-1 $\beta$ . The data obtained indicate a violation of the interaction of the immune and endocrine systems, the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in sows with postpartum pathology.

**Keywords:** sows, gestation, cytokines, steroid hormones, cortisol, postpartum pathology, correlation

The leading role in ensuring the physiological course of gestation belongs to immunoendocrine regulation, the components of which interact according to the principle of direct and indirect relationship, and provide morphological, immunological and adaptive-compensatory changes aimed at creating conditions for the development of fetuses [1]. At the same time, the close connection between the immune and endocrine mechanisms of homeostasis regulation determines the clinical manifestations of the developed disorders, including the occurrence of postpartum pathology.

A key role in the inflammatory process development belongs to cytokines — mediators of intersystem interaction involved in the regulation of the fertilization process, the formation and development of fetus organs, and preparation for farrowing. During gestation, each period corresponds to a certain cytokine profile, reflecting the relationship in the mother-fetus system and the mechanisms of neurohumoral regulation. It has now been established that at the beginning of the gestation period, successful implantation and placentation require an increased production

of pro-inflammatory cytokines and the predominance of Th1 cellular immunity; later, the cytokine balance shifts towards immunosuppressive mediators that induce a Th2 immune response [2, 3].

Along with cytokines, steroid hormones (cortisol, progesterone, estradiol), which are produced with the participation of the fetoplacental complex, have a significant regulatory effect. They provide functional differentiation of endometrial structures, mobilization of energy resources and immunosuppression in the developing mother-embryo-fetus system, which are necessary for implantation and placentation of the embryo [4].

Numerous works in the field of human medicine on the study of the relationship between cytokines and hormones, as well as between pro- and anti-inflammatory mediators produced by various subpopulations of T cells (Th1/Th2) [5—7], indicate the relevance of similar studies in veterinary medicine.

In connection with the above, the objective of the research was to assess the hormonal and cytokine status of sows in the periods before insemination and gestation and to study the correlations between pro-

(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines and hormones (cortisol, progesterone, estradiol) in clinically healthy sows and with the pathology developed after farrowing.

**MATERIAL AND METHODS**

Clinically healthy sows of mixed breeds of 3—4 farrowings ( $n = 12$ ) were chosen for the research in the period after weaning.

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 Commission on Bioethics of FSBSI “ARVRIPP&T” (protocol No. 1—02/23 dtd. February 10, 2023). The level of cytokines (interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10)) and hormones (cortisol, progesterone and estradiol) were determined in the blood from sows 5—7 days before insemination, on days 38—40 and 78—81 of gestation by enzyme immunoassay (ELISA) with subsequent consideration of the results on the Uniplan-TM spectrophotometer in accordance with the approved instructions for diagnostic kits.

After receiving the results, a retrospective analysis was carried out, during which, depending on the nature of the course in sows of the postpartum period, the animals were divided into 2 groups: I ( $n = 7$ ) — sows that remained clinically healthy, II ( $n = 5$ ) — animals, in which after farrowing, acute purulent-catarhal endometritis and MMA (mastitis-metritis-agalactia) were recorded.

Statistical analysis of the data obtained and the significance of differences were carried out using the Statistica 10.0 software (Stat Soft Inc., USA) and Microsoft Excel. The research results are presented in the Me format (Q25 %; Q75 %), where Me is the median, Q25 % and Q75 % are quartiles.

The significance of differences within groups and between groups was assessed using the Mann — Whitney test. Differences between indicators with a confidence level of 95 % and higher ( $p < 0.05$ ) were considered the most important. Between all the studied indicators, the Spearman rank correlation coefficient was determined, showing the degree of dependence of one feature on another. To assess the strength of the relationship, the Chaddock scale has been used, in which  $r_s = 0.7—1.0$  — corresponds to a high correlation strength,  $r_s = 0.3—0.7$  — medium,  $r_s = 0.1—0.3$  — weak correlation strength.

**RESULTS AND DISCUSSION**

A comparative analysis of the content of cytokines found that in the sows with postpartum pathology, the levels of pro-inflammatory cytokines and anti-inflammatory mediators differed from their content in clinically healthy animals already before insemination (Table 1).

Thus, the amount of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , which are the key cytokines of inflammation, was higher by 17.9 and 16.0 %, and IL-4 and IL-10, which have an anti-inflammatory effect, were lower by 14.1 and 9.5 %. The revealed differences persisted during gestation period: on days 38—40, the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  exceeded those of the animals of the first group by 21.4 and 30.0 %, and on days 78—81 — by 18.8 and 18.5 %. The concentrations of IL-4 and IL-10 remained lower by 14.8 and 13.2 % (days 38—40) and by 14.9 and 13.7 % (days 78—81), respectively. The predominance of cytokines that induce the development of inflammation and differentiation of lymphocytes according to the Th-1 phenotype over mediators that ensure the activation of immunosuppressive Th-2 lymphocytes in diseased sows affected the increase in the value of the cytokine index in all periods of the study by 2.7, 1.4 and 1.5 times compared to its value in healthy sows.

The hormonal status, which is closely related to the cytokine profile, in the sows with postpartum pathology, compared with that in healthy animals, was characterized by an increased amount of cortisol by 14.6 % before insemination and a decrease in its concentration by 8.9 and 10.8 % on days 38—40 and 78—81 of gestation, respectively (Table 2).

Cortisol, which is actively involved in maintaining the neuroendocrine regulation of the sexual cycle [8], contributes to the physiological course of gestation, has a regulatory effect on the vascular system and protects the body from inflammation and stress [7]. A decrease in the amount of cortisol in diseased sows may indicate inhibition of metabolic processes and fetoplacental insufficiency, as well as contribute to the occurrence of pathologies during gestation and after farrowing. The content of progesterone, which provides secretory and trophic function of the uterus in physiological concentrations, and estradiol, which is necessary to maintain gestation, in sows with postpartum pathology was lower in all periods of the study by 4.7, 6.4, 10.2 % and by 15.6, 21.2, 28.9 %, respectively, compared with their number in healthy sows. At the same time, the value of the ratio of progesterone/estradiol in them was higher by 38.9, 7.6 and 38.9 %, respectively, which indicated the predominance of progesteronemia in the studied periods.

**Table 1**

*Cytokine profile of sows*

Indicators	Group	Before insemination	Period of gestation, d	
			38—40	78—81
IL-1 $\beta$ , pg/ml	I	5.6 [3.4; 4.5]	7.0 [6.9;7.3] <sup>+</sup>	6.4 [5.9;6.7]
	II	6.6 [6.33;7.2] <sup>*</sup>	8.5 [8.4;8.5] <sup>++</sup>	7.6 [7.4;7.7] <sup>++</sup>
TNF- $\alpha$ , pg/ml	I	2.5 [1.8; 2.2]	3.0 [2.7;3.6]	2.7 [1.8;3.4]
	II	2.9 [2.8;2.9]	3.9 [3.8;4.0] <sup>++</sup>	3.2 [3.0;3.7] <sup>*</sup>
IL-4, pg/ml	I	6.1 [5.9;6.4]	6.7 [5.4;8.1]	7.1 [6.5;7.6]
	II	5.2 [4.8;5.6] <sup>*</sup>	5.7 [5.0;6.5]	6.1 [6.0;6.5] <sup>*</sup>
IL-10, pg/ml	I	6.3 [5.9;6.6]	6.8 [6.3;7.2]	7.3 [6.7;8.1]
	II	5.7 [5.4;5.9]	5.9 [5.2;6.0] <sup>*</sup>	6.3 [6.1;6.7] <sup>*</sup>
Th1/ Th2	I	0.6 [0.4;0.5]	0.8 [0.7;0.8] <sup>+</sup>	0.6 [0.6;0.7] <sup>+</sup>
	II	1.6 [1.9;2.0] <sup>*</sup>	1.1 [1.0;1.2] <sup>++</sup>	0.9 [0.8;0.9] <sup>++</sup>

**Note.** Values are presented as Me [Q25; Q75]

Group I — healthy animals; Group II — diseased sows after farrowing

<sup>\*</sup>  $p < 0.05—0.001$  relative to healthy animals

<sup>+</sup>  $p < 0.05—0.001$  relative to the previous period

**Table 2**

*Hormonal status of sows*

Indicators	Group	Before insemination	Period of gestation, d	
			38—40	78—81
Progesterone, nmol/L	I	6.4 [5.7;7.2]	81.0 [74.6;89.7] <sup>+</sup>	107.1 [103.2;111.4] <sup>+</sup>
	II	6.1 [5.6;6.9]	75.8 [71.9;79.6] <sup>+</sup>	96.2 [90.4;101.2] <sup>+</sup>
Estradiol, nmol/L	I	3.3 [2.9;4.0]	3.2 [2.7;3.6]	3.8 [3.6;3.9]
	II	2.6 [2.7;3.2] <sup>*</sup>	2.7 [2.4;3.1]	2.7 [2.1;3.0] <sup>*</sup>
Progesterone/estradiol	I	1.8 [1.7;2.0]	26.3 [22.1;28.8] <sup>+</sup>	29.9 [29.2;30.4]
	II	2.5 [1.9;3.1]	28.3 [25.6; 29.4] <sup>+</sup>	36.4 [29.0;41.4]
Cortisol, nmol/L	I	198.8 [155;232]	265.3 [197;313] <sup>+</sup>	273.9 [197;329]
	II	227.9 [182;268] <sup>*</sup>	241.6 [236;275]	244.2 [231;257]

**Note.** values are presented as Me [Q25; Q75]

Group I — healthy animals; Group II — diseased sows after farrowing

<sup>\*</sup>  $p < 0.05—0.001$  relative to healthy animals

<sup>+</sup>  $p < 0.05—0.001$  relative to the previous period

To establish the existing relationships of the studied indicators, a Spearman rank correlation analysis was performed (Fig. 1), which showed the presence of a negative correlation in both groups between cortisol and estradiol ( $r = -0.72$  and  $-0.40$ ), cortisol and progesterone ( $r = -0.54$  and  $-0.58$ ), and a positive association between progesterone and estradiol ( $r = 0.70$  and  $0.54$ ). However, in diseased sows, the degree of correlation between cortisol and estradiol, as well as progesterone and estradiol, was lower by 44.4 and 22.9 %, respectively, compared with healthy animals.

When assessing the effect of hormone levels on the expression of cytokines during gestation in healthy sows, a positive relationship between cortisol and IL-1 $\beta$  ( $r = 0.47$ ) and IL-10 ( $r = 0.30$ ) was established; progesterone with IL-4 ( $r = 0.41$ ) and a negative correlation between estradiol and IL-1 $\beta$  ( $r = -0.36$ ). At the same time, in diseased sows after farrowing, there was no pronounced relationship between these indicators, while they showed a positive correlation between progesterone and TNF- $\alpha$  ( $r = 0.32$ ), and a negative correlation between estradiol and IL-4 ( $r = -0.40$ ).

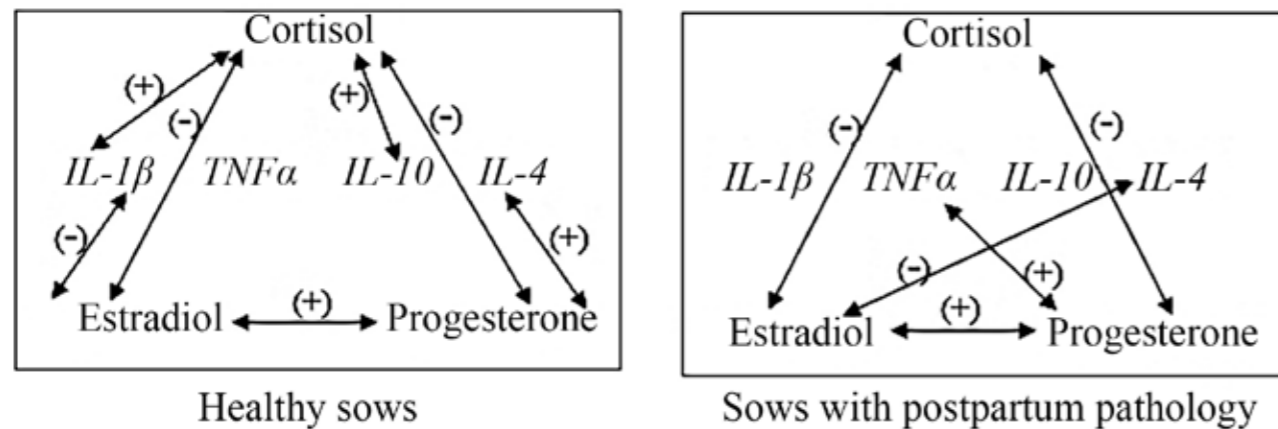


Fig. 1. Relationship between hormonal and cytokine regulation during gestation ( $p < 0.05$ )

Note. (+) — positive correlation  
(-) — negative correlation

When studying the relationships of the cytokine profile in healthy and subsequently diseased animals, a positive correlation was noted between IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  ( $r = 0.36$ ;  $r = 0.30$ ), IL-1 $\beta$  and IL-10 ( $r = 0.51$ ;  $r = 0.50$ ), respectively. At the same time, in healthy sows, a direct relationship was established between IL-4 and IL-1 $\beta$  ( $r = 0.51$ ), TNF- $\alpha$  ( $r = 0.67$ ) and IL-10 ( $r = 0.55$ ), and TNF- $\alpha$  with IL-10 ( $r = 0.64$ ).

Animals of both groups showed a negative correlation between gestation period and cortisol concentration ( $r = -0.75$ ;  $r = -0.49$ ), and a positive correlation with the content of progesterone ( $r = 0.70$ ;  $r = 0.54$ ) and estradiol ( $r = 0.94$ ;  $r = 0.81$ ), which were most pronounced in healthy animals. In addition, in clinically healthy sows, an inverse correlation has been established between the amount of IL-1 $\beta$  and the gestational age ( $r = -0.30$ ), which corresponds to the concept of “gestation as a Th-2 phenomenon”, in which there is a dominance of anti-inflammatory cytokines and a decrease in the content of pro-inflammatory mediators during gestation [2, 3].

The revealed elevated level of pro-inflammatory and reduced levels of anti-inflammatory cytokines be-

fore insemination and during gestation in subsequently diseased sows indicates a predisposition to the development of inflammatory processes.

Immune mechanisms play a crucial role in the mother-fetus relationship, while gestation hormones induce changes in immune cell populations and functions, promoting immune tolerance, reducing the expression of major trophoblastoma histocompatibility proteins, tissue remodeling and angiogenesis [9, 10]. Hormonal and immune changes registered during gestation in healthy animals, in particular, an increase in the concentration of IL-4 and consistently high levels of progesterone lead to a shift in the immune balance towards Th-2 and its maintenance until the perinatal period.

The revealed correlations between changes in the levels of cortisol and cytokines IL-1 $\beta$  and IL-10 in clinically healthy sows and their absence in diseased animals are due to the ability of cortisol to respond with functional activation to an increase in the level of IL-1 $\beta$  and depends on the state of the immune system [11].

The appearance of a direct relationship between progesterone and TNF- $\alpha$  and an inverse correlation be-

tween estradiol and IL-4 in the sows with postpartum pathology also indicates the presence of an inflammatory process in the body, since established relationships were not detected in clinically healthy sows.

## CONCLUSION

The results obtained indicate a pronounced relationship between cytokine and endocrine regulation during gestation. At the same time, in clinically healthy sows, direct and inverse correlations of a noticeable and high degree were noted, and in the animals with postpartum pathology, mostly moderate and weak correlations were revealed. Violation or absence of correlations in the cytokine and hormonal profile in diseased sows after farrowing indicates the manifestation of an immunodeficiency state that contributes to the occurrence of postpartum pathology.

## REFERENCES

1. Sled A. N. Leukocytes and features of their relationship with cortisol and progesterone in the body of dry cows / A. N. Sled, M. A. Derkho // *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* (Proceedings of Orenburg State Agrarian University). — 2019. — no. 1 (75). — P. 133—136.
2. Nefedova D. D. Immunological aspects of pregnancy (literature review) / D. D. Nefedova, V. A. Linde, M. A. Levkovich // *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii* (Medical Bulletin of the South of Russia). — 2013. — No. 4. — P. 16—21.
3. 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

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- L. Yu. Sashnina** — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;  
**A. G. Shakhov** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Chief Scientific Associate;  
**Yu. Yu. Vladimirova** — Candidate of Veterinary Sciences, Junior Scientific Associate;  
**G. V. Nikonenko** — Junior Scientific Associate;  
**K. O. Akulova** — Junior Scientific Associate.

The article was submitted 24.03.2023.

4. Nezhdanov A. G. Hormonal and cytokine profile of the blood of dairy cows in the early period of gestation / A. G. Nezhdanov, S. V. Shabunin, V. I. Mikhalev, N. V. Pasenko, V. A. Safonov // *Rossiyskaya selskokhozyaystvennaya nauka* (Russian agricultural science). — 2020. — no. 2. — P. 70—73. DOI: 10.31857/S2500-2627-2020-2-70-73

5. Gazieva I. A. Immunopathogenetic mechanisms of the formation of placental insufficiency and early reproductive losses: Abstract of a thesis. ... Doctor of Biological Sciences: 14.03.09 / Gazieva Irina Aleksandrovna; [Place of defense: South. — Ur. state med. university]. — Chelyabinsk, 2014. — 45 p.

6. Repina M. A. Progesterone and pregnancy / M. A. Repina // *Akusherstvo i zhenskoe bolezni* (Obstetrics and women's diseases). — 2011. — V. LX. Issue. 3. — P. 130—136.

7. Dovzhikova I. V. Cortisol during pregnancy / I. V. Dovzhikova // *Bulleten VSNTs SO RAMN*. — 2010. — No. 6 (76). — Part 1. — P. 226—229.

8. Goncharov N. P. Corticosteroids: metabolism, mechanism of action and clinical application / N. P. Goncharov, G. S. Kolesnikov // *M.: Adamant* — 2002. — 203 p.

9. Shirshov S. V. Molecular mechanisms of hormonal and hormonal-cytokine control of immune tolerance during pregnancy / S. V. Shirshov // *Biologicheskie membrany* (Biological membranes). — 2014. — V. 31, No. 5. — P. 303. — DOI: 10.7868/S0233475514050089

10. Ott T. L. Symposium review: Immunological detection of the bovine conceptus during early pregnancy / Ott T. L. // *Journal of dairy science*. — 2019. — V. 102. — No. 4. — P. 3766—3777.

11. Monastirskiy V. O. Dynamics of interleukin-1 $\beta$  and cortisol in blood plasma in patients with ischemic stroke / Monastirskiy V. O. // *Ukrainian Bulletin of Psychoneurology* (Ukrainskiy vestnik psikhonevrologii). — 2010. — V. 18. — No. 1. — P. 23—25.

Научная статья

УДК 619:616—022:636.2

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.142

## ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ ТЕЛЯТ ПРИ ФИБРИНОЗНО-ГНОЙНОЙ БРОНХОПНЕВМОНИИ

Борис Викторович Шабунин<sup>\*✉</sup>, Дмитрий Сергеевич Степанов<sup>\*</sup>,  
Дмитрий Евгеньевич Рудь<sup>\*</sup>, Игорь Сергеевич Толкачев<sup>\*</sup>,  
Юлия Владимировна Шапошникова<sup>\*\*</sup>, Евгений Владимирович Михайлов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии  
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, [bv.shabunin@gmail.com](mailto:bv.shabunin@gmail.com)

<sup>\*\*</sup>Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия

**Аннотация.** В статье представлены данные о морфологической структуре сердца, печени, почек, легких, селезенки и лимфатических узлов у телят при фибринозно-гнойной пневмонии. Образцы органов фиксировали в 10 % забуференном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и заливали в гистологический парафин. Для окраски гистологических препаратов использовали гематоксилин и эозин. Со стороны селезенки и лимфатических узлов выявлено стирание архитектоники, отсутствие лимфоидных фолликулов, а также опустошение паренхимы. В сердце и печени выявлена дистрофия клеток, в легких — фибринозно-гнойная пневмония.

**Ключевые слова:** телята, фибринозно-гнойная бронхопневмония, гистология, паренхиматозные органы

Среди всех инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, наибольший удельный вес занимают болезни молодняка. После болезней желудочно-кишечного тракта второе место занимают болезни дыхательной системы (около 30 %). Одним из самых распространенных заболеваний органов дыхания у молодняка является бронхопневмония. Данное заболевание наносит значительный экономический ущерб, складывающийся из целого ряда факторов. И именно поэтому следует повышать эффективность лечебных и профилактических мероприятий по снижению заболеваемости, облегчению тяжести течения болезни и сокращению сроков выздоровления [1, 2].

Первопричиной возникновения 90 % пневмоний у телят являются вирусы, которые вызывая инфекционный процесс в макроорганизме, создают определенные условия для жизнедеятельности в нем бактерий, что приводит к осложнению вирусного заболевания. Роль вирусов в патогенезе бронхопневмоний сводится к иммуносупрессии и воздействию на клетки эпителия респираторных путей. В инфекционный процесс могут вовлекаться пастереллы, сальмонеллы и другие микроорганиз-

мы. Смешанные формы пневмоний весьма разнообразны и широко распространены, а в условиях промышленного животноводства при значительных концентрациях животных на одной территории, возможность смешанных форм значительно возрастает [3, 4].

Респираторные болезни молодняка крупного рогатого скота наносят огромный экономический ущерб промышленному скотоводству. Возбудители этих болезней способны вызывать поражение респираторного тракта и лимфоидной системы восприимчивых животных самостоятельно (в моноварианте), а также в различных ассоциациях между собой [5].

При вскрытии трупов животных, павших с респираторной патологией, находят множественные кровоизлияния на слизистых и серозных покровах. Особенно много их на слизистой гортани, трахеи, перикарде. Лимфатические узлы увеличены, отечны [6]. При гистологическом исследовании легких выявляют характерные признаки умеренной фиброзной и гнойной бронхопневмонии: альвеолярные перегородки утолщены из-за обильной клеточной инфильтрации, в просветах альвеол также ви-

зуализируется инфильтрация полиморфоядерными нейтрофилами и накопление фибрина [7].

Несмотря на достаточно широкую распространенность респираторной патологии, данные о гистологической структуре паренхиматозных органов животных на фоне вирусно-бактериальной инфекции практически отсутствуют.

Целью исследования явилось изучение патоморфологических изменений паренхиматозных органов телят при фибринозно-гнойной бронхопневмонии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В одном из животноводческих хозяйств молочно-направленного Воронежской области регистрировали респираторную патологию у телят. Отмечали повышение температуры тела до 41,2 °С, гнойно-катаральное истечение из носовых ходов, кашель, падеж. При аутопсии павших телят возрастом 35—45 дней ( $n = 4$ ) отбирали образцы паренхиматозных органов для гистологического исследования по общепринятым гистологическим методикам [8]. Кусочки органов фиксировались в 10 % нейтральном забуференном формалине, дегидратировались в спиртах возрастающей крепости, заливались в гистологический парафин Histomix (Biovitrum, Россия). Из парафиновых блоков на микротоме МПС-2 изготавливались срезы толщиной 3—4 мкм, которые помещались на высокоадгезивные стекла и окрашивались гематоксилином-эозином по общепринятой методике и монтировались под полистирол. Для изучения препаратов применялся микроскоп «Microscreen» (Hospitex diagnostics), фотографии были сделаны на встроенную камеру разрешением 15 Мпикс.

Для постановки и подтверждения диагноза проводилось молекулярно-генетическое и бактериологическое исследования патологического материала, в результате которых было выявлено наличие возбудителя *Herpesvirus bovis 1* и смешанную бактериальную инфекцию *E.coli*, *Pasteurella multocida*, *Enterococcus faecium*.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении вскрытия павших животных был выявлен ряд патологических изменений. В легких ткань имела серовато-синюшный цвет, поверхность висцеральной плевро была тусклая, в области верхушек к париетальной части плотно спаяна тяжами (рис. 1).

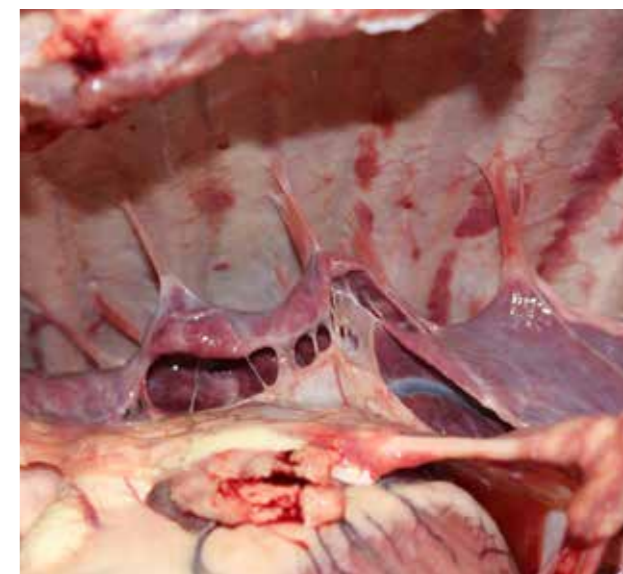


Рис. 1. Спайки в грудной полости у телят, больных фибринозно-гнойной бронхопневмонией

Также обращали на себя внимание мелкие (до 1,5 см в диаметре) сероватые очажки. Ткань легких на ощупь плотная, на разрезах серовато-синюшная с множеством, преимущественно овальной и округлой формы очажками, размерами до 1 × 2,5 см. Описанные выше очажки располагались группами, частью сливались друг с другом, образуя мелкие полости, заполненные тягучим, сливкообразным содержимым зеленоватого цвета. Крупные бронхи заполнены мелкопузырчатой тягучей слизью, расположенной большей частью пристеночно, в просветах мелких и среднего калибра бронхах — тягучая сливкообразная жидкость (рис. 2).

Ткани сердечной мышцы были дряблыми, поверхность эпикарда тусклой, на разрезе — темно-красная с мелкими, едва заметными светло-красными очажками размером до 0,3 × 0,5 см. В полости сердца наблюдали жидкую темно-красную кровь и множество мелких «свертков», расположенных пристеночно. Эндокард бледный, клапаны обычного вида, створки смыкались плотно. В остальных органах видимых патологических изменений при макроскопическом исследовании не обнаружено.

При гистологическом исследовании легких наблюдали выраженное гнойное воспаление с частичной деструкцией ткани и формированием мелких полостей, заполненных тканевым детритом и слизью с густой нейтрофильной инфильтрацией. В просвете бронхов выявляли скопление инфильтрата. Плевра была отекая, с прерывистыми пластами фибрина и густой нейтрофильной инфильтрацией (рис. 3).





Рис. 2. Выделение содержимого из бронхов у телят, больных фибринозно-гнойной бронхопневмонией

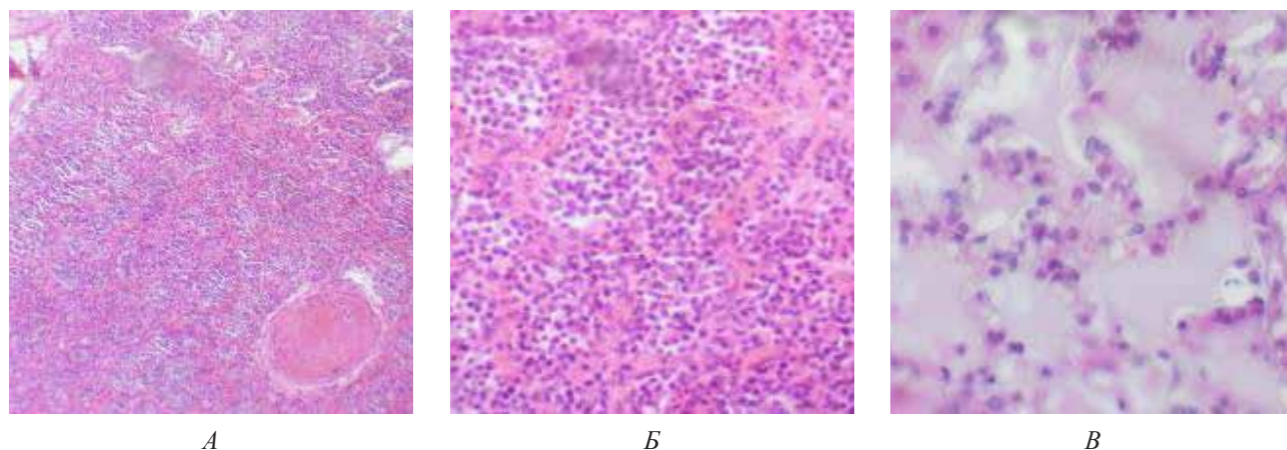


Рис. 3. Архитектоника легких телят больных фибринозно-гнойной пневмонией. Окраска гематоксилин-эозин:

А — ув. 100х; Б — ув. 400х; В — ув. 1000х; А — общий вид; Б — стирание архитектоники из-за воспалительного экссудата; В — скопление жидкости в альвеолах

В печени обнаруживали неравномерное кровенаполнение с большей выраженностью в области центральных вен, перипортально расположенные гепатоциты с выраженной зернистостью цитоплазмы и с признаками мелкокапельной жировой дистрофии (рис. 5).

В почках в толще коркового вещества выявляли очаги некроза эпителия преимущественно про-

ксимальных канальцев, клубочки с неравномерным кровенаполнением. В мозговом слое клетки имели обычное строение, сосуды венозного типа, полнокровные, особенно в области пирамидок и местах скопления собирательных трубочек.

При исследовании лимфатических узлов отмечали стертую архитектонику (рис. 6). Корковое вещество было представлено гомогенной массой,

густо переполненной клетками воспаления — гранулоцитами и лимфоцитами. В кортексе также встречались единичные макрофаги с включениями гемосидерина. Фолликулярные образования не визуализировались. При исследовании мозгового вещества было выявлено заустевание синусов из-за чего медулла выглядела похожей на «решето».

Дисплазия мозгового вещества наряду со стиранием архитектоники коркового указывают на иммунодефицитное состояние организма. Одной из причин заустевания медуллы являются тяжелые септические состояния [9].

При исследовании селезенки было выявлено полное стирание границ красной и белой пульпы и нарушение архитектоники органа.

Фолликулярные образования белой пульпы не визуализировались. Трабекулы были очень сильно гипертрофированы и сильно сдавливали паренхиму органа. Капсула была также утолщена. Сосуды всех калибров были заустевшими (рис. 7).

Данное состояние может указывать на серьезную дисфункцию органа, индуцированную инфекцией. Из-за отсутствия лимфоидных фолликулов селезенка не может должным образом выполнять защитные функции. Редукция белой пульпы является следствием иммуносупрессии или иммунодефицита [10, 11]. Такие изменения нередко встречаются при тяжелых септических состояниях, что может быть обусловлено воздействием токсинов бактерий на иммунные органы.

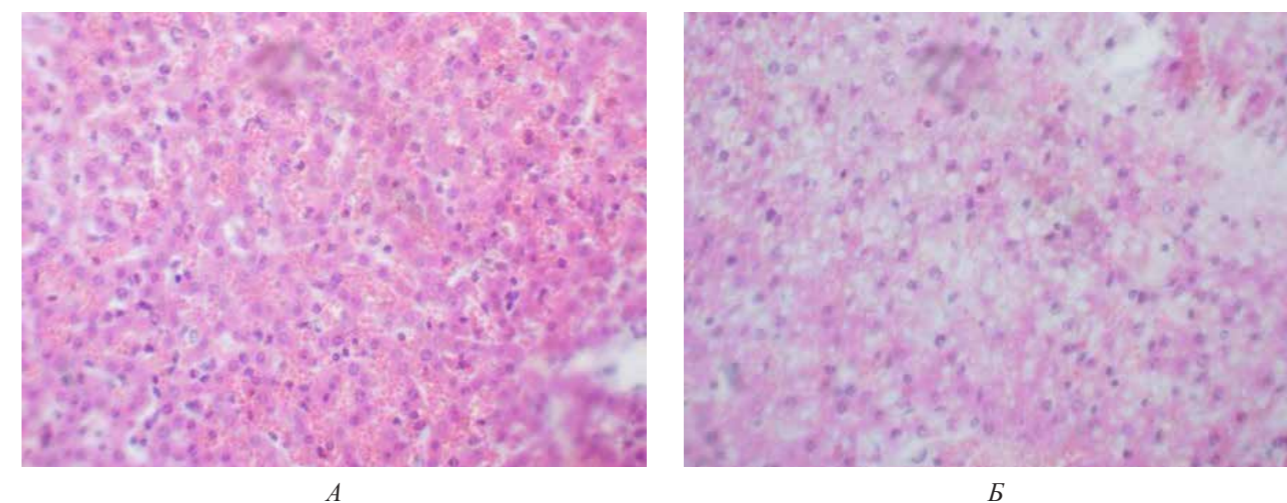


Рис. 4. Структурная организация печени телят больных фибринозно-гнойной бронхопневмонией. Окраска гематоксилин-эозин, ув. 1000х:

А — застой крови в сосудистом русле; Б — гидропическая дистрофия гепатоцитов

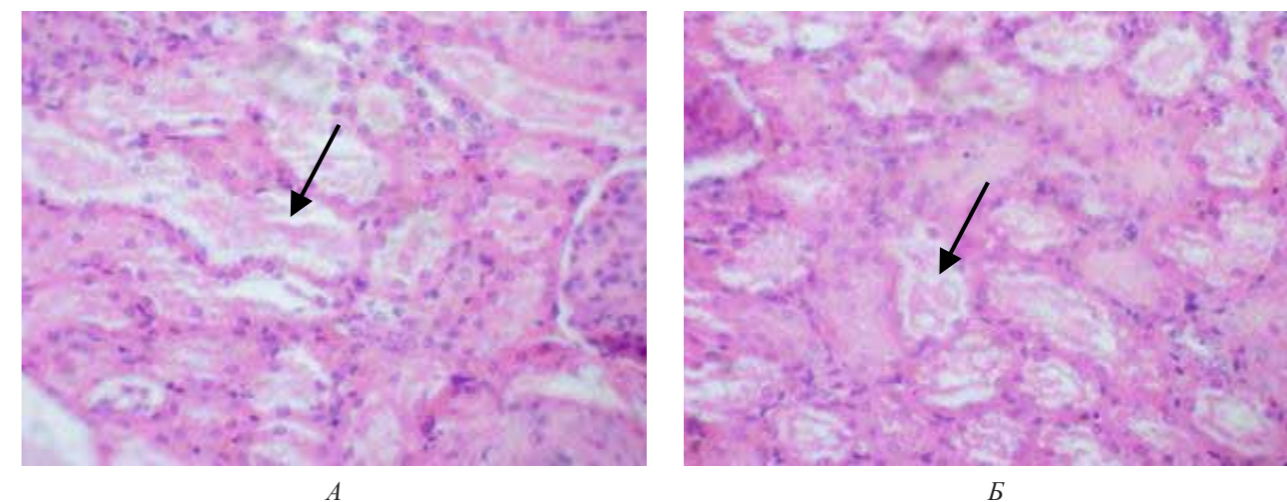
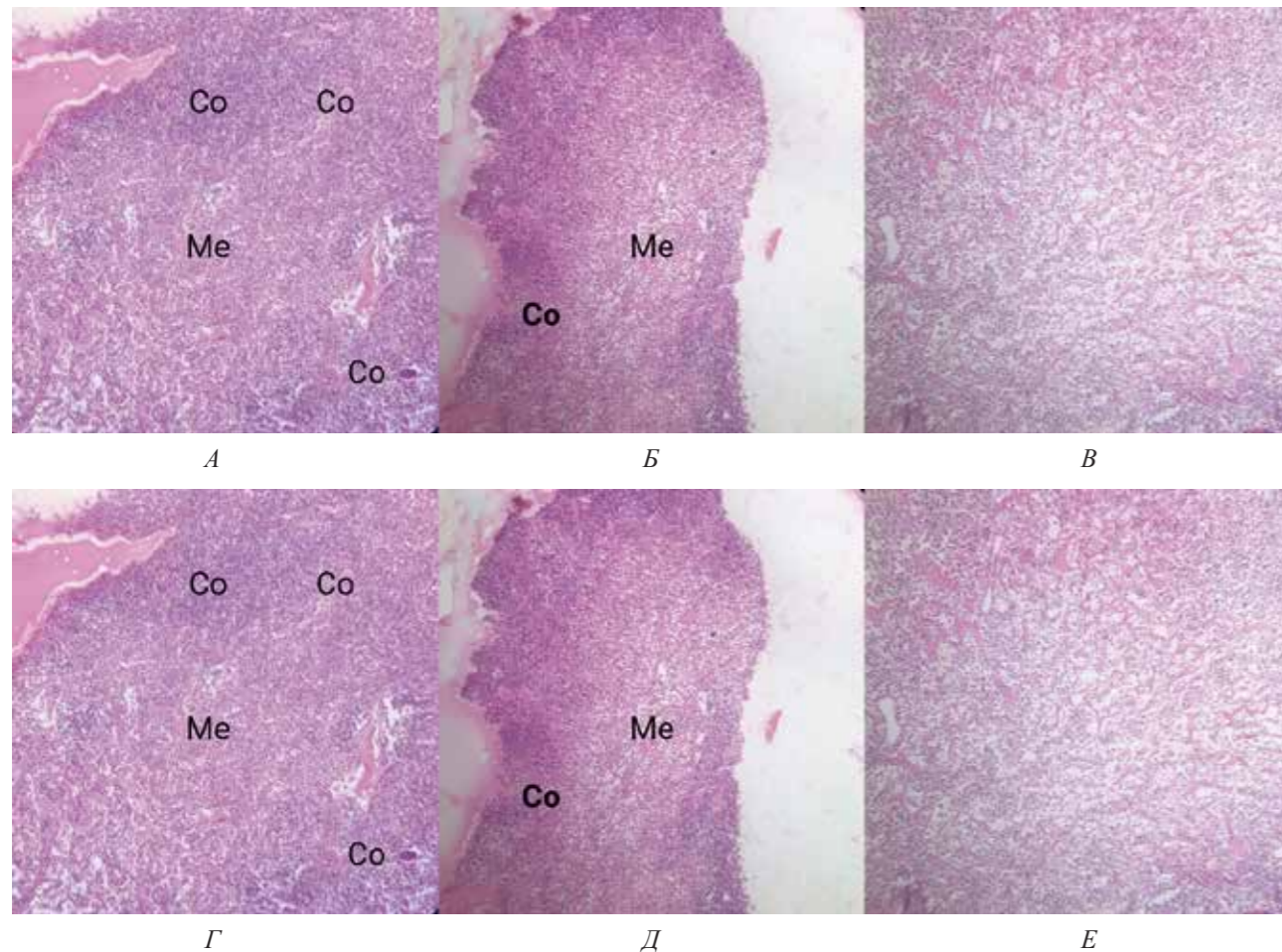


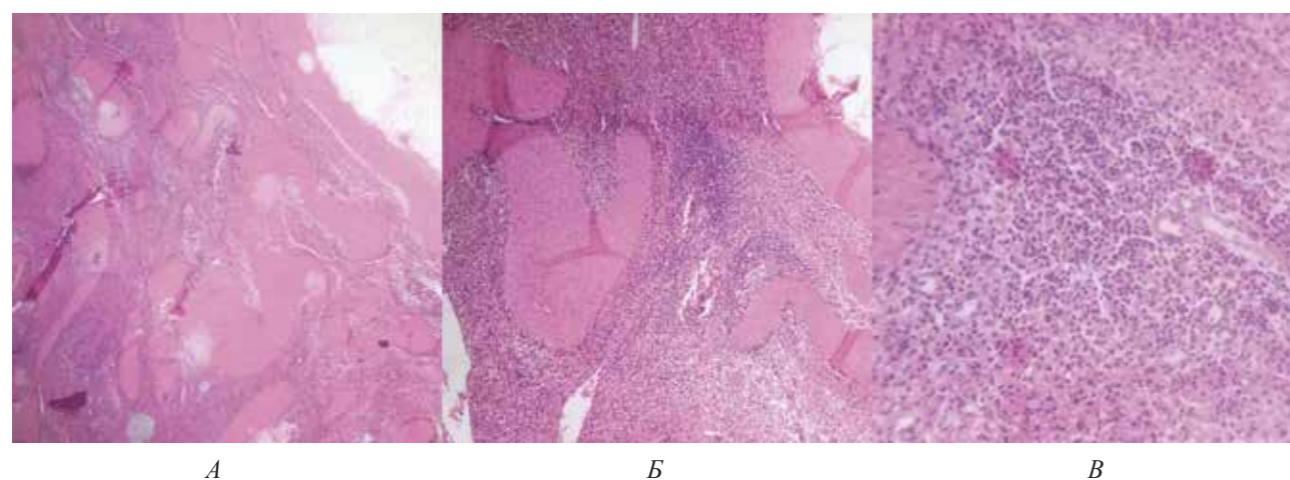
Рис. 5. Архитектоника почек телят больных фибринозно-гнойной бронхопневмонией. Окраска гематоксилин-эозин, ув. 1000х:

А, Б — почечные канальца в состоянии некроза (стрелка)



**Рис. 6.** Структурная организация лимфатического узла телят больных фибринозно-гнойной бронхопневмонией. Окраска гематоксилин-эозин:

*A, B* — общий вид (ув. 40х); *Co* — корковое вещество; *Me* — мозговое вещество; *B* — общий вид на мозговое вещество (ув. 100х); *Г, Д* — запустевшие синусы мозгового вещества (треугольники) (ув. 400х); *E* — корковое вещество под большим увеличением (ув. 1000х)

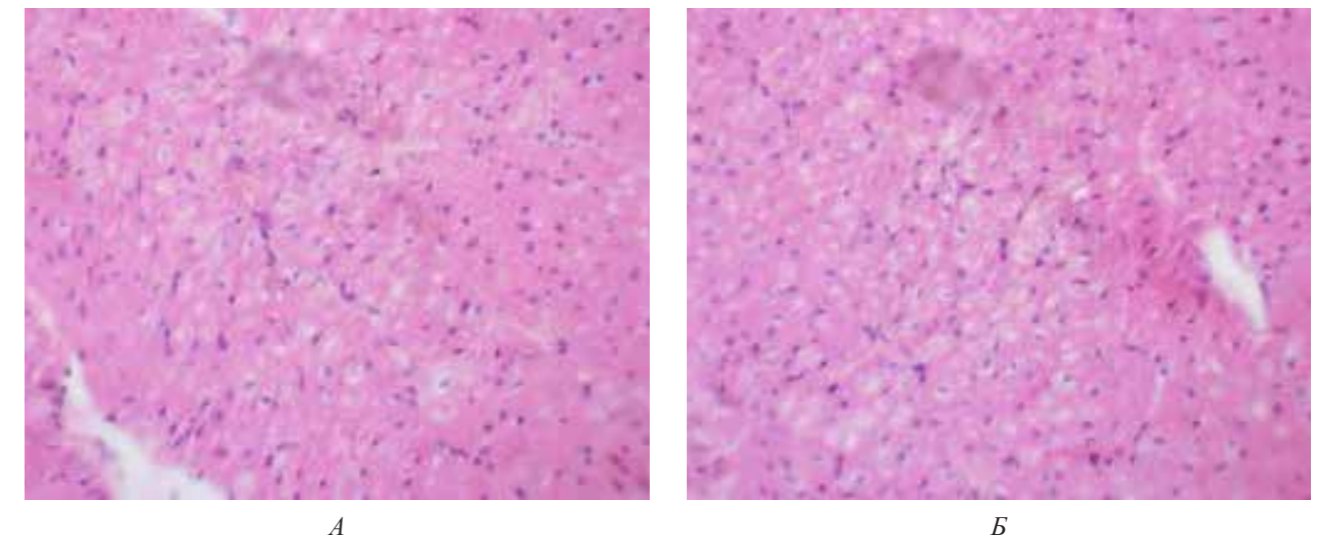


**Рис. 7.** Архитектоника селезенки у телят больных фибринозно-гнойной бронхопневмонией. Окраска гематоксилин-эозин:

*A* — общий вид (ув. 40х); *B* — орган на увеличении 100х; *B'* — вид на лимфоидное образование (ув. 400х)

При гистологическом исследовании сердца выявлены кардиомиоциты со светлой цитоплазмой, лишенной поперечной исчерченности, и часть клеток с признаками глыбчатого распада. В других

участках выявляли клетки с выраженными дистрофическими изменениями, сосуды всех калибров полнокровные, эпикард и эндокард без видимых признаков патологических изменений (рис. 8).



**Рис. 8.** Архитектоника миокарда телят больных фибринозно-гнойной бронхопневмонией. Окраска гематоксилин-эозин, ув. 400х:

*A, B* — поперечный срез, показывающий дистрофию кардиомиоцитов

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в легких телят больных фибринозно-гнойной бронхопневмонией отмечали расширение стенок альвеол вследствие лейкоцитарной инфильтрации, просвет бронхов заполнен лейкоцитами. Острое нарушение кровообращения из-за прогрессирующей сердечной право- и левожелудочковой недостаточности привело к полнокровию внутренних органов и отеку легких. Со стороны селезенки и лимфатических узлов выявлено стирание архитектоники, отсутствие лимфоидных фолликулов, а также опустошение паренхимы клеточными элементами, что указывает на иммунодефицитное состояние организма телят. В печени, почках и сердце бы отмечены ярко выраженные дистрофические и дегенеративные изменения.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Козловский А. Н. Сравнительная терапевтическая эффективность электроактивированных растворов при бронхопневмонии у телят / А. Н. Козловский [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины». — Витебск, 2012. — Т. 48, вып. 1. — С. 97—101.
2. Глотова Т. И. и др. Пастереллез крупного рогатого скота на молочных комплексах: частота выделения и характеристика культур // Российский ветеринарный журнал. — 2012. — № 3. — С. 32—35.

3. Шульга Н. Н. Этиология респираторных болезней телят на Дальнем Востоке / Н. Н. Шульга, В. А. Рябуха, И. С. Шульга, С. С. Дикунина, Д. В. Дудкина // Ветеринария и кормление. — 2014. — № 2. — С. 13—16.

4. Шульга Н. Н. Диагностика, профилактика и терапия респираторных болезней телят / Н. Н. Шульга, И. С. Шульга, Л. П. Плавшак // Эффективное животноводство. — 2019. — № 2(150). — С. 66—69. — DOI: 10.24411/9999-007A-2019-10024

5. Пчельников А. В. Этиология, возрастная и сезонная динамика вирусных респираторных болезней телят в племенных хозяйствах: специальность 06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Пчельников Александр Владимирович. — Москва, 2017. — 118 с.

6. Миронова А. А. Патоморфологические изменения при внутриутробном колибактериозе у телят / А. А. Миронова, С. М. Сулейманов, О. Б. Павленко [и др.] // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2021. — № 4(17). — С. 105—115. — DOI: 10.17238/issn2541-8203.2021.4.105. - EDN TZYVVR

7. Bhat P. Histopathological and immunohistochemical approaches for the diagnosis of Pasteurellosis in swine population of Punjab / Bhat, P., Singh, N. D., Leishangthem, G. D., Kaur, A., Mahajan, V., Banga, H. S., & Brar, R. S. // Veterinary World. — 2016. — Т. 9. — № 9. — С. 989.

8. Методы морфологических исследований: методическое пособие / Л. П. Трояновская, А. Н. Белогуров,

П. А. Паршин [и др.]; *Петра I*. — 3-е издание, переработанное и дополненное. — Воронеж: — 2012. — 103 с.

9. Грибунов Ю. Патоморфологическая оценка эффективности современной иммунотерапии хирургического сепсиса / Грибунов Ю., Баранов Г., Давыдовская Т., Скалозуб О. // *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. — 2014. — Т. — № 2. — С. 69—74.

10. Бобрышева И. В. Морфологическая реактивность селезенки крыс различных возрастных периодов

при иммуносупрессии // *Journal of Siberian Medical Sciences*. — 2015. — № 6. — С. 53.

11. Кащенко С. А. Особенности гистологического строения белой пульпы селезенки крыс в разные периоды постнатального онтогенеза в условиях экспериментальной иммуносупрессии / Кащенко С. А., Бобрышева И. В. // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. — 2014. — № 1 (45). — С. 51—54.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Б. В. Шабунин** — старший лаборант;  
**Д. С. Степанов** — кандидат медицинских наук;  
**Д. Е. Рудь** — соискатель;  
**Ю. В. Шапошникова** — кандидат ветеринарных наук;  
**Е. В. Михайлов** — кандидат ветеринарных наук.

Статья поступила в редакцию 13.04.2023 г.

Original article

UDC 619:616—022:636.2

## PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN PARENCHYMATOUS ORGANS OF CALVES IN CASE OF FIBRINOUS PURULENT BRONCHOPNEUMONIA

**Boris Viktorovich Shabunin\***, **Dmitriy Sergeevich Stepanov\***, **Dmitriy Evgenyevich Rud\***, **Igor Sergeevich Tolkachev\***, **Yuliya Vladimirovna Shaposhnikova\*\***, **Evgeniy Vladimirovich Mikhaylov\***

\**All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, bv.shabunin@gmail.com*

\*\**Voronezh State Agricultural University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia*

**Abstract.** The article presents the data on the morphological structure of the heart, liver, kidneys, lungs, spleen and lymph nodes in the calves with fibrinous purulent pneumonia. Organ specimens were fixed in 10 % buffered formalin, dehydrated in alcohols of increasing strength and embedded in histological paraffin. Histological specimens were stained with hematoxylin and eosin. On the part of the spleen and lymph nodes, the erasing of the architectonics, the absence of lymphoid follicles and the devastation of the parenchyma were detected. Degeneration of cells was detected in the heart and liver, fibrinous purulent pneumonia was detected in the lungs.

**Keywords:** calves, fibrinous purulent bronchopneumonia, histology, parenchymal organs

Among all infectious diseases of farm animals, diseases of young animals occupy the largest share. After diseases of the gastrointestinal tract, the second place is occupied by diseases of the respiratory system (about 30 %). One of the most common respiratory diseases in young animals is bronchopneumonia. This disease causes significant economic damage, consisting of a number of factors.

And that is why it is necessary to increase the efficacy of therapeutic and preventive measures to reduce the incidence, alleviate the disease severity and reduce the recovery time [1, 2].

The underlying cause of 90 % of pneumonia in calves are viruses, which by causing an infectious process in the macroorganism create certain conditions for the vital activity of bacteria in it that leads to a complication of a viral disease.

The role of viruses in the pathogenesis of bronchopneumonia is reduced to immunosuppression and effects on epithelial cells of the respiratory tract. *Pasteurella*, *salmonella* and other microorganisms can be involved in the infectious process. Mixed forms of pneumonia are very diverse and widespread, and in conditions of industrial animal husbandry with significant concentrations of animals in one area, the possibility of mixed forms increases significantly [3, 4].

Respiratory diseases in young cattle cause enormous economic damage to industrial cattle breeding. The causative agents of these diseases can cause damage to the respiratory tract and lymphoid system of susceptible animals on their own (in a monovariant), as well as in various associations with each other [5].

At autopsy of the animal carcasses that died with respiratory pathology, multiple hemorrhages are found on the mucous and serous integuments. Especially a lot of them on the mucous membrane of the larynx, trachea, pericardium. Lymph nodes are enlarged, edematous [6].

Histological examination of the lungs reveals typical signs of moderate fibrinous purulent bronchopneumonia: alveolar septa are thickened due to abundant cellular infiltration, infiltration of polymorphonuclear neutrophils and fibrin accumulation are also visualized in the lumen of the alveoli [7].

Despite the rather wide prevalence of respiratory pathology, there are practically no data on the histological structure of the parenchymal organs of animals against the background of a viral and bacterial infection.

The objective of the research was to study pathomorphological changes in the parenchymal organs of calves with fibrinous purulent bronchopneumonia.

## MATERIAL AND METHODS

At one of the livestock dairy farms in Voronezh region, respiratory pathology was recorded in calves. An increase in body temperature up to 41.2 °C, purulent-catarrhal discharge from the nasal passages, cough and death were noted.

During autopsy of dead calves aged 35–45 days ( $n = 4$ ), samples of parenchymal organs were taken for histological examination according to generally accepted histological methods [8]. Organ pieces were fixed in 10 % neutral buffered formalin, dehydrated in alcohols of increasing strength, and embedded in Histomix histological paraffin (Biovitrum, Russia). Sections of 3–4  $\mu\text{m}$  thick were made from paraffin blocks on an MPS-2 microtome, which were placed on highly adhesive glasses and stained with hematoxylin-eosin according to the standard method and mounted for polystyrene. To study the specimens, a Microscreen microscope (Hospitex diagnostics) was used; photographs were taken with a built-in camera with a resolution of 15 megapixels.

To establish and confirm the diagnosis, molecular-genetic and bacteriological studies of the pathological material were carried out, as a result of which the presence of the pathogen *Herpesvirus bovis 1* and a mixed bacterial infection of *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *Enterococcus faecium* were detected.

## STUDY RESULTS AND DISCUSSION

During the autopsy of the dead animals, a number of pathological changes were revealed. In the lungs, the tissue had a grayish-bluish color, the surface of the visceral pleura was dull, in the region of the tops to the parietal part it was tightly soldered with strands (Fig. 1).

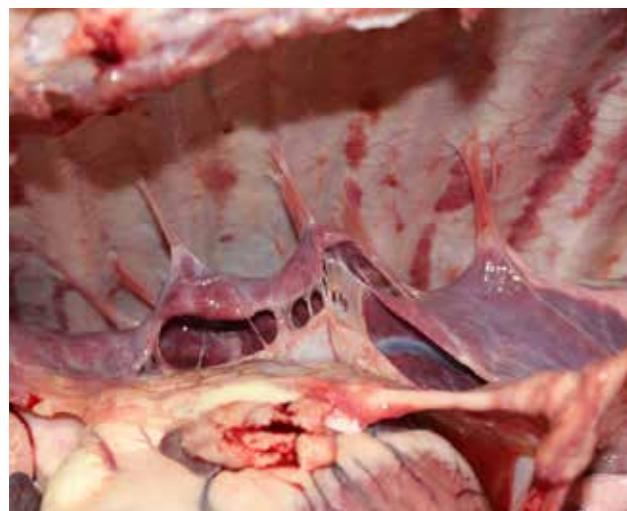


Fig. 1. Adhesions in the chest cavity in calves with fibrinous purulent bronchopneumonia

Small (up to 1.5 cm in diameter) grayish foci were also noteworthy. The lung tissue was dense to the touch, grayish-bluish in sections with many, mostly oval and round-shaped foci, up to 1 × 2.5 cm in size. The foci described above were located in groups, partly merging with each other, forming small cavities filled with a viscous, creamy greenish content. Large bronchi were filled with small-bubbly viscous mucus, located mostly parietal, in the lumens of small and medium caliber bronchi there was a viscous creamy liquid (Fig. 2).

The tissues of the heart muscle were flabby, the surface of the epicardium was dull, on the cut it was dark red with small, barely noticeable light red foci up to 0.3 × 0.5 cm in size. Liquid dark red blood and many small “packages” were observed in the heart cavity located near the wall. The endocardium was pale, the valves were normal, the cusps closed tightly. In other organs, no visible pathological changes were found during macroscopic examination.

Histological examination of the lungs revealed pronounced purulent inflammation with partial tissue destruction and the formation of small cavities filled with tissue detritus and mucus with dense neutrophilic infiltration. In the lumen of the bronchi, the accumulation of infiltrate was detected. The pleura was edematous, with discontinuous layers of fibrin and dense neutrophilic infiltration (Fig. 3).

In the liver, uneven blood filling was found with greater severity in the region of the central veins, periportal located hepatocytes with pronounced granularity of the cytoplasm and with signs of fine droplet fatty degeneration (Fig. 4).

In the kidneys, in the thickness of the cortical substance, foci of necrosis of the epithelium, mainly of the proximal tubules, glomeruli with uneven blood filling were detected. In the medulla, the cells had the usual structure, vessels of the venous type, full-blooded, especially in the area of the pyramids and places of accumulation of collector tubules.

When examining the lymph nodes, erased architectonics was noted (Fig. 6). The cortical substance was represented by a homogeneous mass, densely crowded with inflammatory cells (granulocytes and lymphocytes). The cortex also contained single macrophages with hemosiderin inclusions. Follicular formations were not visualized. When examining the medulla, sinus desolation was revealed, which made the medulla look like a “sieve”.

Dysplasia of the medulla along with the erasure of the architectonics of the cortical indicate an immunodeficiency state of the organism. One of the reasons for the desolation of the medulla is severe septic states [9].



Fig. 2. Isolation of contents from the bronchi in calves with fibrinous purulent bronchopneumonia

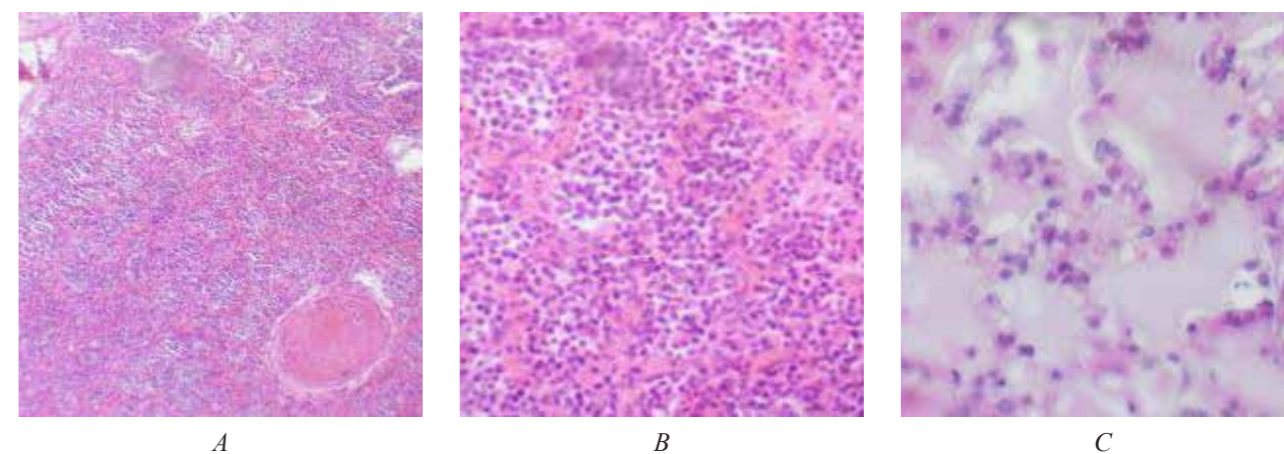


Fig. 3. Architectonics of the lungs of calves with fibrinous purulent pneumonia. Hematoxylin-eosin staining: A — magnification 100x; B — magnification 400x; C — magnification 1000x; A — general view; B — erasure of architectonics due to inflammatory exudate; C — accumulation of fluid in the alveoli

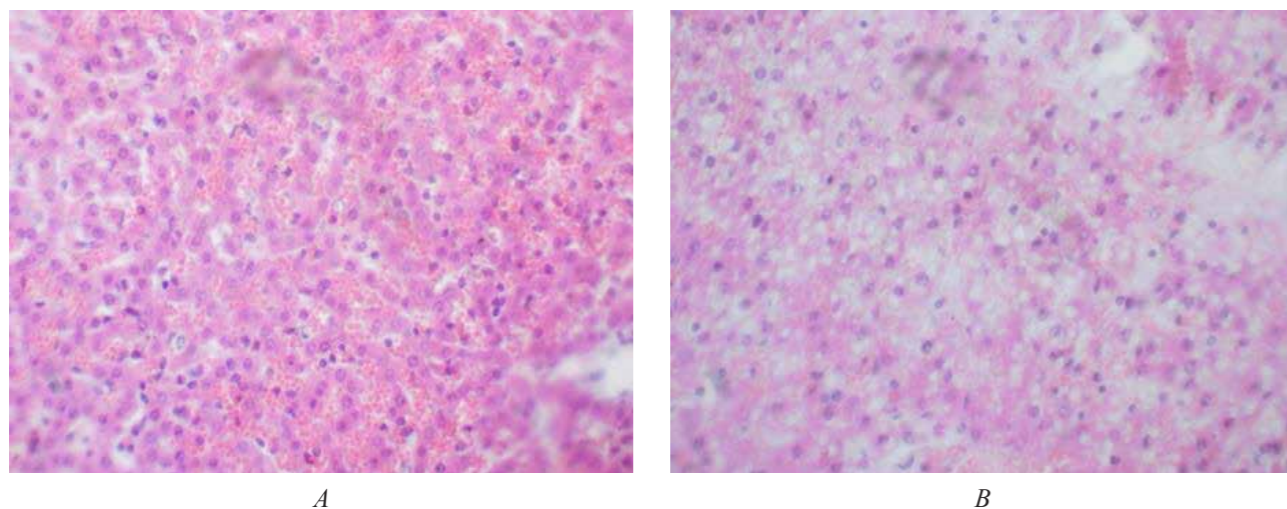
When examining the spleen, a complete erasure of the boundaries of the red and white pulp and a violation of the architectonics of the organ was detected. Follicular formations of the white pulp were not visualized. The trabeculae were very strongly hypertrophied and strongly squeezed the parenchyma of the

organ. The capsule was also thickened. Vessels of all calibers were empty (Fig. 7).

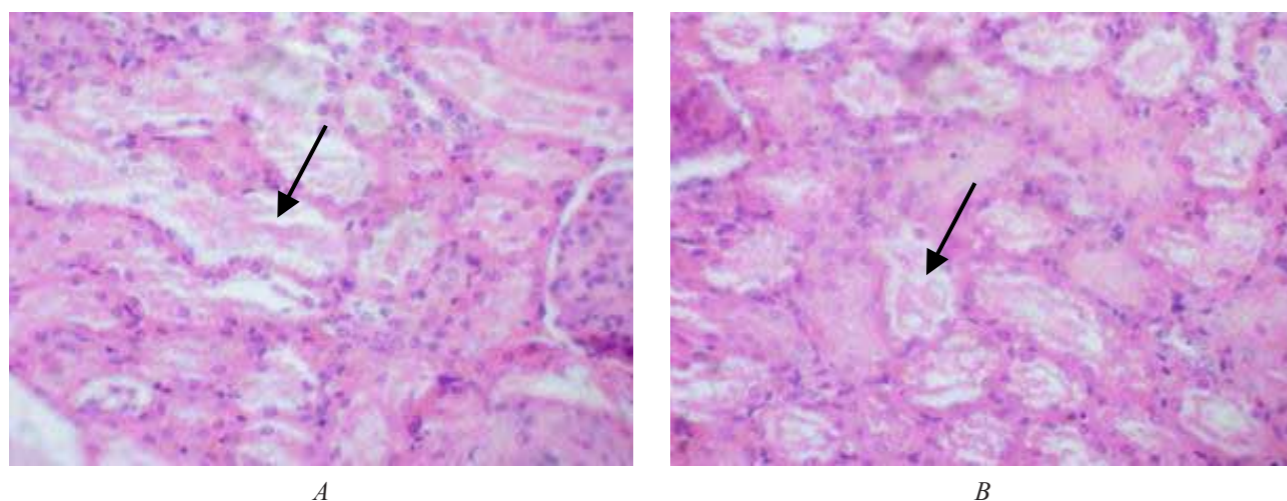
This state may indicate serious organ dysfunction induced by infection. Due to the absence of lymphoid follicles, the spleen cannot perform its protective functions properly. Reduction of the white pulp is a con-

sequence of immunosuppression or immunodeficiency [10, 11]. Such changes are often found in case of

severe septic states, which may be due to the effect of bacterial toxins on the immune organs.



**Fig. 4.** Structural organization of the liver of calves with fibrinous purulent bronchopneumonia. Hematoxylin-eosin staining, magnification 1000x:  
A — blood stagnation in the vascular bed; B — hydropic degeneration of hepatocytes



**Fig. 5.** Architectonics of the kidneys of calves with fibrinous purulent bronchopneumonia. Hematoxylin-eosin staining, magnification 1000x:  
A, B — renal tubules in a state of necrosis (arrow)

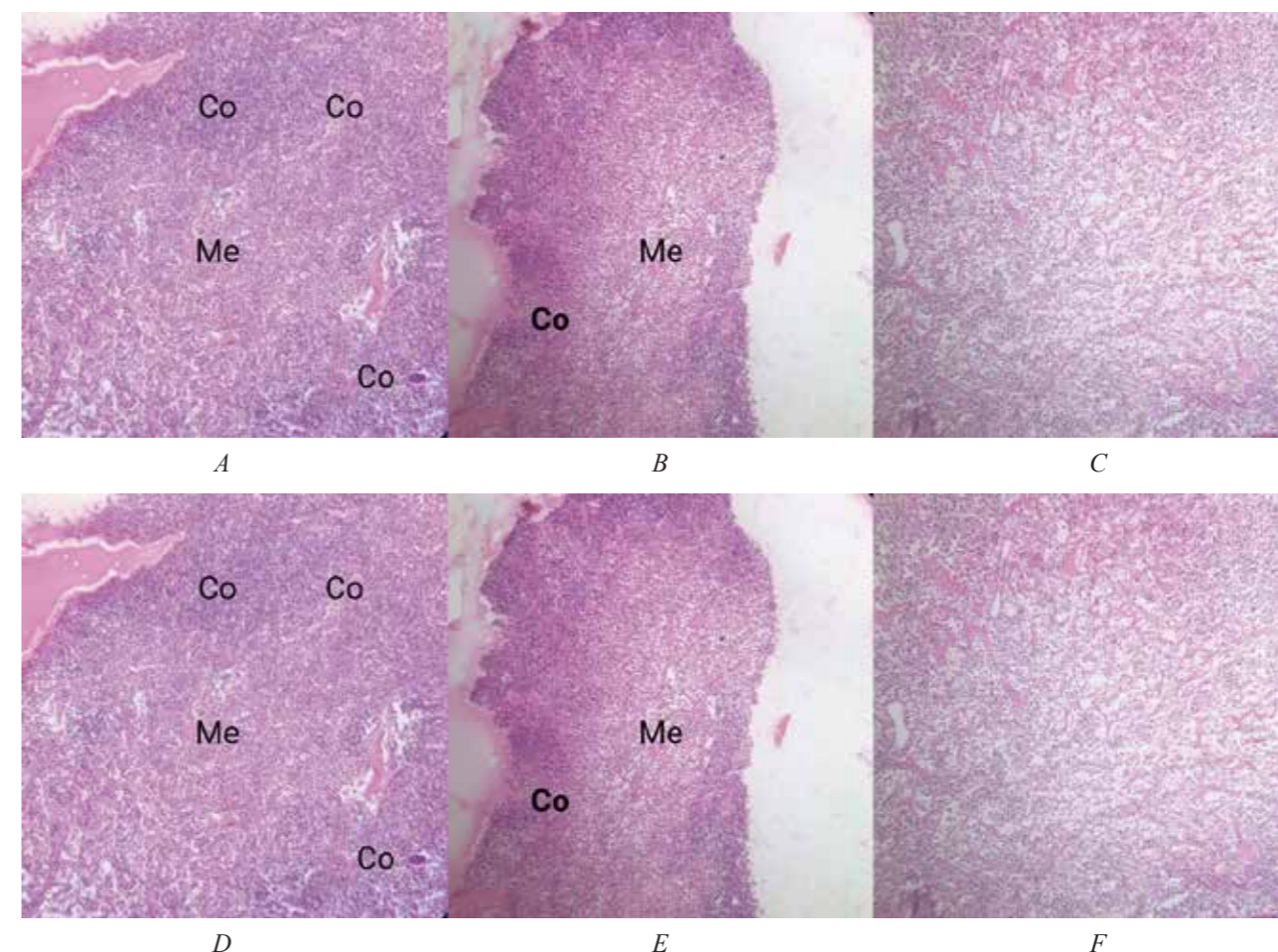
Histological examination of the heart revealed cardiomyocytes with light cytoplasm, devoid of transverse striation, and part of the cells with signs of clumpy decay.

In other areas, cells with pronounced dystrophic changes were detected, vessels of all calibers were full-blooded, epicardium and endocardium without visible signs of pathological changes (Fig. 8).

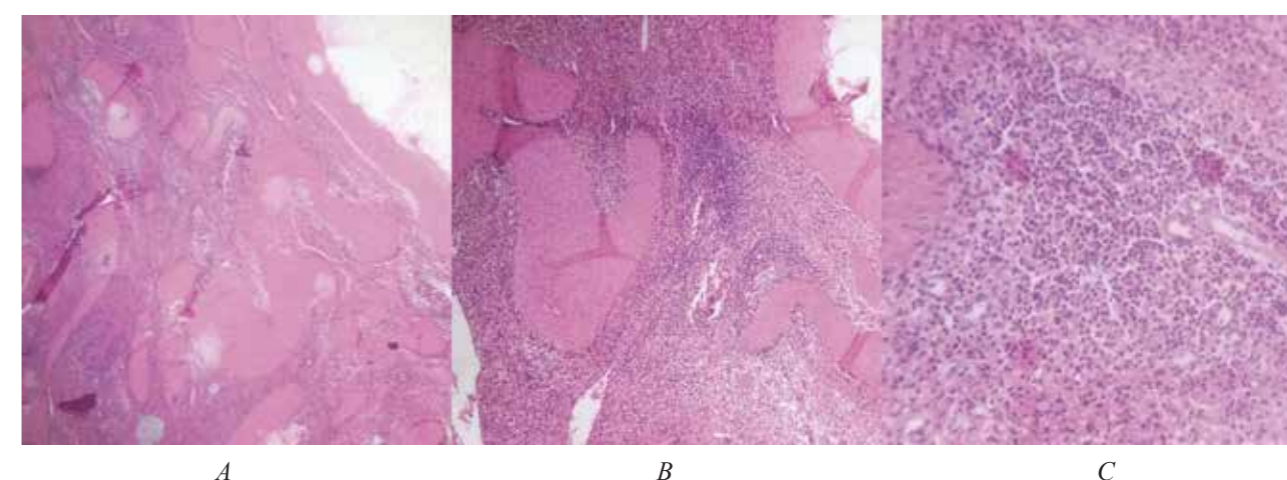
#### CONCLUSION

Thus, in the lungs of the calves with fibrinous purulent bronchopneumonia, an expansion of the walls

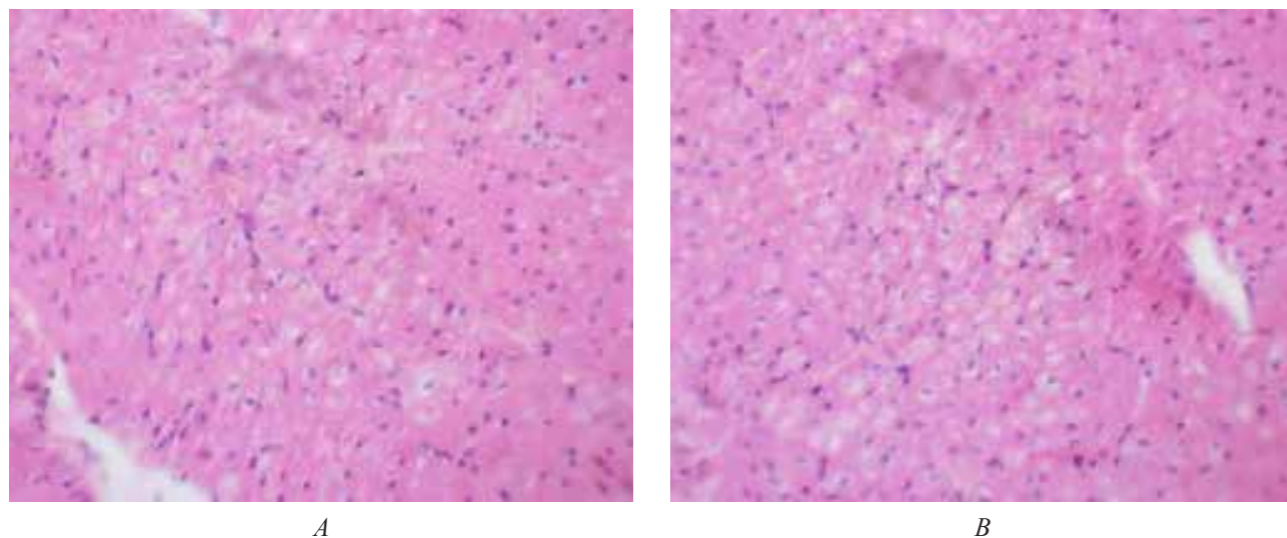
of the alveoli was noted due to leukocyte infiltration, the bronchial lumen was filled with leukocytes. Acute circulatory disorders due to progressive cardiac right and left ventricular failure led to plethora of internal organs and pulmonary edema. On the part of the spleen and lymph nodes, the erasing of the architectonics, the absence of lymphoid follicles, as well as the devastation of the parenchyma with cellular elements have been revealed, which indicates an immunodeficient state of the calves' bodies. In the liver, kidneys and heart, pronounced dystrophic and degenerative changes were noted.



**Fig. 6.** Structural organization of the lymph node of calves with fibrinous purulent bronchopneumonia. Hematoxylin-eosin staining:  
A, B — general view (magnification 40x); Co — cortex; Me — medulla; C — general view of the medulla (magnification 100x); D, E — desolated sinuses of the medulla (triangles) (magnification 400x). F — cortex under high magnification (magnification 1000x)



**Fig. 7.** Architectonics of the spleen in calves with fibrinous purulent bronchopneumonia. Hematoxylin-eosin staining:  
A — general view (magnification 40x); B — organ at magnification 100x; C — view of the lymphoid formation (magnification 400x)



**Fig. 8.** Architectonics of the myocardium of calves with fibrinous purulent bronchopneumonia. Hematoxylin-eosin staining, magnification 400x:

A, B — transverse section showing dystrophy of cardiomyocytes

#### REFERENCES

1. Kozlovskiy A. N. Comparative therapeutic efficacy of electroactivated solutions for bronchopneumonia in calves / A. N. Kozlovskiy [et al.] // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya "Vitebskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny" (Transactions of the educational establishment "Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine". — Vitebsk, 2012. — V. 48, issue. 1. — P. 97—101.
2. Glotova T. I. et al. Pasteurellosis in cattle at dairy complexes: frequency of isolation and characteristics of cultures // Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal (Russian Veterinary Journal). — 2012. — No. 3. — P. 32—35.
3. Shulga N. N. Etiology of respiratory diseases of calves in the Far East / N. N. Shulga, V. A. Ryabukha, I. S. Shulga, S. S. Dikunina, D. V. Dudkina // Veterinariya i kormlenie (Veterinary medicine and feeding). — 2014. — No. 2. — P. 13—16.
4. Shulga N. N. Diagnosis, prevention and therapy of respiratory diseases in calves / N. N. Shulga, I. S. Shulga, L. P. Plavshak // Effektivnoe zhivotnovodstvo (Effective animal husbandry). — 2019. — No. 2 (150). — P. 66—69. — DOI: 10.24411/9999-007A-2019-10024
5. Pchelnikov A. V. Etiology, age and seasonal dynamics of viral respiratory diseases of calves at breeding farms: specialty 06.02.02 "Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology": thesis for the degree of Candidate of Veterinary Sciences / Pchelnikov Aleksandr Vladimirovich. — Moscow, 2017. — 118 p.
6. Mironova A. A. Pathomorphological changes in case of intrauterine colibacteriosis in calves / A. A. Mironova, S. M. Suleymanov, O. B. Pavlenko [et al.] // Bulletin of Veterinary Pharmacology. — 2021. — No. 4 (17). — P. 105—115. — DOI: 10.17238/issn2541-8203.2021.4.105
7. Bhat P. Histopathological and immunohistochemical approaches for the diagnosis of Pasteurellosis in swine population of Punjab / Bhat, P., Singh, N. D., Leishangthem, G. D., Kaur, A., Mahajan, V., Banga, H. S., & Brar, R. S. // Veterinary World. — 2016. — V. 9. — No. 9. — P. 989.
8. Methods of morphological research: methodical manual / L. P. Troyanovskaya, A. N. Belogurov, P. A. Parshin [et al.]; VSAU named after Emperor Peter the Great. — 3<sup>rd</sup> edition, revised and enlarged. — Voronezh: — 2012. — 103 p.
9. Gribunov Yu. Pathological evaluation of the efficacy of modern immunotherapy for surgical sepsis / Gribunov Yu., Baranov G., Davydovskaya T., Skalozub O. // Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik (Kremlin medicine. Clinical Bulletin). — 2014. — V. — No. 2. — P. 69—74.
10. Bobrysheva I. V. Morphological reactivity of the spleen of rats of different age periods during immunosuppression // Journal of Siberian Medical Sciences. — 2015. — no. 6. — P. 53.
11. Kashchenko S. A. Features of the histological structure of the white pulp of the spleen of rats in different periods of postnatal ontogenesis under conditions of experimental immunosuppression / Kashchenko S. A., Bobrysheva I. V. // Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta (Journal of Grodno State Medical University). — 2014. — no. 1 (45). — P. 51—54.


#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS


**B. V. Shabunin** — Senior Laboratory Assistant;  
**D. S. Stepanov** — Candidate of Medical Sciences;  
**D. E. Rud** — Applicant for a Degree;  
**Yu. V. Shaposhnikova** — Candidate of Veterinary Sciences;  
**E. V. Mikhaylov** — Candidate of Veterinary Sciences.

The article was submitted 13.04.2023.

Научная статья  
УДК 619:616—007.616—091  
DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.156

## МИКРООКРУЖЕНИЕ ТЕЛЕЦ ГАССАЛЯ В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД У ПОРОСЯТ-ГИПОТРОФИКОВ

Борис Викторович Шабунин, Егор Максимович Степанов, Артем Валерьевич Некрасов, Евгений Владимирович Михайлов 

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, email: voronezh81@rambler.ru 

**Аннотация.** В данной статье представлены данные по изучению клеточного пула микроокружения телец Гассалья у поросят-гипотрофиков в ранний постнатальный период. Диагностический убой суточных поросят-гипотрофиков массой менее 800 гр. ( $n = 5$ ) и поросят-нормотрофиков ( $n = 5$ ) того же возраста, принадлежащих свиноводческому хозяйству Воронежской области, был проведен в прозектории ФГБНУ «ВНИВИПФиТ». У поросят-нормотрофиков клеточный пул микроокружения телец был представлен скоплением тимоцитов и антигенпрезентирующих клеток в разной стадии дифференцировки. При проведении электронной микроскопии отмечались эпителиальные клетки-предшественницы телец. Они имели большое округлое ядро, состоящее из эухроматина с одним-двумя ядрышками. В тимоцитах хроматин был распределен скоплениями по периферии и в центре. В цитоплазме визуализировались оптически плотные митохондрии. У поросят-гипотрофиков в тельцах Гассалья присутствовал клеточный инфильтрат и частичная деструкция самих телец. Тимоциты имели морфологические изменения, а именно пикнотичные ядра, а у дендритных клеток атипичные ядра, что является признаком иммунодефицита.

**Ключевые слова:** тельца Гассалья, тимус, морфология, иммуногистохимия микроокружение, поросята-гипотрофики, поросята-нормотрофики.

**Благодарность:** работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 23-26-00020

Гипотрофия поросят характеризуется недостаточностью и пониженной иммунобиологической реактивностью новорожденных животных, которые чаще других страдают расстройствами желудочно-кишечного тракта, отстают в росте и развитии. При гипотрофии снижается функциональная активность желез внутренней секреции, что приводит к угнетению морфологического, биохимического и иммунного статуса организма [1].

Особое место в иммунной системе новорожденного занимает вилочковая железа — тимус, необходимый для развития всей иммунной системы, а также для становления и поддержания иммунологической компетенции организма в дальнейшем онтогенезе. Рабочее состояние тимуса подтверждается наличием в дольках тимуса четко оформленного коркового и мозгового вещества, пролиферацией тимобластов, наличием Т-лимфоцитов, макрофагов и слоистых телец Гассалья [2].

В тимусе поросят-гипотрофиков выявляется диспластический характер структурных изменений, характеризующийся уменьшением долек тимуса, стиранием границ между корковым и мозговым слоями, а также гипоплазией тимоцитов, которые могут привести к нарушению его функционирования и выключению Т-клеточного звена иммунитета [3].

Одним из наименее изученных компонентов тимуса, как в норме, так и при различных патологиях являются тельца Гассалья и их микроокружения [4].

В последнее время установлено, что данные структуры принимают активное участие в процессах созревании Т-регуляторов, синтезе цитокинов, экспрессии аутоантигенов [5].

Цель работы — изучить микроокружение телец Гассалья в ранний постнатальный период у поросят-гипотрофиков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диагностический убой суточных поросят-гипотрофиков с критической массой менее 800гр. ( $n = 5$ ) и поросят-нормотрофиков массой 1100 гр. ( $n = 5$ ) того же возраста, принадлежащих свиноводческому хозяйству Воронежской области, был проведен в прозектории ФГБНУ «ВНИВИПФиТ».

Образцы тимуса фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, заливали по общепринятой методике в парафин и с парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 3—5 мкм. Для изучения общей морфологической структуры органа парафиновые срезы были окрашены гематоксилин-эозином.

Для иммуногистохимического исследования использовали коммерческие моноклональные антитела (МКАТ) к кластеру дифференцировки CD-3 и PAX-5 (производство Novo Castra, Великобритания).

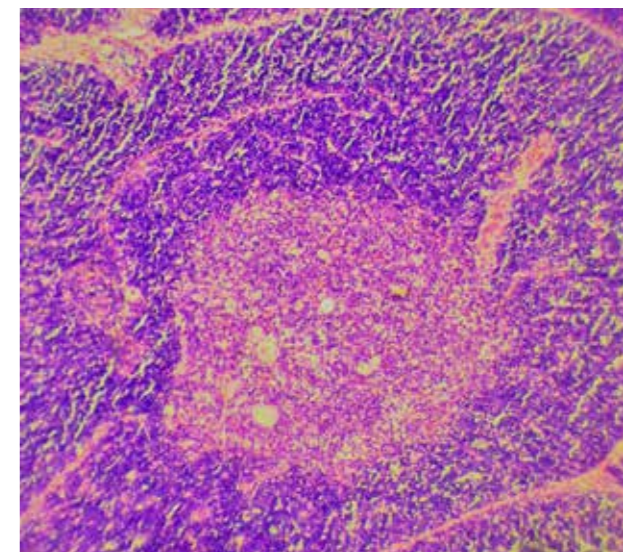
Материал (тимус) для иммуногистохимического исследования фиксировали 10 % нейтральным забуференным формалином в течение 24 ч, выполняли стандартную проводку. Подготовленные образцы тканей заливали в парафиновую среду Гистомикс, готовили срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37 °С в течение 18 ч. Демаскировку и иммуногистохимическую окраску проводили ручным способом с использованием системы визуализации NovoLink polymer (Novo Castra, Великобритания). Контролем реакции служила неиммунизированная сыворотка [6].

Материал для электронной микроскопии был проведен в 2,5%-ном глютаровом альдегиде на 0,114 М коллидном буфере на холоде с постфиксацией в 1%-ном растворе тетраокси осмия на том же буфере. Осмолярность 360 мосм достигнута введением во второй фиксатор 0,05 М железосинеродистого калия и раствора Рингера [7]. Материал был заключен в эпон-812. Полутонкие срезы были окрашены азур-2 в сочетании с фуксином основным и просматривали в световом микроскопе «Leica». Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Ultracut (Leica), контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом и просматривали в электронном микроскопе EM-208 (Philips).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тимус поросят-нормотрофиков представлял собой сформированный орган с четкими границами

коркового и мозгового вещества. Стромальный аппарат железы четко делил орган на доли (рис. 1). В мозговом веществе (рис. 2) по периферии выявляли гипертрофированные светлые эпителиальные клетки, которые, по мнению ряда авторов являются предшественницами телец Гассалья [8—11]. Тимические тельца по большей части были зрелыми, так как ядро тельца было уже кератинизированно. Клеточный пул микроокружения телец был представлен скоплением тимоцитов и антигенпрезентирующих клеток в разной стадии дифференцировки. При проведении электронной микроскопии отмечались эпителиальные клетки-предшественницы телец (рис. 2 Г). Они имели большое округлое ядро, состоящее из эухроматина с одним-двумя ядрышками. В тимоцитах хроматин (рис. 2 Д) был распределен скоплениями по периферии и в центре. В цитоплазме визуализировались оптически плотные митохондрии. Исследование ИМГХ маркером CD-3 (рис. 2 в) выявило единичные положительные Т-клетки, расположенные как в непосредственной близости, так и окружающие сами тельца. Исследование маркером PAX-5 выявило наличие единичных (или расположенных скоплениями) незрелых В-лимфоцитов (рис. 2 Е).



**Рис. 1.** Четкая граница коркового и мозгового вещества тимуса у поросят-нормотрофиков. Окраска — гематоксилин-эозин, ув. 100х

При гистологическом исследовании архитектоники тимуса поросят — гипотрофиков выявлено стирание границ коркового и мозгового слоя (рис. 3). В мозговом слое, тельца Гассалья были единичны и находились в деструктивной форме, а также в них присутствовал клеточный ин-

фильтрат (рис. 4 б). Видимые включения по данным Беловешкина А. Г. являлись второй стадией разрушения телец Гассалья [4]. Помимо них, визуализировались типичные тельца с кератиновым ядром, состоящим из концентрически организованных пластин. При проведении электронной микроскопии в близлежащих тимоцитах визуализировался пикноз, а в антигенпрезентирующих

клетках, нарушение формы ядер (рис. 4 Г, Д). Иммуногистохимические исследования показали, что в тельцах присутствовали единичные CD-3 лимфоциты (рис 4 В). Экспрессия PAX-5 показала, что кератин также слегка окрашивался данным маркером (рис. 4 Е). Около самих телец визуализировались в единичном количестве В — лимфоциты [12].

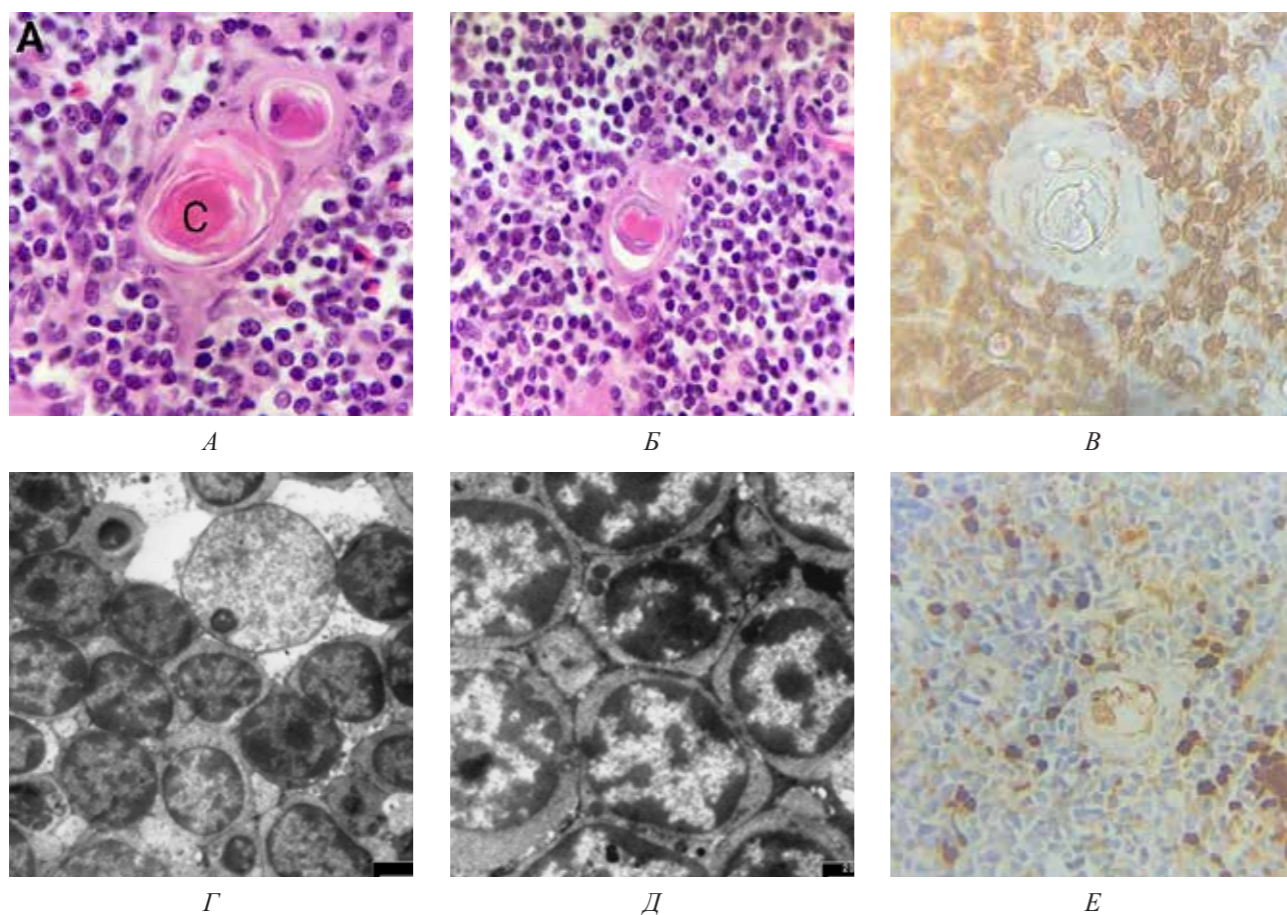


Рис. 2. Тельца Гассалья поросят-нормотрофиков:

А — тельце Гассалья здоровых поросят с гиперхромным ядром, окруженным ободком эозинофильной цитоплазмы. Окраска — гематоксилин-эозин, ув. 1000х; Б — тимическое тельце обычного вида. Окраска — гематоксилин-эозин, ув. 400х; В — тимическое тельце, окраска маркером CD-3, ув. 400х; Г — эпителиальная клетка-предшественница телец Гассалья (стрелка), ув. 10 000х; Д — тимоциты под электронным микроскопом, ув. 15 000х; Е — молодое тельце Гассалья, окраска PAX-5, ув. 400х

Полученные данные свидетельствуют, что при гипотрофии у поросят происходит стирание границ коркового и мозгового слоя, а также частичная деструкция телец Гассалья.

Это характеризует наличие лейкоцитарной инфильтрации. Тимоциты и дендритные клетки имели структурно морфологические изменения, а именно пикнотичные и атипичные ядра, что является признаком иммунодефицита [13]. Это приводит к повышенной трансформации и распаду иммуноком-

петентных клеток, что в дальнейшем ведет к снижению иммунной реакции. Аналогичные результаты исследований были получены Жаровым А. В. при исследовании иммунных органов поросят при гипотрофии [14].

Автором было показано стирание границы коркового и мозгового вещества в тимусе, частичные апоптозы тимоцитов и дистрофия и деформация телец Гассалья. Шапошниковым И. Т. и соавторами было установлено наличие патологических ти-

моцитов у телят при иммунодефиците, что также подтверждает нарушение защитных функций у исследуемых нами животных [15].

Pallares F. J. и Gomez S. также указывали, что при гипотрофии у большинства поросят происходит атрофия тимуса, а в тельцах Гассалья наблюдается лейкоцитарная инфильтрация, а в некоторых случаях — деструкция телец [16].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показывают, что при гипотрофии у поросят происходит нарушение формирования телец Гассалья и их микроокружения, что было видно по наличию лейкоцитарной инфильтрации и появлению патологических форм. На это указывает повышенная трансформация и распад иммунокомпетентных клеток, что в дальнейшем приведет к снижению иммунного ответа и к дисфункции органа.

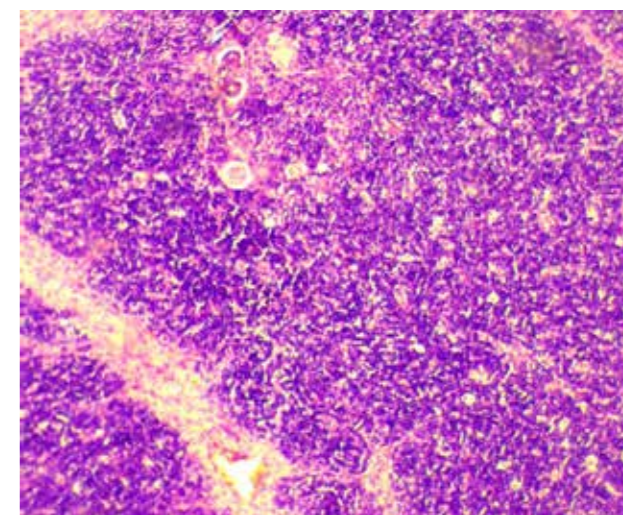


Рис. 3. Отсутствие четкой границы коркового и мозгового вещества тимуса у поросят-гипотрофиков, окраска — гематоксилин-эозин, ув. 100х

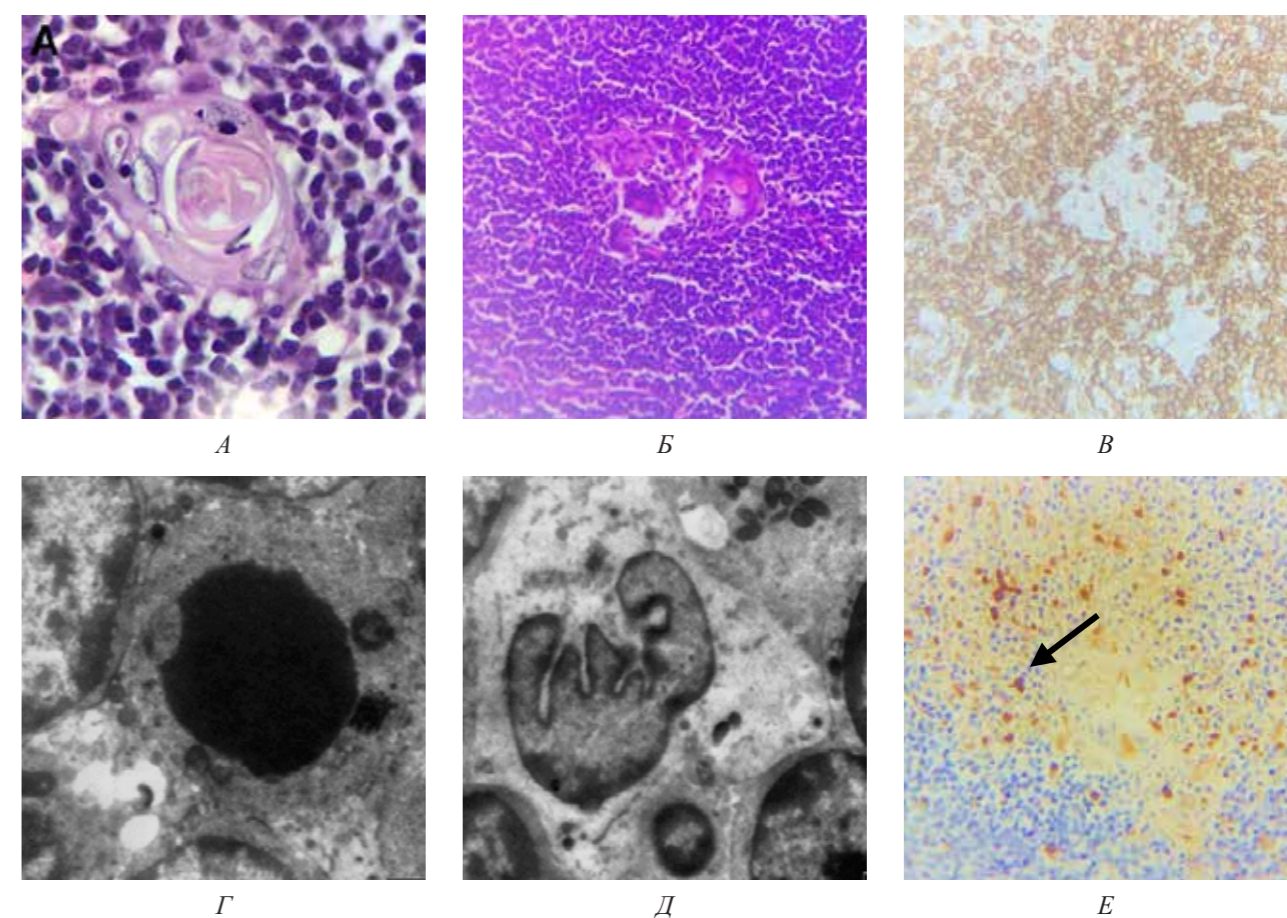


Рис. 4. Тельца Гассалья поросят-гипотрофиков:

А — тельце Гассалья, окраска — гематоксилин-эозин, ув. 1000х; Б — тельце Гассалья с лейкоцитарной инфильтрацией, окраска — гематоксилин-эозин, ув. 400х; В — тельце Гассалья в тимусе, окраска CD-3 маркером; Г, Д — патологические формы ядра в тимоците и дендритной клетки, белая линия соответствует 2000 нм; Е — скопление предшественников В-лимфоцитов вокруг деструктивного телеца Гассалья (стрелка), окраска PAX-5, ув. 400х



СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Фармакокоррекция гипотрофии и рахита молодняка свиней: монография / А. В. Савинков, М. П. Семениченко, О. С. Гусева, А. И. Рязанцева. — Кинель: РИО Самарского ГАУ, 2020. — 222 с
2. *Абаева Т. С.* Особенности структуры макро- и микроскопической анатомии вилочковой железы у грудных детей и у людей пожилого возраста // Вестник науки и образования. — 2016. — № 12 (24)
3. *Шахов А. Г.* Факторные инфекции свиней / А. Г. Шахов, А. И. Ануфриев, П. А. Ануфриев // Животноводство России. Спец. выпуск по свиноводству. — 2005. — С. 24—27
4. *Беловешкин А. Г., Студеникина Т. М.* Участие эозинофилов в морфогенезе телец Гассаля // Весті Національної академії наук України. Серія медико-біологічних наук. — 2011. — № 2. — С. 93—97.
5. *Волкова Л. В.* и др. Состояние стромального компонента тимуса и телец Гассаля при аутопсиях у детей // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2014. — № 8—1. — С. 133—134.
6. *Газизова А. И., Аткинова А. Б.* Морфофункциональное состояние тимуса у крупного рогатого скота как лимфоидного органа // Наука и Мир. — 2015. — Т. 1. — № 2. — С. 48—50.
7. *Гордова В. С., Дьячкова И. М.* Антигенпрезентирующие клетки лимфоидных органов // Вестник Чувашского университета. — 2014. — № 2.
8. *Луговцов Н. А., Платонов А. Н., Луговцова П. А.* Топография клеточных элементов тимуса человека: CD68-положительные макрофаги, S-100, CD1a-положительные дендритные клетки, тельца Гассаля, их

- содержимое (СЕА) // Молодежный сборник научных статей «Научные стремления». — 2012. — № 2.
9. *Якименко Л. Л.* и др. Морфофункциональные особенности телец Гассаля тимуса позвоночных. — 2012
10. *Raica M., Encica S., Motoc A.* // Ann. Anat. 2006. Vol. 188 (4). P. 345—352
11. *Bodey B.* Immunological aspects of neoplasia. The role of the thymus / B. Bodey, S. E. Siegel // Springer Science. 2004. 567 p.
12. *Беловешкин А. Г.* К вопросу о классификации телец Гассаля тимуса человека / А. Г. Беловешкин. — Текст: непосредственный // Молодой ученый. — 2013. — № 4 (51). — С. 631—634. — URL: <https://moluch.ru/archive/51/6616/> (дата обращения: 23.12.2022).
13. *Stanley S. K.* et al. Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse // The Journal of experimental medicine. — 1993. — Т. 178. — № 4. — С. 1151—1163.
14. *Жаров А. В.* Функциональная морфология органов иммунной и эндокринной систем поросят при гипотрофии / А. В. Жаров // Ветеринарная патология. — 2003. — № 2(6). — С. 58—59. — EDN HSOBVD.
15. *Шапошников И. Т.* и др. Клинико-морфологическая характеристика лимфоидных органов у телят при иммунодефиците // Ветеринарная патология. — 2011. — № 4. — С. 92.
16. *Pallarés F. J., Gómez S.* Unusual histopathologic features in thymic corpuscles associated with porcine periweaning failure-to-thrive syndrome // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. — 2019. — Т. 31. — № 4. — С. 601—603.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Б. В. Шабунин** — старший лаборант;  
**А. В. Некрасов** — старший лаборант;  
**Е. И. Степанов** — младший научный сотрудник;  
**Е. В. Михайлов** — кандидат ветеринарных наук, заведующий отделом экспериментальной фармакологии.

Статья поступила в редакцию 03.03.2023 г.

Original article

UDC 619:616—007.616—091

**MICROENVIRONMENT OF HASSALL'S CORPUSCLES IN HYPOTROPHIC PIGLETS IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD**

**Boris Viktorovich Shabunin, Egor Maksimovich Stepanov, Artem Valeryevich Nekrasov, Evgeniy Vladimirovich Mikhaylov**

*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, voronezh81@rambler.ru*

**Abstract.** This article presents the data on the study of the cellular pool of the microenvironment of Hassall's corpuscles in hypotrophic piglets in the early postnatal period. Diagnostic slaughter of daily hypotrophic piglets weighing less than 800 g ( $n = 5$ ) and normotrophic piglets ( $n = 5$ ) of the same age, belonging to the pig breeding farm of Voronezh region, was conducted in the prosectorium of FSBSI "ARVRIPP&T". In normotrophic piglets, the cellular pool of the microenvironment of corpuscles was represented by an accumulation of thymocytes and antigen-presenting cells at different stages of differentiation. Electron microscopy revealed epithelial progenitor cells of the corpuscles. They had a large, rounded nucleus composed of euchromatin with one or two nucleoli. In thymocytes, chromatin was distributed in clusters along the periphery and in the center. Optically dense mitochondria were visualized in the cytoplasm. Hypotrophic piglets had cellular infiltrate and partial destruction of the corpuscles themselves in Hassall's corpuscles. Thymocytes had morphological changes, namely, pyknotic nuclei, and dendritic cells had atypical nuclei, which was a sign of immunodeficiency.

**Keywords:** Hassall's corpuscles, thymus, morphology, immunohistochemistry, microenvironment, hypotrophic piglets, normotrophic piglets.

**Acknowledgment:** the work is carried out with the support of the Russian foundation for basic research, project no. 23-26-00020

Hypotrophy of piglets is characterized by insufficiency and reduced immunobiological reactivity of newborn animals, which more often than others suffer from disorders of the gastrointestinal tract, lag behind in growth and development. In case of hypotrophy, the functional activity of the endocrine glands decreases, which leads to inhibition of the morphological, biochemical, and immune status of the body [1].

A special place in the immune system of a newborn is occupied by the thymus gland (thymus), which is necessary for the development of the entire immune system, as well as for the formation and maintenance of the body's immunological competence in further ontogenesis. The working state of the thymus is confirmed by the presence of a clearly defined cortical and medulla in the thymus lobules, the proliferation of thymoblasts, the presence of T-lymphocytes, macrophages and stratified Hassall's corpuscles [2].

In the thymus of hypotrophic piglets, a dysplastic nature of structural changes is revealed, characterized by a decrease in thymus lobules, blurring of the boundaries between the cortical and medulla layers,

as well as hypoplasia of thymocytes, which can lead to disruption of its functioning and shutdown of the T-cell immunity [3].

One of the least studied components of the thymus, both in normal conditions and in case of various pathologies, are Hassall's corpuscles and their microenvironments [4]. Recently, it has been established that these structures are actively involved in the maturation of T-regulators, the synthesis of cytokines, and the expression of autoantigens [5].

The objective of the work is to study the microenvironment of Hassall's corpuscles in hypotrophic piglets in the early postnatal period.

**MATERIAL AND METHODS**

Diagnostic slaughter of daily hypotrophic piglets with a critical mass of less than 800 g ( $n = 5$ ) and normotrophic piglets of the same age weighing 1100 g ( $n = 5$ ), belonging to the pig farm in Voronezh region, was conducted in the prosectorium of FSBSI "ARVRIPP&T".

Thymus specimens were fixed in 10 % neutral formalin solution, embedded in paraffin according to the standard method, and serial sections 3—5 μm thick were prepared from paraffin blocks. To study the general morphological structure of the organ, paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin.

For immunohistochemical studies, commercial monoclonal antibodies (mAbs) to the differentiation cluster CD-3 and PAX-5 (Novo Castra, UK) were used.

The material (thymus) for immunohistochemical studies was fixed with 10 % neutral buffered formalin for 24 h, and standard histological processing was performed. Prepared tissue specimens were embedded in Histomix paraffin medium, sections 4 μm thick were prepared, which were applied to highly adhesive slides and dried at a temperature of 37 °C for 18 hours). Non-immunized serum served as the reaction control [6].

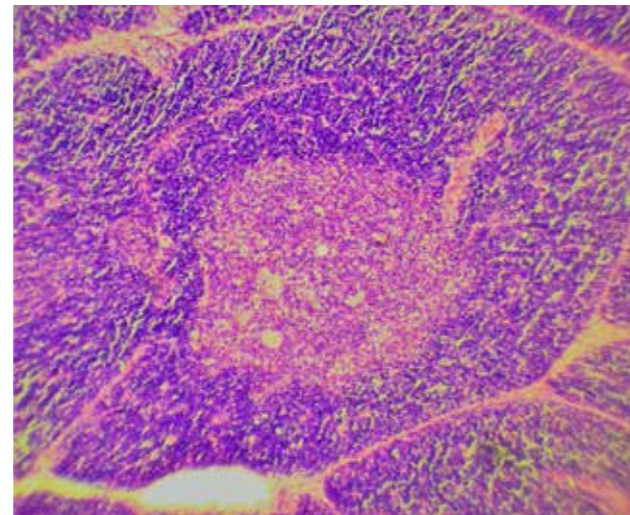
The material for electron microscopy was carried out in 2.5 % glutaraldehyde in 0.114 M collide buffer in the cold with postfixation in 1 % tetraoxosmium solution in the same buffer.

The osmolarity of 360 mosm was achieved by introducing 0.05 M potassium ferricyanide and Ringer's solution into the second fixative [7]. The material was enclosed in epon-812. Semi-thin sections were stained with azure-2 in combination with magenta basic and viewed using the Leica light microscope. Ultrathin sections were prepared on an Ultracut ultramicrotome (Leica), counterstained with lead citrate and uranyl acetate, and viewed using the EM-208 electron microscope (Philips).

## RESULTS AND DISCUSSION

The thymus of normotrophic piglets was a formed organ with clear boundaries between the cortex and medulla. The stromal apparatus of the gland clearly divided the organ into lobes (Fig. 1). In the medulla (Fig. 2), hypertrophied light epithelial cells were detected along the periphery, which according to some authors are the precursors of Hassall's corpuscles [8—11]. The thymic corpuscles were mostly mature as the nucleus of the corpuscles was already keratinized. The cellular pool of the microenvironment of corpuscles was represented by an accumulation of thymocytes and antigen-presenting cells at different stages of differentiation. Electron microscopy revealed epithelial progenitor cells of corpuscles (Fig. 2D). They had a large, rounded nucleus composed of euchromatin with one or two nucleoli. In thymocytes, chromatin (Fig. 2 E) was distributed in clusters along the periphery and in the center. Optically dense mitochondria were visualized in the cytoplasm. The study of IMHC

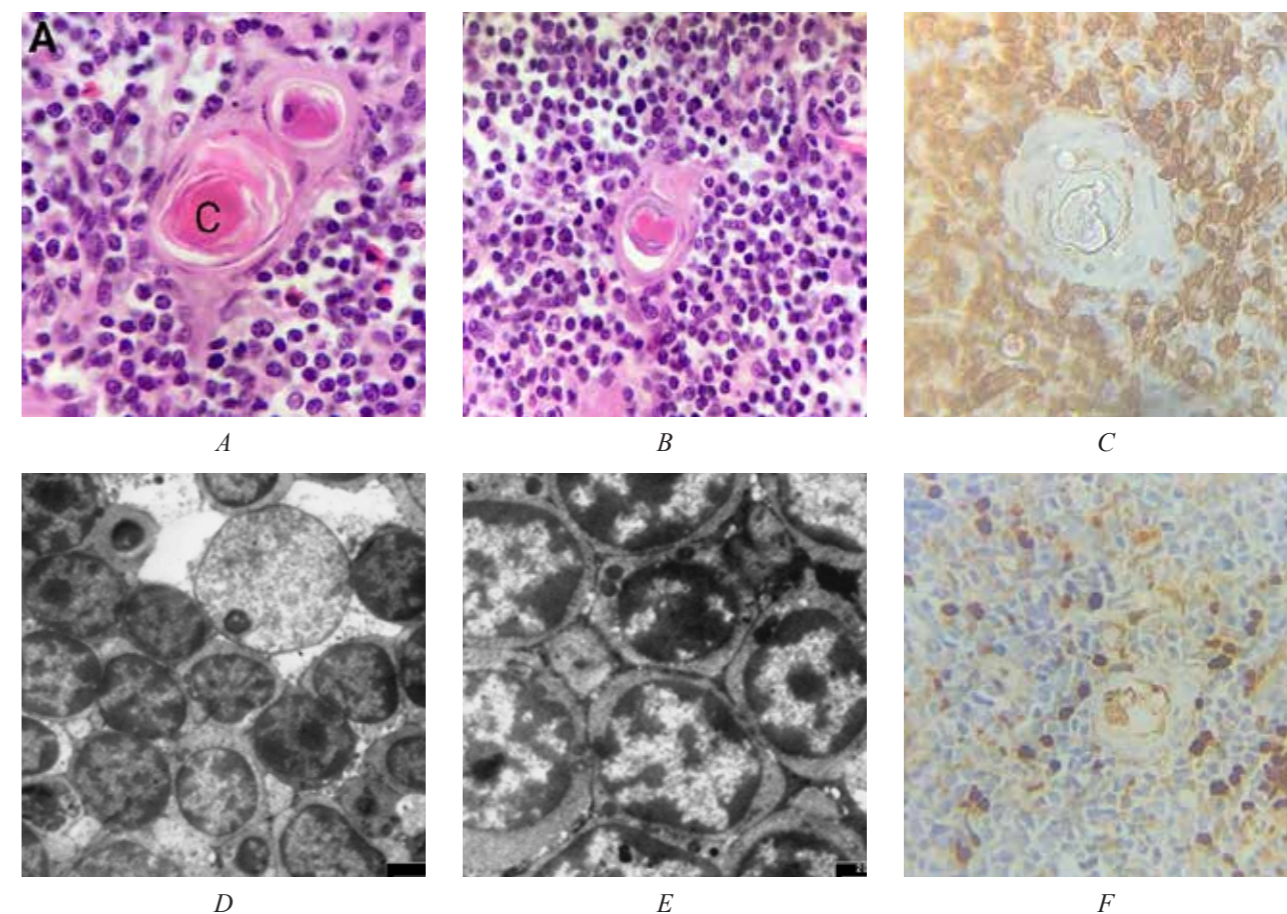
with the marker CD-3 (Fig. 2C) revealed single positive T-cells located both in the immediate vicinity and surrounding the corpuscles themselves. Examination with the PAX-5 marker revealed the presence of single (or clustered) immature B-lymphocytes (Fig. 2 F).



**Fig. 1.** Clear boundary between the cortical and medulla of the thymus in normotrophic piglets. Stained with hematoxylin-eosin, 100x magnification

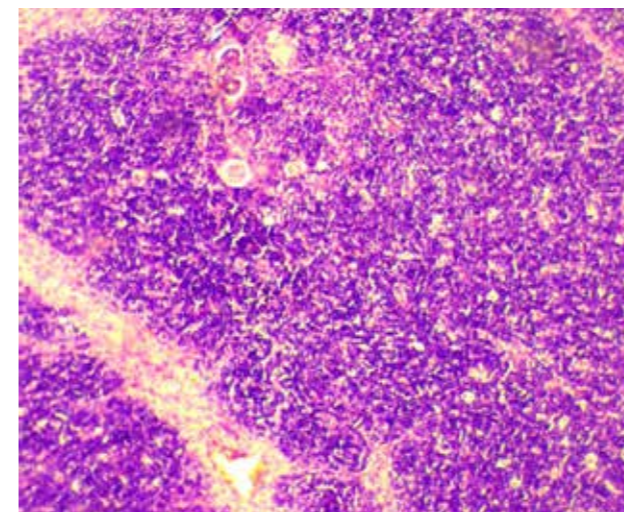
A histological study of the thymus architectonics in hypotrophic piglets revealed the erasure of the boundaries of the cortical and medulla (Fig. 3). In the medulla, Hassall's corpuscles were single and were in a destructive form, and they also had a cellular infiltrate (Fig. 4B). Visible inclusions, according to Beloveshkin A. G., were the second stage of the destruction of Hassall's corpuscles [4]. In addition to them, typical corpuscles with a keratin core consisting of concentrically organized plates were visualized. During electron microscopy, pycnosis was visualized in nearby thymocytes, and in antigen-presenting cells, a violation of the shape of the nuclei (Fig. 4 D, E). Immunohistochemical studies showed that single CD-3 lymphocytes were present in the corpuscles (Fig. 4B). Expression of PAX-5 showed that keratin was also slightly stained with this marker (Fig. 4F). Near the corpuscles themselves, B-lymphocytes were visualized in a single amount [12].

The data obtained indicate that in case of hypotrophy in piglets, the boundaries of the cortical and medulla are erased, as well as the partial destruction of Hassall's corpuscles. This characterizes the presence of leukocyte infiltration. Thymocytes and dendritic cells had structural and morphological changes, namely, pycnotic and atypical nuclei, which was a sign of immunodeficiency [13].



**Fig. 2.** Hassall's corpuscles in normotrophic piglets:

A — Hassall's corpuscles in healthy piglets with a hyperchromatic nucleus surrounded by a rim of eosinophilic cytoplasm. Stained with hematoxylin-eosin, 1000x magnification; B — thymic corpuscle of an ordinary type. Stained with hematoxylin-eosin, 400x magnification; C — thymic corpuscle, stained with CD-3 marker, 400x magnification; D — epithelial cell-precursor of Hassall's corpuscles (arrow), the strip corresponds to 5 μm; E — thymocytes under an electron microscope, the strip corresponds to 2000 nm; F — young Hassall's corpuscle, PAX-5 staining, 400x magnification



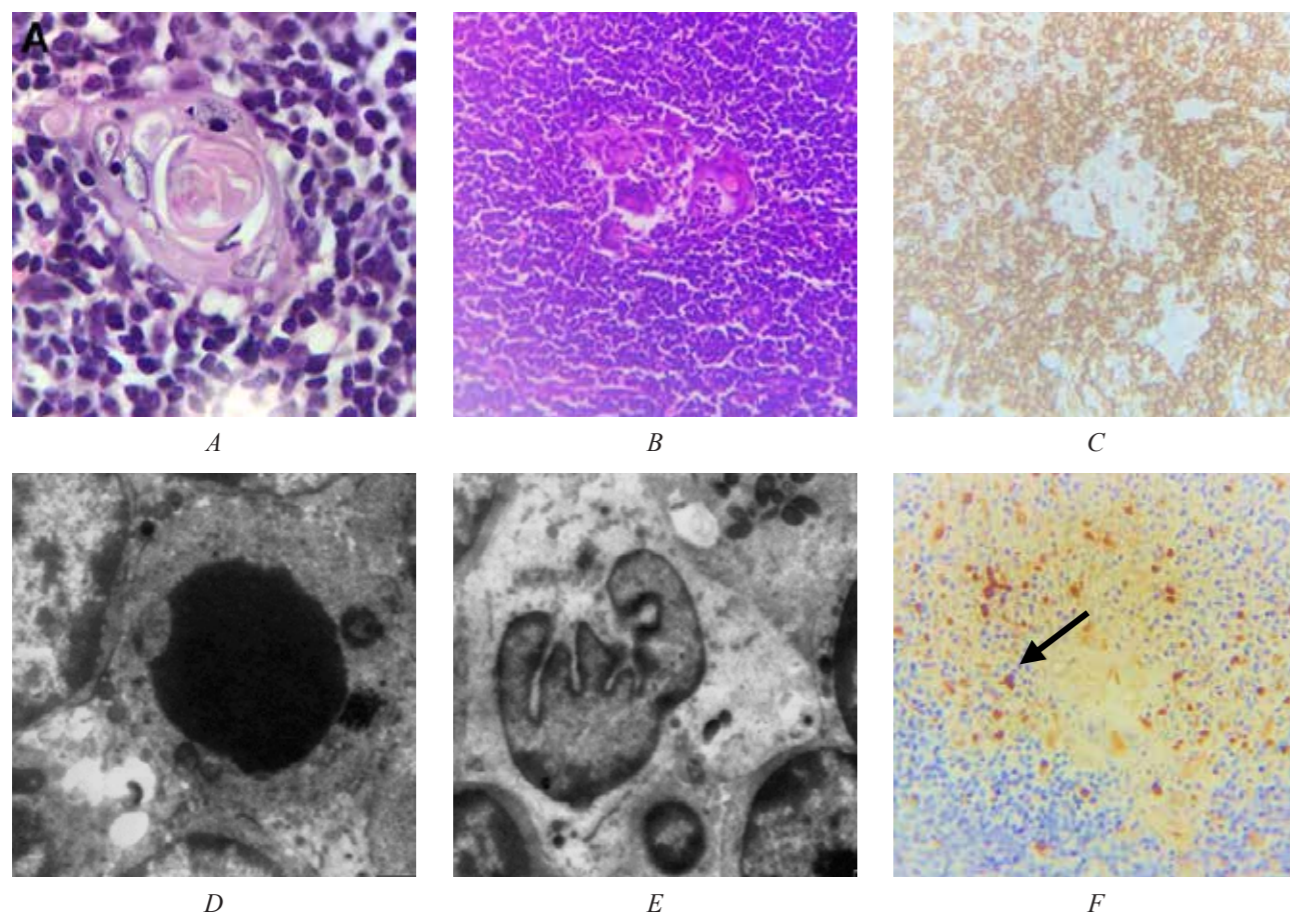
**Fig. 3.** Absence of a clear boundary between the cortical and medulla of the thymus in hypotrophic piglets, stained with hematoxylin-eosin, 100x magnification

This leads to an increased transformation and disintegration of immunocompetent cells, which further leads to a decrease in the immune response.

Similar research results were obtained by Zharov A. V. in the study of the immune organs of hypotrophic piglets [14].

The author showed the erasure of the border of the cortical and medulla in the thymus, partial apoptosis of thymocytes and dystrophy and deformation of Hassall's corpuscles. Shaposhnikov I. T. and co-authors established the presence of pathological thymocytes in calves with immunodeficiency, which also confirmed the violation of protective functions in the animals we studied [15].

Pallares F. J. and Gomez S. also pointed out that in case of hypotrophy, thymus atrophy occurs in most piglets, and leukocyte infiltration is observed in Hassall's corpuscles, and in some cases destruction of the corpuscles [16].



**Fig. 4.** Hassall's corpuscles in hypotrophic piglets:

*A* — Hassall's corpuscle, stained with hematoxylin-eosin, 1000x magnification; *B* — Hassall's corpuscle with leukocyte infiltration, stained with hematoxylin-eosin, 400x magnification; *C* — Hassall's corpuscle in the thymus, stained with a CD-3 marker; *D, E* — pathological forms of the nucleus in the thymocyte and dendritic cell, the white line corresponds to 2000 nm; *F* — accumulation of precursors of B-lymphocytes around the destructive Hassall's corpuscle (arrow), PAX-5 staining, 400x magnification

### CONCLUSION

The conducted studies show that in case of hypotrophy in piglets there is a violation of the formation of Hassall's corpuscles and their microenvironment, which was evident from the presence of leukocyte infiltration and the appearance of pathological forms. This is indicated by increased transformation and decay of immunocompetent cells, which will further lead to a decrease in the immune response and to organ dysfunction.

### REFERENCES

1. Pharmacocorrection of hypotrophy and rickets of young pigs: monograph / A. V. Savinkov, M. P. Semenenko, O. S. Guseva, A. I. Ryzantseva. — Kinel: RIO Samarskogo GAU (RIO Samara SAU), 2020. — 222 p.
2. *Abaeva T. S.* Features of the structure of the macro- and microscopic anatomy of the thymus in infants and the elderly // *Vestnik nauki i obrazovaniya* (Bulletin of science and education). — 2016. — No. 12 (24).

3. *Shakhov A. G.* Factor infections of pigs / A. G. Shakhov, A. I. Anufriev, P. A. Anufriev // *Zhivotnovodstvo Rossii. Spets. vypusk po svinovodstvu*. (Animal husbandry of Russia. Special issue on pig breeding). — 2005. — P. 24—27
4. *Beloveshkin A. G., Studenikina T. M.* Participation of eosinophils in the morphogenesis of Hassall's corpuscles // *Vesti Natsyonalnoy akademii navuk Belarusi. Seriya medytsynskikh navuk* (Bulletin of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical sciences series). — 2011. — No. 2. — P. 93—97.
5. *Volkova L. V. et al.* State of the stromal component of the thymus and Hassall's corpuscles in case of autopsies in children // *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy* (International Journal of Applied and Fundamental Research). — 2014. — No. 8—1. — P. 133—134.
6. *Gazizova A. I., Akenova A. B.* Morphofunctional state of the thymus in cattle as a lymphoid organ // *Nauka i Mir* (Science and World). — 2015. — V. 1. — No. 2. — P. 48—50.

7. *Gordova V. S., Dyachkova I. M.* Antigen-presenting cells of lymphoid organs // *Vestnik Chuvashskogo universiteta* (Bulletin of Chuvash University). — 2014. — No. 2.
8. *Lugovtsov N. A., Platonov A. N., Lugovtsova P. A.* Topography of cellular elements of the human thymus: CD68-positive macrophages, S-100, CD1a-positive dendritic cells, Hassall's corpuscles, their contents (CEA) // *Molodezhnyy sbornik nauchnykh statey "Nauchnye stremleniya"* (Youth collection of scientific articles "Scientific aspirations"). — 2012. — No. 2.
9. *Yakimenko L. L. et al.* Morphological and functional features of Hassall's corpuscles in the thymus of vertebrates. — 2012.
10. *Raica M., Encica S., Motoc A.* // *Ann. Anat.* 2006. Vol. 188 (4). P. 345—352.
11. *Bodey, B.* Immunological aspects of neoplasia. The role of the thymus / B. Bodey, S. E. Siegel // Springer Science. 2004. 567 p.
12. *Beloveshkin A. G.* On the classification of Hassall's corpuscles of the human thymus / A. G. Beloveshkin. — Text: direct // *Molodoy uchenyy* (Young scientist). — 2013. — No. 4 (51). — P. 631—634. — URL: <https://moluch.ru/archive/51/6616/> (date of access: 23.12.2022).
13. *Stanley S. K. et al.* Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse // *The Journal of experimental medicine*. — 1993. — V. 178. — No. 4. — P. 1151—1163.
14. *Zharov A. V.* Functional morphology of the organs of the immune and endocrine systems of hypotrophic piglets / A. V. Zharov // *Veterinarnaya patologiya* (Veterinary pathology). — 2003. — No. 2 (6). — P. 58—59. — EDN HSOBVD.
15. *Shaposhnikov I. T. et al.* Clinical and morphological characteristics of lymphoid organs in calves with immunodeficiency // *Veterinarnaya patologiya* (Veterinary pathology). — 2011. — No. 4. — P. 92.
16. *Pallarés F. J., Gómez S.* Unusual histopathologic features in thymic corpuscles associated with porcine perineaning failure-to-thrive syndrome // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. — 2019. — V. 31. — No. 4. — P. 601—603.

### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**B. V. Shabunin** — Senior Laboratory Assistant;  
**E. M. Stepanov** — Postgraduate Student;  
**A. V. Nekrasov** — Senior Laboratory Assistant;  
**E. V. Mikhaylov** — Candidate of Veterinary Sciences.

The article was submitted 03.03.2023.

Персоналия  
УДК 619(092)

## К 95-ЛЕТИЮ ПРОФЕССОРА В. А. ПАРИКОВА

**Сергей Викторович Шабунин, Павел Андреевич Паршин**

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, Воронеж, Россия, e-mail: vnivipat@mail.ru*

Виталию Александровичу Парикову — доктору ветеринарных наук, профессору, заслуженному деятелю науки Российской Федерации в 2023 году исполняется 95 лет со дня рождения.

В. А. Париков родился 12 апреля 1928 года в деревне Коряковец Сокольского района Ивановской области. В 1947 году окончил Юрьевский зоотехническо-ветеринарный техникум. С 1947 по 1953 год работал заведующим Н. Ландеховским зооветеринарным пунктом, а затем председателем колхоза «Новая Жизнь» Ивановской области.

В 1953 году В. А. Париков поступил и в 1958 году с отличием окончил Воронежский зоотехническо-ветеринарный институт и работал до 1963 года преподавателем Березовского сельскохозяйственного техникума Воронежской области.

В 1966 году окончил очную аспирантуру при кафедре акушерства, искусственного осеменения и основ ветеринарии Воронежского сельскохозяйственного института им. К. Д. Глинки. После окончания аспирантуры с 1966 года работал в должности ассистента этой кафедры, а затем старшего преподавателя. Под руководством заведующего кафедрой заслуженного деятеля науки РСФСР, доктора ветеринарных наук Акатова Василия Алексеевича он выполнил и в 1967 году защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Фонофорез тетрациклина в ткани вымени и лечение катарального мастита у коров ультразвуком». В 1971 году был избран на должность доцента кафедры акушерства и основ ветеринарии.

С октября 1973 года работал заведующим лабораторией патологии молочной железы Всесоюзного, а затем Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии. Одновременно в течение 4 лет (1974—1978) работал заместителем директора по научной работе института.

В 1990 году В. А. Париков защитил докторскую диссертацию на тему «Разработка и совершенствование методов диагностики, терапии и профилактики мастита у коров», а с октября 1991 года ему присвоено звание профессора по специальности акушерство и искусственное осеменение.

Париков В. А. внес огромный вклад в развитие ветеринарного акушерства России, им разработаны и внедрены в производство аппараты, приборы и препараты для диагностики, лечения и профилактики мастита у коров, за которые он награжден четырьмя медалями ВДНХ СССР (две бронзовые, серебряная, золотая) и знаком «Изобретатель СССР». Он являлся автором более 200 научных работ, 1 монографии, многочисленных методических рекомендаций и 16 изобретений. Им подготовлено 12 кандидатов и 3 доктора наук. На протяжении многих лет являлся руководителем Государственных и ведомственных НИР. Занимался плодотворной международной деятельностью с зарубежными институтами в области ветеринарного акушерства Польши и Голландии.

Профессор В. А. Париков на протяжении многих лет был членом секции Отделения ветеринарной медицины РАСХН, диссертационных советов по защите докторских и кандидатских диссертаций при ВНИВИ патологии фармакологии и терапии и Воронежском государственном аграрном университете им. К. Д. Глинки.

Научная эрудиция, принципиальность и требовательность профессора В. А. Парикова сочетались с чуткостью и отзывчивостью, все это снискало ему глубокое уважение и широкую известность. Заслуги профессора В. А. Парикова в подготовке кадров отмечены Почетным званием «Заслуженный деятель науки Российской Федерации» и многими медалями.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**С. В. Шабунин** — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, научный руководитель института;  
**П. А. Паршин** — доктор ветеринарных наук, профессор, директор института.

Статья поступила в редакцию 12.04.2023 г.

Personal article  
UDC 619(092)

## ON THE OCCASION OF THE 95<sup>TH</sup> ANNIVERSARY SINCE THE BIRTH OF VITALIY ALEKSANDROVICH PARIKOV

**Sergey Viktorovich Shabunin, Pavel Andreevich Parshin**

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

In 2023, it is the 95<sup>th</sup> anniversary since the birth of Vitaliy Aleksandrovich Parikov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Honored Scientist of the Russian Federation.

V. A. Parikov was born on April 12, 1928 in Koryakovets village, Sokolskiy rayon, Ivanovo region. In 1947, he graduated from Yuryev Zootechnical and Veterinary Technical School. From 1947 to 1953, V. A. Parikov worked as the Head of the Zooveterinary station named after N. Landekhovskiy, and then as the Chairman of the collective farm “Novaya Zhizn” in Ivanovo region.

In 1953, V. A. Parikov entered and in 1958 graduated with honors from Voronezh Zootechnical and Veterinary Institute and worked until 1963 as a Lecturer at Berezovskiy Agricultural College of Voronezh Region.

In 1966, V. A. Parikov completed full-time post-graduate studies at the Department of Obstetrics, Artificial Insemination and Fundamentals of Veterinary Medicine of Voronezh Agricultural Institute named after K. D. Glinka. After graduating from postgraduate school in 1966, he worked as a Teaching Assistant of this department, and then as a Senior Lecturer. Under the guidance of Akatov Vasiliy Alekseevich, Head of the department, Honored Scientist of the RSFSR, Doctor of Veterinary Sciences, he completed and in 1967 defended his Candidate thesis on the topic Phonophoresis of Tetracycline in the Tissues of the Udder and Treatment of Bovine Catarrhal Mastitis with Ultrasound. In 1971, he was elected to the post of Assistant Professor of the Department of Obstetrics and Fundamentals of Veterinary Medicine.

From October 1973, V. A. Parikov worked as the Head of the Mammary Gland Pathology Laboratory of the All-Union and then All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy. At the same time, he had been working as a

Deputy Director for Scientific Work of the Institute for 4 years (1974—1978).

In 1990, V. A. Parikov defended his Doctoral thesis on the topic Development and Improvement of Methods for Diagnosing, Treating and Preventing Bovine Mastitis, and since October 1991 he was awarded the title of Professor in obstetrics and artificial insemination.

Parikov V. A. made a huge contribution to the development of veterinary obstetrics in Russia, he developed and introduced into production devices, instruments and designed drugs for the diagnosis, treatment and prevention of bovine mastitis, for which he was awarded four medals of the VDNKh of the USSR (two bronze, one silver, one gold) and the badge Inventor of the USSR. He was the author of more than 200 scientific papers, 1 monograph, numerous guidelines and 16 inventions. He prepared 12 Candidates and 3 Doctors of Sciences. For many years he was the Head of state and departmental researches. He was engaged in fruitful international activities with foreign institutions in the field of veterinary obstetrics in Poland and Holland.

Professor V. A. Parikov for many years was a member of the section of the Department of Veterinary Medicine of the Russian Academy of Agricultural Sciences, dissertation councils for the defense of doctoral and candidate theses at the All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy and Voronezh State Agricultural University named after K. D. Glinka.

Scientific erudition, adherence to principles and exactingness of Professor V. A. Parikov were combined with sensitivity and responsiveness, all this earned him a deep respect and wide popularity. The merits of Professor V. A. Parikov in the training of personnel were awarded with the Honorary title Honored Worker of Science of the Russian Federation and many medals.

### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**S. V. Shabunin** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Academician of the RAS, Academic Director of the Institute;

**P. A. Parshin** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of the Institute.

The article was submitted 12.04.2023.

## 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 зооигиены, 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](mailto: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».

