

Ветеринарный фармакологический вестник
входит в перечень рецензируемых научных изданий,
в которых должны быть опубликованы основные научные результаты
диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание
ученой степени доктора наук (по состоянию на 24.03.2020 года)

Наименование издания	ISSN	Научные специальности и соответствующие им отрасли науки, по которым присуждаются ученые степени	Дата включения издания в Перечень
Ветеринарный фармакологический вестник	2541—8203	06.02.01 — Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных (биологические науки), 06.02.01 — Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных (ветеринарные науки), 06.02.02 — Ветеринарная микробиология, вирусология, теринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (биологические науки), 06.02.02 — Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки), 06.02.03 — Ветеринарная фармакология с токсикологией (биологические науки), 06.02.03 — Ветеринарная фармакология с токсикологией (ветеринарные науки), 06.02.04 — Ветеринарная хирургия (биологические науки), 06.02.04 — Ветеринарная хирургия (ветеринарные науки), 06.02.05 — Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза (биологические науки), 06.02.05 — Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза (ветеринарные науки), 06.02.06 — Ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных (ветеринарные науки), 06.02.06 — Ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных (биологические науки), 06.02.08 — Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов (сельскохозяйственные науки), 06.02.08 — Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов (биологические науки), 06.02.10 — Частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства (сельскохозяйственные науки)	с 28.02.2020

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

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

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

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

BULLETIN OF VETERINARY PHARMACOLOGY

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

FOUNDER AND PUBLISHER

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

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

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

EDITORIAL BOARD

Chief Editor

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

Deputy Chief Editor

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

Tkacheva Yuliya Aleksandrovna — Executive Secretary

EDITORIAL COUNCIL

Chairman

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

Editorial Council Members

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

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

Dzhavadov Eduard Dzhavadovich — Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of the RAS, Professor of the Department of Epizootology of FSBEI HE "Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine", 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 Agro-technical University named after S. Seifullin", Republic of Kazakhstan

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

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

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

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

Safonov Vladimir Aleksandrovich — Doctor of Biological Sciences, Principal Scientific Associate of Federal State Budgetary Institution of Science of the Order of Lenin and the Order of the October Revolution Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry named after V. I. Vernadsky of the Russian Academy of Sciences (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 RAS, Rector of Samarkand Institute of Veterinary Medicine, Uzbekistan

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

Bulletin of Veterinary Pharmacology
is included in the list of peer-reviewed scientific periodicals,
in which the main scientific results of dissertations for the degree
of Candidate of Sciences, for the degree of Doctor of Sciences
must be published (as of March 24, 2020)

Periodical name	ISSN	Scientific specialties and corresponding branches of science, in which scientific degrees are awarded	Date of inclusion of the periodical in the List
Bulletin of Veterinary Pharmacology	2541—8203	06.02.01 — Diagnosis of diseases and therapy of animals, pathology, oncology and morphology of animals (biological sciences), 06.02.01 — Diagnosis of diseases and therapy of animals, pathology, oncology and morphology of animals (veterinary sciences), 02.06.02 — Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology (biological sciences), 06.02.02 — Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology (veterinary sciences), 06.02.03 — Veterinary pharmacology with toxicology (biological sciences), 06.02.03 — Veterinary Pharmacology with Toxicology (veterinary sciences), 06.02.04 — Veterinary surgery (biological sciences), 06.02.04 — Veterinary surgery (veterinary sciences), 06.02.05 — Veterinary sanitation, ecology, zoohygiene and veterinary and sanitary expertise (biological sciences), 06.02.05 — Veterinary sanitation, ecology, zoohygiene and veterinary and sanitary expertise (veterinary sciences), 06.02.06 — Veterinary obstetrics and biotechnology of animal reproduction (veterinary sciences), 06.02.06 — Veterinary obstetrics and biotechnology of animal reproduction (biological sciences), 06.02.08 — Feed production, feeding of farm animals and feed technology (agricultural sciences), 06.02.08 — Feed production, feeding of farm animals and feed technology (biological sciences), 06.02.10 — Special zootechnics, production technology of livestock products (agricultural sciences)	Since February 28, 2020

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

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

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

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

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

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

ВЕТЕРИНАРНЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

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



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

№ 4 (25) • 2023

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Оценка эмбриотоксических и тератогенных свойств комплексного средства из природного сырья

Конакова И. А., Медетханов Ф. А., Абрамова А. А., Аюпова И. Р. 8

Изучение токсического и местно-раздражающего действия кормовой добавки Гепатопротект на лабораторных животных

Малков С. В., Опарина О. Ю., Красноперов А. С., Верещак Н. А., Томских О. Г. 17

Референсные интервалы базовых эхокардиографических параметров у физиологически здоровых домашних кошек

Руденко П. А., Гандур Ж. А., Луцай В. И., Руденко А. А. 27

Гематологические маркеры внутриутробной задержки развития у новорожденных телят

Сафонов В. А., Ермилова Т. С., Черницкий А. Е. 39

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Эффективность препарата на основе албендазола сульфоксида при гельминтозах овец

Орбец В. А., Кастарнова Е. С., Говорова М. В. 51

Состояние естественной резистентности у поросят при вакцинации против классической чумы и рожи свиней

Шахов А. Г., Сашина Л. Ю., Коцарев В. Н., Владимирова Ю. Ю., Никоненко Г. В. 59

Применение доксорубина гидрохлорида в постоперационном периоде при остеосаркоме кошек

Малахова Н. А., Лицук А. П., Пискунова О. Г., Клейменова Н. В., Клейменов И. С. 73

Опыт применения препарата картисилан для лечения дисплазии тазобедренного сустава у кошки

Винокурова Д. П., Семененко М. П., Семененко К. А., Тараник Т. В. 85

Состояние неспецифической резистентности молочной железы больных субклиническим маститом коров при применении комбинированной мази «Уберосепт» совместно с иммуностимулятором <i>Перегончий А. Р., Павленко О. Б., Зимников В. И., Сашина Л. Ю., Манжурина О. А.</i>	94
--	----

СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ,
ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

Анализ виroma кишечника свиней группы откорма с различной конверсией корма <i>Сыромятников М. Ю., Шабунин С. В., Нестерова Е. Ю., Гладких М. И., Смирнова Ю. Д., Буракова И. Ю., Морозова П. Д., Грязнова М. В., Михайлов Е. В., Боев В. Ю.</i>	106
---	-----

Идентификация генов антибиотикорезистентности у бактерий рода <i>Staphylococcus</i>, изолированных из молока коров <i>Сыромятников М. Ю., Шабунин С. В., Нестерова Е. Ю., Гладких М. И., Зимников В. И., Манжурина О. А., Сашина Л. Ю.</i>	122
--	-----

Морфологические особенности кожного покрова кроссбредных овец при оценке качества овцеводческой продукции <i>Ульянов А. Г., Котарев В. И., Ульянов И. А., Торгун П. М.</i>	136
--	-----

Исследование разнообразия грибного микробиома кишечника свиней при различной конверсии корма <i>Сыромятников М. Ю., Шабунин С. В., Нестерова Е. Ю., Гладких М. И., Смирнова Ю. Д., Буракова И. Ю., Морозова П. Д., Грязнова М. В., Михайлов Е. В.</i>	151
---	-----

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОБИОХИМИЯ
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Анализ генов ферментов метаболических путей в кишечнике новорожденных поросят при диарее <i>Грязнова М. В., Смирнова Ю. Д., Буракова И. Ю., Морозова П. Д., Михайлов Е. В., Сыромятников М. Ю.</i>	163
--	-----

Цитокиновый профиль у поросят, выращиваемых под свиноматками, переболевшими послеродовыми болезнями <i>Шахов А. Г., Сашина Л. Ю., Владимирова Ю. Ю., Акулова К. О., Никоненко Г. В.</i>	175
---	-----

Патоморфологические и молекулярно-генетические изменения молочной железы коров при катаральном мастите <i>Михайлов Е. В., Павленко О. Б., Шабунин Б. В., Стрельников Н. А., Болотова В. С., Сыромятников М. Ю., Лацигина И. Н., Пасько Н. В.</i>	185
--	-----

Контроль воспроизводительной способности у коров на молочных предприятиях <i>Авдеенко В. С., Никитин Г. С., Ачилов В. В., Гальченко В. А.</i>	201
---	-----

Условия публикации и правила оформления статей	217
---	-----

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. 4 (25) • 2023
.....

EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY

.....

Assessment of embryotoxic and teratogenic properties of a complex remedy from natural raw materials

Konakova I. A., Medetkhanov F. A., Abramova A. A., Ayupova I. R. 13

Study of the toxic and locally irritating effect of the feed additive hepatoprotect on laboratory animals

Malkov S. V., Oparina O. Yu., Krasnoperov A. S., Vereshchak N. A., Tomskikh O. G. 22

Reference intervals for basic echocardiographic parameters in physiologically healthy domestic cats

Rudenko P. A., Gandur J. A., Lutsay V. I., Rudenko A. A. 33

Hematological markers of intrauterine growth restriction in newborn calves

Safonov V. A., Ermilova T. S., Chernitskiy A. E. 45

CLINICAL PHARMACOLOGY

.....

Efficacy of the drug based on albendazole sulfoxide in case of ovine helminthiases

Orobets V. A., Kastarnova E. S., Govorova M. V. 55

State of natural resistance in piglets during vaccination against classical swine fever and erysipelas

Shakhov A. G., Sashnina L. Yu., Kotsarev V. N., Vladimirova Yu. Yu., Nikonenko G. V. 66

Use of doxorubicin hydrochloride in the postoperative period in case of feline osteosarcoma

Malakhova N. A., Lishchuk A. P., Piskunova O. G., Kleymenova N. V., Kleymenov I. S. 79

Experience of using the drug kartisilan for the treatment of hip joint dysplasia in a cat

Vinokurova D. P., Semenenko M. P., Semenenko K. A., Taranik T. V. 90

State of nonspecific resistance of the mammary gland of the cows with bovine subclinical mastitis when using the combination ointment “Uberosept” together with an immunostimulant

Peregonychiy A. R., Pavlenko O. B., Zimnikov V. I., Sashnina L. Yu., Manzhurina O. A. 100

AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION, DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

Analysis of the intestinal virome of the pigs of the fattening group with various feed conversion

Syromyatnikov M. Yu., Shabunin S. V., Nesterova E. Yu., Gladkikh M. I., Smirnova Yu. D., Burakova I. Yu., Morozova P. D., Gryaznova M. V., Mikhaylov E. V., Boev V. Yu. 114

Identification of antibiotic resistance genes in the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from cow’s milk

Syromyatnikov M. Yu., Shabunin S. V., Nesterova E. Yu., Gladkikh M. I., Zimnikov V. I., Manzhurina O. A., Sashnina L. Yu. 129

Morphological characteristics of the skin of crossbred sheep when assessing the quality of sheep products

Ulyanov A. G., Kotarev V. I., Ulyanov I. A., Torgun P. M. 144

Study of the fungal microbiome diversity of the intestines in pigs at various feed conversion

Syromyatnikov M. Yu., Shabunin S. V., Nesterova E. Yu., Gladkikh M. I., Smirnova Yu. D., Burakova I. Yu., Morozova P. D., Gryaznova M. V., Mikhaylov E. V. 157

PATHOPHYSIOLOGY, PATHOBIOCHEMISTRY AND EXPERIMENTAL THERAPY

Analysis of the genes of enzymes of metabolic pathways in the intestines of the newborn piglets with diarrhea

Gryaznova M. V., Smirnova Yu. D., Burakova I. Yu., Morozova P. D., Mikhaylov E. V., Syromyatnikov M. Yu. 169

Cytokine profile in the piglets reared by the sows that have had postpartum diseases

Shakhov A. G., Sashnina L. Yu., Vladimirova Yu. Yu., Akulova K. O., Nikonenko G. V. 180

Pathomorphological and molecular-genetic changes in the mammary gland of cows with catarrhal mastitis

Mikhaylov E. V., Pavlenko O. B., Shabunin B. V., Strelnikov N. A., Bolotova V. S., Syromyatnikov M. Yu., Latsigina I. N., Pasko N. V. 193

Control of the reproductive ability of cows at dairy enterprises

Avdeenko V. S., Nikitin G. S., Achilov V. V., Galchenko V. A. 209

Publishing terms and article formatting requirements 217

ОЦЕНКА ЭМБРИОТОКСИЧЕСКИХ И ТЕРАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСНОГО СРЕДСТВА ИЗ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ

Ирина Александровна Конакова[✉], Фазил Акберович Медетханов,
Арина Алексеевна Абрамова, Илина Руслановна Аюпова¹

Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана,
Казань, Россия, ira.konakova@yandex.ru[✉]

Аннотация. Актуальность синтеза новых эффективных и безопасных препаратов для использования в масштабном животноводстве не вызывает сомнений. Это объясняется тем, что значительный процент препаратов, имеющихся в арсенале у ветеринарных врачей, предназначены для человека, а также многие из них оказывают негативное влияние на организм животных и вызывают сложность в дозировании. Учитывая данный факт, на кафедре фармакологии, токсикологии и радиобиологии нами было разработано новое средство на основе природного сырья для парентерального применения. Согласно требованиям «Федерального закона об обращении лекарственных средств», нами была изучена безопасность средства на этапе доклинических исследований, включающая в себя оценку эмбриотоксических и тератогенных свойств в период эмбриогенеза. В ходе проведения эксперимента установлено, что внутримышечное введение средства в дозе 0,5 мл на животное в течение первых 19 суток беременности не оказывает токсического влияния на развивающийся зародыш, что подтверждается отсутствием достоверной разницы между контрольной и опытной группой в изучаемых показателях. Введение средства в указанные выше сроки также не вызывает нарушений органогенеза и аномалий развития костной системы во внутриутробном периоде.

Ключевые слова: доклинические исследования, природное сырье, лабораторные крысы, эмбриотоксичность, тератогенность

В настоящее время существует множество подходов и схем для лечения и профилактики различных заболеваний, однако, несмотря на огромный ассортимент синтетических препаратов на фармацевтическом рынке, все большую популярность приобретают так называемые натуральные средства на основе природного сырья, в качестве которого могут выступать лекарственные травы, продукты пчеловодства или различные виды грибов, история применения которых, исчисляется тысячами лет, о чем свидетельствуют многочисленные археологические раскопки и рукописи, сохранившиеся до наших дней [1—3].

Повышенный интерес к средствам из природных компонентов объясняется, прежде всего, доступностью их получения и изготовления из них стандартизированных лекарственных средств, вы-

сокой биологической активностью, многогранным действием на организм, а также сравнительной дешевизной. Механизм их действия до конца не изучен, однако, имеются данные, что активность природного сырья обусловлена наличием в нем биологических активных веществ, так называемых метаболитов, в качестве которых могут выступать фенольные соединения, кумарины, эфирные масла, алкалоиды [4].

Между тем, существует мнение, что эффективность таких препаратов связана со схожестью химического состава клеток растений и животных, благодаря чему, они на клеточном уровне могут встраиваться в биохимические процессы, оказывая более мягкое действие на организм. Несмотря на большое количество преимуществ природного сырья, препараты на их основе нельзя считать

полностью безвредными, что обусловлено способностью компонентов накапливать в той или иной мере различные химические вещества, меняющие свою активность и степень токсичности в зависимости от технологии изготовления. Ввиду этого, все этапы производства препаратов должны быть строго регламентированы и стандартизированы и соответствовать международным стандартам качества GMP. Одним из основных этапов доказательства безопасности средств является проведение доклинических исследований, включающее в себя изучение эмбриотоксического действия, которое может проявляться в повышении уровня эмбриональной смертности и возникновения различных аномалий у плодов.

Исходя из вышеизложенного, целью работы явилось изучение возможных эмбриотоксических и тератогенных свойств нового средства на основе природного сырья на этапе доклинических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по изучению степени повреждающего действия разработанного средства на развитие плодов осуществляли согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» и «Методическими указаниями по тестированию тератогенной активности химических веществ» [5—7]. Испытания проводили на 14 половозрелых аутбредных самках белых крыс массой тела 180,0—200,0 г, которым в соответствии с методикой были подобраны половозрелые самцы в соотношении 1 : 4. Для проведения эксперимента животные были распределены на контрольную и опытную группы, в которых к самкам в стадии эструса и проэструса подсаживали самцов из расчета один самец на четыре самки. Микроскопическое обнаружение сперматозоидов в вагинальных мазках принимали за первый день беременности. Разработанное средство вводили путем внутримышечных инъекций самкам опытной группы на протяжении 19 суток, начиная с первого дня беременности, в дозе 0,5 мл на голову. Животным контрольной группы по аналогичной схеме применяли воду для инъекций.

Для оценки степени повреждающего действия изучаемого средства в эмбриональном периоде онтогенеза на 20 сутки беременности осуществляли эвтаназию самок эфиром диэтиловым с последующим вскрытием для извлечения матки с плодами, при этом фиксировали продолжительность бере-

менности, общее число живых и мертвых плодов, количество желтых тел и плодов на одну самку, число мест имплантаций, среднюю массу плодов их краниокаудальный размер, диаметр и массу плаценты и хориона. Для определения краниокаудального размера, диаметра хориона и плаценты использовали штангенциркуль «ШЦ-125», а для взвешивания плодов электронные весы PKS0618D (рис. 1).

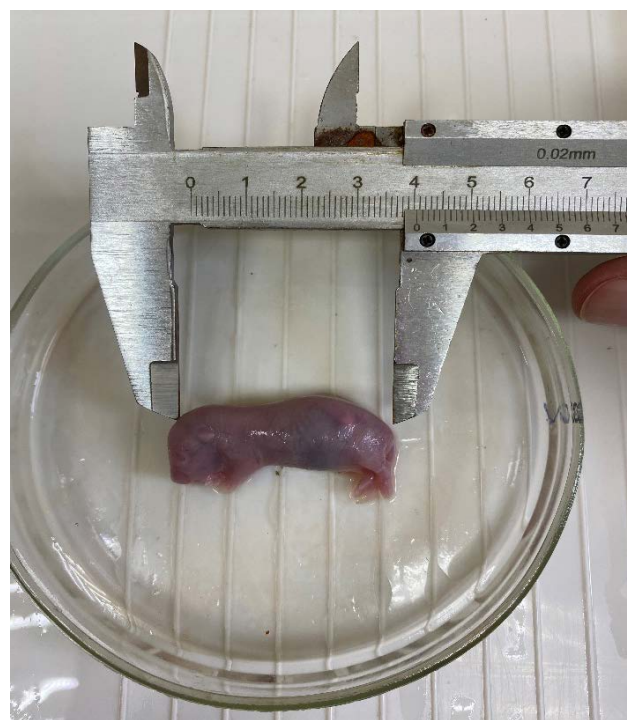


Рис. 1. Измерение краниокаудального размера плода с помощью штангенциркуля

Для установления возможных аномалий в период органогенеза, в частности, формирования костной системы, использовали метод Даусона. Для этого, плоды фиксировали в 96 % этиловом спирте в течение 10 дней, после чего помещали их в 1 % раствор гидроксида калия на 24—48 часов до просветления тканей и заливали ализариновым красителем на 3—5 суток, который готовили по прописи А. П. Дыбан (1970) с добавлением нескольких капель 1 % водного раствора красного ализарина [8].

После окрашивания костей в сиреневый цвет, плоды промывали до полного просветления раствора и регистрировали отклонения в формировании скелета. При этом визуально оценивали общее состояние костной системы, учитывали количество костей, характерное для данного вида животного, и измеряли длину крупных костей.

Испытания на животных проводились согласно Правилам надлежащей лабораторной практики

и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [9, 10].

Достоверность разности между показателями контрольной и опытной группами определяли с помощью критерия Стьюдента при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе экспериментального периода установлено, что в течение всего срока беременности общее состояние и поведение подопытных животных оставалось без изменений, они охотно принимали корм и адекватно реагировали на внешние раздражители.

Результаты исследований извлеченного эмбрионального материала представлены в таблице 1, из которой видно, что количество самок с живыми плодами соответствует числу беременных, то есть животные с полной резорбцией плодов в обеих группах отсутствуют. Число плодов на одну самку в контроле составило $6,14 \pm 0,55$ при $6,86 \pm 0,64$ в опытной группе, что статистически не различимо. Аналогичная тенденция отмечена и между показателями числа яйцеклеток, поступивших в матку, где разница среди групп недостоверна. Число мест имплантаций, характеризующие участки в матке,

где произошло прикрепление зародыша, в среднем в контрольной группе составило $7,29 \pm 0,65$ против $8,0 \pm 0,7$ в опыте при $p \geq 0,05$. Одним из показателей отсутствия эмбриотоксического действия препарата являются значения массы и диаметра зародышевых оболочек, выполняющих важнейшую роль в формировании плода. Опытным путем установлено, что данные показатели у изучаемых экстраэмбриональных оболочек между группами статистически не различимы, что косвенно свидетельствует об отсутствии негативного влияния средства на развитие плодов. Токсическое воздействие на развивающийся зародыш может проявляться и в задержке общего развития, проявляющееся изменениями показателей массы тела и краниокаудального размера.

Путем взвешивания установлено, что средняя масса плодов у крыс, получавших разработанное средство, составила $3,9 \pm 0,11$ граммов, а в контрольной группе $3,81 \pm 0,10$ при $p \geq 0,05$. При этом, оба значения находились в пределах физиологической нормы для данного вида животного. Цифровые показатели, характеризующие длину плода от кончика носа до основания хвоста, в обеих подопытных группах находились на одном уровне и не имели достоверных различий.

Таблица 1

Результаты исследования эмбрионального материала при использовании разработанного средства с 1 по 19 сутки беременности ($n = 7$)

Показатель	Значение показателя для групп	
	Контрольная	Опытная
Количество беременных самок	7	7
Количество самок с живыми плодами	7	7
Число плодов на одну самку, шт.	$6,14 \pm 0,55$	$6,86 \pm 0,64$
Количество желтых тел, шт.	$8,57 \pm 0,70$	$9,14 \pm 0,55$
Число мест имплантаций, шт.	$7,29 \pm 0,65$	$8,00 \pm 0,70$
Средняя масса плодов при вскрытии, г	$3,90 \pm 0,11$	$3,81 \pm 0,10$
Краниокаудальный размер плодов, мм	$30,93 \pm 1,33$	$33,79 \pm 1,98$
Диаметр хориона, мм	$14,20 \pm 1,24$	$14,57 \pm 0,70$
Средняя масса хориона, г	$0,64 \pm 0,31$	$0,68 \pm 0,27$
Диаметр плаценты, мм	$13,26 \pm 0,30$	$13,57 \pm 0,38$
Средняя масса плаценты, г	$1,05 \pm 0,10$	$0,92 \pm 0,07$

Одним из критериев оценки токсического воздействия вновь разработанных средств на формирование плода является установление аномалий костной системы. Отмечено, что плоды обеих подопытных групп имели анатомически правильно сформированный скелет, топография костей не

нарушена, их количество соответствует физиологическим нормам для данного вида животного. Размеры зачатков крупных костей в обеих исследуемых группах находятся на одном уровне и не имеют достоверных различий, о чем свидетельствуют табличные данные (табл. 2).

Таблица 2

Средние размеры зачатков костной системы при введении разработанного средства с 1 по 19 сутки беременности ($n = 7$)

Вид кости		Размер кости, мм	
		Контрольная	Опытная
Бедренная	правая	4,23 ± 0,12	4,64 ± 0,17
	левая	4,31 ± 0,20	4,63 ± 0,16
Большеберцовая	правая	5,02 ± 0,17	5,09 ± 0,10
	левая	5,05 ± 0,10	5,06 ± 0,07
Малоберцовая	правая	4,44 ± 0,12	4,34 ± 0,14
	левая	4,39 ± 0,11	4,39 ± 0,08
Лопаточная	правая	3,49 ± 0,14	3,47 ± 0,15
	левая	3,43 ± 0,09	3,4 ± 0,11
Плечевая	правая	4,29 ± 0,10	4,32 ± 0,07
	левая	4,31 ± 0,09	4,35 ± 0,08
Локтевая	правая	4,38 ± 0,08	4,35 ± 0,06
	левая	4,37 ± 0,05	4,32 ± 0,07
Лучевая	правая	3,45 ± 0,09	3,41 ± 0,07
	левая	3,46 ± 0,06	3,39 ± 0,06

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований по изучению эмбриотоксического и тератогенного действия на этапе доклинических испытаний установлено, что разработанное нами средство из природных компонентов не оказывает негативного влияния на развитие плода в эмбриональный период онтогенеза, что подтверждается полученными результатами. Также средство не обладает способностью вызывать аномалии в строении костной системы, что свидетельствует об отсутствии тератогенных свойств.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Aminah N. S. Chemical constituents and their biological activities from Taunggyi (Shan state) medicinal plants / N. S. Aminah et al. // Heliyon. 2021. — № 7. — P. 68—73.

2. Siddique H. Medicinal plants used to treat infectious diseases in the central part and a northern district of Bangladesh — An ethnopharmacological perception / H. Siddique et al. // Journal of Herbal Medicine. — 2021. — № 29. — P. 420—428.

3. Крепкова Л. В. Современные подходы к доклинической оценке безопасности лекарственных средств растительного происхождения // Биомедицина. — 2011. — 4. — С. 150—152

4. Конакова И. А. Фитотерапия в ветеринарии / И. А. Конакова, Ф. А. Медетханов, Л. А. Афанасьева // Ветеринария сельскохозяйственных животных. — 2022. — № 9. — С. 52—57.

5. Дыбан А. П. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияние их на репродуктивную функцию. — М.: МЗ СССР, 1986. — 21 с.

6. *Хабриев Р. У.* Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — 832 с.

7. *Мионов А. Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Москва: Гриф и К, 2012. — 944 с.

8. *Дыбан А. П.* Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических

веществ // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, 1970. — № 10. — С. 89—100

9. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября. — Санкт-Петербург, 2012. — 48 с.

10. Надлежащая лабораторная практика: Технический кодекс установившейся практики (ТКП) 125—2008 (02040). Утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.03.2008 г. — № 56. — 39 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

И. А. Конакова — кандидат ветеринарных наук, ассистент кафедры биологии, генетики и разведения животных;

Ф. А. Медетханов — доктор биологических наук, заведующий кафедрой фармакологии, токсикологии и радиобиологии, доцент;

А. А. Абрамова — студент 2-го курса факультета ветеринарной медицины;

И. Р. Аюпова — студент 1-го курса факультета ветеринарной медицины.

Статья поступила в редакцию 04.09.2023 г.

ASSESSMENT OF EMBRYOTOXIC AND TERATOGENIC PROPERTIES OF A COMPLEX REMEDY FROM NATURAL RAW MATERIALS

Irina Aleksandrovna Konakova[✉], **Fazil Akberovich Medetkhanov**,
Arina Alekseevna Abramova, **Irina Ruslanovna Ayupova**¹

*Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman,
Kazan, Russia, ira.konakova@yandex.ru*[✉]

Abstract. The relevance of the synthesis of new effective and safe drugs for use in large-scale animal husbandry is beyond doubt. This is due to the fact that a significant percentage of the drugs available in the arsenal of veterinarians are human, as well as many of them have a negative effect on the body of animals and cause difficulty in dosing. Considering this fact, at the Department of Pharmacology, Toxicology and Radiobiology, we have designed a new drug based on natural raw materials for parenteral use. According to the requirements of the Federal Law on the Circulation of Medicines, we studied the safety of the drug at the stage of preclinical studies, which included an assessment of embryotoxic and teratogenic properties during embryogenesis. During the experiment, it has been found that the use of the drug at a dose of 0.5 ml per animal during the first 19 days of gestation does not have a toxic effect on the developing embryo, which is confirmed by the absence of a significant difference between the control and experimental groups in the studied indicators. Administration of the drug within the above periods also does not cause organogenesis disorders and abnormalities in the development of the skeletal system in the prenatal period.

Keywords: preclinical studies, natural raw materials, laboratory rats, embryotoxicity, teratogenicity

Currently, there are many approaches and schemes for the treatment and prevention of various diseases, however, despite the huge range of synthetic drugs on the pharmaceutical market, so-called natural remedies based on natural raw materials, which can be medicinal herbs and beekeeping products, are becoming increasingly popular or various types of mushrooms, the history of which dates back thousands of years, as evidenced by numerous archaeological excavations and manuscripts that have survived to this day [1–3].

The increased interest in products made from natural components is explained, first of all, by the availability of their production and the manufacture of standardized medicines from them, high biological activity, multifaceted effects on the body, as well as comparative cheapness. The mechanism of their action has not been fully studied, however, there is evidence that the activity of natural raw materials is due to the presence of biological active substances in them, so-called metabolites, which can be phenolic compounds, coumarins, essential oils, and alkaloids [4].

Meanwhile, there is an opinion that the effectiveness of such drugs is associated with the similarity of the chemical composition of plant and animal cells, due to which they can be integrated into biochemical processes at the cellular level, providing a milder effect on the body. Despite the large number of advantages of natural raw materials, drugs based on them cannot be considered completely harmless, which is due to the ability of the components to accumulate, to one degree or another, various chemicals that change their activity and degree of toxicity depending on the manufacturing technology. In view of this, all stages of drug production must be strictly regulated and standardized and comply with international GMP quality standards. One of the main stages of proving the safety of drugs is conducting preclinical studies, which includes studying the embryotoxic effect that can manifest itself in an increase in the level of embryonic mortality and the occurrence of various anomalies in fetuses.

Based on the above, the objective of the work was to study the possible embryotoxic and teratogenic prop-

erties of a new product based on natural raw materials at the stage of preclinical research.

MATERIAL AND METHODS

The researches to study the degree of damaging effect of the designed drug on fetal development were carried out in accordance with the Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances and Guidelines for Testing the Teratogenic Activity of Chemical Substances [5—7]. The tests were carried out on 14 mature outbred female white rats weighing 180.0—200.0 g, to which, in accordance with the methodology, mature males were selected in a ratio of 1 : 4. To conduct the experiment, the animals were divided into control and experimental groups, in which males were placed to females at the estrus and proestrus stages at the rate of one male for four females. Microscopic detection of sperm in vaginal smears was taken as the first day of gestation. The designed product was administered by intramuscular injection to females of the experimental group for 19 days, starting from the first day of gestation, at a dose of 0.5 ml per animal. The animals in the control group received water for injection according to a similar scheme.

To assess the degree of damaging effect of the drug under study in the embryonic period of ontogenesis, on day 20 of gestation, females were euthanized with diethyl ether, followed by autopsy to remove the uterus with fetuses, while there were recorded the duration of gestation, the total number of living and dead fetuses, the number of corpora lutea and fetuses per female, the number of implantation sites, the average weight of the fetuses, their craniocaudal size, the diameter and weight of the placenta and chorion. To determine the craniocaudal size, diameter of the chorion and placenta, a ShTs-125 caliper was used, and a PKS0618D electronic scale was used to weigh the fetuses (Fig. 1).

To establish possible anomalies during the period of organogenesis, in particular, the formation of the skeletal system, the Dawson method was used. To do this, the fetuses were fixed in 96 % ethyl alcohol for 10 days, after which they were placed in a 1 % potassium hydroxide solution for 24—48 hours until the tissues cleared and filled with alizarin dye for 3—5 days, which was prepared according to A. P. Dyban (1970) with the addition of a few drops of a 1 % aqueous solution of alizarin red [8]. After staining the bones lilac, the fetuses were washed until the solution was completely clear and deviations in the formation of the skeleton were recorded. At the same time, the general

condition of the skeletal system was visually assessed, the number of bones typical of a given animal species was taken into account, and the length of large bones was measured.



Fig. 1. Measuring the craniocaudal size of the fetus using a caliper

Animal testing was carried out in accordance with the Guidelines of Good Laboratory Practice and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes [9, 10]. The significance of the difference between the indicators of the control and experimental groups was determined using the Student's *t* test at $p < 0.05$.

STUDY RESULTS

During the experimental period, it was established that throughout the entire gestation, the general condition and behavior of the experimental animals remained unchanged, they willingly accepted food and responded adequately to external stimuli.

The results of studies of the extracted embryonic material are presented in Table 1, from which it can be seen that the number of females with live fetuses corresponds to the number of pregnant animals, that is, there are no animals with complete resorption of fetuses in both groups. The number of fetuses per female in the control was 6.14 ± 0.55 , while 6.86 ± 0.64 in the experimental group, which was not statisti-

cally distinguishable. A similar trend was noted between the indicators of the number of oocytes entering the uterus, where the difference among the groups was not significant. The number of implantation sites, characterizing the areas in the uterus where the embryo was attached, on average in the control group was 7.29 ± 0.65 versus 8.0 ± 0.7 in the experiment with $p \geq 0.05$. One of the indicators of the absence of embryotoxic effect of the drug is the mass and diameter of the embryonic membranes, which play a critical role in the formation of the fetus. It was experimentally established that these indicators in the studied extraembryonic membranes are not statistically distinguishable between groups, which indirectly in-

dicates the absence of a negative effect of the drug on fetal development. The toxic effect on the developing embryo can also manifest itself in a delay in general development, manifested by changes in body weight and craniocaudal size.

By weighing it was established that the average weight of fetuses in rats receiving the designed product was 3.9 ± 0.11 grams, and in the control group — 3.81 ± 0.10 with $p \geq 0.05$. Moreover, both values were within the physiological norm for this animal species. Digital indicators characterizing the length of the fetus from the tip of the nose to the base of the tail (tailset) were at the same level in both experimental groups and did not have significant differences.

Table 1

Results of the study of embryonic material using the designed product from days 1 to 19 of gestation (n = 7)

Indicator	Indicator value for groups	
	Control	Experimental
Number of pregnant females	7	7
Number of females with alive fetuses	7	7
Number of fetuses per female, pcs.	6.14 ± 0.55	6.86 ± 0.64
Number of corpora lutea, pcs.	8.57 ± 0.70	9.14 ± 0.55
Number of implantation sites, pcs.	7.29 ± 0.65	8.00 ± 0.70
Average weight of fetus on autopsy, g	3.90 ± 0.11	3.81 ± 0.10
Craniocaudal size of fetus, mm	30.93 ± 1.33	33.79 ± 1.98
Chorion diameter, mm	14.20 ± 1.24	14.57 ± 0.70
Average chorion mass, g	0.64 ± 0.31	0.68 ± 0.27
Placenta diameter, mm	13.26 ± 0.30	13.57 ± 0.38
Average placenta weight, g	1.05 ± 0.10	0.92 ± 0.07

One of the criteria for assessing the toxic effects of newly designed drugs on fetal formation is the establishment of anomalies of the skeletal system. It was noted that the fetuses of both experimental groups had an anatomically correctly formed skeleton, the topography of the bones was not changed, and their number corresponded to the physiological norms for this type of animal. The sizes of the primordia of large bones in both study groups are at the same level and do not have significant differences, as evidenced by the table data (Table 2).

CONCLUSION

In the course of the researches conducted to study the embryotoxic and teratogenic effects at the stage of preclinical trials, it has been established that the product we designed from natural components does not have a negative effect on the development of the fetus during the embryonic period of ontogenesis, which is confirmed by the results obtained. The drug also does not have the ability to cause abnormalities in the structure of the skeletal system, which indicates the absence of teratogenic properties.

Table 2

Average sizes of the skeletal system rudiments upon administration of the designed drug from days 1 to 19 of gestation ($n = 7$)

Type of bone		Bone size, mm	
		Control	Experimental
Femur	right	4.23 ± 0.12	4.64 ± 0.17
	left	4.31 ± 0.20	4.63 ± 0.16
Tibia	right	5.02 ± 0.17	5.09 ± 0.10
	left	5.05 ± 0.10	5.06 ± 0.07
Fibula	right	4.44 ± 0.12	4.34 ± 0.14
	left	4.39 ± 0.11	4.39 ± 0.08
Scapula	right	3.49 ± 0.14	3.47 ± 0.15
	left	3.43 ± 0.09	3.4 ± 0.11
Brachial bone	right	4.29 ± 0.10	4.32 ± 0.07
	left	4.31 ± 0.09	4.35 ± 0.08
Elbow bone	right	4.38 ± 0.08	4.35 ± 0.06
	left	4.37 ± 0.05	4.32 ± 0.07
Radius	right	3.45 ± 0.09	3.41 ± 0.07
	left	3.46 ± 0.06	3.39 ± 0.06

REFERENCES

1. Aminah N. S. Chemical constituents and their biological activities from Taunggyi (Shan state) medicinal plants / N. S. Aminah et al. // *Heliyon*. 2021. — No. 7. — P. 68—73.
2. Siddique H. Medicinal plants used to treat infectious diseases in the central part and a northern district of Bangladesh — An ethnopharmacological perception / H. Siddique et al. // *Journal of Herbal Medicine*. — 2021. — No. 29. — P. 420—428.
3. Krepkova L. V. Modern approaches to preclinical assessment of the safety of herbal medicines // *Biomeditsina (Biomedicine)*. — 2011. — 4. — P. 150—152
4. Konakova I. A. Herbal medication in veterinary medicine / I. A. Konakova, F. A. Medetkhanov, L. A. Afanasyeva // *Veterinariya selskokhozyaystvennykh zhivotnykh (Veterinary medicine of farm animals)*. — 2022. — No. 9. — P. 52—57.
5. Dyban A. P. Guidelines for studying the embryotoxic effects of pharmacological substances and their effect on reproductive function. — M.: USSR Ministry of Health, 1986. — 21 p.
6. Khabriev R. U. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances / 2nd edition, revised and enlarged M.: OJSC “Publishing House ‘Medicine’”, 2005. — 832 p.
7. Mironov A. N. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs / Moscow: Grif i K, 2012. — 944 p.
8. Dyban A. P. Basic methodical approaches to testing the teratogenic activity of chemical substances // *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii (Archives of Anatomy, Histology and Embryology)*, 1970. — No. 10. — P. 89—100
9. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council dtd. September 22. — St. Petersburg, 2012. — 48 p.
10. Good laboratory practice: Technical Code of Practice (TCP) 125—2008 (02040). Approved by Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated March 28, 2008 — No. 56. — 39 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

I. A. Konakova — Candidate of Veterinary Sciences, Assistant at the Department of Biology, Genetics and Animal Breeding;

F. A. Medetkhanov — Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Pharmacology, Toxicology and Radiobiology, Associate Professor;

A. A. Abramova — Second-year student of the Faculty of Veterinary Medicine;

I. R. Ayupova — First-year student of the Faculty of Veterinary Medicine.

The article was submitted 04.09.2023.

Научная статья

УДК 619:001.891.53:636.028

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.17

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО И МЕСТНО-РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ГЕПАТОПРОТЕКТ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Сергей Витальевич Малков, Ольга Юрьевна Опарина,
Александр Сергеевич Красноперов[✉], Наталья Александровна Верещак,
Оксана Григорьевна Томских¹

Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского
отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия, marafon.86@list.ru[✉]

Аннотация. Отечественное животноводство и птицеводство — это наиболее динамично развивающиеся отрасли сельского хозяйства, обеспечивающие население страны биологически полноценными и безопасными продуктами питания. В период импортозамещения на ветеринарный рынок Российской Федерации поступает значительное количество новых препаратов и кормовых добавок, которые в обязательном порядке должны проходить доклинические и клинические исследования безопасности. Однократное внутривенное введение многокомпонентной кормовой добавки Гепатопротект в дозах 2000 мг/кг и 5000 мг/кг не привело к гибели лабораторных животных, что согласно ГОСТ 32644—2014 позволило отнести ее к 5 классу опасности. За весь период наблюдений не отмечали нарушений в поведенческих реакциях и физиологическом состоянии крыс. Исследования испытуемого продукта по определению местно-раздражающего действия проводили путем нанесения его на кожу морских свинок и кроликов. У одной морской свинки выявили незначительные изменения, выразившиеся в появлении едва видимой эритемы, исчезающей в течение 2 часов. Такое кратковременное минимальное раздражающее действие не влияло на упругость и эластичность кожи, а животные сохраняли физиологическое состояние и поведенческие реакции, свойственные здоровым особям. По результатам анализа раздражающего действия на слизистые оболочки органа зрения кроликов и морских свинок (инстиляция 1 % суспензии на конъюнктиву) зарегистрировали незначительную лакримацию, исчезающую через 25 минут и легкую гиперемию конъюнктивы только у двух морских свинок. На протяжении 14 дней опыта у кроликов и морских свинок не отметили раздражающего действия.

Ключевые слова: кормовая добавка, Гепатопротект, острая токсичность, местно-раздражающее действие, лабораторные животные

В современном животноводстве широко распространены заболевания обмена веществ, которые напрямую влияют на продуктивность животных, возможность раскрытия ими генетического потенциала и экономическую эффективность отрасли в целом. Поэтому с целью предотвращения метаболических нарушений активно разрабатываются и внедряются новые кормовые добавки, способствующие нормализации обмена веществ, улучшению продуктивности и уменьшению затрат на корма [1—4]. Однако перед использованием их для продуктивных животных обязательно должны быть проведены доклинические токсикологические исследования.

Токсикологическая оценка предполагает целый ряд исследований, неотъемлемой частью которых является изучение острой токсичности и местно-раздражающего действия на организм экспериментальных животных [5—8], что и послужило целью нашей работы.

Цель исследования — изучить острую токсичность и местно-раздражающее действие кормовой добавки Гепатопротект на лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в период 2021—2022 гг на базе отдела экологии и незаразной па-

© Малков С. В., Опарина О. Ю., Красноперов А. С., Верещак Н. А., Томских О. Г., 2023

тологии животных Уральского научно-исследовательского ветеринарного института — структурного подразделения ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН в рамках Государственного задания в соответствии с Программой ФНИ государственных академий наук по направлению 4.2.1.5 «Разработка технологий прижизненного управления качеством животноводческого сырья для получения высококачественных и безопасных продуктов питания».

Кормовая добавка Гепатопротект — многокомпонентный сыпучий порошок бежевого цвета, содержащий в своем составе: аморфный диоксид кремния; диатомит; дрожжи кормовые; пропиленгликоль; корень цикория; пропионат кальция; кислоту аскорбиновую; хелатные соединения метионина с марганцем, медью и цинком; метионин 84 %; холин хлорид 60 %; шрот подсолнечника. Испытуемая комбинация компонентов предназначена для нормализации обмена веществ, выведения токсичных соединений из организма, защиты и восстановления печени от вредного влияния неконтагиозных факторов, предупреждения кетоацидоза, повышения устойчивости к стрессу, улучшения продуктивности, уменьшения затрат корма, повышения сохранности поголовья животных. Разработчик и производитель: ООО «СХП «Нива», Республика Крым.

Доклинические испытания по определению острой токсичности, осуществляли на клинически здоровых самках нелинейных лабораторных крыс ($n = 6$), половозрелых, небеременных и ранее нерожавших, с предварительным 10-дневным карантинированием, маркированием и формированием групп. Возраст крыс на начало эксперимента был 8—9 недель, живая масса — 180—195 г.

Перед определением острой токсичности лабораторных крыс выдерживали на голодной диете в течение 12 часов со свободным доступом к воде. Затем грызунов взвешивали и на основании массы тела индивидуально для каждого грызуна рассчитывали необходимое количество испытуемой добавки. На начальном этапе трем особям вводили кормовую добавку Гепатопротект в дозе 2000 мг/кг массы тела.

По результатам этого эксперимента следующим трем грызунам дозу увеличили до 5000 мг/кг согласно ГОСТ 32644—2014 [9]. Исследуемый продукт измельчали до состояния порошка и смешивали с дистиллированной водой, доводя объем готовой суспензии до 5 мл, затем ее вводили животным при помощи зонда индивидуально внутрижелудочно. Наблюдения за крысами проводи-

ли в течение первых суток: в первые 30 минут непрерывно, а в последующие 4 часа регистрировали признаки токсичности ежечасно. По окончании этого периода согласно регламенту опыта давали корм. Оценку состояния животных в соответствии с ГОСТ 32644—2014 осуществляли индивидуально ежедневно с выявлением физиологических, поведенческих, болевых и пищевых вариаций в течение 14 дней. Контрольные взвешивания проводили на 7 и 14 дни эксперимента. По окончании исследования острой токсичности лабораторных грызунов подвергли эвтаназии и аутопсии с целью оценки возможных макроскопических изменений внутренних органов.

Далее проводили исследования по выявлению раздражающих свойств испытуемой кормовой добавки. Объектом наблюдений были клинически здоровые небеременные и ранее нерожавшие самки морских свинок ($n = 6$) и кроликов ($n = 6$) с живой массой 350—390 г и 2,4—2,5 кг соответственно. Все лабораторные животные проходили карантинирование в течение 14 дней с последующим взвешиванием на весах CAS SW-10 (Южная Корея), мечением и комплектованием групп.

Экспериментальных животных содержали в одинаковых условиях с контролируемым микроклиматом согласно нормативным санитарно-гигиеническим требованиям и рекомендациям [10—15].

Первый этап исследования включал определение местно-раздражающего действия на кожу трех морских свинок и трех кроликов, которым выбривали по 2 участка шерстного покрова площадью 30 × 30 мм в виде кожного «окошка» с двух сторон туловища. После 24 часов голодной диеты и отсутствия эритемы на коже животных начинали эксперимент. На кожу двух «окошек» правой стороны индивидуально однократно наносили аппликации мази (50 % Гепатопротект + 50 % ланолин) в количестве: морским свинкам — 0,1 г/животное и 1,0 г/животное, кроликам — 0,5 г/животное и 5,0 г/животное. Контролем служили «окна» с противоположной стороны, на которые наносили аналогичное количество мази, содержащей только ланолин. Экспозиция составляла 4 часа. По истечении этого периода удаляли оставшееся количество Гепатопротекта, места нанесения высушивали и регистрировали изменения реакции кожи ежедневно в течение 14 дней в одно и то же время. Учитывали изменения цвета, появление отека и расчесов, толщину кожной складки. Болезненность определяли реакцией животных на пальпацию экспериментального участка.

Результаты оценивали по бальной системе (шкала выраженности местно-раздражающего действия на кожу) (табл. 1).

Второй этап исследования — определение раздражающего действия на слизистые оболочки органа зрения. Для этого трем морским свинкам и трем

кроликам в конъюнктивальный свод правого глаза наносили однократно 2—3 капли 1 % суспензии кормовой добавки, а левая сторона служила контролем, но вместо исследуемого вещества применяли дистиллированную воду температуры тела животного.

Таблица 1

Шкала выраженности местно-раздражающего действия на кожу

Визуальные изменения	Значение
Отсутствие эритемы и отека	0
Едва видимая эритема (бледно-розовая) и появление припухлости	1
Ясно видимая эритема (ярко розовая) и легкий отек (четкие края припухлости)	2
Красная эритема по всему участку и средний отек (припухлость \approx 1 мм)	3
Тяжелая эритема, инфильтрация и сильный отек (припухлость $>$ 1 мм)	4
Тяжелая эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления, наличие струпа	5

Визуальную реакцию раздражения конъюнктивы оценивали ежедневно в течение 6 часов после инстилляций по балльной шкале (табл. 2). Далее ежедневно на протяжении 14 дней учитывали общее состояние животных, наличие эритемы конъюнктивы,

изменения слезного протока и склеры, присутствие слезотечения и количество выделений, возможное появление кератита и блефарита, светобоязнь. Обращали внимание на длительность и выраженность изменений.

Таблица 2

Балльная шкала оценки реакции конъюнктивы на раздражение

Баллы	Реакция	Эффект
0	Нет	Отсутствует
2	Слабая	Слабый
4	Выраженная	Умеренный
6	Слезотечение	Слабо выраженный
8	Наличие выделений	Выраженный
10	Отек век	Сильно выраженный

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании анализа литературных данных было установлено, что входящие в состав компонентов кормовой добавки Гепатопротект вещества, не оказывают негативного влияния на организм животных. Это послужило основанием для выбора на начальном этапе эксперимента дозировки 2000 мг/кг массы тела.

При определении острой токсичности в течение 24 часов после введения кормовой добавки Гепатопротект наблюдали 100 % сохранность крыс, отсутствие изменений в потреблении корма и воды, частоты и глубины дыхательных движений, цвета видимых слизистых оболочек, координации движений и тонуса скелетной мускулатуры. Угнетенного состояния не отмечали. Цвет

фекалий и консистенция соответствовали норме. Последующие 14 суток все крысы были живы, активны и отрицательной динамики в их физиологическом состоянии не наблюдали.

Живая масса грызунов на 7 и 14 дни эксперимента показала увеличение средних значений на 3,5 % и 7,3 % по отношению к фоновым показателям. Анализ результатов аутопсии не выявил патологических изменений в цвете, консистенции и размере внутренних органов.

Отсутствие гибели животных и признаков токсичности на начальном этапе эксперимента послужило основанием для испытания верхнего уровня дозы — 5000 мг/кг массы тела. Исследования проводили в аналогичные временные периоды с регистрацией изменений.

Внутрижелудочное введение испытуемой кормовой добавки в дозе 5000 мг/кг также не выявило негативного влияния на организм лабораторных крыс. Сохранность составила 100 %. Отклонений в физиологическом состоянии, пищевых, поведенческих и болевых реакциях грызунов не было зарегистрировано.

Увеличение живой массы на 7 и 14 дни наблюдений составило 3,4 % и 6,2 % по отношению к первоначальным данным. Видимых патологических изменений внутренних органов после аутопсии не отмечали. Таким образом, применение кормовой добавки в дозах 2000 мг/кг и 5000 мг/кг не привело к гибели лабораторных животных, что согласно ГОСТ 32644—2014 позволило отнести ее к 5 классу опасности.

При исследовании местно-раздражающего действия проводили запланированные манипуляции с лабораторными животными согласно дизайну опыта.

После воздействия кормовой добавки на кожу у кроликов не зарегистрировали признаков воспаления или раздражения. Кожа оставалась эластичной, подвижной, безболезненной и волосяной покров начинал восстанавливаться со вторых суток. Животные весь период наблюдений оставались активными и сохраняли физиологические и пищевые реакции, свойственные здоровым особям.

Незначительные изменения выявили после аппликации тестируемой кормовой добавки на кожу морских свинок, как наиболее чувствительных объектов лабораторных исследований. У одного животного при нанесении добавки в составе мази в дозе 1,0 г/животное в первые сутки отмечали едва видимую эритему, которая исчезла в течение 2-х часов, т. е. имело место минимальное раздражаю-

щее действие, не повлиявшее на упругость и эластичность кожи. Возможно, данная реакция связана с индивидуальной чувствительностью конкретной особи, так как отклонений в физиологическом состоянии и поведенческих реакциях не зарегистрировано.

По результатам первого этапа исследований было установлено, что после однократной накожной 4-часовой экспозиции кормовой добавки в составе мази у обоих видов животных в течение 14 дней не выявлено местно-раздражающего эффекта и видимых изменений.

При изучении раздражающего действия кормовой добавки на слизистые оболочки глаз морских свинок и кроликов существенных негативных изменений не отмечено.

Однако после инстилляции 1 % суспензии у двух морских свинок зарегистрировали незначительную лакримацию, исчезающую через 25 минут. В течение 1 часа у этих особей также наблюдали легкую гиперемию конъюнктивы.

На основании полученных результатов второго этапа исследований, продолжавшегося 14 дней, было установлено, что нанесение на конъюнктиву суспензии кормовой добавки Гепатопротект не оказывало раздражающего действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За время проведения исследований не наблюдали клинических признаков интоксикации у лабораторных крыс после внутрижелудочного введения кормовой добавки Гепатопротект в дозе 2000 мг/кг и 5000 мг/кг. Изменений внешнего вида, пищевых и поведенческих реакций, падежа животных не отмечали. По окончании опытного периода макроскопических патологических изменений внутренних органов не регистрировали.

Проведенные исследования кормовой добавки Гепатопротект не выявили негативного влияния на кожу лабораторных животных, слизистые оболочки органов зрения и их функциональное состояние. Установлено, что аппликации тестируемой кормовой добавки не обладают местно-раздражающим эффектом на кожу морских свинок и кроликов, а применение в форме 1 % суспензии не вызывает отрицательного воздействия на слизистые оболочки глаз.

Таким образом, кормовая добавка Гепатопротект согласно ГОСТ 32644—2014 относится к 5 классу опасности и не обладает местно-раздражающим действием. В связи с этим, она может быть рекомендована для дальнейших клинических испытаний.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Романова Ю. А., Дежаткин И. М., Дежаткина С. В., Ахметова В. В. Повышение качества молока путем скармливания активированных кремнийсодержащих добавок // Материалы Международной научно-практической конференции обучающихся, аспирантов и молодых ученых: Проблемы и пути развития ветеринарной и зоотехнической наук. Саратов. 2021. С. 762—768.
2. Соколова О. В. Эффективность пробиотической добавки «Бацелл» в технологическом цикле выращивания ремонтного молодняка крупного рогатого скота // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015. № 2. С. 343—346.
3. Улитко В. Е., Лифанова С. П., Ерисанова О. Е. Повышение стрессоустойчивости коров, их продуктивности и пищевой ценности молока при использовании в рационах антиоксидантных добавок // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2019. № 2(46). С. 197—200.
4. Шкуратова И. А., Исаева А. Г., Соколова О. В., Белоусов А. И., Пьянзина И. П. Профилактика эффективности микроэлементов в мицеллярной форме при нарушении обмена веществ у телят // В сборнике: Экология человека и медико-биологическая безопасность населения. Сборник материалов IX-ого Международного симпозиума. 2014. С. 145—148.
5. Верещак Н. А., Стариков Н. М., Вершинина И. Ю., Опарина О. Ю. Изучение отдаленных действий добавки кормовой В-сет // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015. № 2. С. 275—277.
6. Верещак Н. А., Стариков Н. М., Вершинина И. Ю., Опарина О. Ю. Фармако-токсикологические исследования кормовой добавки Лакто-драйв на лабораторных животных // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015. № 2. С. 117—119.
7. Кучинский М. П., Кучинская Г. М. Изучение местно-раздражающих свойств и субхронической токсичности тетраминерала на лабораторных животных // Ученые записки УО ВГАВМ. 2007. Том 43. Выпуск 1. С. 139—142.
8. Шкуратова И. А., Верещак Н. А., Белоусов А. И., Соколова О. В., Стариков Н. М. Определение острой и хронической токсичности препарата «Колихинол» для ветеринарного применения // В сборнике: Актуальные вопросы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации. Материалы IV Съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов России. 2013. С. 646—649.
9. ГОСТ 32644—2014 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. М.: Стандартинформ, 2015. 15 с.
10. ГОСТ 33215—2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. М.: Стандартинформ, 2019. 20 с.
11. ГОСТ 33216—2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. М.: Стандартинформ, 2019. 15 с.
12. ГОСТ 34566—2019 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. М.: Стандартинформ, 2019. 14 с.
13. ГОСТ Р 51232—98 Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества. М.: Стандартинформ, 2005. 21 с.
14. Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений. РД-АПК 3.10.07.02—09. М.: 2009. 29 с.
15. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: часть первая / под ред. А. Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- С. В. Малков** — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
О. Ю. Опарина — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
А. С. Красноперов — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;
Н. А. Верещак — доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник;
О. Г. Томских — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 29.09.2023 г.

STUDY OF THE TOXIC AND LOCALLY IRRITATING EFFECT OF THE FEED ADDITIVE HEPATOPROTECT ON LABORATORY ANIMALS

Sergey Vitalyevich Malkov, Olga Yuryevna Oparina, Aleksandr Sergeevich Krasnoperov[✉],
Natalya Aleksandrovna Vereshchak, Oksana Grigoryevna Tomskikh¹

*Ural Federal Agrarian Research Center of the Ural Branch of the Russian
Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia, marafon.86@list.ru[✉]*

Abstract. Domestic livestock and poultry farming are the most dynamically developing sectors of agriculture, providing the country's population with biologically complete and safe food products. During the period of import substitution, a significant number of new drugs and feed additives enter the veterinary market of the Russian Federation, which must undergo preclinical and clinical safety studies. A single intragastric administration of the multicomponent feed additive Hepatoprotect at doses of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg did not lead to the death of laboratory animals, which, according to GOST 32644—2014, allowed it to be classified as hazard class 5. During the entire observation period, no disturbances were noted in the behavioral reactions and physiological state of the rats. The studies of the test product to determine the local irritant effect were carried out by applying it to the skin of guinea pigs and rabbits. One guinea pig showed minor changes, expressed in the appearance of barely visible erythema, disappearing within 2 hours. Such a short-term minimal irritant effect did not affect the firmness and elasticity of the skin, and the animals retained the physiological state and behavioral reactions typical of healthy individuals. Based on the results of the analysis of the irritant effect on the mucous membranes of the organ of vision of rabbits and guinea pigs (instillation of a 1 % suspension onto the conjunctiva), a slight lacrimation was recorded, disappearing in 25 minutes, and a slight hyperemia of the conjunctiva in only two guinea pigs. During 14 days of the experiment, no irritation was noted in rabbits and guinea pigs.

Keywords: feed additive, Hepatoprotect, acute toxicity, local irritant effect, laboratory animals

In modern livestock farming, metabolic diseases are widespread, which directly affect the productivity of animals, the ability of them to reveal their genetic potential and the economic efficiency of the industry as a whole. Therefore, in order to prevent metabolic disorders, new feed additives are being actively designed and introduced to help normalize metabolism, improve productivity and reduce feed costs [1—4]. However, before using them in productive (food producing) animals, preclinical toxicological studies must be carried out.

A toxicological assessment involves a number of studies, an integral part of which is the study of acute toxicity and local irritant effects on the body of the experimental animals [5—8], which was the objective of our work.

The objective of the research is to study the acute toxicity and local irritant effect of the feed additive Hepatoprotect on laboratory animals.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out during the period of 2021—2022 on the basis of the Department of Ecology and Non-Contagious Pathology of Animals of the Ural Research Veterinary Institute — a structural unit of FSBSI Ural Federal Agrarian Research Center of the RAS, within the framework of the State assignment in accordance with the FRI Program of State Academies of Sciences 4.2.1.5 Development of Technologies for Intravital Quality Management of Livestock Raw Materials to Obtain High-Quality and Safe Food Products.

The feed additive Hepatoprotect is a multicomponent free-flowing beige powder containing amorphous silicon dioxide, diatomite, feed yeast, propylene glycol, chicory root, calcium propionate, ascorbic acid, chelate compounds of methionine with manganese, copper and zinc, methionine 84 %, choline chloride 60 %, sunflower meal.

The tested combination of components is intended to normalize metabolism, remove toxic compounds from the body, protect and restore the liver from the harmful effects of non-contagious factors, prevent ketoacidosis, increase resistance to stress, improve productivity, reduce feed costs, and increase the livability of livestock. Developer and manufacturer: SKhP Niva LLC, Republic of Crimea.

Preclinical tests to determine acute toxicity were carried out on clinically healthy female nonlinear laboratory rats ($n = 6$), sexually mature, non-pregnant, nulliparous, with a preliminary 10-day quarantine, marking and group formation. The age of the rats at the beginning of the experiment was 8–9 weeks, live weight — 180–195 g.

Before determining acute toxicity, laboratory rats were kept on a starvation diet for 12 hours with free access to water. Then the rodents were weighed and, based on body weight, the required amount of the test additive was calculated individually for each rodent. At the initial stage, three animals were administered the feed additive Hepatoprotect at a dose of 2000 mg/kg of body weight. Based on the results of this experiment, the dose for the next three rodents was increased to 5000 mg/kg according to GOST 32644—2014 [9].

The test product was ground to a powder and mixed with distilled water, making the volume of the finished suspension up to 5 ml, then it was administered to the animals using a probe individually intragastrically. The observations of the rats were carried out during the first day: in the first 30 minutes continuously, and in the next 4 hours, the signs of toxicity were recorded hourly. At the end of this period, food was given according to the experimental regulations. The assessment of the animals' condition in accordance with GOST 32644—2014 was carried out individually every day, identifying physiological, behavioral, pain and nutritional variations for 14 days. Control weighing was carried out on days 7 and 14 of the experiment. At the end of the acute toxicity study, labo-

ratory rodents were euthanized and necropsied to assess possible macroscopic changes in internal organs.

Then, the studies were carried out to identify the irritating properties of the tested feed additive. The objects of observation were clinically healthy non-pregnant and previously nulliparous female guinea pigs ($n = 6$) and rabbits ($n = 6$) with a live weight of 350–390 g and 2.4–2.5 kg, respectively. All laboratory animals were quarantined for 14 days, followed by weighing on a CAS SW-10 scale (South Korea), tagging and forming of the groups.

The experimental animals were kept in the same conditions with a controlled microclimate in accordance with regulatory sanitary and hygienic requirements and recommendations [10–15].

The first stage of the study included determining the local irritant effect on the skin of three guinea pigs and three rabbits, which were shaved in two areas of fur with an area of 30 × 30 mm in the form of a skin “window” on both sides of the body. The experiment began 24 hours after a starving diet and the absence of erythema on the skin of the animals. Applications of the ointment (50 % Hepatoprotect + 50 % lanolin) were individually applied to the skin of two “windows” on the right side in the following quantities: for guinea pigs — 0.1 g/animal and 1.0 g/animal, for rabbits — 0.5 g/animal and 5.0 g/animal. The “windows” on the opposite side served as the control, onto which a similar amount of ointment containing only lanolin was applied. The exposure lasted 4 hours. After this period, the remaining amount of Hepatoprotect was removed, the application sites were dried, and changes in skin reaction were recorded daily for 14 days at the same time. Changes in color, the appearance of swelling and scratching, and the thickness of the skin fold were taken into account. Pain was determined by the reaction of animals to palpation of the experimental area.

The results were assessed using a point system (scale of severity of local irritant effect on the skin) (Table 1).

Table 1

Severity scale of the local irritant effect on the skin

Visual changes	Value
1	2
Absence of erythema and edema	0
Barely visible erythema (pale pink) and swelling	1
Clearly visible erythema (bright pink) and mild edema (clear edges of swelling)	2

Table 1 (the end)

1	2
Red erythema over the entire area and moderate edema (swelling \approx 1 mm)	3
Severe erythema, infiltration and severe edema (swelling $>$ 1 mm)	4
Severe erythema, severe infiltration, focal ulceration, eschar	5

The second stage of the study is to determine the irritant effect on the mucous membranes of the organ of vision. For this, three guinea pigs and three rabbits were treated with 2—3 drops of a 1 % suspension of feed additive once in the conjunctival fornix of the right eye, and the left side served as the control, but instead of the test substance, distilled water with the animal's body temperature was used.

The visual reaction of conjunctival irritation was assessed hourly for 6 hours after instillation using a point scale (Table 2). Then, every day for 14 days, the general condition of the animals, the presence of conjunctival erythema, changes in the lacrimal duct and

sclera, the presence of lacrimation and the amount of discharge, the possible appearance of keratitis and blepharitis, and photophobia were taken into account. There was paid attention to the duration and severity of changes.

STUDY RESULTS

Based on an analysis of the literary data, it has been found that the substances included in the components of the feed additive Hepatoprotect do not have a negative effect on the animal's body. This served as the basis for choosing a dosage of 2000 mg/kg of body weight at the initial stage of the experiment.

Table 2

Point scale for assessing the reaction of the conjunctiva to irritation

Point	Reaction	Effect
0	No	Absent
2	Weak	Weak
4	Expressed	Moderate
6	Lacrimation	Weakly expressed
8	Presence of discharge	Expressed
10	Swelling of the eyelids	Strongly expressed

When determining acute toxicity within 24 hours after administration of the feed additive Hepatoprotect, 100 % livability of rats was observed, no changes in food and water consumption, frequency and depth of respiratory movements, color of visible mucous membranes, coordination of movements and tone of skeletal muscles. No depressed state was noted. The color of feces and consistency were normal. For the next 14 days, all rats were alive, active, and no negative dynamics was observed in their physiological state.

The live weight of rodents on days 7 and 14 of the experiment showed an increase in average values by 3.5 % and 7.3 % relative to the baseline indicators. The

analysis of the autopsy results did not reveal pathological changes in the color, consistency and size of the internal organs.

The absence of animal death and signs of toxicity at the initial stage of the experiment served as the basis for testing the upper dose level — 5000 mg/kg of body weight. The studies were carried out in similar time periods with the registration of changes.

Intragastric administration of the tested feed additive at a dose of 5000 mg/kg also did not reveal a negative effect on the body of laboratory rats. Livability was 100 %. No deviations in the physiological state, nutritional, behavioral and pain reactions of rodents

were recorded. The increase in live weight on days 7 and 14 of observations was 3.4 % and 6.2 %, compared to the initial data. No visible pathological changes in the internal organs were noted after the autopsy. Thus, the use of the feed additive at doses of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg did not lead to the death of laboratory animals, which according to GOST 32644—2014 allowed it to be classified as hazard class 5.

When studying the local irritant effect, planned manipulations were carried out with the laboratory animals according to the design of the experiment.

After exposure of the feed additive on the skin of the rabbits, no signs of inflammation or irritation were recorded. The skin remained elastic, mobile, painless and the hair began to recover from the second day. The animals remained active throughout the observation period and retained physiological and nutritional reactions typical of healthy individuals.

Minor changes were revealed after the application of the tested feed additive to the skin of guinea pigs, as the most sensitive objects of laboratory research. In one animal, when the additive was applied as part of the ointment at a dose of 1.0 g/animal, barely visible erythema was noted on the first day, which disappeared within 2 hours, i. e. there was a minimal irritant effect that did not affect the firmness and elasticity of the skin. Perhaps this reaction is associated with the individual sensitivity of a particular individual, since no deviations in the physiological state and behavioral reactions were registered.

Based on the results of the first stage of the research, it was found that after a single cutaneous 4-hour exposure to the feed additive in the ointment, no local irritant effect or visible changes were detected in both types of animals for 14 days.

When studying the irritant effect of the feed additive on the mucous membranes of the eyes of guinea pigs and rabbits, no significant negative changes were noted. However, after instillation of a 1 % suspension, slight lacrimation was recorded in two guinea pigs, disappearing in 25 minutes. Within 1 hour, mild conjunctival hyperemia was also observed in these individuals.

Based on the results of the second stage of the research, which lasted 14 days, it was found that applying a suspension of the feed additive Hepatoprotect to the conjunctiva did not have an irritating effect.

CONCLUSION

During the research, no clinical signs of intoxication were observed in laboratory rats after intragastric administration of the feed additive Hepatoprotect at a dose of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg. No changes in

appearance, food and behavioral reactions or death of animals were noted. At the end of the experimental period, macroscopic pathological changes in internal organs were not recorded.

The studies of the feed additive Hepatoprotect did not reveal any negative effects on the skin of laboratory animals, the mucous membranes of the organs of vision and their functional state. It has been found that applications of the tested feed additive do not have a local irritating effect on the skin of guinea pigs and rabbits, and use in the form of a 1 % suspension does not cause a negative effect on the mucous membranes of the eyes.

Thus, the feed additive Hepatoprotect, according to GOST 32644—2014, belongs to hazard class 5 and does not have a local irritant effect. In this regard, it can be recommended for further clinical trials.

REFERENCES

1. Romanova Yu. A., Dezhatkina I. M., Dezhatkina S. V., Akhmetova V. V. Improving the quality of milk by feeding activated silicon-containing additives // Materials of the International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduate Students and Young Scientists: Problems and ways of development of veterinary and zootechnical sciences. Saratov. 2021, P. 762—768.
2. Sokolova O. V. Efficiency of the probiotic additive “Batsell” in the technological cycle of rearing replacement young cattle // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine). 2015. No. 2. P. 343—346.
3. Ulitko V. E., Lifanova S. P., Erisanova O. E. Increasing the stress resistance of cows, their productivity and nutritional value of milk when using antioxidant additives in diets // Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii (Bulletin of Ulyanovsk State Agricultural Academy). 2019. No. 2(46). pp. 197—200.
4. Shkuratova I. A., Isaeva A. G., Sokolova O. V., Belousov A. I., Pyanzina I. P. Prevention of the effectiveness of microelements in micellar form for metabolic disorders in calves // In the collection of papers: Human Ecology and medical and biological safety of the population. Collection of the materials of the IX International Symposium. 2014. P. 145—148.
5. Vereshchak N. A., Starikov N. M., Verzhinina I. Yu., Oparina O. Yu. Study of long-term effects of feed additive B-set // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine). 2015. No. 2. P. 275—277.
6. Vereshchak N. A., Starikov N. M., Verzhinina I. Yu., Oparina O. Yu. Pharmacotoxicological studies of the feed additive Lacto-drive on laboratory animals // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine). 2015. No. 2. P. 117—119.

7. *Kuchinskiy M. P., Kuchinskaya G. M.* Study of local irritant properties and subchronic toxicity of tetramineral in laboratory animals // *Uchenye zapiski UO VGAVM (Transactions of EI VSAVM)*. 2007. Vol. 43. Issue 1. P. 139—142.

8. *Shkuratova I. A., Vereshchak N. A., Belousov A. I., Sokolova O. V., Starikov N. M.* Determination of acute and chronic toxicity of the drug “Colichinol” for veterinary use // In the collection of papers: Current issues of veterinary pharmacology, toxicology and pharmacy. Materials of the IV Congress of Veterinary Pharmacologists and Toxicologists of Russia. 2013. P. 646—649.

9. GOST 32644—2014 Test methods for the effects of chemical products on the human body. M.: Standartinform, 2015. 15 p.

10. GOST 33215—2014 Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for equipment of prem-

ises and organization of procedures. M.: Standartinform, 2019. 20 p.

11. GOST 33216—2014 Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for keeping and caring for laboratory rodents and rabbits. M.: Standartinform, 2019. 15 p.

12. GOST 34566—2019 Complete feed for laboratory animals. Technical conditions. M.: Standartinform, 2019. 14 p.

13. GOST R51232—98 Drinking water. General requirements for organization and methods of quality control. M.: Standartinform, 2005. 21 p.

14. Guidelines for keeping laboratory animals in vivariums of research institutes and educational institutions. RD-APK 3.10.07.02—09. M.: 2009. 29 p.

15. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs: part one / ed. by A. N. Mironov. M.: Grif i K, 2012. 944 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

S. V. Malkov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;

O. Yu. Oparina — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;

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

N. A. Vereshchak — Doctor of Veterinary Sciences, Principal Scientific Associate;

O. G. Tomskikh — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate.

The article was submitted 29.09.2023.

Научная статья

УДК 619:616.12.07

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.27

РЕФЕРЕНСНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ БАЗОВЫХ ЭХОКАРДИОГРАФИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ У ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ДОМАШНИХ КОШЕК

Павел Анатольевич Руденко[✉], Жубран Ахмед Гандур, Владимир Иванович Луцай,
Андрей Анатольевич Руденко¹

Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Россия, vetrudek@yandex.ru[✉]

Аннотация. Методом расчета 95 % доверительного интервала определены референсные значения эхокардиографических показателей у физиологически здоровых домашних кошек. Работу проводили в ветеринарной клинике «Вега» (г. Москва) и на кафедре ветеринарной медицины «РосБиоТех». В исследование вошли 189 кошек молодого возраста от 6 месяцев до 2 лет, разных пород и массой тела (2,2—9,6 кг). Для практической ветеринарной медицины рекомендованы следующие референсные интервалы по основным эхокардиографическим показателям: диаметр аорты — 8,66—9,02 мм; максимальная скорость потока крови на аорте — 0,87—0,97 м/с; градиент давления в аорте — 3,03—3,77 мм. рт. ст.; толщина межжелудочковой перегородки в диастолу — 4,11—4,30 мм; толщина задней стенки левого желудочка в диастолу — 4,17—4,35 мм; конечный диастолический размер левого желудочка — 13,98—14,62 мм; конечный систолический размер левого желудочка — 6,01—6,54 мм; фракция укорочения — 55,29—58,04 %; диаметр легочной артерии — 6,23—6,79 мм; максимальная скорость потока на легочной артерии — 0,87—0,98 м/с; градиент давления в легочной артерии — 3,01—3,84 мм. рт. ст., диаметр клапана легочной артерии на уровне фиброзного кольца — 7,32—7,90 мм; толщина стенки правого желудочка — 2,24—2,47 мм; полость правого желудочка в диастолу — 3,84—4,38 мм; систолическая экскурсия в фиброзного кольца трехстворчатого клапана — 8,50—9,35 мм; диаметр левого предсердия — 11,20—11,63 мм; диаметр правого предсердия — 8,45—9,18 мм; легочная вена — 2,81—3,00 мм; правая ветвь легочной артерии — 3,22—3,47 мм; соотношение левой вены к правой ветви легочной артерии — 0,86—0,89 ед.; соотношение диаметр левого предсердия к диаметру аорты — 1,27—1,30 ед.

Ключевые слова: кошки, норма, эхокардиография, М-режим, В-режим, импульсная доплерография

Эхокардиография является важным методом диагностики различных заболеваний сердечно-сосудистой системы у домашних животных [1, 2]. Эхокардиографические исследования в последние годы вызывают все больший интерес у ветеринарных специалистов, так как изменения структуры и функции сердечно-сосудистой системы происходит на ранних стадиях недостаточности миокарда, когда еще клинические симптомы не проявляются [3, 4]. С помощью эхокардиографии можно с высокой эффективностью выявлять параметры ремоделирования миокарда, то есть дилатацию предсердий, эксцентрическую или концентрическую гипертрофию левого и правого желудочка, оценивать размер и состояние магистральных сосудов, выявлять венозный застой в легочных венах и в каудальной полой вене как маркеры декомпенсированной

левожелудочковой и правожелудочковой сердечной недостаточности [5—7].

Особенно ценно использовать эхокардиографию при проведении предоперационной скрининговой диагностики животных на предмет наличия скрытых кардиальных патологий, которые могут значительно повышать риск запланированных оперативных вмешательств [8—11].

Эхокардиография показана при оценке состояния клапанного аппарата сердца, выявлении наличия недостаточности и стеноза клапанов, сращении клапанов и др. [6, 12].

С помощью эхокардиографии можно также изучать диастолическую функцию правого и левого желудочка по характеристикам трансмитрального и транстрикуспидального кровотока или используя другие параметры и подходы функциональ-

ной диагностики патологий сердечно-сосудистой системы [13—15].

С помощью эхокардиографии можно надежно выявлять снижение контрактильности или систолическую дисфункцию левого или правого желудочка, что играет важную роль в клинической практике для оценки состояния сердечно-сосудистой системы [16, 17]. С помощью эхокардиографии можно оценивать скоростные потоки в выносящем тракте левого и правого желудочка, то есть скорость на аорте или легочной артерии, что также может играть важное значение при диагностике заболеваний сердечно-сосудистой системы [18—20]. Таким образом, изучение структурно-функциональных изменений сердечно-сосудистой системы, а также выявление референсных интервалов основных эхокардиографических параметров у здоровых домашних кошек является актуальным для практической ветеринарии.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы является оценка и расчет референсных интервалов основных эхокардиографических показателей у физиологически здоровых домашних кошек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Научная работа проводилась в ветеринарной клинике «Вега» (г. Москва) и на кафедре ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ», в период с 1 марта по 10 июля 2023 г. Домашние кошки поступали в клинику с целью проведения эхокардиографического обследования в рамках проведения предоперационного кардиологического скрининга. В исследование вошли кошки молодого возраста от 6 месяцев до 2 лет, разных пород и массой тела (2,2—9,6 кг).

Эхокардиографическое обследование проводили с помощью ветеринарного УЗИ-сканера *Mindray DC-60* (Китай) [4]. Оценивали толщину межжелудочковой перегородки в диастолу (ТМЖПд) и толщину задней стенки левого желудочка в диастолу (ТЗСЛЖд) в М-режиме [7]. Также рассчитывали конечный диастолический и систолический размер желудочка (КДР и КСР) в М-режиме [7, 8]. Для этого выводили правую парастернальную проекцию по короткой оси левого желудочка. Фракцию укорочения (ФК) выражали в процентах и рассчитывали по формуле $(\text{КДР} - \text{КСР}) \times 100 / \text{КДР}$ [10]. Диаметр полости правого желудочка и толщину свободной стенки правого желудочка определяли в М-режиме из правой парастернальной проекции по длинной оси левого желудочка [11]. Измерение

диаметра левого предсердия и корня аорты проводили в В-режиме на уровне основания сердца по короткой оси сердца [6].

Измерение максимального размера легочной вены (ЛВ) и правой ветви легочной артерии (ПВЛА) проводили из правой парастернальной проекции по длинной оси левого желудочка в М-режиме сканирования [11]. Вместе с этим, рассчитывали коэффициенты ЛВ/ПВЛА и ЛП/АО [12]. Скорость потока на легочной артерии оценивали в импульсно-волновом режиме в правой парастернальной проекции на уровне основания сердца. При этом контрольный объем располагали по центру легочной артерии, стараясь расположить ось сканирования максимально параллельно потоку крови [10].

Оценивали скорость потока крови на аорте из верхушечной проекции с левой стороны грудной клетки. Контрольный объем располагали по центру аорты параллельно потоку крови. Градиент давления в аорте и легочной артерии рассчитывали по стандартной формуле $4V^2$ [11, 17]. Характеристики клапана легочной артерии оценивали в правой парастернальной проекции на уровне аортального клапана [8, 19].

Статистическую обработку проводили в программе *Statistica 7,0* (США) [4, 14], используя такие биометрические показатели, как M — среднее арифметическое значение, $CI-95\%$ — минимальный 95 % доверительный интервал, $CI + 95\%$ — максимальный 95 % доверительный интервал, лимиты — Min (минимум) и Max (максимум), $Std.Dev.$ (*Standard Deviation*) — стандартное отклонение и $Std.Err.$ (*Standard Error*) — стандартная ошибка. Референсные интервалы эхокардиографических показателей рассчитывали методом определения 95 % CI (*Confidence Interval*) [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные эхокардиографические параметры у физиологически здоровых кошек приведены в таблице.

Степень нарушений эффективности легочного кровотока и насосной функции левых камер сердца можно оценить по соотношению левого предсердия к аорте (ЛП/АО). Указанный коэффициент может значительно снизить влияние массы тела домашних кошек на эхокардиографические показатели, так как используется относительно фиксированный диаметр аорты для оценки степени объемной перегрузки левого предсердия.

Таблица

Базовые эхокардиографические параметры у физиологически здоровых домашних кошек (n = 189)

Параметр	Биометрические показатели						
	M	CI -95 %	CI +95 %	Min	Max	Std. Dev.	Std. Err.
Аорта, мм	8,84	8,66	9,02	6,10	13,30	1,26	0,09
Скорость потока на аорте, м/с	0,92	0,87	0,97	0,60	1,60	0,24	0,02
Градиент давления на аорте, мм. рт. ст.	3,40	3,03	3,77	1,38	10,43	1,42	0,18
ТМЖПд, мм	4,21	4,11	4,30	2,60	5,90	0,66	0,05
ТЗСЛЖд, мм	4,26	4,17	4,35	2,60	5,90	0,62	0,04
КДР, мм	14,30	13,98	14,62	9,10	19,80	2,23	0,16
КСР, мм	6,27	6,01	6,54	1,20	10,90	1,84	0,13
ФУ, %	56,66	55,29	58,04	30,95	90,30	9,54	0,70
Легочная артерия, мм	6,51	6,23	6,79	3,00	11,30	1,74	0,14
Скорость потока на легочной артерии, м/сек	0,93	0,87	0,98	0,50	1,80	0,23	0,03
Градиент давления на легочной артерии, мм.рт.ст.	3,43	3,01	3,84	1,72	9,12	1,55	0,20
Клапан легочной артерии, мм	7,61	7,32	7,90	4,20	11,90	1,21	0,14
Толщина стенки правого желудочка, мм	2,35	2,24	2,47	1,50	3,30	0,44	0,06
ПЖд, мм	4,11	3,84	4,38	2,20	7,40	1,10	0,14
TAPSE мм	8,93	8,50	9,35	4,50	11,50	1,52	0,21
Диаметр левого предсердия, мм	11,41	11,20	11,63	7,90	17,10	1,52	0,11
Диаметр правого предсердия, мм	8,82	8,45	9,18	6,50	13,30	1,39	0,18
ЛВ, мм	2,90	2,81	3,00	1,90	6,00	0,63	0,05
ПВЛА, мм	3,35	3,22	3,47	2,10	8,00	0,82	0,06
ЛВ/ПВЛА, ед.	0,87	0,86	0,89	0,62	1,09	0,10	0,01
ЛП/АО, ед.	1,29	1,27	1,30	1,02	1,49	0,11	0,01

Примечание: ТМЖПд — толщина межжелудочковой перегородки в диастолу, ТЗСЛЖд — толщина задней стенки левого желудочка в диастолу, КДР — конечный диастолический размер, КСР — конечный систолический размер, ФУ — фракция укорочения, ПЖд — размер полости правого желудочка в конце диастолы, TAPSE — систолическая экскурсия в фиброзного кольца трехстворчатого клапана, ЛВ — легочная вена, ПВЛА — правая ветвь легочной артерии.

Существует положительное влияние массы тела на размеры АО и ЛП у кошек и отношение размера левого предсердия к размеру корня аорты может быть использовано в качестве показателя степени выраженности дилатации левого пред-

сердия. В нашем исследовании среднее значения данного показателя составило $1,29 \pm 0,01$ ед. (95 % CI 1,27—1,30).

Таким образом, измерение характеристик аорты является ключевым моментом для оценки дру-

гих показателей эхокардиографического скрининга. В популяции физиологически здоровых кошек средний размер аорты составил $8,84 \pm 0,09$ мм (95 % CI 8,66—9,02).

Также стоит отметить, что измерение левого предсердия (ЛП) дает возможность оценить наличие и степень дилатации левого предсердия, что может служить признаком застойной сердечной недостаточности. В наших исследованиях показатель ЛП составил в среднем $11,41 \pm 0,11$ мм (95 % CI 11,20—11,63).

Толщина межжелудочковой перегородки в диастолу (ТМЖПд) и толщина задней стенки левого желудочка в диастолу (ТЗСЛЖд) представляет собой важнейшие показатели для диагностики гипертрофической кардиомиопатии у домашних кошек [5]. Исходя из данных, представленных в таблице, ТМЖПд у физиологически здоровых кошек составила в среднем $4,21 \pm 0,05$ мм (95 % CI 4,11—4,30), а ТЗСЛЖд — $4,26 \pm 0,04$ мм (95 % CI 4,17—4,35).

Диастолический размер левого желудочка используется для определения наличия или отсутствия перегрузки объемом левого желудочка. Это измерение отражает максимальное наполнение желудочков в фазу диастолы. Систолические размеры являются отражением сократительной функции сердца и не должны использоваться для оценки наличия или отсутствия дилатации. Тот же принцип применим к измерениям толщины стенок и перегородок. Наличие или отсутствие гипертрофии следует определять по диастолическим измерениям толщины миокарда левого желудочка. В нашем исследовании — конечный диастолический размер (КДР) и конечный систолический размер (КСР) левого желудочка составили в среднем $14,30 \pm 0,16$ мм (95 % CI 13,98—14,62) и $6,27 \pm 0,13$ мм (95 % CI 6,01—6,54), соответственно.

Фракция укорочения (ФУ) левого желудочка (в англоязычной литературе — FS, *Fractional Shortening*) — степень укорочения волокон миокарда во время систолы представляет собой изменение размера камеры левого желудочка в течение полного сердечного цикла, выраженное в процентах. Показатель ФУ, вероятно, является наиболее распространенным и важным эхокардиографическим параметром. Он показывает степень сокращения и укорочения волокон миокарда, то есть контрактильность или сократимость миокарда. В нашем наблюдении среднее значение ФУ составило — $56 \pm 0,70$ % (95 % CI 55,29—58,04). Увеличение выше референсных значений показателей КСР, КДР при одновременном снижении ФУ могут служить

достоверными маркерами при верификации дилатационной кардиомиопатии, которая нередко регистрируется у домашних кошек [18].

Скорость кровотока зависит от частоты сердечных сокращений, контрактильности миокарда, преднагрузки, состояния магистральных сосудов и их клапанного аппарата. Увеличение частоты сердечных сокращений у животных увеличивает как пиковую, так и среднюю скорость легочного и аортального кровотока. Легочный поток имеет несколько большее время выброса по сравнению с аортальным потоком из-за сниженной преднагрузки в малом круге кровообращения. Наряду с этим, фазы дыхания оказывают выраженное влияние на кровообращения в правых камерах сердца. Увеличенный венозный отток при вдохе увеличивает инспираторную скорость легочного кровотока. Величина максимальной скорости кровотока в аорте в среднем составила $0,92 \pm 0,02$ м/с (95 % CI 0,87—0,97), а в легочной артерии — $0,93 \pm 0,03$ м/с (95 % CI 0,87—0,98).

Систолическая экскурсия фиброзного кольца трехстворчатого клапана (TAPSE) представляет собой систему оценки функционального состояния правого желудочка (ПЖ). TAPSE является широко признанным, клинически полезным и выполнимым маркером дисфункции ПЖ, и было доказано, что он является ценным прогностическим маркером при различных заболеваниях сердца у животных, включая сердечную недостаточность.

Показатель TAPSE является важным параметром, определяющим сердечный индекс и контрактильность миокарда правого желудочка. Его следует использовать для прогнозирования смертности и заболеваемости в совокупности с другими эхокардиографическими параметрами. В нашей работе установлено, что показатель TAPSE у здоровых домашних кошек в среднем составляет $8,93 \pm 0,21$ мм (95 % CI 8,50—9,35), а диастолический размер полости ПЖ в среднем составил $4,11 \pm 0,14$ мм (95 % CI 3,84—4,38).

Систолическое давление внутри левого желудочка примерно равно периферическому систолическому артериальному давлению при отсутствии обструкции оттока крови из левого желудочка. Таким образом, приводное давление струи митральной регургитации будет равно как систолическому давлению желудочков, так и систолическому артериальному давлению. По мере увеличения системного давления приводное давление от левого желудочка к предсердию также будет увеличиваться, и пиковая скорость соответственно уве-

личится. Те же принципы применимы и к правой стороне сердца. Следовательно, приводящее давление трикуспидальной регургитирующей струи будет равно как систолическому давлению в правом желудочке, так и в легочной артерии при условии отсутствия ее стеноза.

Градиент давления в аорте и легочной артерии в наших исследованиях составили в среднем $3,40 \pm 0,18$ мм. рт. ст. (95 % CI 3,03—3,77) и $3,43 \pm 0,20$ мм. рт. ст. (95 % CI 3,01—3,84), соответственно.

При ухудшении насосной функции левых камер сердца возникает венозный застой в легких, что приводит к увеличению диаметра легочной вены (ЛВ), при относительно стабильных размерах правой ветви легочной артерии. Исходя из вышесказанного, соотношение ПВ/ПВЛА представляет собой простой и воспроизводимый эхокардиографический показатель, который увеличивается с прогрессированием стадий сердечной недостаточности и может помочь отличить животных с кардиальной дисфункцией от бессимптомных пациентов с дегенеративным заболеванием митрального клапана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метод эхокардиографии является важнейшим и информативным методом диагностики и должен широко использоваться в ветеринарной медицине для оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы у домашних кошек. Рекомендуем использовать следующие референсные интервалы по основным показателям эхокардиографии: диаметр аорты — 8,66—9,02 мм; максимальная скорость потока крови на аорте—0,87—0,97 м/с; градиент давления в аорте — 3,03—3,77 мм. рт. ст.; толщина межжелудочковой перегородки в диастолу — 4,11—4,30 мм; толщина задней стенки левого желудочка в диастолу — 4,17—4,35 мм; конечный диастолический размер левого желудочка — 13,98—14,62 мм; конечный систолический размер левого желудочка — 6,01—6,54 мм; фракция укорочения — 55,29—58,04 %; диаметр легочной артерии — 6,23—6,79 мм; максимальная скорость потока на легочной артерии — 0,87—0,98 м/с; градиент давления в легочной артерии — 3,01—3,84 мм. рт. ст., диаметр клапана легочной артерии на уровне фиброзного кольца — 7,32—7,90 мм; толщина стенки правого желудочка — 2,24—2,47 мм; полость правого желудочка в диастолу — 3,84—4,38 мм; систолическая экскурсия в фиброзного кольца трехстворчатого клапа-

на — 8,50—9,35 мм; диаметр левого предсердия — 11,20—11,63 мм; диаметр правого предсердия — 8,45—9,18 мм; легочная вена — 2,81—3,00 мм; правая ветвь легочной артерии — 3,22—3,47 мм; соотношение левой вены к правой ветви легочной артерии — 0,86—0,89 ед.; соотношение диаметр левого предсердия к диаметру аорте — 1,27—1,30 ед.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Left ventricular myocardial remodeling in dogs with mitral valve endocardiosis / Y. A. Vatnikov, E. V. Kulikov, E. A. Notina [et al.] // *Veterinary World*. — 2020. — v. 13(4). — P. 731—738. — DOI 10.14202/vet-world.2020.731-738. — EDN UZJXXA.
2. Методы диагностики гипертрофической кардиомиопатии у кошек / В. А. Трушкин, А. А. Никитина, С. П. Ковалев [и др.] // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. — 2021. — № 4. — С. 86—89. — DOI 10.52419/issn2072-6023.2021.4.86. — EDN QOQKSX.
3. Оценка линейных эхокардиографических показателей у собак при эндокардиозе атриовентрикулярных клапанов сердца / А. А. Руденко, Ю. А. Ватников, Е. Д. Сотникова, П. А. Руденко // *Ветеринария*. — 2021. — № 1. — С. 53—59. — DOI 10.30896/0042-4846.2021.24.1.53-59. — EDN RJWMFV.
4. *Häggström J.* Screening for hypertrophic cardiomyopathy in cats / J. Häggström, V. Luis Fuentes, G. Wess // *J Vet Cardiol*. — 2015. — v. 1. — P. 134—149. doi: 10.1016/j.jvc.2015.07.003. PMID: 26776573.
5. *Гирфанов А. И.* Динамика морфологических изменений сердца при патологии миокарда у кошачьих породы Мейн Кун / А. И. Гирфанов, К. Э. Ахмадеева // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. — 2019. — Т. 238. — № 2. — С. 57—60. — DOI 10.31588/2413-4201-1883-238-2-57-61. — EDN BMYLEX.
6. Усовершенствование методики предоперационного эхокардиографического скринингового исследования у собак карликовых пород / А. А. Руденко, Ю. А. Ватников, И. А. Морозов, П. А. Руденко // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. — 2021. — Т. 245. — № 1. — С. 164—168. — DOI 10.31588/2413-4201-1883-245-1-164-168. — EDN XCWFYK.
7. *Плюсюк В. Н.* Вирусные инфекции как этиологический фактор кардиомиопатий у домашней кошки: клиническое исследование / В. Н. Плюсюк // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. — 2017. — Т. 3. — № 35. — С. 50—53. — EDN ZGBRSH.
8. *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.

9. *Сабирзянова Л. И.* Эхокардиографическое исследование кошек больных обструктивным бронхитом с признаками бронхиальной астмы / Л. И. Сабирзянова, В. В. Крюкова, А. В. Яшин // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В. Р. Филиппова. — 2019. — Т. 4. — № 57. — С. 118—121. — DOI 10.34655/bgsha.2019.57.4.018. — EDN DMMFPC.
10. *Campbell F. E.* The effect of hydration status on the echocardiographic measurements of normal cats / F. E. Campbell, M. D. Kittleson // J Vet Intern Med. — 2007. — v. 21(5). — P. 1008—1015. doi: 10.1892/0891-6640(2007)21[1008: teohso]2.0.co;2. PMID: 17939557.
11. *Илларионова В. К.* Стандартные сечения при эхокардиографическом исследовании собак в двухмерном режиме из правого парастернального доступа / В. К. Илларионова // Российский ветеринарный журнал. — 2017. — № 3. — С. 6—9. — EDN YNDQDZ.
12. *Позябин С. В.* Комплексная коррекция синдрома застойной сердечной недостаточности у собак, больных эндокардиозом митрального клапана / С. В. Позябин, А. А. Руденко, П. А. Руденко // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2020. — № 10. — С. 6—15. — DOI 10.26155/vet.zoo.bio.202010001. — EDN NTRJCH.
13. *Sadjadi R.* Effect of medetomidine on left ventricular outflow tract velocity in cats: A Doppler echocardiography study / R. Sadjadi, M. Nasrollahzadeh Masouleh, A. Asghari, S. Bokaie // Vet Res Forum. — 2021. — v. 12(3). — P. 383—386. doi: 10.30466/vrf.2020.113899.2710. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34815852; PMCID: PMC8576155.
14. 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. — EDN ROAMHX.
15. Characteristic, evolution and influence on epizootic process of microorganisms in biocenoses of livestock farms / P. Rudenko, A. Strizhakov, A. Rudenko [et al.] // European Journal of Molecular and Clinical Medicine. — 2021. — v. 8(2). — P. 1865—1877. — EDN AOZSLZ.
16. *Сергеев М. А.* Информативность различных методов диагностики гипертиреоза и сопутствующих патологий у кошек / М. А. Сергеев, Д. Р. Амиров // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2019. — 237(1). — С. 174—179. — DOI 10.31588/2413-4201-1883-237-1-174-179. — EDN VVKYDY.
17. *Khelik I. A.* Clinicopathologic, hemodynamic, and echocardiographic effects of short-term oral administration of anti-inflammatory doses of prednisolone to systemically normal cats / I. A. Khelik, D. J. Berger, J. P. Mochel, Y. J. Seo, J. S. Palerme, W. A. Ware, J. L. Ward // Am J Vet Res. — 2019. — v. 80(8). — p. 743—755. doi: 10.2460/ajvr.80.8.743. PMID: 31339769.
18. *Руденко А. А.* Оценка частоты дыхания во время сна у кошек с застойной сердечной недостаточностью: степень приверженности к данному тесту владельцев животных и ее влияние на выживаемость пациентов / А. А. Руденко // Российский ветеринарный журнал. — 2018. — № 4. — С. 9—14. — DOI 10.32416/article_5bd1c1f917fda5.38468318. — EDN YLLGHB.
19. *Litster A. L.* Radiographic and echocardiographic measurement of the heart in obese cats / A. L. Litster, J. W. Buchanan // Vet Radiol Ultrasound. — 2000. — v. 41(4). — p. 320—325. doi: 10.1111/j.1740—8261.2000.tb02080.x. PMID: 10955493.
20. Особенности клинического проявления болевого синдрома при остром гастроэнтерите у собак / Э. А. Куприна, А. А. Руденко, В. И. Луцай, П. А. Руденко // Ветеринарная патология. — 2023. — Т. 22. — № 2. — С. 12—18. — DOI 10.23947/1682-5616-2023-22-2-12-18. — EDN EWPAK.
21. *Freire A. P.* Use of 95 % confidence intervals in the reporting of between-group differences in randomized controlled trials: analysis of a representative sample of 200 physical therapy trials / A. P. Freire, M. R. Elkins, E. M. Ramos, A. M. Moseley // Braz J Phys Ther. — 2019. — v. 23(4). — p. 302—310. doi: 10.1016/j.bjpt.2018.10.004. PMID: 30366845.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

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

Ж. А. Гандур — студент;

В. И. Луцай — доктор ветеринарных наук, профессор;

А. А. Руденко — доктор ветеринарных наук, профессор.

Заявленный вклад соавторов:

П. А. Руденко — концептуализация, методология и валидация;

Ж. А. Гандур — проведение экспериментов, статистический анализ;

В. И. Луцай — администрирование исследований, приобретение финансирования;

А. А. Руденко — написание, обзор и редактирование.

Статья поступила в редакцию 12.09.2023 г.

REFERENCE INTERVALS FOR BASIC ECHOCARDIOGRAPHIC PARAMETERS IN PHYSIOLOGICALLY HEALTHY DOMESTIC CATS

Pavel Anatolyevich Rudenko[✉], Jubran Akhmed Gandur, Vladimir Ivanovich Lutsay,
Andrey Anatolyevich Rudenko¹

Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia, vetrudek@yandex.ru[✉]

Abstract. The reference values of echocardiographic indicators in physiologically healthy domestic cats were determined using the method of calculating the 95 % confidence interval. The work was carried out at the veterinary clinic “Vega” (Moscow) and at the Department of Veterinary Medicine of “ROSBIOTECH”. The study included 189 young cats from 6 months to 2 years of age, of different breeds and body weight (2.2—9.6 kg). For practical veterinary medicine, the following reference intervals are recommended for the main echocardiographic indicators: aortic diameter — 8.66—9.02 mm; maximum blood flow velocity in the aorta — 0.87—0.97 m/s; pressure gradient in the aorta — 3.03—3.77 mm of mercury; thickness of the interventricular septum in diastole — 4.11—4.30 mm; thickness of the posterior wall of the left ventricle in diastole — 4.17—4.35 mm; end diastolic dimension of the left ventricle — 13.98—14.62 mm; end systolic dimension of the left ventricle — 6.01—6.54 mm; fractional shortening — 55.29—58.04 %; pulmonary artery diameter — 6.23—6.79 mm; maximum flow velocity on the pulmonary artery — 0.87—0.98 m/s; pressure gradient in the pulmonary artery — 3.01—3.84 mm of mercury; the diameter of the pulmonary valve at the level of the fibrous ring — 7.32—7.90 mm; right ventricular wall thickness — 2.24—2.47 mm; cavity of the right ventricle in diastole — 3.84—4.38 mm; tricuspid annular plane systolic excursion — 8.50—9.35 mm; left atrium diameter — 11.20—11.63 mm; right atrium diameter — 8.45—9.18 mm; pulmonary vein — 2.81—3.00 mm; right branch of the pulmonary artery — 3.22—3.47 mm; ratio of the left vein to the right branch of the pulmonary artery — 0.86—0.89 units; the ratio of the diameter of the left atrium to the diameter of the aorta — 1.27—1.30 units.

Keywords: cats, norm, echocardiography, M-mode, B-mode, pulsed Doppler echocardiography

Echocardiography is an important method for diagnosing various diseases of the cardiovascular system in domestic animals [1, 2]. In recent years, echocardiographic studies have attracted increasing interest among veterinary specialists, since changes in the structure and function of the cardiovascular system occur at the early stages of myocardial failure, when clinical symptoms do not yet appear [3, 4]. Using echocardiography, it is possible to highly effectively identify parameters of myocardial remodeling, that is, atrial dilatation, eccentric or concentric hypertrophy of the left and right ventricles, assess the size and condition of the great vessels, identify venous congestion in the pulmonary veins and in the caudal vena cava as markers of decompensated left and right ventricles heart failure [5—7].

It is especially valuable to use echocardiography when conducting preoperative screening diagnostics of animals for the presence of hidden cardiac pa-

thologies, which can significantly increase the risk of planned surgical interventions [8—11].

Echocardiography is indicated for assessing the condition of the valvular apparatus of the heart, identifying the presence of valve insufficiency and stenosis, valve fusion, etc. [6, 12]. Using echocardiography, one can also study the diastolic function of the right and left ventricle based on the characteristics of transmitral and transtricuspid blood flow or using other parameters and approaches to the functional diagnosis of the cardiovascular system pathologies [13—15].

Echocardiography can reliably detect decreased contractility or systolic dysfunction of the left or right ventricle, which plays an important role in clinical practice for assessing the state of the cardiovascular system [16, 17]. Using echocardiography, it is possible to evaluate the velocity flows in the outflow tract of the left and right ventricles, that is, the velocity in the aorta or pulmonary artery, which can also be im-

portant in the diagnosis of diseases of the cardiovascular system [18—20]. Thus, the study of structural and functional changes in the cardiovascular system, as well as the identification of reference intervals for the main echocardiographic parameters in healthy domestic cats is relevant for practical veterinary medicine.

Based on the above, the objective of this work is to evaluate and calculate reference intervals for the main echocardiographic indicators in physiologically healthy domestic cats.

MATERIAL AND METHODS

Scientific work was carried out at the veterinary clinic “Vega” (Moscow) and at the Department of Veterinary Medicine of FSBEI HE “ROSBIOTECH”, from March 1 to July 10, 2023. Domestic cats were admitted to the clinic for the purpose of conducting an echocardiographic examination as part of the preoperative cardiac screening. The study included young cats from 6 months to 2 years of age, of different breeds and body weight (2.2—9.6 kg).

Echocardiographic examination was performed using the veterinary ultrasound scanner *Mindray DC-60* (China) [4]. The thickness of the interventricular septum in diastole (TIVSd) and the thickness of the posterior wall of the left ventricle in diastole (TPWLVD) were assessed in M-mode [7]. The end diastolic and systolic dimensions of the ventricle (EDD and ESD) were also calculated in M-mode [7, 8]. To do this, a right parasternal projection was taken along the short axis of the left ventricle. The fractional shortening (FS) was expressed as a percentage and calculated using the formula $(EDD - ESD) \times 100 / EDD$ [10]. The diameter of the right ventricular cavity and the thickness of the free wall of the right ventricle were determined in M-mode from the right parasternal projection along the long axis of the left ventricle [11]. The diameter of the left atrium and aortic root was measured in B-mode at the level of the base of the heart along the short axis of the heart [6].

The measurement of the maximum size of the pulmonary vein (PV) and the right branch of the pulmonary artery (RBPA) was carried out from the right parasternal projection along the long axis of the left ventricle in M-mode scanning [11]. At the same time, the coefficients PV/RBPA and LA/Ao were calculated [12]. Pulmonary artery flow velocity was assessed in pulse-wave mode in the right parasternal view at the level of the base of the heart. In this case, the control volume was placed in the center of the pulmonary artery, trying to position the scanning axis as parallel to the blood flow as possible [10]. The blood flow velocity in the aorta was assessed from the apical projection

on the left side of the chest. The control volume was placed in the center of the aorta parallel to the blood flow. The pressure gradient in the aorta and pulmonary artery was calculated using the standard formula $4V^2$ [11, 17]. Pulmonary valve characteristics were assessed in the right parasternal view at the level of the aortic valve [8, 19].

Statistical processing was carried out in the Statistica 7.0 program (USA) [4, 14], using such biometric indicators as M — arithmetic mean, $CI-95\%$ — minimum 95 % confidence interval, $C+95\%$ — maximum 95 % confidence interval, limits — Min (minimum) and Max (maximum), $Std.Dev.$ — standard deviation and $Std.Err.$ — standard error. Reference intervals for echocardiographic indicators were calculated using the 95 % CI (*Confidence Interval*) method [21].

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

The main echocardiographic parameters in physiologically healthy cats are shown in the Table.

The degree of impairment of the efficacy of pulmonary blood flow and pumping function of the left heart chambers can be assessed by the ratio of the left atrium to the aorta (LA/Ao). This coefficient can significantly reduce the effect of body weight of domestic cats on echocardiographic indicators, since a relatively fixed aortic diameter is used to assess the degree of volume overload of the left atrium.

There is a positive effect of body weight on Ao and LA sizes in cats, and the ratio of left atrium size to aortic root size can be used as an indicator of the severity of left atrium dilatation. In our study, the average value of this indicator was 1.29 ± 0.01 units (95 % CI 1.27—1.30).

Therefore, measurement of aortic characteristics is key to assessing other echocardiographic screening indicators. In a population of physiologically healthy cats, the mean aortic size was 8.84 ± 0.09 mm (95 % CI 8.66—9.02).

It is also worth noting that measuring the left atrium (LA) makes it possible to assess the presence and degree of left atrium dilatation, which can be a sign of congestive heart failure. In our studies, the LA value averaged 11.41 ± 0.11 mm (95 % CI 11.20—11.63).

The thickness of the interventricular septum in diastole (TIVSd) and the thickness of the posterior wall of the left ventricle in diastole (TPWLVD) are the most important indicators for the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in domestic cats [5]. Based on the data presented in the table, TIVSd in physiologically healthy cats averaged 4.21 ± 0.05 mm (95 % CI 4.11—4.30), and TPWLVD — 4.26 ± 0.04 mm (95 % CI 4.17—4.35).

Table

Baseline echocardiographic parameters in physiologically healthy domestic cats (n = 189)

Parameter	Biometrics						
	M	CI -95 %	CI +95 %	Min	Max	Std. Dev.	Std. Err.
Aorta, mm	8.84	8.66	9.02	6.10	13.30	1.26	0.09
Aortic flow velocity, m/s	0.92	0.87	0.97	0.60	1.60	0.24	0.02
Pressure gradient across the aorta, mm of mercury	3.40	3.03	3.77	1.38	10.43	1.42	0.18
TIVSd, mm	4.21	4.11	4.30	2.60	5.90	0.66	0.05
TPWLVD, mm	4.26	4.17	4.35	2.60	5.90	0.62	0.04
EDD, mm	14.30	13.98	14.62	9.10	19.80	2.23	0.16
ESD, mm	6.27	6.01	6.54	1.20	10.90	1.84	0.13
FS, %	56.66	55.29	58.04	30.95	90.30	9.54	0.70
Pulmonary artery, mm	6.51	6.23	6.79	3.00	11.30	1.74	0.14
Flow velocity at the pulmonary artery, m/sec	0.93	0.87	0.98	0.50	1.80	0.23	0.03
Pressure gradient on the pulmonary artery, mm of mercury	3.43	3.01	3.84	1.72	9.12	1.55	0.20
Pulmonary valve, mm	7.61	7.32	7.90	4.20	11.90	1.21	0.14
Right ventricular wall thickness, mm	2.35	2.24	2.47	1.50	3.30	0.44	0.06
RVd, mm	4.11	3.84	4.38	2.20	7.40	1.10	0.14
TAPSE, mm	8.93	8.50	9.35	4.50	11.50	1.52	0.21
Left atrium diameter, mm	11.41	11.20	11.63	7.90	17.10	1.52	0.11
Right atrium diameter, mm	8.82	8.45	9.18	6.50	13.30	1.39	0.18
PV, mm	2.90	2.81	3.00	1.90	6.00	0.63	0.05
RBPA, mm	3.35	3.22	3.47	2.10	8.00	0.82	0.06
PV/RBPA, U	0.87	0.86	0.89	0.62	1.09	0.10	0.01
LA/Ao, U	1.29	1.27	1.30	1.02	1.49	0.11	0.01

Note. TIVSd — thickness of the interventricular septum in diastole, TPWLVD — thickness of the posterior wall of the left ventricle in diastole, EDD — end diastolic dimension, ESD — end systolic dimension, FS — fractional shortening, RVd — size of the cavity of the right ventricle at the end of diastole, TAPSE — *tricuspid* annular plane systolic excursion, PV — pulmonary vein, RBPA — right branch of the pulmonary artery.

Left ventricular diastolic dimension is used to determine the presence or absence of left ventricular volume overload. This measurement reflects the maximum filling of the ventricles during the diastole phase. Systolic measurements are a reflection of car-

diac contractile function and should not be used to assess the presence or absence of dilatation. The same principle applies to wall and septa thickness measurements. The presence or absence of hypertrophy should be determined by diastolic measurements of left ven-

tricular myocardial thickness. In our study, the end diastolic dimension (EDD) and end systolic dimension (ESD) of the left ventricle averaged 14.30 ± 0.16 mm (95 % CI 13.98—14.62) and 6.27 ± 0.13 mm (95 % CI 6.01—6.54), respectively.

Fractional shortening (FS) of the left ventricle — the degree of shortening of myocardial fibers during systole is a change in the size of the left ventricular chamber during the full cardiac cycle, expressed as a percentage. FS is probably the most common and important echocardiographic parameter. It shows the degree of contraction and shortening of myocardial fibers, that is, contractility or contractility of the myocardium. In our observation, the average FS value was 56 ± 0.70 % (95 % CI 55.29—58.04). An increase above the reference values of the ESD and EDD indicators with a simultaneous decrease in FS can serve as reliable markers for verifying dilated cardiomyopathy, which is often recorded in domestic cats [18].

The speed of blood flow depends on the heart rate, myocardial contractility, preload, the condition of the great vessels and their valve apparatus. The increase in heart rate in animals increases both peak and mean pulmonary and aortic blood flow velocities. Pulmonary flow has a slightly longer ejection time, compared to aortic flow, due to reduced afterload in the pulmonary circulation. Along with this, the phases of breathing have a pronounced effect on blood circulation in the right chambers of the heart. Increased venous outflow during inspiration increases the inspiratory velocity of pulmonary blood flow. The maximum blood flow velocity in the aorta averaged 0.92 ± 0.02 m/s (95 % CI 0.87—0.97), and in the pulmonary artery — 0.93 ± 0.03 m/s (95 % CI 0.87—0.98).

Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) is a system for assessing the functional status of the right ventricle (RV). TAPSE is a widely accepted, clinically useful and feasible marker of RV dysfunction and has been shown to be a valuable prognostic marker in case of various cardiac diseases in animals, including heart failure.

The TAPSE indicator is an important parameter that determines the cardiac index and contractility of the right ventricular myocardium. It should be used to predict mortality and morbidity in conjunction with other echocardiographic parameters. Our work found that the TAPSE indicator in healthy domestic cats averaged 8.93 ± 0.21 mm (95 % CI 8.50—9.35), and the diastolic dimension of the pancreatic cavity averaged 4.11 ± 0.14 mm (95 % CI 3.84—4.38).

Systolic pressure inside the left ventricle is approximately equal to peripheral systolic blood pressure in

the absence of obstruction of blood outflow from the left ventricle. Thus, the drive pressure of the mitral regurgitation jet will be equal to both the ventricular systolic pressure and the systolic arterial pressure. As systemic pressure increases, the drive pressure from the left ventricle to the atrium will also increase and the peak velocity will correspondingly increase. The same principles apply to the right side of the heart. Consequently, the adducting pressure of the tricuspid regurgitation jet will be equal to both the systolic pressure in the right ventricle and in the pulmonary artery, provided there is no stenosis.

The pressure gradient in the aorta and pulmonary artery in our studies averaged 3.40 ± 0.18 mm of mercury (95 % CI 3.03—3.77) and 3.43 ± 0.20 mm of mercury (95 % CI 3.01—3.84), respectively.

When the pumping function of the left chambers of the heart deteriorates, venous congestion occurs in the lungs, which leads to an increase in the diameter of the pulmonary vein (PV), with a relatively stable size of the right branch of the pulmonary artery. Based on the above, the PV/RBPA ratio is a simple and reproducible echocardiographic measure that increases with advancing stages of heart failure and may help distinguish animals with cardiac dysfunction from asymptomatic patients with degenerative mitral valve disease.

CONCLUSION

Thus, the echocardiography method is the most important and informative diagnostic method and should be widely used in veterinary medicine to assess the functional state of the cardiovascular system in domestic cats. We recommend using the following reference intervals for the main indicators of echocardiography: aortic diameter — 8.66—9.02 mm; maximum blood flow velocity in the aorta — 0.87—0.97 m/s; pressure gradient in the aorta — 3.03—3.77 mm of mercury; thickness of the interventricular septum in diastole — 4.11—4.30 mm; thickness of the posterior wall of the left ventricle in diastole — 4.17—4.35 mm; end diastolic dimension of the left ventricle — 13.98—14.62 mm; end systolic dimension of the left ventricle — 6.01—6.54 mm; fractional shortening — 55.29—58.04 %; pulmonary artery diameter — 6.23—6.79 mm; maximum flow velocity on the pulmonary artery — 0.87—0.98 m/s; pressure gradient in the pulmonary artery — 3.01—3.84 mm of mercury; the diameter of the pulmonary valve at the level of the fibrous ring — 7.32—7.90 mm; right ventricular wall thickness — 2.24—2.47 mm; cavity of the right ventricle in diastole — 3.84—4.38 mm; *tricuspid* annular plane systolic excursion — 8.50—9.35 mm;

left atrium diameter — 11.20—11.63 mm; right atrium diameter — 8.45—9.18 mm; pulmonary vein — 2.81—3.00 mm; right branch of the pulmonary artery — 3.22—3.47 mm; ratio of the left vein to the right branch of the pulmonary artery — 0.86—0.89 units; the ratio of the diameter of the left atrium to the diameter of the aorta — 1.27—1.30 units.

REFERENCES

1. Left ventricular myocardial remodeling in dogs with mitral valve endocardiosis / Y. A. Vatnikov, E. V. Kulikov, E. A. Notina [et al.] // *Veterinary World*. — 2020. — v. 13(4). — P. 731—738. — DOI 10.14202/vet-world.2020.731-738. — EDN UZJJXA.
2. Methods for diagnosing hypertrophic cardiomyopathy in cats / V. A. Trushkin, A. A. Nikitina, S. P. Kovalev [et al.] // *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii* (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine). — 2021. — No. 4. — P. 86—89. — DOI 10.52419/issn2072-6023.2021.4.86. — EDN QOQKXS.
3. Assessment of linear echocardiographic indicators in dogs with endocardiosis of atrioventricular heart valves / A. A. Rudenko, Yu. A. Vatnikov, E. D. Sotnikova, P. A. Rudenko // *Veterinariya* (Veterinary medicine). — 2021. — No. 1. — P. 53—59. — DOI 10.30896/0042-4846.2021.24.1.53-59. — EDN RJWMFV.
4. *Häggeström J.* Screening for hypertrophic cardiomyopathy in cats / J. Häggström, V. Luis Fuentes, G. Wess // *J Vet Cardiol*. — 2015. — v. 1. — P. 134—149. doi: 10.1016/j.jvc.2015.07.003. PMID: 26776573.
5. *Girfanov A. I.* Dynamics of morphological changes in the heart in case of myocardial pathology in Maine Coon cats / A. I. Girfanov, K. E. Akhmadeeva // *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Baumana* (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after. N. E. Bauman). — 2019. — V. 238. — No. 2. — P. 57—60. — DOI 10.31588/2413-4201-1883-238-2-57-61. — EDN BMYLEX.
6. Improvement of the methodology for preoperative echocardiographic screening studies in dogs of dwarf breeds / A. A. Rudenko, Yu. A. Vatnikov, I. A. Morozov, P. A. Rudenko // *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Baumana* (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after. N. E. Bauman). — 2021. — V. 245. — No. 1. — P. 164—168. — DOI 10.31588/2413-4201-1883-245-1-164-168. — EDN XCWFYK.
7. *Plisyuk V. N.* Viral infections as an etiological factor of cardiomyopathies in domestic cats: a clinical study / V. N. Plisyuk // *Aktualnye voprosy veterinarnoy biologii* (Current issues in veterinary biology). — 2017. — V. 3. — No. 35. — P. 50—53. — EDN ZGBRSH.
8. *Vatnikov Yu. A.* Evaluation of the efficacy of therapy for compensated intestinal dysbiosis in cats / Yu. A. Vatnikov, P. A. Rudenko, N. S. Bugrov, A. A. Rudenko // *Agrar-naya nauka* (Agrarian science). — 2022. — No. 1. — P. 24—29. — doi: 10.32634/0869-8155-2022-355-1-24-29.
9. *Sabirzyanova L. I.* Echocardiographic study of cats with obstructive bronchitis with the signs of bronchial asthma / L. I. Sabirzyanova, V. V. Kryukova, A. V. Yashin // *Vestnik Buryatskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii im. V. R. Filippova* (Bulletin of Buryat State Agricultural Academy named after. V. R. Filippov). — 2019. — V. 4. — No. 57. — P. 118—121. — DOI 10.34655/bgsha.2019.57.4.018. — EDN DMMFPC.
10. *Campbell F. E.* The effect of hydration status on the echocardiographic measurements of normal cats / F. E. Campbell, M. D. Kittleson // *J Vet Intern Med*. — 2007. — v. 21(5). — P. 1008—1015. doi: 10.1892/0891-6640(2007)21[1008:teohso]2.0.co;2. PMID: 17939557.
11. *Illarionova V. K.* Standard sections for echocardiographic examination of dogs in two-dimensional mode from the right parasternal access / V. K. Illarionova // *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal* (Russian Veterinary Journal). — 2017. — No. 3. — P. 6—9. — EDN YNDQDZ.
12. *Pozyabin S. V.* Complex correction of congestive heart failure syndrome in dogs with mitral valve endocardiosis / S. V. Pozyabin, A. A. Rudenko, P. A. Rudenko // *Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya* (Veterinary medicine, zootechnics and biotechnology). — 2020. — No. 10. — P. 6—15. — DOI 10.26155/vet.zoo.bio.202010001. — EDN NTRJCH.
13. *Sadjadi R.* Effect of medetomidine on left ventricular outflow tract velocity in cats: A Doppler echocardiography study / R. Sadjadi, M. Nasrollahzadeh Masouleh, A. Asghari, S. Bokaie // *Vet Res Forum*. — 2021. — v. 12(3). — P. 383—386. doi: 10.30466/vrf.2020.113899.2710. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34815852; PMCID: PMC8576155.
14. Features of the functional state of the body of sheep under stress / Yu. A. Yuldashbaev, Yu. A. Vatnikov, P. A. Rudenko, A. A. Rudenko // *Vestnik Rossiyskogo universiteta družby 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. — EDN ROAMHX.
15. Characteristic, evolution and influence on epizootic process of microorganisms in biocenoses of livestock farms / P. Rudenko, A. Strizhakov, A. Rudenko [et al.] // *European Journal of Molecular and Clinical Medicine*. — 2021. — v. 8(2). — P. 1865—1877. — EDN AOSZSLZ.
16. *Sergeev M. A.* Information content of various methods for diagnosing hyperthyroidism and concomitant pathologies in cats / M. A. Sergeev, D. R. Amirov // *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Baumana* (Transactions of Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after. N. E. Bauman). — 2019. — 237(1). — P. 174—179. — DOI 10.31588/2413-4201-1883-237-1-174-179. — EDN VVKYDY.

17. *Khelik I. A.* Clinicopathologic, hemodynamic, and echocardiographic effects of short-term oral administration of anti-inflammatory doses of prednisolone to systemically normal cats / I. A. Khelik, D. J. Berger, J. P. Mochel, Y. J. Seo, J. S. Palerme, W. A. Ware, J. L. Ward // *Am J Vet Res.* — 2019. — v. 80(8). — p. 743—755. doi: 10.2460/ajvr.80.8.743. PMID: 31339769.

18. *Rudenko A. A.* Assessment of respiratory rate during sleep in cats with congestive heart failure: the degree of adherence to this test by animal owners and its impact on patient survival / A. A. Rudenko // *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal (Russian Veterinary Journal).* — 2018. — No. 4. — P. 9—14. — DOI 10.32416/article_5bd1c1f917fda5.38468318. — EDN YLLGHB.

19. *Litster A. L.* Radiographic and echocardiographic measurement of the heart in obese cats / A. L. Litster,

J. W. Buchanan // *Vet Radiol Ultrasound.* — 2000. — v. 41(4). — p. 320—325. doi: 10.1111/j.1740—8261.2000.tb02080.x. PMID: 10955493.

20. Features of the clinical manifestation of pain syndrome in case of acute gastroenteritis in dogs / E. A. Kuprina, A. A. Rudenko, V. I. Lutsay, P. A. Rudenko // *Veterinarnaya patologiya (Veterinary pathology).* — 2023. — V. 22. — No. 2. — P. 12—18. — DOI 10.23947/1682-5616-2023-22-2-12-18. — EDN EWPARK

21. *Freire A. P.* Use of 95 % confidence intervals in the reporting of between-group differences in randomized controlled trials: analysis of a representative sample of 200 physical therapy trials / A. P. Freire, M. R. Elkins, E. M. Ramos, A. M. Moseley // *Braz J Phys Ther.* — 2019. — v. 23(4). — p. 302—310. doi: 10.1016/j.bjpt.2018.10.004. PMID: 30366845.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

P. A. Rudenko — Doctor of Veterinary Sciences, Professor;

J. A. Gandur — Student;

V. I. Lutsay — Doctor of Veterinary Sciences, Professor;

A. A. Rudenko — Doctor of Veterinary Sciences, Professor.

The article was submitted 12.09.2023.

Научная статья

УДК 636.2:619:618.3:612.119

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.39

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВНУТРИУТРОБНОЙ ЗАДЕРЖКИ РАЗВИТИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

Владимир Александрович Сафонов^{*✉}, Татьяна Сергеевна Ермилова^{*},
Антон Евгеньевич Черницкий^{**1}

**Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского*

Российской академии наук, Москва, Россия, safrus2003@mail.ru[✉]

***Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского
отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия*

Аннотация. С помощью ROC-анализа у 56 новорожденных телят симментальской породы оценивали информативность гематологических показателей для выявления внутриутробной задержки развития. Последнюю диагностировали по результатам ультразвукового исследования (сканер «Easi-Scan-3», BCF Technology Ltd., Великобритания) животных на разных сроках гестации. В 1-суточном возрасте у телят получали образцы венозной крови для исследований на гематологическом анализаторе «Mindray BC-2800 Vet» (Mindray, Китай), дифференциального подсчета лейкоцитов в мазках крови, определения лейкоцитарной формулы крови и интегральных лейкоцитарных индексов. Установлено, что скрининг гематологических показателей у 1-суточных телят с высокой чувствительностью (50,0—100,0 %) и специфичностью (69,2—92,3 %) позволяет диагностировать у них внутриутробную задержку развития. Из 28 изученных маркеров 3 (содержание гемоглобина, эритроцитов и гематокрит) обладали отличной, 10 (среднее содержание гемоглобина в эритроците, абсолютное и относительное содержание лимфоцитов, относительное содержание сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс, индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов, лимфоцитарно-нейтрофильное соотношение, индекс Кребса, индекс сдвига лейкоцитов крови и лейкоцитарный индекс интоксикации Рейса) — очень хорошей и 4 (содержание лейкоцитов, средний объем эритроцита, ядерный индекс сдвига и лейкоцитарный индекс интоксикации Кальф-Калифа) — хорошей диагностической ценностью. Для каждого маркера рассчитано критическое значение.

Ключевые слова: телята, внутриутробная задержка развития, диагностика, показатели крови, интегральные лейкоцитарные индексы, ROC-анализ.

Благодарность: исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-26-00136)

Внутриутробная задержка развития эмбриона и плода (ВЗРП) регистрируется у 25,0—53,8 % беременных коров [1, 2] и представляет серьезную проблему для молочного животноводства [1, 3]. Рост лактационной нагрузки, сопряженный с нарушениями иммунного и метаболического статуса животных, приводит к ухудшению их репродуктивного здоровья [2, 4]. При повышении молочной продуктивности коров с 4000—5000 кг до 6000—9000 кг в год частота распространения ВЗРП в стадах возрастает в 1,23—1,45 раза [2]. Развитие ВЗРП могут провоцировать генетические и эндокринные нарушения, инфекции, стрессы, связанные с неправильной эксплуатацией и кормлением животных [1, 3—6]. Большинство авторов счита-

ют ВЗРП сложным, полиэтиологичным синдромом, причины и механизмы которого до конца не раскрыты [1, 4]. ВЗРП негативно сказывается не только на внутриутробной выживаемости плода, но и на морфофункциональной зрелости и адаптивном потенциале новорожденного [3, 7]. Такие телята, как правило, демонстрируют нарушения обмена веществ, низкую скорость роста и жизнеспособность [3, 8—10]. Широкое внедрение портативных УЗИ-сканеров в практику животноводства и разработка критериев для диагностики ВЗРП [4, 11, 12] позволили подробно изучать механизмы развития, формы проявления ВЗРП у крупного рогатого скота и ее последствия для здоровья новорожденных [1, 2, 4, 7, 9, 13, 14].

© Сафонов В. А., Ермилова Т. С., Черницкий А. Е., 2023

Показано, что внутриутробная задержка развития у новорожденных телят не всегда сопровождается дефицитом массы тела и клиническими проявлениями морфофункциональных нарушений [15], что требует совершенствования системы их лабораторного скрининга для последующей коррекции технологии выращивания животных, лечебных и профилактических мероприятий.

В настоящее время описаны биохимические [7—9] и генетические маркеры ВЗРП у телят [3, 5], однако, практически нет данных об особенностях морфологического состава их периферической крови.

Цель исследования — оценить информативность морфологических показателей крови и интегральных лейкоцитарных индексов у новорожденных телят для выявления внутриутробной задержки развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования выполнены в условиях КФХ Барбашов и ИП Рогачева (Икрянинский район, Астраханская область, Россия) в 2022—2023 годах при поддержке гранта РНФ 23—26—00136. Обследовано 56 новорожденных телят симментальской породы, полученных от коров 3—5 лактации: 28 — с ВЗРП (группа I) и 28 — физиологическим течением беременности (группа II). Оценку развития эмбриона/плода у коров проводили по результатам ультразвукового скрининга с помощью сканера «Easi-Scan-3» с линейным датчиком 4,5—8,5 МГц (BCF Technology Ltd., Великобритания) на 38—45-й, 60—65-й и 110—115-й дни после осеменения и зачатия, согласно критериям, описанным ранее [4, 7, 9, 12].

Образцы крови для исследований получали из яремной вены животных через 24 часа после рождения, перед утренним кормлением, с помощью вакуумных систем с гепарином лития. На ветеринарном гематологическом анализаторе «Mindray BC-2800 Vet» (Mindray, Китай) исследовали содержание в крови гемоглобина (*HGB*), эритроцитов (*RBC*), лейкоцитов (*WBC*), лимфоцитов (*LYM*), гранулоцитов (*GRA*), тромбоцитов (*PLT*), тромбоцит (*PCT*), гематокрит (*HCT*), средний объем эритроцита (*MCV*), среднее содержание гемоглобина в эритроците (*MCH*), показатель распределения эритроцитов по объему (*RDW*). Мазки крови окрашивали по Романовскому-Гимзе, дифференциальный подсчет лейкоцитов в мазках выполняли на микроскопе «Olympus BX43» (Olympus, Япония), по резуль-

татам определяли лейкоцитарную формулу крови, рассчитывали интегральные лейкоцитарные индексы — индекс Кребса (*ИК*), лейкоцитарный индекс интоксикации Я. Я. Кальф-Калифа (*ЛКИИ*), реактивный ответ нейтрофилов Т. Ш. Хабирова (*РОН*), лейкоцитарный индекс интоксикации Б. А. Рейса (*ЛКИИр*), ядерный индекс сдвига (*ЯИС*), индекс сдвига лейкоцитов крови (*ИСЛК*), индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (*ИСЛМ*), лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (*ИЛГ*), индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов (*ИСНМ*), лимфоцитарно-нейтрофильное соотношение (*ЛНС*), индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (*ИСЛЭ*) [16, 17].

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли в программах «IBM SPSS Statistics 20.0» (IBM Corp., США) и «Statistica 8.0» (Stat Soft Inc., США). Результаты выражали как среднее значение (*M*) ± стандартное отклонение (*SD*) и медиана (*Me*). Достоверность различий между медианами выборок определяли, используя U-критерий Манна — Уитни. Взаимосвязи между параметрами оценивали с помощью критерия Спирмана, информативность маркеров для диагностики ВЗРП у новорожденных — по результатам анализа ROC-кривой [18, 19], оценивая площадь под ROC-кривой (*AUC*), показатели чувствительности (*Se*), специфичности (*Sp*) и критическое значение маркера. Нулевую гипотезу для всех методов статистической обработки отвергали при 5 % уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

У новорожденных с ВЗРП обнаружено пониженное содержание в крови гемоглобина (на 29,0 %, $P < 0,001$), эритроцитов (на 24,6 %, $P < 0,001$), гематокритной величины (на 29,0 %, $P < 0,001$), среднего содержания гемоглобина в эритроците (на 5,4 %, $P < 0,05$) и повышенное содержание лейкоцитов (на 27,0 %, $P < 0,05$), соответственно, по сравнению с группой II (табл. 1).

В лейкоцитарной формуле крови у таких телят выше, чем у потомства коров с физиологическим течением беременности, была доля лимфоцитов *LYM%* ($64,3 \pm 9,54$ % против $52,0 \pm 9,55$ %, $P < 0,01$) и ниже сегментоядерных нейтрофилов *СЯН%* ($23,8 \pm 7,10$ % против $36,4 \pm 9,53$ %, $P < 0,01$); относительное содержание палочкоядерных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов и моноцитов достоверно не различалось между выборками.

Таблица 1

Гематологические показатели 1-суточных телят симментальской породы с внутриутробной задержкой развития (группа I) и физиологическим течением гестации (группа II)

Показатель	Группа I (n = 28) M ± SD; Me	Группа II (n = 28) M ± SD; Me
HGB, г/л	76,3 ± 7,14; 76,0 ^c	110,2 ± 12,3; 107,0
HCT, %	21,2 ± 2,36; 21,1 ^c	30,3 ± 3,60; 29,7
RBC, 10 ¹² /л	5,34 ± 0,28; 5,39 ^c	7,34 ± 0,78; 7,15
MCV, фл	39,8 ± 1,18; 39,0	41,2 ± 1,42; 41,0
MCH, пг	14,3 ± 0,65; 14,1 ^a	15,0 ± 0,58; 14,9
RDW, %	14,3 ± 1,86; 14,1	15,3 ± 1,14; 15,4
WBC, 10 ⁹ /л	11,7 ± 1,97; 11,8 ^a	9,63 ± 2,61; 9,25
LYM, 10 ⁹ /л	7,58 ± 2,03; 7,39 ^b	4,90 ± 1,25; 4,47
GRA, 10 ⁹ /л	4,11 ± 1,08; 4,23	5,89 ± 2,40; 6,00
PLT, 10 ⁹ /л	763,0 ± 221,6; 822,0	689,4 ± 194,7; 647,5
PCT, %	0,91 ± 0,37; 0,93	0,82 ± 0,32; 0,75

Различия между группами статистически достоверны:

^a P < 0,05

^b P < 0,01

^c P < 0,001

Изменения в лейкоцитарной формуле крови новорожденных закономерно отразились на значениях определяемых лейкоцитарных индексов. Так, у телят с ВЗРП были достоверно ниже ИК (на 39,8 %, P < 0,01), ЛИИ (на 55,4 %, P < 0,01),

ЛИИр (на 38,9 %, P < 0,05), ИСЛК (на 39,8 %, P < 0,01) и выше — ИСЛМ (на 42,3 %, P < 0,01), ИЛГ (на 68,4 %, P < 0,01) и ЛНС (на 70,3 %, P < 0,01), соответственно, по сравнению с особями группы II (табл. 2).

Таблица 2

Гематологические показатели 1-суточных телят симментальской породы с внутриутробной задержкой развития (группа I) и физиологическим течением гестации (группа II)

Показатель	Группа I (n = 28) M ± SD; Me	Группа II (n = 28) M ± SD; Me
1	2	3
ИК	0,59 ± 0,26; 0,53 ^b	0,98 ± 0,40; 0,87
ЛИИ	0,87 ± 0,24; 0,81 ^b	1,95 ± 1,60; 1,43
РОН	4,94 ± 3,37; 4,53	6,90 ± 3,52; 6,35
ЛИИр	0,58 ± 0,26; 0,53 ^a	0,95 ± 0,37; 0,85
ЯИС	0,51 ± 0,24; 0,56	0,33 ± 0,14; 0,31
ИСЛК	0,59 ± 0,25; 0,53 ^b	0,98 ± 0,40; 0,87
ИСЛМ	64,3 ± 9,54; 65,5 ^b	45,2 ± 16,1; 49,0
ИЛГ	19,7 ± 7,75; 19,3 ^b	11,7 ± 4,20; 11,6

Окончание табл. 2

1	2	3
ИСНМ	35,5 ± 9,87; 34,5	40,0 ± 12,5; 39,5
ЛНС	2,01 ± 0,82; 1,93 ^b	1,18 ± 0,42; 1,16
ИСЛЭ	54,9 ± 12,7; 56,5	42,1 ± 18,7; 46,0

Различия между группами статистически достоверны:

^a $P < 0,05$

^b $P < 0,01$

По данным ROC-анализа диагностическая значимость 3 из 28 исследованных гематологических маркеров внутриутробной задержки развития у 1-суточных телят оценивалась как отличная (*HGB*, *HCT*, *RBC*), 10 — как очень хорошая

(*MCH*, *LYM*, *LYM%*, *СЯН%*, *ИЛГ*, *ИСЛМ*, *ЛНС*, *ИК*, *ИСЛК*, *ЛИИр*), 4 — как хорошая (*WBC*, *MCV*, *ЯИС*, *ЛИИ*) и 4 — как средняя (*RDW*, *ИСНМ*, *РОН*, *ИСЛЭ*). Наиболее информативные маркеры ВЗРП представлены в таблице 3.

Таблица 3

Наиболее информативные гематологические маркеры внутриутробной задержки развития у 1-суточных телят симментальской породы

Маркер	<i>Se</i> , %	<i>Sp</i> , %	Критическое значение
1	2	3	4
HGB***	100,0	84,6	Менее 96,0 г/л
hCT***	100,0	92,3	Менее 25,8 %
rBC***	100,0	92,3	Менее $6,23 \cdot 10^{12}/л$
mCH**	75,0	84,6	Менее 14,6 пг
<i>mCV</i> *	75,0	69,2	Менее 40,5 фл
<i>wBC</i> *	75,0	69,2	Более $10,0 \cdot 10^9/л$
<i>LYM</i> **	100,0	69,2	Более $5,05 \cdot 10^9/л$
<i>LYM%</i> **	75,0	84,6	Более 61,5 %
<i>СЯН%</i> **	75,0	92,3	Менее 27,0 %
<i>ИК</i> **	75,0	84,6	Менее 0,63
<i>ЛИИ</i> *	75,0	76,0	Менее 0,89
<i>ЛИИр</i> **	75,0	84,6	Менее 0,63
<i>ИСЛК</i> **	50,0	92,3	Менее 0,55
<i>ИСЛМ</i> **	75,0	84,6	Более 61,5
<i>ИЛГ</i> **	75,0	84,6	Более 16,0
<i>ЛНС</i> **	75,0	84,6	Более 1,60
<i>ЯИС</i> *	50,0	92,3	Более 0,58

Se — специфичность; *Sp* — чувствительность

*, **, *** показатель *AUC* находится в диапазоне 0,701...0,800, 0,801...0,900 и 0,901...1,00 соответственно

Из таблицы 3 видно, что наибольшей чувствительностью для диагностики ВЗРП у новорожденных обладали *HGB*, *HCT*, *RBC* и *LYM* (100,0 %), наибольшей специфичностью — *HCT*, *RBC*, *СЯН%*, *ИСЛК* и *ЯИС* (92,3 %), *HGB*, *МСН*, *LYM%*, *ИК*, *ЛИИр*, *ИСЛМ*, *ИЛГ* и *ЛНС* (84,6 %), для других маркеров чувствительность и специфичность варьировались от 50,0 до 75,0 %.

Наши данные согласуются с результатами более ранних исследований [20—22], обнаруживших у телят с нарушениями внутриутробного развития пониженные уровни эритроцитов и гемоглобина в периферической крови. Что касается содержания в периферической крови таких телят лейкоцитов и их субпопуляций, в литературе имеются противоречивые сведения. Так, N. Saenko et al. [22] указывают на отсутствие изменений в содержании лейкоцитов в периферической крови, С. А. Позов и соавт. [21] — на снижение их числа, В. И. Сидельникова и соавт. [23], напротив, на их повышение. В нашем исследовании для 1-суточных телят с ВЗРП были характерны повышенное содержание в периферической крови лейкоцитов и лимфоцитов, и пониженное сегментоядерных нейтрофилов (табл. 2). Такой профиль белой крови не характерен для физиологически зрелых новорожденных и может предрасполагать к развитию различных заболеваний инфекционной и неинфекционной природы [16, 23, 24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что скрининг гематологических показателей у 1-суточных телят симментальской породы с высокой чувствительностью (50,0—100,0 %) и специфичностью (69,2—92,3 %) позволяет диагностировать у них внутриутробную задержку развития (подтвержденную результатами ультразвукового исследования на разных сроках гестации). Из 28 изученных маркеров 3 (*HGB*, *HCT*, *RBC*) обладали отличной, 10 (*МСН*, *LYM*, *LYM%*, *СЯН%*, *ИЛГ*, *ИСЛМ*, *ЛНС*, *ИК*, *ИСЛК*, *ЛИИр*) — очень хорошей и 4 (*WBC*, *MCV*, *ЯИС*, *ЛИИ*) — хорошей диагностической ценностью. Для каждого из гематологических показателей определено критическое значение, отсекающее группу с ВЗРП.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Лозовая Е. Г. Этиопатогенез нарушений внутриутробного развития и гибели эмбрионов и плодов у коров и разработка эффективных мер профилактики: специальность 06.02.06 «Ветеринарное акушерство и био-

техника репродукции животных»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Лозовая Елена Геннадьевна. — Воронеж, 2021. — 21 с.

2. Бутко В. А. Гипопрогестеронемия у высокопродуктивных молочных коров и ее роль в эмбриональной смертности и задержке развития плода: специальность 4.2.1. «Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Бутко Виталий Андреевич. — Воронеж, 2023. — 21 с.

3. Wu G. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences / G. Wu, F. W. Bazer, J. M. Wallace, T. E. Spencer // *Journal of Animal Science*. — 2006. — v. 84 (9). — p. 2316—2337. — doi: 10.2527/jas.2006—156.

4. Nezhdanov A. Endocrine and metabolic mechanisms of embryo and fetal intrauterine growth retardation in dairy cows / A. Nezhdanov, S. Shabunin, V. Mikhalev, N. Klimov, A. Chernitskiy // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. — 2014. — v. 38 (6). — p. 675—680. — doi: 10.3906/vet-1405—12.

5. Hicks Z. M. Going up inflame: Reviewing the underexplored role of inflammatory programming in stress-induced intrauterine growth restricted livestock / Z. M. Hicks, D. T. Yates // *Frontiers in Animal Science*. — 2021. — v. 2. — 761421. — doi: 10.3389/fanim.2021.761421.

6. Shabunin S. V. Prognostic value of endogenous intoxication and oxidative stress indices in early embryogenesis in cows / S. V. Shabunin, A. G. Nezhdanov, V. I. Mikhalev, E. G. Lozovaya, A. E. Chernitskiy // *Russian Agricultural Sciences*. — 2016. — v. 42 (1). — p. 101—104. — doi: 10.3103/S1068367416010183.

7. Safonov V. A. Antioxidant status and functional condition of respiratory system of newborn calves with intrauterine growth retardation / V. A. Safonov, V. I. Mikhalev, A. E. Chernitskiy // *Agricultural Biology*. — 2018. — v. 53 (4). — p. 831—841. — doi: 10.15389/agrobiology.2018.4.831eng.

8. Mikhalev V. Metabolic status of newborn calves with intrauterine growth retardation / V. Mikhalev, S. Shabunin, V. Safonov, A. Chernitskiy // *Reproduction in Domestic Animals*. — 2018. — v. 53 (S2). — p. 168—168. — doi: 10.1111/rda.13272.

9. Ермилова Т. С. Биохимические маркеры внутриутробной задержки развития у новорожденных телят / Т. С. Ермилова, В. А. Сафонов, А. Е. Черницкий // *Ветеринарный фармакологический вестник*. — 2022. — № 4(21). — С. 155—164. — doi: 10.17238/issn2541—8203.2022.4.155.

10. Greenwood P. L. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production / P. L. Greenwood, L. M. Café // *Animal*. — 2007. — v. 1 (9). — p. 1283—1296. — doi: 10.1017/S175173110700050X.

11. *Buczinski S. M.* Fetal well-being assessment in bovine near-term gestations: current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine / S. M. Buczinski, G. Fecteau, R. C. Lefebvre, L. C. Smith // *Canadian Veterinary Journal*. — 2007. — v. 48 (2). — p. 178—183.
12. *Бутко В. А.* Клинико-эхографические маркеры диагностики нарушений раннего эмбриогенеза у коров / В. А. Бутко, Е. Г. Лозовая, В. И. Михалев // *Ветеринарный фармакологический вестник*. — 2020. — № 2(11). — С. 177—190. — doi: 10.17238/issn2541—8203.2020.2.177.
13. *Нежданов А. Г.* Метаболический статус коров при задержке внутриутробного развития эмбриона и плода / А. Г. Нежданов, В. И. Михалев, Г. Г. Чусова, Н. Е. Папин, А. Е. Черницкий, Е. Г. Лозовая // *Сельскохозяйственная биология*. — 2016. — т. 51. — № 2. — С. 230—237. — doi: 10.15389/agrobiology.2016.2.230rus.
14. *Shabunin S.* Dilementosis as a risk factor of embryo loss in lactating cows / S. Shabunin, A. Nezhdanov, V. Mikhalev, E. Lozovaya, A. Chernitskiy // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. — 2017. — v. 41 (4). — p. 453—459. — doi: 10.3906/vet-1609—76.
15. *Glover I. D.* Little association between birth weight and health of preweaned dairy calves / I. D. Glover, D. Barrett, K. Reyher // *Veterinary Record*. — 2019. — v. 184 (15). — 477. — doi: 10.1136/vr.105062.
16. *Жуков А. П.* Возрастные изменения интегральных гематологических индексов у крупного рогатого скота / А. П. Жуков, Е. Б. Шарафутдинова, А. П. Датский, М. М. Жамбулов // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. — 2016. — № 4 (60). — С. 213—216.
17. *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, Е. М. Самойленко, И. Н. Лобачева // *Здоровье Украины*. — 2009. — № 6 (19). — С. 51—57.
18. *DeLong E. R.* Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach / E. R. DeLong, D. M. DeLong, D. L. Clarke-Pearson // *Biometrics*. — 1988. — v. 44 (3). — p. 837—845.
19. *Kamarudin A. N.* Time-dependent ROC curve analysis in medical research: current methods and applications / A. N. Kamarudin, T. Cox, R. Kolamunnage-Dona // *BMC Medical Research Methodology*. — 2017. — v. 17 (1). — 53. — doi: 10.1186/s12874—017—0332—6.
20. *Саврасов Д. А.* Гипотрофия — предиктор развития анемии и вторичного иммунодефицита у телят раннего неонатального возраста / Д. А. Саврасов, П. А. Паршин, Г. А. Востроилова // *Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины*. — 2020. — т. 56. — № 4. — С. 64—68.
21. *Позов С. А.* Естественная резистентность и развитие телят в зависимости от особенностей эмбрионального периода / С. А. Позов, В. А. Порублев, Э. К. Папуниди, С. Ю. Смоленцев // *Ветеринарный врач*. — 2020. — № 3 — С. 51—55. — doi: 10.33632/1998—698X.2020—3—51—55.
22. *Saenko N.* The adaptive potential of newborn calves under conditions of technogenic anthropobiocenosis / N. Saenko, V. Lemeshchenko, G. Lukashik, E. Nekhaychuk, T. Skobelskaya // *E3S Web of Conferences*. — 2021. — v. 265. — 01010. — doi: 10.1051/e3sconf/202126501010.
23. *Сидельникова В. И.* Индивидуальная реактивность гранулоцитарной системы новорожденных телят и ее роль в патогенезе воспалительных заболеваний респираторного и желудочно-кишечного тракта / В. И. Сидельникова, А. Е. Черницкий, А. И. Золотарев, М. И. Рецкий // *Сельскохозяйственная биология*. — 2015. — т. 50. — № 4. — С. 486—494. — doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.486rus.
24. *Шахов А. Г.* Иммунный статус телят с разным уровнем морфофункционального развития / А. Г. Шахов, Д. В. Федосов, Л. Ю. Сашнина, Ю. Н. Масьянов, Ю. Н. Алехин, Т. А. Ерина // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. — 2013. — № 6. — С. 58—61.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

В. А. Сафонов — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биогеохимии окружающей среды;

Т. С. Ермилова — научный сотрудник лаборатории биогеохимии окружающей среды;

А. Е. Черницкий — доктор биологических наук, заведующий отделом репродуктивной биологии и неонатологии.

Статья поступила в редакцию 24.08.2023 г.

Original article

UDC 636.2:619:618.3:612.119

HEMATOLOGICAL MARKERS OF INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION IN NEWBORN CALVES

Vladimir Aleksandrovich Safonov*✉, Tatyana Sergeevna Ermilova*, Anton Evgenyevich Chernitskiy**¹

**Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry named after V. I. Vernadsky of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, safrus2003@mail.ru*✉

***Ural Federal Agrarian Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia*

Abstract. Using ROC analysis, the informativeness of hematological indicators for identifying intrauterine growth restriction was assessed in 56 newborn calves of Simmental breed. The latter was diagnosed based on the results of ultrasound examination (Easi-Scan-3 scanner, BCF Technology Ltd., UK) of animals at different stages of gestation. At the age of 1 day, venous blood samples were obtained from calves for research on the Mindray BC-2800 Vet hematological analyzer (Mindray, China), differential counting of leukocytes in blood smears, determination of the leucogram and integral leukocyte indices. It has been established that screening of hematological indicators in 1-day-old calves with high sensitivity (50.0—100.0 %) and specificity (69.2—92.3 %) allows diagnosing intrauterine growth restriction. Out of 28 markers studied, 3 (hemoglobin content, erythrocytes and hematocrit) had excellent results, 10 (mean cell hemoglobin, absolute and relative content of lymphocytes, relative content of segmented neutrophils, lymphocyte-granulocyte index, lymphocyte-monocyte ratio index, lymphocyte-neutrophil ratio, Krebs index, index of blood leukocyte shift and Reis leukocyte intoxication index) were very good and 4 (leukocyte content, mean cell volume, nuclear shift index and Kalf-Kalif leukocyte intoxication index) — good diagnostic value. A critical value was calculated for each marker.

Keywords: calves, intrauterine growth restriction, diagnostics, blood indicators, integral leukocyte indices, ROC analysis.

Acknowledgment: the study was carried out with the financial support from a grant of the Russian Science Foundation (project No. 23-26-00136)

Intrauterine growth restriction of the embryo and fetus (IUGR) is registered in 25.0—53.8 % of pregnant cows [1, 2] and represents a serious problem for dairy farming [1, 3]. An increase in lactation load, associated with disturbances in the immune and metabolic status of animals, leads to a deterioration in their reproductive health [2, 4]. With an increase in the milk productivity of cows from 4000—5000 kg to 6000—9000 kg per year, the incidence of IUGR in herds increases by 1.23—1.45 times [2]. The development of IUGR can be provoked by genetic and endocrine disorders, infections and stress associated with improper use and feeding of animals [1, 3—6]. Most authors consider IUGR to be a complex, multi-etiological syndrome, the causes and mechanisms of which are not fully understood [1, 4]. IUGR negatively affects not only the intrauterine survival of the fetus, but also the morphofunctional maturity and adaptive potential of the new-

born [3, 7]. Such calves typically exhibit metabolic disorders and low growth rates and viability [3, 8—10].

The widespread introduction of portable ultrasound scanners into livestock farming practice and the development of criteria for diagnosing IUGR [4, 11, 12] have made it possible to study in detail the mechanisms of development, forms of manifestation of IUGR in cattle and its consequences for the health of the newborns [1, 2, 4, 7, 9, 13, 14].

It has been shown that intrauterine growth restriction in newborn calves is not always accompanied by body weight deficiency and clinical manifestations of morphofunctional disorders [15], which requires improving the system of their laboratory screening for subsequent correction of animal rearing technology, therapeutic and preventive measures. Currently, biochemical [7—9] and genetic markers of IUGR in calves have been described [3, 5], however, there is practical-

ly no data on the features of the morphological composition of their peripheral blood.

The objective of the study is to evaluate the information content of morphological blood indicators and integral leukocyte indices in newborn calves to identify intrauterine growth restriction.

MATERIAL AND METHODS

The researches were carried out in the conditions of the collective farm Barbashov and IE Rogacheva (Ikryaninskiy r., Astrakhan region, Russia) in 2022—2023 with the support of the Russian Science Foundation grant 23—26—00136. We examined 56 newborn calves of Simmental breed, obtained from cows of 3—5 lactations: 28 with IUGR (group I) and 28 with a physiological course of gestation (group II). The development of the embryo/fetus in cows was assessed based on the results of ultrasound screening using an Easi-Scan-3 scanner with a linear sensor of 4.5—8.5 MHz (BCF Technology Ltd., UK) on days 38—45, 60—65 and 110—115 after insemination and conception, according to the criteria described previously [4, 7, 9, 12].

The blood samples for the research were obtained from the jugular vein of animals 24 hours after birth, before morning feeding, using vacuum systems with lithium heparin. Using a veterinary hematological analyzer Mindray BC-2800 Vet (Mindray, China), the blood levels of hemoglobin (*HGB*), red blood cells (*RBC*), white blood cells (*WBC*), lymphocytes (*LYM*), granulocytes (*GRA*), platelets (*PLT*), plateletcrit (*PCT*), hematocrit (*HCT*), mean cell volume (*MCV*), mean cell hemoglobin (*MCH*), red cell distribution width (*RDW*). Blood smears were stained according to Romanowsky-Giemsa, differential counts of leukocytes in smears were performed on an Olympus BX43 microscope

(Olympus, Japan), based on the results, the leucogram was determined, integral leukocyte indices were calculated — the Krebs index (*KI*), leukocyte intoxication index of Ya.Ya. Kalf-Kalifa (*LII*), reactive response of neutrophils of T. Sh. Khabirov (*RRN*), leukocyte intoxication index of B. A. Reis (*LIIr*), nuclear shift index (*NSI*), blood leukocyte shift index (*BLSI*), lymphocyte-monocyte ratio index (*LMRI*), lymphocyte-granulocyte index (*LGI*), neutrophil-monocyte ratio index (*NMRI*), lymphocyte-neutrophil ratio (*LNR*), lymphocyte-eosinophil ratio index (*LERI*) [16, 17].

Statistical processing of the experimental data was performed in the programs IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corp., USA) and Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., USA). The results were expressed as mean (*M*) ± standard deviation (*SD*) and median (*Me*). The significance of differences among sample medians was determined using the Mann-Whitney U test. The relationships among parameters were assessed using the Spearman test; the information content of markers for diagnosing IUGR in the newborns was based on the results of the analysis of the ROC curve [18, 19], assessing the area under the ROC curve (*AUC*), sensitivity (*Se*), specificity (*Sp*) and critical marker value. The null hypothesis for all statistical methods was rejected at the 5 % significance level.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

In the newborns with IUGR, decreased blood levels of hemoglobin (by 29.0 %, $P < 0.001$), red blood cells/erythrocytes (by 24.6 %, $P < 0.001$), hematocrit value (by 29.0 %, $P < 0.001$), mean cell hemoglobin (by 5.4 %, $P < 0.05$) and increased leukocyte content (by 27.0 %, $P < 0.05$), respectively, compared to group II (Table 1).

Table 1

Hematological indicators of 1-day-old Simmental calves with intrauterine growth restriction (group I) and physiological course of gestation (group II)

Indicator	Group I ($n = 28$) $M \pm SD; Me$	Group II ($n = 28$) $M \pm SD; Me$
1	2	3
<i>HGB</i> , g/L	$76.3 \pm 7.14; 76.0^c$	$110.2 \pm 12.3; 107.0$
<i>HCT</i> , %	$21.2 \pm 2.36; 21.1^c$	$30.3 \pm 3.60; 29.7$
<i>RBC</i> , $10^{12}/L$	$5.34 \pm 0.28; 5.39^c$	$7.34 \pm 0.78; 7.15$
<i>MCV</i> , fl	$39.8 \pm 1.18; 39.0$	$41.2 \pm 1.42; 41.0$
<i>MCH</i> , pg	$14.3 \pm 0.65; 14.1^a$	$15.0 \pm 0.58; 14.9$
<i>RDW</i> , %	$14.3 \pm 1.86; 14.1$	$15.3 \pm 1.14; 15.4$

Table 1 (the end)

1	2	3
WBC, 10 ⁹ /L	11.7 ± 1.97; 11.8 ^a	9.63 ± 2.61; 9.25
LYM, 10 ⁹ /L	7.58 ± 2.03; 7.39 ^b	4.90 ± 1.25; 4.47
GRA, 10 ⁹ /L	4.11 ± 1.08; 4.23	5.89 ± 2.40; 6.00
PLT, 10 ⁹ /L	763.0 ± 221.6; 822.0	689.4 ± 194.7; 647.5
PCT, %	0.91 ± 0.37; 0.93	0.82 ± 0.32; 0.75

The differences among the groups are statistically significant:

^a $P < 0.05$

^b $P < 0.01$

^c $P < 0.001$

In the leucogram of such calves, compared with the offspring of cows with a physiological course of gestation, the proportion of lymphocytes *LYM*% (64.3 ± 9.54 % vs. 52.0 ± 9.55 %, $P < 0.01$) and lower than segmented neutrophils *SN*% (23.8 ± 7.10 % vs. 36.4 ± 9.53 %, $P < 0.01$); the relative content of stab neutrophils, eosinophils, basophils and monocytes did not differ significantly among samples.

The changes in the leucogram of the newborns naturally affected the values of the determined leucocyte indices. Thus, the calves with IUGR had significantly lower KI (by 39.8 %, $P < 0.01$), LII (by 55.4 %, $P < 0.01$), LIIr (by 38.9 %, $P < 0.05$), BLSI (by 39.8 %, $P < 0.01$) and higher — LMRI (by 42.3 %, $P < 0.01$), LGI (by 68.4 %, $P < 0.01$) and LNR (by 70.3 %, $P < 0.01$), respectively, compared with the individuals of group II (Table 2).

Table 2

Hematological indicators of 1-day-old Simmental calves with intrauterine growth restriction (group I) and physiological course of gestation (group II)

Indicators	Group I ($n = 28$) $M \pm SD; Me$	Group II ($n = 28$) $M \pm SD; Me$
KI	0.59 ± 0.26; 0.53 ^b	0.98 ± 0.40; 0.87
LII	0.87 ± 0.24; 0.81 ^b	1.95 ± 1.60; 1.43
RRN	4.94 ± 3.37; 4.53	6.90 ± 3.52; 6.35
LIIr	0.58 ± 0.26; 0.53 ^a	0.95 ± 0.37; 0.85
NSI	0.51 ± 0.24; 0.56	0.33 ± 0.14; 0.31
BLSI	0.59 ± 0.25; 0.53 ^b	0.98 ± 0.40; 0.87
LMRI	64.3 ± 9.54; 65.5 ^b	45.2 ± 16.1; 49.0
LGI	19.7 ± 7.75; 19.3 ^b	11.7 ± 4.20; 11.6
NMRI	35.5 ± 9.87; 34.5	40.0 ± 12.5; 39.5
LNR	2.01 ± 0.82; 1.93 ^b	1.18 ± 0.42; 1.16
LERI	54.9 ± 12.7; 56.5	42.1 ± 18.7; 46.0

The differences among the groups are statistically significant:

^a $P < 0.05$

^b $P < 0.01$

According to ROC analysis, the diagnostic significance of 3 out of 28 studied hematological markers of intrauterine growth restriction in 1-day-old calves was assessed as excellent (*HGB, HCT, RBC*), 10 — as very good (*MCH, LYM, LYM%, SN%, LGI, LMRI, LNR, KI, BLSI, LIIr*), 4 — as good (*WBC, MCV, NSI, LII*) and 4 — as average (*RDW, NMRI, RRN, LERI*). The most informative markers of IUGR are presented in Table 3.

Table 3 shows that HGB, HCT, RBC and LYM (100.0 %) had the highest sensitivity for diagnosing IUGR in the newborns; the highest specificity — HCT, RBC, SN%, BLSI and NSI (92.3 %), HGB, MCH, LYM%, KI, LIIr, LMRI, LGI and LNR (84.6 %), for other markers sensitivity and specificity ranged from 50.0 to 75.0 %.

Our data are consistent with the results of earlier studies [20—22], which found reduced levels of red

blood cells and hemoglobin in the peripheral blood in the calves with intrauterine growth restriction. Regarding the content of such leukocytes and their subpopulations in the peripheral blood of calves, there is contradictory information in the literature.

Thus, N. Saenko et al. [22] indicate no changes in the content of leukocytes in peripheral blood, S. A. Pozov et al. [21] indicate the reduction of their number, V. I. Sidelnikova et al. [23], on the contrary, mark their increase. In our study, 1-day-old calves with IUGR were characterized by an increased content of leukocytes and lymphocytes in the peripheral blood, and a decreased content of segmented neutrophils (Table 2).

This white blood profile is not typical of physiologically mature newborns and can predispose to the development of various diseases of infectious and non-infectious nature [16, 23, 24].

Table 3

Most informative hematological markers of intrauterine growth restriction in 1-day-old calves of Simmental breed

Marker	<i>Se</i> , %	<i>Sp</i> , %	Critical value
HGB***	100.0	84.6	Less than 96.0 g/L
HCT***	100.0	92.3	Less than 25.8 %
RBC***	100.0	92.3	Less than $6.23 \cdot 10^{12}/L$
MCH**	75.0	84.6	Less than 14.6 pg
<i>MCV</i> *	75.0	69.2	Less than 40.5 fl
<i>WBC</i> *	75.0	69.2	More than $10.0 \cdot 10^9/L$
<i>LYM</i> **	100.0	69.2	More than $5.05 \cdot 10^9/L$
<i>LYM%</i> **	75.0	84.6	More than 61.5 %
<i>SN%</i> **	75.0	92.3	Less than 27.0 %
<i>KI</i> **	75.0	84.6	Less than 0.63
<i>LII</i> *	75.0	76.0	Less than 0.89
<i>LIIr</i> **	75.0	84.6	Less than 0.63
<i>BLSI</i> **	50.0	92.3	Less than 0.55
<i>LMRI</i> **	75.0	84.6	More than 61.5
<i>LGI</i> **	75.0	84.6	More than 16.0
<i>LNR</i> **	75.0	84.6	More than 1.60
<i>NSI</i> *	50.0	92.3	More than 0.58

Se — specificity; *Sp* — sensitivity

*, **, *** the AUC indicator is in the range of 0.701...0.800, 0.801...0.900 and 0.901...1.00, respectively

CONCLUSION

The results of the study have shown that the screening of hematological indicators in 1-day-old calves of Simmental breed with high sensitivity (50.0—100.0 %) and specificity (69.2—92.3 %) allows diagnosing intrauterine growth restriction in them (confirmed by the results of ultrasound examination at different stages of gestation).

Out of 28 studied markers, 3 (*HGB*, *HCT*, *RBC*) had excellent, 10 (*MCH*, *LYM*, *LYM%*, *SN%*, *LGI*, *LMRI*, *LNR*, *KI*, *BLSI*, *LIIr*) had very good and 4 (*WBC*, *MCV*, *NSI*, *LII*) — good diagnostic value. For each of the hematological indicators, a critical value has been determined that cuts off the group with IUGR.

REFERENCES

1. *Lozovaya E. G.* Etiopathogenesis of intrauterine growth disorders and death of embryos and fetuses in cows and the development of effective preventive measures: specialty 06.02.06 “Veterinary obstetrics and biotechnology of animal reproduction”: abstract of a thesis ... Cand. of Vet. Sciences / Lozovaya Elena Gennadyevna. — Voronezh, 2021. — 21 p.
2. *Butko V. A.* Hypoprogesteronemia in high yielding dairy cows and its role in embryonic mortality and fetal growth restriction: specialty 4.2.1. “Animal pathology, morphology, physiology, pharmacology and toxicology”: abstract of a thesis ... Cand. of Vet. Sciences / Butko Vitaliy Andreevich. — Voronezh, 2023. — 21 p.
3. *Wu G.* Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences / G. Wu, F. W. Bazer, J. M. Wallace, T. E. Spencer // *Journal of Animal Science*. — 2006. — v. 84(9). — p. 2316—2337. — doi: 10.2527/jas.2006—156.
4. *Nezhdanov A.* Endocrine and metabolic mechanisms of embryo and fetal intrauterine growth retardation in dairy cows / A. Nezhdanov, S. Shabunin, V. Mikhalev, N. Klimov, A. Chernitskiy // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. — 2014. — v. 38(6). — p. 675—680. — doi: 10.3906/vet-1405—12.
5. *Hicks Z. M.* Going up inflame: Reviewing the underexplored role of inflammatory programming in stress-induced intrauterine growth restricted livestock / Z. M. Hicks, D. T. Yates // *Frontiers in Animal Science*. — 2021. — v. 2. — 761421. — doi: 10.3389/fanim.2021.761421.
6. *Shabunin S. V.* Prognostic value of endogenous intoxication and oxidative stress indices in early embryogenesis in cows / S. V. Shabunin, A. G. Nezhdanov, V. I. Mikhalev, E. G. Lozovaya, A. E. Chernitskiy // *Russian Agricultural Sciences*. — 2016. — v. 42(1). — p. 101—104. — doi: 10.3103/S1068367416010183.
7. *Safonov V. A.* Antioxidant status and functional condition of the respiratory system of newborn calves with intrauterine growth retardation / V. A. Safonov, V. I. Mikhalev, A. E. Chernitskiy // *Agricultural Biology*. — 2018. — v. 53(4). — p. 831—841. — doi: 10.15389/agrobiolgy.2018.4.831eng.
8. *Mikhalev V.* Metabolic status of newborn calves with intrauterine growth retardation / V. Mikhalev, S. Shabunin, V. Safonov, A. Chernitskiy // *Reproduction in Domestic Animals*. — 2018. — v. 53 (S2). — p. 168—168. — doi: 10.1111/rda.13272.
9. *Ermilova T. S.* Biochemical markers of intrauterine growth restriction in newborn calves / T. S. Ermilova, V. A. Safonov, A. E. Chernitskiy // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2022. — No. 4(21). — P. 155—164. — doi: 10.17238/issn2541—8203.2022.4.155.
10. *Greenwood P. L.* Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production / P. L. Greenwood, L. M. Café // *Animal*. — 2007. — v. 19). — p. 1283—1296. — doi: 10.1017/S175173110700050X.
11. *Buczinski S. M.* Fetal well-being assessment in bovine near-term gestations: current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine / S. M. Buczinski, G. Fecteau, R. C. Lefebvre, L. C. Smith // *Canadian Veterinary Journal*. — 2007. — v. 48(2). — p. 178—183.
12. *Butko V. A.* Clinical and echographic markers for diagnosing disorders of early embryogenesis in cows / V. A. Butko, E. G. Lozovaya, V. I. Mikhalev // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2020. — No. 2(11). — P. 177—190. — doi: 10.17238/issn2541—8203.2020.2.177.
13. *Nezhdanov A. G.* Metabolic status of cows in case of intrauterine growth restriction of the embryo and fetus / A. G. Nezhdanov, V. I. Mikhalev, G. G. Chusova, N. E. Papin, A. E. Chernitskiy, E. G. Lozovaya // *Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology)*. — 2016. — V. 51. — No. 2. — P. 230—237. — doi: 10.15389/agrobiolgy.2016.2.230rus.
14. *Shabunin S.* Dilementosis as a risk factor of embryo loss in lactating cows / S. Shabunin, A. Nezhdanov, V. Mikhalev, E. Lozovaya, A. Chernitskiy // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. — 2017. — v. 41(4). — p. 453—459. — doi: 10.3906/vet-1609—76.
15. *Glover I. D.* Little association between birth weight and health of preweaned dairy calves / I. D. Glover, D. Barrett, K. Reyher // *Veterinary Record*. — 2019. — v. 184 (15). — 477. — doi: 10.1136/vr.105062.
16. *Zhukov A. P.* Age-related changes of integral hematological indices in cattle / A. P. Zhukov, E. B. Sharafutdinova, A. P. Datskiy, M. M. Zhambulov // *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Proceedings of Orenburg State Agrarian University)*. — 2016. — No. 4 (60). — P. 213—216.
17. *Speranskiy I. I.* Clinical blood analysis — have all its possibilities been exhausted? Integral indices of intoxication as the criteria for assessing the severity of endogenous intoxication, its complications and the effectiveness of treatment / I. I. Speranskiy, E. M. Samoylenko, I. N. Lobacheva // *Zdorovye Ukrainy (Health of Ukraine)*. — 2009. — No. 6 (19). — P. 51—57.

18. DeLong E. R. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach / E. R. DeLong, D. M. DeLong, D. L. Clarke-Pearson // *Biometrics*. — 1988. — v. 44(3). — p. 837—845.
19. Kamarudin A. N. Time-dependent ROC curve analysis in medical research: current methods and applications / A. N. Kamarudin, T. Cox, R. Kolamunnage-Dona // *BMC Medical Research Methodology*. — 2017. — v. 17(1). — 53. — doi: 10.1186/s12874-017-0332-6.
20. Savrasov D. A. Hypotrophy is a predictor of the development of anemia and secondary immunodeficiency in calves of early neonatal age / D. A. Savrasov, P. A. Parshin, G. A. Vostroilova // *Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya Vitebskaya ordena Znak pocheta gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny (Transactions of the educational establishment “Vitebsk the Order of the ‘Badge of Honor’ State Academy of Veterinary Medicine”)*. — 2020. — V. 56. — No. 4. — P. 64—68.
21. Pozov S. A. Natural resistance and development of calves depending on the characteristics of the embryonic period / S. A. Pozov, V. A. Porublev, E. K. Papunidi, S. Yu. Smolentsev // *Veterinarnyy vrach (Veterinarian)*. — 2020. — No. 3 — pp. 51—55. — doi: 10.33632/1998-698X.2020-3-51-55.
22. Saenko N. The adaptive potential of newborn calves under conditions of technogenic anthropobiocenosis / N. Saenko, V. Lemeshchenko, G. Lukashik, E. Nekhaychuk, T. Skobelskaya // *E3S Web of Conferences*. — 2021. — V. 265. — 01010. — doi: 10.1051/e3sconf/202126501010.
23. Sidelnikova V. I. Individual reactivity of the granulocyte system of newborn calves and its role in the pathogenesis of inflammatory diseases of the respiratory and gastrointestinal tract / V. I. Sidelnikova, A. E. Chernitskiy, A. I. Zolotarev, M. I. Retskiy // *Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology)*. — 2015. — V. 50. — No. 4. — P. 486—494. — doi: 10.15389/agrobiolog.2015.4.486rus.
24. Shakhov A. G. Immune status of calves with different levels of morphofunctional development / A. G. Shakhov, D. V. Fedosov, L. Yu. Sashnina, Yu. N. Masyanov, Yu. N. Alekhin, T. A. Erina // *Vestnik Rossiyskoy akademii selskokhozyaystvennykh nauk (Bulletin of the Russian Academy of Agricultural Sciences)*. — 2013. — No. 6. — P. 58—61.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

V. A. Safonov — Doctor of Biological Sciences, Principal Scientific Associate of the Laboratory of Environmental Biogeochemistry;

T. S. Ermilova — Scientific Associate of the Laboratory of Environmental Biogeochemistry;

A. E. Chernitskiy — Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Reproductive Biology and Neonatology.

The article was submitted 24.08.2023.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ АЛБЕНДАЗОЛА СУЛЬФОКСИДА ПРИ ГЕЛЬМИНТОЗАХ ОВЕЦ

Владимир Александрович Оробец, Елена Сергеевна Кастарнова[✉],
Милана Владимировна Говорова¹

Ставропольский государственный аграрный университет,
Ставрополь, Россия e-mail: elena-kastarnova@mail.ru[✉]

Аннотация. В настоящее время на рынке ветеринарных препаратов представлен широкий ассортимент антигельминтных средств. Публикации результатов проведенных исследований свидетельствуют о востребованности совершенствования средств и методов профилактики и лечения гельминтозов мелкого рогатого скота. Актуальность разработки лекарственных препаратов антигельминтного действия, обусловлена необходимостью повышения биологической доступности применяемых субстанций. Рынок ветеринарных препаратов широк и ежегодно проводятся исследования, направленные на создание новых лечебных комбинаций и тестирование новых формул лекарств. Целью данного исследования явилось изучение антигельминтной активности разработанной лекарственной формы на основе хитозана с включенным албендазолом сульфоксидом (АСХ) при гельминтозах овец. Изучение эффективности новой лекарственной формы антгельминтика проводили на базе овцеводческого хозяйства, неблагополучного по инвазионным заболеваниям. Для этого методом двукратной гельминтооувоскопии подобрали 120 овец, естественно зараженных нематодами желудочно-кишечного тракта, *Dictyocaulus filaria*, *M. expansa* и *D. lanceatum*. Установлено, что препарат на основе хитозана с включенным албендазолом сульфоксидом обладает высокой антгельминтной эффективностью при мониезиозе, нематодозах желудочно-кишечного тракта и легких в дозе 3 мг/кг по д. в., при дикроцелиозе — в дозе 5 мг/кг по д. в. По данным проведенного исследования эффективность разработанного препарата оказалась выше активности субстанции при нематодозах желудочно-кишечного тракта, мониезиозе и дикроцелиозе овец.

Ключевые слова: овцы, паразитология, лечение, хитозан, дикроцелиоз, диктиокаулез, мониезиоз, нематодозы

Известно, что наиболее распространенными болезнями мелкого рогатого скота являются гельминтозы. Этому способствуют особенности технологии содержания животных в традиционных регионах разведения и благоприятные природно-климатические условия. Гельминтозы мелкого рогатого скота, во многих случаях, регистрируются в ассоциации, включающей нематод, цестод и трематод [15].

Продукты животноводства являются важным источником белка для людей во всем мире [9]. Гельминтозы распространены в животноводстве и могут привести к экономическим потерям для животноводческой отрасли [4—6]. Паразитарные инфекции могут привести к снижению роста, веса и фертильности, что может повлиять на произ-

водство и качество мяса, молока и шерсти [15, 7]. Например, финансовые потери из-за фасциолеза в животноводстве оцениваются в 3 миллиарда долларов США в год во всем мире [8].

Фасциолез и дикроцелиоз являются двумя наиболее распространенными зоонозными гельминтозами домашнего скота [11, 12]. Эти трематоды обнаруживаются в желчном пузыре и желчных протоках жвачных животных, таких как овцы, крупный рогатый скот и козы [14]. Люди также могут заразиться при непреднамеренном проглатывании метацеркарий на водных растениях (*Fasciola* spp.) или у муравьев (*Dicrocoelium* spp.) [10, 13, 16].

В настоящее время на рынке ветеринарных препаратов представлен широкий ассортимент антигельминтных средств. Актуальность разра-

ботки лекарственных препаратов антигельминтного действия, обусловлена необходимостью повышения биологической доступности применяемых субстанций.

Например, разработана и апробирована технология создания супрамолекулярной системы противопаразитарного препарата с использованием механохимической технологии и адресной доставки. Для получения твердой дисперсии лекарственного препарата используются водорастворимые полимеры, позволяющие улучшить свойства субстанции за счет повышения водорастворимости. В клинических исследованиях на естественно инвазированных желудочно-кишечными нематодами и мониезиями овцах доказано, что по противопаразитарной активности разработанный препарат значительно превосходит активность субстанции [1, 3].

Целью данного исследования явилось изучение антигельминтной активности разработанной лекарственной формы на основе наночастиц хитозана с включенным албендазолом сульфоксидом (АСХ) при гельминтозах овец. Наночастицы хитозана с включенным действующим веществом получали методом ионной кросс-сшивки по модифицированному методу Calvo et al. (1997).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение эффективности новой лекарственной формы антгельминтика проводили на базе овцеводческого хозяйства, неблагополучного по инвазионным заболеваниям. Для отбора подопытных животных методом двукратной гельминтоооскопии выявили 120 овец, естественно зараженных нематодами желудочно-кишечного тракта, *Dictyocaulus filaria*, *M. expansa* и *D. lanceatum*. Подобранных овец поместили индивидуальными номерами и разделили на 3 группы с учетом инвазированности ($n = 40$).

При изучении эффективности новой лекарственной формы антгельминтика группы бензимидазолов введение препаратов подопытным животным осуществляли посредством внутримышечной инъекции.

Животным первой группы в качестве противопаразитарной терапии применяли базовый препарат — субстанцию албендазола в дозе 5 мг д. в. на 1 кг массы животного, животным второй группы в качестве противопаразитарной терапии применяли разработанный препарат на основе хитозановых частиц в дозе 3 мг албендазола сульфоксида на 1 кг массы животного, животным третьей группы препараты не вводили, и они служили контро-

лем. Овцам, инвазированным дикроцелиями препараты вводили внутримышечно в дозах 7,5 и 5 мг/кг по действующему веществу.

На 18-й день проведения эксперимента осуществляли сбор фекалий овец подопытных групп и исследовали стандартными гельминтоооскопическими методами для регистрации динамики интенсивности инвазии в зависимости от числа обнаруженных яиц гельминтов в 1 грамме фекалий [2].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Excel. Достоверность статистической разницы между средними величинами определяли по методу Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам гельминтологических исследований (табл. 1) установлено, что экстенсэффективность албендазола при мониезиозе овец составила 93,3 %, при использовании АСХ — 100 %. При нематодозах пищеварительного тракта овец экстенсэффективность албендазола составила 80 %, при введении препарата АСХ — 95 %, при этом снижение интенсивности выделения яиц нематод достигло 94,96 и 99,10 % соответственно. При диктиокаулезе животные обеих групп полностью освободились от гельминтов. По результатам копрологических исследований препараты проявили 100%-ную эффективность. При дикроцелиозе в группе животных, получавших албендазол от гельминтов, освободилось 20 овец, во второй группе животных, получавших АСХ — 23 овцы, снижение интенсивности выделения яиц дикроцелий в данных группах составило 86,71 и 96,94 % соответственно. Экстенснвазированность овец контрольной группы за период наблюдения не изменилась. Интенсивность выделения яиц мониезий, нематод пищеварительного тракта, диктиокаул и дикроцелий составляла $149,4 \pm 33,71$, $59,3 \pm 22,92$, $7,2 \pm 6,93$ и $9,1 \pm 2,7$ экз/г фекалий.

Повышение эффективности разработанного препарата на основе комплекса албендазола сульфоксида и хитозана достигается, по нашему мнению, за счет трансформации фармакокинетики и как следствие повышения биодоступности действующего вещества лекарственного препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность препарата на основе албендазола сульфоксида при гельминтозах овец выше активности субстанции при нематодозах желудочно-кишечного тракта, мониезиозе и дикроцелиозе овец.

По данным проведенного исследования установлено, что новая лекарственная форма антгельминтика из группы бензимидазолов обладает высокой эффективностью при мониезиозе, нематодозах желудочно-кишечного тракта и легких в дозе 3 мг/кг по д. в., при дикроцелиозе — в дозе 5 мг/кг по д. в.

Исследования выполнены в рамках программы поддержки развития научных коллективов Ставропольского государственного аграрного университета, реализуемой при финансовой поддержке Программы стратегического академического лидерства «Приоритет — 2030».

Таблица 1

Сравнительная эффективность новой лекарственной формы антгельминтика при гельминтозах овец

Группа животных	n	Освободилось от гельминтов, гол.	Среднее число яиц гельминтов		ИЭ, %
			до лечения	после лечения	
Мониезиоз*					
Албендазол	30	28	124,2 ± 31,6	4,2 ± 0,3	96,62
АСХ	30	30	158,1 ± 37,8	0	100
Контроль	30	30	149,4 ± 33,7	166,7 ± 41,3	0
Нематоды пищеварительного тракта					
Рикобендазол	40	32	176,4 ± 19,7	8,9 ± 13,2	
АСХ	40	38	188,7 ± 22,5	1,7 ± 0,4	
Контроль	40	0	159,3 ± 22,9	172,5 ± 28,1	0
Диктиокаулез**					
Албендазол	18	18	28,6 ± 6,8	0	100
АСХ	18	18	24,1 ± 7,2	0	100
Контроль	15	0	27,2 ± 6,9	29,2 ± 7,8	0
Дикроцелиоз					
Албендазол	25	20	31,6 ± 4,8	4,2 ± 0,1	86,71
АСХ	25	23	39,2 ± 3,9	1,2 ± 0,6	96,94
Контроль	25	0	39,1 ± 2,7	38,9 ± 2,3	0

* при мониезиозе определение эффективности по экстенсивности инвазии до и после применения препарата

** среднее количество личинок в 1 г фекалий

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Варламова А. И., Архипов И. А., Халиков С. С., Садов К. М. Эффективность фебендазола на основе наноразмерной супрамолекулярной системы доставки с поливинилпирролидоном и диоктилсульфосукцината натрия при гельминтозах // Российский паразитологический журнал. 2019. Вып.1. С. 56—63.

2. Котельников Г. А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды. Справочник. М.: Колос.1983. 280 с.

3. Пузанова Е. В. Прогноз эпизоотической ситуации по основным гельминтозам сельскохозяйственных животных на территории Российской Федерации на 2020 год // Российский паразитологический журнал. 2020. Вып.2. С. 53—61.

4. Шамхалов В. М., Магомедов О. А., Шамхалов М. В., Гюльахмедова Н. Х., Бакриева Р. М. Распространение кишечных гельминтозов овец в Дагестане // Российский паразитологический журнал. 2015. № 2. С. 61—63.

5. Arbabi M, Nezami E, Hooshyar H, *Delavari M*. Epidemiology and economic loss of fasciolosis and dicrocoeliosis in Arak, Iran. *Veterinary world*. 2018;11(12):1648—1655. doi: 10.14202/vetworld.2018.1648—1655. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Charlier J, Rinaldi L, Musella V, Ploeger HW, Chartier C, Vineer HR, Hinney B, von Samson-Himmelstjerna G, Băcescu B, *Mickiewicz M*. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Prev Vet Med*. 2020;182:105103. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105103. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Charlier J, van der Voort M, Kenyon F, Skuce P, *Ver-cruyse J*. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol*. 2014;30(7):361—367. doi: 10.1016/j.pt.2014.04.009. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Elliott T, Kelley J, Rawlin G, *Spithill T*. High prevalence of fasciolosis and evaluation of drug efficacy against *Fasciola hepatica* in dairy cattle in the Maffra and Bairnsdale districts of Gippsland, Victoria, Australia. *Vet Parasitol*. 2015;209(1—2):117—124. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.02.014. [PubMed] [Cross-Ref] [Google Scholar]
9. *Grigg D*. The pattern of world protein consumption. *Geoforum*. 1995;26(1):1—17. doi: 10.1016/0016—7185(94)00020—8. [CrossRef] [Google Scholar]
10. *Kiani B.*, Budke, C.M., Shams Abadi, E. et al. Evaluation of zoonotic plathyhelminthe infections identified in slaughtered livestock in Iran, 2015—2019. *BMC Vet Res* 17, 185 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02888-9>
11. Organization WH. Report of the WHO expert consultation on food-borne trematode infections and taeniasis. World Health Organization. 2011. [Google Scholar]
12. Otranto D, *Traversa D*. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Vet Parasitol*. 2002;107(4):317—335. doi: 10.1016/S0304—4017(02)00121—8. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
13. Otranto D, *Traversa D*. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Vet Parasitol*. 2002 Aug 22;107(4):317—35. doi: 10.1016/s0304—4017(02)00121—8. PMID: 12163243.
14. *Sabzevarinezhad G*. Flukes Liver Epidemic Common Between Human and Livestock in Slaughtered and Their Staining. 2004. [Google Scholar]
15. Umur S, Kaaden OR. Prevalence and economic importance of cystic Echinococcosis in slaughtered ruminants in Burdur, Turkey 1. *J Veterinary Med Ser B*. 2003;50(5):247—252. doi: 10.1046/j.1439—0450.2003.00667.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. *Youn H*. Review of zoonotic parasites in medical and veterinary fields in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol*. 2009;47(Suppl): S133. doi: 10.3347/kjp.2009.47.S.S133. [PMC free article] [PubMed] [Cross-Ref] [Google Scholar]

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. С. Кастарнова— кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры терапии и фармакологии;
В. А. Оробец— доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой терапии и фармакологии;
М. В. Говорова — студентка.

Статья поступила в редакцию 06.09.2023 г.

EFFICACY OF THE DRUG BASED ON ALBENDAZOLE SULFOXIDE IN CASE OF OVINE HELMINTHIASES

Vladimir Aleksandrovich Orobets, Elena Sergeevna Kastarnova[✉],
Milana Vladimirovna Govorova¹

Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia, elena-kastarnova@mail.ru[✉]

Abstract. Currently, the veterinary drug market offers a wide range of anthelmintic drugs. The publications of the results of research conducted indicate the demand for improving the means and methods for the prevention and treatment of helminthiasis in small cattle. The relevance of the design of drugs with anthelmintic action is due to the need to increase the bioavailability of the substances used. The veterinary drug market is wide and the research is conducted annually to design new therapeutic combinations and test new drug formulas. The objective of this research was to study the anthelmintic activity of the designed dosage form based on chitosan with the inclusion of albendazole sulfoxide (ASO) in case of ovine helminthiasis. The study of the efficacy of a new dosage form of an anthelmintic was carried out on the basis of a sheep breeding farm, which was unfavorable for invasive diseases. For this purpose, 120 sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes, *Dictyocaulus filaria*, *M. expansa* and *D. lanceatum*, were selected using double helminthooscopy. It has been established that the drug based on chitosan with the inclusion of albendazole sulfoxide has high anthelmintic efficacy in case of monieziosis, nematodes of the gastrointestinal tract and lungs at a dose of 3 mg/kg of a. s., and in case of dicroceliosis — at a dose of 5 mg/kg of a. s. According to the study, the efficacy of the designed drug turned out to be higher than the activity of the substance in case of nematodes of the gastrointestinal tract, ovine moniesiosis and dicroceliosis.

Keywords: sheep, parasitology, treatment, chitosan, dicroceliosis, dictyoculosis, monesiosis, nematodes

It is known that the most common diseases of small cattle are helminthiasis. This is facilitated by the peculiarities of the technology for keeping animals in traditional breeding regions and favorable natural and climatic conditions. Helminthiasis of small cattle, in many cases, are recorded in an association that includes nematodes, cestodes and trematodes [15].

Animal products are an important source of protein for people around the world [9]. Helminthiasis are common in livestock farming and can lead to economic losses for the livestock industry [4—6]. Parasitic infections can lead to reductions in height, weight and fertility, which can affect the production and quality of meat, milk and wool [15, 7]. For example, financial losses due to fascioliasis in livestock are estimated at 3 billion US dollars per year worldwide [8].

Fascioliasis and dicroceliosis are the two most common zoonotic helminthiasis of livestock [11, 12]. These flukes/trematodes are found in the gallbladder and bile ducts of ruminant animals such as sheep, cattle and goats [14]. Humans can also become infect-

ed by inadvertently ingesting metacercariae on aquatic plants (*Fasciola spp.*) or ants (*Dicrocoelium spp.*) [10, 13, 16].

Currently, the veterinary drug market offers a wide range of anthelmintic drugs. The relevance of the design of drugs with anthelmintic action is determined by the need to increase the bioavailability of the substances used. For example, a technology for creating a supramolecular system of an antiparasitic drug using mechanochemical technology and targeted delivery has been developed and tested. To obtain a solid dispersion of the drug, water-soluble polymers are used, which improve the properties of the substance by increasing water solubility. In clinical studies on sheep, naturally infected with gastrointestinal nematodes and moniezia, it has been proven that the designed drug significantly exceeds the activity of the substance in terms of antiparasitic activity [1, 3].

The objective of this research was to study the anthelmintic activity of the designed dosage form based on chitosan nanoparticles with included albenda-

zole sulfoxide (ASO) in case of ovine helminthiasis. Chitosan nanoparticles with the included active substance were obtained by ionic cross-linking according to the modified method of Calvo et al. (1997).

MATERIAL AND METHODS

The study of the efficacy of a new dosage form of an anthelmintic was carried out on the basis of a sheep farm that was unfavorable for invasive diseases. To select experimental animals, 120 sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes, *Dictyocaulus filaria*, *M. expansa* and *D. lanceatum*, were identified using double helminthoovoscopy. The selected sheep were marked with individual numbers and divided into 3 groups, taking into account their infestation ($n = 40$).

When studying the efficacy of a new dosage form of an anthelmintic of the benzimidazole group, the drugs were administered to the experimental animals by intramuscular injection.

The animals of the first group were treated with the basic drug, albendazole substance (antiparasitic therapy), at a dose of 5 mg of a. s. per 1 kg of animal weight, the animals of the second group received a designed drug based on chitosan particles as antiparasitic therapy at a dose of 3 mg of albendazole sulfoxide per 1 kg of animal weight, the animals of the third group were not administered the drugs, and they served as the control. The sheep infected with dicrocelia were administered intramuscularly at doses of 7.5 and 5 mg/kg of the active substance. On day 18 of the experiment, the feces of the sheep from the experimental groups were collected and examined using standard helminthoovoscopic methods to record the dynamics of the intensi-

ty of invasion depending on the number of helminth eggs detected in 1 gram of feces [2].

Statistical processing of the obtained data was carried out using the Microsoft Excel computer program. The reliability of the statistical difference between the average values was determined using the Student's method.

STUDY RESULTS

According to the results of helminthological studies (Table 1), it was established that the extensive efficacy of albendazole against ovine monieziasis was 93.3 %, and when using ASO it was 100 %. For nematodes of the gastrointestinal tract of sheep, the extensional efficacy of albendazole was 80 %, with the introduction of the drug ASO — 95 %, while the decrease in the intensity of the release of nematode eggs reached 94.96 and 99.10 %, respectively. In case of dictyocaulosis, the animals of both groups completely recovered from helminths. According to the results of scatological studies, the drugs showed 100 % efficacy. In case of dicroceliosis, in the group of animals receiving albendazole against helminths, 20 sheep recovered, in the second group of the animals receiving ASO — 23 sheep, the decrease in the intensity of the release of dicrocoelium eggs in these groups was 86.71 and 96.94 %, respectively. The extent of infestation of the sheep in the control group did not change during the observation period. The intensity of the release of eggs of moniezia, nematodes of the gastrointestinal tract, dictyocaulus and dicrocoelium was 149.4 ± 33.71 , 59.3 ± 22.92 , 7.2 ± 6.93 and 9.1 ± 2.7 samples/g of feces.

Table 1

Comparative efficacy of a new dosage form of an anthelmintic in case of ovine helminthiasis

Group of animals	n	Recovered from helminths, animals	Average number of helminth eggs		IE, %
			before treatment	after treatment	
1	2	3	4	5	6
<i>Monieziosis*</i>					
Albendazole	30	28	124.2 ± 31.6	4.2 ± 0.3	96.62
ASO	30	30	158.1 ± 37.8	0	100
Control	30	30	149.4 ± 33.7	166.7 ± 41.3	0
<i>Nematodes of the gastrointestinal tract</i>					
Ricobendazole	40	32	176.4 ± 19.7	8.9 ± 13.2	

Table 1 (the end)

1	2	3	4	5	6
ASO	40	38	188.7 ± 22.5	1.7 ± 0.4	
Control	40	0	159.3 ± 22.9	172.5 ± 28.1	0
Dictyocaulosis**					
Albendazole	18	18	28.6 ± 6.8	0	100
ASO	18	18	24.1 ± 7.2	0	100
Control	15	0	27.2 ± 6.9	29.2 ± 7.8	0
Dicrocoeliosis					
Albendazole	25	20	31.6 ± 4.8	4.2 ± 0.1	86.71
ASO	25	23	39.2 ± 3.9	1.2 ± 0.6	96.94
Control	25	0	39.1 ± 2.7	38.9 ± 2.3	0

* in case of monieziosis, determination of efficacy is based on the extent of invasion before and after of the drug use

** average number of larvae in 1 g of feces

Increasing the efficacy of the designed drug based on the complex of albendazole sulfoxide and chitosan is achieved, in our opinion, due to the transformation of pharmacokinetics and, as a consequence, increasing the bioavailability of the active substance of the drug.

CONCLUSION

The efficacy of the drug based on albendazole sulfoxide in case of ovine helminthiasis is higher than the activity of the substance for nematodes of the gastrointestinal tract, ovine monieziosis and dicrocoeliosis. According to the study, it has been established that a new dosage form of an anthelmintic from the group of benzimidazoles is highly effective against monieziosis, nematodes of the gastrointestinal tract and lungs at a dose of 3 mg/kg of a. s., and in case of dicrocoeliosis — at a dose of 5 mg /kg of a. s.

The research was carried out within the framework of the program to support the development of scientific teams of Stavropol State Agrarian University, implemented with the financial support of the Strategic Academic Leadership Program “Priority — 2030”.

REFERENCES

1. Varlamova A. I., Arkhipov I. A., Khalikov S. S., Sadov K. M. Efficacy of fenbendazole based on a nanosized supramolecular delivery system with polyvinylpyrrolidone and sodium dioctyl sulfosuccinate in case of helminthiasis //

Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal (Russian Journal of Parasitology). 2019. Issue 1. P. 56—63.

2. Kotelnikov G. A. Helminthological studies of animals and the environment. Book of reference. M.: Kolos. 1983. 280 p.

3. Puzanova E. V. Forecast of the epizootic situation for the main helminthiasis of farm animals on the territory of the Russian Federation for 2020 // Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal (Russian Journal of Parasitology). 2020. Issue 2. P. 53—61.

4. Shamkhalov V. M., Magomedov O. A., Shamkhalov M. V., Gyulakhmedova N. Kh., Bakrieva R. M. Distribution of intestinal ovine helminthiasis in Dagestan // Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal (Russian Journal of Parasitology). 2015. No. 2. P. 61—63.

5. Arbabi M, Nezami E, Hooshyar H, Delavari M. Epidemiology and economic loss of fasciolosis and dicrocoeliosis in Arak, Iran. *Veterinary world*. 2018;11(12):1648—1655. doi: 10.14202/vetworld.2018.1648—1655. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

6. Charlier J, Rinaldi L, Musella V, Ploeger HW, Chartier C, Vineer HR, Hinney B, von Samson-Himmelstjerna G, Băcescu B, Mickiewicz M. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Prev Vet Med*. 2020;182:105103. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105103. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

7. Charlier J, van der Voort M, Kenyon F, Skuce P, Vercrusse J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol*. 2014;30(7):361—367.

doi: 10.1016/j.pt.2014.04.009. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

8. *Elliott T, Kelley J, Rawlin G, Spithill T.* High prevalence of fasciolosis and evaluation of drug efficacy against *Fasciola hepatica* in dairy cattle in the Maffra and Bairnsdale districts of Gippsland, Victoria, Australia. *Vet Parasitol.* 2015;209(1–2):117–124. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.02.014. [PubMed] [Cross-Ref] [Google Scholar]

9. *Grigg D.* The pattern of world protein consumption. *Geoforum.* 1995;26(1):1–17. doi: 10.1016/0016–7185(94)00020–8. [CrossRef] [Google Scholar]

10. *Kiani B., Budke, C.M., Shams Abadi, E.* et al. Evaluation of zoonotic plathyhelminthe infections identified in slaughtered livestock in Iran, 2015–2019. *BMC Vet Res* 17, 185 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02888-9>

11. Organization WH. Report of the WHO expert consultation on food-borne trematode infections and taeniasis. World Health Organization. 2011. [Google Scholar]

12. *Otranto D, Traversa D.* A review of dicrocoeliosis of ruminants includ-ing recent advances in the diagnosis

and treatment. *Vet Parasitol.* 2002;107(4):317–335. doi: 10.1016/S0304–4017(02)00121–8. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

13. *Otranto D, Traversa D.* A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Vet Parasitol.* 2002 Aug 22;107(4):317–35. doi: 10.1016/s0304–4017(02)00121–8. PMID: 12163243.

14. *Sabzevarinezhad G.* Flukes Liver Epidemic Common Between Human and Livestock in Slaughtered and Their Staining. 2004. [Google Scholar]

15. *Umur S, Kaaden OR.* Prevalence and economic importance of cystic Echinococcosis in slaughtered ruminants in Burdur, Turkey 1. *J Veterinary Med Ser B.* 2003;50(5):247–252. doi: 10.1046/j.1439–0450.2003.00667.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

16. *Youn H.* Review of zoonotic parasites in medical and veterinary fields in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol.* 2009;47(Suppl): S133. doi: 10.3347/kjp.2009.47.S.S133. [PMC free article] [PubMed] [Cross-Ref] [Google Scholar]

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

E. S. Kastarnova — Candidate of Biological Sciences, Scientific Associate of the Department of Therapy and Pharmacology;

V. A. Orobets — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Department of Therapy and Pharmacology;

M. V. Govorova — Student.

The article was submitted 06.09.2023.

Научная статья

УДК 619:[615.37:616.9]:636.4

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.59

СОСТОЯНИЕ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У ПОРОСЯТ ПРИ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ И РОЖИ СВИНЕЙ

Алексей Гаврилович Шахов, Лариса Юрьевна Сашнина[✉],
Владимир Николаевич Коцарев, Юлия Юрьевна Владимирова,
Галина Васильевна Никоненко¹

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, l.yu.sashnina@mail.ru[✉]*

Аннотация. В условиях промышленного свиноводческого комплекса изучено состояние естественной резистентности у поросят при плановой вакцинации против классической чумы и рожи свиней. У них по сравнению с интактными животными установлено повышение лизоцимной и комплементарной активности сыворотки крови и содержания общих иммуноглобулинов через 5—6 дней после первого и второго введения вакцины против КЧС и вакцинации против рожи, свидетельствующее о высокой напряженности гуморального звена неспецифической защиты и снижение через 14 дней после первого введения вакцины против КЧС и содержания общих иммуноглобулинов спустя 17 дней после ее повторной инъекции, обусловленное необходимостью уменьшения антигенной нагрузки. У животных отмечено увеличение концентрации гигантских и мелких циркулирующих иммунных комплексов и коэффициента их патогенности, что связано с большим поступлением вакцинных вирусного и бактериального антигенов и недостаточной элиминацией ЦИК, а также фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа, спонтанного и стимулированного НСТ-теста, свидетельствующее о повышении поглотительной функции и метаболической активности нейтрофилов, с тенденцией к уменьшению индекса их стимуляции, характеризующей снижение резерва адаптации фагоцитирующих клеток.

Ключевые слова: вакцинация, КЧС, рожа свиней, лизоцимная и комплементарная активность сыворотки крови, фагоцитоз, циркулирующие иммунные комплексы

Высокая продуктивность и сохранность животных в промышленных свиноводческих хозяйствах во многом зависят от состояния естественной резистентности, механизмы которой направлены на обеспечение постоянства внутренней среды организма при воздействии различных патогенных факторов, включая возбудителей инфекционных болезней [1—3].

На состояние естественной устойчивости организма поросят негативное влияние оказывают различные стресс-факторы (ранний отъем от свиноматок, перевод их на доращивание и откорм), технологические погрешности в кормлении и содержании, экологическое неблагополучие и др. [3—6]. Снижение ее у поросят отмечено также при стрессе, вызванном вакцинацией против рожи свиней [7], сальмонеллеза [8], классической чумы свиней [9]. Вместе с тем исследованиями

И. Н. Тюренкова и соавт. (2014) на белых крысах показано, что вакцинация повышает устойчивость к действию стрессорных факторов за счет уменьшения уровня лимфоцитоза, изменения цитокинового профиля в сторону снижения провоспалительной направленности иммунных реакций [10].

Актуальность настоящего исследования обусловлена необходимостью изучения состояния неспецифического (естественного) иммунитета у поросят при воздействии на них технологически обязательных приемов при выращивании, предусмотренных промышленной технологией, в отдельности и в сочетании с плановой вакцинацией против классической чумы и рожи свиней.

Цель исследований — изучение гуморальной и клеточной естественной резистентности у поросят при вакцинации против классической чумы и рожи свиней.

© Шахов А. Г., Сашнина Л. Ю., Коцарев В. Н., Владимирова Ю. Ю., Никоненко Г. В., 2023

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в промышленном свиноводческом хозяйстве на 2 группах по 25 поросят.

Животные первой группы (контрольная) были интактными (без воздействия вакцинных вирусного и бактериального антигенов), второй (опытная) — в возрасте 49 и 100 дней были привиты вакциной против классической чумы свиней (КЧС) живой культуральной сухой (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и в возрасте 60 и 85 дней вакциной против рожи свиней из штамма ВР-2, сухой, живой (ФКП «Щелковский биокомбинат»).

Отъем поросят от свиноматок и перевод на доращивание проводили в возрасте 28 дней, а на откорм — в 70 дней. Кормление и содержание животных соответствовали нормам, предусмотренным промышленной технологией.

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.).

Забор крови от клинически здоровых поросят ($n = 5$) обеих групп для иммунологических исследований проводили в 33, 55, 63, 90, 98, 105 и 117 дневном возрасте. В крови определяли фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН), фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке и коррекции иммунного статуса животных» [11] и метаболическую активность фагоцитов по реакции восстановления нитросинего тетразолия *in vitro* (НСТ-тест) при взаимодействии с интактными (спНСТ) и стимулированными (стНСТ) пирогеналом нейтрофилами периферической крови. Показатель резерва активации нейтрофилов (ПР) рассчитывали по формуле: $ПР = стНСТ/спНСТ$ [12]. В сыворотке крови определяли лизоцимную (ЛАСК) и комплементарную (КАСК) активность сыворотки крови согласно «Методическим рекомендациям по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных» [13], количество общих иммуноглобулинов (Ig) в соответствии с «Методами ветеринарной клинической лабораторной диагностики» [14], содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) по «Методическим рекомендациям по оценке и коррекции иммунного статуса животных» [11], коэффициент патогенности ЦИК рассчитывали по соотношению $КП = C7/C3$ [15].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и Statistica v10, оценку достоверности — по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

У поросят опытной группы в возрасте 55 дней спустя 6 суток после введения вакцины против КЧС (табл. 1) отмечено повышение по сравнению с предыдущими значениями (33 дня) лизоцимной (на 9,1 %) и комплементарной (на 84,8 %) активности сыворотки крови, свидетельствующее об увеличении неспецифической гуморальной защиты. При этом их значения превышали таковые у интактных животных на 4,2 и 73,8 % соответственно, у которых повысилась только ЛАСК на 31,8 %.

Содержание общих иммуноглобулинов у поросят обеих групп не претерпели существенных изменений, при этом их уровень у вакцинированных животных превышал на 3,0 %.

Концентрация гигантских (3,0 %) и мелких (7,0 %) циркулирующих иммунных комплексов у поросят опытной группы повысилась на 17,1 и 12,2 % соответственно, а коэффициент патогенности (C7/C3) снизился на 2,6 %. При этом их значения превышали таковые у интактных животных на 46,4 %, 58,6 и 7,5 %, что указывает на более высокую антигенную нагрузку.

При отсутствии изменений в количестве циркулирующих активных фагоцитов у поросят опытной группы повысилась их поглотительная функция: фагоцитарный индекс на 9,5 %, фагоцитарное число на 16,6 % и метаболическая активность спНСТ на 8,9 % и спНСТ на 11,6 %, превысив таковые у интактных животных на 7,2; 8,9; 29,8 и 19,1 %, у которых значения последних трех показателей увеличились в меньшей степени на 8,5 %; 6,8 и 3,2 %. Повышение поглотительной и метаболической активности сегментоядерных нейтрофилов у поросят опытной группы сочетается с активацией системы комплемента, участвующей в процессе фагоцитоза. Показатель резерва функциональной активности нейтрофилов (ПР) у них не изменился, но был меньше чем у интактных животных на 10,5 % за счет увеличения ФИ, ФЧ, спНСТ и стНСТ.

У поросят опытной группы спустя 14 суток после введения вакцины против КЧС и 3 дня после вакцинации против рожи свиней и у интактных животных в возрасте 63 дня (табл. 1) отмечено повышение по сравнению с предыдущими показателями ЛАСК на 3,3 и 14,0 % соответственно,

обусловленное необходимостью снижения антигенной нагрузки, и содержания общих иммуноглобулинов на 19,4 и 16,9 %, свидетельствующее о напряженном функционировании гуморального звена иммунитета.

У вакцинированных поросят отмечено снижение КАСК на 44,5 %, обусловленное расходом на образование ЦИК и повышение фагоцитоза, при незначительном увеличении ее значения у интакт-

ных животных. Сравнивая указанные гуморальные показатели у подопытных поросят, следует отметить, что у животных опытной группы ЛАСК и КАСК были меньше на 5,6 и 6,6 % соответственно, а содержание общих иммуноглобулинов больше на 5,2 %. У них же были выше концентрация гигантских и мелких ЦИК и их патогенность на 48,3; 75,0 и 15,2 %, что связано с высокой антигенной нагрузкой.

Таблица 1

Показатели неспецифической резистентности поросят

Показатели	Возраст (дни), группы			
	55		63	
	контрольная	опытная 6 дней после вакцинации против КЧС	контрольная	опытная 14 дней после вакцинации против КЧС
ЛАСК, мкг/мл	2,7 ± 0,80	2,8 ± 0,14	3,0 ± 0,14	2,9 ± 0,16
КАСК, % гем.	7,5 ± 0,36	13,1 ± 1,20*	7,8 ± 0,24	7,2 ± 0,47 ⁺
Общие ИГ, мг/мл	19,9 ± 0,72	20,4 ± 1,77	23,2 ± 0,85 ⁺	24,4 ± 0,93 ⁺
ЦИК 3,0 %, мг/мл	0,28 ± 0,02	0,41 ± 0,02*	0,29 ± 0,02	0,43 ± 0,016*
ЦИК 7,0 %, мг/мл	0,29 ± 0,011	0,46 ± 0,02*	0,28 ± 0,029	0,49 ± 0,09*
С7/С3, у. е.	1,06 ± 0,09	1,14 ± 0,07	0,99 ± 0,06	1,14 ± 0,05*
ФАН, %	82,4 ± 0,75	81,6 ± 1,17	82,0 ± 0,89	81,2 ± 1,55
ФИ, у. е.	5,7 ± 0,10	6,1 ± 0,14*	5,8 ± 0,12	6,3 ± 0,16*
ФЧ, у. е.	4,7 ± 0,12	5,1 ± 0,11*	4,4 ± 0,11	5,2 ± 0,15*
Сп-НСТ, %	18,8 ± 1,02	24,4 ± 0,75*	20,4 ± 0,75	29,6 ± 1,70**
Ст-НСТ, %	38,8 ± 0,49	46,2 ± 0,89*	41,6 ± 0,98 ⁺	58,4 ± 1,17**
ПР, у. е.	2,09 ± 0,10	1,87 ± 0,08	2,02 ± 0,04	1,98 ± 0,06

* $P < 0,05$

$P < 0,001$ относительно непривитых поросят

⁺ $P < 0,05$

$P < 0,001$ относительно предыдущего периода

У поросят опытной группы были выше, чем у интактных животных ФИ на 9,3 %, ФЧ на 16,5 %, спНСТ на 45,1 % и стНСТ на 40,4 %, что свидетельствует о более выраженной у них неспецифической клеточной защите.

Повторное введение вакцины против рожи (85 сутки) и классической чумы свиней (100 сут-

ки) сказались на неспецифической резистентности животных.

У поросят опытной группы спустя 5 дней после вакцинации против рожи и у интактных животных в возрасте 90 дней снизилась по сравнению с предыдущими показателями ЛАСК на 4,2 и 10,9 % в связи с расходом фермента на инактивацию цир-

кулирующих бактериальных патогенов, а у последних и КАСК на 4,1 %, но увеличилось содержание общих иммуноглобулинов на 54,9 и 49,4 %, при этом значение КАСК и общих иммуноглобулинов у иммунизированных поросят превышали на 14,8 и 9,4 %, что свидетельствует о более выраженной у них гуморальной защите (табл. 2).

При общей тенденции снижения у животных обеих групп гигантских на 27,6 и 25,6 % и увеличения мелких ЦИК на 21,4 и 12,2 % и коэффициента патогенности на 66,7 и 53,5 % их значения у вакцинированных поросят были больше на 52,4 %; 61,8 и 6,1 %, что указывает на более высокую антигенную нагрузку.

Таблица 2

Показатели неспецифической резистентности поросят

Показатели	Возраст (дни), группы			
	90		98	
	контрольная	опытная 5 дней после вакцинации против рожи	контрольная	опытная 13 дней после вакцинации против рожи
ЛАСК, мкг/мл	2,7 ± 0,17	2,7 ± 0,11	2,4 ± 0,29	2,9 ± 0,05
КАСК, % гем.	7,4 ± 0,22	8,5 ± 0,68	8,0 ± 0,35	8,8 ± 0,47
Общие ИГ, мг/мл	34,7 ± 1,01 ⁺	37,8 ± 1,03 ^{*+}	36,6 ± 0,54	40,6 ± 1,42 [*]
ЦИК 3,0 %, мг/мл	0,21 ± 0,02 ⁺	0,32 ± 0,03 ^{*+}	0,23 ± 0,008	0,28 ± 0,02 [*]
ЦИК 7,0 %, мг/мл	0,34 ± 0,02	0,55 ± 0,04 [*]	0,31 ± 0,02	0,50 ± 0,02 [*]
С7/С3, у. е.	1,65 ± 0,15 ⁺	1,75 ± 0,15 ⁺	1,36 ± 0,08	1,83 ± 0,14 [*]
ФАН, %	83,6 ± 1,17	88,2 ± 1,17 ^{*+}	82,0 ± 0,89	86,0 ± 1,41 [*]
ФИ, у. е.	5,9 ± 0,26	7,7 ± 0,21 ^{*+}	6,0 ± 0,17	7,5 ± 0,15 [*]
ФЧ, у. е.	4,9 ± 0,18 ⁺	6,8 ± 0,15 ^{*+}	4,9 ± 0,12	6,4 ± 0,11 [*]
Сп-НСТ, %	21,2 ± 0,86	34,8 ± 1,53 ^{*+}	20,6 ± 0,98	33,2 ± 0,92 [*]
Ст-НСТ, %	43,0 ± 2,88	68,4 ± 0,66 ^{*+}	41,2 ± 2,42	64,0 ± 0,94 ^{*+}
ПР, у. е.	2,04 ± 0,16	1,96 ± 0,09	2,03 ± 0,20	1,96 ± 0,02

* $P < 0,05$

$P < 0,001$ относительно непривитых поросят

+ $P < 0,05$

$P < 0,001$ относительно предыдущего периода

У животных опытной группы повысились ФАН на 8,6 %, поглотительная функция нейтрофилов: ФИ на 21,1 %, ФЧ на 31,7 %, что связано с активацией их комплемента и опсонизацией бактерии антителами, и метаболическая активность фагоцитов: спНСТ на 17,6 и стНСТ на 17,1 %, превысив таковые у интактных поросят на 5,5 %; 30,4; 37,8; 64,2 и 59,1 % соответственно, что свидетельствует о более выраженной у них неспецифической клеточной защите. Однако у них был меньше функцио-

нальный резерв клеток на 3,9 %. У животных опытной группы в возрасте 98 дней спустя 13 суток после повторного введения бактериального антигена противорожистой вакцины повысилась ЛАСК на 6,2 %, КАСК на 3,0 % и содержание общих иммуноглобулинов на 7,3 %, при этом их значения превышали таковые у интактных поросят на 21,8 %; 9,6 и 10,8 % соответственно, у которых ЛАСК снизилась на 11,5 %, но повысились КАСК и содержание общих иммуноглобулинов на 7,9 и 5,9 % (табл. 2).

У животных опытной группы снизилась концентрация гигантских и мелкодисперсных ЦИК на 12,5 и 9,1 %, но увеличился коэффициент патогенности на 4,6 %, при этом их значения превышали таковые у интактных поросят на 21,7 %; 61,3 и 34,6 % соответственно, у которых уровень гигантских ЦИК увеличился на 9,5 %, а мелкодисперсных ЦИК и коэффициент патогенности снизились на 8,8 и 17,6 %.

Полученные результаты свидетельствуют о более высокой антигенной нагрузке у животных опытной группы. Количество активных фагоцитирующих нейтрофилов, их поглотительная функция и метаболическая активность, а также функцио-

нальный показатель резерва клеток у подопытных поросят не претерпели существенных изменений по сравнению с предыдущими показателями.

При этом значения ФАН, ФИ, ФЧ, спНСТ и стНСТ у вакцинированных животных превышали таковые у интактных поросят на 4,9 %; 24,4; 30,4; 61,2 и 55,3 %, что свидетельствует о более выраженной у них клеточной защите.

Но повышенная антигенная нагрузка может привести к снижению активности клеточного звена неспецифической защиты у поросят опытной группы, о чем свидетельствует меньшая (на 3,4 %) величина функционального резерва фагоцитирующих клеток.

Таблица 3

Показатели неспецифической резистентности поросят

Показатели	Возраст (дни), группы			
	105		117	
	непривитые	опытная 5 дней после вакцинации против КЧС	непривитые	опытная 17 дней после вакцинации против КЧС
ЛАСК, мкг/мл	2,7 ± 0,26	2,9 ± 0,29	3,0 ± 0,13	2,9 ± 0,13
КАСК, % гем.	7,5 ± 0,84	9,0 ± 0,99	8,3 ± 0,40	8,2 ± 0,45
Общие ИГ, мг/мл	35,9 ± 1,58	40,6 ± 0,93*	44,5 ± 2,07 ⁺	37,5 ± 3,07
ЦИК 3,0 %, мг/мл	0,25 ± 0,01	0,37 ± 0,02* ⁺	0,27 ± 0,02	0,29 ± 0,02 ⁺
ЦИК 7,0 %, мг/мл	0,32 ± 0,02	0,59 ± 0,02* ⁺	0,40 ± 0,03 ⁺	0,42 ± 0,05 ⁺
С7/С3, у. е.	1,32 ± 0,07	1,60 ± 0,07*	1,51 ± 0,10	1,43 ± 0,11
ФАН, %	82,8 ± 1,02	88,8 ± 1,02*	81,6 ± 1,72	88,4 ± 1,33*
ФИ, у. е.	5,7 ± 0,06	7,5 ± 0,09*	5,3 ± 0,39	6,7 ± 0,19* ⁺
ФЧ, у. е.	4,7 ± 0,06	6,7 ± 0,10*	4,4 ± 0,26	6,1 ± 0,17* ⁺
Сп-НСТ, %	19,2 ± 0,68	35,6 ± 1,47*	21,2 ± 1,02	38,8 ± 2,67*
Ст-НСТ, %	43,2 ± 2,06	68,0 ± 0,93* ⁺	42,0 ± 1,67	62,0 ± 1,42* ⁺
ПР, у. е.	2,26 ± 0,07	1,92 ± 0,05*	2,01 ± 0,05 ⁺	1,62 ± 0,11* ⁺

* $P < 0,05$

$P < 0,001$ относительно непривитых поросят

⁺ $P < 0,05$

$P < 0,001$ относительно предыдущего периода

У поросят опытной группы в возрасте 105 дней спустя пять суток после введения вакцины против КЧС (табл. 3) ЛАСК, КАСК и содержание общих

иммуноглобулинов не претерпели существенных изменений по сравнению с предыдущими значениями, но превышали таковые у интактных живот-

ных на 7,5 %; 19,8 и 13,2 % соответственно, у которых ЛАСК увеличилась на 12,6 %, а КАСК снизилась на 6,9 %.

При общей тенденции увеличения у поросят обеих групп содержания гигантских на 8,7 и 32,1 % и мелких ЦИК на 3,2 и 18,0 % и снижения коэффициента патогенности на 2,9 и 12,6 % их значения у животных опытной группы превышали на 48,0 %; 84,4 и 21,2 %. У них же количество активных фагоцитирующих нейтрофилов и их поглотительная функция ФИ и ФЧ не претерпели существенных изменений, а метаболическая активность повысилась спНСТ на 7,2 и стНСТ на 6,3 %, при этом их значения превышали таковые у интактных поросят на 7,2 %; 32,3; 41,7; 85,4 и 57,4 % соответственно, у которых снизилась поглотительная функция клеток ФИ на 5,5 %, ФЧ на 4,5 %, а из метаболической активности — спНСТ на 6,8 % при увеличении стНСТ на 4,9 %. У животных опытной группы незначительно снизился функциональный резерв фагоцитирующих клеток и был меньше на 15,0 %, чем у интактных поросят, у которых он увеличился на 11,3 %.

У животных опытной группы в возрасте 117 дней спустя 17 суток после введения вакцины против КЧС (табл. 3) ЛАСК по сравнению с предыдущим показателем не изменилась, а КАСК и содержание общих иммуноглобулинов снизились на 7,9 и 7,7 % соответственно, при этом значения ЛАСК и КАСК не отличались от таковых у интактных поросят, а уровень общих иммуноглобулинов был меньше на 15,8 %. У последних показатели гуморальной защиты увеличились на 11,2 %; 10,8 и 24,0 % соответственно.

Концентрация гигантских и мелких ЦИК и коэффициент патогенности у животных опытной группы снизились на 21,6 %; 28,8 и 10,6 % соответственно, а у интактных поросят повысились на 8,0 %; 25,0 и 14,4 %, при этом у вакцинированных — значения ЦИК были выше на 7,4 и 5,0 %, а коэффициент патогенности меньше на 5,3 %.

Количество активных фагоцитирующих клеток у животных обеих групп не изменилось, а поглотительная функция снизилась ФИ на 6,9 и 11,3 % и ФЧ на 6,6 и 8,8 %, при этом их значения у поросят опытной группы были выше на 8,3 %, 26,0 и 38,3 % соответственно. При общей тенденции у животных обеих групп увеличения спНСТ на 10,4 и 9,0 %, снижения стНСТ на 2,8 и 8,8 % и функционального резерва фагоцитирующих клеток на 11,1 и 15,6 % значения спНСТ и стНСТ у поросят опытной группы были выше на 83,0 и 74,6 %, а показатель резерва меньше на 19,4 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями у поросят, вакцинированных против классической чумы и рожи свиней по сравнению с интактными животными установлено:

1. Повышение лизоцимной и комплементарной активности сыворотки крови и содержания общих иммуноглобулинов через 5—6 дней после первого и второго введения вакцины против КЧС и вакцинации против рожи, свидетельствующее о высокой напряженности гуморального звена неспецифической защиты.

2. Снижение лизоцимной и комплементарной активности сыворотки крови через 14 дней после первого введения вакцины против КЧС и содержания общих иммуноглобулинов спустя 17 дней после ее повторной инъекции, связанное с необходимостью уменьшения антигенной нагрузки.

3. Увеличение концентрации гигантских и мелких циркулирующих иммунных комплексов и коэффициента их патогенности после первого введения вакцины против КЧС и иммунизации против рожи, что связано с большим поступлением антигенов и недостаточной элиминацией ЦИК.

4. Снижение коэффициента патогенности циркулирующих иммунных комплексов через 17 дней после повторного введения вакцины против КЧС, обусловленное накоплением «антител».

5. Увеличение фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа, спонтанного и стимулированного НСТ-теста, свидетельствующее о повышении поглотительной функции и метаболической активности нейтрофилов, с тенденцией к уменьшению индекса их стимуляции, характеризующей снижение резервов адаптации фагоцитирующих клеток.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Максимов Г. В. Естественная резистентность свиней в условиях промышленной технологии выращивания / Г. В. Максимов, О. Н. Полозюк, Е. И. Федюк, Е. А. Крыштоп // Ветеринария. — 2010. — № 9. — С. 43—47.

2. Орлянкин Б. Г. Врожденный и адаптивный противовирусный иммунитет / Б. Г. Орлянкин, О. А. Верховский, Т. И. Алипер // Ветеринария. — 2023. — № 4. — С. 3—12. — DOI 10.30896/0042-4846.2023.26.4.03-11.

3. Попов В. С. Взаимосвязь факторных инфекций и вторичных иммунодефицитов при неспецифической иммунокоррекции у свиней / В. С. Попов, Н. В. Воробьева, П. А. Филиппов // Аграрный вестник Юго-Востока. — 2018. — № 1(18). — С. 41—44.

4. Рецкий М. И. Молекулярно-биохимические механизмы стресса и адаптации / М. И. Рецкий, В. С. Бузла-

ма, Б. Л. Жаркой, Ю. В. Водолазский // Эколого-адапционная стратегия защиты здоровья и продуктивности животных в современных условиях. — 2001. — С. 29—85.

5. *Востроилова Г. А.* Биохимический и иммунный статус поросят при отъемном стрессе и его фармакокоррекция аминокислотами / Г. А. Востроилова, Н. А. Хохлова, Т. Е. Лободина [и др.] // Ветеринарная патология. — 2015. — № 1(51). — С. 69—75

6. *Шахов А. Г.* Состояние неспецифического иммунитета у поросят под влиянием технологического стресса / А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, Ю. Ю. Владимирова, Н. В. Карманова // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — № 2(11). — С. 166—176. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.2.166.

7. *Шляпникова З. Г.* Развитие эндотоксикоза в организме поросят при стресс-реакции / З. Г. Шляпникова, Р. Е. Киселева, Л. П. Тельцов, Е. Ю. Бояркина // Морфологические ведомости. — 2007. — № 3—4. — С. 216—219.

8. *Гречухин А. Н.* Практическое руководство по ветеринарным обработкам в свиноводческих хозяйствах / А. Н. Гречухин // С.-Петербург. — 2010. — 408 с.

9. *Шевцов А.* Классическая чума свиней: перспективы искоренения / А. Шевцов // Животноводство России. — 2021. — № 10. — С. 27—30.

10. *Тюренков И. Н.* Влияние иммунизации на адаптационные механизмы при хроническом стрессировании животных / И. Н. Тюренков, И. С. Филина, Б. Ю. Гу-

милевский, Е. В. Волотова, Д. А. Бакулин // Фундаментальные исследования. — 2014. — № 7—2. — С. 368—371.

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

12. *Шабунин С. В.* Влияние аминокислот на состояние прооксидантной и антиоксидантной систем крови у свиноматок / С. В. Шабунин, А. Г. Шахов, Г. А. Востроилова и др. // Достижения науки и техники АПК. — 2019. — № 7. — С. 71—74. — DOI 10.24411/0235—2451—2019—10716

13. *Шахов А. Г.* Методические рекомендации по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных / А. Г. Шахов, Ю. Н. Масьянов, М. И. Рецкий [и др.] // Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины. Ч. III. «Методы исследований по проблемам незаразной патологии у продуктивных животных». — М.: РАСХН. — 2007. — С. 174—215.

14. *Кондрахин И. П.* Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И. П. Кондрахин, А. В. Архипов, В. И. Левченко, Г. А. Таланов, Л. А. Фролова, В. Э. Новиков // М.: Колос. — 2004. — 520 с

15. *Скибо Ю. В.* Характеристика циркулирующих иммунных комплексов сыворотки крови больных атопической бронхиальной астмой разной степени тяжести / Ю. В. Скибо [и др.] // Казанский медицинский журнал. — 2013. — Т. 94, № 5. — С. 744—748.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. Г. Шахов — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник;

Л. Ю. Сашнина — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;

В. Н. Коцарев — доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник;

Ю. Ю. Владимирова — кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник;

Г. В. Никоненко — младший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 21.09.2023 г.

Original article

UDC 619:[615.37:616.9]:636.4

STATE OF NATURAL RESISTANCE IN PIGLETS DURING VACCINATION AGAINST CLASSICAL SWINE FEVER AND ERYSIPELAS

Aleksey Gavrilovich Shakhov, Larisa Yuryevna Sashnina[✉], Vladimir Nikolaevich Kotsarev,
Yuliya Yuryevna Vladimirova, Galina Vasilyevna Nikonenko¹

*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology
and Therapy, Voronezh, Russian Federation, l.yu.sashnina@mail.ru[✉]*

Abstract. In the conditions of an industrial pig breeding complex, the state of natural resistance in piglets during routine vaccination against classical swine fever and erysipelas was studied. In comparison with the intact animals, an increase in serum lysozyme and complementary activity and the content of total immunoglobulins was found 5—6 days after the first and second administration of the CSF vaccine and vaccination against erysipelas, indicating a high tension of the humoral link of nonspecific protection and a decrease in 14 days after the first injection of the vaccine against CSF and the content of total immunoglobulins 17 days after its repeated injection, due to the need to reduce the antigenic load. In the animals, an increase in the concentration of giant and small circulating immune complexes and the coefficient of their pathogenicity was noted, which is associated with a large supply of vaccine viral and bacterial antigens and insufficient elimination of CIC, as well as the phagocytic index, phagocytic number, spontaneous and stimulated NBT test, indicating an increase in absorption function and metabolic activity of neutrophils, with a tendency towards a decrease in the index of their stimulation, which characterizes a decrease in the adaptation reserve of phagocytic cells.

Keywords: vaccination, CSF, swine erysipelas, serum lysozyme and complementary activity, phagocytosis, circulating immune complexes

High productivity and livability of animals on industrial pig breeding farms largely depend on the state of natural resistance, the mechanisms of which are aimed at ensuring the constancy of the internal environment of the body when exposed to various pathogenic factors, including pathogens of infectious diseases [1—3].

The state of natural stability of the body of piglets is negatively affected by various stress factors (early weaning from sows, transferring them to rearing and fattening), technological errors in feeding and keeping, environmental problems, etc. [3—6]. A decrease in it in piglets was also noted under stress caused by vaccination against swine erysipelas [7], salmonellosis [8] and classical swine fever [9].

At the same time, the research by I. N. Tyurenkova et al. (2014) on white rats showed that vaccination increases resistance to stress factors by reducing the level of lymphocytosis, changing the cytokine profile towards reducing the pro-inflammatory orientation of immune reactions [10].

The relevance of this research is due to the need to study the state of nonspecific (natural) immunity in piglets when they are exposed to technologically mandatory rearing techniques provided for by industrial technology, separately and in combination with routine vaccination against classical swine fever and erysipelas.

The objective of the research is to study humoral and cellular natural resistance in piglets when vaccinated against classical swine fever and erysipelas.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out on an industrial pig breeding farm on 2 groups of 25 piglets.

The animals of the first group (control) were intact (without exposure to vaccine viral and bacterial antigens), the second (experimental) — at the age of 49 and 100 days were vaccinated with a live culture dry vaccine against classical swine fever (CSF) (FSBSI “ARRIAH”) and at the age of 60 and 85 days — with a vaccine against swine erysipelas from the VR-2 strain, dry, live (FFE “Shchelkovo Biocombine”).

The piglets were weaned from sows and transferred to rearing at the age of 28 days, and to fattening — at the age of 70 days. Feeding and keeping of animals complied with the standards provided for by industrial technology.

The experiment was carried out in accordance with the requirements of current international and Russian legislative acts (Directive 2010/63/EU dtd. September 22, 2010, the European Convention (ETS123), Strasbourg, 1986), as well as the requirements of the bioethics commission of FSBSI “ARVRIPP&T” (protocol No. 1—02/23 dtd. February, 10, 2023).

The blood sampling from clinically healthy piglets ($n = 5$) of both groups for immunological studies was carried out at the age of 33, 55, 63, 90, 98, 105 and 117 days. In the blood, the phagocytic activity of neutrophils (PAN), the phagocytic index (PhI) and the phagocytic number (PhN) were determined in accordance with the Methodical Recommendations for the Assessment and Correction of the Immune Status of Animals [11] and the metabolic activity of phagocytes — according to the reduction reaction of nitroblue tetrazolium in vitro (NBT test) upon interaction with intact (spNBT) and stimulated (stNBT) with pyrogenal peripheral blood neutrophils. The indicators of neutrophil activation reserve (RI) was calculated using the formula: $RI = stNBT/spNBT$ [12]. Serum lysozyme (SLA) and complementary (SCA) activity was determined in accordance with the Methodical Recommendations for the Assessment and Correction of Nonspecific Resistance of Animals [13], the amount of total immunoglobulins (Ig) — in accordance with the Methods of Veterinary

Clinical Laboratory Diagnostics [14], the content of circulating immune complexes (CIC) — according to the Methodical Recommendations for the Assessment and Correction of the Immune Status of Animals [11], the pathogenicity coefficient of CIC was calculated by the ratio $PC = C7/C3$ [15].

Statistical processing of the obtained data was carried out using the Microsoft Excel and Statistica v10 application package, and reliability was assessed using the Student’s test.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

In the piglets of the experimental group at the age of 55 days, 6 days after the administration of the vaccine against CSF (Table 1), an increase was noted in serum lysozyme (by 9.1 %) and complementary (by 84.8 %) activity, compared to the previous values (33 days), indicating an increase in nonspecific humoral protection. Moreover, their values exceeded those in the intact animals by 4.2 and 73.8 %, respectively, in which only SLA increased by 31.8 %.

The content of total immunoglobulins in the piglets of both groups did not undergo significant changes, while their level in the vaccinated animals was higher by 3.0 %.

The concentration of giant (3.0 %) and small (7.0 %) circulating immune complexes in the piglets of the experimental group increased by 17.1 and 12.2 %, respectively, and the pathogenicity coefficient ($C7/C3$) decreased by 2.6 %. Moreover, their values exceeded those in the intact animals by 46.4 %, 58.6 and 7.5 %, which indicated a higher antigenic load.

Table 1

Indicators of nonspecific resistance of piglets

Indicators	Age (days), groups			
	55		63	
	control	experimental 6 days after vaccination against CSF	control	experimental 14 days after vaccination against CSF
1	2	3	4	5
SLA, $\mu\text{g/ml}$	2.7 ± 0.80	2.8 ± 0.14	3.0 ± 0.14	2.9 ± 0.16
SCA, % hem.	7.5 ± 0.36	$13.1 \pm 1.20^*$	7.8 ± 0.24	$7.2 \pm 0.47^+$
Total Ig, mg/ml	19.9 ± 0.72	20.4 ± 1.77	$23.2 \pm 0.85^+$	$24.4 \pm 0.93^+$
CIC3.0 %, mg/ml	0.28 ± 0.02	$0.41 \pm 0.02^*$	0.29 ± 0.02	$0.43 \pm 0.016^*$
CIC7.0 %, mg/ml	0.29 ± 0.011	$0.46 \pm 0.02^*$	0.28 ± 0.029	$0.49 \pm 0.09^*$

Table 1 (the end)

1	2	3	4	5
C7/C3, c. u.	1.06 ± 0.09	1.14 ± 0.07	0.99 ± 0.06	1.14 ± 0.05*
PAN, %	82.4 ± 0.75	81.6 ± 1.17	82.0 ± 0.89	81.2 ± 1.55
PhI, c. u.	5.7 ± 0.10	6.1 ± 0.14*	5.8 ± 0.12	6.3 ± 0.16*
PhN, c. u.	4.7 ± 0.12	5.1 ± 0.11*	4.4 ± 0.11	5.2 ± 0.15*
spNBT, %	18.8 ± 1.02	24.4 ± 0.75*	20.4 ± 0.75	29.6 ± 1.70**
stNBT, %	38.8 ± 0.49	46.2 ± 0.89*	41.6 ± 0.98 ⁺	58.4 ± 1.17**
RI, c. u.	2.09 ± 0.10	1.87 ± 0.08	2.02 ± 0.04	1.98 ± 0.06

* $P < 0.05$ $P < 0.001$ relative to the unvaccinated piglets⁺ $P < 0.05$ $P < 0.001$ relative to the previous period

In the absence of changes in the number of circulating active phagocytes in the piglets of the experimental group, their absorption function increased: phagocytic index — by 9.5 %, phagocytic number — by 16.6 % and metabolic activity of spNBT — by 8.9 % and stNBT — by 11.6 %, exceeding those in the intact animals by 7.2, 8.9, 29.8 and 19.1 %, for which the values of the last three indicators increased to a lesser extent by 8.5 %, 6.8 and 3.2 %. An increase in the absorption and metabolic activity of segmented neutrophils in the piglets of the experimental group is combined with activation of the complement system involved in the process of phagocytosis. The indicator of the reserve of functional activity of neutrophils (RI) did not change in them, but was less than in the intact animals by 10.5 % due to an increase in PhI, PhN, spNBT and stNBT.

In the piglets of the experimental group, 14 days after the administration of the vaccine against CSF and 3 days after vaccination against swine erysipelas and in the intact animals at the age of 63 days (Table 1), an increase was noted in SLA values by 3.3 and 14.0 %, respectively, compared to the previous indicators, due to the need to reduce the antigenic load and the content of total immunoglobulins by 19.4 and 16.9 %, indicating the intense functioning of the humoral immunity. In the vaccinated piglets, there was a decrease in SCA by 44.5 %, due to the expenditure on the CIC formation and an increase in phagocytosis, with a slight increase in its value in the intact animals. Comparing the indicated humoral indicators in the experimental piglets, it should be noted that in the animals of the

experimental group, SLA and SCA were lower by 5.6 and 6.6 %, respectively, and the content of total immunoglobulins was higher by 5.2 %. They also had a higher concentration of giant and small CIC and their pathogenicity — by 48.3, 75.0 and 15.2 %, which was associated with a high antigenic load.

In the piglets of the experimental group, PhI was higher than in the intact animals by 9.3 %, PhN — by 16.5 %, spNBT — by 45.1 % and stNBT — by 40.4 %, which indicated a more pronounced nonspecific cellular protection in them.

Repeated administration of the vaccine against erysipelas (85 days) and classical swine fever (100 days) affected the nonspecific resistance of animals.

In the piglets of the experimental group, 5 days after vaccination against erysipelas and in the intact animals at the age of 90 days, SLA indicators decreased by 4.2 and 10.9 %, compared to the previous ones due to the consumption of the enzyme for the inactivation of circulating bacterial pathogens, and in the latter, the SCA — by 4.1 %, but the content of total immunoglobulins increased by 54.9 and 49.4 %, while the value of SCA and total immunoglobulins in the immunized piglets exceeded by 14.8 and 9.4 %, which indicated a more pronounced humoral protection (Table 2).

With a general tendency in the animals of both groups to decrease giant CIC by 27.6 and 25.6 %, and increase small CIC by 21.4 and 12.2 %, and the pathogenicity coefficient — by 66.7 and 53.5 %, their values in the vaccinated piglets were greater by 52.4 %, 61.8 and 6.1 %, indicating a higher antigenic load.

Table 2

Indicators of nonspecific resistance of piglets

Indicators	Age (days), groups			
	90		98	
	control	experimental 5 days after vaccination against erysipelas	control	experimental 13 days after vaccination against erysipelas
SLA, µg/ml	2.7 ± 0.17	2.7 ± 0.11	2.4 ± 0.29	2.9 ± 0.05
SCA, % hem.	7.4 ± 0.22	8.5 ± 0.68	8.0 ± 0.35	8.8 ± 0.47
Total Ig, mg/ml	34.7 ± 1.01 ⁺	37.8 ± 1.03 ^{*+}	36.6 ± 0.54	40.6 ± 1.42 [*]
CIC3.0 %, mg/ml	0.21 ± 0.02 ⁺	0.32 ± 0.03 ^{*+}	0.23 ± 0.008	0.28 ± 0.02 [*]
CIC7.0 %, mg/ml	0.34 ± 0.02	0.55 ± 0.04 [*]	0.31 ± 0.02	0.50 ± 0.02 [*]
C7/C3, c. u.	1.65 ± 0.15 ⁺	1.75 ± 0.15 ⁺	1.36 ± 0.08	1.83 ± 0.14 [*]
PAN, %	83.6 ± 1.17	88.2 ± 1.17 ^{*+}	82.0 ± 0.89	86.0 ± 1.41 [*]
PhI, c. u.	5.9 ± 0.26	7.7 ± 0.21 ^{*+}	6.0 ± 0.17	7.5 ± 0.15 [*]
PhN, c. u.	4.9 ± 0.18 ⁺	6.8 ± 0.15 ^{*+}	4.9 ± 0.12	6.4 ± 0.11 [*]
spNBT, %	21.2 ± 0.86	34.8 ± 1.53 ^{*+}	20.6 ± 0.98	33.2 ± 0.92 [*]
stNBT, %	43.0 ± 2.88	68.4 ± 0.66 ^{*+}	41.2 ± 2.42	64.0 ± 0.94 ^{*+}
RI, c. u.	2.04 ± 0.16	1.96 ± 0.09	2.03 ± 0.20	1.96 ± 0.02

* $P < 0.05$ $P < 0.001$ relative to the unvaccinated piglets⁺ $P < 0.05$ $P < 0.001$ relative to the previous period

In the animals of the experimental group, PAN increased by 8.6 %, the absorption function of neutrophils: PhI — by 21.1 %, PhN — by 31.7 %, which was associated with the activation of their complement and opsonization of the bacterium with antibodies, and the metabolic activity of phagocytes: spNBT — by 17.6 and stNBT — by 17.1 %, exceeding those of the intact piglets by 5.5 %, 30.4, 37.8, 64.2 and 59.1 %, respectively, which indicated a more pronounced nonspecific cellular protection in them. However, they had less functional cell reserve by 3.9 %.

In the animals of the experimental group at the age of 98 days, 13 days after repeated administration of the bacterial antigen of the erysipelas vaccine, SLA increased by 6.2 %, SCA — by 3.0 % and the content of total immunoglobulins — by 7.3 %, while their values exceeded those of the intact animals by 21.8 %, 9.6

and 10.8 %, respectively, in which SLA decreased by 11.5 %, but SCA and the content of total immunoglobulins increased by 7.9 and 5.9 % (Table 2).

In the animals of the experimental group, the concentration of giant and finely dispersed CIC decreased by 12.5 and 9.1 %, but the pathogenicity coefficient increased by 4.6 %, while their values exceeded those of the intact piglets by 21.7 %, 61.3 and 34.6 %, respectively, in which the level of giant CIC increased by 9.5 %, and small CIC and the pathogenicity coefficient decreased by 8.8 and 17.6 %. The results obtained indicate a higher antigenic load in the animals of the experimental group.

The number of active phagocytic neutrophils, their absorption function and metabolic activity, as well as the functional indicator of cell reserve in the experimental piglets did not undergo significant changes,

compared to the previous indicators. At the same time, the values of PAN, PhI, PhN, spNBT and stNBT in the vaccinated animals exceeded those in the intact piglets by 4.9 %, 24.4, 30.4, 61.2 and 55.3 %, which indicated a more pronounced cellular protection in them. But an increased antigenic load can lead to a decrease in the activity of the cellular link of nonspecific defense in the piglets of the experimental group, as evidenced by a smaller (by 3.4 %) value of the functional reserve of phagocytic cells.

In the piglets of the experimental group at the age of 105 days, five days after the administration of the vaccine against CSF (Table 3), SLA, SCA and the content of total immunoglobulins did not undergo significant changes, compared to the previous values, but exceeded those in the intact animals by 7.5 %, 19.8 and 13.2 %, respectively, in which SLA increased by 12.6 %, and SCA decreased by 6.9 %. With a gener-

al trend of an increase in the piglets of both groups in the content of giant CIC by 8.7 and 32.1 % and small CIC — by 3.2 and 18.0 %, and a decrease in the pathogenicity coefficient by 2.9 and 12.6 %, their values in the animals of the experimental group were exceeded by 48.0 %, 84.4 and 21.2 %. In them, the number of active phagocytic neutrophils and their absorption function, PhI and PhN did not undergo significant changes, and metabolic activity increased spNBT by 7.2 and stNBT — by 6.3 %, while their values exceeded those in the intact piglets by 7.2 %, 32.3, 41.7, 85.4 and 57.4 %, respectively, in which the absorptive function of PhI cells decreased by 5.5 %, PhN — by 4.5 %, and from metabolic activity: spNBT — by 6.8 %, with an increase in stNBT by 4.9 %. In the animals of the experimental group, the functional reserve of phagocytic cells decreased slightly and was by 15.0 % less than in the intact piglets, in which it increased by 11.3 %.

Table 3

Indicators of nonspecific resistance of piglets

Indicators	Age (days), groups			
	105		117	
	unvaccinated	experimental 5 days after vaccination against CSF	unvaccinated	experimental 17 days after vaccination against CSF
SLA, µg/ml	2.7 ± 0.26	2.9 ± 0.29	3.0 ± 0.13	2.9 ± 0.13
SCA, % hem.	7.5 ± 0.84	9.0 ± 0.99	8.3 ± 0.40	8.2 ± 0.45
Total Ig, mg/ml	35.9 ± 1.58	40.6 ± 0.93*	44.5 ± 2.07 ⁺	37.5 ± 3.07
CIC3.0 %, mg/ml	0.25 ± 0.01	0.37 ± 0.02* ⁺	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.02 ⁺
CIC7.0 %, mg/ml	0.32 ± 0.02	0.59 ± 0.02* ⁺	0.40 ± 0.03 ⁺	0.42 ± 0.05 ⁺
C7/C3, c. u.	1.32 ± 0.07	1.60 ± 0.07*	1.51 ± 0.10	1.43 ± 0.11
PAN, %	82.8 ± 1.02	88.8 ± 1.02*	81.6 ± 1.72	88.4 ± 1.33*
PhI, c. u.	5.7 ± 0.06	7.5 ± 0.09*	5.3 ± 0.39	6.7 ± 0.19* ⁺
PhN, c. u.	4.7 ± 0.06	6.7 ± 0.10*	4.4 ± 0.26	6.1 ± 0.17* ⁺
spNBT, %	19.2 ± 0.68	35.6 ± 1.47*	21.2 ± 1.02	38.8 ± 2.67*
stNBT, %	43.2 ± 2.06	68.0 ± 0.93* ⁺	42.0 ± 1.67	62.0 ± 1.42* ⁺
RI, c. u.	2.26 ± 0.07	1.92 ± 0.05*	2.01 ± 0.05 ⁺	1.62 ± 0.11* ⁺

* $P < 0.05$

$P < 0.001$ relative to the unvaccinated piglets

⁺ $P < 0.05$

$P < 0.001$ relative to the previous period

In the animals of the experimental group at the age of 117 days, 17 days after the administration of the vaccine against CSF (Table 3), SLA did not change, compared to the previous indicator, and SCA and the content of total immunoglobulins decreased by 7.9 and 7.7 %, respectively, while the values of SLA and SCA did not differ from those in the intact piglets, and the level of total immunoglobulins was by 15.8 % lower. In the latter, the indicators of humoral protection increased by 11.2 %, 10.8 and 24.0 %, respectively.

The concentration of giant and small CIC and the pathogenicity coefficient in the animals of the experimental group decreased by 21.6 %, 28.8 and 10.6 %, respectively, and in the intact piglets increased by 8.0 %, 25.0 and 14.4 %, while among vaccinated animals the CIC values were higher by 7.4 and 5.0 %, and the pathogenicity coefficient was lower by 5.3 %.

The number of active phagocytic cells in the animals of both groups did not change, and the absorption function decreased: PhI — by 6.9 and 11.3 %, and PhN — by 6.6 and 8.8 %, while their values in the piglets of the experimental group were higher by 8.3 %, 26.0 and 38.3 %, respectively.

With a general tendency in the animals of both groups to increase of spNBT by 10.4 and 9.0 %, decrease of stNBT by 2.8 and 8.8 %, and the functional reserve of phagocytic cells — by 11.1 and 15.6 %, the values of spNBT and stNBT in the piglets of the experimental group were higher by 83.0 and 74.6 %, and the reserve indicator was lower by 19.4 %.

CONCLUSION

The studies conducted on the piglets vaccinated against classical swine fever and erysipelas, in comparison with the intact animals, have established the following.

1. An increase in serum lysozyme and complementary activity and the content of total immunoglobulins 5—6 days after the first and second administration of the vaccine against CSF and vaccination against erysipelas, indicating a high tension of the humoral link of nonspecific protection.

2. A decrease in serum lysozyme and complementary activity 14 days after the first injection of the CSF vaccine and the content of total immunoglobulins 17 days after its repeated injection, associated with the need to reduce the antigenic load.

3. An increase in the concentration of giant and small circulating immune complexes and their pathogenicity coefficient after the first administration of the CSF vaccine and immunization against erysipelas,

which is associated with a large supply of antigens and insufficient elimination of CIC.

4. A decrease in the pathogenicity coefficient of circulating immune complexes 17 days after repeated administration of the CSF vaccine, due to the accumulation of “antibodies.”

5. An increase in the phagocytic index, phagocytic number, spontaneous and stimulated NBT test, indicating an increase in the absorption function and metabolic activity of neutrophils, with a tendency towards a decrease in the index of their stimulation, characterizing a decrease in the adaptation reserves of phagocytic cells.

REFERENCES

1. *Maksimov G. V.* Natural resistance of pigs under industrial rearing technology / G. V. Maksimov, O. N. Polozyuk, E. I. Fedyuk, E. A. Kryshpov // *Veterinariya (Veterinary Medicine)*. — 2010. — No. 9. — P. 43—47.
2. *Orlyankin B. G.* Innate and adaptive antiviral immunity / B. G. Orlyankin, O. A. Verkhovskiy, T. I. Aliper // *Veterinariya (Veterinary Medicine)*. — 2023. — No. 4. — P. 3—12. — DOI 10.30896/0042—4846.2023.26.4.03—11.
3. *Popov V. S.* Relationship between factor infections and secondary immunodeficiencies during nonspecific immunocorrection in pigs / V. S. Popov, N. V. Vorobyeva, P. A. Filippov // *Agrarnyy vestnik Yugo-Vostoka (Agrarian Bulletin of the South-East)*. — 2018. — No. 1(18). — P. 41—44.
4. *Retskiy M. I.* Molecular and biochemical mechanisms of stress and adaptation / M. I. Retskiy, V. S. Buzlama, B. L. Zharkoy, Yu. V. Vodolazskiy // *Ekologo-adaptatsionnaya strategiya zashchity zdorovya i produktivnosti zhivotnykh v sovremennykh usloviyakh (Ecological and adaptation strategy for protecting the health and productivity of animals in modern conditions)*. — 2001. — P. 29—85.
5. *Vostroilova G. A.* Biochemical and immune status of piglets under weaning stress and its pharmacocorrection with aminoseleton / G. A. Vostroilova, N. A. Khokhlova, T. E. Lobodina [et al.] // *Veterinarnaya patologiya (Veterinary pathology)*. — 2015. — No. 1(51). — P. 69—75
6. *Shakhov A. G.* The state of nonspecific immunity in piglets under the influence of technological stress / A. G. Shakhov, L. Yu. Sashnina, Yu. Yu. Vladimirova, N. V. Karmanova // *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. — 2020. — No. 2(11). — P. 166—176. — DOI 10.17238/issn2541—8203.2020.2.166.
7. *Shlyapnikova Z. G.* Development of endotoxemia in the body of piglets during a stress reaction / Z. G. Shlyapnikova, R. E. Kiseleva, L. P. Teltsov, E. Yu. Boyarkina // *Morfologicheskie vedomosti (Morphological news)*. — 2007. — No. 3—4. — P. 216—219.
8. *Grechukhin A. N.* Practical guide to veterinary treatments on pig breeding farms / A. N. Grechukhin // *St. Petersburg*. — 2010. — 408 p.

9. *Shevtsov A.* Classical swine fever: prospects for eradication / *A. Shevtsov* // *Zhivotnovodstvo Rossii (Animal husbandry of Russia)*. — 2021. — No. 10. — P. 27—30.

10. *Tyurenkov I. N.* Effect of immunization on adaptation mechanisms during chronic stress in animals / *I. N. Tyurenkov, I. S. Filina, B. Yu. Gumilevskiy, E. V. Volotova, D. A. Bakulin* // *Fundamentalnye issledovaniya (Fundamental Researches)*. — 2014. — No. 7—2. — P. 368—371.

11. *Shakhov A. G.* Methodical recommendations for assessing and correcting the immune status of animals / *A. G. Shakhov, Yu.N. Masyanov, M. I. Retskiy [et al.]* // *Voronezh*. — 2005. — 115 p.

12. *Shabunin S. V.* Effect of aminoseleton on the state of the prooxidant and antioxidant blood systems in sows / *S. V. Shabunin, A. G. Shakhov, G. A. Vostroilova et al.* // *Dostizheniya nauki i tekhniki APK (Achievements of science and technology of the agro-industrial complex)*. —

2019. — No. 7. — P. 71—74. — DOI 10.24411/0235-2451-2019-10716

13. *Shakhov A. G.* Methodical recommendations for the assessment and correction of nonspecific resistance in animals / *A. G. Shakhov, Yu.N. Masyanov, M. I. Retskiy [et al.]* // *New methods of research on the problems of veterinary medicine. Part III. "Research methods on the problems of non-contagious pathology in productive animals."* — M.: RASKhN. — 2007. — P. 174—215.

14. *Kondrakhin I. P.* Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics/ *I. P. Kondrakhin, A. V. Arkhipov, V. I. Levchenko, G. A. Talanov, L. A. Frolova, V. E. Novikov* // M.: Kolos. — 2004. — 520p.

15. *Skibo, Yu.V.* Characteristics of circulating immune complexes in the blood serum of patients with atopic bronchial asthma of varying severity / *Yu.V. Skibo [et al.]* // *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal (Kazan Medical Journal)*. — 2013. — V. 94, No. 5. — P. 744—748

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. G. Shakhov — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Chief Scientific Associate;

L. Yu. Sashnina — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;

V. N. Kotsarev — Doctor of Veterinary Sciences, Principal Scientific Associate;

Yu.Yu. Vladimirova — Candidate of Veterinary Sciences, Junior Scientific Associate;

G. V. Nikonenko — Junior Scientific Associate.

The article was submitted 21.09.2023.

Научная статья

УДК 619:636.8:616—006

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.73

ПРИМЕНЕНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА ГИДРОХЛОРИДА В ПОСТОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ ПРИ ОСТЕОСАРКОМЕ КОШЕК

Наталья Алексеевна Малахова*✉, Андрей Петрович Лищук*,
Ольга Геннадьевна Пискунова*, Наталья Викторовна Клейменова*,
Иван Сергеевич Клейменов**

*Орловский государственный аграрный университет имени Н. В. Парахина, Орел, Россия

**Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева, Орел, Россия, malahova-n@mail.ru✉

Аннотация. Проблема злокачественных новообразований, к сожалению, с каждым годом становится все актуальнее. Применение в медицинской практике для терапии злокачественных опухолей препаратов доксорубина насчитывает несколько десятилетий, в ветеринарной медицине подобная терапия и в настоящее время применяется не часто. При этом доказана эффективность препарата в терапии многих злокачественных опухолей, в том числе, положительный эффект в отношении остеосарком. Целью исследования явилось изучение влияния доксорубина гидрохлорида в постоперационном периоде на общее состояние и некоторые морфологические и биохимические показатели крови кошек с диагнозом остеосаркома с возможной оценкой прогностических факторов развития болезни.

Диагноз на остеосаркому ставился комплексно, учитывались анамнестические данные, рентгенография и патогистологическое исследование. В исследовании проанализированы результаты пяти кошек в возрасте 7—9 лет с подтвержденным диагнозом остеосаркома (дистальный и проксимальный отделы плечевой кости) на фоне ампутации конечности и применения доксорубина гидрохлорида. В контрольную группу ($n = 5$) были включены кошки такого же возраста, без явной патологии. Препарат вводили на 0,9 % растворе хлорида натрия внутривенно медленно четырехкратно с интервалом 7 дней, дозу доксорубина гидрохлорида определяли из расчета 10 мг/м^2 площади тела животного. Первоначально препарат вводили на седьмой день после оперативного вмешательства. Кровь брали до лечения, через один месяц и через шесть месяцев после начала лечения.

Оценивали изменение количества форменных элементов крови (эритроцитов, лейкоцитов), гемоглобина и некоторых биохимических показателей щелочной фосфатазы (ЩФ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ). При саркомах у животных отмечается изменение морфологического статуса крови, хотя подобные изменения могут быть крайне незначительными. Изменения количественного состава форменных элементов крови неспецифичны, возможен лейкоцитоз, как признак воспалительного процесса, так и лейкопения на фоне проводимого лечения химиотерапевтическими препаратами.

Установлено, что применение доксорубина гидрохлорида на фоне ампутации конечности снижает частоту отдаленных метастазов, продлевает сроки выживаемости, не сказывается критическим образом на морфологическом и биохимическом статусе крови.

Ключевые слова: новообразования, химиотерапия, кошки, остеосаркома, доксорубина гидрохлорид

В последние годы сохраняется тенденция роста заболеваемости злокачественными новообразованиями в мире и России [1—4].

Опухоли скелета, особенно злокачественные, занимают важное место в современной клинической онкологии. Для саркомы костей характерно агрессивное течение и раннее гематогенное метастазирование, при этом подобные опухоли плохо

поддаются лечению и требуют тяжелых (калечащих) операций. У собак, уже при первичном комплексном клиническом исследовании метастазы находили в 10 % случаев, а при аутопсии в 30 % [5].

Авторы не располагают статистической информацией о распространенности и структуре данного вида опухоли в патологии онкологических заболеваний кошек в условиях региона, однако доступная

информация (архив историй болезни) клиники, на базе которой проводились исследования, показывает схожие данные с доступными российскими и зарубежными исследованиями, которых крайне мало. В частности, большинство верифицированных остеосарком располагались в аппендикулярном скелете и являются сравнительно редким видом злокачественной опухоли для кошек [6].

На долю остеосарком приходится порядка 70—80 % всех первичных новообразований костной ткани, в то же время в структуре злокачественных опухолей она занимает всего около 1 % случаев. Остеосаркомы могут локализоваться как в аксиальной, так и в аппендикулярной частях скелета. Считается, что остеосаркомы с аксиальным расположением дают менее благоприятный прогноз, чем локализующиеся в костях аппендикулярного скелета. У кошек остеосаркомы аппендикулярной части скелета менее агрессивны, чем у собак, поэтому радикальные операции (ампутация) могут давать положительный результат [6, 7].

В современных высокотехнологичных условиях все чаще прибегают к органосохраняющим операциям, однако, даже радикальные методы (ампутация конечности) не исключают отдаленного метастазирования опухоли, по некоторым данным, частота подобных метастазов может составлять до 40 % случаев, что указывает на необходимость детального контроля за состоянием прооперированных животных и применения дополнительных методов лечения и коррекции. Особенно это относится к «массивным», низкодифференцированным опухолям. Чаще всего метастазы обнаруживают в легких, реже опухоль метастазирует в кости, головной мозг и др. [7, 8].

Вышесказанное трактует определенные тактики в лечении больных животных, а именно проведение комбинированного лечения. В частности, возможно комбинировать блок неoadъювантной терапии, хирургическое лечение и блок адъювантной терапии. Только хирургическое лечение не всегда эффективно, так в медицинской практике у 80—90 % пациентов в течении 1,5 лет после операции регистрируются метастазы.

Подобные данные приведены в отношении собак — среднее время выживаемости при лечении только путем ампутации или удаления опухоли не превышает 5 месяцев, при этом у большинства животных развиваются метастазы [8—10].

В настоящее время в ветеринарной медицине все чаще применяется комбинированное лечение онкологических заболеваний: хирургическое

и лучевое, химиотерапевтическое или гормональное. Химиотерапию рассматривают как высокотехнологичный метод лечения злокачественных новообразований, основанный на введении в организм антинеопластических химиотерапевтических препаратов.

Одним из препаратов с широким спектром противоопухолевой активности является доксорубин гидрохлорид. По экономическим соображениям, ввиду относительно небольшой цены в сравнении с другими препаратами, препараты доксорубина довольно широко применяются в моно- и комплексной терапии многих видов опухолей [11].

Сравнительно низкая частота опухолей костей у животных в структуре онкологических заболеваний в то же время делает эту патологию «удобной» моделью в проведении аналитических исследований и тщательного изучения всех аспектов этиологии и патогенеза опухоли для совершенствования методов диагностики и терапии [5].

Цель работы — изучить влияние доксорубина гидрохлорида на общее состояние и некоторые морфологические показатели крови кошек с диагнозом остеосаркома в постоперационном периоде с возможной оценкой прогностических факторов развития болезни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на кошках ($n = 5$) возрастом 7—9 лет, поступивших в ветеринарную клинику ФГБОУ ВО Орловский ГАУ им. Н. В. Парахина в период 2018—2022 гг. Все животные были домашними, иммунизированы в установленные сроки комплексными поливалентными вакцинами.

Диагноз устанавливали комплексно, основываясь на результатах анамнестических данных, клинических и лабораторных исследований. Учитывали общее состояние (габитус, поведение, прием пищи, температура тела), проводили местное исследование патологического очага (визуальный осмотр, пальпация).

Лабораторная и инструментальная диагностика включала в себя рентгенографию в прямой и боковой проекциях на аппарате PLX-102, патоморфологическое исследование биопсийного материала и образцов опухоли костной ткани, иссеченной из операционного материала по общепринятой методике, морфологическое и биохимическое исследование некоторых показателей крови. Всем жи-

вотным по показаниям проведена экзартикуляция грудной конечности в плечевом суставе (2 случая левая грудная конечность, 3 случая правая грудная конечность).

Проводили адьювантную химиотерапию доксорубицином гидрохлоридом. Препарат вводили на

0,9 % растворе хлорида натрия внутривенно медленно четырехкратно с интервалом 7 дней, дозу доксорубицина гидрохлорида определяли из расчета 10 мг/м² площади тела животного (табл. 1). Первая инъекция препарата проведена через 7 дней после проведения операции.

Таблица 1

Расчет дозы доксорубицина гидрохлорида по площади поверхности тела

Животные	Порода	Возраст, лет	Вес, кг	Поверхность тела, м ²	Доза, мг
Кот 1	Беспородная	7	3,6	0,235	2,4
Кошка 2	Британская короткошерстная	7	3,2	0,217	2,3
Кот 3	Беспородная	8	3,8	0,244	2,4
Кошка 4	Беспородная	8	3,7	0,236	2,4
Кот 5	Сиамская	9	3,0	0,208	2,1

Для профилактики рвоты, одной из наиболее часто встречающихся нежелательных реакций доксорубицина гидрохлорида, в день введения препарата назначали препарат маропитанта цитрат подкожно 1 раз в сутки в дозе 1 мг/кг массы животного. Однако, несмотря на это, у кошки с весом 3,0 кг проявлялось токсическое действие после первых двух инъекций препарата.

Перед первым введением доксорубицина гидрохлорида, через один месяц и через шесть месяцев после первого введения препарата проводили оценку клинического статуса животных, брали кровь для проведения гематологических и биохимических исследований.

Исследование крови проводилось по методикам и в условиях лаборатории «Vet Union». В крови определяли количество лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, в сыворотке крови — содержание щелочной фосфатазы (ЩФ), активность аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ).

Время жизни после постановки диагноза контролировали у всех пяти животных, точкой отсчета принимали начало химиотерапии. Наряду с лабораторными исследованиями в эти же периоды проводили оценку общего состояния животного, рентгенологическое и УЗИ исследования для выявления метастазирования.

Полученные данные подвергали статистической обработке при помощи пакета прикладных программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При оценке анамнестических данных и физикальном исследовании клиническая картина остеосаркомы у животных представлялась триадой симптомов: пальпируемая (растущая) опухоль, боль в пораженном месте и нарушение функции конечности (усиливающаяся по мере роста опухоли). Положение пораженной конечности щадящее (не наступают). Местно, в области тумора гиперемия, температура повышена, при пальпации консистенция плотная, выраженная сильная болезненность. Подвижность в соседнем суставе ограничена. Наследственный анализ опухоли проследить не представлялось возможным. Средняя давность заболевания с момента появления первых клинических признаков составила 74 дня.

При рентгенологическом исследовании отмечали обширные очаги остеодеструкции, остеолит, остеосклероз, продолжающийся за пределами кости на мягкие ткани, очаг деструкции имел неровные контуры, определялись признаки отслойки надкостницы. Рентгенологическое исследование грудной клетки и УЗИ исследование органов брюшной полости не выявили метастатических поражений органов [12].

В предоперационный период у всех животных была проведена толстоигольная биопсия из внекостного компонента опухоли, после операции по удалению опухоли было проведено детальное патогистологическое исследование материала

из массива опухоли ампутированной конечности. Микроскопически опухоли представлены атипичными новообразованными костными структурами с ярко выраженным клеточным полиморфизмом. Характерным, является образование остеоида в виде костных балочек, иногда в виде крупных полей, в которых позиционируются очаги обызвествления [12].

В постоперационный период перед началом химиотерапии общее состояние всех животных удо-

влетворительное, основные показатели в пределах физиологической нормы. В области шва — незначительная гиперемия, отек и выделения отсутствуют. Со слов хозяев отмечено умеренное потребление корма, животные подвижны, активно реагируют на различные раздражители.

Результаты морфологического и биохимического исследования некоторых показателей крови животных на разных этапах исследования представлены в таблицах 2—4.

Таблица 2

Морфологические и биохимические показатели крови кошек перед применением доксорубина гидрохлорида

Показатели	Единицы измерения	Референсный интервал	Контроль (n = 5)	Кошки перед применением доксорубина гидрохлорида
Эритроциты	10 ¹² /л	5—10	8,1 ± 0,39	5,9 ± 0,11**
Гемоглобин	г/л	80—150	112,4 ± 4,08	89,0 ± 2,35**
Лейкоциты	10 ⁹ /л	5,5—18	9,37 ± 1,10	20,68 ± 0,60**
ЩФ	Ед/л	10—92	65,2 ± 7,39	103,4 ± 3,86*
АсАТ	Ед/л	10—56	37,6 ± 3,99	64,2 ± 3,43**
АлАТ	Ед/л	10—85	52,4 ± 8,71	88,2 ± 1,16*

* $P < 0,005$

** $P < 0,001$ — по отношению к показателям контрольной группы

Как следует из данных таблицы 2, у кошек перед применением доксорубина гидрохлорида количество эритроцитов и гемоглобина было ниже показателей животных контрольной группы на 27,2 % ($P < 0,001$) и 20,8 % ($P < 0,001$) соответственно, при этом количество лейкоцитов было повышено — в 2,2 раза ($P < 0,001$). Отмечали изменения и в биохимических показателях крови — уровни ЩФ, АсАТ и АлАТ были повышены на 58,6 % ($P < 0,005$), 70,4 % ($P < 0,001$) и 68,3 % ($P < 0,005$) соответственно. Представленные изменения по всей видимости объясняются обширной, травмирующей операцией в ближайшей ретроспективе.

При анализе гематологических и биохимических показателей через один месяц после начала химиотерапии (3 дня после последней инфузии) обращает на себя внимание резкое снижение количества лейкоцитов в 5,2 раза ($P < 0,001$) и повышение уровня щелочной фосфатазы на 74,5 % ($P < 0,001$), АсАТ на 37,8 % ($P < 0,001$), АлАТ на 23,8 % ($P < 0,001$) (табл. 3). Подобная картина

возможна ввиду токсического действия доксорубина на лейкоцитопоз и гепатоциты [8].

При этом, несмотря на имеющиеся литературные данные о серьезном угнетении эритропоэтической функции, количество эритроцитов и гемоглобина в крови было даже несколько больше, чем у животных перед применением химиотерапевтического препарата — эритроцитов на 13,6 % ($P < 0,05$), гемоглобина на 2,0 % [8]. Лабораторные исследования через шесть месяцев после начала химиотерапии показывают стабилизацию всех исследуемых показателей относительно данных на момент окончания химиотерапии (табл. 4). Количество эритроцитов увеличилось на 16,1 % ($P < 0,05$), уровень гемоглобина — на 26,2 % ($P < 0,001$), содержание лейкоцитов достоверно возросло почти в 3 раза ($P < 0,001$). Снизились показатели ЩФ, АсАТ и АлАТ в 2,0 ($P < 0,001$), 3,0 ($P < 0,001$) и 1,9 раза ($P < 0,001$) соответственно, что указывает на восстановление поврежденных клеток печени и стабилизацию костномозгового кроветворения.

Таблица 3

Морфологические и биохимические показатели крови кошек после окончания курса химиотерапии доксорубицином гидрохлоридом

Показатели	Единицы измерения	Контроль (n = 5)	Перед применением доксорубицина	Через 1 месяц после начала терапии
Эритроциты	10 ¹² /л	8,1 ± 0,39	5,9 ± 0,11	6,7 ± 0,32*
Гемоглобин	г/л	112,4 ± 4,08	89,0 ± 2,35	90,8 ± 2,35
Лейкоциты	10 ⁹ /л	9,37 ± 1,10	20,68 ± 0,60	3,98 ± 0,15**
ЩФ	Ед/л	65,2 ± 7,39	103,4 ± 3,86	180,4 ± 10,74**
АСТ	Ед/л	37,6 ± 3,99	64,2 ± 3,43	88,2 ± 3,81**
АЛТ	Ед/л	52,4 ± 8,71	88,2 ± 1,16	109,2 ± 4,85**

* P < 0,05

** P < 0,001 — по отношению к показателям перед началом химиотерапии

Таблица 4

Морфологические и биохимические показатели крови кошек через 6 месяцев после окончания курса химиотерапии доксорубицином гидрохлоридом

Показатели	Единицы измерения	Контроль (n = 5)	Через 1 месяц после начала терапии	Через 6 месяцев после начала терапии
Эритроциты	10 ¹² /л	8,1 ± 0,39	6,7 ± 0,32	7,78 ± 0,34*
Гемоглобин	г/л	112,4 ± 4,08	90,8 ± 2,35	114,6 ± 4,68**
Лейкоциты	10 ⁹ /л	9,37 ± 1,10	3,98 ± 0,15	11,3 ± 0,42**
ЩФ	Ед/л	65,2 ± 7,39	180,4 ± 10,74	84,6 ± 1,66**
АсАТ	Ед/л	37,6 ± 3,99	88,2 ± 3,81	26,8 ± 4,80**
АлАТ	Ед/л	52,4 ± 8,71	109,2 ± 4,85	56,4 ± 9,46**

* P < 0,05

** P < 0,001 — по отношению к показателям после окончания химиотерапии

Через шесть месяцев у всех животных со слов хозяев поведение было адекватное, животные полностью адаптировались к перемещению на трех конечностях. Общее состояние удовлетворительное. Рентгенография и УЗИ диагностика не выявила метастазов в легких и органах брюшной полости.

Через 12 месяцев опрос хозяев не выявил жалоб на поведение, прием пищи и общие реакции у четырех животных. Одна кошка погибла на фоне прогрессирующей кахексии. При аутопсии выявлены множественные метастазы в легких.

Через 18 месяцев у оставшихся четырех животных состояние удовлетворительное, картина кро-

ви близка картине крови контрольной группы. При рентгенографии грудной клетки и УЗИ исследования органов брюшной полости метастазы не обнаружены. В дальнейшем связь с хозяевами животных по различным причинам была утеряна.

Таким образом, анализ продолжительности жизни и безметастатического периода показал, что шестимесячный отрезок пережили 100 % животных, двенадцать и восемнадцать месяцев — 80 % животных. Применение доксорубицина гидрохлорида по предложенной схеме способствует значительному прогрессу продолжительности жизни и увеличению сроков безметастатического периода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение доксорубина гидрохлорида в качестве препарата адъювантной химиотерапии на фоне ампутации пораженной конечности значительно снижает частоту отдаленных метастазов и способствует длительной ремиссии. В предложенной дозировке доксорубин гидрохлорид не оказывает выраженного супрессивного действия на показатели крови кошек. В представленных случаях у животных наблюдали снижение количества лейкоцитов и повышение активности щелочной фосфатазы, аспартат- и аланинаминотрансфераз. Через шесть месяцев после лечения данные показатели стабилизировались и соответствовали референсным значениям.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Jemal A.* Global cancer statistics /A. Jemal, F. Bray, M. Melissa, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman // *CA: a cancer journal for clinicians* — 2011. — V. 61. — № 2. — P. 69—90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>
2. *Magrath I.* Pediatric cancer in low-income and middle-income countries / I. Magrath, E. Steliarova-Foucher, E. Sidnei, R. C. Ribeiro, M. Harif, C-K. Li, R. Kebudi, S.D. McFarlane, S.C Howard // *Lancet Oncol.* — 2013. — V. 14. — I.3 -E.104—116. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70008-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70008-1)
3. *Bray F.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries/ F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal // *CA: a cancer journal for clinicians.* 2018. V. 68. № 6. P. 394—424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
4. *Sung H.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray // *Cancer Journal for Clinicians.* — 2021. — Vol. 71. — № 3. — P. 209—249.
5. *Митин В. Н.* Сравнительные результаты различных методов лечения остеосаркомы длинных трубчатых костей у собак: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2003. — 45 с.
6. *Heldman E.* Feline Osteosarkoma: 145 Cases (1990—1995) / E. Heldman, MA Anderson, C. Wagner-Mann // *Journal of the American Animal Hospital Association.* — 2000. — 2000 Nov-Dec;36(6):518—21. doi: 10.5326/15473317-36-6-518
7. *Nakano Y.* Outcome of appendicular or scapular osteosarcoma treated by limb amputation in cats: 67 cases (1997—2018) / Y. Nakano, Y. Kagawa, Y. Shimoyama, T. Yamagami, K. Nomura, H. Wakabayashi, Y. Sugiyama, & T. Kobayashi // *Journal of the American Veterinary Medical Association.* — 2022- Vol. 260. — S1- P. 24—28. <https://doi.org/10.2460/javma.21.04.0213>
8. *Якунина М. Н.* Консервативное лечение спонтанной остеосаркомы у собак: автореф. дис. ... к-та биол. наук. — М., 2006. — 23с.
9. *Федченко А. А.* Практические рекомендации по лечению первичных злокачественных опухолей костей (остеосаркомы, саркомы Юинга) / А. А. Федченко, А. Ю. Боян, В. А. Горбунова, А. Н. Махсон, В. В. Тепляков // *Злокачественные опухоли.* — 2021. — Т. 10. — № 3S2. — С. 283—295.
10. *Voerman I. et al.* Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma—a meta-analysis // *BMC veterinary research.* — 2012. — Т. 8. — № 1. — С. 1—12.
11. *Абрамов М. Е.* Доксорубин: вклад в современную противоопухолевую терапию/ М. Е. Абрамов, А. Ю. Машелуева, Е. И. Чичиков// *Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология.* — 2010. — № 3. — С. 46—49.
12. *Митрохина Н. В.* Особенности патоморфологической диагностики остеосаркомы у собак / Н. В. Митрохина, Ю. А. Ватников // *Ветеринарная патология.* — 2013. — № 4. — С. 72—78.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

- Н. А. Малахова** — кандидат ветеринарных наук, доцент, зав. кафедрой анатомии, физиологии и хирургии;
А. П. Лищук — кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры анатомии, физиологии и хирургии;
О. Г. Пискунова — кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, физиологии и хирургии;
Н. В. Клейменова — кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, физиологии и хирургии;
И. С. Клейменов — кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии.

Статья поступила в редакцию 16.10.2023 г.

USE OF DOXORUBICIN HYDROCHLORIDE IN THE POSTOPERATIVE PERIOD IN CASE OF FELINE OSTEOSARCOMA

Natalya Alekseevna Malakhova*✉, Andrey Petrovich Lishchuk*,
Olga Gennadyevna Piskunova*, Natalya Viktorovna Kleymenova*,
Ivan Sergeevich Kleymenov**¹

*Orel State Agrarian University named after N. V. Parakhin, Orel, Russia, malahova-n@mail.ru✉

**Orel State University named after I. S. Turgenev, Orel, Russia

Abstract. The problem of malignant neoplasms, unfortunately, becomes more and more urgent every year. The use of doxorubicin drugs in medical practice for the treatment of malignant tumors dates back several decades; in veterinary medicine, such therapy is not often used at present. At the same time, the efficacy of the drug in the treatment of many malignant tumors has been proven, including a positive effect against osteosarcomas. The objective of the research was to study the effect of doxorubicin hydrochloride in the postoperative period on the general condition and some blood morphological and biochemical indicators of cats diagnosed with osteosarcoma with a possible assessment of prognostic factors for the disease development.

The diagnosis of osteosarcoma was made comprehensively, taking into account anamnestic data, radiography and pathohistological examination. The study analyzed the results of five cats aged 7—9 years with a confirmed diagnosis of osteosarcoma (distal and proximal humerus) following limb amputation and the use of doxorubicin hydrochloride. The control group ($n = 5$) included cats of the same age, without obvious pathology. The drug was administered intravenously in a 0.9 % sodium chloride solution slowly four times with an interval of 7 days; the dose of doxorubicin hydrochloride was determined at the rate of 10 mg/m² of the animal's body area. Initially, the drug was administered on the seventh day after surgery. Blood was taken before treatment, one month and six months after the treatment onset.

The changes in the number of blood cells (erythrocytes, leukocytes), hemoglobin and some biochemical indicators of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were assessed. In case of sarcomas in animals, there is a change in the blood morphological status, although such changes can be extremely insignificant. The changes in the quantitative composition of blood cells are nonspecific; leukocytosis is possible, as a sign of an inflammatory process, as well as leukopenia during treatment with chemotherapy drugs.

It has been established that the use of doxorubicin hydrochloride against the background of limb amputation reduces the frequency of distant metastases, prolongs survival, and does not critically affect the blood morphological and biochemical status.

Keywords: neoplasms, chemotherapy, cats, osteosarcoma, doxorubicin hydrochloride

INTRODUCTION

In recent years, the trend towards an increase in the incidence of malignant neoplasms in the world and in Russia has continued [1—4].

Skeletal tumors, especially malignant ones, occupy an important place in modern clinical oncology. Bone sarcoma is characterized by an aggressive course and early hematogenous metastasis, while such tumors are difficult to treat and require severe (mutilating) operations. In dogs, even during the initial comprehensive

clinical study, metastases were found in 10 % of cases, and during autopsy — in 30 % [5].

The authors do not have statistical information on the prevalence and structure of this type of tumor in the pathology of oncological diseases of cats in the region, however, the available information (archive of case histories) of the clinic, on the basis of which the studies were conducted, shows similar data with available Russian and foreign studies, which are very few. In particular, the majority of verified osteosarco-

mas were located in the appendicular skeleton and are a relatively rare type of malignant tumor in cats [6].

Osteosarcoma accounts for about 70—80 % of all primary bone tumors, while at the same time it accounts for only about 1 % of cases in the structure of malignant tumors. Osteosarcoma can be localized in both the axial and appendicular parts of the skeleton. It is believed that osteosarcomas with an axillary location give a less favorable prognosis than those localized in the bones of the appendicular skeleton. In cats, osteosarcomas of the appendicular part of the skeleton are less aggressive than in dogs, so radical operations (amputation) can give a positive result [6, 7].

In modern high-tech conditions, organ-preserving operations are increasingly being resorted to, however, even radical methods (amputation of a limb) do not exclude distant metastasis of the tumor; according to some data, the frequency of such metastases can be up to 40 % of cases, which indicates the need for detailed monitoring of the condition of the operated animals and the use of additional methods of treatment and correction. This especially applies to “massive”, poorly differentiated tumors. Most often, metastases are found in the lungs; less often, the tumor metastasizes to the bones, brain, etc. [7,8].

The above describes certain tactics in the treatment of sick animals, namely, combined treatment. In particular, it is possible to combine a block of neoadjuvant therapy, surgical treatment and a block of adjuvant therapy. Surgical treatment alone is not always effective; in medical practice, metastases are registered in 80—90 % of patients within 1.5 years after surgery.

Similar data are provided for dogs — the average survival time when treated only by amputation or tumor removal does not exceed 5 months, while the metastases develop in the majority of animals [8, 9,10].

Currently, combined treatment of oncological diseases is increasingly used in veterinary medicine: surgical and radiation, chemotherapy or hormonal.

Chemotherapy is considered as a high-tech method of treating malignant neoplasms, based on the introduction of antineoplastic chemotherapeutic drugs into the body.

One of the drugs with a wide spectrum of antitumor activity is doxorubicin hydrochloride. For economic reasons, due to the relatively low price compared to other drugs, doxorubicin drugs are quite widely used in mono- and complex therapy of many types of tumors [11].

The relatively low frequency of bone tumors in animals in the structure of oncological diseases at the same time makes this pathology a “convenient” mod-

el for conducting analytical studies and careful study of all aspects of the etiology and pathogenesis of the tumor to improve diagnostic methods and therapy [5].

The objective of the work is to study the effect of doxorubicin hydrochloride on the general condition and some blood morphological indicators of cats diagnosed with osteosarcoma in the postoperative period with a possible assessment of prognostic factors for the disease development.

MATERIAL AND METHODS

The studies were conducted on cats ($n = 5$) aged 7—9 years, admitted to the veterinary clinic of FSBEI HE “Orel State Agrarian University named after N. V. Parakhin” in the period 2018—2022. All animals were domestic animals, immunized in a timely manner with complex polyvalent vaccines.

The diagnosis was made comprehensively, based on the results of anamnestic data, clinical and laboratory studies. The general condition (habitus, behavior, food intake, body temperature) was taken into account and a local examination of the pathological focus was carried out (visual examination, palpation). Laboratory and instrumental diagnostics included radiography in frontal and lateral projections using a PLX-102 device, pathomorphological examination of biopsy material and bone tumor samples excised from surgical material using a generally accepted method, morphological and biochemical examination of some blood indicators. All animals underwent disarticulation of the thoracic limb in the shoulder joint as needed (2 cases — left thoracic limb, 3 cases — right thoracic limb).

Adjuvant chemotherapy with doxorubicin hydrochloride was performed. The drug was administered intravenously in a 0.9 % sodium chloride solution slowly four times with an interval of 7 days; the dose of doxorubicin hydrochloride was determined at the rate of 10 mg/m² of the animal’s body area (Table 1). The first injection of the drug was performed 7 days after the operation.

To prevent vomiting, one of the most common adverse reactions of doxorubicin hydrochloride, on the day of drug administration, maropitant citrate was prescribed subcutaneously once a day at a dose of 1 mg/kg of animal weight. However, despite this, a cat weighing 3.0 kg showed toxic effects after the first two injections of the drug.

Before the first administration of doxorubicin hydrochloride, one month and six months after the first administration of the drug, the clinical status of the animals was assessed, and blood was taken for hematological and biochemical studies. The blood test was

carried out according to the methods and conditions of the Vet Union laboratory. The number of leukocytes, erythrocytes and hemoglobin in the blood was deter-

mined; the content of alkaline phosphatase (ALP) and the activity of alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST) were determined in the blood serum.

Table 1

Calculation of doxorubicin hydrochloride dose based on body surface area

Animals	Breed	Age, years	Weight, kg	Body surface, m ²	Dose, mg
Male cat 1	Outbred	7	3.6	0.235	2.4
Female cat 2	British Shorthair	7	3.2	0.217	2.3
Male cat 3	Outbred	8	3.8	0.244	2.4
Female cat 4	Outbred	8	3.7	0.236	2.4
Male cat 5	Siamese	9	3.0	0.208	2.1

The survival time after diagnosis was monitored in all five animals; the starting point was the start of chemotherapy. Along with laboratory tests, during the same periods, an assessment of the general condition of the animal, X-ray and ultrasound examinations were carried out to detect metastasis.

The obtained data were subjected to statistical processing using the Microsoft Excel application package.

RESULTS

When assessing the anamnestic data and physical examination, the clinical picture of osteosarcoma in animals was a triad of symptoms: a palpable (growing) tumor, pain in the affected area and impaired limb function (increasing as the tumor grows). The position of the affected limb is gentle (do not step on). Locally, in the area of the tumor there is hyperemia, the temperature is increased, upon palpation the consistency is dense, severe pain is expressed. Mobility in the adjacent joint is limited. It was not possible to trace the hereditary analysis of the tumor. The average duration of the disease from the moment the first clinical signs appeared was 74 days.

An X-ray examination revealed extensive areas of osteodestruction, osteolysis, and osteosclerosis extending beyond the bone into soft tissue; the area of destruction had uneven contours, and signs of periosteal detachment were identified. X-ray examination of the chest and ultrasound examination of the abdominal organs did not reveal metastatic lesions of the organs [12].

In the preoperative period, all animals underwent a core-needle biopsy from the extraosseous component of the tumor; after surgery to remove the tumor, a detailed pathohistological examination of material

from the tumor mass of the amputated limb was carried out. Microscopically, the tumors are represented by atypical newly formed bone structures with pronounced cellular polymorphism. The formation of osteoid in the form of bone trabeculas is typical, sometimes in the form of large fields in which foci of calcification are positioned [12].

In the postoperative period before the start of chemotherapy, the general condition of all animals was satisfactory, the main indicators were within the physiological norm. In the suture area there was slight hyperemia, swelling and discharge are absent. According to the owners, moderate food consumption was noted, the animals were active and actively responded to various stimuli.

The results of morphological and biochemical studies of some blood indicators of animals at different stages of the study are presented in Tables 2—4.

As follows from the data in Table 2, in cats before the use of doxorubicin hydrochloride, the number of erythrocytes and hemoglobin was lower than that of the animals in the control group by 27.2 % ($P < 0.001$) and 20.8 % ($P < 0.001$), respectively, while the number of leukocytes was increased by 2.2 times ($P < 0.001$). The changes in the blood biochemical indicators were also noted. The levels of ALP, AST and ALT were increased by 58.6 % ($P < 0.005$), 70.4 % ($P < 0.001$) and 68.3 % ($P < 0.005$), respectively. The presented changes are apparently explained by an extensive, traumatic operation in the near future.

When analyzing hematological and biochemical indicators one month after the start of chemotherapy (3 days after the last infusion), attention is drawn to a sharp decrease in the number of leukocytes by 5.2 times ($P < 0.001$) and an increase in the level of alka-

line phosphatase by 74.5 % ($P < 0.001$), AST — by 37.8 % ($P < 0.001$), ALT — by 23.8 % ($P < 0.001$) (Table 3). A similar picture is possible due to the toxic effect of doxorubicin on leukocytopoiesis and hepatocytes [8].

Moreover, despite the available literature data on serious inhibition of erythropoietic function, the number of erythrocytes and hemoglobin in the blood was even slightly higher than in the animals before the use of a chemotherapy drug: erythrocytes — by 13.6 % ($P < 0.05$), hemoglobin — by 2.0 % [8].

Laboratory studies six months after the start of chemotherapy show stabilization of all studied indicators relative to the data at the end of chemotherapy (Table 4). The number of erythrocytes increased by 16.1 % ($P < 0.05$), the hemoglobin level — by 26.2 % ($P < 0.001$), the content of leukocytes significantly increased by almost 3 times ($P < 0.001$). The indicators of ALP, AST and ALT decreased by 2.0 ($P < 0.001$), 3.0 ($P < 0.001$) and 1.9 times ($P < 0.001$), respectively, indicating restoration of damaged liver cells and stabilization of bone marrow hematopoiesis

Table 2

Blood morphological and biochemical indicators of cats before the use of doxorubicin hydrochloride

Indicators	Units	Reference interval	Control ($n = 5$)	Cats before using doxorubicin hydrochloride
Erythrocytes	$10^{12}/L$	5—10	8.1 ± 0.39	$5.9 \pm 0.11^{**}$
Hemoglobin	g/L	80—150	112.4 ± 4.08	$89.0 \pm 2.35^{**}$
Leukocytes	$10^9/L$	5.5—18	9.37 ± 1.10	$20.68 \pm 0.60^{**}$
ALP	U/L	10—92	65.2 ± 7.39	$103.4 \pm 3.86^*$
AST	U/L	10—56	37.6 ± 3.99	$64.2 \pm 3.43^{**}$
ALT	U/L	10—85	52.4 ± 8.71	$88.2 \pm 1.16^*$

* $P < 0.005$

** $P < 0.001$ — in relation to the indicators of the control group

Table 3

Blood morphological and biochemical indicators of cats after completion of chemotherapy with doxorubicin hydrochloride

Indicators	Units	Control ($n = 5$)	Before using doxorubicin	1 month after the start of therapy
Erythrocytes	$10^{12}/L$	8.1 ± 0.39	5.9 ± 0.11	$6.7 \pm 0.32^*$
Hemoglobin	g/L	112.4 ± 4.08	89.0 ± 2.35	90.8 ± 2.35
Leukocytes	$10^9/L$	9.37 ± 1.10	20.68 ± 0.60	$3.98 \pm 0.15^{**}$
ALP	U/L	65.2 ± 7.39	103.4 ± 3.86	$180.4 \pm 10.74^{**}$
AST	U/L	37.6 ± 3.99	64.2 ± 3.43	$88.2 \pm 3.81^{**}$
ALT	U/L	52.4 ± 8.71	88.2 ± 1.16	$109.2 \pm 4.85^{**}$

* $P < 0.05$

** $P < 0.001$ — in relation to the indicators before the start of chemotherapy

Table 4

Blood morphological and biochemical indicators of cats 6 months after the end of chemotherapy with doxorubicin hydrochloride

Indicators	Units	Control (n = 5)	1 month after the start of therapy	6 months after the start of therapy
Erythrocytes	10 ¹² /L	8.1 ± 0.39	6.7 ± 0.32	7.78 ± 0.34*
Hemoglobin	g/L	112.4 ± 4.08	90.8 ± 2.35	114.6 ± 4.68**
Leukocytes	10 ⁹ /L	9.37 ± 1.10	3.98 ± 0.15	11.3 ± 0.42**
ALP	U/L	65.2 ± 7.39	180.4 ± 10.74	84.6 ± 1.66**
AST	U/L	37.6 ± 3.99	88.2 ± 3.81	26.8 ± 4.80**
ALT	U/L	52.4 ± 8.71	109.2 ± 4.85	56.4 ± 9.46**

* $P < 0.05$

** $P < 0.001$ — in relation to the indicators after the end of chemotherapy

In six months, according to the owners, all animals had adequate behavior; the animals were completely adapted to moving on three limbs. General condition was satisfactory. X-ray and ultrasound diagnostics did not reveal metastases in the lungs and abdominal organs.

In 12 months, a survey of the owners revealed no complaints about behavior, food intake and general reactions in four animals. One cat died due to progressive cachexia. An autopsy revealed multiple metastases in the lungs.

In 18 months, the remaining four animals were in satisfactory condition, the blood picture was close to the blood picture of the control group. Chest x-ray and ultrasound examination of the abdominal organs did not reveal metastases. Subsequently, the contact with the owners of the animals was lost for various reasons.

Thus, an analysis of life expectancy and the metastasis-free period showed that 100 % of animals survived the six-month period and 80 % of the animals survived twelve and eighteen months. The use of doxorubicin hydrochloride according to the proposed scheme contributes to significant progress in life expectancy and an increase in the length of the metastasis-free period.

CONCLUSION

The use of doxorubicin hydrochloride as an adjuvant chemotherapy drug against the background of amputation of the affected limb significantly reduces the incidence of distant metastases and promotes long-term remission. At the proposed dosage, doxorubicin hydrochloride does not have a pronounced suppressive

effect on the blood indicators of cats. In the presented cases, a decrease in the number of leukocytes and an increase in the activity of alkaline phosphatase, aspartate and alanine aminotransferases were observed in animals. Six months after treatment, these indicators stabilized and corresponded to the reference values.

REFERENCES

1. Jemal A. Global cancer statistics / A. Jemal, F. Bray, M. Melissa, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman // *CA: a cancer journal for clinicians* — 2011. — V. 61. — № 2. — P. 69—90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>
2. Magrath I. Pediatric cancer in low-income and middle-income countries / I. Magrath, E. Steliarova-Foucher, E. Sidnei, R. C. Ribeiro, M. Harif, C-K. Li, R. Kebudi, S.D. McFarlane, S.C Howard // *Lancet Oncol.* — 2013. — V. 14. — I.3 -E.104—116. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70008-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70008-1)
3. Bray F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries/ F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal // *CA: a cancer journal for clinicians.* 2018. V. 68. No.6. P. 394—424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
4. Sung H. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray // *A Cancer Journal for Clinicians.* — 2021. — Vol. 71. — No. 3. — P. 209—249.
5. Mitin V. N. Comparative results of various methods of treating osteosarcoma of long bones in dogs: abstract of a thesis ...Doc. of Biol. Sciences. — M., 2003. — 45 p.
6. Heldman E. Feline Osteosarkoma: 145 Cases (1990—1995) / E. Heldman, MA Anderson, C. Wag-

ner-Mann // Journal of the American Animal Hospital Association. — 2000. — 2000 Nov-Dec;36(6):518—21. doi: 10.5326/15473317—36—6—518.

7. *Nakano Y.* Outcome of appendicular or scapular osteosarcoma treated by limb amputation in cats: 67 cases (1997—2018) / Y. Nakano, Y. Kagawa, Y. Shimoyama, T. Yamagami, K. Nomura, H. Wakabayashi, Y. Sugiyama, & T. Kobayashi // Journal of the American Veterinary Medical Association. — 2022- Vol. 260. — S1- P. 24—28. <https://doi.org/10.2460/javma.21.04.0213>

8. *Yakunina M. N.* Conservative treatment of spontaneous osteosarcoma in dogs: abstract of a thesis ... Cand. of Biol. Sciences. — M., 2006. — 23 p.

9. *Fedchenko A. A.* Practical recommendations for the treatment of primary malignant bone tumors (osteosarcoma, Ewing sarcoma) / A. A. Fedchenko, A. Yu. Bokhyan,

V. A. Gorbunova, A. N. Makhson, V. V. Teplyakov // Zlokestvennyye opukholi (Malignant tumors). — 2021. — Vol. 10. — No. 3S2. — P. 283—295.

10. *Boerman I.* et al. Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma—a meta-analysis // BMC veterinary research. — 2012. — V. 8. — No. 1. — P. 1—12.

11. *Abramov M. E.* Doxorubicin: contribution to modern antitumor therapy / M. E. Abramov, A. Yu. Mashchelueva, E. I. Chichikov // Effektivnaya farmakoterapiya. Onkologiya, gematologiya i radiologiya (Effective pharmacotherapy. Oncology, hematology and radiology). — 2010. — No. 3. — P. 46—49.

12. *Mitrokhina N. V.* Features of pathomorphological diagnosis of osteosarcoma in dogs / N. V. Mitrokhina, Yu. A. Vatnikov // Veterinarnaya patologiya (Veterinary pathology). — 2013. — No. 4. — P. 72—78.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

N. A. Malakhova — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;
A. P. Lishchuk — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;
O. G. Piskunova — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor;
N. V. Kleymenova — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;
I. S. Kleymenov — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor.

The article was submitted 16.10.2023.

Научная статья

УДК 619:636.8:615

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.85

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА КАРТИСИЛАН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИСПЛАЗИИ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА У КОШКИ

Диана Петровна Винокурова*✉, Марина Петровна Семенович**,
Ксения Андреевна Семенович**, Татьяна Вадимовна Тараник*¹

*Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина,
Краснодар, Россия, diana_vp@mail.ru✉

**Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии, Краснодар, Россия

Аннотация. Дисплазию тазобедренного сустава (ДТБС) — можно считать полиэтиологичным заболеванием, имеющим различную степень тяжести. На развитие ДТБС влияют такие факторы, как генетическая предрасположенность, условия жизни, возраст животного и время постановки диагноза. У растущего молодняка перегрузка тазобедренных суставов является еще одним предрасполагающим фактором. При этом компоненты опорно-двигательного аппарата не достигают функциональной зрелости одновременно, что свидетельствует о недостаточности мышц и/или костной системы, и в последствии приводит к неустойчивости сустава. А погрешности в соотношении протеинов, минералов и других необходимых нутриентов, или их недостаток в кормах животного, только способствует развитию патологий опорно-двигательного аппарата. Все это говорит об актуальности проведенного исследования, целью которого было изучение терапевтической эффективности нового препарата картисилан при ДТБС у кошки с ярко выраженными симптомами данной патологии.

Методы. При проведении исследования были использованы методы клинического наблюдения, биохимического анализа крови и рентген диагностика задних конечностей животного в динамике.

Результаты. Эксперимент позволил сделать выводы об эффективности картисилана как терапевтического средства для стабилизации, укрепления и снижения воспалительных процессов пораженных суставов при ДТБС у кошек, а также рекомендовать его в качестве профилактической фармакологической поддержки для предотвращения осложнений, связанных с патологиями опорно-двигательного аппарата в период роста животного.

Ключевые слова: дисплазия тазобедренного сустава, лечение, картисилан, кошки, профилактика, костная патология

Дисплазия тазобедренного сустава или сокращенно ДТБС — это недоразвитие суставной ямки тазовой кости, обусловленное, в основном, наследственными причинами. Для данного заболевания характерна недостаточно глубокая суставная впадина, края которой плохо охватывают головку бедренной кости. При увеличении массы тела животного, как правило, вследствие роста молодого организма, головка бедренной кости начинает смещаться. Это приводит к развитию множества осложнений. Возраст животного и их тяжесть зависят от степени недоразвития суставной впадины. Незначительная степень дисплазии клинически обычно никак не проявляется, но она может

быть обнаружена при рентгенологическом исследовании пораженного сустава пациента. При росте животного из-за перерастяжения капсулы сустава при избыточной подвижности головки бедренной кости в периоды активности животного проявляется самая легкая степень — хронический артрит тазобедренного сустава.

При продолжении процесса воспаления часто происходит утолщение капсулы сустава, по краям суставной ямки появляются костные разрастания, которые углубляют ее, и таким образом, происходит компенсация недоразвития. Самые тяжелые осложнения наблюдаются при более выраженном недоразвитии суставной ямки [5].

© Винокурова Д. П., Семенович М. П., Семенович К. А., Тараник Т. В., 2023

При этом головка бедренной кости не может задержаться в суставной впадине и с нарастанием массы тела при росте молодого организма постепенно из нее все больше и больше выходит — вплоть до полного вывиха тазобедренного сустава. При такой патологии суставы более уязвимы и при незначительных травмах, которые у животных без такой патологии не имели бы ни каких последствий, происходят неожиданные вывихи. Кроме этого, со временем возможно возникновение деформирующего артрита. Он проявляется достаточно сильной болью при движении тазобедренного сустава и выраженной хромотой [1]. У мелких домашних животных различные болезни опорно-двигательного аппарата встречаются часто. В возрастной период 12—24 мес. заболеванию подвержены 44 % кошек, и 56 % собак. При этом оперативное лечение проводится гораздо реже, чем консервативное из-за высокой стоимости и длительного послеоперационного и реабилитационного периода [2—4].

К сожалению, вылечить генетические заболевания хирургическими методами невозможно. Исследования по улучшению качества жизни пациентов с дисплазией проводятся и в ветеринарной, и в гуманитарной медицине. Предлагаются все новые и новые методики по купированию таких процессов. Существует ряд лечебных воздействий, позволяющих приостановить процесс разрушения сустава или замедлить реализацию дисплазии с вторичным остеоартрозом.

Эти воздействия можно разделить на две большие группы — консервативные (медикаментозное) и хирургические. Консервативное лечение в основном направлено на прекращение воспалительных явлений и на восстановление гиалинового хряща сустава (хондропротекторы). Наиболее эффективным способом введения таких препаратов является инъекция внутрь сустава, хотя применяются и внутривенные, и внутримышечные введения. Используется и рассасывающая терапия в виде внутрисуставных введений препаратов, особенно при вторичном остеоартрозе [5]. Однако на данный момент целенаправленной фармакологической терапии и профилактики ДТБС в ветеринарии не существует, поэтому разработка препаратов, способных предотвращать или нивелировать осложнения, связанные с ДТБС, является актуальным направлением ветеринарной фармакологической науки.

Цель исследования: изучение эффективности препарата картисилан при дисплазии тазобедренного сустава у кошки на основе комплексной оценки его терапевтического действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперимент проведен в условиях клиники факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Кубанский ГАУ», куда поступила кошка шотландской породы Боня, возраст 1,4 года с диагнозом остеохондродисплазия (хондро-артропатия) шотландских вислоухих кошек. Основной причиной обращения в клинику явились регулярные вывихи тазобедренного сустава правой конечности, болезненность в области кистей и стоп, агрессивное поведение, при котором животное не позволяло прикасаться к себе, особенно к пораженным участкам.

При клиническом обследовании в области плюсневого сустава было установлено структурное изменение с разрастанием костной ткани и патологическим развитием плюсневых костей (уменьшение их длины) (рис. 1). При рентгенографии выявлено патологическое смещение шейки бедра относительно головки, находящейся в вертлужной впадине (рис. 2), а также дисплазия тазобедренного сустава с правой стороны (рис. 3).



Рис. 1. Кошка Боня, 1,4 года, неправильная постановка лап, увеличение дистальных отделов кистей и стоп

До поступления в клинику терапия животному не проводилась, поэтому после установления диагноза в качестве фармакологической поддержки кошке был назначен препарат картисилан, который задавался перорально в виде порошка с кормом курсом 1 раз в день в дозе 0,5 г/кг протяженности 30 дней.

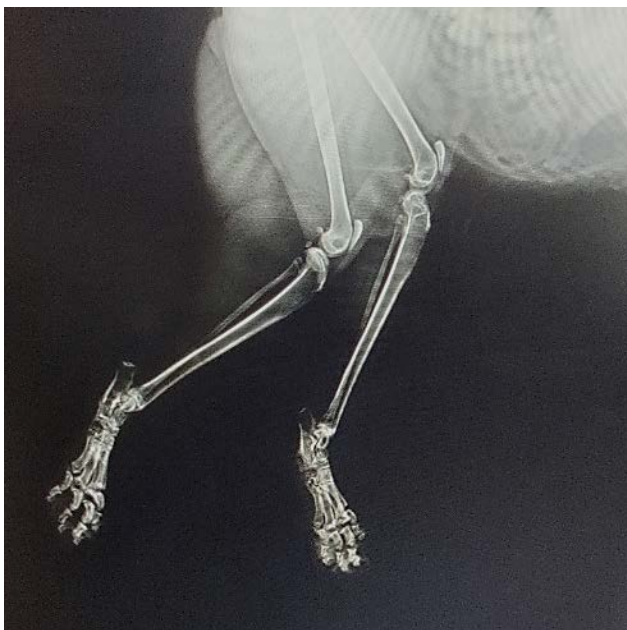


Рис. 2. Рентген тазовых конечностей



Рис. 3. Рентген области тазобедренного сустава, дисплазия с правой стороны

Картисилан представляет собой комплексный препарат, компоненты которого способны воздействовать на многие звенья остео- и хондрогенеза, стимулируя процессы репарации и активизации остеобластов, синтез органического матрикса и кальцификации кости, сопровождающие нарушения двигательной функции и здоровья у животных [6].

В течение эксперимента у кошки в динамике осуществлялся забор крови для проведения биохимического исследования, а также рентгенография для визуализации патологических процессов в тазобедренном суставе, также кистях и стопах задних

конечностей. Биохимические исследования сыворотки крови проводились на анализаторе Sinnova BS-3000P Chemistry Analyzer.

Рентгенодиагностика осуществлялась на аппарате Diagnostic X-ray unit (Южная Корея) в прямой проекции. Кроме этого, в ходе эксперимента регулярно учитывалось общее состояние животного, особенности поведения, координация движений, интенсивность и характер двигательной активности, тонус скелетных мышц, наличие и степень хромоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результатами биохимических исследований сыворотки крови выявлено умеренное увеличение уровня общего белка (на 10,5%), что, учитывая диагноз заболевания, может быть обусловлено длительным воспалительным процессом, характеризующимся увеличением глобулиновых фракций, и в первую очередь, γ -глобулинов (табл. 1).

Кроме того, развитие вторичной остеодистрофии часто сопровождается гиперпротеинемией. Подобный дисбаланс в белковом метаболизме в ряде случаев не связан напрямую с кальций-фосфорным обменом, при котором концентрации данных элементов в сыворотке крови находятся ниже границ референсных пределов. Нормальные значения общего кальция и неорганического фосфора в крови лишь подтверждают гипотезу о том, что в процессе обмена веществ концентрации минералов, даже при их достаточном количестве, не встраиваются в очаг патологического процесса и не улучшают состояние костей и суставов.

Регистрируемая гипергликемия может быть обусловлена стрессовым состоянием, возникающим на фоне манипуляции со взятием крови. Однако следует учесть, что болевая реакция в конечностях на протяжении длительного времени сопровождающая животное и невозможность комфортного естественного движения, а также агрессия, проявляемая кошкой при прикосновениях к задним лапам, способна оказать влияние на концентрацию глюкозы [8].

Однако терапия картисиланом оказала позитивные изменения на ряд биохимических констант крови, что проявилось снижением уровня общего белка, нормализацией концентрации глюкозы, а также умеренным возрастанием активности щелочной фосфатазы, обусловленным восстановлением клеточного матрикса костной ткани [7].

При повторной рентгенографии тазобедренного сустава через месяц применения препарата

выявлено уплотнение в области шейки бедренной кости (рис. 4). В зрелом возрасте невозможно полностью восстановить животное с диагнозом дис-

плазия тазобедренного сустава, однако картисилан позволил улучшить состояние костей, суставов и качество жизни.

Таблица 1

Динамика биохимических показателей сыворотки крови кошки

Показатель	Фоновые значения	Через 30 дней	Границы референсных пределов
Общий белок, г/л	87,3 ↑	84,1	54,0—79,0
Мочевина, ммоль/л	7,3	8,5	5,4—12,1
Креатинин, мкмоль/л	86,7	75,1	70,0—165,0
Глюкоза, ммоль/л	9,2 ↑	4,3	3,3—6,3
Триглицериды, ммоль/л	0,44	0,45	0,38—1,1
Холестерин, ммоль/л	1,9	0,93	1,6—3,9
АсАТ, ЕД/л	32	31	9,0—45,0
АлАТ, ЕД/л	59	62	18,0—79,0
Амилаза, ЕД/л	1147	1063	500,0—1200,0
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	40	64 ↑	0—55,0
Кальций общий, ммоль/л	2,2	1,9	2,0—2,7
Фосфор неорганический, ммоль/л	2,3	1,8	1,1—2,3



Рис. 4. Рентген области тазобедренного сустава после лечения, дисплазия с правой стороны

У кошки нормализовалось общее состояние, движения стали мягче и комфортнее, она перестала проявлять агрессию при прикосновениях к участкам с патологией.

При дальнейшем наблюдении за животным в течении 2 месяцев после прекращения экспери-

мента случаев вывиха тазобедренного сустава выявлено не было, что подтверждает положительное влияние препарата на связки, их эластичность и прочность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, картисилан можно рекомендовать с профилактической целью как медикаментозное средство для предотвращения осложнений, связанных с ДТБС в период роста организма для кошек, находящихся в зоне риска, а также как средство для лечения у взрослых особей как симптоматическое средство для повышения качества жизни.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Оперативная хирургия у животных / Б. С. Семенов, В. Н. Виденин, А. Ю. Нечаев [и др.]. — 3-е изд., доп. — Санкт-Петербург: Лань, 2023. — С. 607.
2. Поносов С. В. Частота встречаемости дисплазии суставов у мелких домашних животных / С. В. Поносов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2020. — № 4(84). — С. 221—224.

3. Keller G. G., Hip dysplasia: a feline population study / G. G. Keller, A. L. Reed, J. C. Lattimer et al. // *Veterinary Radiology & Ultrasound*. — 1999. — Vol. 40. — No. 5. — pp. 460—464.

4. Ортопедические патологии кошек: инцидентность, диагностика, лечение / Л. С. Барсегян, С. А. Ягников, О. А. Кулешова [и др.] // *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные*. — 2016. — № 6. — С. 10—18.

5. Самошкин И. Б. Дисплазия тазобедренных суставов у собак // *ZOO ПАРК*. 1995, № 1. с 42—43

6. Слободяник В. И. Препараты различных фармакологических групп. Механизм действия: учебное пособие / В. И. Слободяник, В. А. Степанов, Н. В. Мельникова. — Санкт-Петербург: Лань, 2021. — С. 179.

7. Гематология: учебник / Ю. Г. Васильев, Е. И. Трошин, А. И. Любимов, Д. С. Берестов. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — С. 217.

8. Курлыкова Ю. А. Клиническая диагностика: учебное пособие / Ю. А. Курлыкова. — Самара: СамГАУ, 2019. — С. 134.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Д. П. Винокурова — кандидат ветеринарных наук, доцент;

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

К. А. Семененко — кандидат экономических наук, старший научный сотрудник отдела фармакологии;

Т. В. Тараник — студентка.

Статья поступила в редакцию 25.09.2023 г.

Original article
UDC 619:636.8:615

EXPERIENCE OF USING THE DRUG KARTISILAN FOR THE TREATMENT OF HIP JOINT DYSPLASIA IN A CAT

Diana Petrovna Vinokurova*[✉], Marina Petrovna Semenenko**,
Kseniya Andreevna Semenenko**, Tatyana Vadimovna Taranik*¹

¹Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia, diana_vp@mail.ru[✉]

²Krasnodar Scientific Center for Zootechnics and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia

Abstract. Hip joint dysplasia (HJD) can be considered a polyetiological disease with varying degrees of severity. The development of HJD is affected by factors such as genetic predisposition, living conditions, age of the animal and time of diagnosis. In growing young animals, overload of the hip joints is another predisposing factor. In this case, the components of the musculoskeletal system do not reach functional maturity at the same time, which indicates insufficiency of the muscles and/or skeletal system, and subsequently leads to instability of the joint. The errors in the ratio of proteins, minerals and other essential nutrients, or their lack in animal feed, only contribute to the development of pathologies of the musculoskeletal system. All this speaks to the relevance of the research, the objective of which was to study the therapeutic efficacy of the new drug kartisilan in case of HJD in a cat with pronounced symptoms of this pathology.

Methods. When conducting the study, the methods of clinical observation, biochemical blood analysis and x-ray diagnostics of the animal's hind limbs in dynamics were used.

Results. The experiment allowed us to draw conclusions about the efficacy of kartisilan as a therapeutic agent for stabilizing, strengthening and reducing inflammatory processes in the affected joints in case of HJD in cats, and also to recommend it as a preventive pharmacological support to prevent complications associated with pathologies of the musculoskeletal system during the growth period of the animal.

Keywords: hip joint dysplasia, treatment, kartisilan, cats, prevention, bone pathology

INTRODUCTION

Hip joint dysplasia (HJD) is an underdevelopment of the articular fossa of the pelvic bone, mainly due to hereditary reasons. This disease is characterized by an insufficiently deep articular cavity, the edges of which do not adequately cover the head of the femur. As an animal's body weight increases, usually due to the growth of a young body, the head of the femur begins to shift. This leads to the development of many complications. The age of the animal and their severity depend on the degree of the articular cavity underdevelopment. A minor degree of dysplasia usually does not manifest itself clinically, but it can be detected by X-ray examination of the patient's affected joint. As the animal grows, due to overstretching of the joint capsule and excessive mobility of the head of the femur during periods of animal's activity, the mildest degree manifests itself — chronic arthritis of the hip joint. As the inflammation process continues, the joint capsule often thickens, bone growths appear

along the edges of the articular fossa, which deepen it, and thus compensation for underdevelopment occurs. The most severe complications are observed with more pronounced underdevelopment of the articular fossa [5]. In this case, the head of the femur cannot remain in the articular cavity and, as the body weight increases and the young body grows, it gradually comes out of it more and more — until the hip joint is completely dislocated. In case of this pathology, the joints are more vulnerable and with minor injuries, which in the animals without such a pathology would not have any consequences, unexpected dislocations occur. In addition, deforming arthritis may develop over time. It is manifested by quite severe pain when moving the hip joint and severe lameness [1].

In small domestic animals, various diseases of the musculoskeletal system are common. In the age period of 12—24 months, the disease affects 44 % of cats and 56 % of dogs. At the same time, surgical treatment is carried out much less frequently than conservative

treatment due to the high cost and long postoperative and rehabilitation period [2—4].

Unfortunately, it is impossible to cure genetic diseases with surgical methods. The research to improve the quality of life of patients with dysplasia is carried out in both veterinary and humane medicine. More and more new methods are being proposed to stop such processes. There are a number of therapeutic effects that can stop the process of joint destruction or slow down the development of dysplasia with secondary osteoarthritis. These effects can be divided into two large groups: conservative (medicinal) and surgical.

Conservative treatment is mainly aimed at stopping inflammation and restoring hyaline cartilage of the joint (chondroprotectors). The most effective way to administer such drugs is by injection into the joint, although intravenous and intramuscular injections are also used. Absorbable therapy in the form of intra-articular injections of drugs is also used, especially in case of secondary osteoarthritis [5].

However, at the moment, there is no targeted pharmacological therapy and prevention of HJD in veterinary medicine, so the design of drugs that can prevent or neutralize complications associated with HJD is a current area of veterinary pharmacological science. **The research objective** was to study the efficacy of the drug kartisilan in case of hip joint dysplasia in cats based on a comprehensive assessment of its therapeutic effect.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out in the clinic of the Faculty of Veterinary Medicine of FSBEI HE “Kuban State Agrarian University”, where a Scottish cat Bonya, age 1.4 years, was admitted with a diagnosis of osteochondrodysplasia (chondroarthropathy) of Scottish Fold cats. The main reason for contacting the clinic was regular dislocations of the hip joint of the right limb, pain in the fore and hind feet, aggressive behavior in which the animal did not allow itself to be touched, especially the affected areas.

A clinical examination in the area of the tarsal joint revealed a structural change with the proliferation of bone tissue and pathological development of the metatarsal bones (reduction in their length) (Fig. 1). X-ray examination revealed a pathological displacement of the femoral neck relative to the head located in the acetabulum (Fig. 2), as well as dysplasia of the hip joint on the right side (Fig. 3).

Before admission to the clinic, the animal was not treated, therefore, after the diagnosis was established, the cat was prescribed the drug kartisilan as pharma-

cological support, which was administered orally in the form of a powder with food in a course of 1 time per day at a dose of 0.5 g/kg for 30 days.



Fig. 1. Bonya cat, 1.4 years old, incorrect positioning of paws, enlargement of the distal parts of its fore and hind feet

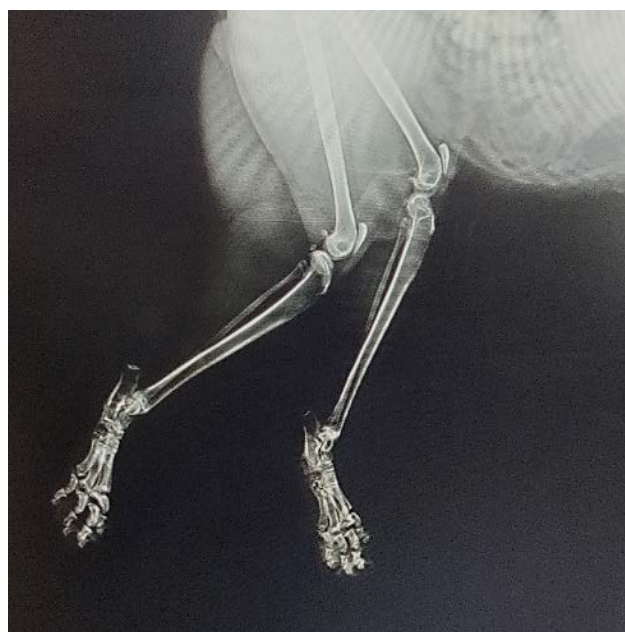


Fig. 2. X-ray of the pelvic limbs

Kartisilan is a complex drug, the components of which are capable of affecting many parts of osteo- and chondrogenesis, stimulating the processes of repair and activation of osteoblasts, the synthesis of organic matrix and bone calcification, which accompany disorders of motor function and health in animals [6].



Fig. 3. X-ray of the hip joint, dysplasia on the right side

During the experiment, blood was collected from the cat over time for biochemical analysis, as well as radiography to visualize pathological processes in the hip joint, as well as the fore and hind feet of the hind limbs. Biochemical studies of blood serum were carried out on the Sinnova BS-3000P Chemistry Analyzer. X-ray diagnostics was carried out using the Diagnostic X-ray

unit (South Korea) in a direct projection. In addition, during the experiment, the general condition of the animal, behavioral characteristics, coordination of movements, intensity and nature of motor activity, skeletal muscle tone and the presence and degree of lameness were regularly taken into account.

RESULTS

The results of biochemical studies of blood serum revealed a moderate increase in the level of total protein (by 10.5 %), which, considering the diagnosis of the disease, may be due to a long-term inflammatory process, characterized by an increase in globulin fractions, and primarily γ -globulins (Table 1).

In addition, the development of secondary osteodystrophy is often accompanied by hyperproteinemia. Such an imbalance in protein metabolism in some cases is not directly related to calcium-phosphorus metabolism, in which the concentrations of these elements in the blood serum are below the reference limits. Normal values of total calcium and inorganic phosphorus in the blood only confirm the hypothesis that in the process of metabolism, the concentrations of minerals, even if they are in sufficient quantities, are not integrated into the focus of the pathological process and do not improve the condition of bones and joints.

Table 1

Dynamics of the blood serum biochemical indicators of the cat

Indicator	Baseline values	In 30 d	Reference limits
Total protein, g/L	87.3 ↑	84.1	54.0—79.0
Urea, mmol/L	7.3	8.5	5.4—12.1
Creatinine, μ mol/L	86.7	75.1	70.0—165.0
Glucose, mmol/L	9.2 ↑	4.3	3.3—6.3
Triglycerides, mmol/L	0.44	0.45	0.38—1.1
Cholesterol, mmol/L	1.9	0.93	1.6—3.9
AST, U/L	32	31	9.0—45.0
ALT, U/L	59	62	18.0—79.0
Amylase, U/L	1147	1063	500.0—1200.0
Alkaline phosphatase, U/L	40	64 ↑	0—55.0
Total calcium, mmol/L	2.2	1.9	2.0—2.7
Inorganic phosphorus, mmol/L	2.3	1.8	1.1—2.3

Recorded hyperglycemia may be due to a stressful state that occurs during the manipulation of blood collection. However, it should be taken into account that the pain reaction in the limbs that accompanies the animal for a long time and the impossibility of comfortable natural movement, as well as the aggression shown by the cat when touching the hind legs, can affect the glucose concentration [8].

However, the therapy with kartisilan had positive changes on a number of blood biochemical constants, which was manifested by a decrease in the level of total protein, normalization of glucose concentration, as well as a moderate increase in the activity of alkaline phosphatase, due to the restoration of the cellular matrix of bone tissue [7].

A repeat X-ray of the hip joint after a month of using the drug revealed compaction in the area of the femoral neck (Fig. 4). In adulthood, it is impossible to completely restore an animal diagnosed with a hip dysplasia, but kartisilan has improved the condition of bones, joints and quality of life.



Fig. 4. X-ray of the hip joint after treatment, dysplasia on the right side

The cat's general condition returned to normal, its movements became softer and more comfortable, it stopped showing aggression when touching areas with pathology.

During further observation of the animal for 2 months after the end of the experiment, no cases of dislocation of the hip joint were identified, which confirmed the positive effect of the drug on the ligaments, their elasticity and strength.

CONCLUSION

Thus, kartisilan can be recommended for prophylactic purposes as a medication to prevent complications associated with HJD during the growth period for cats at risk, as well as a treatment for adult animals as a symptomatic remedy to improve the quality of life.

REFERENCES

1. Operative surgery in animals / B. S. Semenov, V. N. Videnin, A. Yu. Nechaev [et al.]. — 3rd ed., enl. — St. Petersburg: Lan, 2023. — P. 607.
2. Ponosov S. V. Frequency of occurrence of joint dysplasia in small domestic animals / S. V. Ponosov // Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Transactions of Orenburg State Agrarian University). — 2020. — No. 4(84). — P. 221—224.
3. Keller G. G., Hip dysplasia: a feline population study / G. G. Keller, A. L. Reed, J. C. Lattimer et al. // Veterinary Radiology & Ultrasound. — 1999. — Vol. 40. — No. 5. — P. 460—464.
4. Orthopedic pathologies of cats: incidence, diagnosis, treatment / L. S. Barseghyan, S. A. Yagnikov, O. A. Kuleshova [et al.] // Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye (Russian Veterinary Journal. Small domestic and wild animals). — 2016. — No. 6. — P. 10—18.
5. Samoshkin I. B. Hip dysplasia in dogs // ZOO PARK. 1995, No. 1. P. 42—43.
6. Slobodyanik V. I. Drugs of various pharmacological groups. Mechanism of action: textbook / V. I. Slobodyanik, V. A. Stepanov, N. V. Melnikova. — St. Petersburg: Lan, 2021. — P. 179.
7. Hematology: textbook / Yu. G. Vasilyev, E. I. Troshin, A. I. Lyubimov, D. S. Berestov. — St. Petersburg: Lan, 2020. — P. 217.
8. Kurlykova, Yu. A. Clinical diagnostics: textbook / Yu. A. Kurlykova. — Samara: SamGAU (SamSAU), 2019. — P. 134.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- D. P. Vinokurova** — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;
M. P. Semenenko — Doctor of Veterinary Sciences, Head of the Department of Pharmacology;
K. A. Semenenko — Candidate of Economic Sciences, Senior Scientific Associate;
T. V. Taranik — Student.

The article was submitted 25.09.2023.

Научная статья

УДК 619:618.19:636.2]:615.37

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.94

СОСТОЯНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БОЛЬНЫХ СУБКЛИНИЧЕСКИМ МАСТИТОМ КОРОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КОМБИНИРОВАННОЙ МАЗИ «УБЕРОСЕПТ» СОВМЕСТНО С ИММУНОСТИМУЛЯТОРОМ

Александр Романович Перегончий[✉], Ольга Борисовна Павленко,
Виталий Иванович Зимников, Лариса Юрьевна Сашнина,
Ольга Алексеевна Манжурина¹

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, rimpri36@yandex.ru[✉]*

Аннотация. Целью данного исследования было определение состояния неспецифической резистентности молочной железы у коров в сравнительном аспекте под влиянием мази Уберосепт + Миксоферон и камфорной мази + Миксоферон, при терапии мастита у коров. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что после лечения в обеих опытных группах в пробах молока снизилась степень микробной контаминации и количество соматических клеток до референтных значений. В тоже время у животных, которых лечили комбинированной мазью + Миксоферон, общая бактериальная обсемененность снизилась в 10 раз, а количество соматических клеток в 7 раз. При этом наблюдали повышение лизоцима на 35,8 % в секрете молочной железы, снижение количества общих иммуноглобулинов на 64,2 %, и циркулирующих иммунных комплексов на 55,9 %. При исследовании морфологического состава молочной железы было установлено достоверное снижение числа нейтрофилов на 52,6 % и увеличение количества лимфоцитов в 2,1 раза.

Ключевые слова: коровы, комбинированная мазь, иммунитет, субклинический мастит

Обеспечение населения качественной и безопасной продукцией является важнейшей задачей для сельского хозяйства. Одной из наиболее развитых отраслей животноводства является молочное скотоводство. Наиболее частой причиной снижения качества молока и уменьшения его производства является мастит коров. Среди болезней крупного рогатого скота мастит является заболеванием, оказывающим, возможно, самое большое влияние на благополучие животных, а также на экономику хозяйства [1]. В настоящее время введение антибиотиков является наиболее распространенным методом лечения мастита крупного рогатого скота. Однако такая стратегия имеет некоторые недостатки, в том числе отсутствие эффективности лечения в виду появления резистентности возбудителей, а также браковка молока с наличием антибиотика [2, 3]. Однако стоит учитывать, что постоянное введение препаратов внутрь соскового

канала приводит к дисбактериозу и раздражению тканей вымени. В последующем это может привести к существенному снижению молочной продуктивности и развитию маститов грибковой этиологии [4]. Лечение с помощью интрацистернального введения антибиотиков является самым распространенным методом лечения мастита, но далеко не единственным. Одним из самых перспективных является применение трансдермальных средств, которые в своем большинстве представлены мазями. Для лечения субклинического мастита у коров часто применяют раздражающие мази для нанесения на кожу пораженной четверти вымени. В большинстве своем они представлены средствами на основе камфоры, ихтиола, салициловой кислоты, йода и других [5]. Использование трансдермальных препаратов также должно быть комплексным, т. к. применение монотерапии не всегда эффективно при лечении маститов у коров. Поэтому приме-

© Перегончий А. Р., Павленко О. Б., Зимников В. И., Сашнина Л. Ю., Манжурина О. А., 2023

нение комплексной терапии, включающей иммуностимулирующие средства и антимикробные мази, позволяют повысить эффективность проводимых лечебных мероприятий. При создании более эффективных препаратов следует учитывать иммунологические аспекты патогенеза мастита у коров, взаимосвязь локальных факторов защиты вымени и иммунной системы организма животного.

Целью нашего исследования стало изучение влияния комплексной мази и иммуностимулятора на гуморальные и клеточные факторы резистентности молочной железы у коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на коровах больных субклиническим маститом красно-пестрой голштинской и симментальской породы в условиях ООО «Агротех-Гарант» Задонье Рамонского района Воронежской области. Были сформированы 3 группы коров по 10 голов в каждой. Животным первой группы для лечения субклинического мастита наносили комбинированную мазь «Уберосепт» в течение 5 дней, 1 раз в сутки и инъецировали иммуномодулирующий препарат «Миксоферон» согласно наставлению (по 30 доз (3,0 мл) внутримышечно два раза в день на протяжении 7 дней). Коровам второй группы применяли камфорную мазь 10,0 % в течение 5 дней, 1 раз в сутки и также инъецировали «Миксоферон» согласно наставлению. Третья группа являлась группой отрицательного контроля. Мазь наносили после доения, предварительно очистив кожный покров вымени, с соблюдением правил асептики. Оценку состояния неспецифической резистентности молочной железы у коров при применении комплексной мази и иммуностимулятора осуществляли на основании морфо-иммунологических и бактериологических исследований молока, отобранного до и после завершения курса терапии.

Морфологический состав секрета определяли в мазках-отпечатках, которые готовили по методике определения клеточного состава секрета вымени коров, иммунологические исследования секрета вымени проведены общепринятыми методами согласно утвержденным методикам, бактериологические исследования согласно «Методическим указаниям по бактериологическому исследованию молока и секрета вымени коров» (М., 1983). Подсчет соматических клеток в молоке проводили с помощью счетчика соматических клеток фирмы «DeLaval».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве критериев воздействия предложенных схем лечения на гуморальные и клеточные факторы резистентности молочной железы коров были выбраны морфологические показатели, ряд иммунологических показателей секрета молочной железы, а также состав микроорганизмов.

В первой опытной группе в секрете молочной железы было установлено снижение общей бактериальной обсемененности на 92,6 % на первый день после курса лечения. Спустя неделю после окончания лечения общая бактериальная обсемененность незначительно выросла и составила $8,2 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, что на 90,6 % меньше, чем до лечения. Количество соматических клеток на протяжении опыта существенно снизилось в 3,9 раз. Спустя неделю после прекращения лечения количество соматических клеток было ниже в 7,3 раза, чем до лечения. Лизоцим молока через 1 день после окончания лечения был больше на 31,7 %, а через неделю на 35,8 %. Общие иммуноглобулины молока на протяжении опыта в первой группе уменьшались, так после 7-го дня лечения их количество уменьшилось на 14,3 %. А на 14 день после начала лечения на 64,2 %. Количество ЦИК после курса лечения уменьшилось на 19,0 %, в последующем последовало снижение их концентрации до 0,298 мг/мл, что на 55,9 % меньше, чем до лечения. (табл. 1)

В опытной группе № 2 было установлено снижение общей бактериальной обсемененности после 7 дней лечения на 84,7 % и на 86,9 % спустя неделю после последнего дня применения миксоферона. Количество соматических клеток после курса лечения снизилось в 3,7 раза, а спустя неделю после его завершения в 5,7 раза. Наблюдалось повышение лизоцима в секрете молочной железы к 8 дню на 26,8 %, спустя еще неделю он и его содержание составило 0,728 мкг/мл, что на 39,7 % больше, чем до опыта.

Количество общих иммуноглобулинов постепенно снижалось к 8 дню опыта на 29,9 %, а к 14 дню на 56,1 %. С течением опыта количество циркулирующих иммунных комплексов во второй опытной группе снижалось на 18,1 %, а в последующем на 32,5 %. (табл. 1)

В группе контроля наблюдали постепенное увеличение общей бактериальной обсемененности до 200,0 %. Количество соматических клеток также увеличилось на 72,1 %. Среди иммунологических показателей стоит отметить рост ЦИК на 91,7 %.

Таблица 1

Показатели неспецифической резистентности секрета молочной железы

Показатель	До опыта	После лечения, на 8 день	Спустя неделю после опыта
1-я опытная группа			
Общая бак. обсемененность, КОЕ/мл	$8,7 \cdot 10^5 \pm 3,5$	$6,4 \cdot 10^4 \pm 2,1$	$8,2 \cdot 10^4 \pm 0,9$
Количество соматических клеток тыс/мл	$2968,0 \pm 46,7$	$743,5 \pm 21,7$	$406,5 \pm 29,8$
Лизоцим, мкг/мл	$0,461 \pm 0,03$	$0,675 \pm 0,02$	$0,718 \pm 0,03$
Общие ИГ молока, мг/мл	$4,19 \pm 0,3$	$3,59 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,2$
ЦИК молока, мг/мл	$0,675 \pm 0,02$	$0,547 \pm 0,004$	$0,298 \pm 0,02$
2-я опытная группа			
Общая бак. обсемененность, КОЕ/мл	$3,21 \cdot 10^5 \pm 0,3$	$4,9 \cdot 10^4 \pm 0,2$	$4,2 \cdot 10^4 \pm 0,2$
Количество соматических клеток тыс/мл	$3133,0 \pm 52,0$	$846,7 \pm 32,1$	$553,3 \pm 30,6$
Лизоцим, мкг/мл	$0,521 \pm 0,02$	$0,661 \pm 0,01$	$0,728 \pm 0,02$
Общие ИГ молока, мг/мл	$7,4 \pm 0,1$	$5,19 \pm 0,1$	$3,25 \pm 0,2$
ЦИК молока, мг/мл	$0,570 \pm 0,02$	$0,467 \pm 0,03$	$0,385 \pm 0,05$
Контроль			
Общая бак. обсемененность, КОЕ/мл	$2,4 \cdot 10^5 \pm 0,1$	$5,1 \cdot 10^5 \pm 0,2$	$7,2 \cdot 10^5 \pm 0,3$
Количество соматических клеток тыс/мл	$2798,21 \pm 144,13$	$3989,7 \pm 46,9$	$4815,61 \pm 37,2$
Лизоцим, мкг/мл	$0,519 \pm 0,03$	$0,675 \pm 0,02$	$0,420 \pm 0,01$
Общие ИГ молока, мг/мл	$5,09 \pm 0,3$	$6,35 \pm 0,3$	$6,77 \pm 0,2$
ЦИК молока, мг/мл	$0,423 \pm 0,01$	$0,667 \pm 0,03$	$0,811 \pm 0,03$

Анализируя полученные результаты исследования секрета молочной железы, можно сделать вывод о мобилизации иммунной системы. Об этом свидетельствует снижение количества циркулирующих иммунных комплексов, повышение лизоцимной активности и постепенное снижение количества общих иммуноглобулинов. Вследствие действия последних факторов наблюдалось снижение микробной контаминации секрета молочной железы [6, 7]. Уменьшение количества соматических клеток напрямую связано со снижением количества циркулирующих иммунных комплексов [8].

При исследовании морфологического состава молочной железы было установлено снижение числа нейтрофилов в первой группе на 52,6 %, во второй на 27,9 % (табл. 2). Также стоит отметить увеличение количества лимфоцитов в первой группе в 2,1 раз, во второй на 65,7 %. Таким образом, изменения морфологического состава секрета молоч-

ной железы имеет решающее значение. Важным является не количество клеток, а их видовой состав, т. к. количество соматических клеток в молоке и их дифференциация по видам могут служить дополнительными критериями при прогнозе и мониторинге распространения мастита.

Интерферон, содержащийся в Миксофероне воздействует на клеточные звенья иммунной системы: стимулирует литическую активность лимфоцитов, специфических цитотоксичных Т-лимфоцитов и макрофагов, влияет на образование специфических антител В-лимфоцитами и стимулирует выработку собственного интерферона альфа. Наряду с этим количество лимфоцитов в контрольной группе незначительно уменьшалось, а нейтрофилов увеличивалось. Увеличение числа лимфоцитов, а также снижение сегментоядерных нейтрофилов свидетельствует об угасании воспалительных процессов и выздоровлении молочной железы [6, 9].

Таблица 2

Морфологический состав секрета молочной железы

№ группы	Дни отбора	Нейтрофилы		Эозиноф.	Моноц.	Лимфоц.
		Палочкояд.	Сегментояд.			
1	До опыта	1,0 ± 0,02	65,3 ± 8,4	0,3 ± 0,01	1,0 ± 0,02	32,3 ± 9,0
	7 день после окончания лечения	0,8 ± 0,01	31,0 ± 7,4	1,75 ± 0,02	0	66,5 ± 7,3
2	До опыта	0,6 ± 0,01	68,4 ± 8,4	1,0 ± 0,01	1,2 ± 0,02	28,9 ± 3,2
	7 день после окончания лечения	0	49,3 ± 2,4	1,5 ± 0,03	1,25 ± 0,1	47,9 ± 2,5
3	До опыта	0,5 ± 0,01	63,1 ± 3,3	2,0 ± 0,03	1,2 ± 0,01	33,0 ± 3,1
	7 день после окончания опыта	1,3 ± 0,01	66,4 ± 2,6	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,02	29,3 ± 2,6

До опыта в группе № 1 из пяти проб *Staph. aureus* был выделен в 4 пробах, в двух были выделены возбудители *Klebsiella pneumoniae*, 1 проба с *Ent. faecicum* и 1 проба *Staph. epidermidis*, *E. coli*. В группе № 2 и контроля в 3 пробах обнаружены *E. coli*, *Staph. aureus*, в 1 пробе *Klebsiella pneumoniae*. В группе контроля в 3 пробах выявили *Staph. aureus*, в 2 пробах *Klebsiella pneumoniae*, *Staph. epidermidis*, *Ent. faecicum* (рис. 1).

Для наблюдения динамики освобождения вымени от возбудителей мастита после лече-

ния были отобраны пробы от этих же животных. В группе № 1 *Staph. aureus* выделен в 4 пробах, *Klebsiella pneumoniae*, *Staph. epidermidis*, *Ent. faecicum*, были обнаружены в пробах от трех животных. В группе № 2 *Staph. aureus* выявлен у трех животных, *E. coli* обнаружена в двух пробах, у одной коровы обнаружен возбудитель *Klebsiella pneumoniae*. В группе контроля в 3 пробах обнаружен *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis* выявлен у трех животных, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Ent. faecicum* выделены из трех разных проб (рис. 2).

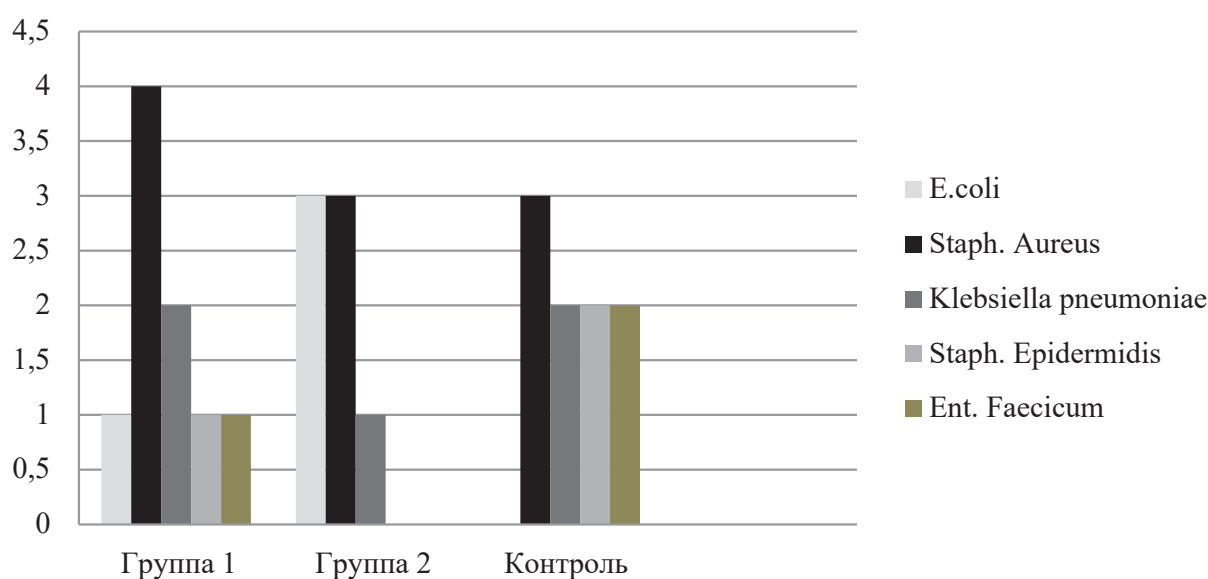


Рис. 1. Состав микрофлоры до лечения

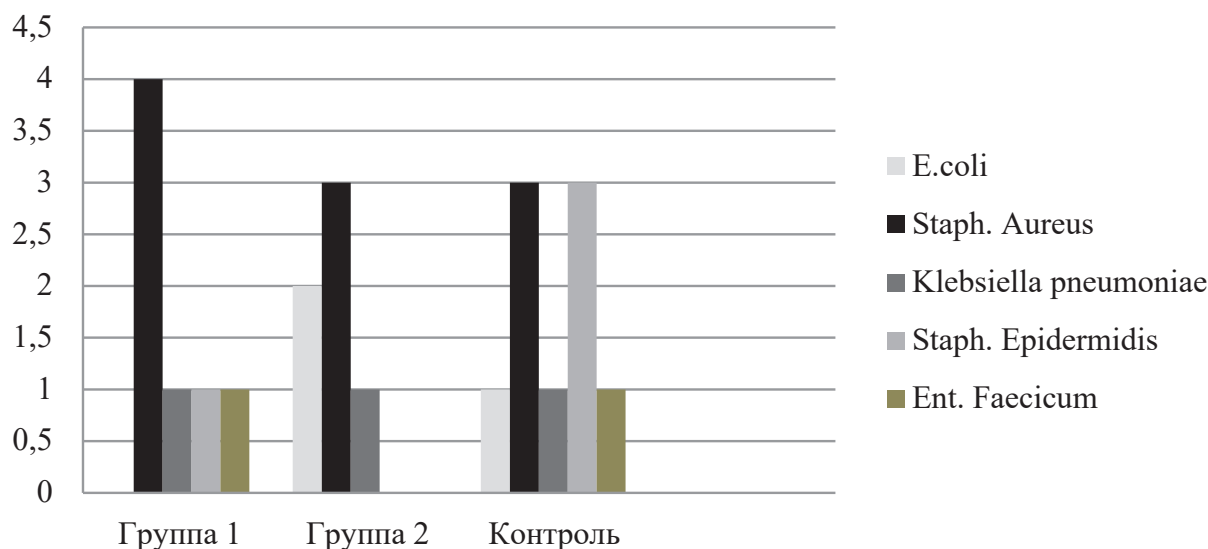


Рис. 2. Состав микрофлоры после лечения

Спустя неделю после окончания лечения в группе № 1 из 5 проб удалось выделить возбудителя *Staph. aureus* только в 4 пробах, в одной пробе патогенные микроорганизмы не обнаружены. В группе № 2 *Staph. aureus* был обнаружен у трех коров, *E.coli*

у двух животных, в одной пробе обнаружен возбудитель *Klebsiella pneumoniae*. В группе контроля в 3 пробах выявлен *Staph. aureus*, *E.coli* и *Staph. epidermidis* были обнаружены у двух животных, *Klebsiella pneumoniae* обнаружен в одной пробе (рис. 3).

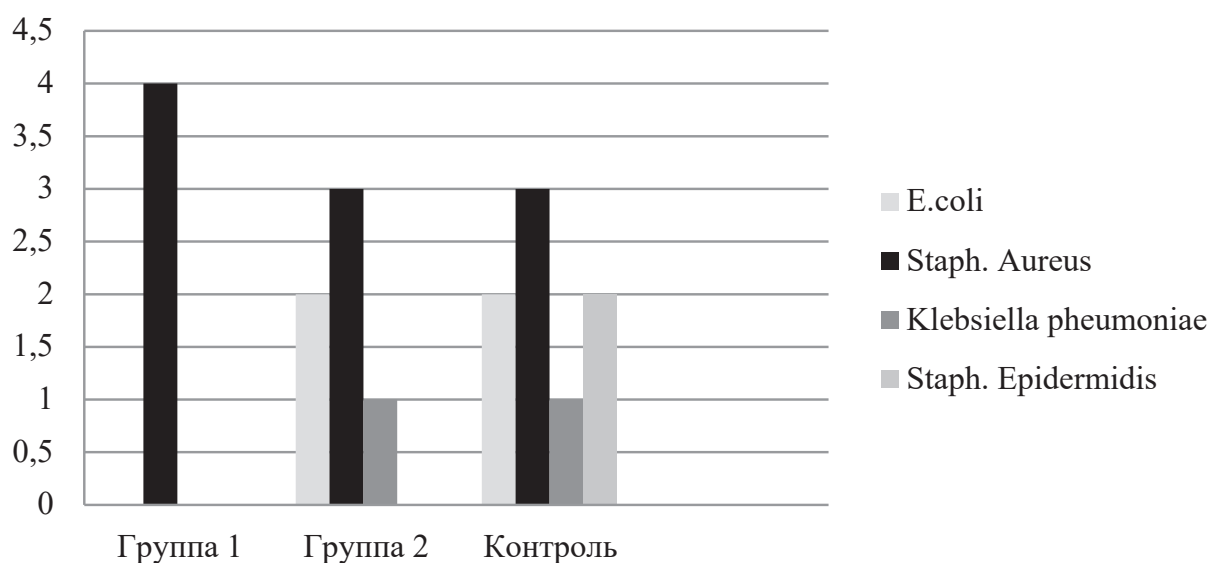


Рис. 3. Состав микрофлоры через неделю после лечения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что совместное использование комбинированной мази «Уберосепт» и препарата «Миксоферон» оказывает более выраженное терапевтическое действие, чем монотерапия только наружным препаратом. Установлено иммуномоделирующее действие данной схемы лечения,

снижение контаминации молока микроорганизмами и уменьшение числа соматических клеток. Стоит также отметить большее влияние комплексной мази на иммунитет молочной железы. Об этом свидетельствует выраженное снижение циркулирующих иммунных комплексов в секрете молочной железы, а также общих иммуноглобулинов. В исследуемых пробах молока от коров, которым при-

меняли мазь «Уберосепт» совместно с препаратом «Миксоферон», отмечено улучшение микробиологического фона. В одном случае было установлено полное освобождение от возбудителей мастита, в остальных случаях в пробах молока присутствовал только *Staph.aureus*. Данный микроорганизм известен своей возможностью инкапсулироваться в глубоких структурах вымени, что сильно усложняет терапию мастита, вызванного данным возбудителем.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. Sharon, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., IqbalYatoo, M., Patel, S. K., et al. // *The veterinary quarterly*. 2021—41(1), P. 107—136.

2. *Ивашкевич О. П.* Субклинический мастит у коров (распространение, этиопатогенез и лечение) / О. П. Ивашкевич, И. Т. Лучко // Матер. Международной научно-практ. конф., посвященной 45-летию ГНУ ВНИ-ВИПФиТРОссельхозакадемии. «Проблемы и пути развития ветеринарии высокотехнологичного животноводства» Воронеж, 2015. — С. 189—194.

3. *Gomes F.* (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. Gomes, F., Henriques, M. // *Current microbiology*. 2016—72(4), P. 377—382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>

4. *Багманов М. А.* (2011) Патология молочной железы у домашних животных: учебное пособие. Казань: КГАВМ, 230 с.

5. Патент № 2745236 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/05, А61К 31/19, А61К 35/644. Способ лечения и профилактики субклинического мастита у коров: № 2020113780: заявл. 03.04.2020: опубл. 22.03.2021 / М. В. Назаров, Я. А. Руднева; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина». — EDN QVFFWQ.

6. Показатели неспецифической резистентности молочной железы клинически здоровых и больных маститом коров. В. И. Зимников, *Павленко О. Б.*, *Манжурина*

на О. А., *Каширина Л. Н.*, и [др.] // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. — 2023. — Т. 59, № 2. — С. 129—133. DOI 10.52368/2078-0109-2023-59-2-134-137

7. Влияние бычьих рекомбинантных альфа-и гамма-интерферонов на иммунологические показатели и микробную контаминацию молока клинически здоровых коров / Н. Т. Климов, В. И. Зимников, Д. А. Ерин [и др.] // *Ветеринарный фармакологический вестник*. — 2018. — № 2(3). — С. 81—86. — EDN TVQPZE.

8. *Курченко Г. А.* Содержание циркулирующих иммунных комплексов в крови коров в зависимости от уровня соматических клеток в их молоке. *Тарасенко М. Н.*, *Ряпосова М. В.* // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2016. — №3. — С. 134—136. — Реф. англ. — Библиогр.: с. 136. Шифр ПЗ596 / Г. А. Курченко // *Ветеринария*. Реферативный журнал. — 2017. — № 1. — С. 91. — EDN YFMXRД.

9. A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan Fries cows. Alhussien, M., Kaur, M., Manjari, P., Kimothi, et al. // *Veterinary world*. 2015—8(5), P. 685—689. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.685-689>

10. *Сафонов М. М.* Влияние иммуномодулятора «Миксоферон» на иммунитет коров при субклиническом мастите: специальность 06.02.06 «Ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Сафонов Михаил Михайлович. — Москва, 2015. — 22 с. — EDN ZPTDBL.

11. *Желавский Н. Н.* Иммунобиологические аспекты патогенеза мастита коров / Н. Н. Желавский // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». — 2018. — Т. 54, вып. 2. — С. 23—26.

12. Влияние терапии субклинического мастита комплексным тканевым препаратом на динамику гематологических и иммунологических показателей крови коров / А. И. Ашенбреннер, Н. Ю. Беляева, Е. А. Кроневальд [и др.] // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. — 2020. — № 2(184). — С. 67—73. — EDN UBUGFG.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. Р. Перегончий — аспирант, младший научный сотрудник;

О. Б. Павленко — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник;

В. И. Зимников — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник;

Л. Ю. Сашнина — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник;

О. А. Манжурина — кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 03.10.2023 г.

STATE OF NONSPECIFIC RESISTANCE OF THE MAMMARY GLAND OF THE COWS WITH BOVINE SUBCLINICAL MASTITIS WHEN USING THE COMBINATION OINTMENT “UBEROSEPT” TOGETHER WITH AN IMMUNOSTIMULANT

Aleksandr Romanovich Peregonchiy[✉], Olga Borisovna Pavlenko, Vitaliy Ivanovich Zimnikov, Larisa Yuryevna Sashnina, Olga Alekseevna Manzhurina¹

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia, pimppi36@yandex.ru[✉]

Abstract. The objective of this study was to determine the state of nonspecific resistance of the mammary gland in cows in a comparative aspect under the effect of the ointment “Uberosept” + “Mixoferon” and the camphor ointment + “Mixoferon” during the treatment of mastitis in cows. The results of the studies indicate that after treatment in both experimental groups, the degree of microbial contamination and the number of somatic cells in milk samples decreased to reference values. At the same time, in the animals treated with the combination ointment + “Mixoferon”, the total bacterial load decreased by 10 times, and the number of somatic cells decreased by 7 times. At the same time, an increase in lysozyme by 35.8 % in the secretion of the mammary gland was observed, a decrease in the amount of total immunoglobulins by 64.2 %, and circulating immune complexes — by 55.9 %. The study of the morphological composition of the mammary gland revealed a significant decrease in the number of neutrophils by 52.6 % and an increase in the number of lymphocytes by 2.1 times.

Keywords: cows, combination ointment, immunity, subclinical mastitis

Providing the population with high-quality and safe products is the most important task for agriculture. One of the most developed branches of livestock farming is dairy farming. The most common cause of decreased milk quality and decreased production is bovine mastitis. Among cattle diseases, mastitis is the disease with probably the greatest effect on animal welfare, as well as on the economy of the farm [1]. Currently, the administration of antibiotics is the most common method of treating mastitis in cattle. However, this strategy has some disadvantages, including the lack of treatment efficacy due to the emergence of pathogen resistance, as well as the rejection of milk with the presence of an antibiotic [2, 3]. However, it is worth considering that the constant administration of drugs inside the nipple canal leads to dysbiosis and irritation of the udder tissue. Subsequently, this can lead to a significant decrease in milk production and the development of mastitis of fungal etiology [4]. Treatment with intracisternal antibiotics is the most common method of treating mastitis, but far from the only one. One of the most promising is the use of transdermal agents, which are mostly represented by ointments. To treat bovine subclinical

mastitis, irritating ointments are often used to apply to the skin of the affected quarter of the udder. Most of them are represented by products based on camphor, ichthyol, salicylic acid, iodine and others [5]. The use of transdermal drugs should also be comprehensive, because the use of monotherapy is not always effective in the treatment of bovine mastitis. Therefore, the use of complex therapy, including immunostimulating agents and antimicrobial ointments, can increase the efficacy of the treatment measures. When designing more effective drugs, one should take into account the immunological aspects of the pathogenesis of bovine mastitis, the relationship between local factors of protection of the udder and the immune system of the animal's body.

The objective of our research was to study the effect of the complex ointment and an immunostimulant on humoral and cellular resistance factors of the mammary gland in cows.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out on Red-Motley Holstein and Simmental cows with subclinical mas-

titis in the conditions of LLC “Agrotech-Garant”, Zadonye, Ramonskiy r., Voronezh region. Three (3) groups of cows of 10 animals each were formed. For the treatment of subclinical mastitis, the animals of the first group were treated with the combination ointment “Uberosept” for 5 days, 1 time per day and injected with the immunomodulatory drug “Mixoferon” according to the instructions (30 doses (3.0 ml) intramuscularly twice a day for 7 days). The cows of the second group were treated with the camphor ointment 10.0 % for 5 days, 1 time per day, and were also injected with “Mixoferon” according to the instructions. The third group was the negative control group. The ointment was applied after milking, having previously cleaned the skin of the udder, in compliance with the rules of asepsis. The assessment of the state of nonspecific resistance of the mammary gland in cows when using a complex ointment and an immunostimulant was carried out on the basis of morphoimmunological and bacteriological studies of milk taken before and after the termination of the therapy course.

The morphological composition of the secretion was determined in smears, which were prepared according to the method for determining the cellular composition of the secretion of the udder of cows, immunological studies of the secretion of the udder were carried out by generally accepted methods according to approved methods, bacteriological studies in accordance with the Methodical Instructions for the Bacteriological Study of Milk and Secretion of the Udder of Cows (M., 1983). Somatic cells in milk were counted using the DeLaval somatic cell counter.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

Morphological indicators, a number of immunological indicators of mammary gland secretion, as well as the composition of microorganisms were selected as the criteria for the effect of the proposed treatment

regimens on the humoral and cellular factors of resistance of the mammary gland of cows.

In the first experimental group, a 92.6 % decrease in total bacterial contamination was found in the secretions of the mammary gland on the first day after the treatment course. A week after the end of treatment, the total bacterial count increased slightly and amounted to $8.2 \cdot 10^4$ CFU/ml, which is by 90.6 % less than before treatment. The number of somatic cells during the experiment decreased significantly by 3.9 times. A week after the treatment termination, the number of somatic cells was by 7.3 times lower than before treatment. Milk lysozyme was by 31.7 % higher 1 day after the end of treatment, and by 35.8 % higher in a week. Total milk immunoglobulins decreased throughout the experiment in the first group, so after day 7 of treatment their number decreased by 14.3 %, and on day 14 after the treatment onset — by 64.2 %. The number of CIC decreased by 19.0 % after the treatment course, which was subsequently followed by a decrease in their concentration to 0.298 mg/ml, which was by 55.9 % less than before treatment (Table 1).

In the experimental group No. 2, a decrease in total bacterial contamination by 84.7 % was found 7 days after treatment and a week after the last day of using Mixoferon — by 86.9 %. The number of somatic cells after the treatment course decreased by 3.7 times, and a week after its completion by 5.7 times. There was an increase in lysozyme in the secretion of the mammary gland by 26.8 % by day 8; in another week, it and its content amounted to 0.728 μ g/ml, which was by 39.7 % more than before the experiment. The amount of total immunoglobulins gradually decreased by day 8 of the experiment by 29.9 %, and by day 14 — by 56.1 %. Over the experiment course, the number of circulating immune complexes in the second experimental group decreased by 18.1 %, and subsequently — by 32.5 %. (Table 1)

Table 1

Indicators of nonspecific resistance of mammary gland secretion

Indicator	Before experiment	After treatment, on d 8	A week after the experiment
1	2	3	4
Experimental group 1			
Total bacterial contamination, CFU/ml	$8.7 \cdot 10^5 \pm 3.5$	$6.4 \cdot 10^4 \pm 2.1$	$8.2 \cdot 10^4 \pm 0.9$
Number of somatic cells ths/ml	2968.0 ± 46.7	743.5 ± 21.7	406.5 ± 29.8
Lysozyme, μ g/ml	0.461 ± 0.03	0.675 ± 0.02	0.718 ± 0.03

Table 1 (the end)

1	2	3	4
Total Ig of milk, mg/ml	4.19 ± 0.3	3.59 ± 0.6	1.5 ± 0.2
Milk CIC, mg/ml	0.675 ± 0.02	0.547 ± 0.004	0.298 ± 0.02
Total bacterial contamination, CFU/ml	3.21·10 ⁵ ± 0.3	4.9·10 ⁴ ± 0.2	4.2·10 ⁴ ± 0.2
Number of somatic cells ths/ml	3133.0 ± 52.0	846.7 ± 32.1	553.3 ± 30.6
Lysozyme, µg/ml	0.521 ± 0.02	0.661 ± 0.01	0.728 ± 0.02
Total Ig of milk, mg/ml	7.4 ± 0.1	5.19 ± 0.1	3.25 ± 0.2
Milk CIC, mg/ml	0.570 ± 0.02	0.467 ± 0.03	0.385 ± 0.05
Control			
Total bacterial contamination, CFU/ml	2.4·10 ⁵ ± 0.1	5.1·10 ⁵ ± 0.2	7.2·10 ⁵ ± 0.3
Number of somatic cells ths/ml	2798.21 ± 144.13	3989.7 ± 46.9	4815.61 ± 37.2
Lysozyme, µg/ml	0.519 ± 0.03	0.675 ± 0.02	0.420 ± 0.01
Total Ig of milk, mg/ml	5.09 ± 0.3	6.35 ± 0.3	6.77 ± 0.2
Milk CIC, mg/ml	0.423 ± 0.01	0.667 ± 0.03	0.811 ± 0.03

In the control group, a gradual increase in total bacterial contamination was observed up to 200.0 %. The number of somatic cells also increased by 72.1 %. Among the immunological indicators, it is worth noting the increase in CIC by 91.7 %.

Analyzing the results of the study of mammary gland secretions, we can conclude that the immune system is mobilized. This is evidenced by a decrease in the number of circulating immune complexes, an increase in lysozyme activity and a gradual decrease in the amount of total immunoglobulins. Due to the action of the latter factors, a decrease in microbial contamination of mammary gland secretions was observed [6, 7]. A decrease in the number of somatic cells is directly related to a decrease in the number of circulating immune complexes [8].

When studying the morphological composition of the mammary gland, a decrease in the number of neutrophils by 52.6 % in the first group was found, in the second — by 27.9 % (Table 2). It is also worth noting the increase in the number of lymphocytes in the first group by 2.1 times, in the second — by 65.7 %.

Thus, changes in the morphological composition of mammary gland secretion are of critical importance. What is important is not the number of cells, but their species composition, because the number of somatic

cells in milk and their differentiation by type can serve as additional criteria for predicting and monitoring the spread of mastitis.

The interferon contained in “Mixoferon” affects the cellular components of the immune system: it stimulates the lytic activity of lymphocytes, specific cytotoxic T-lymphocytes and macrophages, affects the formation of specific antibodies by B-lymphocytes and stimulates the production of their own interferon alpha. Along with this, the number of lymphocytes in the control group decreased slightly, and the number of neutrophils increased.

An increase in the number of lymphocytes, as well as a decrease in segmented neutrophils, indicates the extinction of inflammatory processes and recovery of the mammary gland [6, 9].

Before the experiment, in group No. 1, *Staph. aureus* was isolated in 4 out of 5 samples, in two ones there were isolated the pathogens of *Klebsiella pneumoniae*, in 1 sample — *Ent. Faecicum*, and in 1 sample — *Staph. epidermidis*, *E.coli*. In group No. 2 and control, *E. coli*, *Staph. aureus* were found in 3 samples, in 1 sample — *Klebsiella pneumonia*. In the control group, *Staph. Aureus* was detected in 3 samples, in 2 samples — *Klebsiella pneumonia*, *Staph. epidermidis*, *Ent.faecicum* (Fig. 1)

Table 2

Morphological composition of mammary gland secretion

Group No.	Days of sampling	Neutrophils		Eosinophils	Monocytes	Lymphocytes
		Stab	Segmented			
1	Before experiment	1.0 ± 0.02	65.3 ± 8.4	0.3 ± 0.01	1.0 ± 0.02	32.3 ± 9.0
	D7 after the treatment termination	0.8 ± 0.01	31.0 ± 7.4	1.75 ± 0.02	0	66.5 ± 7.3
2	Before experiment	0.6 ± 0.01	68.4 ± 8.4	1.0 ± 0.01	1.2 ± 0.02	28.9 ± 3.2
	D7 after the treatment termination	0	49.3 ± 2.4	1.5 ± 0.03	1.25 ± 0.1	47.9 ± 2.5
3	Before experiment	0.5 ± 0.01	63.1 ± 3.3	2.0 ± 0.03	1.2 ± 0.01	33.0 ± 3.1
	D7 after the experiment termination	1.3 ± 0.01	66.4 ± 2.6	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.02	29.3 ± 2.6

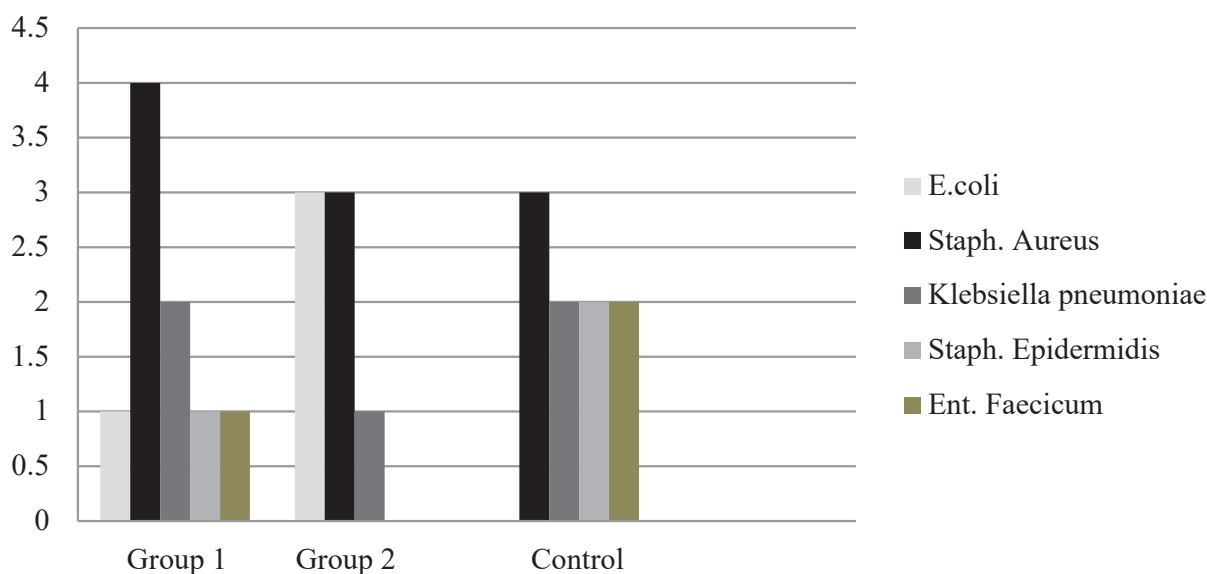


Fig. 1. Microflora composition before treatment

To observe the dynamics of the recovery of the udder from mastitis pathogens after treatment, samples were taken from the same animals. In group No. 1, *Staph. aureus* was isolated in 4 samples, *Klebsiella pneumoniae*, *Staph. epidermidis*, *Ent. faecicum* were found in the samples from three animals. In group No. 2, *Staph. aureus* was detected in three animals, *E. coli* was found in two samples, and the pathogen of

Klebsiella pneumoniae was detected in one cow. In the control group, *Staph. aureus* was detected in 3 samples, *Staph. epidermidis* was detected in three animals, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Ent. faecicum* were isolated from three different samples (Fig. 2).

A week after the treatment termination, in group No. 1, it was possible to isolate the pathogen *Staph. aureus* only in 4 out of 5 samples; no pathogenic micro-

organisms were found in one sample. In group No. 2, *Staph. aureus* was detected in three cows, *E. coli* — in two animals, and the pathogen *Klebsiella pneumonia* was found in one sample.

In the control group, *Staph. aureus* was detected in 3 samples, *E. coli* and *Staph. epidermidis* were detected in two animals, *Klebsiella pneumonia* was found in one sample (Fig. 3).

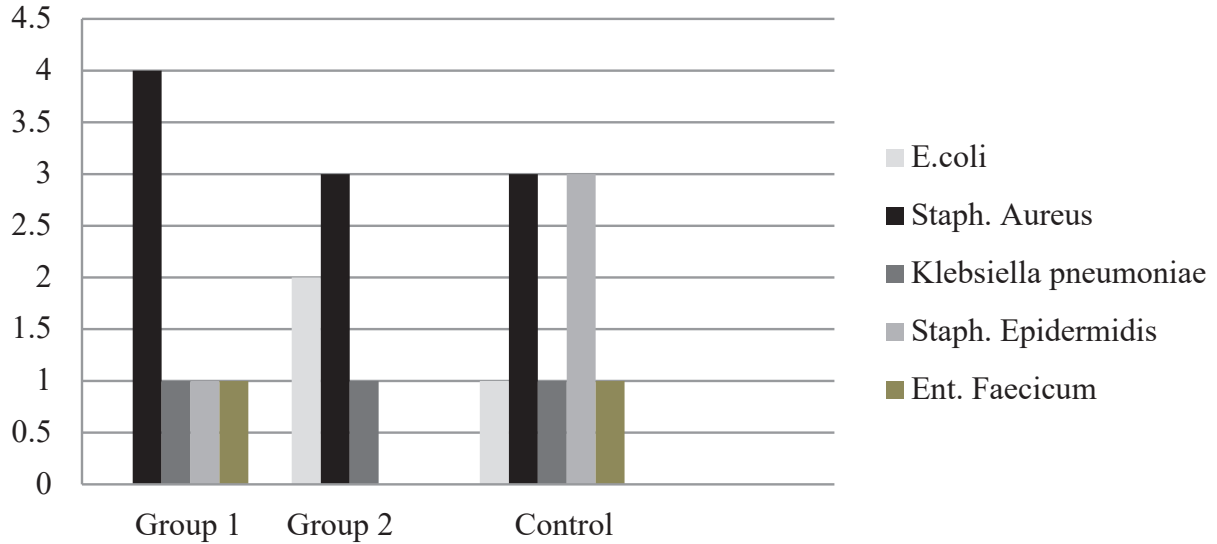


Fig. 2. Microflora composition after treatment

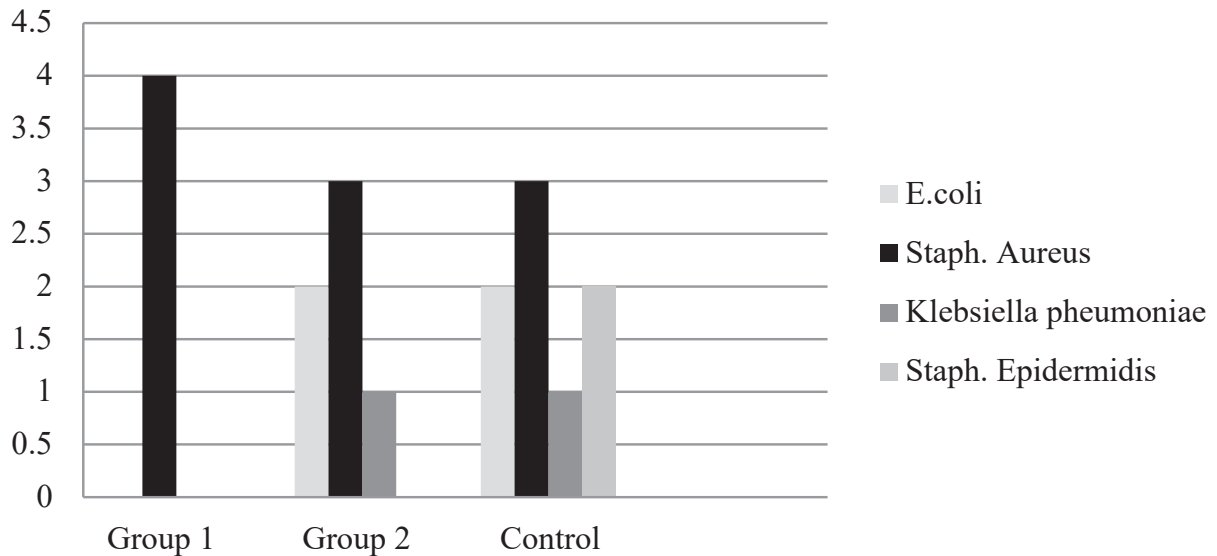


Fig. 3. Microflora composition a week after treatment

CONCLUSION

As a result of the studies, it was found that the combined use of the combination ointment “Uberosept” and the drug “Mixoferon” has a more pronounced therapeutic effect than monotherapy with only an external drug. The immune-modeling effect of this treatment regimen has been established, reducing the contamination of milk with microorganisms and reducing the number of somatic cells. It is also worth noting the greater effect of the complex ointment on the immuni-

ty of the mammary gland. This is evidenced by a pronounced decrease in circulating immune complexes in the secretion of the mammary gland, as well as in total immunoglobulins. In the studied milk samples from cows that were treated with the ointment “Uberosept” together with the drug “Mixoferon”, an improvement in the microbiological background was noted. In one case, complete recovery from mastitis pathogens was established; in other cases, only *Staph. aureus* was present in the milk samples. This microorganism is known for

its ability to be encapsulated in the deep structures of the udder, which greatly complicates the treatment of mastitis caused by this pathogen.

REFERENCES

1. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. Sha-run, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., IqbalYatoo, M., Patel, S. K., et al. // *The veterinary quarterly*. 2021—41(1), P. 107—136.
2. *Ivashkevich O. P.* Subclinical mastitis in cows (distribution, etiopathogenesis and treatment) / O. P. Ivashkevich, I. T. Luchko // *Mater. of International Scientific and Practical. Conf., dedicated to the 45th Anniversary of the State Scientific Institution ARVRIPP&T of the RAAS. “Development problems and ways of veterinary medicine in high-tech animal husbandry” Voronezh, 2015.* — P. 189—194.
3. *Gomes F.* (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. Gomes, F., Henriques, M. // *Current microbiology*. 2016—72(4), P. 377—382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>
4. *Bagmanov M. A.* (2011) Pathology of the mammary gland in domestic animals: textbook. Kazan: KGAVM, 230 p.
5. Patent No. 2745236 C1 Russian Federation, IPC A61K 31/05, A61K 31/19, A61K 35/644. Method for the treatment and prevention of subclinical mastitis in cows: No. 2020113780: application 03.04.2020: publ. 22.03.2021 / M. V. Nazarov, Ya. A. Rudneva; applicant Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin”. — EDN QVFFWQ.
6. Indicators of nonspecific resistance of the mammary gland of clinically healthy and sick cows with mastitis. *Zimnikov V. I., Pavlenko O. B., Manzhurina O. A., Kashirina L. N.*, and [et al.] // *Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya “Vitebskaya ordena ‘Znak Pocheta’ gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny”* (Transactions of the educational establishment “Vitebsk the Order of ‘the Badge of Honor’ State Academy of Veterinary Medicine”). — 2023. — V. 59, No. 2. — P. 129—133. DOI 10.52368/2078-0109-2023-59-2-134-137
7. Effect of recombinant bovine interferons alpha and gamma on immunological indicators and microbial contamination of milk from clinically healthy cows / N. T. Klimov, V. I. Zimnikov, D. A. Erin [et al.] // *Bulletin of Veterinary Pharmacology* — 2018. — No. 2(3). — P. 81—86. — EDN TVQPZE.
8. *Kurchenko G. A.* Content of circulating immune complexes in the blood of cows depending on the level of somatic cells in their milk. *Tarasenko M. N., Ryaposova M. V.* // *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii* (Normative-legal regulatory issues in veterinary medicine). — 2016. — N3. — P. 134—136. — Ref. English-Bibliography: p.136. Code P3596 / G. A. Kurchenko // *Veterinary medicine. Abstract journal*. — 2017. — No. 1. — P. 91. — EDN YFMXRD.
9. A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan Fries cows. Alhussien, M., Kaur, M., Manjari, P., Kimothi, et al. // *Veterinary world*. 2015—8(5), P. 685—689. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.685-689>
10. *Safonov M. M.* Effect of the immunomodulator “Mixoferon” on the immunity of cows with subclinical mastitis: specialty 06.02.06 “Veterinary obstetrics and biotechnology of animal reproduction”: abstract of a thesis for the degree of Candidate of Veterinary Sciences / Safonov Mikhail Mikhailovich. — Moscow, 2015. — 22 p. — EDN ZPTDBL.
11. *Zhelavskiy N. N.* Immunobiological aspects of the pathogenesis of bovine mastitis / N. N. Zhelavskiy // *Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya “Vitebskaya ordena ‘Znak Pocheta’ gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny”* (Transactions of the educational establishment “Vitebsk the Order of ‘the Badge of Honor’ State Academy of Veterinary Medicine”). Scientific notes of the educational institution “Vitebsk Order of the Badge of Honor State Academy of Veterinary Medicine”). — 2018. — V. 54, issue. 2. — P. 23—26.
12. Effect of therapy for subclinical mastitis with a complex tissue preparation on the dynamics of hematological and immunological blood indicators of cows / A. I. Ashenbrenner, N. Yu. Belyaeva, E. A. Kronevald [et al.] // *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* (Bulletin of Altay State Agrarian University). — 2020. — No. 2(184). — P. 67—73. — EDN UBUGFG.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- A. R. Peregonchiy** — Postgraduate Student, Junior Scientific Associate;
O. B. Pavlenko — Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Scientific Associate;
V. I. Zimnikov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate;
L. Yu. Sashnina — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate;
O. A. Manzhurina — Candidate of Veterinary Sciences, Principal Scientific Associate.

The article was submitted 03.10.2023.

СРЕДСТВА ЗООГИГИЕНЫ, ДЕЗИНФЕКЦИИ, ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ

Научная статья

УДК 579.62:577.29

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.106

АНАЛИЗ ВИРОМА КИШЕЧНИКА СВИНЕЙ ГРУППЫ ОТКОРМА С РАЗЛИЧНОЙ КОНВЕРСИЕЙ КОРМА

Михаил Юрьевич Сыромятников^{*, **, ***✉}, Сергей Викторович Шабунин^{*},
Екатерина Юрьевна Нестерова^{**, ***}, Мария Ивановна Гладких^{***},
Юлия Дмитриевна Смирнова^{***}, Инна Юрьевна Буракова^{**, ***},
Полина Дмитриевна Морозова^{**, ***}, Мария Владимировна Грязнова^{***},
Евгений Владимирович Михайлов^{*}, Вячеслав Юрьевич Боев^{****1}

**Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, syromyatnikov@bio.vsu.ru✉*

***Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия*

****Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

*****Селекционно-гибридный центр, пос. Вишневка, Верхнехавский район, Воронежская область, Россия*

Аннотация. Цель исследования заключалась в проведение анализа виroma кишечника свиней с различной конверсией корма. В качестве объектов исследования выступали две условные группы свиней на откорме, отличающиеся значением показателя конверсии корма (высокая конверсия «А» и низкая конверсия «Б»). Наибольшей распространенностью в кишечнике свиней обеих групп характеризовались вирусы, относящиеся к типу Uroviricota (более 40 %). На уровне семейства доминирующими вирусами оказались представители Podoviridae (36 %). Особенностью вирусного микробиома свиней из группы А было обнаружение в его составе вирусов семейств Alloherpesviridae, Alternaviridae, Herpesviridae, Partitiviridae и Polydnaviridae. Отличительной особенностью виroma кишечника у группы Б являлись идентифицированные виды семейства Mimiviridae. Полученные результаты на данный момент не могут свидетельствовать о существовании зависимости между отдельными вирусными таксонами в кишечнике свиней и показателем конверсии корма. Такие данные требуют дальнейшего и более углубленного изучения.

Ключевые слова: свиньи, кишечник, конверсия корма, виром, вирусы, высокопроизводительное секвенирование.

Благодарность: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках национального проекта «Наука» (проект FZGW-2020-0001, уникальный номер реестра государственных заданий 075001X39782002)

Определение оптимальной величины конверсии корма является главной стратегией, способствующей эффективному ведению сельского хозяйства [1]. Высокие значения коэффициента конверсии приводят к нерациональной экономической политике животноводческого предприятия за счет повышения затрат на производство и снижения выхода конечного продукта. Таким образом, расчет и поддержание на производстве низкого значения параметра конверсии корма способствует решению

проблемы и является фактором экономического роста на свинокомплексах. Это способствует минимизации затрат на производство свиней и приводит к хорошим показателям мясопроизводства [2]. Помимо кормления, большую роль в поддержании здоровья животных оказывают такие факторы как генетика поголовья, болезни заразной и незаразной этиологии, неадекватная терапия, неправильное содержание и др. Такие показатели напрямую негативно влияют на состояние кишечника животных,

© Сыромятников М. Ю., Шабунин С. В., Нестерова Е. Ю., Гладких М. И., Смирнова Ю. Д., Буракова И. Ю., Морозова П. Д., Грязнова М. В., Михайлов Е. В., Боев В. Ю., 2023

его микрофлору, которая, в свою очередь, является индикатором здоровья поголовья [3]. Это объясняется тем, что кишечная микробиота продуцирует незаменимые ферменты и субстраты питательных веществ для жизни свиней [4].

Желудочно-кишечный тракт млекопитающих населен различными организмами, в число которых входят бактерии и археи, представители эукариот, а также вирусы [5, 6]. Их взаимосвязь между собой и с организмом-хозяином обеспечивает здоровое функционирование органов пищеварительной системы, а также играет существенную роль в формировании иммунитета [7]. Виром кишечника животных, в частности, свиней, на сегодняшний день подвержен детальному изучению [8, 9]. Известно, что вирусы, населяющие кишечный тракт преимущественно представлены бактериофагами, которые оказывают большое значение в формировании бактериальных сообществ [10]. Важный вклад вирусов в кишечный микробиом, а, следовательно, и здоровье животных, необходимо учитывать при организации и рациональном ведении сельского хозяйства [11].

Цель исследования оценить виром кишечника свиней, принадлежащих к группам с разным коэффициентом конверсии корма методом высокопроизводительного секвенирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали ($n = 12$) клинически здоровые свиньи в период откорма. Животных разделили на 2 группы согласно коэффициенту конверсии корма: ($n = 6$) — низкая конверсия корма (А) со средним коэффициентом конверсии 2,00 и ($n = 6$) — высокая конверсия корма (Б) со средним коэффициентом конверсии 2,22. Материалом для изучения вирома кишечника являлись фекалии, полученные из прямой кишки стерильными зондами. Для экстракции ДНК из образцов использовали коммерческий набор HiPure DNA Micro Kit (Magen, Гуанчжоу, Китай). Выделение проводили согласно протоколу производителя. Библиотеки секвенирования готовили по следующему протоколу: ДНК фрагментировали с использованием набора MGIEasy Fast FS Library Prep Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай) с последующей очисткой магнитными частицами MGIEasy DNA Clean Beads (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Лигирование адаптеров проводили с комплектом адаптеров А для праймеров MGIEasy UDB (MGI, Шэньчжэнь, Китай) и ПЦР-амплификацией.

Качество библиотеки ДНК оценивали с использованием Qubit и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США).

Дальнейшую циркуляризацию одной нити осуществляли с использованием модуля MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Окончательные библиотеки были объединены и секвенированы с использованием платформы секвенирования MGI DNBSEQ-G50 с моделью проточной ячейки для секвенирования DNBSEQ-G50RS: FCL (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Для создания DNB использовался набор для высокопроизводительного секвенирования DNBSEQ-G50RS. Качество необработанных метагеномных данных оценивали с помощью инструмента FastQC. Технические последовательности и базы низкого качества ($Q < 30$) были обрезаны с помощью fastp. Таксономическое профилирование образцов было выполнено с использованием Kraken2 со стандартными базами данных вирусов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование вирома кишечника здоровых свиней осуществлялось путем проведения высокопроизводительного секвенирования. Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей в сумме позволил выявить 315 271 ридов.

Анализируя последовательности относительно того типа, к которому относятся вирусы, было идентифицировано 7 филумов: Duplornaviricota, Kitrinoviricota, Nucleocytoviricota, Pevloviricota, Pisuviricota, Preplasmiviricota и Uroviricota. Часть вирусов не могла быть отнесена к какому-либо конкретному типу, в связи, с чем была объединена в общую группу «Неклассифицированные вирусы» (рис. 1).

Самым обильным типом в виrome кишечника свиней двух групп оказался Uroviricota, их содержание превышало 40 % от всей численности вирусов. Следующими по распространенности филумами были Duplornaviricota и Kitrinoviricota (среднее значение для обеих групп составило 17 % и 14 % соответственно). Содержание представителей групп Preplasmiviricota и «Неклассифицированные вирусы» не превышало 8 %. Вирусы, относящиеся к типу Nucleocytoviricota, доминировали в группе Б (16 %), а их содержание в группе А составляло менее 2 %. Типы Pevloviricota и Pisuviricota были детектированы только в группе А.

Распределение семейств в вирусном микробиоме представлено на рисунке 2.

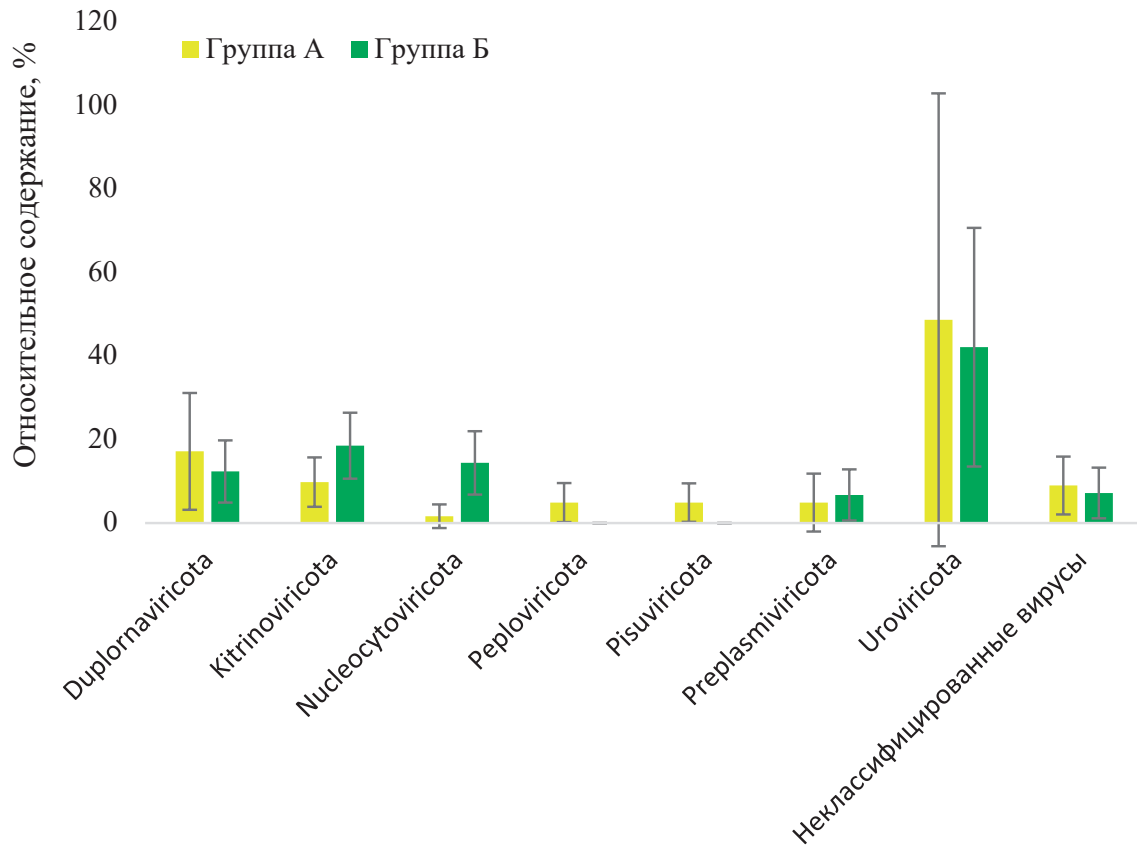


Рис. 1. Относительная обильность типов вирусов в кишечниках свиней

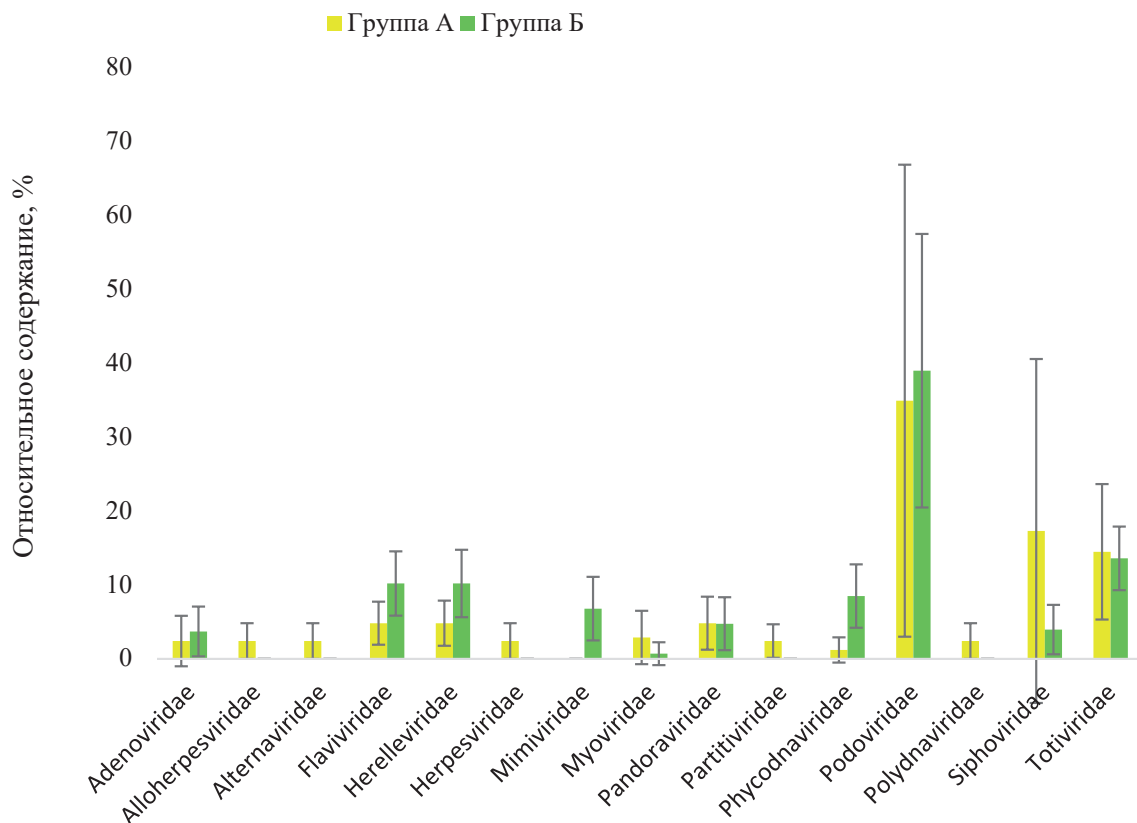


Рис. 2. Относительная обильность семейств вирусов в кишечнике свиней

Биоинформатический анализ позволил выявить 15 семейств вирусов в кишечнике: Adenoviridae, Alloherpesviridae, Alternaviridae, Flaviviridae, Herelleviridae, Herpesviridae, Mimiviridae, Myoviridae, Pandoraviridae, Partitiviridae, Phycodnaviridae, Podoviridae, Polydnaviridae, Siphoviridae и Totiviridae. Наибольшей обильностью в виrome кишечника характеризовалось семейство Podoviridae. Относительное содержание вирусов для двух групп в среднем составляло порядка 36 %. Особенностью вирусного микробиома свиней из группы А было присутствие вирусов семейств Alloherpesviridae, Alternaviridae, Herpesviridae, Partitiviridae и Polydnaviridae. Относительное содержание вирусов каждого из этих семейств оставляло 2,4 %. Также характер-

ным отличием микробиома группы А от микробиома группы Б являлось высокая обильность представителей семейства Siphoviridae, чье процентное содержание составляло 17 % и 4 % соответственно. Особенностью микробиома группы Б было идентифицированные виды семейства Mimiviridae, а также повышенное содержание в виrome семейства Phycodnaviridae. Тем не менее, статистически значимых различий между двумя группами не было обнаружено.

При рассмотрении доминирующего семейства подробнее, было идентифицировано 15 разновидностей вирусов, встречающихся в виrome кишечника свиней. Необходимо отметить, что 13 из них удалось идентифицировать до штамма одного вида *crAssphage* sp. (рис. 3).

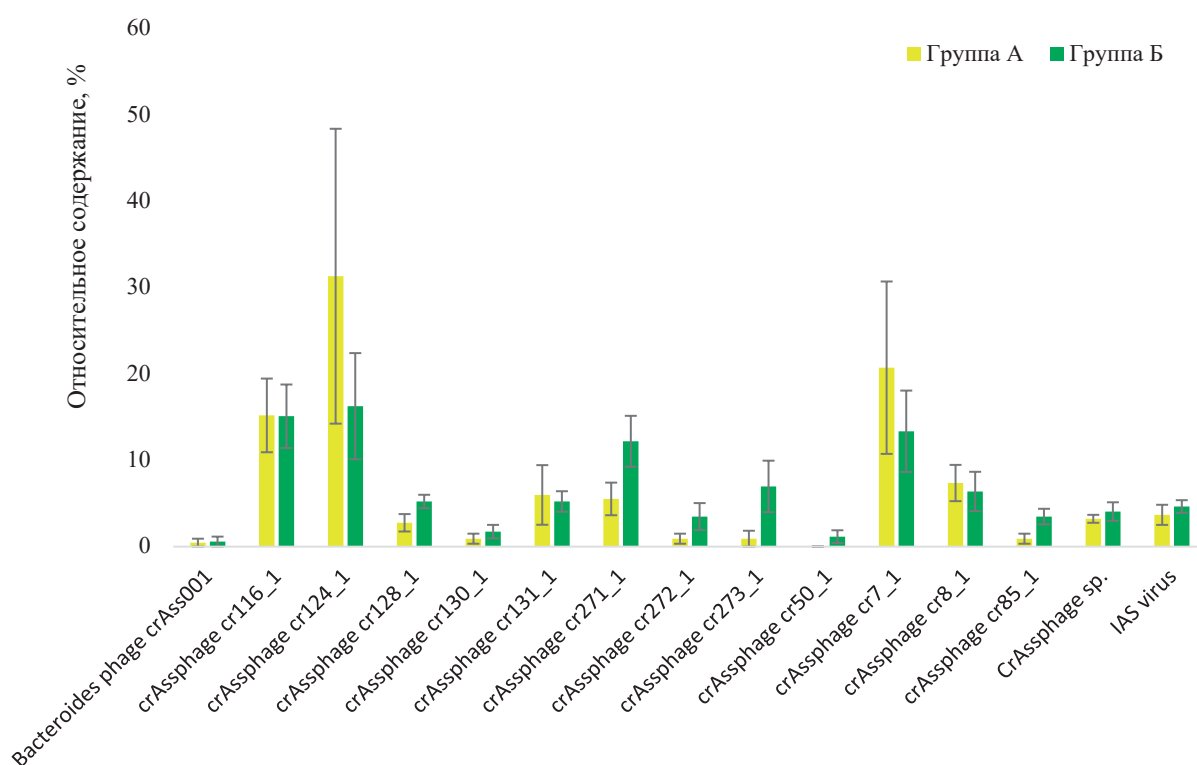


Рис. 3. Распространенность вирусов семейства Podoviridae в кишечнике свиней

Известно, что бактериофаг *crAssphage* представляет собой двуцепочечную ДНК, заключенную в кольцо [12]. Вирус активно используется в качестве индикатора загрязнения окружающей среды фекалиями [13, 14]. Это объясняется тем, что *crAssphage* распространен повсеместно и является одним из главных компонентов кишечного метагенома млекопитающих, в том числе и свиней [15, 16]. Что касается нашего исследования, то в кишечном виrome группы А зафиксировано преобладание штамма *crAssphage* cr124_1 над остальными

идентифицированными таксонами. Значение относительной обильности составило 31 %. В то же время, в группе Б не было выявлено конкретного преобладающего штамма. В этой выборке наиболее распространенными стали представители *crAssphage* cr116_1, *crAssphage* cr124_1 и *crAssphage* cr7_1 со значениями относительной обильности 15 %, 16 % и 13 % соответственно.

Еще одним идентифицированным представителем семейства Podoviridae стал *IAS virus*. Его содержание в обеих группах составило менее 5 %.

Относительная обильность в группе А соответствовала 3,6 %, а в группе Б 4,6 %. Известно, что в структуре ДНК у родственных бактериофагов *crAss* и *IAS* преобладающее большинство переменных нуклеотидных последовательностей расположена в области, ответственной за кодирование хвостовых волокон и шипов.

Такие особенности указывают на высокую вариабельность рецепторов и белков, что способствует представителям данного семейства обладать высокой вирулентностью [17].

На рисунке 4 представлено видовое разнообразие представителей семейства *Siphoviridae*, выявленные в результате анализа вирома кишечника свиней с разными показателями конверсии корма. Характерной особенностью бактериофагов, принадлежащих к данному семейству, является хорошо развитый адгезивный аппарат, который располагается на дистальном конце длинного несжимающегося хвоста. Сцепление с клеткой-хозяина происходит за счет специфических рецепторов белковой или углеводной природы [18].

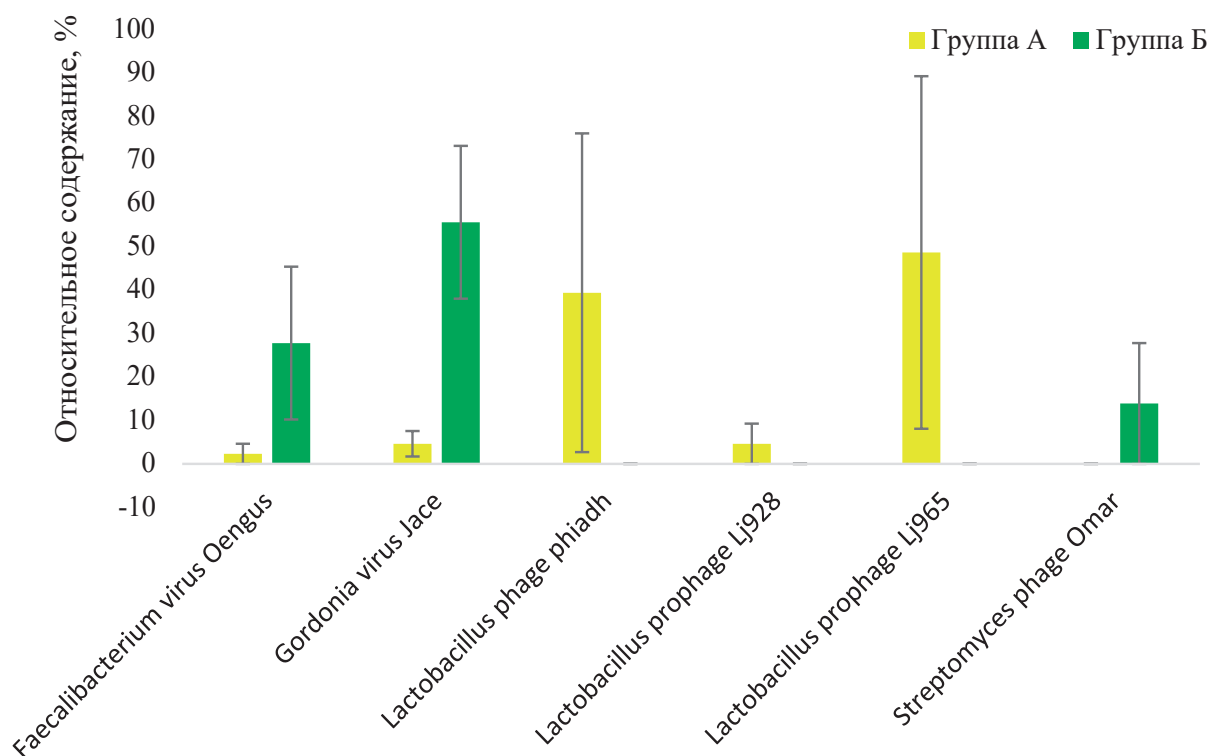


Рис. 4. Распространенность вирусов семейства *Siphoviridae* в кишечнике свиней

Продемонстрирована неоднородность встречаемости конкретного вида в двух изучаемых группах. Так в группе А были детектированы штаммы *Lactobacillus phage phiadh* (39 %), *Lactobacillus prophage Lj928* (4 %) и *Lactobacillus prophage Lj965* (48 %), тогда как в группе Б они отсутствовали. При этом *Streptomyces phage Omar* был выявлен только в группе Б, его относительная обильность составила 13 %. Под действием активных веществ ряда антибиотиков в кишечнике свиней может осуществляться индукция профагов [19]. Штаммы *Faecalibacterium virus Oengus* и *Gordonia virus Jase* были распространены в обеих группах, однако в группе Б их процентное содержание преобладало над группой А и составило 27 % и 55 % соответственно.

Изучение вирусного таксономического разнообразия кишечника свиней позволило идентифицировать до вида еще 5 семейств *Adenoviridae*, *Flaviviridae*, *Herelleviridae*, *Phycodnaviridae* и *Myoviridae* (рис. 5).

Вирусы *Porcine mastadenovirus A* и *Porcine mastadenovirus C*, принадлежащие к семейству *Adenoviridae* были выявлены в группах свиней с разным показателем конверсии корма. Так *Porcine mastadenovirus A* детектирован только в группе Б, а *Porcine mastadenovirus C* только в группе А, их относительное содержание составило 13,7 % и 13,3 % соответственно. Аденовирусы представлены разнообразным генетическим потенциалом и линиями, в связи с этим разные представители этого сообщества способны поражать один и тот же ор-

ганизм хозяина одновременно. Изучено около 150 серотипов аденовирусов [20]. Доказано, что вирусы семейства Adenoviridae детектируются у каждого крупного класса позвоночных животных, в том числе и свиней [21].

Похожая с описанным выше случаем картина характерна и для представителей семейства Myoviridae. Так штамм *Faecalibacterium virus* Lagaffe был выявлен только у свиней из группы Б

(5,7 %), а вирусы *Lactobacillus phage* KC5a (6,6 %), *Lactobacillus phage* phi jlb1 (6,6 %) и *Lactobacillus prophage* Lj771 (20 %) только у животных, принадлежащих к группе А. Основной отличительной характеристикой бактериофагов семейства Myoviridae от других вирусных частиц является наличие подвижного хвоста, который способен сокращаться, благодаря чему происходит проникновение вируса в клетку хозяина [22].

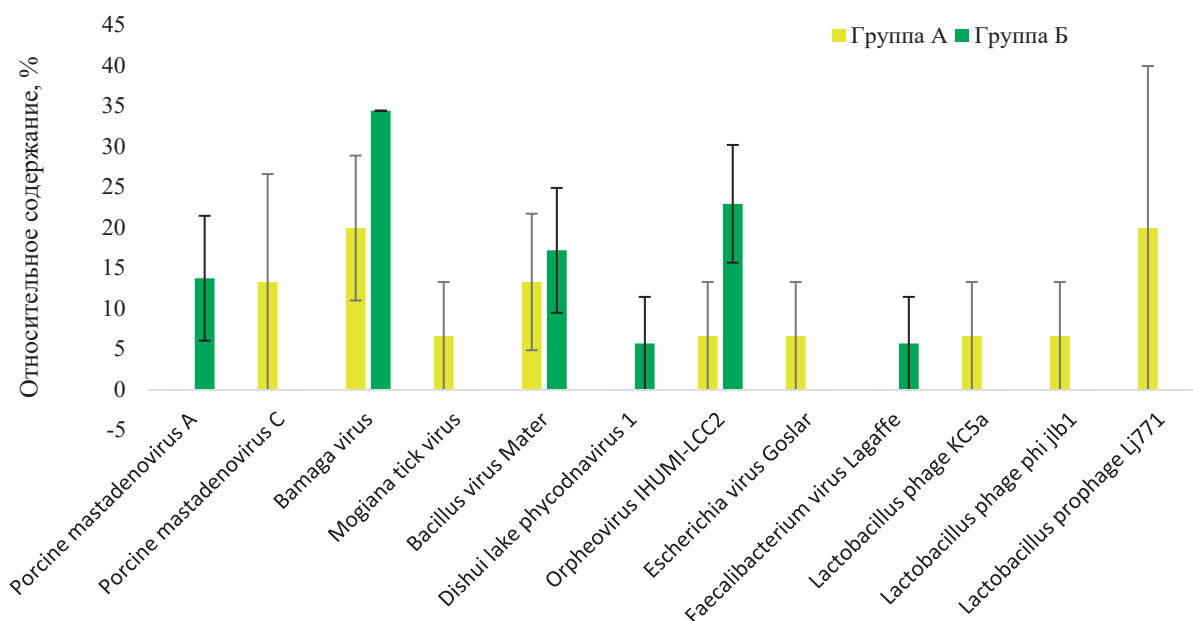


Рис. 5. Распространенность вирусов различных видов в кишечнике свиней

В данной выборке из 5 семейств наиболее обильным содержанием характеризовался вирус *Bamaga virus* из семейства Flaviviridae, его относительное содержание составило 34 % в группе Б. Что касается группы А, *Bamaga virus* также присутствовал, но процент относительного содержания был ниже (20 %). Еще одним представителем данного семейства стал *Mogiana tick virus*, который был обнаружен только у свиней, принадлежащих к группе А (6,6 %). По своей структуре семейство Flaviviridae представляет собой сферу, которая представлена одноцепочечной положительной цепью РНК [23]. *Bamaga virus* был идентифицирован в начале 2000 годов и активно изучался на протяжении двух десятилетий [24]. Было установлено, что вирус способен реплицироваться не во всех клеточных линиях позвоночных, например, организмы курицы и обезьяны не подвержены заражению [25].

Bacillus virus Mater стал единственным представителем семейства Herelleviridae и был идентифицирован в обеих группах. Относительное содержание для группы А составило 13 %, а для группы Б 17 %.

Установлено, что штаммы семейства Herelleviridae являются стафилококковыми бактериофагами, то есть проявляют вирусную активность к бактериям рода *Staphylococcus* [26].

Представителей семейства Phycodnaviridae вирусы *Dishui lake phycodnavirus* 1 (5,7 %) и *Orpheovirus* IHUMI—LCC2 (22,9 %) были обнаружены в образцах, полученных от группы Б, тогда как в группе А не было идентифицировано штамма *Dishui lake phycodnavirus* 1. Для представителей семейства Phycodnaviridae характерно наличие разнообразных геномов, в которых присутствуют большие кластеры некодирующих нуклеотидных последовательностей [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследование вирома кишечника свиней с разным показателем конверсии корма позволило выявить 7 филумов вирусов, к которым относятся 15 семейств и 33 вида. Самым многочисленным типом в виrome кишечника сви-

ней двух групп оказался тип Uroviricota (более 40 %). Наибольшей обильностью на уровне семейств характеризовалось Podoviridae (36 % для обеих групп). Особенностью вирусного микробиома свиней из группы А было присутствие вирусов семейств Alloherpesviridae, Alternaviridae, Herpesviridae, Partitiviridae и Polydnviridae. Особенностью микробиома группы Б были идентифицированные виды семейства Mimiviridae. Среди всех обнаруженных видов доминировал штамм crAssphage cr124_1 (31 %), принадлежащий к семейству Podoviridae у свиней из группы А. Статистически значимых различий в группах с низкой и высокой конверсией корма не было выявлено и вероятно конверсия корма обусловлена другими факторами, не связанными с виромом кишечника свиней.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Saintilan R.* Phenotypic and genetic relationships between growth and feed intake curves and feed efficiency and amino acid requirements in the growing pig / R. Saintilan, L. Brossard, B. Vautier, P. Sellier [et al.] // *Animals*. — 2015. — Vol. 9, № 1. — P. 18—27. doi: 10.1017/S1751731114002171.
2. *Quan J.* A global comparison of the microbiome compositions of three gut locations in commercial pigs with extreme feed conversion ratios / J. Quan, G. Cai, J. Ye, M. Yang [et al.] // *Scientific Reports*. — 2018. — Vol. 8, № 1. — 4536 p. doi: 10.1038/s41598-018-22692-0.
3. *Hsu B. B.* Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model / B. B. Hsu, T. E. Gibson, V. Yeliseyev, Q. Liu [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2019. — Vol. 25, № 6. — P. 803—814.e5. doi: 10.1016/j.chom.2019.05.001.
4. *Shkoporov A. N.* Viral biogeography of the mammalian gut and parenchymal organs / A. N. Shkoporov, S. R. Stockdale, A. Lavelle, I. Kondova [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2022. — Vol. 7, № 8. — P. 1301—1311. doi: 10.1038/s41564-022-01178-w.
5. *Qin J.* Diversity and potential function of pig gut DNA viruses / J. Qin, B. Ji, Y. Ma, X. Liu [et al.] // *Heliyon*. — 2023. — Vol. 9, № 3. — e14020 p. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14020.
6. *Vigors S.* Pigs that are divergent in feed efficiency, differ in intestinal enzyme and nutrient transporter gene expression, nutrient digestibility and microbial activity / S. Vigors, T. Sweeney, C.J. O'Shea, A. K. Kelly [et al.] // *Animals*. — 2016. — Vol. 10, № 11. — P. 1848—1855. doi: 10.1017/S1751731116000847.
7. *De Sordi L.* The Battle Within: Interactions of Bacteriophages and Bacteria in the Gastrointestinal Tract / L. De Sordi, M. Lourenço, L. Debarbieux // *Cell Host & Microbe*. — 2019. — Vol. 25, № 2. — P. 210—218. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.018.
8. *He B.* Viral Metagenome-Based Precision Surveillance of Pig Population at Large Scale Reveals Viromic Signatures of Sample Types and Influence of Farming Management on Pig Virome / B. He, W. Gong, X. Yan, Z. Zhao [et al.] // *mSystems*. — 2021. — Vol. 6, № 3. — e0042021 p. doi: 10.1128/mSystems.00420-21.
9. *Stanley D.* Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens / D. Stanley, S. E. Denman, R. J. Hughes, M. S. Geier [et al.] // *Applied, Microbiology and Biotechnology*. — 2012. — Vol. 96, № 5. — P. 1361—9. doi: 10.1007/s00253-011-3847-5.
10. *Mehta R. S.* Stability of the human faecal microbiome in a cohort of adult men / R. S. Mehta, G. S. Abu-Ali, D. A. Drew, J. Lloyd-Price [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2018. — Vol. 3, № 3. — P. 347—355. doi: 10.1038/s41564-017-0096-0.
11. *Pasolli E.* Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle / E. Pasolli, F. Asnicar, S. Manara, M. Zolfo [et al.] // *Cell*. — 2019. — Vol. 176, № 3. — P. 649—662.e20. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.001.
12. *Siranosian B. A.* Acquisition, transmission and strain diversity of human gut-colonizing crAss-like phages / B. A. Siranosian, F. B. Tamburini, G. Sherlock, A. S. Bhatt // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11, № 1. — 280 p. doi: 10.1038/s41467-019-14103-3.
13. *Farkas K.* Critical Evaluation of CrAssphage as a Molecular Marker for Human-Derived Wastewater Contamination in the Aquatic Environment / K. Farkas, E. M. Adriaenssens, D. I. Walker, J.E. McDonald [et al.] // *Food and Environmental Virology*. — 2019. — Vol. 11. — P. 113—119. doi: 10.1007/s12560-019-09369-1.
14. *García-Aljaro C.* Determination of crAssphage in water samples and applicability for tracking human faecal pollution / C. García-Aljaro, E. Ballesté, M. Muniesa, J. Jofre // *Microbial Biotechnology*. — 2017. — Vol. 10, № 6. — P. 1775—1780. doi: 10.1111/1751-7915.12841.
15. *Guerin E.* Biology and Taxonomy of crAss-like Bacteriophages, the Most Abundant Virus in the Human Gut / E. Guerin, A. Shkoporov, S. R. Stockdale, A. G. Clooney [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2018. — Vol. 24, № 5. — P. 653—664.e6. doi: 10.1016/j.chom.2018.10.002.
16. *Ostenfeld L.* Detection of specific uncultured bacteriophages by fluorescence in situ hybridisation in pig microbiome / L. Ostenfeld, P. Munk, F. Aarestrup, S. Otani // *PloS one*. — 2023. — Vol. 18. — e0283676 p. doi: 10.1371/journal.pone.0283676.
17. *Shkoporov A. N.* ΦCrAss001 represents the most abundant bacteriophage family in the human gut and infects *Bacteroides intestinalis* / A. N. Shkoporov, E. V. Khokhlova, C. B. Fitzgerald, S.R Stockdale [et al.] // *Nature Communications*. — 2018. — Vol. 9, № 1. — 4781 p. doi: 10.1038/s41467-018-07225-7.
18. *Goulet A.* Conserved and Diverse Traits of Adhesion Devices from Siphoviridae Recognizing Proteinaceous

or Saccharidic Receptors / A. Goulet, S. Spinelli, J. Mahony, C. Cambillau // *Viruses*. — 2020. — Vol. 12, № 5. — 512 p. doi: 10.3390/v12050512.

19. *Allen H. K.* Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes / H. K. Allen, T. Looft, D. O. Bayles, S. Humphrey [et al.] // *mBio*. — 2011. — Vol. 2, № 6. — e00260—11 p. doi: 10.1128/mBio.00260—11.

20. *Benkő M.* Adenoviruses: Pathogenesis / M. Benkő // Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, Encyclopedia of Virology. — 2015. — P. 24—29. doi: 10.1016/B978—0—12—801238—3.02526—5.

21. *Hammond J. M.* Porcine adenovirus as a delivery system for swine vaccines and immunotherapeutics / J. M. Hammond, M. A. Johnson // *The Veterinary Journal*. — 2005. — Vol. 169, № 1. — P. 17—27. doi: 10.1016/j.tvjl.2003.09.007.

22. *Filik K.* Bacteriophage Tail Proteins as a Tool for Bacterial Pathogen Recognition—A Literature Review. / K. Filik, B. Szermer-Olearnik, S. Oleksy, J. Brykała [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. — 2022. — Vol. 11, № 5. — 555 p. doi: 10.3390/antibiotics11050555.

23. *Schweitzer B. K.* Overview of the Flaviviridae With an Emphasis on the Japanese Encephalitis Group Viruses / B. K. Schweitzer, N. M. Chapman, P. C. Iwen // *Laborato-*

ry Medicine. — 2009. — Vol. 40, № 8. — P. 493—499. doi: 10.1309/LM5YWS85NJPCWESW.

24. *Colmant A. M.G.* The recently identified flavivirus Bamaga virus is transmitted horizontally by *Culex* mosquitoes and interferes with West Nile virus replication in vitro and transmission in vivo / A.M.G. Colmant, S. Hall-Mendelin, S. A. Ritchie, H. Bielefeldt-Ohmann [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. — 2018. — Vol. 12, № 10. — e0006886 p. doi: 10.1371/journal.pntd.0006886.

25. *Colmant A. M.G.* A newly discovered flavivirus in the yellow fever virus group displays restricted replication in vertebrates / A.M.G. Colmant, H. Bielefeldt-Ohmann, J. Hobson-Peters, W. W. Suen [et al.] // *Journal of General Virology*. — 2016. — Vol. 97, № 5. — P. 1087—1093. doi: 10.1099/jgv.0.000430.

26. *Göller P. C.* Multi-species host range of staphylococcal phages isolated from wastewater / P. C. Göller, T. Elsener, D. Lorgé, N. Radulovic [et al.] // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — 6965 p. doi: 10.1038/s41467—021—27037—6.

27. *Wilson W. H.* The Phycodnaviridae: the story of how tiny giants rule the world / W. H. Wilson, J. L. Van Etten, M. J. Allen // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. — 2009. — Vol. 328. — P. 1—42. doi: 10.1007/978-3-540-68618-7_1.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

М. Ю. Сыромятников — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий; старший научный сотрудник лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики;

С. В. Шабунин — доктор ветеринарных наук, научный руководитель;

Е. Ю. Нестерова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

М. И. Гладких — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

Ю. Д. Смирнова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

И. Ю. Буракова — аспирант кафедры биохимии и биотехнологии, младший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки, младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

П. Д. Морозова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

М. В. Грязнова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

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

В. Ю. Боев — главный ветеринарный врач.

Статья поступила в редакцию 14.09.2023 г.

AGENTS FOR ZOOHYGIENE, DISINFECTION, DISINSECTIZATION AND DISINFESTATION

Original article
UDC 579.62:577.29

ANALYSIS OF THE INTESTINAL VIROME OF THE PIGS OF THE FATTENING GROUP WITH VARIOUS FEED CONVERSION

Mikhail Yuryevich Syromyatnikov^{*, **, ***✉}, Sergey Viktorovich Shabunin^{*},
Ekaterina Yuryevna Nesterova^{**, ***}, Mariya Ivanovna Gladkikh^{***},
Yuliya Dmitrievna Smirnova^{***}, Inna Yuryevna Burakova^{**, ***},
Polina Dmitrievna Morozova^{**, ***}, Mariya Vladimirovna Gryaznova^{***},
Evgeniy Vladimirovich Mikhaylov^{*}, Vyacheslav Yuryevich Boev^{****1}

**All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and
Therapy (ARVRIPP&T), Voronezh, Russia, syromyatnikov@bio.vsu.ru✉*

***Voronezh State University, Voronezh, Russia*

****Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia*

*****SGTs, Vishnevka s., Verkhnekhavskiy r., Voronezh region, Russia*

Abstract. The objective of the study was to analyze the intestinal virome of pigs with various feed conversion rates. The objects of the study were two conditional groups of fattening pigs, differing in the value of the feed conversion indicator (high conversion (A) and low conversion (B)). The highest prevalence in the intestines of pigs of both groups was characterized by viruses belonging to the type Uroviricota (more than 40 %). At the family level, the dominant viruses were representatives of Podoviridae (36 %). A feature of the viral microbiome of pigs from group A was the detection of viruses from the families Alloherpesviridae, Althernaviridae, Herpesviridae, Partitiviridae and Polydnviridae. A distinctive feature of the intestinal virome of group B was the identified species of the family Mimiviridae. The results obtained currently cannot indicate the existence of a relationship between individual viral taxa in the intestines of pigs and feed conversion rate. Such data require further and more in-depth study.

Keywords: pigs, intestines, feed conversion, virome, viruses, high-throughput sequencing.

Acknowledgements: the work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the national project "Science" (project FZGW-2020-0001, unique state assignment register number 075001X39782002)

Determining the optimal feed conversion rate is the main strategy for efficient farming [1]. High values of the conversion rate lead to an irrational economic policy of the livestock enterprise by increasing production costs and reducing the yield of the final product. Thus, calculating and maintaining a low value of the feed conversion parameter in production helps solve the problem and is a factor in economic growth in pig breeding farms. This helps to minimize the cost of pig production and leads to good meat production performance [2]. In addition to feeding, the factors such as livestock genetics, diseases of contagious and non-contagious etiology, inadequate therapy, improper keeping, etc. play a major role in main-

taining animal health. Such indicators directly negatively affect the condition of the animals' intestines, their microflora, which, in turn, is an indicator of livestock health [3]. This is explained by the fact that the intestinal microbiota produces essential enzymes and nutrient substrates for the life of pigs [4].

The gastrointestinal tract of mammals is inhabited by various organisms, including bacteria and archaea, representatives of eukaryotes, and viruses [5,6]. Their relationship with each other and with the host organism ensures the healthy functioning of the digestive system and also plays a significant role in the formation of immunity [7]. The intestinal virome of animals, in particular pigs, is currently subject to detailed

© Syromyatnikov M. Yu., Shabunin S. V., Nesterova E. Yu., Gladkikh M. I., Smirnova Yu. D., Burakova I. Yu., Morozova P. D., Gryaznova M. V., Mikhaylov E. V., Boev V. Yu., 2023

study [8,9]. It is known that viruses inhabiting the intestinal tract are predominantly represented by bacteriophages, which are of great importance in the formation of bacterial communities [10]. The important contribution of viruses to the intestinal microbiome, and, consequently, the health of animals, must be taken into account when organizing and rationally managing agriculture [11].

The objective of the study was to evaluate the intestinal virome of pigs belonging to groups with various feed conversion rates using high-throughput sequencing.

MATERIAL AND METHODS

The subjects of the study were ($n = 12$) clinically healthy pigs during the fattening period. The animals were divided into 2 groups according to the feed conversion rate: ($n = 6$) — low feed conversion (A) with an average conversion rate of 2.00 and ($n = 6$) — high feed conversion (B) with an average conversion rate of 2.22. The material for studying the intestinal virome was feces obtained with sterile probes from the rectum.

A commercial HiPure DNA Micro Kit (Magen, Guangzhou, China) was used to extract DNA from the samples. Isolation was carried out according to the manufacturer's protocol. Sequencing libraries were prepared using the following protocol: DNA was fragmented using the MGIEasy Fast FS Library Prep Module kit (MGI, Shenzhen, China), followed by magnetic purification with MGIEasy DNA Clean Beads (MGI, Shenzhen, China). Adapter ligation was performed with MGIEasy UDB Primer Adapter Kit A (MGI, Shenzhen, China) and PCR amplification. DNA library quality was assessed using Qubit and the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

Further single-strand circularization was performed using the MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Shenzhen, China). The final libraries were pooled and sequenced using the MGI DNBSEQ-G50 sequencing platform with the DNBSEQ-G50RS sequencing flow cell model: FCL (MGI, Shenzhen, China). The DNBSEQ-G50RS high-throughput sequencing kit was used to generate DNBs. The quality of raw metagenomic data was assessed using the FastQC tool. Technical sequences and low quality bases ($Q < 30$) were trimmed using fastp. Taxonomic profiling of samples was performed using Kraken2 with standard virus databases.

STUDY RESULTS

The intestinal virome of healthy pigs was studied using high-throughput sequencing. Bioinformatics

analysis of nucleotide sequences allowed us to identify a total of 315271 reads.

By analyzing the sequences relative to the phylum to which the viruses belong, 7 phyla were identified: Duplornaviricota, Kitrinoviricota, Nucleocytoviricota, Peploviricota, Pisuviricota, Preplasmiviricota and Uroviricota. Some viruses could not be attributed to any specific type, and therefore were combined into the common group "Unclassified viruses" (Fig. 1).

The most abundant type in the intestinal virome of pigs of two groups was Uroviricota, its abundance exceeded 40 % of the total number of viruses. The next most common phyla were Duplornaviricota and Kitrinoviricota (the average for both groups was 17 % and 14 %, respectively). The abundance of representatives of the groups Preplasmiviricota and "Unclassified viruses" did not exceed 8 %. Viruses belonging to the phylum Nucleocytoviricota dominated in group B (16 %), and their abundance in group A was less than 2 %. The phyla Peploviricota and Pisuviricota were detected only in group A.

The distribution of families in the viral microbiome is presented in Fig. 2.

Bioinformatics analysis revealed 15 families of viruses in the intestine: Adenoviridae, Alloherpesviridae, Alternaviridae, Flaviviridae, Herelleviridae, Herpesviridae, Mimiviridae, Myoviridae, Pandoraviridae, Partitiviridae, Phycodnaviridae, Podoviridae, Polydnviridae, Siphoviridae and Totiviridae. The family Podoviridae was characterized by the greatest abundance in the intestinal virome. The relative abundance of viruses for the two groups averaged about 36 %. A feature of the viral microbiome of pigs from group A was the presence of viruses from the families Alloherpesviridae, Alternaviridae, Herpesviridae, Partitiviridae and Polydnviridae. The relative abundance of viruses of each of these families was 2.4 %. A typical difference between the microbiome of group A and the microbiome of group B was the high abundance of representatives of the family Siphoviridae, the percentage of which was 17 % and 4 %, respectively. A feature of the microbiome of group B was the identified species of the family Mimiviridae, as well as an increased abundance of the family Phycodnaviridae in the virome. However, no statistically significant differences were found between the two groups.

Taking a closer look at the dominant family, 15 virus species were identified as occurring in the porcine intestinal virome. It should be noted that 13 of them were identified as a strain of one species crAssphage sp. (Fig. 3).

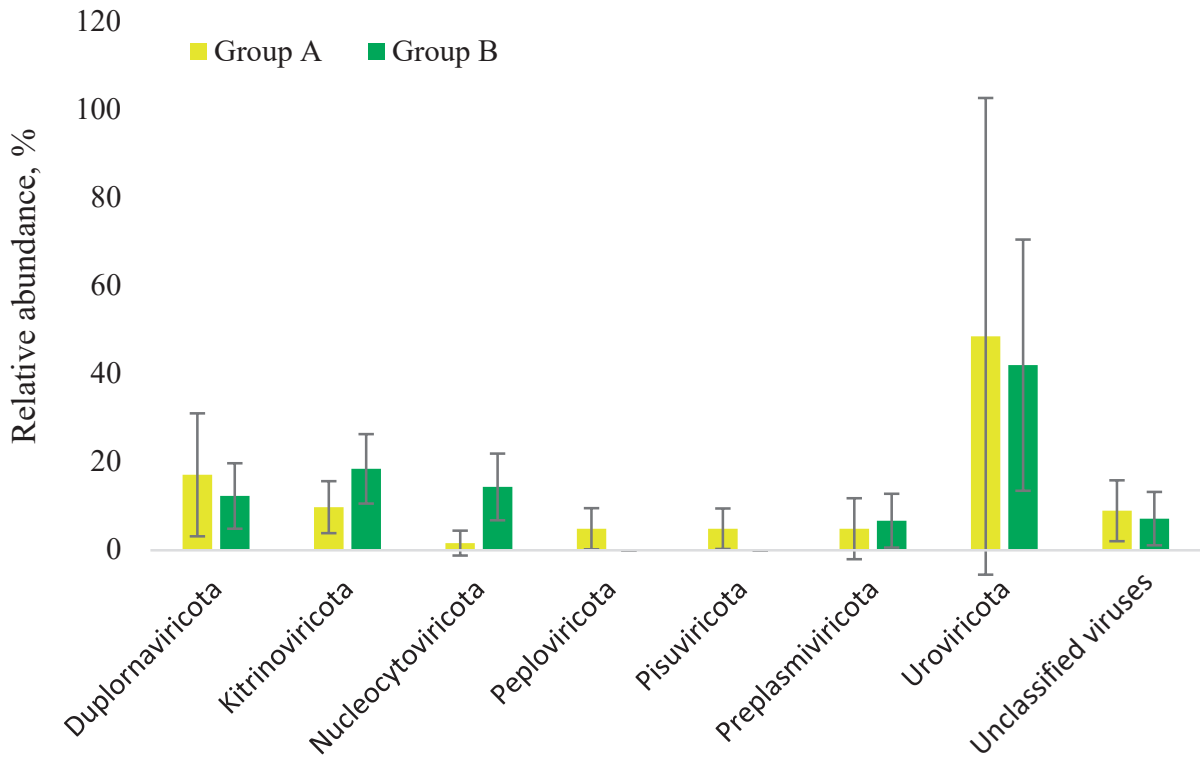


Fig. 1. Relative abundance of virus types in pig intestines

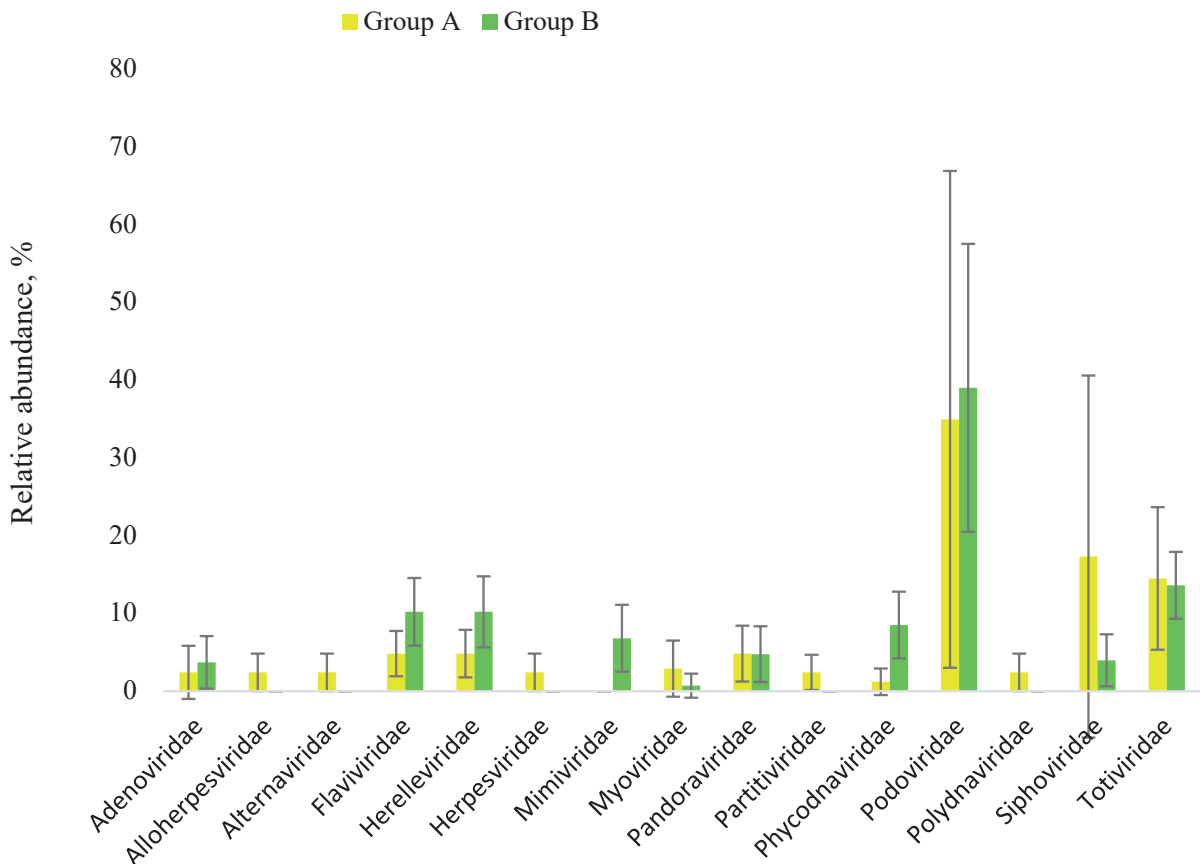


Fig. 2. Relative abundance of virus families in the intestine of pigs

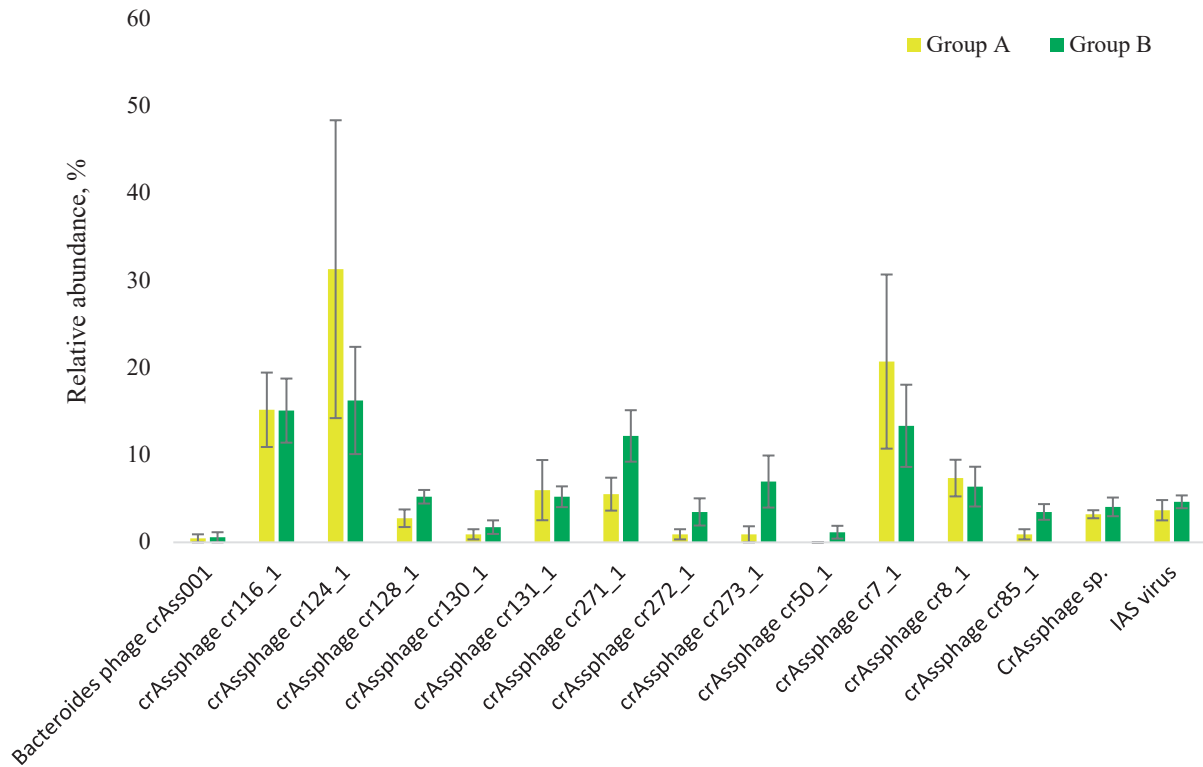


Fig. 3. Prevalence of viruses of the family Podoviridae in the intestines of pigs

It is known that the bacteriophage crAssphage is a double-stranded DNA enclosed in a ring [12]. The virus is actively used as an indicator of environmental contamination with feces [13, 14]. This is explained by the fact that crAssphage is ubiquitous and is one of the main components of the intestinal metagenome of mammals, including pigs [15, 16]. As for our study, the predominance of the strain crAssphage cr124_1 over the other identified taxa was recorded in the intestinal virome of group A. The relative abundance value was 31 %. At the same time, no specific predominant strain was identified in group B. In this sample, the most common representatives were crAssphage cr116_1, crAssphage cr124_1 and crAssphage cr7_1 with relative abundance values of 15 %, 16 % and 13 %, respectively.

Another identified representative of the family Podoviridae was IAS virus. Its abundance in both groups was less than 5 %. The relative abundance in group A corresponded to 3.6 %, and in group B — 4.6 %. It is known that in the DNA structure of related bacteriophages crAss and IAS, the overwhelming majority of variable nucleotide sequences are located in the region responsible for coding tail fibers and spines. Such features indicate high variability of receptors and proteins, which contributes to the representatives of this family being highly virulent [17].

Figure 4 shows the species diversity of representatives of the family Siphoviridae, identified as a result of analysis of the intestinal virome of pigs with various feed conversion rates. A typical feature of bacteriophages belonging to this family is a well-developed adhesive apparatus, which is located at the distal end of a long, non-compressible tail. Adhesion to the host cell occurs due to specific receptors of protein or carbohydrate nature [18].

The heterogeneity of occurrence of a particular species in the two studied groups was demonstrated. Thus, in group A, the strains *Lactobacillus phage phiadh* (39 %), *Lactobacillus prophage Lj928* (4 %) and *Lactobacillus prophage Lj965* (48 %) were detected, while in group B they were absent. At the same time, *Streptomyces phage Omar* was detected only in group B, its relative abundance was 13 %. Under the effect of active substances of a number of antibiotics, prophage induction can occur in the intestines of pigs [19]. The strains of *Faecalibacterium virus Oengus* and *Gordonia virus Jace* were common in both groups, but in group B their percentage prevailed over group A and amounted up to 27 % and 55 %, respectively.

The study of the viral taxonomic diversity of the pig intestine allowed us to identify 5 more families Adenoviridae, Flaviviridae, Herelleviridae, Phycodnaviridae and Myoviridae to species (Fig. 5).

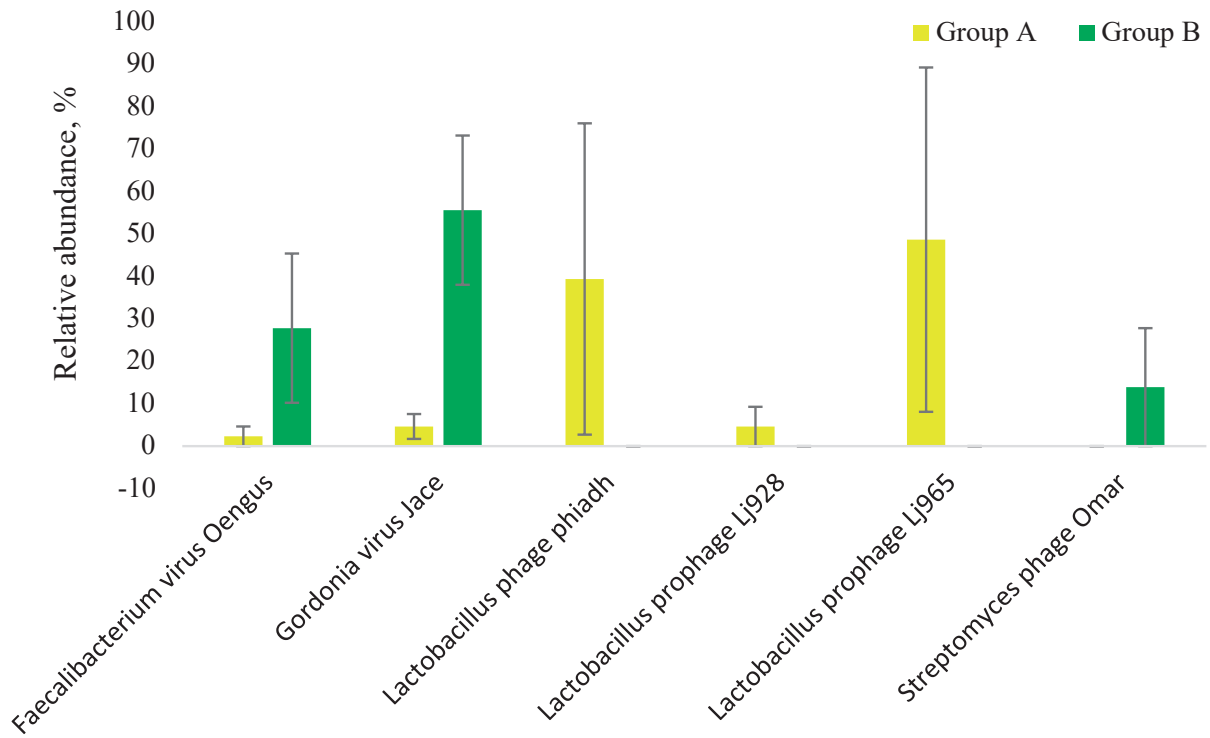


Fig. 4. Prevalence of viruses of the family Siphoviridae in the intestines of pigs

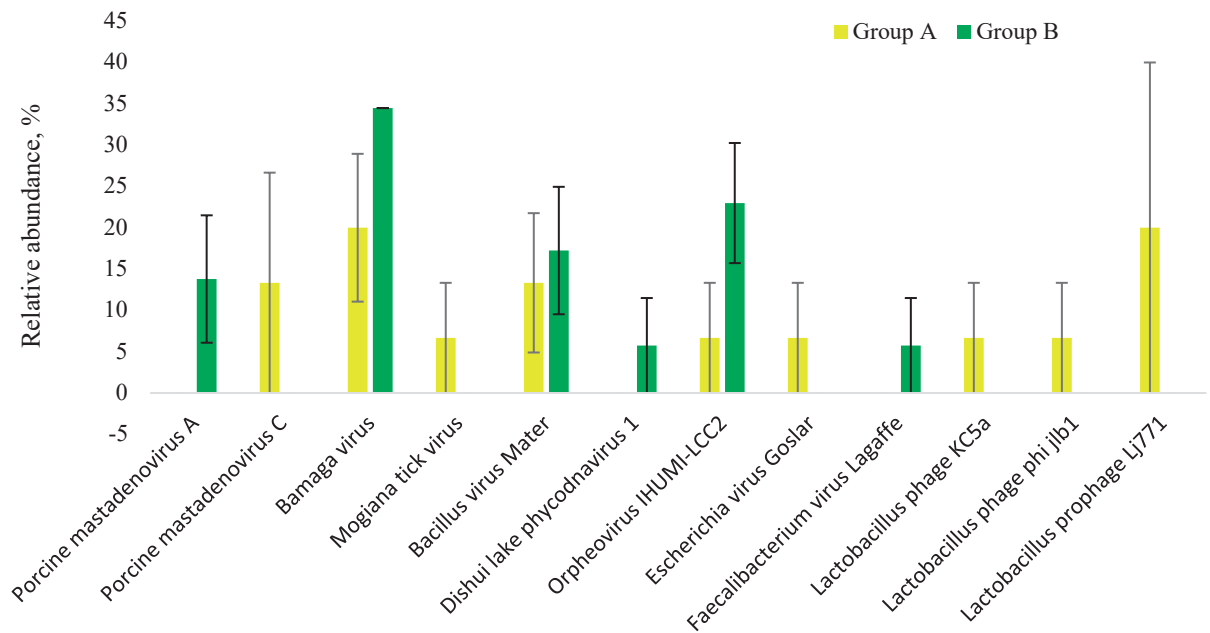


Fig. 5. Prevalence of viruses of various types in the intestines of pigs

Porcine mastadenovirus A and *Porcine mastadenovirus C*, belonging to the family Adenoviridae, were identified in groups of pigs with different feed conversion rates. Thus, *Porcine mastadenovirus A* was detected only in group B, and *Porcine mastadenovirus C* only in group A, their relative abundance was 13.7 % and 13.3 %, respectively. Adenoviruses are represented by a variety of genetic potential and lineages; there-

fore, different representatives of this community are able to infect the same host organism at the same time. About 150 serotypes of adenoviruses have been studied [20]. It has been proven that viruses of the family Adenoviridae are detected in every major class of vertebrate animals, including pigs [21].

A picture similar to the case described above is also typical for representatives of the family Myoviridae.

Thus, the strain *Faecalibacterium virus* Lagaffe was detected only in pigs from group B (5.7 %), and the viruses *Lactobacillus phage* KC5a (6.6 %), *Lactobacillus phage* phi jlb1 (6.6 %) and *Lactobacillus prophage* Lj771 (20 %) only in the animals belonging to group A. The main distinguishing characteristic of bacteriophages of the family Myoviridae from other viral particles is the presence of a mobile tail, which is capable of contracting, due to which the virus penetrates the host cell [22].

In this sample of 5 families, the most abundant virus was *Bamaga virus* from the family Flaviviridae, its relative abundance was 34 % in group B. As for group A, *Bamaga virus* was also present, but the percentage of relative abundance was lower (20 %). Another representative of this family was *Mogiana tick virus*, which was found only in the pigs belonging to group A (6.6 %). In its structure, the family Flaviviridae is a sphere, which is represented by a single-stranded positive strand of RNA [23]. *Bamaga virus* was identified in the early 2000s and has been extensively studied for two decades [24]. It was found that the virus is not able to replicate in all vertebrate cell lines; for example, chicken and monkey organisms are not susceptible to infection [25].

Bacillus virus Mater became the only representative of the family Herelleviridae and was identified in both groups. The relative abundance for group A was 13 %, and for group B — 17 %. It has been established that the strains of the family Herelleviridae are staphylococcal bacteriophages, that is, they exhibit viral activity against bacteria of the genus *Staphylococcus* [26].

Representatives of the family Phycodnaviridae, *Dishui lake phycodnavirus* 1 (5.7 %) and *Orpheovirus IHUMI—LCC2* (22.9 %), were detected in the samples obtained from group B, while no *Dishui lake phycodnavirus* 1 strain was identified in group A. The representatives of the family Phycodnaviridae are characterized by the presence of diverse genomes, in which large clusters of non-coding nucleotide sequences are present [27].

CONCLUSION

Thus, a study of the intestinal virome of pigs with various feed conversion rates made it possible to identify 7 phyla of viruses, which include 15 families and 33 species. The most numerous type in the intestinal virome of pigs of two groups was the type Uroviricota (more than 40 %).

The highest abundance at the family level was characterized by Podoviridae (36 % for both groups). A feature of the viral microbiome of pigs from group

A was the presence of viruses from the families Alloherpesviridae, Alternaviridae, Herpesviridae, Partitiviridae and Polydnviridae. A feature of the microbiome of group B was the identified species of the family Mimiviridae. Among all detected species, the dominant strain was crAssphage cr124_1 (31 %), belonging to the family Podoviridae, in pigs from group A. No statistically significant differences were detected in the groups with low and high feed conversion and feed conversion is likely due to other factors not related to the intestinal virome of pigs.

REFERENCES

1. *Saintilan R.* Phenotypic and genetic relationships between growth and feed intake curves and feed efficiency and amino acid requirements in the growing pig / R. Saintilan, L. Brossard, B. Vautier, P. Sellier [et al.] // *Animals*. — 2015. — Vol. 9, No. 1. — P. 18—27. doi: 10.1017/S1751731114002171.
2. *Quan J.* A global comparison of the microbiome compositions of three gut locations in commercial pigs with extreme feed conversion ratios / J. Quan, G. Cai, J. Ye, M. Yang [et al.] // *Scientific Reports*. — 2018. — Vol. 8, No. 1. — 4536 p. doi: 10.1038/s41598-018-22692-0.
3. *Hsu B. B.* Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model / B. B. Hsu, T. E. Gibson, V. Yeliseyev, Q. Liu [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2019. — Vol. 25, No. 6. — P. 803—814.e5. doi: 10.1016/j.chom.2019.05.001.
4. *Shkoporov A. N.* Viral biogeography of the mammalian gut and parenchymal organs / A. N. Shkoporov, S. R. Stockdale, A. Lavelle, I. Kondova [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2022. — Vol. 7, No. 8. — P. 1301—1311. doi: 10.1038/s41564-022-01178-w.
5. *Qin J.* Diversity and potential function of pig gut DNA viruses / J. Qin, B. Ji, Y. Ma, X. Liu [et al.] // *Heliyon*. — 2023. — Vol. 9, No. 3. — e14020 p. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14020.
6. *Vigors S.* Pigs that are divergent in feed efficiency, differ in intestinal enzyme and nutrient transporter gene expression, nutrient digestibility and microbial activity / S. Vigors, T. Sweeney, C.J. O’Shea, A. K. Kelly [et al.] // *Animals*. — 2016. — Vol. 10, No. 11. — P. 1848—1855. doi: 10.1017/S1751731116000847.
7. *De Sordi L.* The Battle Within: Interactions of Bacteriophages and Bacteria in the Gastrointestinal Tract / L. De Sordi, M. Lourenço, L. Debarbieux // *Cell Host & Microbe*. — 2019. — Vol. 25, No. 2. — P. 210—218. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.018.
8. *He B.* Viral Metagenome-Based Precision Surveillance of Pig Population at Large Scale Reveals Viromic Signatures of Sample Types and Influence of Farming Management on Pig Virome / B. He, W. Gong, X. Yan, Z. Zhao [et al.] // *mSystems*. — 2021. — Vol. 6, No. 3. — e0042021 p. doi: 10.1128/mSystems.00420-21.

9. Stanley D. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens / D. Stanley, S. E. Denman, R. J. Hughes, M. S. Geier [et al.] // *Applied, Microbiology and Biotechnology*. — 2012. — Vol. 96, No. 5. — P. 1361—9. doi: 10.1007/s00253-011-3847-5.
10. Mehta R. S. Stability of the human faecal microbiome in a cohort of adult men / R. S. Mehta, G. S. Abu-Ali, D. A. Drew, J. Lloyd-Price [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2018. — Vol. 3, No. 3. — P. 347—355. doi: 10.1038/s41564—017—0096—0.
11. Pasolli E. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle / E. Pasolli, F. Asnicar, S. Manara, M. Zolfo [et al.] // *Cell*. — 2019. — Vol. 176, No. 3. — P. 649—662.e20. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.001.
12. Siranosian B. A. Acquisition, transmission and strain diversity of human gut-colonizing crAss-like phages / B. A. Siranosian, F. B. Tamburini, G. Sherlock, A. S. Bhatt // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11, No. 1. — 280 p. doi: 10.1038/s41467—019—14103—3.
13. Farkas K. Critical Evaluation of CrAssphage as a Molecular Marker for Human-Derived Wastewater Contamination in the Aquatic Environment / K. Farkas, E. M. Adriaenssens, D. I. Walker, J.E. McDonald [et al.] // *Food and Environmental Virology*. — 2019. — Vol. 11. — P. 113—119. doi: 10.1007/s12560-019-09369-1.
14. García-Aljaro C. Determination of crAssphage in water samples and applicability for tracking human faecal pollution / C. García-Aljaro, E. Ballesté, M. Muniesa, J. Jofre // *Microbial Biotechnology*. — 2017. — Vol. 10, No. 6. — P. 1775—1780. doi: 10.1111/1751—7915.12841.
15. Guerin E. Biology and Taxonomy of crAss-like Bacteriophages, the Most Abundant Virus in the Human Gut / E. Guerin, A. Shkoporov, S. R. Stockdale, A. G. Clooney [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2018. — Vol. 24, No. 5. — P. 653—664.e6. doi: 10.1016/j.chom.2018.10.002.
16. Ostefeld L. Detection of specific uncultured bacteriophages by fluorescence in situ hybridisation in pig microbiome / L. Ostefeld, P. Munk, F. Aarestrup, S. Otani // *PloS one*. — 2023. — Vol. 18. — e0283676 p. doi: 10.1371/journal.pone.0283676.
17. Shkoporov A. N. Φ CrAss001 represents the most abundant bacteriophage family in the human gut and infects *Bacteroides intestinalis* / A. N. Shkoporov, E. V. Khokhlova, C. B. Fitzgerald, S.R Stockdale [et al.] // *Nature Communications*. — 2018. — Vol. 9, No. 1. — 4781 p. doi: 10.1038/s41467—018—07225—7.
18. Goulet A. Conserved and Diverse Traits of Adhesion Devices from Siphoviridae Recognizing Proteinaceous or Saccharidic Receptors / A. Goulet, S. Spinelli, J. Mahony, C. Cambillau // *Viruses*. — 2020. — Vol. 12, No. 5. — 512 p. doi: 10.3390/v12050512.
19. Allen H. K. Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes / H. K. Allen, T. Looft, D. O. Bayles, S. Humphrey [et al.] // *mBio*. — 2011. — Vol. 2, No. 6. — e00260—11 p. doi: 10.1128/mBio.00260—11.
20. Benkő M. Adenoviruses: Pathogenesis / M. Benkő // *Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, Encyclopedia of Virology*. — 2015. — P. 24—29. doi: 10.1016/B978—0—12—801238—3.02526—5.
21. Hammond J. M. Porcine adenovirus as a delivery system for swine vaccines and immunotherapeutics / J. M. Hammond, M. A. Johnson // *The Veterinary Journal*. — 2005. — Vol. 169, No. 1. — P. 17—27. doi: 10.1016/j.tvjl.2003.09.007.
22. Filik K. Bacteriophage Tail Proteins as a Tool for Bacterial Pathogen Recognition-A Literature Review. / K. Filik, B. Szermer-Olearnik, S. Oleksy, J. Brykała [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. — 2022. — Vol. 11, No. 5. — 555 p. doi: 10.3390/antibiotics11050555.
23. Schweitzer B. K. Overview of the Flaviviridae With an Emphasis on the Japanese Encephalitis Group Viruses / B. K. Schweitzer, N. M. Chapman, P. C. Iwen // *Laboratory Medicine*. — 2009. — Vol. 40, No. 8. — P. 493—499. doi: 10.1309/LM5YWS85NJPCWESW.
24. Colmant A. M.G. The recently identified flavivirus Bamaga virus is transmitted horizontally by Culex mosquitoes and interferes with West Nile virus replication in vitro and transmission in vivo / A.M.G. Colmant, S. Hall-Mendelin, S. A. Ritchie, H. Bielefeldt-Ohmann [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. — 2018. — Vol. 12, No. 10. — e0006886 p. doi: 10.1371/journal.pntd.0006886.
25. Colmant A. M.G. A newly discovered flavivirus in the yellow fever virus group displays restricted replication in vertebrates / A.M.G. Colmant, H. Bielefeldt-Ohmann, J. Hobson-Peters, W. W. Suen [et al.] // *Journal of General Virology*. — 2016. — Vol. 97, No. 5. — P. 1087—1093. doi: 10.1099/jgv.0.000430.
26. Göller P. C. Multi-species host range of staphylococcal phages isolated from wastewater / P. C. Göller, T. Elsener, D. Lorgé, N. Radulovic [et al.] // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — 6965 p. doi: 10.1038/s41467-021-27037-6.
27. Wilson W. H. The Phycodnaviridae: the story of how tiny giants rule the world / W. H. Wilson, J. L. Van Etten, M. J. Allen // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. — 2009. — Vol. 328. — P. 1—42. doi: 10.1007/978-3-540-68618-7_1.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

M. Yu. Syromyatnikov — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies; Senior Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics;

S. V. Shabunin — Doctor of Veterinary Sciences, Academic Director;

E. Yu. Nesterova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

M. I. Gladkikh — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

Yu. D. Smirnova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

I. Yu. Burakova — Postgraduate Student, Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

P. D. Morozova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

M. V. Gryaznova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

E. V. Mikhaylov — Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics;

V. Yu. Boev — Chief Veterinarian.

The article was submitted 14.09.2023.

Научная статья

УДК 579.62:577.29

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.122

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ МОЛОКА КОРОВ

Михаил Юрьевич Сыромятников^{*, **, ***✉}, Сергей Викторович Шабунин^{*},
Екатерина Юрьевна Нестерова^{**, ***}, Мария Ивановна Гладких^{***},
Виталий Иванович Зимников^{*}, Ольга Алексеевна Манжурина^{*},
Лариса Юрьевна Сашнина^{*1}

^{*}Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, email: syromyatnikov@bio.vsu.ru✉

^{**}Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

^{***}Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Аннотация. Целью работы стала оценка бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных из молока коров больных маститом, на присутствие в них генов антибиотикорезистентности. В ходе работы обнаружено 17 генов устойчивости к противомикробным препаратам различных спектров действия. Во всех проанализированных образцах были обнаружены гены резистентности к тетрациклинам, бета-лактамам и линкозамидам. Среди генов устойчивости к тетрациклинам ген Tet(K) встречался во всех исследуемых образцах. Ген blaTEM оказался доминирующим среди генов устойчивости к бета-лактамам (присутствие в 100 % образцов). Ген резистентности к линкозамиду lnuA был обнаружен у 100 % проб. Показано, что гены устойчивости к эритромицину msrA и ermC также присутствовали в исследуемых образцах рода *Staphylococcus* и составили 27 % и 14 % соответственно. Ген устойчивости к аминогликозидам aph(3')-Ia (присутствие в 27 % образцов), преобладал в пробах *Staphylococcus* по сравнению с геном aacA-D (присутствие в 5 % образцов). Распространенность генов устойчивости к хлорамфениколу floR и кларитромицину CLR была не так выражена и составила 5 %. Процентное содержание гена резистентности к макролидам mefA составило 14 %. Данная работа показывает, что у бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных из молока, циркулируют гены резистентности к различным классам антибиотиков, что необходимо учитывать при планировании терапии маститов.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, гены, бактерии, мастит, ПЦР, электрофорез, идентификация.

Благодарность: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках национального проекта «Наука» (проект FZGW-2020-0001, уникальный номер реестра государственных заданий 075001X39782002)

Молоко представляет собой пищевой продукт, состоящий из большого разнообразия микро и макроэлементов, среди которых белки, жиры, углеводы, витамины, минералы, аминокислоты и т. д. [1]. Доминирующей микрофлорой молока является молочнокислые бактерии, яркими представителями которых являются бактерии рода: *Lactococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Leuconostoc spp*, *Streptococcus spp*, *Enterococcus spp*. [2]. Помимо полезных бактерий молоко может содержать в своем составе другие микроорганизмы, дрожжи и плесневые грибы,

которые негативно влияют на качество продукта, вызывая порчу, и могут быть опасными для здоровья человека [3]. Ярким примером этого является способность психотелерантных микробов за счет выделения внеклеточных протеаз и липаз продолжать жизнедеятельность в молоке даже при температуре +4 °C [4].

Самым распространенным заболеванием молочного скота является внутримаммарная инфекция (мастит), который оказывает влияние на качество молока [5, 6]. Причиной развития данно-

© Сыромятников М. Ю., Шабунин С. В., Нестерова Е. Ю., Гладких М. И., Зимников В. И., Манжурина О. А., Сашнина Л. Ю., 2023

го заболевания являются бактерии *Streptococcus agalactiae* и *Staphylococcus aureus*. Помимо этих микроорганизмов установлено, что мастит также вызывают: *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella spp.* и *Prototheca spp.* [7—9]. Для терапии и профилактики мастита крупного рогатого скота активно используются противомикробные препараты, что в свою очередь становится причиной появления генов резистентности у патогенных микроорганизмов к применяемым группам антибиотиков [10, 11].

Цель исследования явилось изучение условно-патогенных бактерий рода *Staphylococcus*, изолированных от больных маститом коров, на наличие в них генов антибиотикорезистентности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования выступали бактерии рода *Staphylococcus*, выделенные из 22 образцов молока коров больных маститом (табл. 1). Бактерии были верифицированы с помощью MALDI-TOF.

Таблица 1

Изолированные из молока больных маститом коров бактерии рода *Staphylococcus*.

Номер образца	Вид бактерии
1	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	<i>Staphylococcus cromogenes</i>
4	<i>Staphylococcus aureus</i>
5	<i>Staphylococcus aureus</i>
6	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
7	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	<i>Staphylococcus aureus</i>
9	<i>Staphylococcus aureus</i>
10	<i>Staphylococcus aureus</i>
11	<i>Staphylococcus aureus</i>
12	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
13	<i>Staphylococcus aureus</i>
14	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
15	<i>Staphylococcus aureus</i>
16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
17	<i>Staphylococcus aureus</i>
18	<i>Staphylococcus cromogenes</i>
19	<i>Staphylococcus aureus</i>
20	<i>Staphylococcus aureus</i>
21	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
22	<i>Staphylococcus cromogenes</i>

Экстракция бактериальной ДНК осуществлялась коммерческим набором ПРОБА-ГС (ДНК-технология, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Качественная ПЦР проводилась с использованием 5X ScreenMix-HS реакционной смеси (Евроген, Россия) Температурный цикл варьировал в зависимости от используемых праймеров. Визуализация результатов ПЦР осуществлялась в 2 % агарозном геле.

Для детекции генов в качестве праймеров и зондов использовались уже опубликованные в международных научных изданиях олигонуклеотиды, которые были дополнительно верифицированы в системе NCBI Cenbank с помощью инструмента BLASTn (табл. 2).

Количественная ПЦР проводилась с использованием коммерческой смеси 5X qPCRmix-HS LowROX (Евроген, Россия). Детекция результатов проводилась по каналу флуоресценции FAM.

Таблица 2

Праймеры и зонды, используемые при постановке ПЦР в реальном времени

Название	Последовательность нуклеотидов
<i>Mec-f</i> <i>Mec-r</i> <i>Mec-p</i>	AAAGAACCTCTGCTCAACAAGT TGTTATTTAACCCAATCATTGCTGTT FAM—CCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACT-BHQ1
<i>NDM-f</i> <i>NDM-r</i> <i>NDM-p</i>	TTGGCGATCTGGTTTTCC GGTTGATCTCCTGCTTGA FAM-TGGCAGCACACTTCSTATCTCG-BHQ1
<i>vanA-f</i> <i>vanA-r</i> <i>vanA-p</i>	CTGTGAGGTCGGTTGTGCG TTTGGTCCACCTCGCCA FAM—CAACTAACGCGGCACTGTTTCCCAAT-BHQ1
<i>Kpc-f</i> <i>Kpc-r</i> <i>Kpc-p</i>	CGCAACTGTAAGTTACCG CATGCCTGTTGTCAGATA FAM—CCTGTGTCAGCTCATTCAAGG-BHQ1
<i>floR-f</i> <i>floR-r</i> <i>floR-p</i>	GGCAGGCGATATTCATTA CGAGAAGAAGACGAAGAAGG FAM—CTAAAGCCGACAGTGTA-BHQ1
<i>ampC-f</i> <i>ampC-r</i> <i>ampC-p</i>	GGGAATGCTGGATGCACAA CATGACCCAGTTCGCCATATC FAM—CCTATGGCGTGAAAACCAACGTGCA-BHQ1
<i>ermB-f</i> <i>ermB-r</i> <i>ermB-p</i>	GGATTCTACAAGCGTACCTTGGA GCTGGCAGCTTAAGCAATTGCT FAM—CACTAGGGTTGCTCTTGCACACTCAAGTC-BHQ1

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В результате анализа электрофореграмм и кри-вых флуоресценции 22 образцов бактерий рода *Staphylococcus*, изолированных от больных маститом коров, было детектировано 17 генов антибиотикорезистентности. Они соответствовали 8 группам антибиотиков, среди которых тетрациклины, бета-лактамы, аминогликозиды, эритромицин, хлорамфеникол, линкозамид, макролиды и кларитромицин (рис. 1).

Установлено, что гены устойчивости к антибиотикам тетрациклиновой, бета-лактоманой и линкозамидной групп присутствовали во всех изученных

образцах рода *Staphylococcus* (100 %). Процентное соотношение генов устойчивости к хлорамфениколу и кларитромицину в пробах было наименьшим и составляло 5 %.

Что касается обнаруженных генов резистентности к эритромицину и аминогликозиду, то их количество в изученных образцах составило 36 и 32 % соответственно.

На рисунке 2 представлен пример электрофореграммы (образец под номером 13), у которого были выявлены гены антибиотикорезистентности к тетрациклинам, бета-лактамам, эритромицину и аминогликозидам.

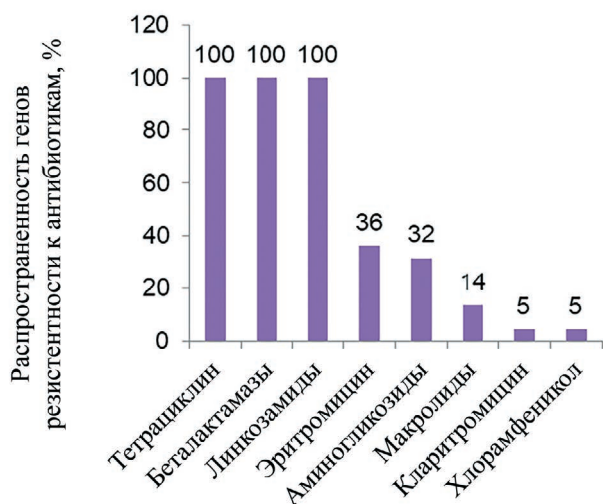


Рис. 1. Распространенность генов антибиотикорезистентности у бактерий родов *Staphylococcus*, изолированных от больных маститом коров

Антимикробные препараты, в число которых входят: пенициллин, цефалоспорины, стрептомицин и тетрациклин активно применяются в качестве терапии и профилактики мастита коров, вызываемого грамположительными и грамотрицательными бактериями [12]. Такие антибиотики повсеместно назначаются животным для предупреждения мастита. Рост заболеваемости маститом поголо-

вья приводит к еще более широкому применению противомикробных препаратов. Все это способствует увеличению остаточных концентраций антибиотиков в молоке, и развитию антибиотикорезистентности [12].

На рисунке 3 представлена распространенность генов устойчивости к тетрациклинам (А) и бета-лактамам (Б).

По результатам электрофореза удалось детектировать 5 генов устойчивости к тетрациклинам (А). Показано, что 100 % образцов бактерий рода *Staphylococcus* содержали в своем составе ген устойчивости к тетрациклинам *Tet(K)*. Тогда как процентное содержание гена *Tet(Z)* и *Tet(W)* в исследуемых образцах составило 9 % и 5 % соответственно. Гены *Tet(B)* и *Tet(M)*, были также обнаружены в исследуемых образцах, а их относительное содержание было 27 % и 23 % соответственно. Аналогичные результаты были получены в Индонезии, где у вида *Streptococcus agalactiae*, выделенного от больных маститом коров были обнаружены гены устойчивости к тетрациклинам [13]. Что касается выявленных 4 генов устойчивости к бета-лактамам (Б), то доминирующим оказался ген *blaTEM*, который был выявлен в 100 % образцов. Менее 50 % пришлось на *blaKPC* (32 %) и *blaNDM* (14 %), а процентное содержание гена *blaZ* составило 59 %.

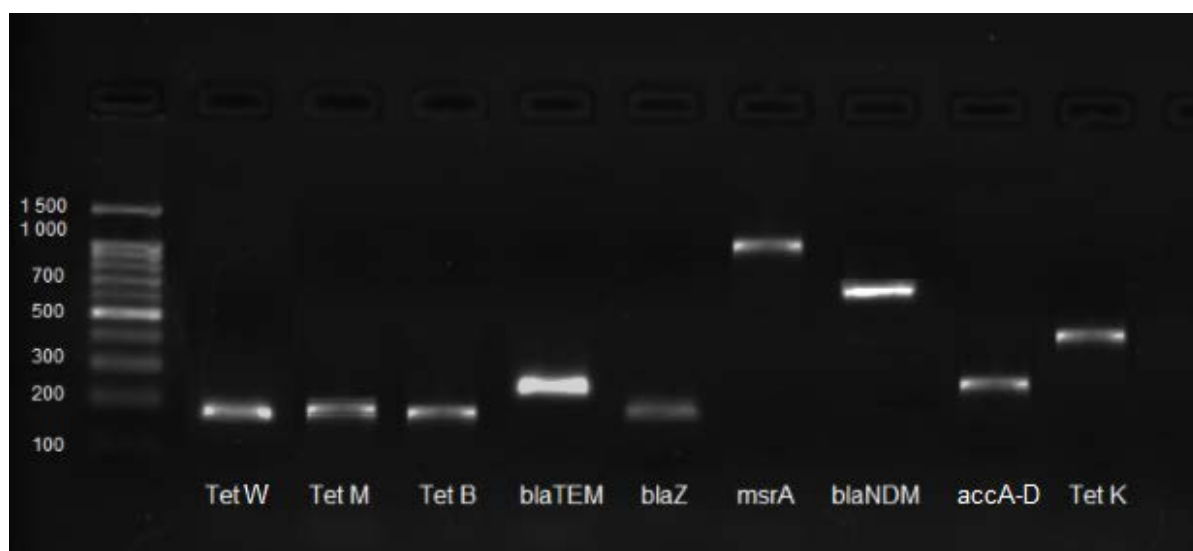


Рис. 2. Электрофореграмма, отражающая распространенность генов антибиотикорезистентности в 13 образце бактерий рода *Staphylococcus*, изолированных от больных маститом коров

Известны результаты исследования, проведенного в Китае, в котором у стрептококка, полученного от коров с маститом, установлена 100 % чувствительность к аминогликозидным антибиотикам [14].

Наше исследование позволило выявить гены антибиотикорезистентности к противомикробным препаратам на основе аминогликозидов и эритромицина в образцах бактерий рода *Staphylococcus* (рис. 4).

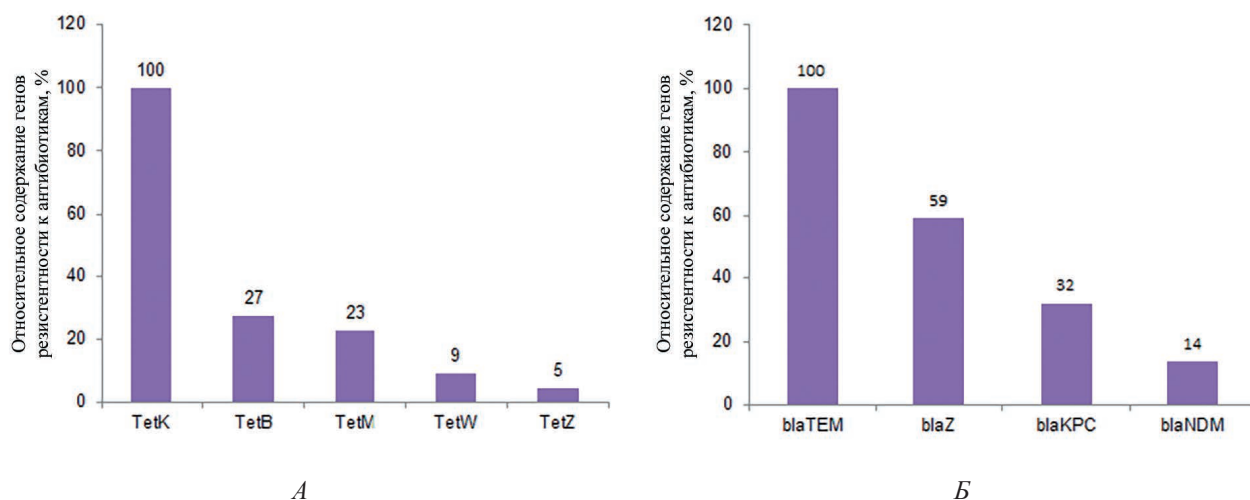


Рис. 3. Распространенность генов антибиотикорезистентности к тетрациклинам (А) и бета-лактамам (Б) у бактерий родов *Staphylococcus*, изолированных от больных маститом коров

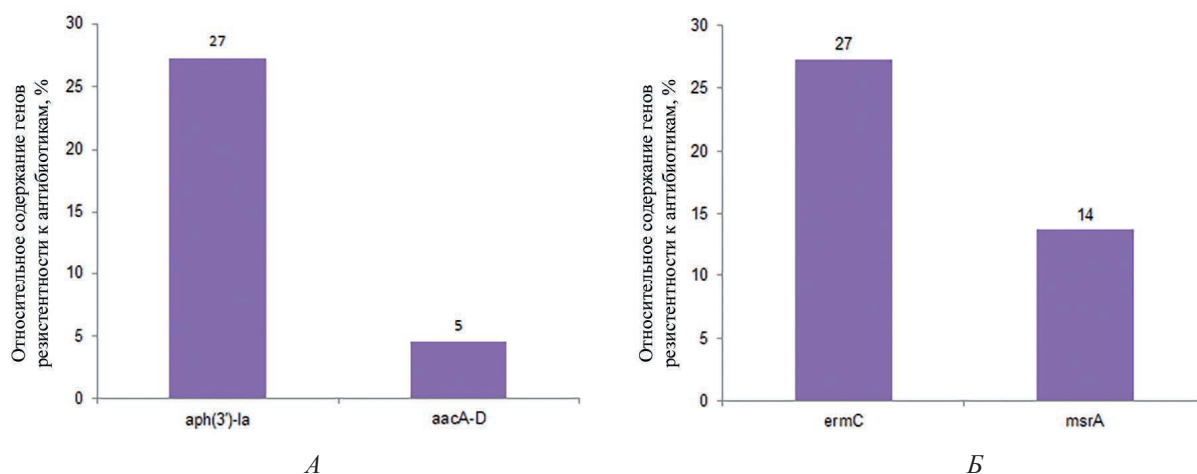


Рис. 4. Распространенность генов антибиотикорезистентности к аминогликозидам (А) и эритромицину (Б) у бактерий родов *Staphylococcus*, изолированных от больных маститом коров

Ген устойчивости к аминогликозидам *aph(3')-Ia*, доминировал в пробах *Staphylococcus* по сравнению с геном *aacA-D*. Так в 27 % случаев было выявлено содержание гена *aph(3')-Ia*, в то время, как только 5 % приходилось на *aacA-D* (А). Обнаруженные гены резистентности к эритромицину *msrA* и *ermC*, составили 27 % и 14 % соответственно (Б). В работе, проведенной на заводах Лахора, в Пакистане обнаружена похожая устойчивость к эритромицину у золотистого стафилококка не только среди молочных коров, но и у буйволов, а также у доярок [15].

На рисунке 5 представлен график распространенности генов антибиотикорезистентности *floR*, *lnuA*, *mefA* и *CLR* к хлорамфениколу, линкозамидом, макролидом и кларитромицину соответственно. Продemonстрировано тотальное доминирова-

ние гена *lnuA* в исследуемых образцах бактерий рода *Staphylococcus* (100 %).

Распространенность генов устойчивости к хлорамфениколу *floR* и кларитромицину *CLR* была не так высока и составила 5 %, а процентное содержание гена резистентности к макролидам *mefA* составило 14 %. Механизм действия генов *lnuA* и *mefA* обусловлен метилированием или мутацией сайта-мишени, активным оттоком антибиотика или же инактивацией лекарственного средства [16].

Следует отметить, что одним из самых вирулентных представителей рода *Staphylococcus* является *S. aureus*. Он связан с пищевыми отравлениями, вызывает различные заболевания у людей и животных и в первую очередь ассоциирован с маститом у крупного рогатого скота [17]. Выделяемые золотистым стафилококком энтеротоксины высо-

котолерантны к температурам и токсичны для организма [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что изолированные от больных маститом коров бактерии рода *Staphylococcus* содержат в своем составе боль-

шое разнообразие генов устойчивости к антибиотикам различного спектра действия, среди которых: бета-лактамы, аминогликозиды, эритромицин, хлорамфеникол, линкозамиды, макролиды и кларитромицин. В 100 % образцов выявлены гены устойчивости к тетрациклинам, бета-лактамам, антибиотикам и линкозамидам.

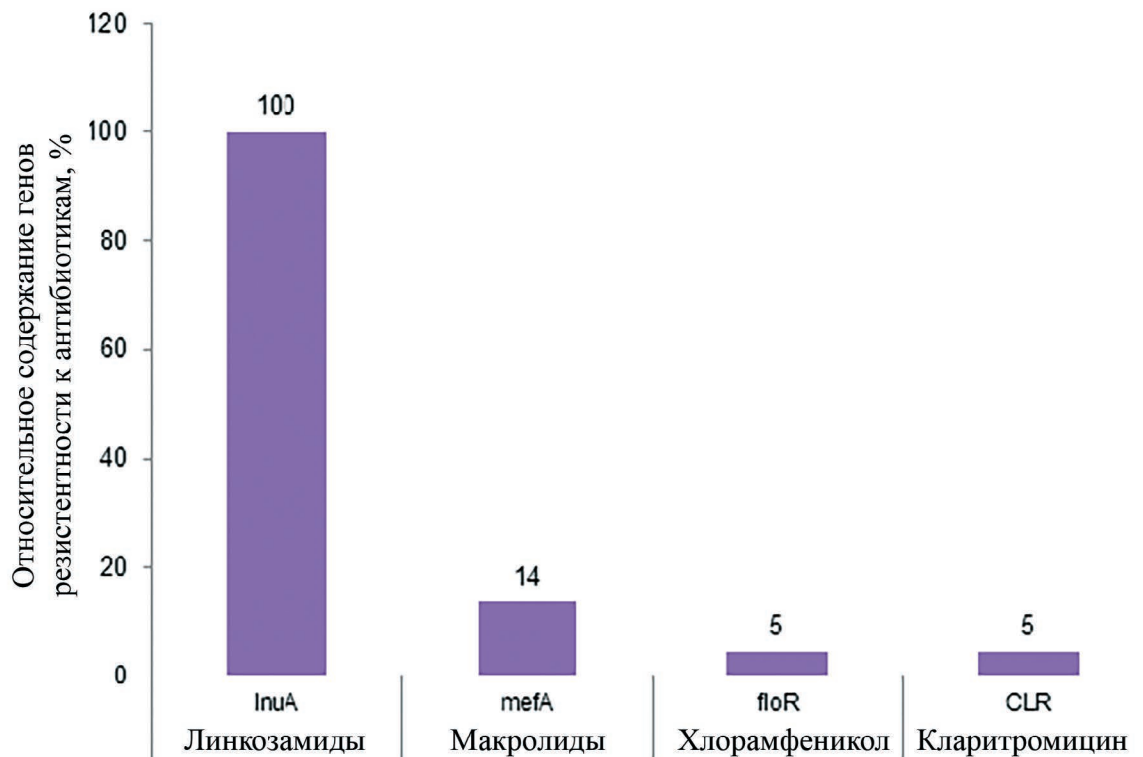


Рис. 5. Распространенность генов антибиотикорезистентности floR, InuA, mefA и CLR к антибиотикам хлорамфеникол, линкозамиды, макролиды и кларитромицину у бактерий родов *Staphylococcus*, изолированных от больных маститом коров

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Singhal S. A comparison of the nutritional value of cow's milk and nondairy beverages / S. Singhal, R. D. Baker, S. S. Baker // *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. — 2017. — Vol. 64, № 5. — P. 799—805. doi: 10.1097/MPG.0000000000001380.
2. Quigley L. The complex microbiota of raw milk / L. Quigley, O. O'Sullivan, C. Stanton, T. P. Beresford, R. P. Ross [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2013. — Vol. 37, № 5. — P. 664—698. doi: 10.1111/1574-6976.12030.
3. Quigley L. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese / L. Quigley, O. O'Sullivan, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. — 2011. — Vol. 150, № 2—3. — P. 81—94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001.
4. Hantsis-Zacharov E. *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk /

- E. Hantsis-Zacharov, M. Halpern // *International Journal of Systematic and Evolutionary*. — 2007. — Vol. 57. — P. 2344—2348. doi: 10.1099/ijs.0.65115—0.
5. Gomes F. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches / F. Gomes, M. Henriques // *Current Microbiology*. — 2016. — Vol. 72. — P. 377—382. doi: 10.1007/s00284—015—0958—8.
6. Gryaznova M. V. Microbiota of cow's milk with udder pathologies / M. V. Gryaznova, M. Y. Syromyatnikov, Y. D. Dvoretzkaya, S. A. Solodskikh, N. T. Klimov [et al.] // *Microorganisms*. — 2021. — Vol. 9. — 1974 P. doi: 10.3390/microorganisms9091974.
7. Jagielski T. Prevalence of prototheca spp. on dairy farms in poland — a cross-country study / T. Jagielski, H. Krukowski, M. Bochniarz, T. Piech, K. Roeske [et al.] // *Microbial Biotechnology*. — 2019. — Vol. 12. — P. 556—566. doi: 10.1111/1751—7915.13394.
8. Jagielski T. A survey on the incidence of *Prototheca mastitis* in dairy herds in Lublin province / T. Jagielski,

K. Roeske, Z. Bakula, T. Piech, L. Wlazlo [et al.] // Journal of Dairy Science. — 2019. — Vol. 102, — P. 619—628. doi: 10.3168/jds.2018-15495.

9. Kaczorowski L. The influence of bacteria causing sub-clinical mastitis on the structure of the cow's milk microbiome / L. Kaczorowski, J. Powierska-Czarny, L. Wolko, A. Piotrowska-Cyplik, P. Cyplik [et al.] // Molecules. — 2022. — Vol. 27, № 6. — 1829 p. doi: 10.3390/molecules27061829.

10. Grave K. The usage of veterinary antibacterial drugs for mastitis in cattle in Norway and Sweden during 1990—1997 / K. Grave, C. Greko, L. Nilsson, K. Odensvik, T. Mork [et al.] // Preventive Veterinary Medicine. — 1999. — Vol. 42, № 1. — P. 45—55. doi: 10.1016/s0167-5877(99)00057-4.

11. Pyörälä S. Treatment of mastitis during lactation / S. Pyörälä // Irish Veterinary Journal. — 2009. — Vol. 62. — S40 p. doi: 10.1186/2046—0481—62-S4-S40.

12. Oliver S. P. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens / S. P. Oliver, S. E. Murinda // Veterinary Clinics of North America. — 2012. — 28, № 2. — P. 165—185. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.005.

13. Effendi M. Tetracycline resistance gene in *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine subclinical mastitis in Surabaya, Indonesia / M. Effendi, A. Oktavianto, P. Hastutiek // Philippine Journal of Veterinary Medicine. — 2018. — Vol. 55. — P. 115—120.

14. Han G. Molecular typing and prevalence of antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus aga-*

lactiae isolated from Chinese dairy cows with clinical mastitis / G. Han, B. Zhang, Z. Luo, B. Lu, Z. Luo [et al.] // PLoS ONE. — 2022. — Vol. 17, № 5. — e0268262 p. doi: 10.1371/journal.pone.0268262.

15. Rasool Z. Genotypic and phenotypic characterization of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and humans in close contact / Z. Rasool, H. Noreen, A. Anjum, A. Rizvi, A. A. Rabaan [et al.] // Tropical Medicine and Infectious Disease. — 2022. — Vol. 8, № 1. — 26 p. doi: 10.3390/tropicalmed8010026.

16. Wang Y. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis / Y. Wang, C. M. Wu, L. M. Lu, G. W. Ren, X. Y. Cao [et al.] // Veterinary Microbiology. — 2008. — Vol. 130, № 1—2. — P. 118—125. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.12.012.

17. Fetsch A. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen / A. Fetsch, S. Johler // Current Clinical Microbiology Reports. — 2018. — Vol. 5. — P. 88—96. doi: 10.1007/s40588—018—0094-x.

18. Cavicchioli V. Q. Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil / V. Q. Cavicchioli, T. M. Scatamburlo, A. K. Yamazi, F. A. Pieri, L. A. Nero // Journal of Dairy Science. — 2015. — Vol. 98, № 12. — P. 8386—8390. doi: 10.3168/jds.2015-9733.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

С. В. Шабунин — доктор ветеринарных наук, научный руководитель;

М. Ю. Сыромятников — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протомикки; ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

Е. Ю. Нестерова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

М. И. Гладких — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

В. И. Зимников — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник сектора болезней органов воспроизводства крупного рогатого скота;

О. А. Манжурина — кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник зав. отделом клинико-лабораторных исследований;

Л. Ю. Сашнина — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией иммунологии и серологии.

Статья поступила в редакцию 11.09.2023 г.

Original article
UDC 579.62:577.29

IDENTIFICATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN THE BACTERIA OF THE GENUS *STAPHYLOCOCCUS* ISOLATED FROM COW'S MILK

Mikhail Yuryevich Syromyatnikov^{*, **, ***✉}, Sergey Viktorovich Shabunin^{*},
Ekaterina Yuryevna Nesterova^{**, ***}, Mariya Ivanovna Gladkikh^{***}, Vitaliy Ivanovich Zimnikov^{*},
Olga Alekseevna Manzhurina^{*}, Larisa Yuryevna Sashnina^{*1}

^{*}All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology
and Therapy, Voronezh, Russia, syromyatnikov@bio.vsu.ru✉

^{**}Voronezh State University, Voronezh, Russia

^{***}Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia

Abstract. The objective of the work was to evaluate the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the milk of cows with mastitis for the presence of antibiotic resistance genes in them. During the work, 17 genes of resistance to antimicrobial drugs of various spectrums of action were discovered. Resistance genes to tetracyclines, beta-lactams and lincosamides were found in all samples analyzed. Among the tetracycline resistance genes, the gene Tet(K) was found in all studied samples. The gene blaTEM turned out to be dominant among beta-lactam resistance genes (presence in 100 % of samples). The lincosamide resistance gene lnuA was detected in 100 % of samples. It was shown that the erythromycin resistance genes msrA and ermC were also present in the studied samples of the genus *Staphylococcus* and amounted to 27 % and 14 %, respectively. The aminoglycoside resistance gene aph(3')-Ia (presence in 27 % of samples) predominated in *Staphylococcus* samples, compared to the gene aacA-D (presence in 5 % of samples). The prevalence of chloramphenicol resistance genes floR and clarithromycin CLR was less pronounced and amounted to 5 %. The percentage of the macrolide resistance gene mefA was 14 %. This work shows that in the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from milk, there circulate resistance genes to various classes of antibiotics, which must be taken into account when planning treatment for mastitis.

Keywords: antibiotic resistance, genes, bacteria, mastitis, PCR, electrophoresis, identification.

Acknowledgment: the work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the national project Science (project FZGW-2020-0001, unique state assignment register number 075001X39782002).

Milk is a drinking product consisting of a wide variety of micro and macroelements, including proteins, fats, carbohydrates, vitamins, minerals, amino acids, etc. [1]. The dominant microflora of milk is lactic acid bacteria, the prominent representatives of which are bacteria of the genus *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* [2]. In addition to beneficial bacteria, milk may contain other microorganisms, yeast and mold fungi, which negatively affect the quality of the product, causing spoilage, and can be dangerous to human health [3]. A striking example of this is the ability of psychotolerant microbes, due to the secretion of extracellular proteases and lipases, to continue vital activity in milk even at a temperature of +4 °C [4].

The most common disease in dairy cattle is intramammary infection (mastitis), which affects milk quality [5, 6]. The cause of this disease is the bacteria *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*. In addition to these microorganisms, it has been established that mastitis is also caused by *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella spp.* and *Prototheca spp.* [7—9].

Antimicrobial drugs are actively used for the treatment and prevention of mastitis in cattle, which in turn causes the emergence of resistance genes in pathogenic microorganisms to the groups of antibiotics used [10, 11].

The objective of the research was to study the opportunistic bacteria of the genus *Staphylococcus* iso-

© Syromyatnikov M. Yu., Shabunin S. V., Nesterova E. Yu., Gladkikh M. I., Zimnikov V. I., Manzhurina O. A., Sashnina L. Yu., 2023

lated from the cows with mastitis for the presence of antibiotic resistance genes in them.

MATERIAL AND METHODS

The objects of the study were the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from 22 samples of milk from the cows with mastitis (Table 1). The bacteria were verified using MALDI-TOF.

Bacterial DNA extraction was carried out with a commercial PROBA-GS kit (DNA technology, Russia) in accordance with the manufacturer's protocol.

Qualitative PCR was carried out using a 5X ScreenMix-HS reaction mixture (Evrogen, Russia). The temperature cycle varied depending on the primers used. Visualization of PCR results was carried out in a 2 % agarose gel.

Table 1

Bacteria of the genus Staphylococcus isolated from milk of the cows with mastitis

Sample number	Type of bacteria
1	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	<i>Staphylococcus cromogenes</i>
4	<i>Staphylococcus aureus</i>
5	<i>Staphylococcus aureus</i>
6	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
7	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	<i>Staphylococcus aureus</i>
9	<i>Staphylococcus aureus</i>
10	<i>Staphylococcus aureus</i>
11	<i>Staphylococcus aureus</i>
12	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
13	<i>Staphylococcus aureus</i>
14	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
15	<i>Staphylococcus aureus</i>
16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
17	<i>Staphylococcus aureus</i>
18	<i>Staphylococcus cromogenes</i>
19	<i>Staphylococcus aureus</i>
20	<i>Staphylococcus aureus</i>
21	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
22	<i>Staphylococcus cromogenes</i>

For gene detection, oligonucleotides already published in international scientific publications were used as primers and probes, which were additionally veri-

fied in the NCBI Genbank system using the BLASTn tool (Table 2).

Quantitative PCR was carried out using a commercial mixture 5X qPCRmix-HS LowROX (Evrogen, Russia). Detection of the results was carried out using the FAM fluorescence channel.

Table 2

Primers and probes used in real-time PCR

Name	Nucleotide sequence
<i>Mec-f</i> <i>Mec-r</i> <i>Mec-p</i>	AAAGAACCTCTGCTCAACAAGT TGTTATTTAAACCAATCATTGCTGTT FAM—CCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACT-BHQ1
<i>NDM-f</i> <i>NDM-r</i> <i>NDM-p</i>	TTGGCGATCTGGTTTTCC GGTTGATCTCCTGCTTGA FAM-TGGCAGCACACTTCCTATCTCG-BHQ1
<i>vanA-f</i> <i>vanA-r</i> <i>vanA-p</i>	CTGTGAGGTCGGTTGTGCG TTTGGTCCACCTCGCCA FAM—CAACTAACGCGGCACTGTTCCCAAT-BHQ1
<i>Kpc-f</i> <i>Kpc-r</i> <i>Kpc-p</i>	CGCAACTGTAAGTTACCG CATGCCTGTTGTGAGATA FAM—CCACTGTGCAGCTCATTCAAGG-BHQ1
<i>floR-f</i> <i>floR-r</i> <i>floR-p</i>	GGCAGGCGATATTCATTACT CGAGAAGAAGACGAAGAAGG FAM—CTAAAGCCGACAGTGTA-BHQ1
<i>ampC-f</i> <i>ampC-r</i> <i>ampC-p</i>	GGGAATGCTGGATGCACAA CATGACCCAGTTCGCCATATC FAM—CCTATGGCGTGAAAACCAACGTGCA-BHQ1
<i>ermB-f</i> <i>ermB-r</i> <i>ermB-p</i>	GGATTCTACAAGCGTACCTTGGA GCTGGCAGCTTAAGCAATTGCT FAM—CACTAGGGTTGCTCTTGACACTCAAGTC-BHQ1

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

As a result of the analysis of electropherograms and fluorescence curves of 22 samples of the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the cows with mastitis, 17 antibiotic resistance genes were detected. They corresponded to 8 groups of antibiotics, including tetracyclines, beta-lactam antibiotics, aminoglycosides, erythromycin, chloramphenicol, lincosamide, macrolides and clarithromycin (Fig. 1).

It was established that antibiotic resistance genes of the tetracycline, beta-lactam and lincosamide groups were present in all studied samples of the genus *Staphylococcus* (100 %). The percentage of resistance genes to chloramphenicol and clarithromycin in the samples was the lowest and amounted to 5 %. As for the detected resistance genes to erythromycin and aminoglycoside, their number in the studied samples was 36 % and 32 %, respectively.

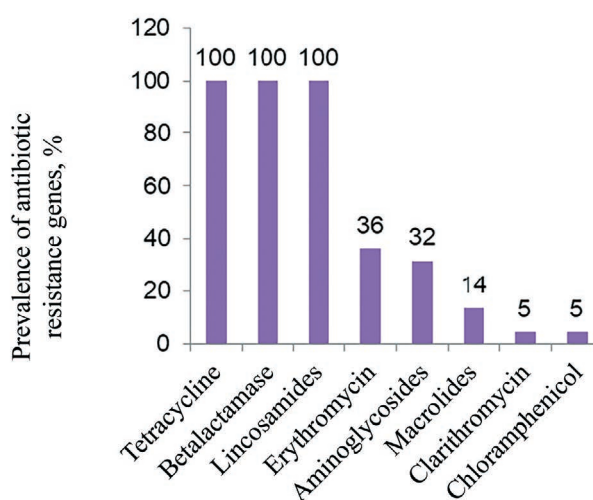


Fig. 1. Prevalence of antibiotic resistance genes in the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the cows with mastitis

Figure 2 shows an example of an electropherogram (sample number 13), in which genes for antibiotic re-

sistance to tetracyclines, beta-lactams, erythromycin and aminoglycosides were identified.

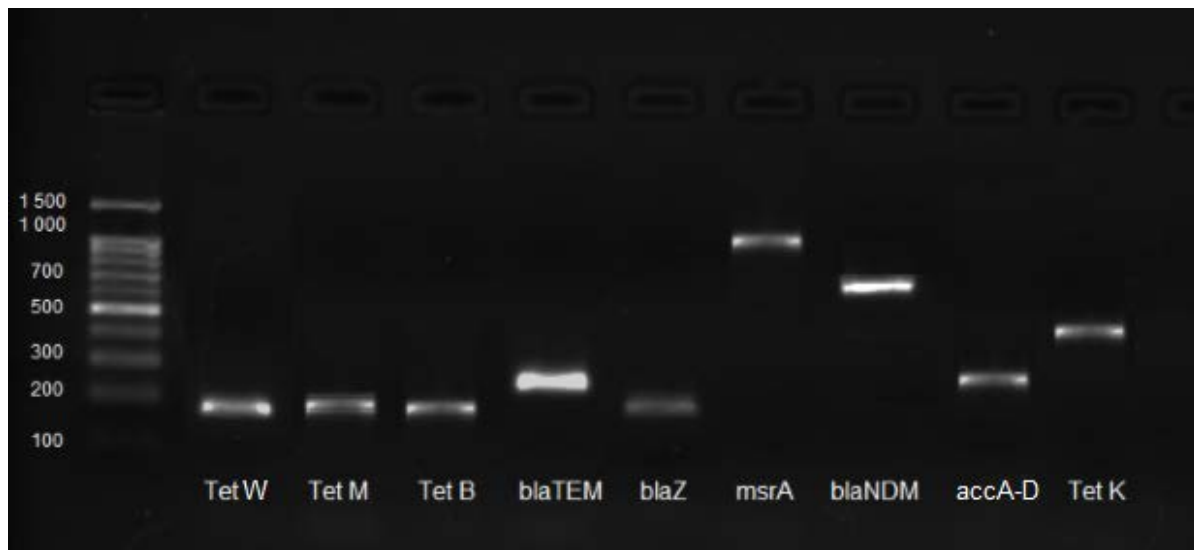


Fig. 2. Electropherogram reflecting the prevalence of antibiotic resistance genes in the 13th sample of bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the cows with mastitis

Antimicrobial drugs, which include penicillin, cephalosporin, streptomycin and tetracycline, are actively used as treatment and prevention of cow mastitis, caused by gram-positive and gram-negative bacteria [12]. Such antibiotics are widely prescribed to animals to prevent mastitis. The increase in the incidence

of mastitis in livestock leads to an even wider use of antimicrobial drugs. All this contributes to an increase in residual concentrations of antibiotics in milk and the development of antibiotic resistance [12]. Fig. 3 shows the prevalence of resistance genes to tetracyclines (A) and beta-lactam antibiotics (B).

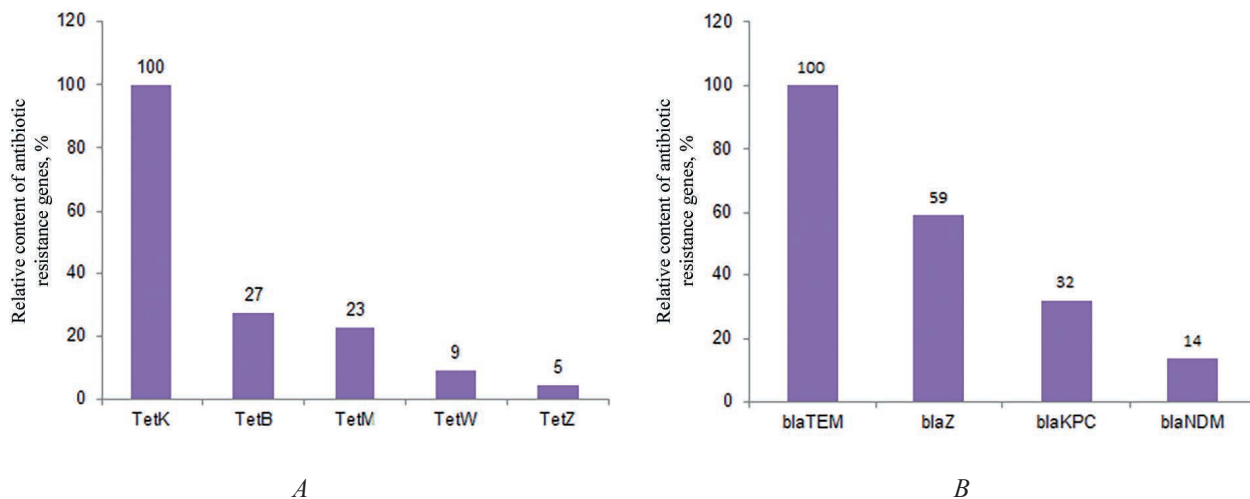


Fig. 3. Prevalence of antibiotic resistance genes to tetracyclines (A) and beta-lactam antibiotics (B) in the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the cows with mastitis

Based on the results of electrophoresis, it was possible to detect 5 resistance genes to tetracyclines (A). It was shown that 100 % of samples of the bacteria of the genus *Staphylococcus* contained the tetracycline resistance gene *Tet(K)*.

While the percentage of the genes *Tet(Z)* and *Tet(W)* in the studied samples was 9 % and 5 %, respectively. The genes *Tet(B)* and *Tet(M)* were also detected in the studied samples, and their relative content was 27 % and 23 %, respectively. Similar results

were obtained in Indonesia, where tetracycline resistance genes were found in the species *Streptococcus agalactiae* isolated from the cows with mastitis [13]. As for the identified 4 beta-lactam resistance genes (B), the gene *blaTEM* turned out to be dominant, which was detected in 100 % of the samples. Less than 50 % were *blaKPC* (32 %) and *blaNDM* (14 %), and the percentage of the gene *blaZ* was 59 %.

The results of a study conducted in China are known, in which streptococcus obtained from the cows with mastitis was found to be 100 % sensitive to aminoglycoside antibiotics [14]. Our study allowed us to identify antibiotic resistance genes to antimicrobial drugs based on aminoglycosides and erythromycin in the samples of the bacteria of the genus *Staphylococcus* (Fig. 4).

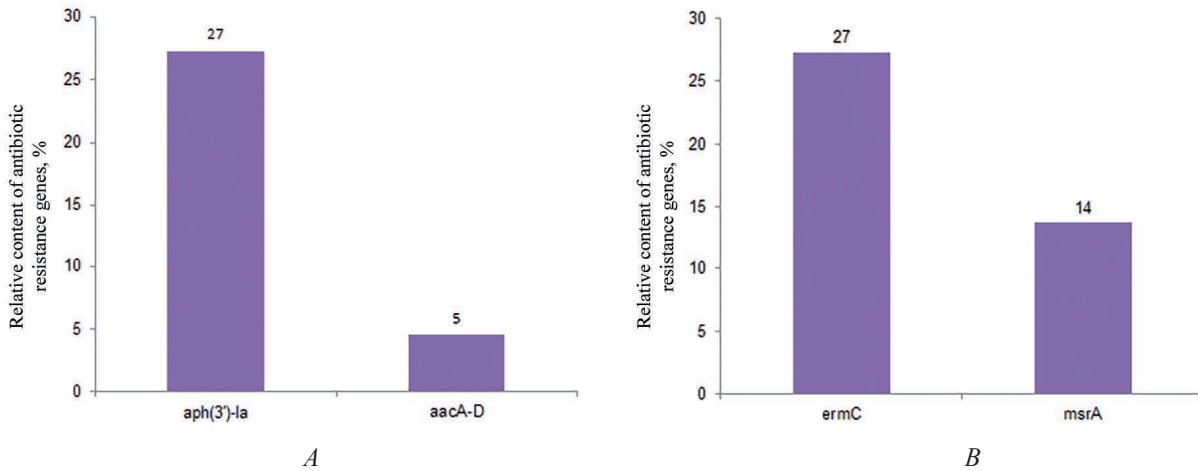


Fig. 4. Prevalence of antibiotic resistance genes to aminoglycosides (A) and erythromycin (B) in the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the cows with mastitis

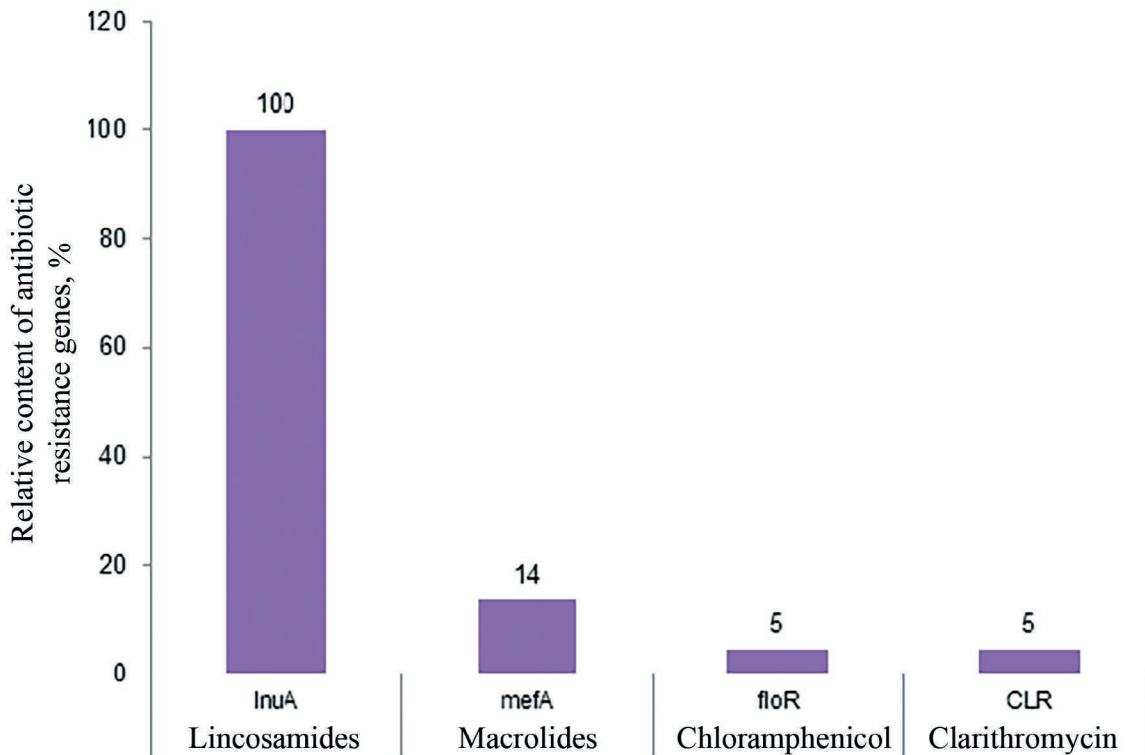


Fig. 5. Prevalence of antibiotic resistance genes *floR*, *InuA*, *mefA* and *CLR* to the antibiotics chloramphenicol, lincosamides, macrolides and clarithromycin in the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the cows with mastitis

The aminoglycoside resistance gene *aph(3')-Ia* was dominant in *Staphylococcus* samples, compared to the gene *aacA-D*. Thus, in 27 % of cases the content of the gene *aph(3')-Ia* was detected, while only 5 % were *aacA-D* (A). The detected erythromycin resistance genes *msrA* and *ermC* were 27 % and 14 %, respectively (B). The research carried out at Lahore factories in Pakistan detected similar resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus* not only among dairy cows, but also in buffaloes and milkmaids [15].

Figure 5 shows a graph of the prevalence of antibiotic resistance genes *floR*, *lnuA*, *mefA* and *CLR* to chloramphenicol, lincosamide, macrolide and clarithromycin, respectively. The total dominance of the gene *lnuA* in the studied samples of the bacteria of the genus *Staphylococcus* (100 %) was demonstrated.

The prevalence of the chloramphenicol resistance gene *floR* and clarithromycin *CLR* was not so high and amounted to 5 %, and the percentage of the macrolide resistance gene *mefA* was 14 %. The mechanism of action of the genes *lnuA* and *mefA* is due to methylation or mutation of the target site, active efflux of the antibiotic, or inactivation of the drug [16].

It should be noted that one of the most virulent representatives of the genus *Staphylococcus* is *S. aureus*. It is associated with food poisoning, causes various diseases in humans and animals, and is primarily associated with mastitis in cattle [17]. Enterotoxins secreted by *Staphylococcus aureus* are highly temperature-tolerant and toxic to the body [18].

CONCLUSION

The results of the study showed that the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the cows with mastitis contained a wide variety of genes for resistance to antibiotics of various spectrum of action, including beta-lactam antibiotics, aminoglycosides, erythromycin, chloramphenicol, lincosamides, macrolides and clarithromycin. Resistance genes to tetracyclines, beta-lactam antibiotics and lincosamides were detected in 100 % of samples.

REFERENCES

1. Singhal S. A comparison of the nutritional value of cow's milk and nondairy beverages / S. Singhal, R. D. Baker, S. S. Baker // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. — 2017. — Vol. 64, No. 5. — P. 799—805. doi: 10.1097/MPG.0000000000001380.
2. Quigley L. The complex microbiota of raw milk / L. Quigley, O. O'Sullivan, C. Stanton, T. P. Beresford, R. P. Ross [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. — 2013. — Vol. 37, No. 5. — P. 664—698. doi: 10.1111/1574-6976.12030.

3. Quigley L. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese / L. Quigley, O. O'Sullivan, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald [et al.] // International Journal of Food Microbiology. — 2011. — Vol. 150, No. 2—3. — P. 81—94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001.

4. Hantsis-Zacharov E. *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk / E. Hantsis-Zacharov, M. Halpern // International Journal of Systematic and Evolutionary. — 2007. — Vol. 57. — P. 2344—2348. doi: 10.1099/ijs.0.65115-0.

5. Gomes F. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches / F. Gomes, M. Henriques // Current Microbiology. — 2016. — Vol. 72. — P. 377—382. doi: 10.1007/s00284-015-0958-8.

6. Gryaznova M. V. Microbiota of cow's milk with udder pathologies / M. V. Gryaznova, M. Y. Syromyatnikov, Y. D. Dvoretzkaya, S. A. Solodskikh, N. T. Klimov [et al.] // Microorganisms. — 2021. — Vol. 9. — 1974 P. doi: 10.3390/microorganisms9091974.

7. Jagielski T. Prevalence of prototheca spp. on dairy farms in poland — a cross-country study / T. Jagielski, H. Krukowski, M. Bochniarz, T. Piech, K. Roeske [et al.] // Microbial Biotechnology. — 2019. — Vol. 12. — P. 556—566. doi: 10.1111/1751-7915.13394.

8. Jagielski T. A survey on the incidence of *Prototheca mastitis* in dairy herds in Lublin province / T. Jagielski, K. Roeske, Z. Bakula, T. Piech, L. Wlazlo [et al.] // Journal of Dairy Science. — 2019. — Vol. 102. — P. 619—628. doi: 10.3168/jds.2018-15495.

9. Kaczorowski L. The influence of bacteria causing sub-clinical mastitis on the structure of the cow's milk microbiome / L. Kaczorowski, J. Powierska-Czarny, L. Wolko, A. Piotrowska-Cyplik, P. Cyplik [et al.] // Molecules. — 2022. — Vol. 27, № 6. — 1829 p. doi: 10.3390/molecules27061829.

10. Grave K. The usage of veterinary antibacterial drugs for mastitis in cattle in Norway and Sweden during 1990—1997 / K. Grave, C. Greko, L. Nilsson, K. Odensvik, T. Mork [et al.] // Preventive Veterinary Medicine. — 1999. — Vol. 42, № 1. — P. 45—55. doi: 10.1016/s0167-5877(99)00057-4.

11. Pyörälä S. Treatment of mastitis during lactation / S. Pyörälä // Irish Veterinary Journal. — 2009. — Vol. 62. — S40 p. doi: 10.1186/2046-0481-62-S4-S40.

12. Oliver S. P. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens / S. P. Oliver, S. E. Murinda // Veterinary Clinics of North America. — 2012. — 28, No. 2. — P. 165—185. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.005.

13. Effendi M. Tetracycline resistance gene in *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine subclinical mastitis in Surabaya, Indonesia / M. Effendi, A. Oktavianto, P. Hastutiek // Philippine Journal of Veterinary Medicine. — 2018. — Vol. 55. — P. 115—120.

14. Han G. Molecular typing and prevalence of antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from Chinese dairy cows with clinical mas-

- titis / G. Han, B. Zhang, Z. Luo, B. Lu, Z. Luo [et al.] // PLoS ONE. — 2022. — Vol. 17, No. 5. — e0268262 p. doi: 10.1371/journal.pone.0268262.
15. **Rasool Z.** Genotypic and phenotypic characterization of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and humans in close contact / Z. Rasool, H. Noreen, A. Anjum, A. Rizvi, A. A. Rabaan [et al.] // Tropical Medicine and Infectious Disease. — 2022. — Vol. 8, No. 1. — 26 p. doi: 10.3390/tropicalmed8010026.
16. **Wang Y.** Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis / Y. Wang, C. M. Wu, L. M. Lu, G. W. Ren, X. Y. Cao [et al.] // Veterinary Microbiology. — 2008. — Vol. 130, No. 1—2. — P. 118—125. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.12.012.
17. **Fetsch A.** *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen / A. Fetsch, S. Jöhler // Current Clinical Microbiology Reports. — 2018. — Vol. 5. — P. 88—96. doi: 10.1007/s40588—018—0094-x.
18. **Cavicchioli V. Q.** Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil / V. Q. Cavicchioli, T. M. Scatamburlo, A. K. Yamazi, F. A. Pieri, L. A. Nero // Journal of Dairy Science. — 2015. — Vol. 98, No. 12. — P. 8386—8390. doi: 10.3168/jds.2015—9733.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

S. V. Shabunin — Doctor of Veterinary Sciences, Academic Director;

M. Yu. Syromyatnikov — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics; Principle Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology;

E. Yu. Nesterova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

M. I. Gladkikh — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

V. I. Zimnikov — Candidate of Veterinary Sciences, Senior Scientific Associate of the Sector of Diseases of Bovine Reproductive Organs;

O. A. Manzhurina — Candidate of Veterinary Sciences, Principle Scientific Associate, Head of the Department of Clinical and Laboratory Studies;

L. Yu. Sashnina — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate, Head of the Laboratory of Immunology and Serology.

The article was submitted 11.09.2023.

Научная статья

УДК 62—6.636.32/.38:591.8:591.477

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.136

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОЖНОГО ПОКРОВА КРОССБРЕДНЫХ ОВЕЦ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ОВЦЕВОДЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Андрей Григорьевич Ульянов^{*✉}, Вячеслав Иванович Котарев^{**},
Игнатий Андреевич Ульянов^{***}, Петр Макарович Торгун^{*1}

**Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I,
Воронеж, Россия, agu16@mail.ru✉*

***Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия*

****Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко, Воронеж, Россия*

Аннотация. Современные тенденции успешного развития отрасли овцеводства направлены на повышение его экономической эффективности за счет максимального использования всех видов продукции. Важной статьёй в общей структуре доходов отрасли овцеводства являются шерстная, шубно-меховая и кожевенная продукция. Вопросы изучения морфологических особенностей кожного покрова овец является важной частью познания закономерностей индивидуального развития животных и их продуктивности. Целью настоящего сообщения является изучение морфологии кожи у баранов русской длинношерстной породы в постнатальном онтогенезе. Толщина кожи в большей степени зависит от породы, возраста и пола овец. Исследования показали, что толщина кожи претерпевает значительные изменения в первые месяцы жизни животных: у баранов в возрасте четырех месяцев по сравнению с новорожденными общая толщина кожи увеличивается на 852 мкм, что составляет 43,4 % ($P < 0,05$). В дальнейшем продолжается увеличение толщины кожи и к 10 месяцам общая толщина кожи достигает почти максимального уровня. Толщина эпидермиса значительно увеличивается у десятимесячных баранов до 26 мкм на 18,2 % по сравнению с шестимесячными животными. На основании изучения толщины сетчатого слоя дермы, толщины пучков коллагеновых волокон в этом слое определены сроки морфологического созревания компонентов сетчатого слоя, что имеет важное практическое значение для технологии производства овчин.

Ключевые слова: овцы, продуктивность, морфология кожи, постнатальный онтогенез

Интерес к разведению полутонкорунных мясошерстных овец обусловлен их высокой продуктивностью, скороспелостью, хорошими убойными качествами и плодовитостью, что позволяет сохранять овцеводство как высокорентабельную отрасль сельскохозяйственного производства. Уровень и рост продуктивности овец во многом зависит от эффективности проводимой селекционной работы в овцеводческих хозяйствах и качества реализуемого племенного молодняка.

В процессе совершенствования пород овец представляется весьма важным и актуальным изучение продуктивных и биологических особенностей животных по ряду основных хозяйственно-полезных признаков.

Изучение формирования структуры кожи и качества шерсти имеет не только общепатологическое, но и большое практическое значение, так как шерстный покров является основной их продукцией. В связи с этим, проведенные исследования позволяют подвести научную основу для правильной разработки мероприятий, направленных на повышение производства шерсти, количество и качество которой в значительной степени зависит от структуры кожи.

В последние 10—15 лет кожа млекопитающих являлась предметом многочисленных исследований. Получено много новых данных об особенностях строения кожи у различных животных. В обширной сводке [1], посвященной молекуляр-

ной и структурной биологии волоса, представлены результаты экспериментов с выделением стволовых клеток волоса и выращиванием волоса в искусственных условиях. Глубокие гистологические исследования кожного покрова млекопитающих обобщены в многочисленных работах В. Е. Соколова [2].

У многих млекопитающих изучены видовые особенности кожи, волосяного покрова [3—7].

Большое количество работ по гистологии кожи и волосяного покрова выполнено различными специалистами в овцеводстве [8, 10]. В племенных хозяйствах широко внедряется технология отбора ремонтных баранов с использованием гистологических тестов кожи по раннему прогнозированию истинной густоты и качества шерсти.

Несмотря на трудности определения гистологического строения кожи, ей следует уделять больше внимания, так как этот орган, оказывает непосредственное влияние на качество кожи и шерстного покрова овец. Это позволит получить объективную оценку животным используемых в селекционно-племенной работе.

В настоящее время имеются большие достижения в области изучения кожи и шерстного покрова у различных видов животных, однако многие вопросы остаются [1, 9, 11] недостаточно изученными.

Целью настоящего сообщения является изучение морфофункциональных показателей кожи у баранов русской длинношерстной породы в постнатальном онтогенезе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Использован материал от 59 баранов различного возраста (табл. 1). Фрагменты кожи из области спины и боковой поверхности живота фиксировали в жидкостях Штыве, Буэна и Ценкера. Материал заливали в парафин. Тонкие парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином, азаном по Гейденгайну, применяли окраску трихром-ШИК. С помощью винтового окуляра-микрометра измеряли общую толщину кожи, толщину эпидермиса, сосочкового и сетчатого слоев дермы (50 измерений для каждого животного). Кроме того, измеряли толщину коллагеновых волокон (50 измерений для каждого животного). Для определения нормальности распределения в совокупности выборок использовали тест Колмогорова–Смирнова. Цифровые данные (толщина кожи и отдельных ее слоев) не имели нормального распределения и не было выявлено равенство дисперсий в сравниваемых группах и поэтому обрабатывались с применением непараметрического Т-критерия Уайта. При уровне значимости $P < 0,05$ изменения считали статистически значимыми. Для обработки результаты измерений толщины коллагеновых волокон использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Эти результаты удовлетворяли двум обязательным условиям применения параметрического t-критерия Стьюдента (нормальность распределения и равенство дисперсий в сравниваемых группах). При уровне значимости $P < 0,05$ изменения считали статистически значимыми.

Таблица 1

Возрастные изменения толщины кожи у баранов

Возраст	n	Общая толщина кожи (мкм)	Толщина эпидермиса (мкм)	Толщина дермы (мкм)	Толщина подкожного жирового слоя (мкм)
0—15 сут.	5	1962 ± 46	21 ± 0,13	1746 ± 42	195 ± 2,93
4 мес.	6	2774 ± 47*	22 ± 0,13	2461 ± 48*	313 ± 8,06*
6 мес.	12	2814 ± 57*	22 ± 0,13	2472 ± 48*	342 ± 8,07*
10 мес.	10	3514 ± 64*	26 ± 0,12*	3116 ± 51*	398 ± 8,92
2 года	8	3603 ± 63	28 ± 0,13*	3094 ± 52	480 ± 9,12*
3 года	10	3645 ± 65	27 ± 0,12	3187 ± 56	458 ± 9,82
5 лет	8	3321 ± 61*	25 ± 0,14*	2898 ± 59	423 ± 9,67

* $P < 0,05$ (непараметрический Т-критерий Уайта)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вопросы изучения морфологических особенностей кожного покрова овец является важной частью познания закономерностей индивидуального развития животных и их продуктивности.

Возрастные изменения толщины кожи у баранов русской длинношерстной породы представлены в таблицах 1—2 и рисунках 1—3. Толщина кожи претерпевает значительные изменения в первые месяцы жизни животных: у баранов в возрасте четырех месяцев по сравнению с новорожденными баранами общая толщина кожи увеличивается на 812 мкм, что составляет 41,4 % ($P < 0,05$). В дальнейшем продолжается увеличение толщины кожи и к 10 месяцам общая толщина кожи до-

стигает почти максимального уровня. По сравнению с предыдущим периодом у десятимесячных баранов толщина кожи увеличивается на 700 мкм (24,9 %). У взрослых половозрелых животных толщина кожи изменяется мало (табл. 1), однако у баранов в возраст 5 лет по сравнению с предыдущей возрастной группой общая толщина кожи уменьшается на 324 мкм, что составляет 9,8 %.

Толщина эпидермиса (рис. 2) значительно увеличивается у десятимесячных баранов до 26 мкм или на 18,2 % по сравнению с шестимесячными животными. У баранов в возрасте двух-трех лет толщина эпидермиса почти не изменяется. Уменьшение толщины эпидермиса выявлено в баранов в возрасте 5 лет (на 8 %; $P < 0,05$).

Таблица 2

Возрастные изменения толщины дермы у баранов

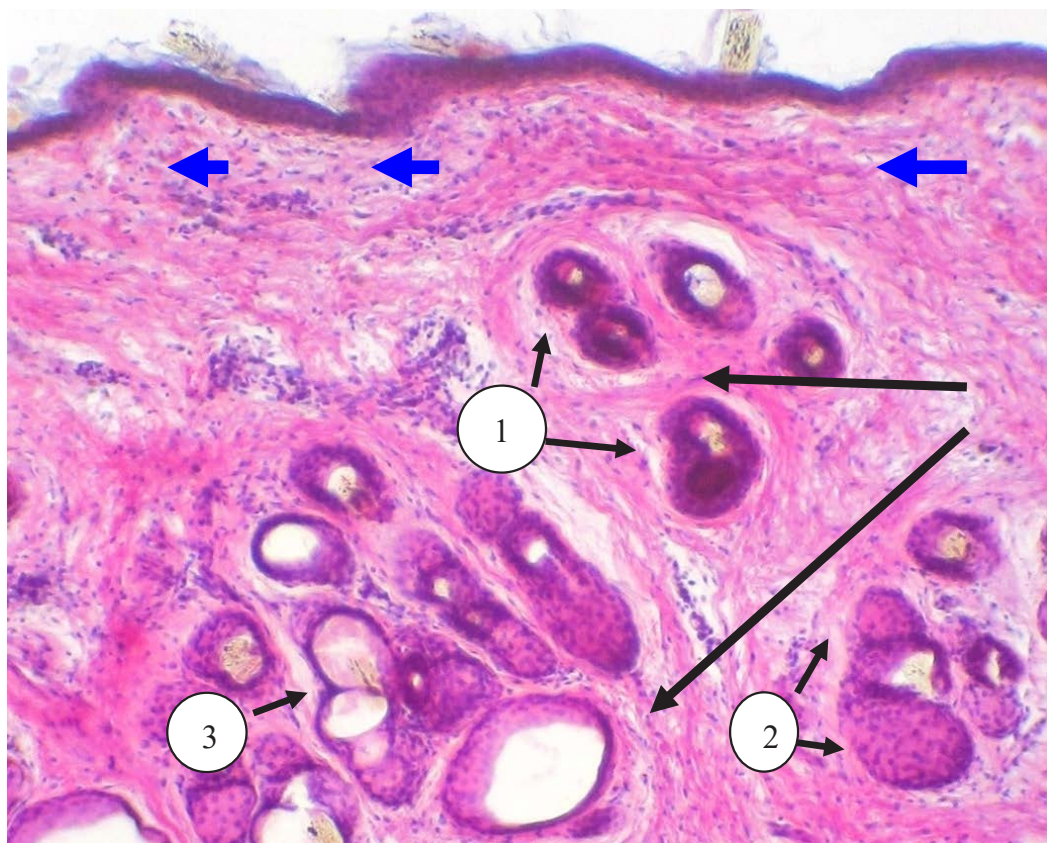
Возраст	Толщина сосочкового слоя дермы (мкм)	Толщина сетчатого слоя дермы (мкм)	Соотношение сетчатого слоя к сосочковому	Диаметр пучков коллагеновых волокон (мкм)
0—15 сут.	794	952	1,20	11 ± 0,11
4 мес.	1096	1365	1,24	16 ± 0,13*
6 мес.	1038	1434	1,38	17 ± 0,12*
10 мес.	1248	1823	1,46	21 ± 0,13
2 года	1247	1847	1,48	27 ± 0,14*
3 года	1244	1943	1,56	25 ± 0,13
5 лет	1130	1768	1,56	20 ± 0,12

* $P < 0,001$ (параметрический t-критерий Стьюдента)

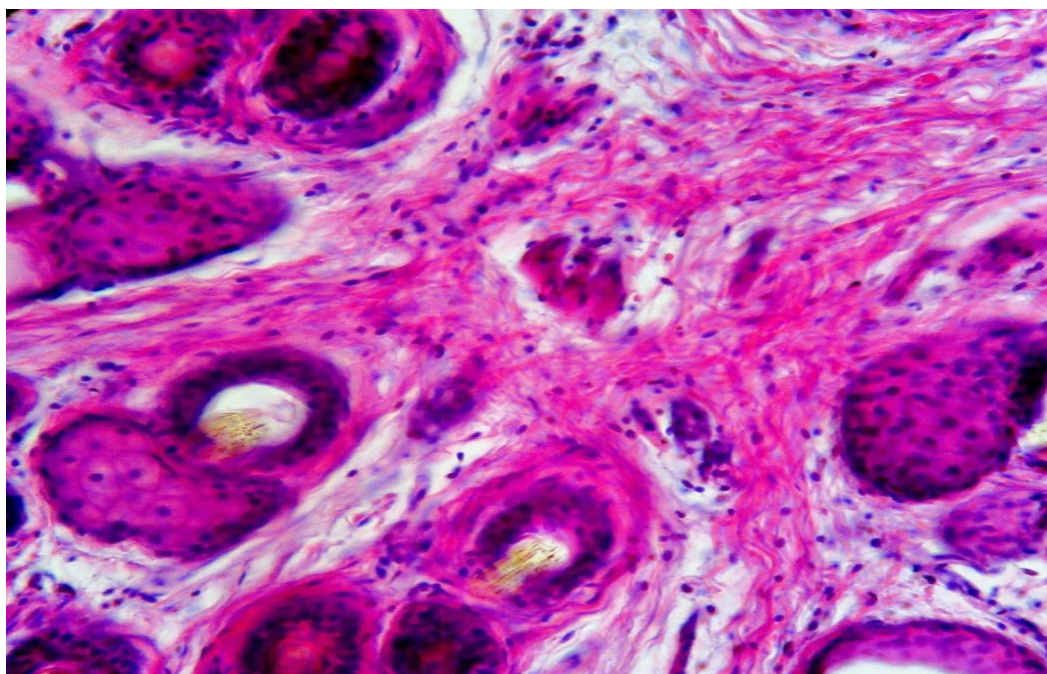
Большое влияние на количество и качество продуцируемой шерсти, а также на товарные свойства кожи овец оказывают строение и функция дермы. Дерма у баранов включает сосочковый и сетчатый слои. Сосочковый слой, располагающийся непосредственно под эпидермисом изменяется от 794 до 1248 мкм (табл. 2). Сосочковый слой представлен рыхлой соединительной тканью, многочисленными кровеносными сосудами и различными соединительнотканью клетками. Верхняя граница сосочкового слоя определяется легко (это нижняя часть эпидермиса), нижняя граница сосочкового слоя определяется по количеству и расположению пучков коллагеновых волокон. Сосочковый слой характеризуется наличием рыхлой соединительной ткани, а сетчатый слой состоит из плотной, не-

оформленной коллагеновой соединительной ткани, чаще всего верхние слои сетчатого слоя имеют горизонтальное направление коллагеновых волокон (рис. 1 А). Увеличение толщины сосочкового слоя отмечается у баранов в возрасте 6 и 10 месяцев соответственно на 30,7 и 57,2 %. Увеличение составляет 244 и 454 мкм ($P < 0,05$). Степень развития сосочкового слоя, его структура находятся взаимосвязи от густоты, длины, толщины коллагеновых волокон.

Аналогичные изменения претерпевает толщина сетчатого слоя дермы кожи. У баранов в возрасте 4 и 6 месяцев толщина сетчатого слоя возрастает соответственно на 413 и 482 мкм (43,4 и 50,6 %) по сравнению с новорожденными животными (табл. 2).



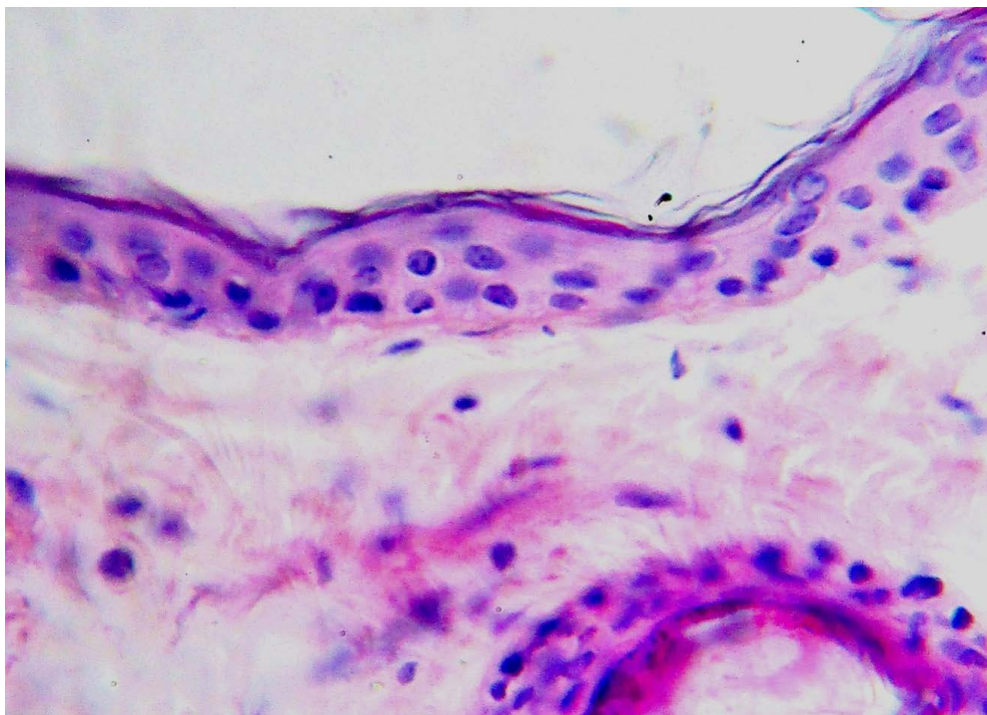
А



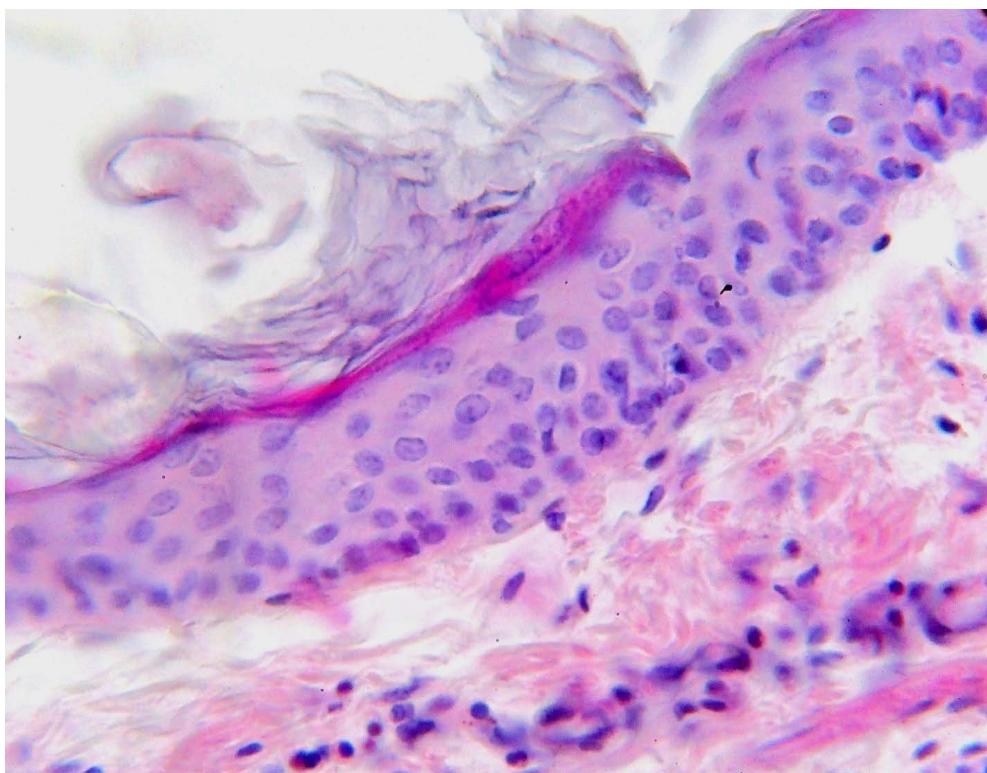
Б

Рис. 1. Кожа барана. Возраст 4 месяца:

А — сверху виден эпидермис (темная полоса). Ниже сосочковый слой (голубые стрелки). Черными стрелками обозначен сетчатый (сечатый слой с поперечно разрезанными волосяными фолликулами (1), сальными (2) и потовыми железами (3); В — сечатый слой при большем увеличении. Фиксация: жидкость Штieve, окраска: гематоксилин-эозин, увеличение А — об. 20, ок. 10; В — об. 40, ок. 10



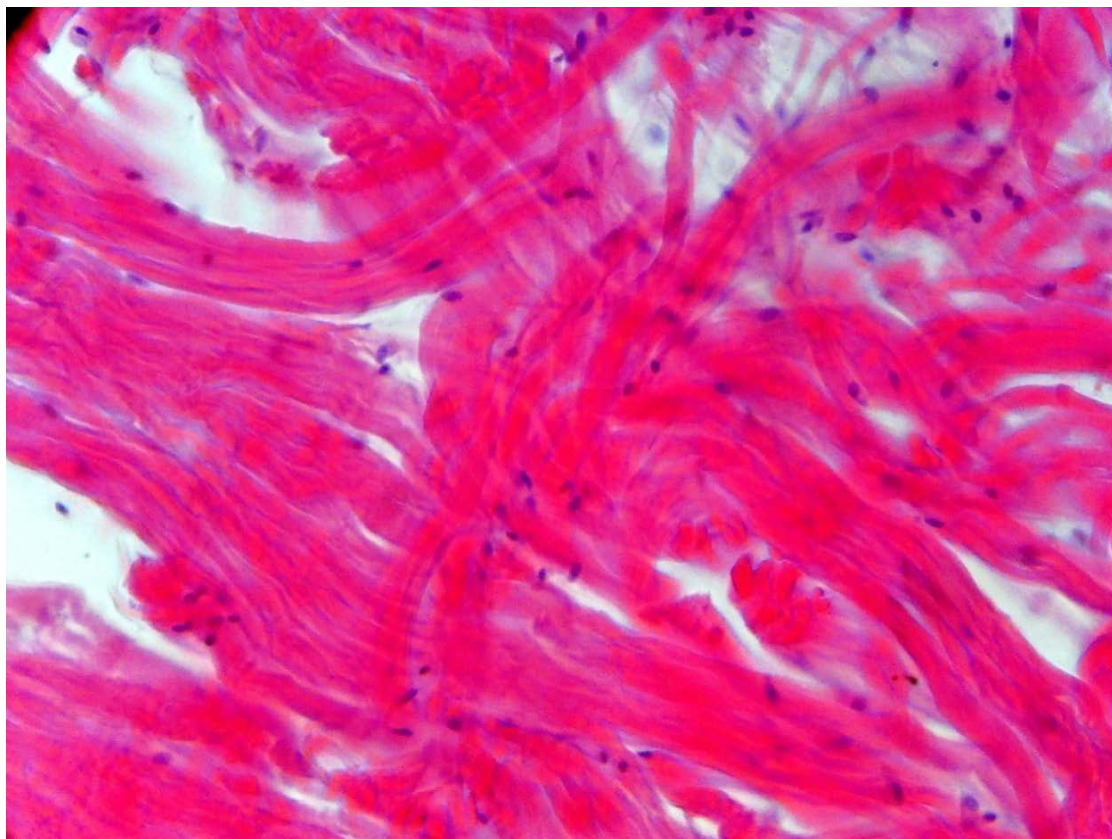
А



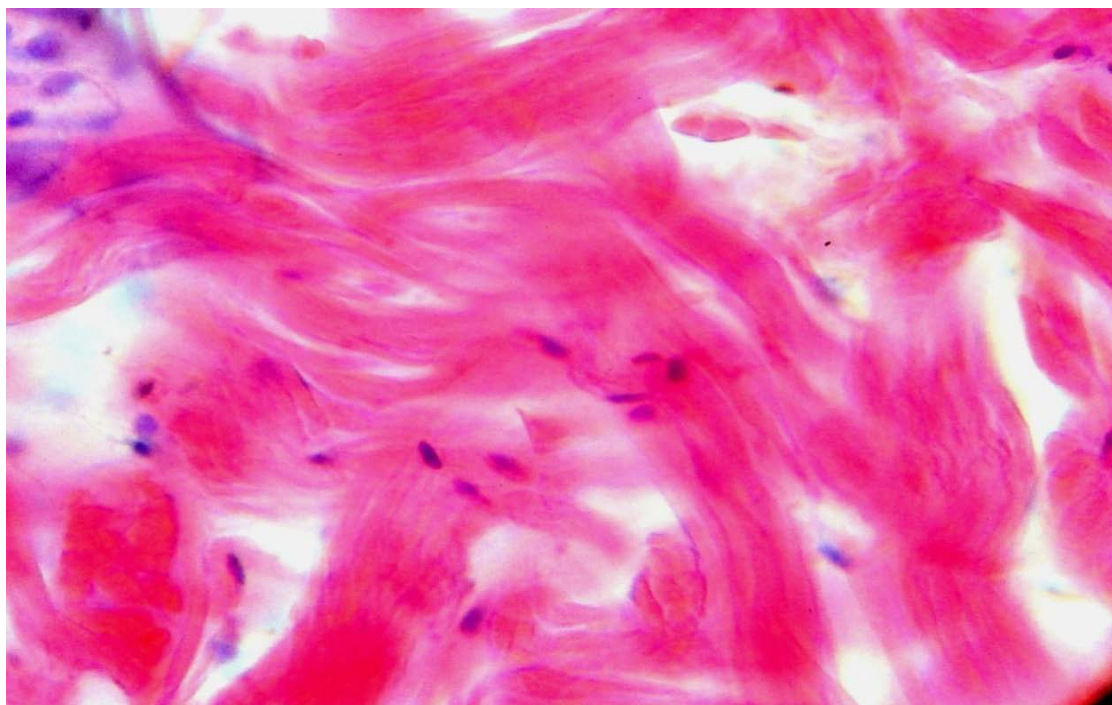
Б

Рис. 2. Кожа барана:

А — возраст новорожденные. Эпидермис включает 2—3 слоя эпителиальных клеток. Под эпителием виден сосочковый слой, в котором видны тонкие молодые коллагеновые волокна и фибробласты; В — возраст 4 месяца. Эпидермис почти в два раза превышает толщину эпидермиса предыдущего барана. В эпидермисе можно выделить 5—6 и более слоев клеток. Хорошо выражен роговой слой. Под эпидермисом виден сосочковый слой. Фиксация: жидкость Штieve, окраска: гематоксилин-эозин, увеличение об. 40, ок. 16



A



B

Рис. 3. Кожа барана. Сетчатый слой дермы:

A — возраст новорожденные. Тонкие коллагеновые волокна имеют в основном горизонтальное направление; *B* — возраст 10 месяцев. Толстые пучки коллагеновых волокон переплетаются и имеют разное направление. Фиксация: жидкость Штыве, окраска: гематоксилин-эозин, увеличение об. 40, ок. 16

Различия статистически значимы ($P < 0,05$). У баранов в возрасте 2 и 3 года толщина сетчатого слоя дермы достигает максимального уровня (1847 и 1943 мкм), однако у пятилетних баранов этот показатель снижается на 175 мкм (9,9 %). Подкожная жировая клетчатка максимально развита у трехлетних баранов, превышая более чем в два раза толщину подкожной жировой клетчатки у новорожденных животных (табл. 1).

Соотношение толщины сетчатого слоя к толщине сосочкового слоя у новорожденных животных составляет 1,20, но постепенно этот показатель увеличивается, достигая максимального значения у трех и пятилетних баранов (табл. 2).

Особенно следует обратить внимание на развитие сетчатого слоя у баранов в постнатальном онтогенезе. Как было уже отмечено, максимальная толщина сетчатого слоя выявлена у трехлетних баранов. У баранов в возрасте 10 месяцев этот показатель почти в два раза превышает толщину сетчатого слоя у новорожденных животных.

Сетчатый слой представлен пучками коллагеновых и эластических волокон сложного переплетения. Величина и характер вязи пучков являются важным породным признаком и определяют прочность кожи. Как показали исследования, с возрастом изменяется диаметр и расположение пучков коллагеновых волокон сетчатого слоя. Толщина пучков коллагеновых волокон у новорожденных баранов составляет всего $11 \pm 0,11$ мкм, но уже у четырехмесячных баранов толщина пучков коллагеновых волокон возрастает на 45,5 %. У новорожденных баранов (рис. 3) коллагеновые волокна располагаются преимущественно горизонтально и лишь отдельные пучки направлены вертикально. У четырехмесячных баранов более 30 % волокон имеют вертикальное расположение, остальные горизонтально направлены.

У десятимесячных животных, как было уже отмечено, толщина пучков коллагеновых волокон увеличивается почти в два раза по сравнению с новорожденными животными, при этом отмечается совершенствование вязи за счет разного их направления, образования многочисленных петель, переплетений. Аналогичное строение сетчатого слоя сохраняется баранов в возрасте 2 и 3 года. У пятилетних баранов наблюдается упрощение вязи и уменьшение толщины пучков коллагеновых волокон.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гистологические исследования показали, что изучение общей толщины кожи и ее слоев, соотношения сетчатого слоя к сосочковому, диаметра пучков коллагеновых волокон в возрастном аспекте позволяет разрабатывать научно обоснованные мероприятия, направленные на повышение шерстной продуктивности и улучшение качества шубно-мехового и кожевенного сырья.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kurt Stenn The Molecular and structural biology of hair/ Stenn Kurt, A. G. Messenger, P. Howard // Baden, New York. — 1991. — 520.
2. Кумиров С. Г. Сравнительная морфофункциональная характеристика кожного покрова пушных зверей клеточного содержания / С. Г. Кумиров // дис. канд. биол. наук МГАВМиБ им. К. И. Скрябина. — Москва, 2017. — 120 с.
3. Меркурьева Е. К. Генетика с основами биометрии / Е. К. Меркурьева, Е. К. Шан гин-Березовский. — Москва, 1983. — 400 с.
4. Овчаренко Н. Д. Возрастная динамика кожного покрова кулундинских овец и их помесей в период полового созревания / Н. Д. Овчаренко, Н. Н. Опалева // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2008. — № 4 (20). — С. 29—32.
5. Дмитрик И. И. Сравнительные породные данные о густоте волосяных фолликулов и толщине кожи у тонкорунных овец / И. И. Дмитрик // Сб. науч. тр. ВНИИ-ОК. — Ставрополь, 2012. — № 2 (1). — С. 238—242.
6. Подлесных Е. А. Морфологическое обоснование типологической принадлежности волос собачьи / Е. А. Подлесных // дис. канд. биол. наук МГАВМиБ им. К. И. Скрябина. — Москва, 2018. — 108 с.
7. Соколов В. Е. Кожный покров млекопитающих / В. Е. Соколов. — Москва, 1973. — 487 с.
8. Слесаренко Н. А. Действие мелакрила на кожный покров зверей / Н. А. Слесаренко, Н. В. Бабичев // Кролиководство и звероводство. — 1995. — № 3. — С. 5—6.
9. Тапильский И. А. Формирование волосяных фолликулов в постнатальном онтогенезе у овец / И. А. Тапильский, П. М. Торгун, А. Г. Ульянов // Овцы, козы, шерстяное дело. — 1996. — № 1. — С. 32—33.
10. Дмитрик И. И. Селекционное значение отдельных гистоструктур кожи овец / И. И. Дмитрик и М. И. Селионова // Сб. науч. тр. ФГБНУ ВНИИОК. — Ставрополь, 2016. — № 2 (9). — С. 237—243.
11. Tridico S. R. Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls / S. R. Tridico, M. M. Houck, K. P. Kirkbride // Forensic Sci Int. — 2014. — V 238. — P. 101—107.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. Г. Ульянов — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры частной зоотехнии;

В. И. Котарев — доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник лаборатории гематологии и биохимии отдела клинико-лабораторных исследований;

И. А. Ульянов — студент 6-го курса лечебного факультета;

П. М. Торгун — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры акушерства, анатомии и хирургии.

Статья поступила в редакцию 19.10.2023 г.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE SKIN OF CROSSBRED SHEEP WHEN ASSESSING THE QUALITY OF SHEEP PRODUCTS

Andrey Grigoryevich Ulyanov*✉, Vyacheslav Ivanovich Kotarev**, Ignatiy Andreevich Ulyanov***, Petr Makarovich Torgun*¹

*Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia, agu16@mail.ru✉

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

***Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko, Voronezh, Russia

Abstract. Modern trends in the successful development of the sheep breeding industry are aimed at increasing its economic efficacy through the maximum use of all types of products. An important item in the overall income structure of the sheep breeding industry is wool, fur coats and leather products. The study of the morphological characteristics of the skin of sheep is an important part of understanding the patterns of individual development of animals and their productivity. The objective of this report is to study the morphology of the skin in rams of the Russian long-haired breed in postnatal ontogenesis. The thickness of the skin largely depends on the breed, age and gender of the sheep. The studies have shown that skin thickness undergoes significant changes in the first months of animal life: in the rams at the age of four months, compared to the newborns, the total skin thickness increases by 852 μm , which is 43.4 % ($P < 0.05$). Subsequently, the increase in skin thickness continues and by 10 months the total skin thickness reaches almost its maximum level. The thickness of the epidermis increases significantly in the rams at the age of ten months — up to 26 μm , by 18.2 %, compared to the six-month-old animals. Based on the study of the thickness of the reticular layer of the dermis and the thickness of the collagen fiber bundles in this layer, the timing of the morphological maturation of the components of the reticular layer has been determined, which is of great practical importance for the technology of sheepskin production.

Keywords: sheep, productivity, skin morphology, postnatal ontogenesis

Interest in breeding semi-fine wool and wool-and-meat producing sheep is due to their high productivity, early maturity, good slaughter qualities and fertility, which allows sheep farming to remain a highly profitable branch of agricultural production. The level and growth of sheep productivity largely depend on the efficacy of the selection work carried out on sheep farms and the quality of the sold of the young breeders.

In the process of improving sheep breeds, it seems very important and relevant to study the productive and biological characteristics of animals for a number of basic economically useful traits.

The study of the formation of skin structure and wool quality is not only of general biological, but also of great practical importance, since wool is their main product. In this regard, the conducted research allows us to provide a scientific basis for the correct development of measures aimed at increasing wool production, the quantity and quality of which largely depends on the skin structure.

In the last 10—15 years, mammalian skin has been the subject of numerous studies. Much new data have been obtained on the structural features of the skin in various animals. An extensive summary [1] on the molecular and structural biology of hair presents the results of experiments with the isolation of hair stem cells and growing hair under artificial conditions. In-depth histological studies of the skin of mammals are summarized in numerous works by V. E. Sokolov [2].

The specific characteristics of the skin and hair have been studied in many mammals [3—7].

A large number of works on the histology of skin and hair have been carried out by various specialists in sheep breeding [8, 10]. At breeding farms, the technology for selecting replacement rams using histological skin tests for early prediction of the true thickness and quality of wool is being widely introduced.

Despite the difficulties in determining the histological structure of the skin, more attention should be paid to it, since this organ has a direct effect on the quali-

ty of the skin and wool of sheep. This will allow us to obtain an objective assessment of the animals used in selection and breeding work.

Currently, there have been great achievements in the field of studying the skin and fur of various animal species, but many issues remain [1, 9, 11] insufficiently studied.

The objective of this report is to study the morpho-functional indicators of the skin in rams of the Russian long-haired breed in postnatal ontogenesis.

MATERIAL AND METHODS

Material from 59 rams of various ages was used (Table 1). Skin fragments from the back and lateral surface of the abdomen were fixed in Steve's, Bouin's and Zenker's fluids. The material was embedded in paraffin. Thin paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin, Heidenhain's azan, and trichrome-CHIC staining was used. Using an ocular micrometer, the total thickness of the skin, the thickness of the epidermis, the papillary and reticular layers of the dermis were measured (50 measurements for each animal). In addition, the thickness of collagen fibers was measured (50 measurements for each animal). To determine the normality of distribution in the set of samples, the Kolmogorov–Smirnov test was used. Digital data (thickness of the skin and its individual layers) did not have a normal distribution, and equality of variances was not revealed in the compared groups, and therefore, and the data were processed using the nonparametric White T test. At a significance level of $P < 0.05$, changes were considered statistically significant. To process the results of measurements of the thickness of collagen fibers, the parametric Student's t-test was

used. These results satisfied two mandatory conditions for using the parametric Student's t-test (normality of distribution and equality of variances in the compared groups). At a significance level of $P < 0.05$, changes were considered statistically significant.

STUDY RESULTS

The study of the morphological characteristics of the skin of sheep is an important part of understanding the patterns of individual development of animals and their productivity.

Age-related changes in skin thickness in rams of the Russian long-haired breed are presented in Tables 1—2 and Fig. 1—3. Skin thickness undergoes significant changes in the first months of animal life: in the rams aged four months, compared to the newborn rams, the total skin thickness increases by 812 μm , which is 41.4 % ($P < 0.05$). Subsequently, the increase in skin thickness continues and by 10 months the total skin thickness reaches almost its maximum level. Compared to the previous period, skin thickness in the rams at the age of ten months increases by 700 μm (24.9 %). In adult sexually mature animals, the skin thickness changes little (Table 1), however, in the rams at the age of 5 years, compared to the previous age group, the total skin thickness decreases by 324 μm , which is 9.8 %.

The thickness of the epidermis (Fig. 2) increases significantly in the rams at the age of ten months — up to 26 μm or by 18.2 %, compared to the animals at the age of six months. In the rams aged two to three years, the thickness of the epidermis remains almost unchanged. A decrease in the thickness of the epidermis was detected in the rams at the age of 5 years (by 8 %; $P < 0.05$).

Table 1

Age-related changes in skin thickness in rams

Age	n	Total skin thickness (μm)	Epidermal thickness (μm)	Dermis thickness (μm)	Thickness of the subcutaneous fat layer (μm)
0—15 d	5	1962 \pm 46	21 \pm 0.13	1746 \pm 42	195 \pm 2.93
4 mth	6	2774 \pm 47*	22 \pm 0.13	2461 \pm 48*	313 \pm 8.06*
6 mth	12	2814 \pm 57*	22 \pm 0.13	2472 \pm 48*	342 \pm 8.07*
10 mth	10	3514 \pm 64*	26 \pm 0.12*	3116 \pm 51*	398 \pm 8.92
2 yrs	8	3603 \pm 63	28 \pm 0.13*	3094 \pm 52	480 \pm 9.12*
3 yrs	10	3645 \pm 65	27 \pm 0.12	3187 \pm 56	458 \pm 9.82
5 yrs	8	3321 \pm 61*	25 \pm 0.14*	2898 \pm 59	423 \pm 9.67

* $P < 0.05$ (White's nonparametric T-test)

Table 2

Age-related changes in dermal thickness in sheep

Age	Thickness of the papillary layer of the dermis (μm)	Thickness of the reticular layer of the dermis (μm)	Ratio of reticular layer to papillary layer	Diameter of collagen fiber bundles (μm)
0—15 d	794	952	1.20	11 \pm 0.11
4 mth	1096	1365	1.24	16 \pm 0.13*
6 mth	1038	1434	1.38	17 \pm 0.12*
10 mth	1248	1823	1.46	21 \pm 0.13
2 yrs	1247	1847	1.48	27 \pm 0.14*
3 yrs	1244	1943	1.56	25 \pm 0.13
5 yrs	1130	1768	1.56	20 \pm 0.12

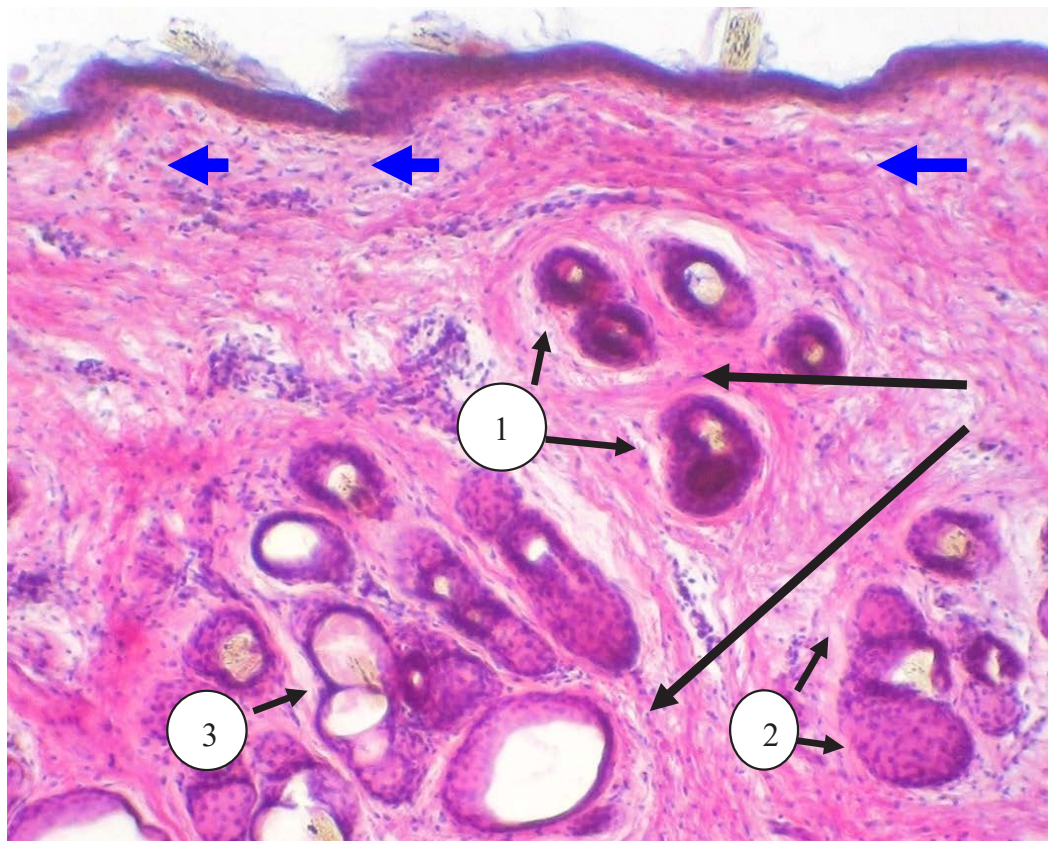
* $P < 0.001$ (Student's parametric t-test)

The structure and function of the dermis have a great effect on the quantity and quality of the wool produced, as well as on the commercial properties of sheep skin. The dermis of sheep includes the papillary and reticular layers. The papillary layer, located directly under the epidermis, varies from 794 to 1248 μm (Table 2). The papillary layer is represented by loose connective tissue, numerous blood vessels and various connective tissue cells. The upper border of the papillary layer is easily determined (this is the lower part of the epidermis), the lower border of the papillary layer is determined by the number and location of collagen fiber bundles. The papillary layer is characterized by the presence of loose connective tissue, and the reticular layer consists of dense, unformed collagenous connective tissue; most often, the upper layers of the reticular layer have a horizontal direction of collagen fibers (Fig. 1 A). An increase in the thickness of the papillary layer is observed in the rams at the age of 6 and 10 months, by 30.7 and 57.2 %, respectively. The increase is 244 and 454 μm ($P < 0.05$). The degree of development of the papillary layer and its structure depend on the density, length and thickness of collagen fibers.

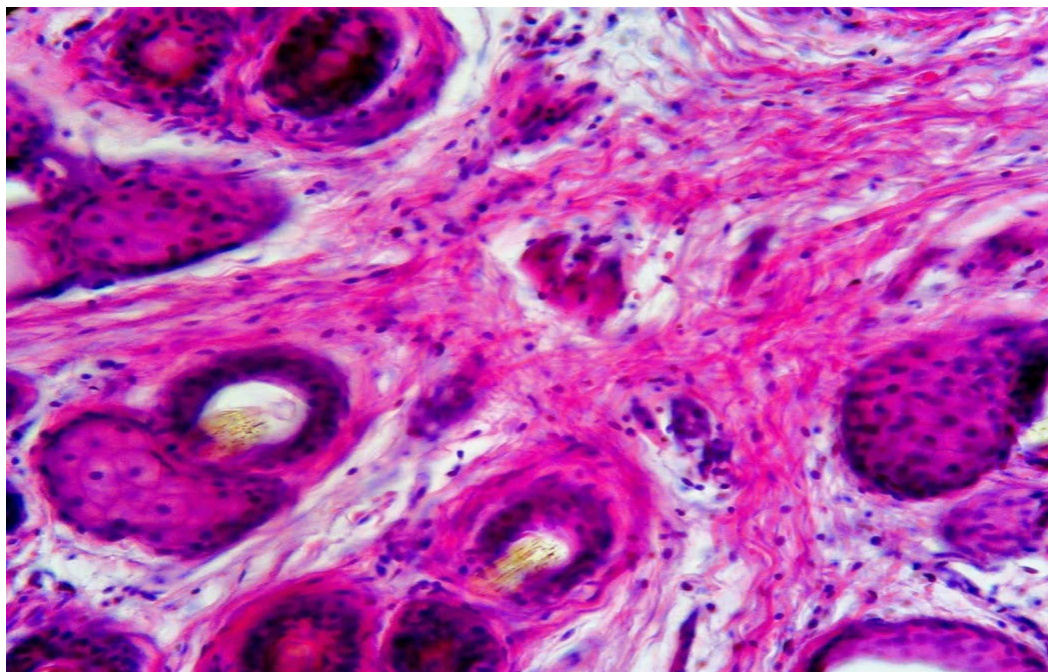
The thickness of the reticular layer of the skin dermis undergoes similar changes. In the rams at the age of 4 and 6 months, the thickness of the reticular layer increases by 413 and 482 μm (43.4 and 50.6 %), respectively, compared to the newborn animals (Table 2). The differences are statistically significant ($P < 0.05$). In the rams at the age of 2 and 3 years, the thickness of the reticular layer of the dermis reaches its maxi-

mum level (1847 and 1943 μm), but in the rams at the age of 5 years this figure decreases by 175 μm (9.9 %). Subcutaneous fatty tissue is most developed in the rams at the age of three years, exceeding more than twice the thickness of subcutaneous fatty tissue in the newborn animals (Table 1). The ratio of the thickness of the reticular layer to the thickness of the papillary layer in newborn animals is 1.20, but gradually this figure increases, reaching a maximum value in the rams at the age of three and five years (Table 2). Particular attention should be paid to the development of the reticular layer in rams in postnatal ontogenesis. As already noted, the maximum thickness of the reticular layer was found in the rams at the age of three years. In the rams at the age of 10 months, this figure is almost twice the thickness of the reticular layer in the newborn animals.

The reticular layer is represented by bundles of collagen and elastic fibers of complex weave. The size and nature of the bundles are an important breed characteristic and determine the strength of the skin. The studies have shown that the diameter and arrangement of bundles of collagen fibers in the reticular layer change with age. The thickness of the collagen fiber bundles in the newborn rams is only 11 \pm 0.11 μm , but already in the rams at the age of four months the thickness of the collagen fiber bundles increases by 45.5 %. In the newborn rams (Fig. 3), collagen fibers are located predominantly horizontally and only individual bundles are directed vertically. In the rams at the age of four months, more than 30 % of the fibers are vertical, the rest are horizontal.



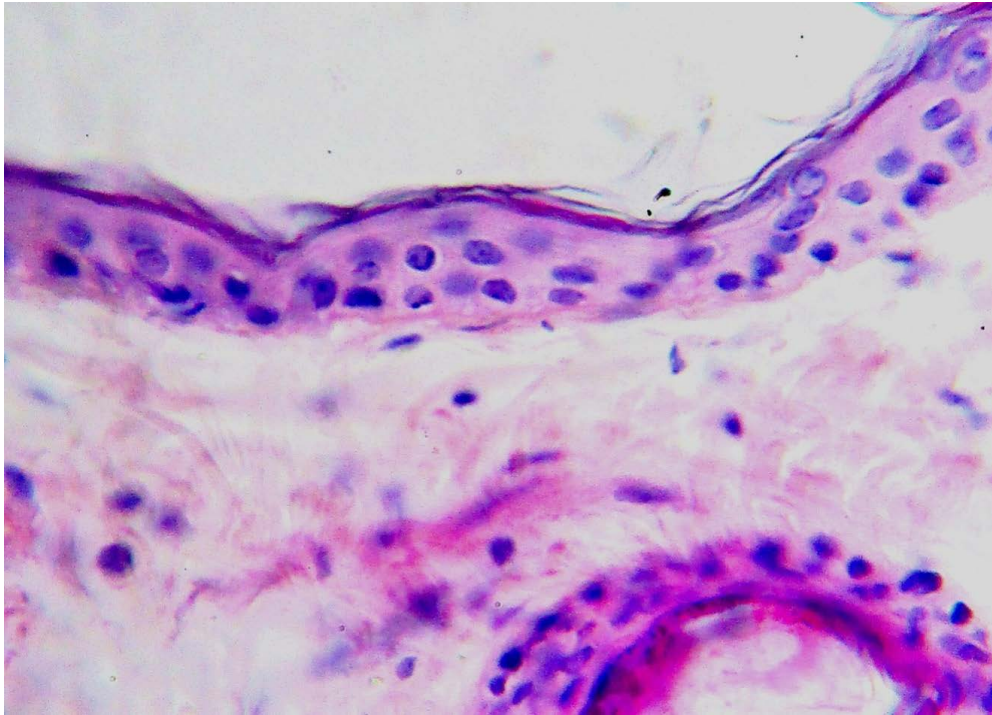
A



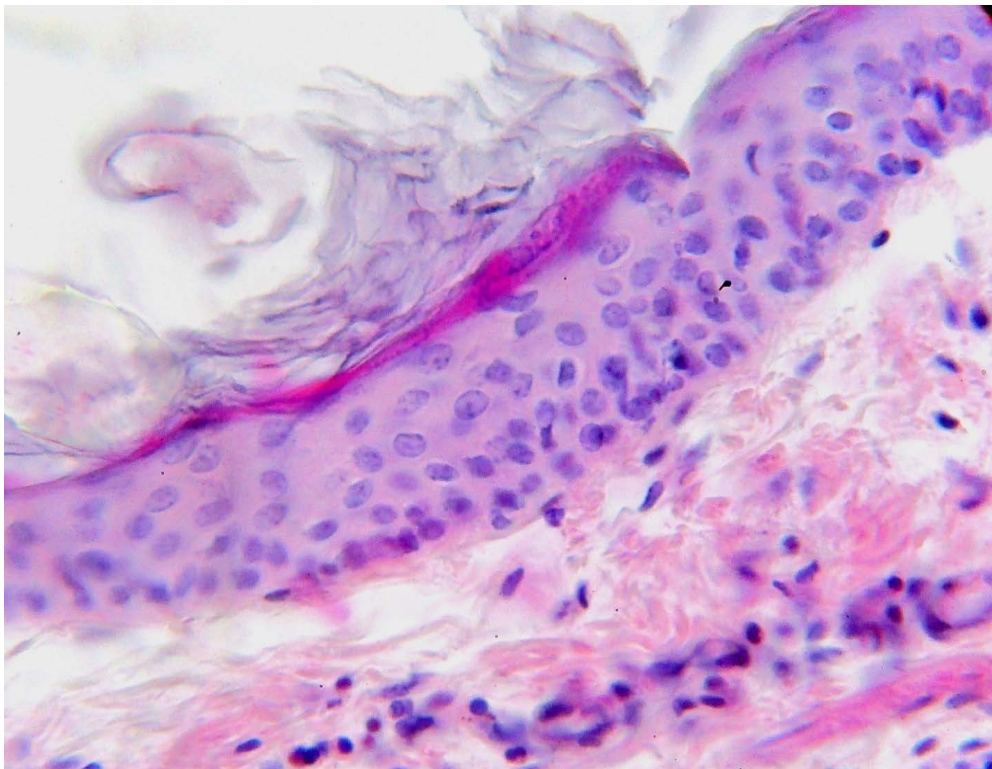
B

Fig. 1. Ram leather. Age — 4 months:

A — the epidermis is visible from above (dark stripe). Below is the papillary layer (blue arrows). Black arrows indicate the reticular layer with transversely cut hair follicles (1), sebaceous (2) and sweat glands (3); B — cross-section layer at higher magnification. Fixation: Steve's fluid, staining: hematoxylin-eosin, m. A — 20, ap. 10; B — 40, ap. 10



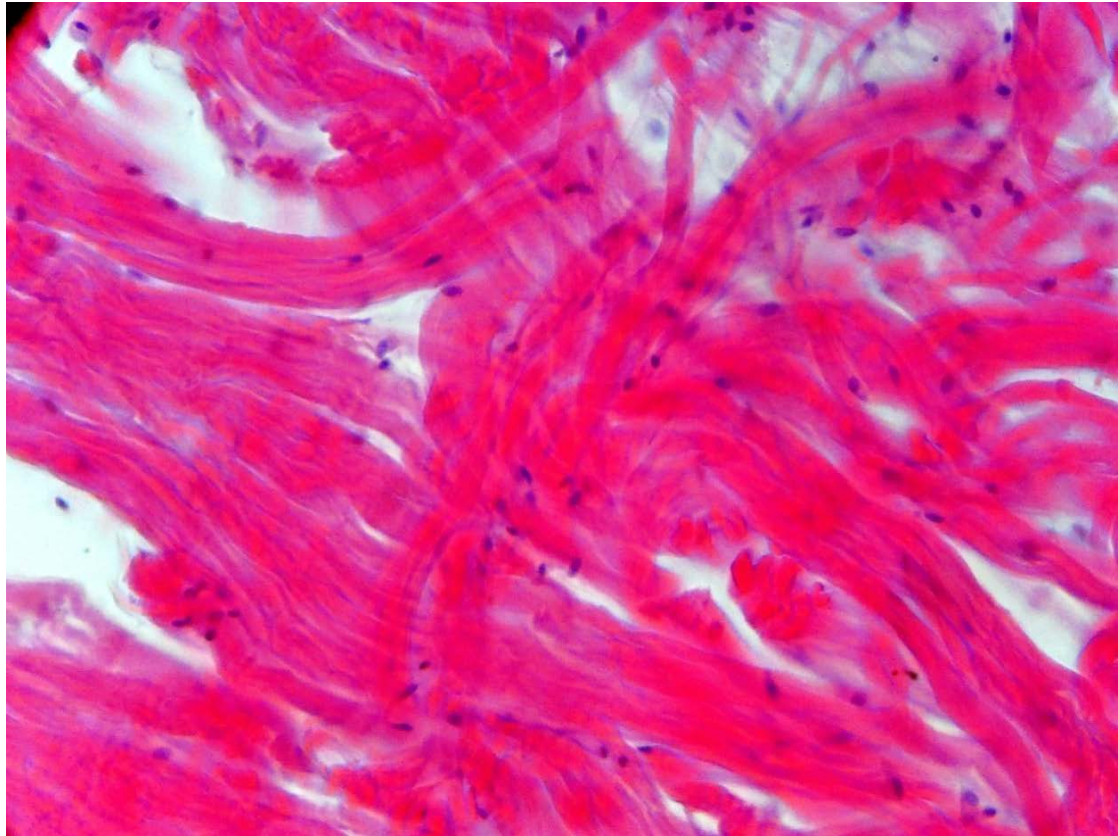
A



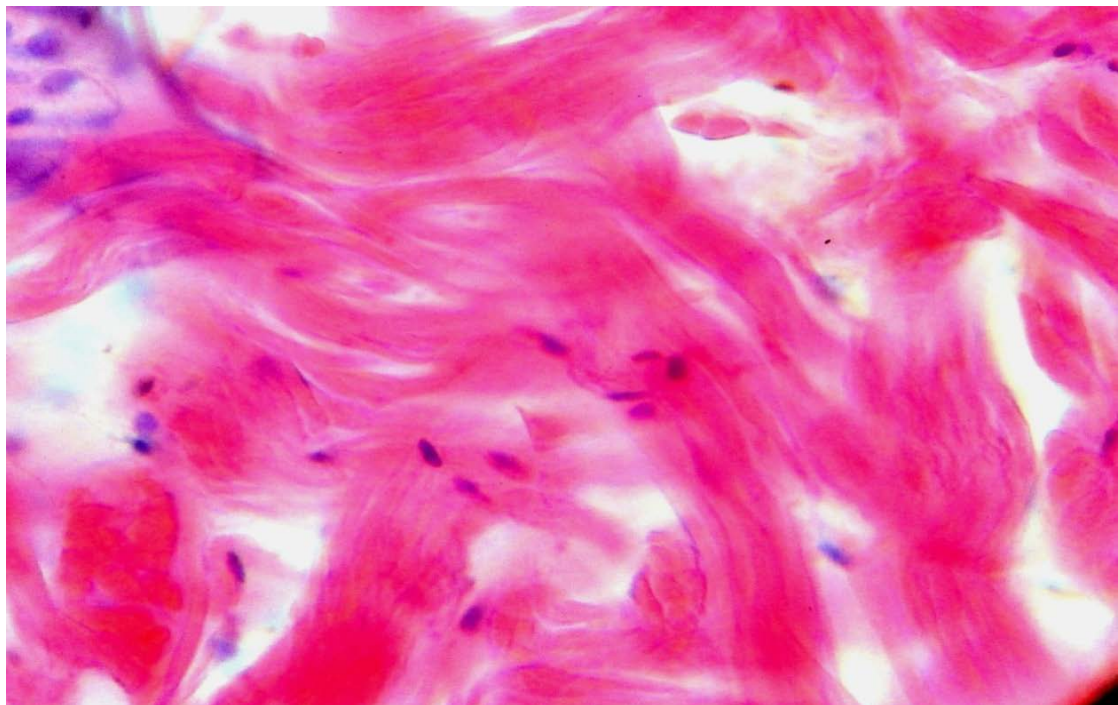
B

Fig. 2. Ram leather:

A — newborns. The epidermis includes 2—3 layers of epithelial cells. Beneath the epithelium, a papillary layer is visible, in which thin young collagen fibers and fibroblasts are visible; B — age 4 months. The epidermis is almost twice the thickness of the epidermis of the previous ram. In the epidermis, 5—6 or more layers of cells can be distinguished. The stratum corneum is well defined. The papillary layer is visible under the epidermis. Fixation: Steve's fluid, staining: hematoxylin-eosin, m. 40, ap. 16



A



B

Fig. 3. Ram leather. Reticular layer of the dermis:

A — newborns. Thin collagen fibers have a mainly horizontal direction; *B* — age of 10 months. Thick bundles of collagen fibers are intertwined and have different directions. Fixation: Steve's fluid, staining: hematoxylin-eosin, m. — 40, ap. 16

In the animals at the age of ten months, as already noted, the thickness of the collagen fiber bundles almost doubles, compared to the newborn animals, while an improvement in the ligature is noted due to their different directions, the formation of numerous loops and weaves. A similar structure of the reticular layer is preserved in the rams at the age of 2 and 3 years. In the rams at the age of five years, a simplification of the ligature and a decrease in the thickness of the collagen fiber bundles are observed.

CONCLUSION

Histological studies indicate that the study of the total thickness of the skin and its layers, the ratio of the reticular layer to the papillary layer, the diameter of the collagen fiber bundles in the age aspect makes it possible to develop scientifically based measures aimed at increasing wool productivity and improving the quality of fur and leather raw materials.

REFERENCES

1. Kurt Stenn The molecular and structural biology of hair/ Stenn Kurt, A. G. Messenger, P. Howard // Baden, New York. — 1991. — 520.
2. Kumirov S. G. Comparative morphofunctional characteristics of the skin of cage kept animals / S. G. Kumirov // thesis ... Cand. of Biol. Sciences MSAVM&B named after K. I. Skryabin (MGAVMiB im. K. I. Skryabina). — Moscow, 2017. — 120 p.
3. Merkur'yeva E. K. Genetics with the basics of biometry / E. K. Merkur'yeva, E. K. Shangin-Berezovskiy. — Moscow, 1983. — 400 p.
4. Ovcharenko N. D. Age dynamics of the skin of Kurlunda sheep and their crosses during puberty / N. D. Ovcharenko, N. N. Opaleva // Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (News of Orenburg State Agrarian University). — 2008. — No. 4 (20). — P. 29—32.
5. Dmitrik I. I. Comparative breed data on the density of hair follicles and skin thickness in fine-wool sheep / I. I. Dmitrik // Collection of scientific papers VNIIOK. — Stavropol, 2012. — No. 2 (1). — P. 238—242.
6. Podlesnykh E. A. Morphological substantiation of the typological affiliation of dog hair / E. A. Podlesnykh // thesis ... Cand. of Biol. Sciences MSAVM&B named after K. I. Skryabin (MGAVMiB im. K. I. Skryabina). — Moscow, 2018. — 108 p.
7. Sokolov V. E. Skin of mammals / V. E. Sokolov. — Moscow, 1973. — 487 p.
8. Slesarenko N. A. Effect of melacryl on the skin of animals / N. A. Slesarenko, N. V. Babichev // Krolikovodstvo i zverovodstvo (Rabbit breeding and fur farming). — 1995. — No. 3. — P. 5—6.
9. Tapil'skiy I. A. Formation of hair follicles in postnatal ontogenesis in sheep / I. A. Tapil'skiy, P. M. Torgun, A. G. Ulyanov // Ovtsy, kozy, sherstyanoe delo (Sheep, goats, wool business). — 1996. — No. 1. — P. 32—33.
10. Dmitrik I. I. Selection significance of individual histostructures of sheep skin / I. I. Dmitrik and M. I. Selionova // Collection of scientific papers FGBNU VNIIOK (FSB-SI ARRISH&GB). — Stavropol, 2016. — No. 2 (9). — P. 237—243.
11. Tridico S. R. Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls / S. R. Tridico, M. M. Houck, K. P. Kirkbride // Forensic Sci Int. — 2014. — V 238. — P. 101—107.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

- A. G. Ulyanov** — Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor of the Department of Special Zootechnics;
V. I. Kotarev — Doctor of Agricultural Sciences, Chief Scientific Associate of the Laboratory of Hematology and Biochemistry, Department of Clinical and Laboratory Studies;
I. A. Ulyanov — 6th-year Student of the Faculty of General Medicine;
P. M. Torgun — Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Obstetrics, Anatomy and Surgery.

The article was submitted 19.10.2023.

Научная статья

УДК 579.62:577.29

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.151

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ГРИБНОГО МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА СВИНЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ КОНВЕРСИИ КОРМА

Михаил Юрьевич Сыромятников^{*,**,***✉}, Сергей Викторович Шабунин^{*},
Екатерина Юрьевна Нестерова^{**,***}, Мария Ивановна Гладких^{***},
Юлия Дмитриевна Смирнова^{***}, Инна Юрьевна Буракова^{**,***},
Полина Дмитриевна Морозова^{**,***}, Мария Владимировна Грязнова^{***},
Евгений Владимирович Михайлов^{*1}

**Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, syromyatnikov@bio.vsu.ru✉*

***Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия*

****Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

Аннотация. В работе представлены результаты исследования высокопроизводительного секвенирования грибного микробиома кишечника свиней, а также оценка влияния показателя конверсии корма на биоразнообразие грибного сообщества кишечника животных. Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей выявил в кишечнике свиней 3 бактериальных типа, в число которых вошли Ascomycota, Basidiomycota и Microsporidia. Доминирующими типами оказались Ascomycota и Basidiomycota. Наиболее многочисленными грибами на уровне семейства оказались представители Schizosaccharomycetaceae. Самым многочисленным видом в кишечном микробиоме свиней оказался *Schizosaccharomyces pombe* (относительное содержание для двух исследуемых групп составило $9,24 \pm 1,49$). На втором месте по распространенности был вид *Colletotrichum higginsianum* (относительное содержание для группы А: $5,44 \pm 0,98$, для группы Б $5,97 \pm 0,76$) и *Thermothielavioides terrestris* (относительное содержание для группы А: $3,96 \pm 0,67$, для группы Б $4,37 \pm 0,46$). Сравнительный биоинформатический анализ кишечного микробиома двух групп свиней с разным показателем конверсии корма не выявил достоверных различий на уровне типа, семейства и вида. Результаты демонстрируют необходимость дальнейшего детального изучения данного вопроса.

Ключевые слова: грибы, микробиом, кишечник свиней, конверсия корма, гены, высокопроизводительное секвенирование

Конверсия корма в свиноводстве — один из важнейших экономических показателей предприятия. Он используется для измерения эффективности корма. Высокие значения конверсии приводят к относительно высоким ценам на свинину в результате повышенных затрат на кормление. Таким образом, снижение данного показателя у свиней, выращиваемых на крупных свиноводческих предприятиях, представляет собой важную стратегию минимизации затрат на производство свинины [1].

В настоящее время идет непрерывный поиск факторов, которые могли бы обеспечить лучшую усвояемость кормов и увеличение показателей при-

веса животных. Кормление напрямую связано с кишечной микробиотой, поскольку последняя выполняет первостепенную роль в усвояемости питательных элементов, углеводном обмене, а также влияет на здоровье и иммунитет животного. Микробиом кишечника представляет собой сложную систему взаимодействующих между собой множества разнообразных популяций бактерий и грибов [1]. Однако, в основном подобные исследования сосредоточены на изучении бактериологического состава кишечного микробиома свиней.

В последнее время растет число публикаций, посвященных грибному микробиому. Так, в од-

© Сыромятников М. Ю., Шабунин С. В., Нестерова Е. Ю., Гладких М. И., Смирнова Ю. Д., Буракова И. Ю., Морозова П. Д., Грязнова М. В., Михайлов Е. В., 2023

ном из исследований, было показано, что вид *Kazachstania slooffiae* является наиболее обильным для кишечника отлученных от молока поросят [2]. Также в кишечнике свиней были обнаружены грибы родов *Saccharomycopsis*, *Mrakia*, *Wallemia*, *Cantharellus*, *Eurotium*, *Solicoccozyma* и *Penicillium* [3]. С возрастом микобиом может меняться, так относительная численность родов *Kazachstania* и *Aureobasidium* значительно снижалась, тогда как относительная численность таких родов, как *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Simpliillium* и *Candida*, увеличивалась по мере взросления поросят [4].

Данное исследование было направлено на изучение грибного микробиома кишечника свиней в период откорма и его связи с показателем конверсии корма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования выступало содержимое толстого отдела кишечника полученных от клинически здоровых свинок в период откорма ($n = 12$). Животных разделили на 2 группы согласно коэффициенту конверсии корма: низкая конверсия корма (А) со средним коэффициентом конверсии 2,00 ($n = 6$) и высокая конверсия корма (Б) со средним коэффициентом конверсии 2,22 ($n = 6$).

Для экстракции ДНК из образцов использовали коммерческий набор HiPure DNA Micro Kit (Magen, Гуанчжоу, Китай). Выделение проводили согласно протоколу производителя. Библиотеки секвенирования готовили по следующему протоколу: ДНК фрагментировали с использованием набора MGIEasy Fast FS Library Prep Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай) с последующей очисткой магнитными частицами MGIEasy DNA Clean Beads (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Лигирование адаптеров проводили с комплектом адаптеров А для праймеров MGIEasy UDB (MGI, Шэньчжэнь, Китай) и ПЦР-амплификацией. Качество библиотеки ДНК оценивали с использованием Qubit и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США).

Дальнейшую циркуляризацию одной нити осуществляли с использованием модуля MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Окончательные библиотеки были объединены и секвенированы с использованием платформы секвенирования MGI DNBSEQ-G50 с моделью проточной ячейки для секвенирования DNBSEQ-G50RS: FCL (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Для создания DNB использовался набор для высокопро-

изводительного секвенирования DNBSEQ-G50RS. Качество необработанных метагеномных данных оценивали с помощью инструмента FastQC. Технические последовательности и базы низкого качества ($Q < 30$) были обрезаны с помощью fastp. Таксономическое профилирование образцов было выполнено с использованием Kraken2 со стандартными базами данных для эукариот.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ

Биоинформатический анализ результатов секвенирования позволил идентифицировать до вида подавляющее большинство полученных нуклеотидных последовательностей. В сумме высокопроизводительное секвенирование 12 образцов микробиома свиней позволило получить 151 724 рида. Количественный состав ридов, полученных в результате анализа образцов из группы А, был равен 7550, а группы Б — 76 174. Согласно современной номенклатуре было идентифицировано 3 типа, 11 классов, 15 отделов, 27 семейств и 47 родов грибов.

Сравнительный биоинформатический анализ данных результатов секвенирования микробиомов двух групп свиней не зафиксировал достоверных различий на уровне типа. Анализ нуклеотидных последовательностей выявил 3 бактериальных филума: *Ascomycota*, *Basidiomycota* и *Microsporidia* (рис. 1). Наименьшее значение относительного содержания грибов в данной выборке приходилось на представителей типа *Microsporidia*.

Для анализа на уровне семейств были отброшены те группы, чье процентное содержание составляло менее 1 %. На рисунке 2. отражены результаты расчета показателя относительного содержания 26 семейств. Исследование грибного микробиома кишечника свиней на уровне семейства также не выявило разницу между группой А и группой Б.

Наиболее многочисленными грибами в выборке оказались представители семейства *Schizosaccharomycetaceae*, чье процентное содержание составило $15,40 \pm 3,20$ для группы А и $15,36 \pm 1,79$ для группы Б. Помимо них, микробиом был обильен грибами из семейств *Chaetomiaceae*, *Glomerellaceae*, *Ophiocordycipitaceae* и *Sordariaceae*.

Не было отмечено достоверных различий и в результате исследования грибов на уровне вида. По подобию анализа на уровне семейства, в выборке участвовали лишь те виды, чье относительное содержание было равно или превышало 1. В грибковом сообществе микробиома свиней нами было определено 39 видов (рис. 3).

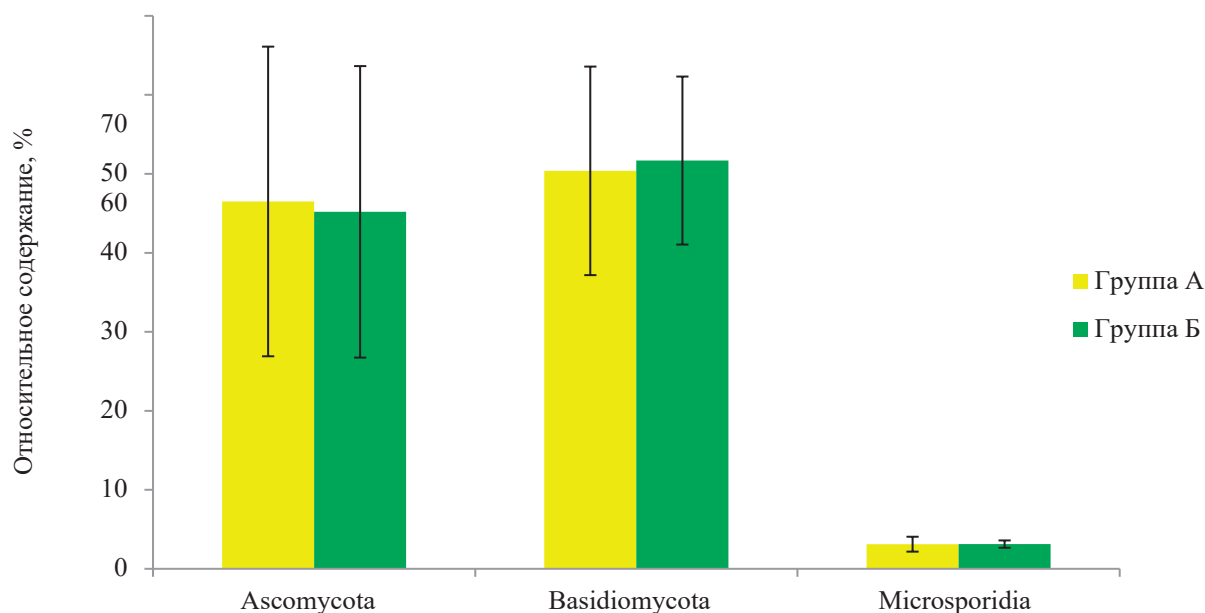


Рис. 1. Распространенность грибных филумов в микробиоме свиней

Было установлено, что самым многочисленным видом среди всех идентифицированных в микробиоме свиней оказался *Schizosaccharomyces pombe*. Среднее значение для двух исследуемых групп составило $9,24 \pm 1,49$. *S. pombe* — это делящиеся дрожжи, относящиеся к отделу аскомикота. Этот вид дрожжей в силу особенностей своего метаболизма используется в ряде стран при ферментации вин и пивных напитков, а также в животноводстве как компонент кормовых добавок [5]. Данные об обнаружении этих грибов в микробиоме свиней не были обнаружены ранее.

На втором месте по распространенности располагались виды *Colletotrichum higginsianum* и *Thermothielavioides terrestris*. *C. higginsianum* относится к аскомицетным грибам, вызывающим антракнозные заболевания у многих сельскохозяйственных растений, в особенности у крестоцветных культур [6]. *T. terrestris* — термофильный нитчатый гриб, обеспечивающий разложение полисахаридов из биомассы. Преимущественно данный вид обнаруживается в почве и компосте [7]. Публикации, подтверждающие наши данные об этих грибах в кишечнике свиней также отсутствуют.

Порядка 13 % от числа всех проанализированных видов приходилось на представителей рода *Aspergillus*: *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus nidulans* и *Aspergillus puulaauensis*. Было установлено, что в микробиоме поросят содержание грибов рода *Aspergillus* формирует обратную зависи-

мость с микроорганизмами, образующими короткоцепочечные жирные кислоты (*Butyricoccus*, *Subdoligranulum* и *Fusicatenibacter*), являющиеся основным источником энергии для клеток слизистой оболочки кишечника.

На третьем месте по распространенности располагались грибы таких видов, как *Drechmeria coniospora*, *Purpureocillium takamizusanense* и *Thermothelomyces thermophiles*. *D. coniospora* — облигатные грибы-паразиты, относящиеся к семейству Clavicipitaceae. Было обнаружено наличие этих грибов-нематофагов в образцах фекалий, полученных от крупного рогатого скота [8]. *P. takamizusanense* — аскомицетный гриб, относящийся к семейству Орфиокоципитациеae. *T. thermophiles* — нитчатый термофильный плесневый грибок из семейства Chaetomiaceae, обеспечивающий гидролиз полисахаридов в растительной биомассе [9]. Информация о корреляции содержания данных видов с показателем конверсии корма у свиней отсутствуют.

Четвертое место по распространенности видов в микробиоме свиней принадлежало *Neurospora crassa* и *Sporisorium graminicola*. *N. crassa* — нитевидный гриб из семейства Sordariaceae. *S. graminicola* — патогенный гриб растений из семейства Ustilaginaceae. Его присутствие было обнаружено в микробиоме кишечника человека, где помимо грибов *Saccharomyces* и *Candida*, представители рода *Sporisorium* характеризовались высокой распространенностью [10]. Связь между этими видами и микробиомом свиней ранее не была выявлена.

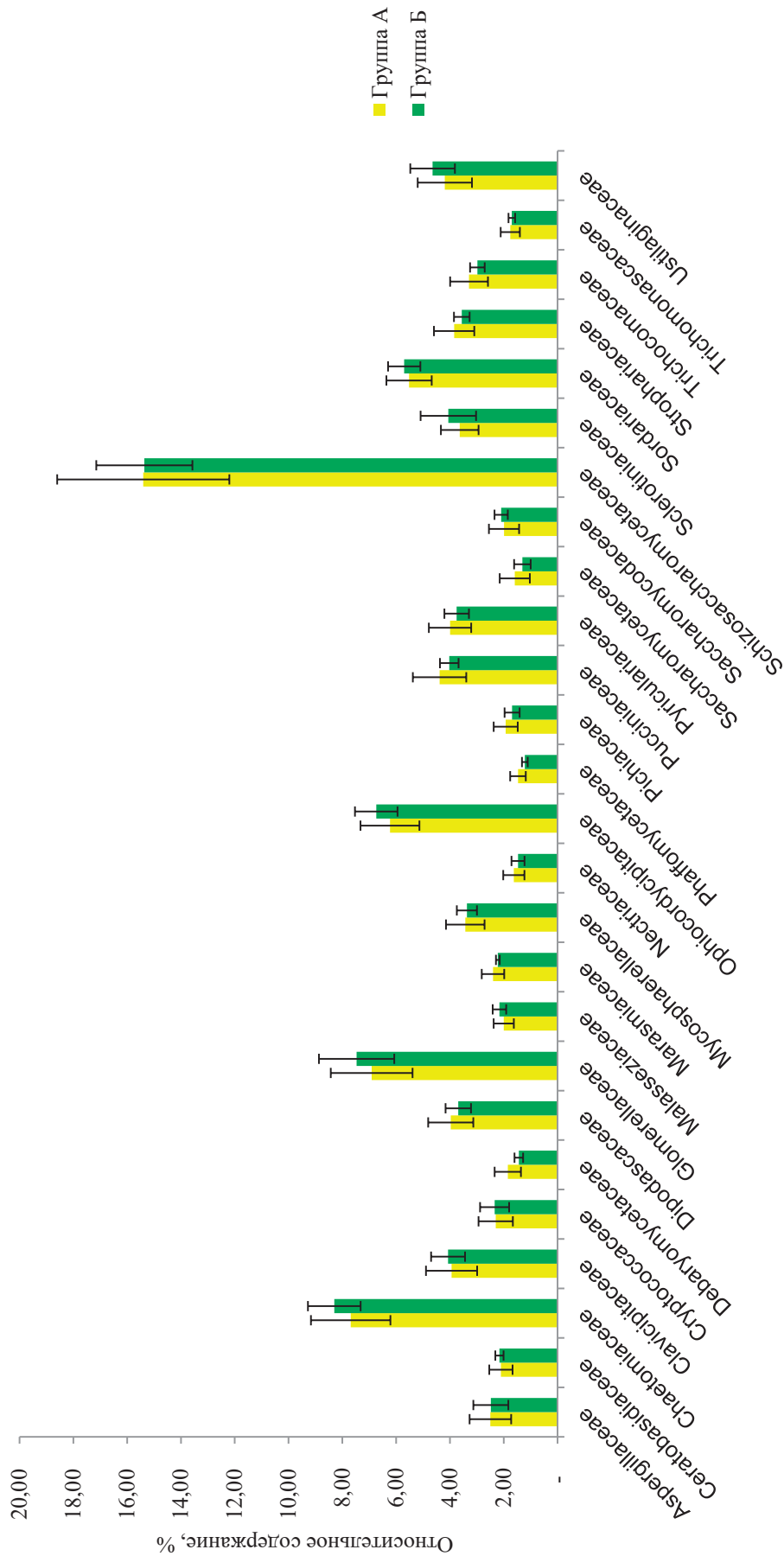


Рис. 2. Распространенность семейств грибов в микробиоме свиней

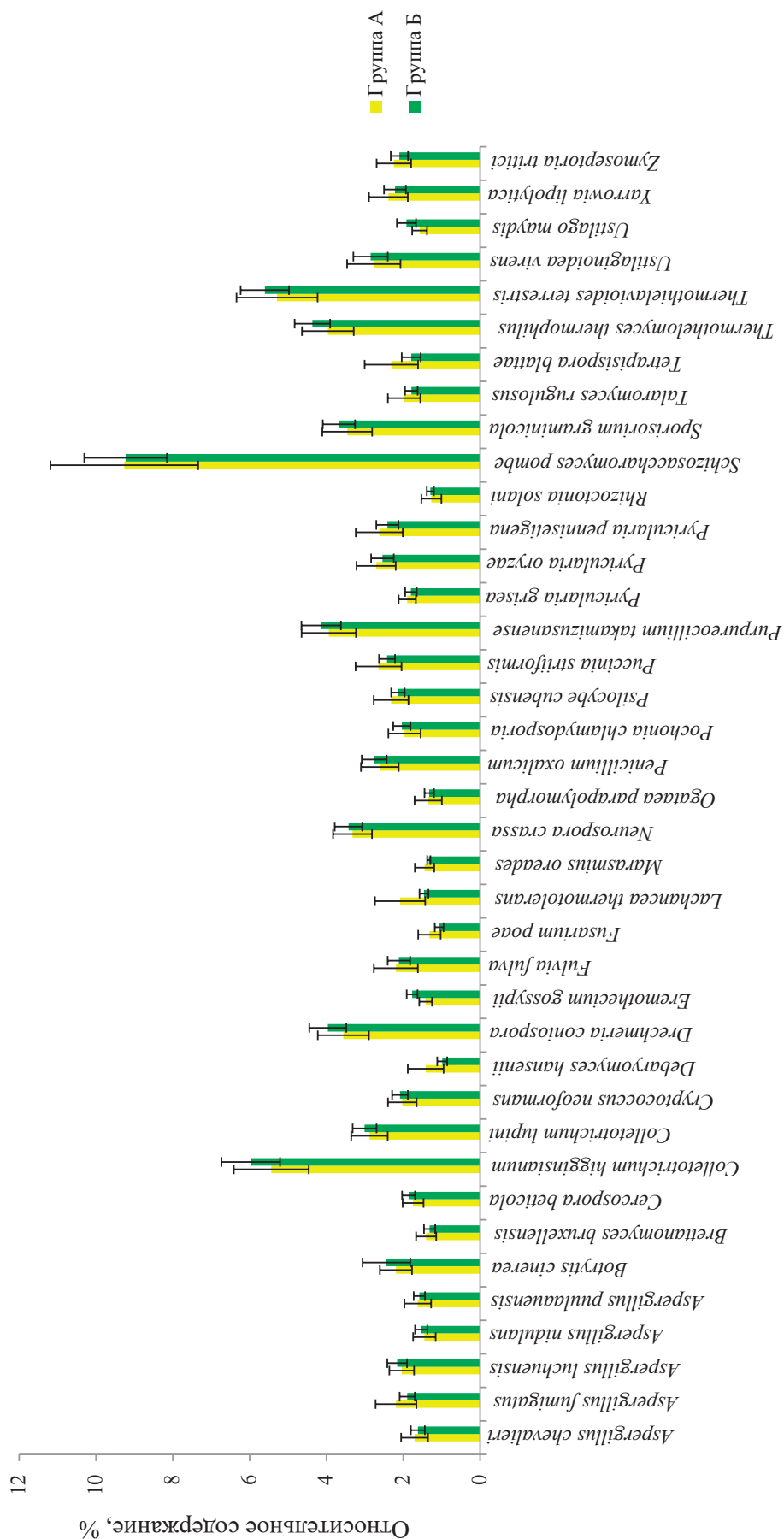


Рис. 3. Распространенность видов грибов в микробиоме свиней

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день разнообразие и состав грибов в кишечнике свиней все еще остаются до конца не изученным. По этой причине проведение исследований в данной области являются актуальными. Нами было проведено высокопроизводительное секвенирование грибного микробиома 12 взрослых свиней, разделенных на группу А и группу Б относительно величины показателя конверсии корма. В результате биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей не было обнаружено типов, семейств или видов, достоверно различающихся по относительной обильности между двумя группами. Было установлено, что преобладающими типами грибов оказались *Ascomycota* и *Basidiomycota* с *Schizosaccharomycetaceae*, *Chaetomiaceae*, *Glomerellaceae*, *Ophiocordycipitaceae* и *Sordariaceae* в качестве доминирующих семейств. Было идентифицировано 8 преобладающих видов, среди которых *Schizosaccharomyces pombe*, *Colletotrichum higginsianum*, *Thermothielavioides terrestris*, *Drechmeria coniospora*, *Purpureocillium takamizusanense*, *Thermothelomyces thermophiles*, *Neurospora crassa* и *Sporisorium graminicola*, что составляло 34 % всех образцов в фекальной микробиоте исследуемой выборки свиней.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Bergamaschi M.* Gut microbiome composition differences among breeds impact feed efficiency in swine / M. Bergamaschi, F. Tiezzi, J. Howard, Y. J. Huang, K. A. Gray [et al.] // *Microbiome*. — 2020. — Vol. 8, № 1. — 110 p. doi: 10.1186/s40168-020-00888-9.
2. *Hu J.* Core-predominant gut fungus *Kazachstania slooffiae* promotes intestinal epithelial glycolysis via lysine desuccinylation in pigs / J. Hu, J. Chen, Q. Hou, X. Xu, J. Ren [et al.] // *Microbiome*. — 2023. — Vol. 11, № 1. — 31 p. doi: 10.1186/s40168-023-01468-3.

3. *Luo Y.* The nutritional significance of intestinal fungi: alteration of dietary carbohydrate composition triggers colonic fungal community shifts in a pig model / Y. Luo, J. Li, H. Zhou, B. Yu, J. He [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2021. — Vol. 87. — e00038—21 p. doi: 10.1128/AEM.00038—21.

4. *Hu J.* Gradual changes of gut microbiota in weaned miniature piglets / J. Hu, Y. Nie, J. Chen, Y. Zhang, Z. Wang [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — Vol. 7. — 1727 p. doi: 10.3389/fmicb.2016.01727.

5. Phytase produced using *Schizosaccharomyces pombe* ASP595—1 strain (Genetically Modified Feed Additives). Food Safety Commission of Japan (Food Safety Tokyo). — 2017. — Vol. 5, № 2. — p. 72—73. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2017001s.

6. *Tsushima A.* Genomic resources of *Colletotrichum* fungi: development and application / A. Tsushima, K. Shirasu // *Journal of General Plant Pathology*. — 2022. — Vol. 88. — P. 349—357. doi: 10.1007/s10327-022-01097-y.

7. *Tölgo M.* Genomic and transcriptomic analysis of the thermophilic lignocellulose-degrading fungus *Thielavia terrestris* LPH172 / M. Tölgo, S. Hüttner, P. Rugbjerg, N. T. Thuy, V. N. Thanh [et al.] // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. — 2021. — Vol. 14, № 1. — 131 p. doi: 10.1186/s13068-021-01975-1.

8. *Saumell C. A.* Nematophagous fungi from decomposing cattle faeces in Argentina / C. A. Saumell, A. S. Fernández, L. A. Fusé, M. Rodríguez, M. F. Sagüés, L. E. Iglesias // *Revista Iberoamericana de Micología*. — 2015. — 32, № 4. — 252—256. doi: 10.1016/j.riam.2014.09.003.

9. *Singh B.* *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: a thermophilic mould of biotechnological potential / B. Singh // *Critical Reviews in Biotechnology*. — 2016. — Vol. 36, № 1. — P. 59—69. doi: 10.3109/07388551.2014.923985.

10. *Szóstak N.* Host factors associated with gut mycobiome structure / N. Szóstak, L. Handschuh, A. Samelak-Czajka, K. Tomela, M. Schmidt [et al.] // *mSystems*. — 2023. — Vol. 8, № 2. — e0098622 p. — doi: 10.1128/msystems.00986-22.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

М. Ю. Сыромятников — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий; старший научный сотрудник лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики;

С. В. Шабунин — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, научный руководитель;

Е. Ю. Нестерова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

М. И. Гладких — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

Ю. Д. Смирнова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

И. Ю. Буракова — аспирант кафедры биохимии и биотехнологии, младший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки, младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

П. Д. Морозова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

М. В. Грязнова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

Е. В. Михайлов — кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией.

Статья поступила в редакцию 03.10.2023 г.

Original article
UDC 579.62:577.29

STUDY OF THE FUNGAL MICROBIOME DIVERSITY OF THE INTESTINES IN PIGS AT VARIOUS FEED CONVERSION

Mikhail Yuryevich Syromyatnikov^{*, **, ***✉}, Sergey Viktorovich Shabunin^{*},
Ekaterina Yuryevna Nesterova^{**, ***}, Mariya Ivanovna Gladkikh^{***},
Yuliya Dmitrievna Smirnova^{***}, Inna Yuryevna Burakova^{**, ***},
Polina Dmitrievna Morozova^{**, ***}, Mariya Vladimirovna Gryaznova^{***},
Evgeniy Vladimirovich Mikhaylov^{*1}

^{*}All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology
and Therapy, Voronezh, Russia, syromyatnikov@bio.vsu.ru✉

^{**}Voronezh State University, Voronezh, Russia

^{***}Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia

Abstract. The article presents the results of a study of a high-throughput sequencing of the fungal microbiome of the intestinal tract in pigs, as well as an assessment of the effect of the feed conversion rate on the biodiversity of the fungal community of the intestinal tract of animals. Bioinformatics analysis of nucleotide sequences revealed 3 bacterial types in the intestines of pigs, including Ascomycota, Basidiomycota and Microsporidia. The dominant phyla were Ascomycota and Basidiomycota. The most numerous fungi at the family level were the representatives of Schizosaccharomycetaceae. The most abundant species in the intestinal microbiome of pigs was *Schizosaccharomyces pombe* (the relative abundance for the two study groups was 9.24 ± 1.49). The second place in prevalence was occupied by the species *Colletotrichum higginsianum* (relative content for group A — 5.44 ± 0.98 , for group B — 5.97 ± 0.76) and *Thermothielavioides terrestris* (relative content for group A — 3.96 ± 0.67 , for group B — 4.37 ± 0.46). A comparative bioinformatics analysis of the intestinal mycobiome of two groups of pigs with various feed conversion rates did not reveal significant differences at the level of type, family and species. The results demonstrate the need for further detailed study of this issue.

Keywords: fungi, microbiome, pig intestines, feed conversion, genes, high-throughput sequencing

Feed conversion in pig breeding is one of the most important economic indicators of an enterprise. It is used to measure feed efficacy. High conversion values lead to relatively high pork prices as a result of increased feeding costs. Thus, reducing this indicator in pigs reared at large pig breeding enterprises is an important strategy for minimizing the costs of pork production [1].

Currently, there is a continuous search for factors that could ensure better digestibility of feed and an increase in animal weight gain. Feeding is directly related to the intestinal microbiota, since the latter plays a primary role in the digestibility of nutrients, carbohydrate metabolism, and also affects the health and immunity of the animal. The intestinal microbiome is a complex system of many diverse populations of bacteria and fungi interacting with each other [1]. However, such studies are mainly focused on study-

ing the bacteriological composition of the intestinal microbiome of pigs.

Recently, the number of publications devoted to the fungal microbiome has been growing. Thus, in one of the studies, it has been shown that the species *Kazachstania slooffiae* is the most abundant in the intestines of weaned piglets [2]. The fungi of the genera *Saccharomycopsis*, *Mrakia*, *Wallemia*, *Cantharellus*, *Eurotium*, *Solicoccozyma* and *Penicillium* were also found in the intestines of pigs [3]. The microbiome can change with age, as the relative abundance of the genera *Kazachstania* and *Aureobasidium* decreased significantly, while the relative abundance of such genera as *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Simpliillium* and *Candida* increased as the piglets matured [4].

This research was aimed at studying the fungal intestinal microbiome of fattening pigs and its relationship with feed conversion rate.

© Syromyatnikov M. Yu., Shabunin S. V., Nesterova E. Yu., Gladkikh M. I., Smirnova Yu. D., Burakova I. Yu., Morozova P. D., Gryaznova M. V., Mikhaylov E. V., 2023

MATERIAL AND METHODS

The object of the study was the contents of the large intestine obtained from clinically healthy pigs during the fattening period ($n = 12$). The animals were divided into 2 groups according to the feed conversion ratio: low feed conversion (A) with an average conversion rate of 2.00 ($n = 6$) and high feed conversion (B) with an average conversion rate of 2.22 ($n = 6$).

The commercial HiPure DNA Micro Kit (Magen, Guangzhou, China) was used to extract DNA from the samples. Isolation was carried out according to the manufacturer's protocol. Sequencing libraries were prepared using the following protocol: DNA was fragmented using the MGIEasy Fast FS Library Prep Module kit (MGI, Shenzhen, China), followed by magnetic purification with the MGIEasy DNA Clean Beads (MGI, Shenzhen, China). Adapter ligation was performed with the MGIEasy UDB Primer Adapter Kit A (MGI, Shenzhen, China) and PCR amplification. DNA library quality was assessed using Qubit and the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

Further single-strand circularization was performed using the MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Shenzhen, China). The final libraries were pooled and sequenced using the MGI DNBSEQ-G50 sequencing platform with the DNBSEQ-G50RS sequencing flow cell model: FCL (MGI, Shenzhen, China). The DNBSEQ-G50RS high-throughput sequencing kit was used to generate DNBs. The quality of raw metagenomic data was

assessed using the FastQC tool. Technical sequences and low quality bases ($Q < 30$) were trimmed using fastp. Taxonomic profiling of samples was performed using the Kraken2 with standard eukaryotic databases.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

Bioinformatics analysis of sequencing results made it possible to identify the vast majority of the obtained nucleotide sequences to species. In total, high-throughput sequencing of 12 pig microbiome samples allowed obtain 151724 reads. The quantitative composition of the reads obtained from the analysis of the samples from group A was equal to 7550, and from group B — 76174. According to modern nomenclature, 3 types, 11 classes, 15 divisions, 27 families and 47 genera of fungi were identified.

A comparative bioinformatics analysis of microbiome sequencing data from two groups of pigs did not record significant differences at the type level. The analysis of nucleotide sequences revealed 3 bacterial phyla: *Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Microsporidia* (Fig. 1). The lowest value of the relative content of fungi in this sample was accounted for by the representatives of the phylum *Microsporidia*.

For the analysis at the family level, those groups the percentage of which was less than 1 % were discarded. Fig. 2 shows the results of calculating the relative content of 26 families. The study of the fungal intestinal microbiome of pigs at the family level also did not reveal any difference between group A and group B.

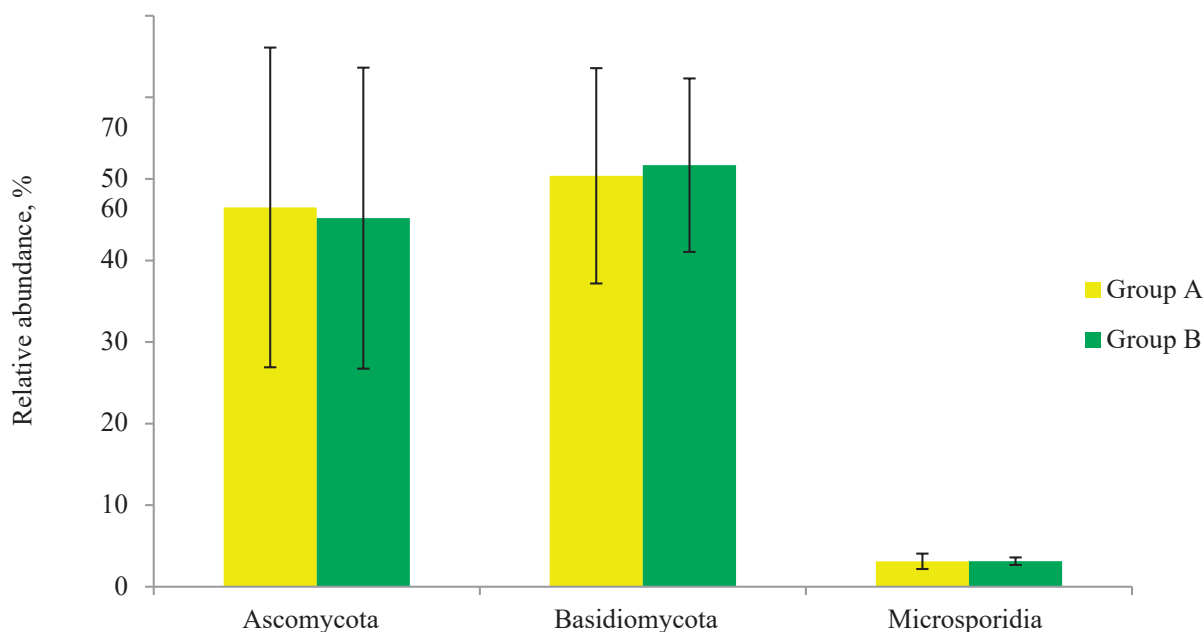


Fig. 1. Prevalence of fungal phyla in the pig microbiome

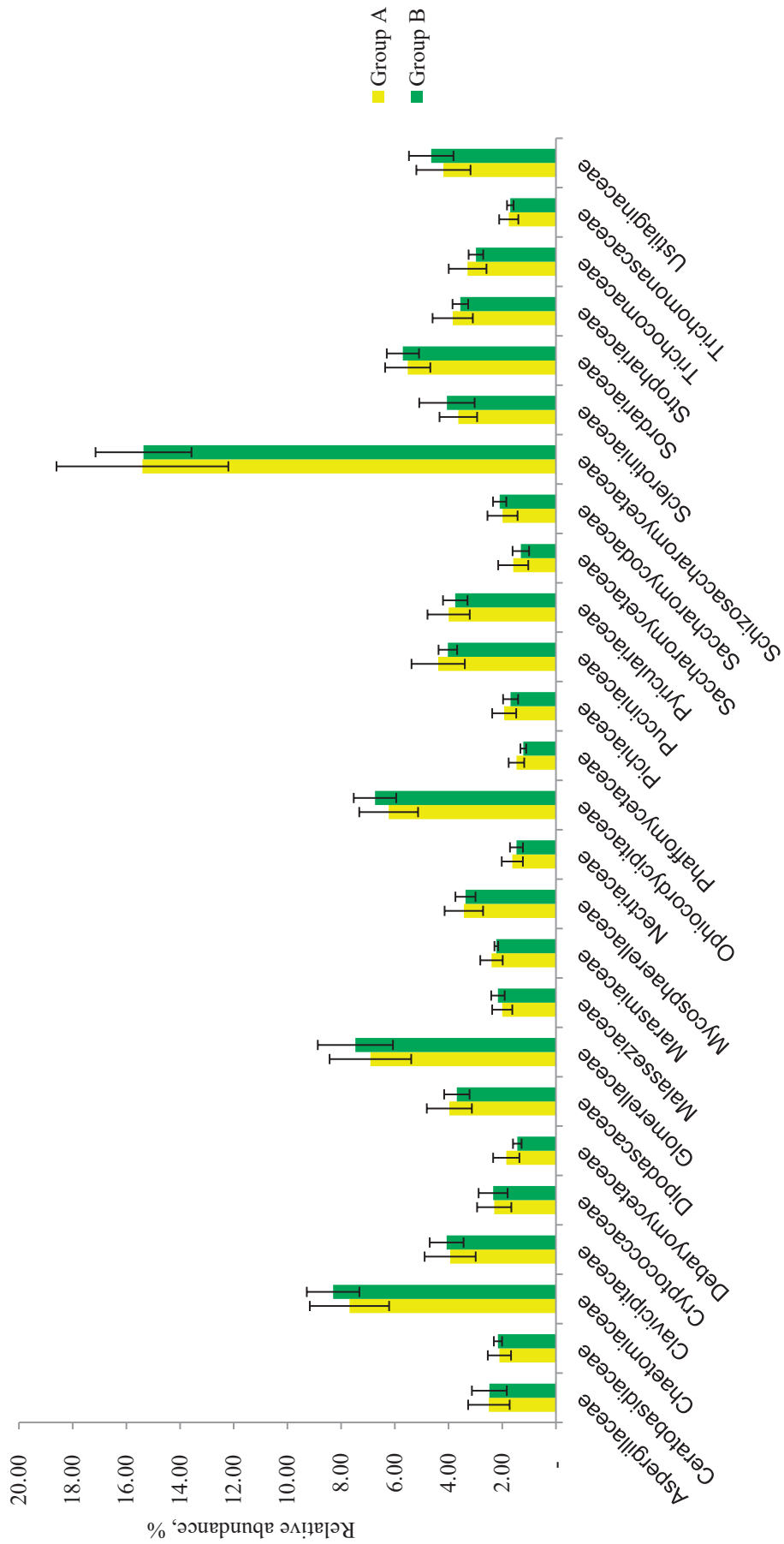


Fig. 2. Prevalence of fungal families in the pig microbiome

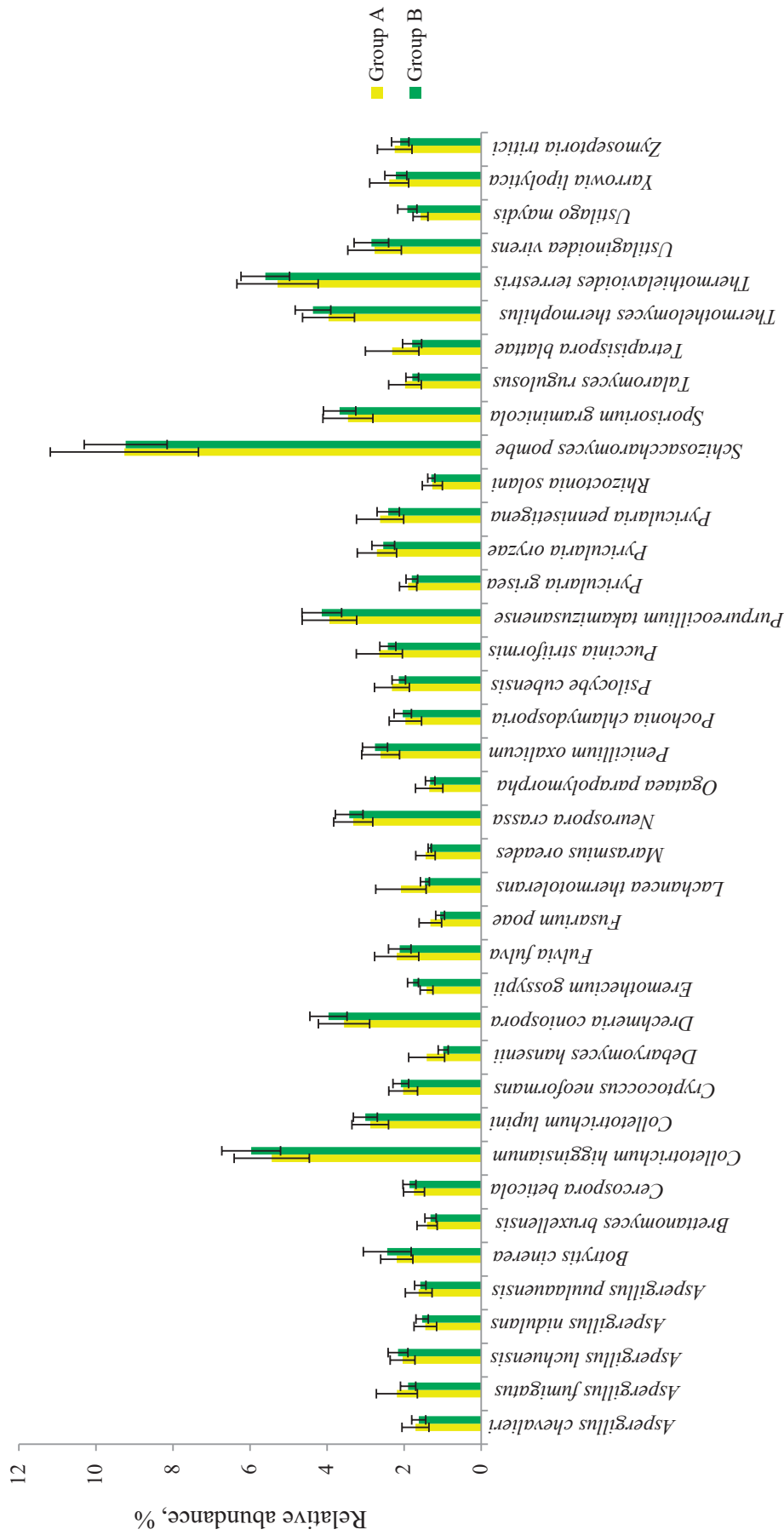


Fig. 3. Prevalence of fungal species in the pig microbiome

The most numerous fungi in the sample were the representatives of the family *Schizosaccharomycetaceae*, the percentage of which was 15.40 ± 3.20 for group A and 15.36 ± 1.79 — for group B. In addition to them, the microbiome was abundant in fungi from the families *Chaetomiaceae*, *Glomerellaceae*, *Ophiocordycipitaceae* and *Sordariaceae*.

No significant differences were noted in the study of fungi at the species level. Similar to the analysis at the family level, the sample included only those species, the relative abundance of which was equal to or greater than 1. We identified 39 species in the fungal community of the pig microbiome (Fig. 3).

It was found that the most abundant species among all identified in the pig microbiome was *Schizosaccharomyces pombe*. The mean value for the two study groups was 9.24 ± 1.49 . *S. pombe* is a fission yeast belonging to the division Ascomycota. Due to the peculiarities of its metabolism, this type of yeast is used in a number of countries in the fermentation of wines and beer drinks, as well as in livestock farming as a component of feed additives [5]. The data on the detection of these fungi in the microbiome of pigs have not been found previously.

The second most common species were *Colletotrichum higginsianum* and *Thermothielavioides terrestris*. *C. higginsianum* is an ascomycete fungus that causes anthracnose diseases in many agricultural plants, especially cruciferous crops [6]. *T. terrestris* is a thermophilic filamentous fungus that degrades polysaccharides from biomass. This species is mainly found in soil and compost [7]. There are also no publications confirming our data on these fungi in the intestines of pigs.

About 13 % of all analyzed species were the representatives of the genus *Aspergillus*: *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus puulaauensis*. It was found that in the microbiome of piglets, the content of fungi of the genus *Aspergillus* forms an inverse relationship with microorganisms that form short-chain fatty acids (*Butyricoccus*, *Subdoligranulum* and *Fusicatenibacter*), which are the main source of energy for the cells of the intestinal mucosa.

In the third place in prevalence there were the fungi of such species as *Drechmeria coniospora*, *Purpureocillium takamizusanense* and *Thermothelomyces thermophiles*. *D. coniospora* is an obligate parasitic fungi belonging to the family Clavicipitaceae. The presence of these nematophagous fungi has been detected in fecal samples obtained from cattle [8]. *P. takamizusanense* is an ascomycete fungus

belonging to the family Ophiocordycipitaceae. *T. thermophiles* is a filamentous thermophilic mold fungus from the family Chaetomiaceae that provides hydrolysis of polysaccharides in plant biomass [9]. There is no information on the correlation between the content of these species and the feed conversion rate in pigs.

The fourth most common species in the pig microbiome were *Neurospora crassa* and *Sporisorium graminicola*. *N. crassa* is a filamentous fungus from the family Sordariaceae. *S. graminicola* is a plant pathogenic fungus from the family Ustilaginaceae. Its presence was detected in the human intestinal microbiome, where, in addition to *Saccharomyces* and *Candida* fungi, the representatives of the genus *Sporisorium* were characterized by high prevalence [10]. The relationship between these species and the pig microbiome has not previously been identified.

CONCLUSION

To date, the diversity and composition of fungi in the intestines of pigs are still not fully understood. For this reason, research in this area is relevant. We carried out high-throughput sequencing of the fungal microbiome of 12 adult pigs, divided into group A and group B according to the feed conversion rate. Bioinformatics analysis of nucleotide sequences revealed no phyla, families or species significantly different in relative abundance between the two groups. The predominant fungal phyla were found to be Ascomycota and Basidiomycota with *Schizosaccharomycetaceae*, *Chaetomiaceae*, *Glomerellaceae*, *Ophiocordycipitaceae* and *Sordariaceae* as the dominant families. Eight (8) predominant species were identified, including *Schizosaccharomyces pombe*, *Colletotrichum higginsianum*, *Thermothielavioides terrestris*, *Drechmeria coniospora*, *Purpureocillium takamizusanense*, *Thermothelomyces thermophiles*, *Neurospora crassa* and *Sporisorium graminicola*, which accounted for 34 % of all samples in the fecal microbiota of the studied sampling of pigs.

REFERENCES

1. Bergamaschi M. Gut microbiome composition differences among breeds impact feed efficiency in swine / M. Bergamaschi, F. Tiezzi, J. Howard, Y. J. Huang, K. A. Gray [et al.] // Microbiome. — 2020. — Vol. 8, No. 1. — 110 p. doi: 10.1186/s40168-020-00888-9.
2. Hu J. Core-predominant gut fungus Kazachstania slooffiae promotes intestinal epithelial glycolysis via lysine desuccinylation in pigs / J. Hu, J. Chen, Q. Hou, X. Xu, J. Ren [et al.] // Microbiome. — 2023. — Vol. 11, No. 1. — 31p. doi: 10.1186/s40168-023-01468-3.

3. Luo Y. The nutritional significance of intestinal fungi: alteration of dietary carbohydrate composition triggers colonic fungal community shifts in a pig model / Y. Luo, J. Li, H. Zhou, B. Yu, J. He [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2021. — Vol. 87. — e00038—21 p. doi: 10.1128/AEM.00038—21.

4. Hu J. Gradual changes of gut microbiota in weaned miniature piglets / J. Hu, Y. Nie, J. Chen, Y. Zhang, Z. Wang [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — Vol. 7. — 1727 p. doi: 10.3389/fmicb.2016.01727.

5. Phytase produced using *Schizosaccharomyces pombe* ASP595—1 strain (Genetically Modified Feed Additives). Food Safety Commission of Japan (Food Safety Tokyo). — 2017. — Vol. 5, No. 2. — p. 72—73. doi: 10.14252/food-safetyfscj.2017001s.

6. Tsushima A. Genomic resources of *Colletotrichum* fungi: development and application / A. Tsushima, K. Shirasu // *Journal of General Plant Pathology*. — 2022. — Vol. 88. — P. 349—357. doi: 10.1007/s10327—022—01097-y.

7. Tölgo M. Genomic and transcriptomic analysis of the thermophilic lignocellulose-degrading fungus *Thielavia ter-*

restris LPH172 / M. Tölgo, S. Hüttner, P. Rugbjerg, N. T. Thuy, V. N. Thanh [et al.] // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. — 2021. — Vol. 14, No. 1. — 131 p. doi: 10.1186/s13068-021-01975-1.

8. Saumell C. A. Nematophagous fungi from decomposing cattle faeces in Argentina / C. A. Saumell, A. S. Fernández, L. A. Fusé, M. Rodríguez, M. F. Sagüés, L. E. Iglesias // *Revista Iberoamericana de Micología*. — 2015. — 32, No. 4. — 252—256. doi: 10.1016/j.riam.2014.09.003.

9. Singh B. *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: a thermophilic mould of biotechnological potential / B. Singh // *Critical Reviews in Biotechnology*. — 2016. — Vol. 36, No. 1. — P. 59—69. doi: 10.3109/07388551.2014.923985.

10. Szóstak N. Host factors associated with gut mycobiome structure / N. Szóstak, L. Handschuh, A. Samelak-Czajka, K. Tomela, M. Schmidt [et al.] // *mSystems*. — 2023. — Vol. 8, No. 2. — e0098622 p. doi: 10.1128/msystems.00986-22.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

M. Yu. Syromyatnikov — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics; Principle Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology;

S. V. Shabunin — Doctor of Veterinary Sciences, Academic Director;

E. Yu. Nesterova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

M. I. Gladkikh — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

Yu. D. Smirnova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

I. Yu. Burakova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

P. D. Morozova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

M. V. Gryaznova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

E. V. Mikhaylov — Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics.

The article was submitted 03.10.2023.

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОБИОХИМИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Научная статья

УДК 577.29

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.163

АНАЛИЗ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ В КИШЕЧНИКЕ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ ПРИ ДИАРЕЕ

Мария Владимировна Грязнова^{***}, Юлия Дмитриевна Смирнова^{***},
Инна Юрьевна Буракова^{**},^{***}, Полина Дмитриевна Морозова^{**},^{***},
Евгений Владимирович Михайлов^{*}, Михаил Юрьевич Сыромятников^{*},^{**},^{***}✉¹

^{*}Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, syromyatnikov@bio.vsu.ru✉

^{**}Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

^{***}Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Аннотация. Целью данной работы явился анализ генов ферментов метаболических путей в кишечнике новорожденных поросят при диарее. *E. coli* была доминирующим бактериальным видом для обеих групп. В группе здоровых поросят относительная численность *E. coli* составляла 53,30 %, а в группе поросят, больных диареей — 23,55 %. В результате проведенного анализа генов метаболизма кишечной микрофлоры было выявлено 425 идентифицированных и интегрированных ферментов метаболических путей. В группе здоровых поросят их число составило 394, в то время как в группе поросят с диареей насчитывалось 404 ферментов метаболических пути. Для обеих групп наиболее обогащенным был путь созревания пептидогликана. Основной вклад в этот метаболический путь вносят бактерии *E. coli*. Были выявлены дифференциальные различия между группами в представленности генов пути биосинтеза биотина II, который был статистически значимо сильнее обогащен в группе поросят с диареей ($10,96 \pm 5,18$ копий на миллион) и отсутствовал у здоровых поросят (p -value = 0,03). Биотин является важным витамином и кофактором в нескольких метаболических путях, а его дефицит связан с заболеваниями, включая воспалительные заболевания кишечника и повышенную проницаемость эпителия кишечника. В целом результаты исследований показывают, что нарушение микробиома, приводят к созданию благоприятных условий для микробов, способных синтезировать биотин, который может способствовать воспалению кишечника.

Ключевые слова: поросята, диарея, микробиом, метаболизм, высокопроизводительное секвенирование

При желудочно-кишечных болезнях (как инфекционной, так и неинфекционной этиологии) диарея почти всегда неотъемлемый симптом, который вызывает задержку роста и даже гибель поросят, что приводит к большим потерям в свиноводстве. Почти 49 % смертей новорожденных и молодняка поросят вызваны диареей [1].

Диарея у поросят обычно связана с различными факторами, которые в основном включают генетический фон [2] и факторы окружающей среды [3, 4]. В последнее время многочисленные исследования указывают на снижение содержания бак-

терий *Lactobacillus* и потерю микробного разнообразия при диарее, тогда как положительное влияние на состояние поросят оказали виды *Clostridium* spp., *Prevotella* spp. и *Escherichia coli* [5, 6], что указывает на то, что микробиота кишечника может быть основной причиной возникновения диареи.

Между тем, сложное взаимодействие микробиота-микробиота и микробиота-хозяин может выделять различные метаболиты, которые составляют основную среду желудочно-кишечного тракта и влияют на здоровье хозяина. Метаболиты демонстрируют самый быстрый ответ на изменения

© Грязнова М. В., Смирнова Ю. Д., Буракова И. Ю., Морозова П. Д., Михайлов Е. В., Сыромятников М. Ю., 2023

окружающей среды и играют важную роль в реакции биологической системы на абиотическое или другое вмешательство, тем самым связывая генотип с фенотипом [7]. Сугихарто и др. [8] наблюдали более высокие уровни пролина, таурина и карнитина в плазме поросят после заражения *E. coli*, тогда как бетаин, креатин и L-аргинин были ниже по сравнению с контрольной группой. Ву и др. [9] продемонстрировали, что у поросят с диареей наблюдались более высокие концентрации 4-аминомасляной кислоты и глицина в тощей кишке, вызванные диареей, вызванной *E. coli*.

Недавно несколько исследований показали, что бутират, вырабатываемый в основном микробиотой кишечника, может опосредовать дифференцировку регуляторных Т-клеток, индуцируя экспрессию транскрипционного фактора FOXP3, участвующего в иммунной регуляции хозяина [10]. Более того, более высокие уровни бутирата в основном оказывают противовоспалительное действие, регулируя иммунную толерантность хозяина к микробиоте кишечника [11]. Обширные предыдущие исследования помогли нам углубить понимание кишечной микробиоты и ее важной роли во многих биологических процессах. Однако роль кишечной микробиоты при диарее поросят и лежащие в ее основе механизмы до сих пор не ясны.

Целью данной работы явился анализ генов ферментов метаболических путей в кишечнике новорожденных поросят при диарее. Полученные результаты могут дать новое представление о разработке новых средств профилактики и терапии желудочно-кишечной патологии у поросят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЕ

В одном из крупных свиноводческих хозяйств Воронежской области для исследования было отобрано 15 поросят 2—5-дневного возраста. В контрольную группу вошли ($n = 7$) здоровых поросят, в группу наблюдения — ($n = 8$) поросят с желудочно-кишечными заболеваниями. Животных содержали в помещении при температуре 30 ± 2 °C и влажности 55 ± 7 %. При визуальном осмотре больных поросят были установлены следующие клинические признаки: шаткая походка, жидкий стул, зловонный запах фекалий, загрязненность животных каловыми массам. При микроскопии кала возбудителей паразитарных заболеваний не выявлено. Поросята получали материнское молоко от свиноматок. Средняя масса поросят в здоровой группе составила $1,5 \pm 0,45$ кг, в больной группе —

$1,0 \pm 0,38$ кг. Для исследования у поросят собирали фекалии в количестве 10 ± 3 г, помещали в микроцентрифужную пробирку и отправляли в лабораторию при соответствующих температурных условиях для дальнейшего исследования.

Выделение ДНК из полученных образцов кала проводили с использованием коммерческого набора HiPure DNA Micro Kit (Magen, Гуанчжоу, Китай), в соответствии с инструкцией. Далее проводили подготовку библиотек секвенирования для платформы DNB-SEQ-G50 (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Для подготовки библиотек сперва фрагментировали ДНК с использованием набора MGIEasy Fast FS Library Prep Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай) с последующей очисткой магнитными частицами MGIEasy DNA Clean Beads (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Затем лигировали адаптеры с комплектом адаптеров A для праймеров MGIEasy UDB (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Качество полученной библиотеки оценивали с использованием Qubit и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США).

Далее в соответствии с рекомендациями производителя проводили циркуляризацию одной нити ДНК, с использованием модуля MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Затем готовые библиотеки смешивали в эквимолярных количествах и приступали непосредственно к их секвенированию на проточной ячейке. Качество необработанных метагеномных данных оценивали с помощью инструмента FastQC. Технические последовательности и базы низкого качества ($Q < 20$) были обрезаны.

Для профилирования состава микробных сообществ до вида использовали MetaPhlAn 4.0.

Для исследования метаболических путей использовали инструмент HUMAnN3, который функционально профилирует гены, пути и модули из полученных метагеномов. Одним из основных преимуществ HUMAnN3 по сравнению с другими системами функционального профилирования является их способность стратифицировать функциональные профили сообщества в соответствии с вносящими вклад видами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате биоинформатического анализа полученных данных секвенирования было идентифицировано 270 видов бактерий. Виды, численность которых составляла менее 1 % для одной из групп исследования были объединены в группу «Другие». На рисунке 1 представлены наиболее распространенные виды бактерий.

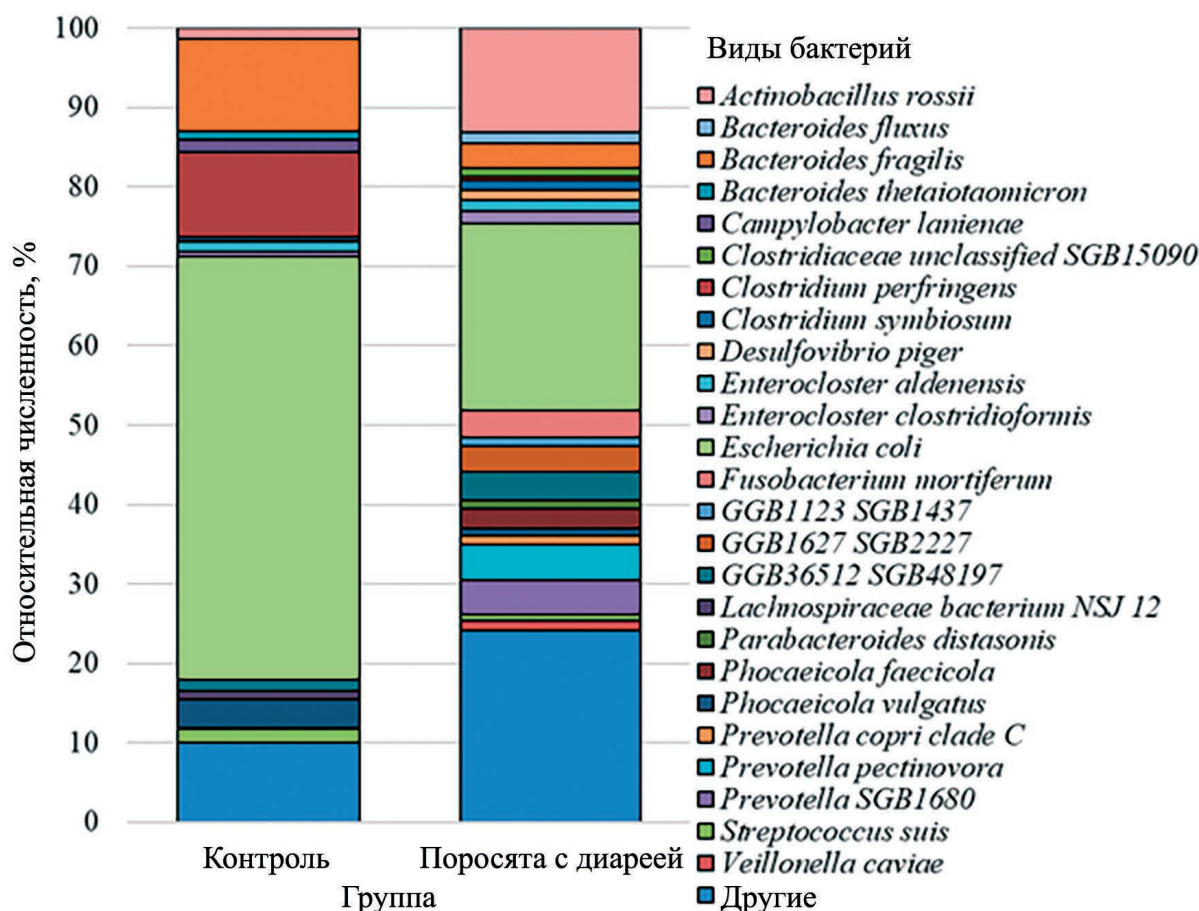


Рис. 1. Наиболее распространенные бактерии, обнаруженные в фекалиях здоровых поросят и поросят, страдающих диареей

E. coli была доминирующим бактериальным видом для обеих групп. В группе здоровых поросят относительная численность *E. coli* составляла 53,30 %, а в группе поросят, страдающих диареей — 23,55 %.

E. coli является нормальным обитателем кишечного тракта животных, однако ее специфические штаммы не редко являются важной причиной заболеваемости и смертности молодняка сельскохозяйственных животных. Колибациллярная диарея обычно возникает у свиней в возрасте до недели и связана с относительно небольшим количеством энтеропатогенных гемолитических серотипов *E. coli*. Значительный интерес был проявлен как к эпидемиологии, так и к факторам вирулентности этих патогенов [12]. Однако имеется относительно мало информации о «нормальной» фекальной флоре *E. coli* здоровых молодых поросят [13]. В нашем исследовании мы наблюдали присутствие данной бактерии как в группе здоровых поросят, так и поросят с диареей, кроме того, относительная численность кишечной палочки у здоровых поросят была выше.

В совокупности с полученными данными дисперсного анализа, можно говорить о том, что в нашем случае диарея у новорожденных поросят не была ассоциирована с *E. coli*.

Также было обнаружено три неидентифицированных бактериальных вида, относящихся к типу Bacteroidetes.

Дифференциальный анализ численности, произведенный с помощью MAaslin2, который базируется на использовании метода линейного моделирования с применением метода Беньямини-Хохберга, не выявил статистически значимых различий в таксономическом составе между исследуемыми группами.

В результате проведенного анализа генов метаболизма мы выявили 425 идентифицированных и интегрированных метаболических путей, которые характерны для исследуемого микробиомного сообщества фекалий новорожденных поросят. В группе здоровых поросят их число составило 394, в то время как в группе поросят с диареей насчитывалось 404 метаболических пути. Для обеих групп

наиболее обогащенным был путь созревания пептидогликана (содержащего мезо-диаминопимелат). На рисунке 2 представлен график дифференциальной распространенности пути с сортировкой по группам и логарифмическим масштабированием.

Из схемы видно, что основной вклад в этот метаболический путь вносят бактерии *E. coli*, которые

доминировали в обеих группах исследования. Для некоторых образцов из группы поросят с диареей наибольшее влияние на обогащение этого метаболического пути вносили бактерии *Actinobacillus rossii*, *Flavonifractor plautii* и *Bacteroides fluxus*, а также не идентифицированные бактериальные виды.

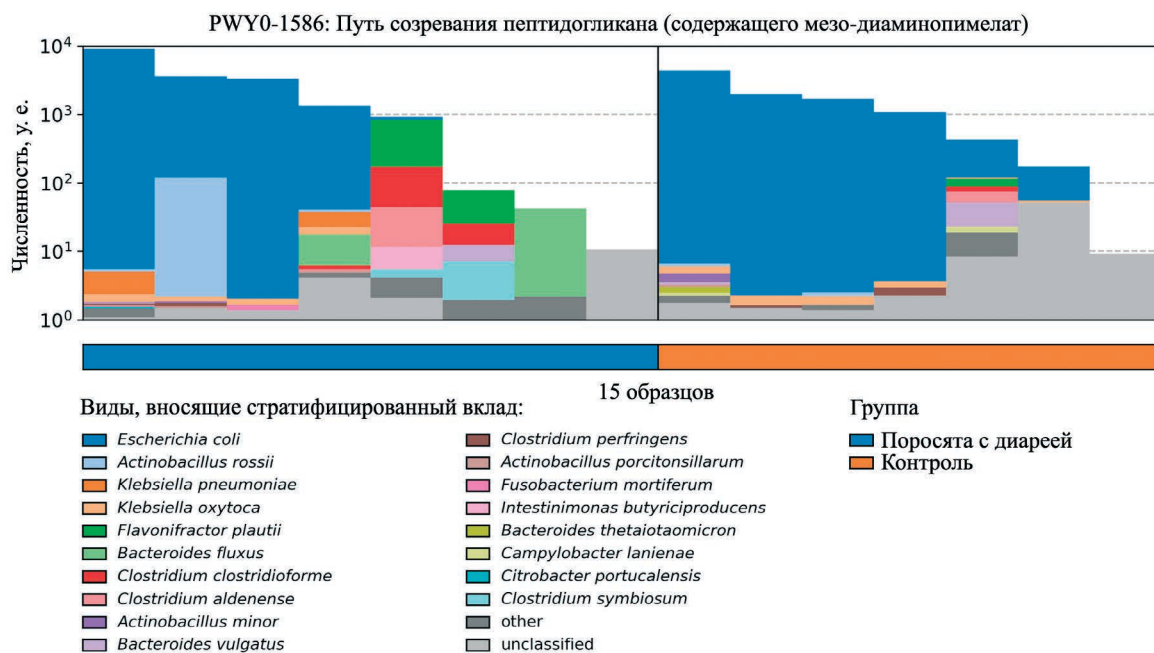


Рис. 2. Дифференциальная распространенность пути созревания пептидогликана в исследуемых группах

Кроме того, мы выявили дифференциальные различия между группами в представленности генов пути биосинтеза биотина II (PWY-5005), который был статистически значимо сильнее обогащен в группе поросят с диареей ($10,96 \pm 5,18$ копий на миллион) и отсутствовал у здоровых поросят (p -value = 0,03). Биотин является важным витамином и кофактором в нескольких метаболических путях, а его дефицит связан с заболеваниями, включая воспалительные заболевания кишечника и повышенную проницаемость эпителия кишечника [14—16].

В целом результаты исследований показывают, что нарушение микробиома, приводят к созданию благоприятных условий для микробов, способных синтезировать биотин, который может способствовать воспалению кишечника [17, 18].

Также в результате перегруппировки семейства генов UniRef в функции RXN и присвоения имен мы получили всего 3427 ферментов. Из этого большого разнообразия путем дифференциального анализа численности выявили шесть генов ферментов,

представленность которых статистически отличалась между группами (см. рис. 3).

Так мы видим, что гены ферментов нитрогеназы и S-метил-5'-тиоаденозиндезаминазы, которая играет решающую роль в выработке аутоиндукторов и метаболизме метионина [19], отсутствовали в группе здоровых поросят, а представленность остальных идентифицированных генов ферментов, относящихся к классам трансфераз и изомераз, была значительно выше в группе поросят с диареей.

Долихилфосфатманнозо-белковая маннозилтрансфераза — один из ключевых компонентов биосинтеза O-гликанов маннозного типа, известно, что данный фермент ранее был ассоциирован с различными типами мышечных дистрофий [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование было направлено не только на определение фекального микробиома новорожденных поросят с диареей, но и на выявление метаболических отличий у больных животных, по

сравнению со здоровыми. Данная работа не выявила бактерий, которые могли бы быть характерны для исследуемой патологии. Это может указывать на необходимость дальнейших исследований связи микробиомных аббераций с постнатальной диареей свиней, возможно вклад микробиомных нарушений в данную патологию переоценен. Кроме того, были выявлены особенности в межфункциональном взаимодействии представителей фекальной микробиоты. Эти отличия были связаны с преобладанием в группе поросят больных диареей генов фермен-

тов классов трансфераз, изомераз, оксидоредуктаз и гидролаз. Также в группе поросят с диареей были обнаружены гены ферментов метаболического пути, ответственных за биосинтез биотина, который отсутствовал у здоровых поросят. Таким образом, путь биосинтеза биотина II был идентифицирован как важный путь, связанный с диареей. Эти результаты могут дать теоретическую основу для разработки профилактики и терапии желудочно-кишечной патологии поросят, а также вносят вклад в понимание метаболических механизмов при диарее.

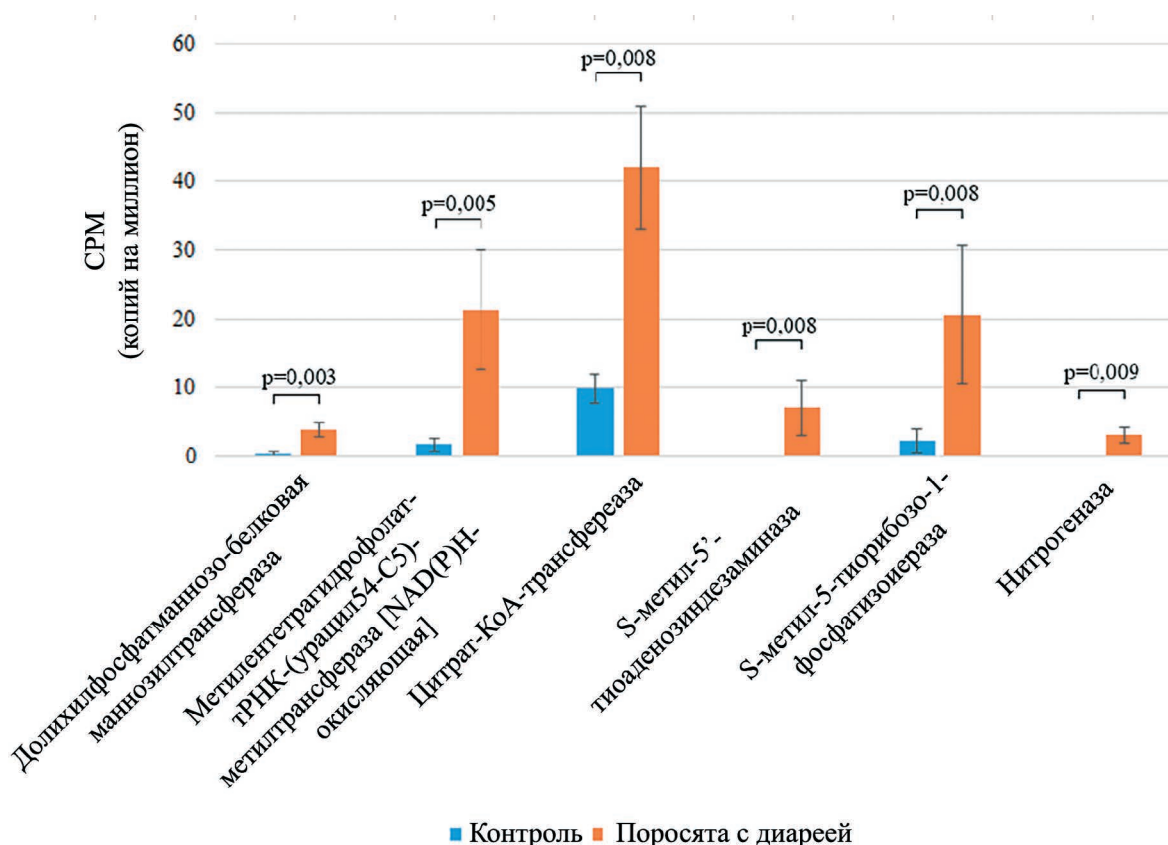


Рис. 3. Гены ферментов, представленность которых отличается у поросят с диареей и здоровой группы

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *VanderWaal K.* Global trends in infectious diseases of swine / K. VanderWaal, J. Deen // Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences, — 2018. — Vol. 115, № 45. — P. 11495—11500. doi: 10.1073/pnas.1806068115.
2. *Hooper L. V.* Interactions between the microbiota and the immune system / L. V. Hooper, D. R. Littman, A. J. Macpherson // Science. — 2012. — Vol. 336, № 6086. — P. 1268—1273. doi: 10.1126/science.1223490.
3. *Yang Q.* Structure and Function of the Fecal Microbiota in Diarrheic Neonatal Piglets / Q. Yang, X. Huang, S. Zhao, W. Sun, Z. Yan [et al.] // Front Microbiol. — 2017. — Vol. 8. — P. 502. doi: 10.3389/fmicb.2017.00502.
4. *Magoč T.* FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies / T. Magoč, S. L. Salzberg // Bioinformatics. — 2011. — Vol. 27, № 21. — P. 2957—2963. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507.
5. *Looft T.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome / T. Looft, T. A. Johnson, H. K. Allen, D. O. Bayles, D. P. Alt [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2012. — Vol. 109, № 5. — P. 1691—1696. doi: 10.1073/pnas.1120238109.
6. *Zheng X.* Fecal Microbial Structure and Metabolic Profile in Post-Weaning Diarrheic Piglets / X. Zheng, K. Nie, Y. Xu, H. Zhang, F. Xie [et al.] // Genes (Basel). — 2023. — Vol. 14, № 6. — P. 1166. doi: 10.3390/genes14061166.

7. Baidoo E. E.K. Microbial Metabolomics: A General Overview / E.E.K. Baidoo // *Methods Mol Biol.* — 2019. — Vol. 1859. — P. 1—8. doi: 10.1007/978—1—4939—8757—3_1.
8. Sugiharto S. Plasma metabolomic profiles and immune responses of piglets after weaning and challenge with *E. coli* / S. Sugiharto, M. S. Hedemann, C. Lauridsen // *J Anim Sci Biotechnol.* — 2014. — Vol. 5, № 1. — P. 17. doi: 10.1186/2049—1891—5—17.
9. Wu H. Jejunal Metabolic Responses to *Escherichia coli* Infection in Piglets / H. Wu, J. Liu, S. Chen, Y. Zhao, S. Zeng [et al.] // *Front Microbiol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 2465. doi: 10.3389/fmicb.2018.02465.
10. Smith P. M. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis / P. M. Smith, M. R. Howitt, N. Panikov, M. Michaud, C. A. Gallini [et al.] // *Science.* — 2013. — Vol. 341, № 6145. — P. 569—573. doi: 10.1126/science.1241165.
11. Chang P. V. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition / P. V. Chang, L. Hao, S. Offermanns, R. Medzhitov // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2014. — Vol. 111, № 6. — P. 2247—2252. doi: 10.1073/pnas.1322269111.
12. Jacobson M. On the Infectious Causes of Neonatal Piglet Diarrhoea-A Review / M. Jacobson // *Vet Sci.* — 2022. — Vol. 9, № 8. — P. 422. doi: 10.3390/vetsci9080422.
13. Hinton M. The ecology of *Escherichia coli* in healthy newborn piglets / M. Hinton, A. H. Linton // *Br Vet J.* — 1987. — Vol. 143, № 6. — P. 541—548. doi: 10.1016/0007—1935(87)90044—3.
14. Elahi A. Biotin Deficiency Induces Th1- and Th17-Mediated Proinflammatory Responses in Human CD4 + T Lymphocytes via Activation of the mTOR Signaling Pathway / A. Elahi, S. Sabui, N. N. Narasappa, S. Agrawal, N. W. Lambrecht [et al.] // *J Immunol.* — 2018. — Vol. 200, № 8. — P. 2563—2570. doi: 10.4049/jimmunol.1701200.
15. Kuroishi T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin / T. Kuroishi // *Can J Physiol Pharmacol.* — 2015. — Vol. 93, № 12. — P. 1091—1096. doi: 10.1139/cjpp-2014—0460.
16. Yoshii K. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity / K. Yoshii, K. Hosomi, K. Sawane, J. Kunisawa // *Front Nutr.* — 2019. — Vol. 6. — P. 48. doi: 10.3389/fnut.2019.00048.
17. Fernandez-Banares F. Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease / F. Fernandez-Banares, A. Abad-Lacruz, X. Xiol, J. J. Gine, C. Dolz [et al.] // *Am J Gastroenterol.* — 1989. — Vol. 84, № 7. — P. 744—748.
18. Yang J. C. Biotin Deficiency Induces Intestinal Dysbiosis Associated with an Inflammatory Bowel Disease-like Phenotype / J. C. Yang, J. P. Jacobs, M. Hwang, S. Sabui, F. Liang [et al.] // *Nutrients.* — 2023. — Vol. 15, № 2. — P. 264. doi: 10.3390/nu15020264.
19. Gao Q. Substrate preference of 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase in *Burkholderia thailandensis* / Q. Gao, D. Zheng, Z. Yuan // *FEMS Microbiol Lett.* — 2013. — Vol. 339, № 2. — P. 110—116. doi: 10.1111/1574—6968.12059.
20. Willer T. ISPD loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome / T. Willer, H. Lee, M. Lommel, T. Yoshida-Moriguchi, D.B de Bernabe [et al.] // *Nat Genet.* — 2012. — Vol. 44, № 5. — P. 575—580. doi: 10.1038/ng.2252.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

М. В. Грязнова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий

Ю. Д. Смирнова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

И. Ю. Буракова — аспирант кафедры биохимии и биотехнологии, младший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки, ВГУ, младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий ВГУИ;

П. Д. Морозова — младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий;

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

М. Ю. Сыромятников — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий; старший научный сотрудник лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики.

Статья поступила в редакцию 20.09.2023 г.

PATHOPHYSIOLOGY, PATHOBIOCHEMISTRY
AND EXPERIMENTAL THERAPY

Original article
UDC 577.29

ANALYSIS OF THE GENES OF ENZYMES OF
METABOLIC PATHWAYS IN THE INTESTINES OF
THE NEWBORN PIGLETS WITH DIARRHEA

Mariya Vladimirovna Gryaznova^{***}, Yuliya Dmitrievna Smirnova^{***},
Inna Yuryevna Burakova^{**,*}, Polina Dmitrievna Morozova^{**,*},
Evgeniy Vladimirovich Mikhaylov^{*}, Mikhail Yuryevich Syromyatnikov^{*,**,*}✉¹

**All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy (ARVRIPP&T), Voronezh, Russia, syromyatnikov@bio.vsu.ru✉*

***Voronezh State University, Voronezh, Russia*

****Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia*

Abstract. The objective of this work was to analyze the genes of enzymes of metabolic pathways in the intestines of the newborn piglets with diarrhea. *E. coli* was the dominant bacterial species for both groups. In the group of healthy piglets, the relative abundance of *E. coli* was 53.30 %, and in the group of the piglets with diarrhea — 23.55 %. As a result of the analysis of the metabolic genes of the intestinal microbiota, 425 identified and integrated enzymes of metabolic pathways were detected. In the group of healthy piglets, their number was 394, while in the group of the piglets with diarrhea, there were 404 metabolic pathway enzymes. For both groups, the peptidoglycan maturation pathway was the most enriched. The main contributor to this metabolic pathway is the bacteria *E. coli*. Differential gradients between groups were identified in the representation of genes for the biotin II biosynthesis pathway, which was statistically significantly more enriched in the group of the piglets with diarrhea (10.96 ± 5.18 copies per million) and was absent in healthy piglets (p -value = 0.03). Biotin is an essential vitamin and cofactor in several metabolic pathways, and the deficiency is associated with diseases including inflammatory bowel disease and increased intestinal permeability. Overall, the research suggests that disrupting the microbiome creates favorable conditions for microbes that can synthesize biotin, which can contribute to intestinal inflammation.

Keywords: piglets, diarrhea, microbiome, metabolism, high-throughput sequencing

In case of gastrointestinal diseases (both infectious and non-infectious etiology), diarrhea is almost always an integral symptom, which causes growth restriction and even death of piglets, which leads to large losses in pig breeding. Almost 49 % of deaths in the newborns and young piglets are caused by diarrhea [1].

Diarrhea in piglets is usually associated with various factors, which mainly include genetic background [2] and environmental factors [3,4]. Recently, numerous studies indicate a decrease in the content of *Lactobacillus* bacteria and a loss of microbial diversity during diarrhea, while *Clostridium spp.*, *Prevotella spp.* and *Escherichia coli* had a positive effect on the condition of piglets [5, 6], indicating

that intestinal microbiota may be a major cause of diarrhea.

Meanwhile, the complex microbiota-microbiota and microbiota-host interactions can release various metabolites, which constitute the basic environment of the gastrointestinal tract and affect the health of the host. Metabolites exhibit the most rapid response to environmental changes and play an important role in the response of a biological system to abiotic or other interference, thereby linking genotype to phenotype [7]. Sugiharto et al. [8] observed higher levels of proline, taurine and carnitine in the plasma of piglets after infection with *E. coli*, whereas betaine, creatine and L-arginine were lower, compared to the control group.

© Gryaznova M. V., Smirnova Yu. D., Burakova I. Yu., Morozova P. D., Mikhaylov E. V., Syromyatnikov M. Yu., 2023

Wu et al. [9] demonstrated that the piglets with diarrhea had higher concentrations of 4-aminobutyric acid and glycine in the jejunum, caused by *E. coli* diarrhea.

Recently, several studies have shown that butyrate, produced mainly by the intestinal microbiota, can mediate the differentiation of regulatory T cells by inducing the expression of the transcription factor FOXP3, involved in host immune regulation [10]. Moreover, higher levels of butyrate mainly exert anti-inflammatory effects by regulating host immune tolerance to the intestinal microbiota [11]. Previous extensive researches have helped us increase our understanding of the intestinal microbiota and its important role in many biological processes. However, the role of intestinal microbiota in case of piglet diarrhea and the underlying mechanisms are still unclear.

The objective of this work was to analyze the genes of enzymes of metabolic pathways in the intestines of the newborn piglets with diarrhea. The results obtained can provide new insight into the development of new means of prevention and treatment of gastrointestinal pathology in piglets.

MATERIAL AND METHODS

At one of the large pig breeding farms in Voronezh region, 15 piglets at the age of 2—5 days were selected for the study. The control group included ($n = 7$) healthy piglets, the observation group included ($n = 8$) the piglets with gastrointestinal diseases. The animals were kept in a room at a temperature of 30 ± 2 °C and a humidity of 55 ± 7 %. During a visual examination of sick piglets, the following clinical signs were identified: unsteady gait, loose stool, fetid odor of feces, contamination of animals with feces. Microscopy of stool revealed no pathogens of parasitic diseases. The piglets received mother's milk from sows. The average weight of piglets in the group of healthy animals was 1.5 ± 0.45 kg, in the group of sick animals — 1.0 ± 0.38 kg. For the study, 10 ± 3 g of feces were collected from piglets, placed into a microcentrifuge tube and sent to the laboratory under appropriate temperature conditions for further research.

DNA extraction from the obtained stool samples was performed using a commercial HiPure DNA Micro Kit (Magen, Guangzhou, China) according to the instructions. Then, sequencing libraries were prepared for the DNB-SEQ-G50 platform (MGI, Shenzhen, China). To prepare the libraries, DNA was first fragmented using the MGIEasy Fast FS Library Prep Module kit (MGI, Shenzhen, China), followed by magnetic purification with MGIEasy DNA Clean Beads (MGI, Shenzhen, China). The adapters were then ligat-

ed with MGIEasy UDB Primer Adapter Kit A (MGI, Shenzhen, China). The quality of the resulting library was assessed using Qubit and the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

Then, in accordance with the manufacturer's recommendations, single strand DNA was circularized using the MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Shenzhen, China). Then the finished libraries were mixed in equimolar quantities and they proceeded directly to their sequencing on a flow cell. The quality of raw metagenomic data was assessed using the FastQC tool. Technical sequences and low quality databases ($Q < 20$) were trimmed.

MetaPhlan 4.0 was used to profile the composition of microbial communities to species level.

To investigate metabolic pathways, we used the HUMAnN3 tool, which functionally profiles genes, pathways and modules from the obtained metagenomes. One of the main advantages of HUMAnN3 over other functional profiling systems is their ability to stratify community functional profiles according to contributing species.

STUDY RESULTS

As a result of bioinformatics analysis of the obtained sequencing data, 270 species of bacteria were identified. Species the abundance of which was less than 1 % for one of the study groups were combined into the group "Others". Fig. 1 shows the most common types of bacteria.

E. coli was the dominant bacterial species for both groups. In the group of healthy piglets, the relative abundance of *E. coli* was 53.30 %, and in the group of piglets suffering from diarrhea — 23.55 %.

E. coli is a normal inhabitant of the intestinal tract of animals, but its specific strains are often an important cause of morbidity and mortality in young farm animals. Colibacillary diarrhea usually occurs in piglets less than a week old and is associated with a relatively small number of enteropathogenic hemolytic serotypes of *E. coli*. Considerable interest has been shown in both the epidemiology and virulence factors of these pathogens [12]. However, relatively little information is available on the "normal" fecal *E. coli* flora of healthy young piglets [13]. In our study, we observed the presence of this bacterium in both the group of healthy piglets and the piglets with diarrhea, in addition, the relative abundance of *E. coli* in healthy piglets was higher. Taken together with the data obtained from the analysis of variance, we can say that in our case, diarrhea in the newborn piglets was not associated with *E. coli*.

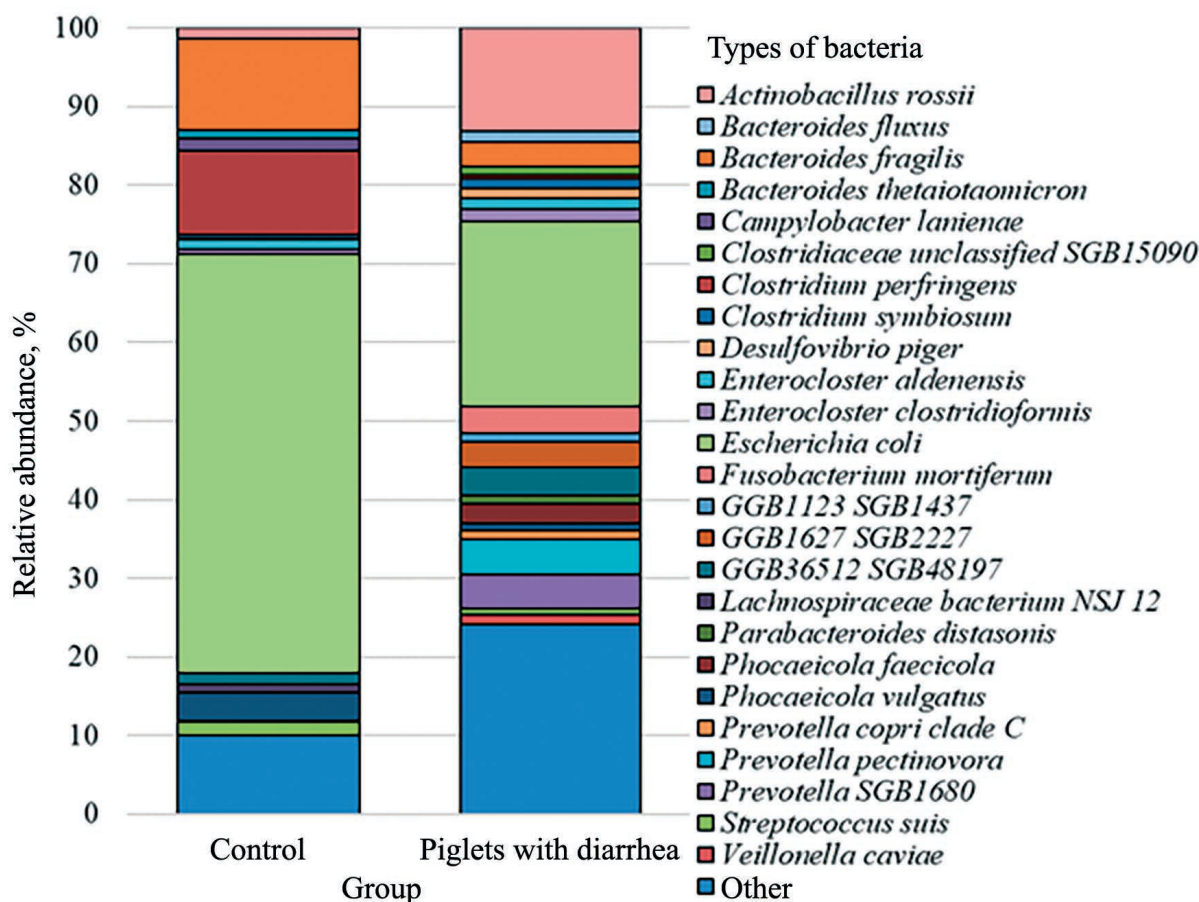


Fig. 1. The most common bacteria found in the feces of healthy piglets and the piglets with diarrhea

Three unidentified bacterial species belonging to the phylum Bacteroidetes were also discovered.

Differential abundance analysis performed using MAAslin2, which is based on linear modeling using the Benjamin-Hochberg method, did not reveal statistically significant differences in taxonomic composition between the studied groups.

As a result of the analysis of metabolic genes, we detected 425 identified and integrated metabolic pathways that are typical of the studied microbiome community of feces of the newborn piglets. In the group of healthy piglets, their number was 394, while in the group of the piglets with diarrhea there were 404 metabolic pathways. For both groups, the most enriched pathway was the peptidoglycan maturation pathway (containing meso-diaminopimelate). Fig. 2 shows a graph of differential path abundance sorted by group and logarithmically scaled.

The diagram shows that the main contribution to this metabolic pathway is made by *E. coli* bacteria, which dominated in both groups of the study. For some samples from the group of the piglets with diarrhea, the bacteria *Actinobacillus rossii*, *Flavonifractor*

plautii and *Bacteroides fluxus*, as well as unidentified bacterial species, contributed most to the enrichment of this metabolic pathway.

In addition, we identified differential gradients between groups in the representation of genes for the biotin II biosynthesis pathway (PWY-5005), which was statistically significantly more enriched in the group of the piglets with diarrhea (10.96 ± 5.18 copies per million) and was absent in healthy piglets (p -value = 0.03). Biotin is an essential vitamin and cofactor in several metabolic pathways, and its deficiency is associated with diseases including inflammatory bowel disease and increased intestinal epithelial permeability [14–16]. In general, research results show that disruption of the microbiome leads to the creation of favorable conditions for microbes capable of synthesizing biotin, which can contribute to intestinal inflammation [17, 18].

By rearranging the gene family UniRef into RXN functions and naming, we also obtained a total of 3427 enzymes. From this large diversity, differential abundance analysis identified six enzyme genes, the representation of which was statistically different between groups (see Fig. 3).

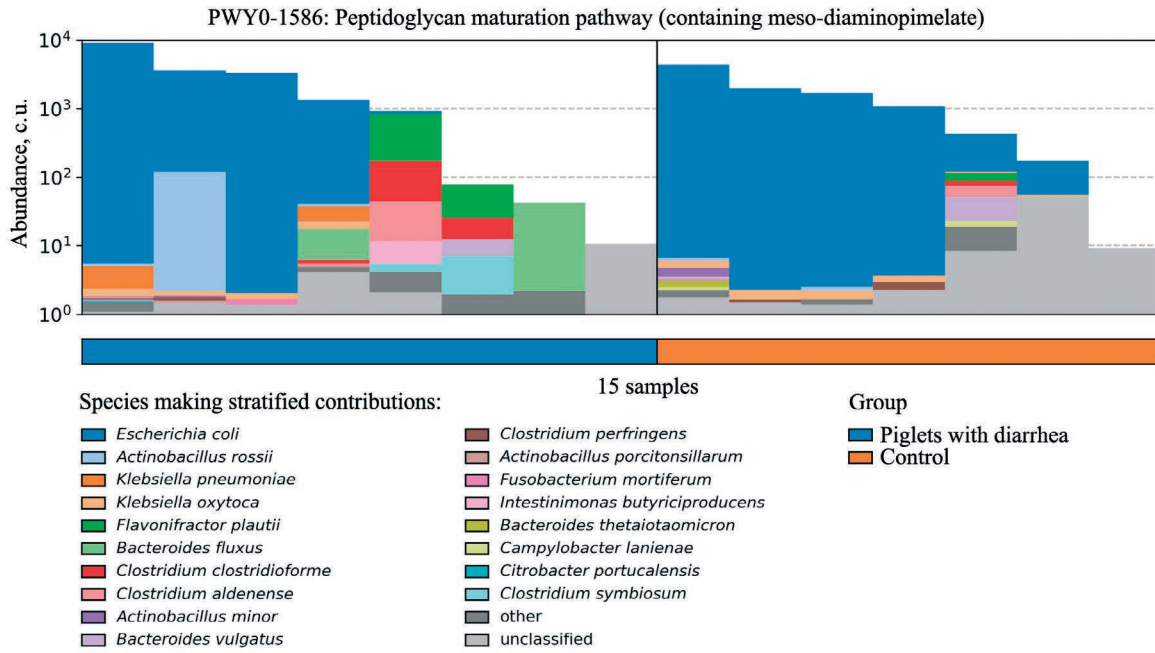


Fig. 2. Differential prevalence of the peptidoglycan maturation pathway in the study groups

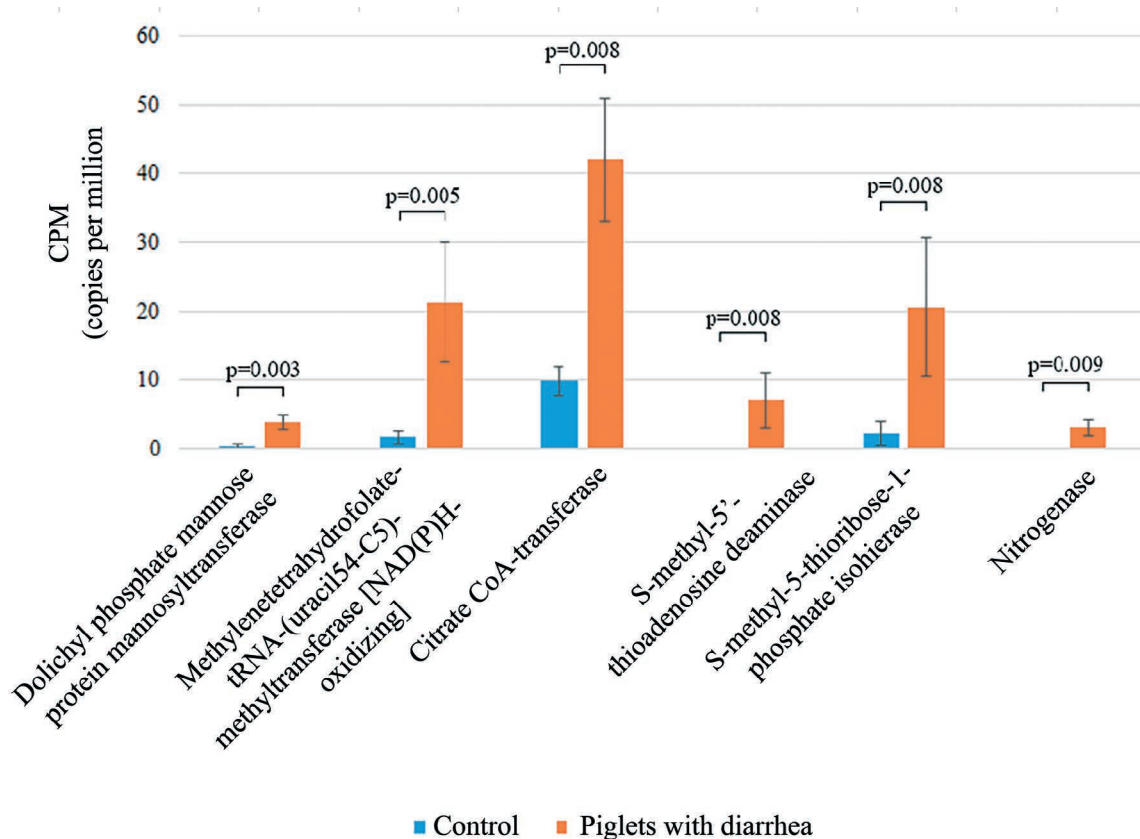


Fig. 3. Genes of enzymes, the representation of which differs in the piglets with diarrhea and in the healthy group

Thus, we see that the genes for the enzymes of nitrogenase and S-methyl-5'-thioadenosine deaminase, which plays a decisive role in the production of auto-

inducers and methionine metabolism [19], were absent in the group of healthy piglets, and the representation of the remaining identified enzyme genes belonging to

the classes of transferases and isomerase was significantly higher in the group of the piglets with diarrhea.

Dolichylphosphate mannose-protein mannosyltransferase is one of the key components of the biosynthesis of mannose-type O-glycans. It is known that this enzyme was previously associated with various types of muscular dystrophies [20].

CONCLUSION

This study was aimed not only at determining the fecal microbiome of the newborn piglets with diarrhea, but also at identifying metabolic differences in sick animals, compared to healthy ones. This work did not identify bacteria that could be typical of the pathology under study. This may indicate the need for further research into the relationship between microbiome aberrations and postnatal diarrhea in pigs; perhaps the contribution of microbiome disturbances to this pathology is overestimated. In addition, features were identified in the cross-functional interaction of representatives of the fecal microbiota. These differences were associated with the predominance of the genes for enzymes of the classes of transferases, isomerases, oxidoreductases and hydrolases in the group of the piglets with diarrhea. In the group of the piglets with diarrhea, the genes for metabolic pathway enzymes responsible for the biosynthesis of biotin, which was absent in healthy piglets, were also found. Thus, the biotin II biosynthetic pathway was identified as an important pathway associated with diarrhea. These results may provide a theoretical basis for the development of prevention and treatment of gastrointestinal pathology in piglets, and also contribute to the understanding of the metabolic mechanisms of diarrhea.

REFERENCES

1. *VanderWaal K.* Global trends in infectious diseases of swine / K. VanderWaal, J. Deen // Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences, — 2018. — Vol. 115, No. 45. — P. 11495—11500. doi: 10.1073/pnas.1806068115.
2. *Hooper L. V.* Interactions between the microbiota and the immune system / L. V. Hooper, D. R. Littman, A. J. Macpherson // Science. — 2012. — Vol. 336, No. 6086. — P. 1268—1273. doi: 10.1126/science.1223490.
3. *Yang Q.* Structure and Function of the Fecal Microbiota in Diarrheic Neonatal Piglets / Q. Yang, X. Huang, S. Zhao, W. Sun, Z. Yan [et al.] // Front Microbiol. — 2017. — Vol. 8. — P. 502. doi: 10.3389/fmicb.2017.00502.
4. *Magoč T.* FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies / T. Magoč, S. L. Salzberg // Bioinformatics. — 2011. — Vol. 27, No. 21. — P. 2957—2963. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507.
5. *Looft T.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome / T. Looft, T. A. Johnson, H. K. Allen, D. O. Bayles, D. P. Alt [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2012. — Vol. 109, No. 5. — P. 1691—1696. doi: 10.1073/pnas.1120238109.
6. *Zheng X.* Fecal Microbial Structure and Metabolic Profile in Post-Weaning Diarrheic Piglets / X. Zheng, K. Nie, Y. Xu, H. Zhang, F. Xie [et al.] // Genes (Basel). — 2023. — Vol. 14, No. 6. — P. 1166. doi: 10.3390/genes14061166.
7. *Baidoo E. E.K.* Microbial Metabolomics: A General Overview / E.E.K. Baidoo // Methods Mol Biol. — 2019. — Vol. 1859. — P. 1—8. doi: 10.1007/978-1-4939-8757-3_1.
8. *Sugiharto S.* Plasma metabolomic profiles and immune responses of piglets after weaning and challenge with *E. coli* / S. Sugiharto, M. S. Hedemann, C. Lauridsen // J Anim Sci Biotechnol. — 2014. — Vol. 5, No. 1. — P. 17. doi: 10.1186/2049—1891—5—17.
9. *Wu H.* Jejunal Metabolic Responses to *Escherichia coli* Infection in Piglets / H. Wu, J. Liu, S. Chen, Y. Zhao, S. Zeng [et al.] // Front Microbiol. — 2018. — Vol. 9. — P. 2465. doi: 10.3389/fmicb.2018.02465.
10. *Smith P. M.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis / P. M. Smith, M. R. Howitt, N. Panikov, M. Michaud, C. A. Gallini [et al.] // Science. — 2013. — Vol. 341, No. 6145. — P. 569—573. doi: 10.1126/science.1241165.
11. *Chang P. V.* The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition / P. V. Chang, L. Hao, S. Offermanns, R. Medzhitov // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2014. — Vol. 111, No. 6. — P. 2247—2252. doi: 10.1073/pnas.1322269111.
12. *Jacobson M.* On the Infectious Causes of Neonatal Piglet Diarrhoea-A Review / M. Jacobson // Vet Sci. — 2022. — Vol. 9, No. 8. — P. 422. doi: 10.3390/vetsci9080422.
13. *Hinton M.* The ecology of *Escherichia coli* in healthy newborn piglets / M. Hinton, A. H. Linton // Br Vet J. — 1987. — Vol. 143, No. 6. — P. 541—548. doi: 10.1016/0007—1935(87)90044—3.
14. *Elahi A.* Biotin Deficiency Induces Th1- and Th17-Mediated Proinflammatory Responses in Human CD4 + T Lymphocytes via Activation of the mTOR Signaling Pathway / A. Elahi, S. Sabui, N. N. Narasappa, S. Agrawal, N. W. Lambrecht [et al.] // J Immunol. — 2018. — Vol. 200, No. 8. — P. 2563—2570. doi: 10.4049/jimmunol.1701200.
15. *Kuroishi T.* Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin / T. Kuroishi // Can J Physiol Pharmacol. — 2015. — Vol. 93, No. 12. — P. 1091—1096. doi: 10.1139/cjpp-2014—0460.
16. *Yoshii K.* Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity / K. Yoshii, K. Hosomi, K. Sawane, J. Kunisawa // Front Nutr. — 2019. — Vol. 6. — P. 48. doi: 10.3389/fnut.2019.00048.

17. *Fernandez-Banares F.* Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease / F. Fernandez-Banares, A. Abad-Lacruz, X. Xiol, J. J. Gine, C. Dolz [et al.] // *Am J Gastroenterol.* — 1989. — Vol. 84, No. 7. — P. 744—748.

18. *Yang J. C.* Biotin Deficiency Induces Intestinal Dysbiosis Associated with an Inflammatory Bowel Disease-like Phenotype / J. C. Yang, J. P. Jacobs, M. Hwang, S. Sabui, F. Liang [et al.] // *Nutrients.* — 2023. — Vol. 15, No. 2. — P. 264. doi: 10.3390/nu15020264.

19. *Gao Q.* Substrate preference of 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase in *Burkholderia thailandensis* / Q. Gao, D. Zheng, Z. Yuan // *FEMS Microbiol Lett.* — 2013. — Vol. 339, No. 2. — P. 110—116. doi: 10.1111/1574—6968.12059.

20. *Willer T.* ISPD loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome / T. Willer, H. Lee, M. Lommel, T. Yoshida-Moriguchi, D.B de Bernabe [et al.] // *Nat Genet.* — 2012. — Vol. 44, No. 5. — P. 575—580. doi: 10.1038/ng.2252.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

M. V. Gryaznova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

Yu. D. Smirnova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

I. Yu. Burakova — Postgraduate Student of the Department of Biochemistry and Biotechnology, Junior Scientific Associate of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

P. D. Morozova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies;

E. V. Mikhaylov — Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics;

M. Yu. Syromyatnikov — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate of the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies; Senior Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics.

The article was submitted 20.09.2023.

Научная статья

УДК 619:[577.12:618.56]:636.4

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.175

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ПОРОСЯТ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ ПОД СВИНОМАТКАМИ, ПЕРЕБОЛЕВШИМИ ПОСЛЕРОДОВЫМИ БОЛЕЗНЯМИ

Алексей Гаврилович Шахов, Лариса Юрьевна Сашнина[✉],
Юлия Юрьевна Владимирова, Кристина Олеговна Акулова,
Галина Васильевна Никоненко¹

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, l.yu.sashnina@mail.ru[✉]*

Аннотация. В статье представлены результаты изучения цитокинового профиля у поросят в подсосный период в промышленном свиноводческом хозяйстве. У поросят, выращиваемых под свиноматками, переболевшими послеродовыми болезнями, по сравнению с поросятами под клинически здоровыми животными в 5-ти дневном возрасте установлено повышенное содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и INF- γ , IL-2, противовоспалительных медиаторов IL-4 и IL-10, суммарной активности эндогенных медиаторов воспаления, цитокинового индекса и отношения IL-4 β /IL-4 и INF- γ /IL-4. Наряду с этим, в 20-ти дневном возрасте отмечено увеличение общего соотношения про- и противовоспалительных цитокинов, отношения IL-1 β /IL-10 и INF- γ /IL-10 при снижении уровня IL-2, IL-4 и IL-10. Полученные данные свидетельствуют о повышенной мобилизации организма и напряженности адаптационных механизмов на 5-е сутки и выраженной системной провоспалительной реакции на 20-е сутки, которая опосредует развитие иммуносупрессии и возникновение болезней различной этиологии.

Ключевые слова: поросята, свиноматки, послеродовые болезни, цитокины

В последние годы большое внимание уделяется изучению цитокинов, осуществляющих взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом, участвующих в регуляции многих иммунологических и физиологических процессов у человека и животных, защите организма от инфекционных патогенов и восстановлении поврежденных тканей [1—4].

Исследованиями Г. Н. Чистяковой и соавт. [5], А. С. Симбирцева [1] показано, что уровень продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками служит важным показателем состояния иммунной системы новорожденных в период адаптации и, являясь ее главными медиаторами, обеспечивают взаимосвязь различных систем организма [6].

Работ, касающихся изучения цитокинового профиля у поросят в ранний постнатальный период, опубликовано мало, при этом результаты исследований зарубежных авторов носят противоречивый характер. К. Nechvatalova [7], S. Elahi [8] исключают наличие в сыворотке крови новорожденных поросят цитокинов, которые передаются им толь-

ко с молозивом и молоком. Напротив, M. Sinkora et al. [9] считают, что уже на 26 день супоросности свиноматок в печени плода обнаруживается IFN- α / β секретирующих клеток, который может представлять ранний механизм противовирусной защиты.

Исследованиями А. Shakhov et al. [2] установлены экспрессия гена цитокина IL-1 α и наличие в сыворотке крови IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , INF- γ у поросят до приема молозива, а в период их выращивания под клинически здоровыми свиноматками уровень указанных медиаторов повышается в связи с поступлением с молозивом (молоком) свиноматок и синтезом клетками собственной иммунной системы.

У больных желудочно-кишечными бактериальными инфекциями поросят-сосунов отмечено увеличение по сравнению с клинически здоровыми животными аналогичного возраста содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и особенно γ -интерферона, а также IL-2 и IL-4, индуцирующих соответственно клеточный и гуморальный иммунитет [10].

© Шахов А. Г., Сашнина Л. Ю., Владимирова Ю. Ю., Акулова К. О., Никоненко Г. В., 2023

Цель исследований — изучение цитокинового профиля у поросят, выращиваемых под свиноматками, переболевшими послеродовыми болезнями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в промышленном свиноводческом хозяйстве на поросятах контрольной группы ($n = 11$) и опытной группы ($n = 11$), выращиваемых под клинически здоровыми и свиноматками, у которых в течение 4—5 суток после родов регистрировали заболевания, проявляющиеся повышением температуры тела до $39,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, угнетением, потерей аппетита, маститом, слизистыми и гнойными выделениями из половых путей.

Проведенное лечение животных с применением метрампага, утеротона и айнила обеспечило их полное клиническое выздоровление. У поросят при удовлетворительном состоянии регистрировали диарею на 2 и 4 сутки после рождения.

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.).

От поросят обеих групп в возрасте 5 и 20 дней проведен забор крови, в сыворотке крови определяли содержание цитокинов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , INF- γ , INF- α методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-си-

стем ЗАО «Вектор-Бест» согласно утвержденным наставлениям к диагностическим наборам.

Оценку цитокинового баланса и направленности иммунного ответа определяли путем подсчета индексов соотношений провоспалительных и противовоспалительных медиаторов: IL-1 β /IL-4; IL-1 β /IL-10; IFN- γ /IL-4; IFN- γ /IL-10, индекса воспалительной активности (ИВА), общего цитокинового индекса (ОЦИ) и индекса, характеризующего соотношение Т-хелперных цитокинов — (ЦИ ThI/ThII) [3, 11].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием прикладных компьютерных программ «Statistica 10.0» (Stat Soft Inc., США) и Microsoft Excel. Оценку достоверности определяли по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

У поросят опытной группы в возрасте 5-ти дней по сравнению с контролем отмечено повышенное содержание провоспалительных цитокинов: IL-1 β , являющегося важнейшим медиатором воспаления, инициирующим развитие и регуляцию неспецифических и специфических механизмов иммунитета [1], на 18,4 %, TNF- α , стимулирующего Т- и В-лимфоциты, регулирующего интенсивность воспаления и усиливающего фагоцитарную активность моноцитов [2], на 8,9 %, и INF- γ , активирующего клеточные механизмы защиты и ингибирующего гуморальные факторы иммунного ответа [3], на 19,5 % (табл. 1).

Таблица 1

Содержание цитокинов у поросят

Показатели	Поросята 5-дневного возраста, выращиваемые под свиноматками		Поросята 20-дневного возраста, выращиваемые под свиноматками	
	здоровыми	переболевшими	здоровыми	переболевшими
IL-1 β , пг/мл	4,73 \pm 0,2	5,65 \pm 0,31*	4,37 \pm 0,23	5,53 \pm 0,36*
IL-2, пг/мл	2,45 \pm 0,07	2,75 \pm 0,12*	2,90 \pm 0,13 ⁺	2,57 \pm 0,06*
IL-4, пг/мл	1,98 \pm 0,09	2,02 \pm 0,17	1,90 \pm 0,19	1,71 \pm 0,09
IL-10, пг/мл	2,78 \pm 0,04	3,3 \pm 0,26	3,41 \pm 0,23 ⁺	3,15 \pm 0,11
TNF- α , пг/мл	6,10 \pm 0,04	6,64 \pm 0,07*	5,56 \pm 0,08 ⁺	5,71 \pm 0,21 ⁺
INF- γ , пг/мл	118,8 \pm 4,87	142,0 \pm 7,95*	136,7 \pm 2,6 ⁺	178,8 \pm 7,34**
INF- α , пг/мл	21,7 \pm 0,33	21,1 \pm 1,83	16,9 \pm 0,18 ⁺	18,0 \pm 0,96 ⁺

* $p < 0,05—0,001$ — по отношению к показателям у поросят, выращиваемых под здоровыми свиноматками

⁺ $p < 0,05—0,001$ — по отношению к показателям предыдущему периоду

У них же регистрировали и повышенный уровень противовоспалительного цитокина IL-10, являющегося антагонистом цитокинов воспаления и индуцирующего гуморальное звено иммунитета [12], на 18,7 %, что обусловлено компенсаторной реакцией, направленной на ингибирование избыточного синтеза провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α .

У животных опытной группы отмечено повышенное содержание IL-2, являющегося индуктором

секреции иммунопотенцирующих лимфо- и монокинов, оказывающего влияния на факторы естественного иммунитета и участвующего в формировании гуморального и клеточно-опосредованного иммунных ответов [1], на 12,2 %.

Суммарная активность эндогенных медиаторов воспаления и индекс, отражающий соотношение цитокинов, продуцируемых Th-1 и Th-2 клетками, у поросят опытной группы были выше на 12,7 и 7,0 % соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Индексы воспалительной активности и отношения про- и противовоспалительных цитокинов

Показатели	Поросята 5-дневного возраста, выращиваемые под свиноматками		Поросята 20-дневного возраста, выращиваемые под свиноматками	
	здоровыми	переболевшими	здоровыми	переболевшими
ИВА	5,5 \pm 0,28	6,2 \pm 0,59	5,3 \pm 0,49	6,6 \pm 0,36*
ОЦИ	33,5 \pm 1,37	34,1 \pm 3,17	31,5 \pm 1,88	43,1 \pm 2,09**
ЦИ Th1/Th2	26,8 \pm 1,29	28,6 \pm 3,08	27,4 \pm 1,82	38,3 \pm 2,03**
IL-1 β /IL-10	1,71 \pm 0,08	1,73 \pm 0,14	1,29 \pm 0,05 ⁺	1,75 \pm 0,06*
IL-1 β /IL-4	2,41 \pm 0,16	2,87 \pm 0,37	2,33 \pm 0,14	3,26 \pm 0,29*
INF γ /IL-10	42,7 \pm 1,64	43,4 \pm 4,63	40,1 \pm 2,99	56,5 \pm 2,99**
INF γ /IL-4	60,4 \pm 4,18	72,3 \pm 7,06	72,3 \pm 4,71	104,8 \pm 8,79**

* $p < 0,05$ —0,001 — по отношению к показателям у поросят, выращиваемых под здоровыми свиноматками

⁺ $p < 0,05$ —0,001 — по отношению к показателям предыдущему периоду

Соотношения IL-1 β /IL-4 и INF- γ /IL-4 у них превышали контрольные значения на 19,1 и 19,7 %, что указывает на активную выработку провоспалительных цитокинов у животных опытной группы, свидетельствующую о напряжении компенсаторно-приспособительных механизмов [3, 11]. Полученные результаты согласуются с клиническим проявлением у них диарейного синдрома в 2—4 суточном возрасте.

В 20-дневном возрасте у поросят, выращиваемых под здоровыми свиноматками, концентрация IL-1 β снизилась на 7,6 %, у животных опытной группы также отмечена тенденция к снижению его содержания, при этом уровень IL-1 β у них был выше на 26,5 % показателя контроля.

Кроме того у поросят опытной и контрольной групп установлено снижение количества TNF- α , являющегося важнейшим медиатором активации иммунных процессов воспалительного характе-

ра, воздействуя на макрофаги, Т- и В-лимфоциты, НК-клетки [4], на 14,0 и 8,9 % и INF- α , проявляющего иммуномодулирующие свойства, повышая активность естественных киллеров, Т-хелперов, фагоцитов, интенсивность дифференцировки В-лимфоцитов [1] на 14,7 и 22,1 %.

При общей тенденции увеличения у поросят обеих групп количества INF- γ , ответственного за индукцию выработки провоспалительных цитокинов [4], на 15,1 и 25,9 % его значение у животных опытной группы превышало на 30,8 %, что свидетельствует о повышении активности лимфоцитов типа ThI. У поросят, выращиваемых под переболевшими свиноматками, отмечено снижение уровня IL-2 на 6,5 % и IL-10 на 4,5 %, в то время как у поросят контрольной группы их количество увеличилось на 18,4 и 22,7 % соответственно.

В этот период у поросят опытной группы установлено снижение содержания IL-4, яв-

ляющегося фактором дифференцировки для Т- и В-лимфоцитов, и индуцирующего гуморальный иммунитет [12], на 15,3 %.

При этом у животных опытной группы содержание IL-2, IL-4 и IL-10 было меньше на 11,4; 10,0 и 7,6 % соответственно по сравнению с аналогичными показателями контроля, что указывает на снижение клеточной и особенно гуморальной защиты и компенсаторных приспособительных механизмов.

Суммарная активность эндогенных медиаторов воспаления и общий цитокиновый индекс у животных опытной группы повысились на 6,4 и 26,5 %, а у поросят контрольной группы отмечена тенденция к их снижению, в результате чего значения ИВА и ОЦИ у поросят, выращиваемых под переболевшими свиноматками, были выше на 24,0 % и 37,0 % соответственно.

Цитокиновый индекс, отражающий соотношение медиаторов, продуцируемых ThI и ThII лимфоцитами, у животных опытной группы увеличился на 33,8 % и был выше на 39,8 %, что свидетельствует о превалировании у них клеточного иммунного ответа.

Существенные изменения у подопытных поросят произошли и в соотношениях отдельных провоспалительных цитокинов к противовоспалительным медиаторам. У поросят опытной группы установлено увеличение IL-1 β /IL-4 на 13,6; INF- γ /IL-10 на 30,2 и INF- γ /IL-4 на 45,0 %, в то время как у животных контрольной группы отмечено снижение IL-1 β /IL-10 на 24,6 %, INF- γ /IL-10 на 6,0 % при повышении INF- γ /IL-4 на 19,8 %.

Вследствие этого у поросят, выращиваемых под переболевшими свиноматками, были выше значения IL-1 β /IL-10 на 35,7 %, IL-1 β /IL-4 на 39,9 %, INF- γ /IL-10 на 41,0 %, INF- γ /IL-4 на 44,9 % относительно контроля.

Анализ полученных результатов выявил наличие иммунного дисбаланса, проявившегося увеличением концентрации INF- γ , основного цитокина, секретируемого ThI лимфоцитами на фоне снижения уровня IL-4, отвечающего за развитие иммунного ответа по ThII пути. Повышенная продукция INF- γ у новорожденных поросят, выращиваемых под переболевшими свиноматками, возможно, является физиологическим защитным ответом и определяет способность к нормальному течению периода новорожденности [12]. Вместе с тем баланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами является важным моментом в регуляции воспалительной реак-

ции и определяет преимущество клеточного или гуморального иммунного ответа [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями у поросят, выращиваемых под переболевшими послеродовыми болезнями свиноматками, по сравнению с приплодом под клинически здоровыми животными на 5-е сутки установлено повышенное содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α , INF- γ , IL-2, противовоспалительных медиаторов IL-4 и IL-10 и увеличение суммарной активности эндогенных медиаторов воспаления, цитокинового индекса и соотношений IL-1 β /IL-4 и INF- γ /IL-4, свидетельствующие о высокой степени напряженности адаптационных механизмов. На 20-е сутки выявлен дисбаланс цитокинов, проявляющийся повышением общего соотношения про- и противовоспалительных цитокинов, индекса Th1/Th2, отношений IL-1 β /IL-10 и INF- γ /IL-10, IL-1 β /IL-4 и INF- γ /IL-4, существенным увеличением содержания INF- γ при снижении уровня IL-2, IL-4 и IL-10, что указывает на превалирование клеточного иммунного ответа над гуморальным.

Выявленные изменения у поросят, выращиваемых под переболевшими послеродовыми болезнями свиноматками, свидетельствуют о более выраженной провоспалительной реакции, которая опосредует развитие иммуносупрессии и возникновение болезней различной этиологии. Полученные результаты обосновывают необходимость применения иммуномодулирующих средств для повышения иммунного статуса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Симбирцев А. С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека / А. С. Симбирцев // СПб. — ООО «Издательство Фолиант». — 2018. — 512 с.
2. Shakhov A. Cytokine pattern in piglets in the early postnatal period / A. Shakhov, L. Sashnina, M. Adodina, E. Mikhaylov, M. Zheyne, K. Kopytina, M. Syromyatnikov // Adv. Anim. Vet. Sci. — 2022. — Т. 10. — № 1. — С. 120—125.
3. Шахов А. Г. Цитокиновый профиль у больных актинобациллезной плевропневмонией поросят и его коррекция ципропигом / А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, Ю. Ю. Владимирова, М. И. Адодина // Международный вестник ветеринарии. — 2021. — № 3. — С. 60—65.
4. Тарасова И. В. «Дирижеры» межклеточных взаимодействий - цитокины. (Окончание. Начало в №№ 1, 2 за 2011 год) / И. В. Тарасова // Аллергология и иммунология в педиатрии. — 2011. — № 3 (26). — С. 36—41.
5. Чистякова Г. Н. Иммунологические аспекты взаимоотношений организмов матери и плода при фи-

зиологически и патологически протекающей беременности // Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2009. — № 4. — С. 59—62.

6. *Жейнес М. Ю.* Иммунный статус и цитокиновый профиль у поросят в ранний постнатальный период и их коррекция: дисс. ... канд. вет. наук. 4.2.3. / М. Ю. Жейнес // Воронеж. — 2022 г., С. 15.

7. *Nechvatalova K.* Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs / K. Nechvatalova, H. Kudlackova, L. Leva, K. Babickova, M. Faldyna // Veterinary immunology and immunopathology. — 2011. — Т. 142. — № 1—2. — С. 95—100.

8. *Elahi S.* Protective role of passively transferred maternal cytokines against Bordetella pertussis infection in newborn piglets / S. Elahi, D. R. Thompson, J. V. Kessel et al. // Infect Immun. — 2017. — Vol. 85. — e01063—16.

9. *Sinkora M.* The ontogeny of the porcine immune system / M. Sinkora, J. E. Butler // Dev. Comp. Immunol. — 2009. — Vol. 33. — P. 273—283.

10. *Шахов А. Г.* Состояние клеточного иммунитета и цитокиновый профиль у поросят при кишечных инфекциях / А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, М. И. Адодина [и др.] // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. — 2019. — Т. 55. — № 4. — С. 146—150.

11. *Карпунина Т. И.* Методические подходы к оценке цитокинового баланса и лейкоцитарной реакции при обтурации желчевыводящих путей различного генеза / Т. И. Карпунина, А. П. Годовалов, Ю. Б. Бусырев // Медицинская иммунология. — 2018. — Т. 20. — № 6. — С. 825—832.

12. *Сашнина Л. Ю.* Роль цитокинов в обеспечении физиологического течения беременности / Л. Ю. Сашнина, А. Г. Шахов, Ю. Ю. Владимирова, Г. В. Никоненко // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2022. — № 3. (20). — С. 144—152.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. Г. Шахов — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии и серологии;

Л. Ю. Сашнина — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии и серологии;

Ю. Ю. Владимирова — кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и серологии;

К. О. Акулова — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и серологии;

Г. В. Никоненко — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и серологии.

Статья поступила в редакцию 08.09.2023 г.

Original article

UDC 619:[577.12:618.56]:636.4

CYTOKINE PROFILE IN THE PIGLETS REARED BY THE SOWS THAT HAVE HAD POSTPARTUM DISEASES

Aleksey Gavrilovich Shakhov, Larisa Yuryevna Sashnina[✉], Yuliya Yuryevna Vladimirova, Kristina Olegovna Akulova, Galina Vasilyevna Nikonenko¹

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russian Federation, l.yu.sashnina@mail.ru[✉]

Abstract. The article presents the results of a study of the cytokine profile in piglets during the suckling period on an industrial pig breeding farm. In the piglets reared under the sows that have had postpartum diseases, compared with the piglets under clinically healthy animals at the age of 5 days, an increased content of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and INF- γ , IL-2, anti-inflammatory mediators IL-4 and IL-10, total activity of endogenous inflammatory mediators, cytokine index and IL-4 β /IL-4 and INF- γ /IL-4 ratio were detected. Along with this, at the of age 20 days there was an increase in the total ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines, the ratio of IL-1 β /IL-10 and INF- γ /IL-10 with a decrease in the level of IL-2, IL-4 and IL-10. The data obtained indicate increased mobilization of the body and tension of adaptation mechanisms on day 5 and a pronounced systemic pro-inflammatory reaction on day 20, which mediates the development of immunosuppression and the occurrence of diseases of various etiologies.

Keywords: piglets, sows, postpartum diseases, cytokines

In recent years, much attention has been paid to the study of cytokines that mediate the relationship between nonspecific protective reactions and specific immunity, participating in the regulation of many immunological and physiological processes in humans and animals, protecting the body from infectious pathogens and restoring damaged tissues [1—4].

The research by G. N. Chistyakova et al. [5], A. S. Simbirtsev [1] showed that the level of cytokine production by immunocompetent cells serves as an important indicator of the immune system state of the newborns during the adaptation period and, being its main mediators, ensure the interconnection of various body systems [6].

Little works have been published on the study of the cytokine profile in piglets in the early postnatal period, and the results of studies by foreign authors are contradictory. K. Nechvatalova [7], S. Elahi [8] exclude the presence of cytokines in the blood serum of newborn piglets, which are transmitted to them only with colostrum and milk. On the contrary, M. Sinkora et al. [9] believe that in sows already on day 26 of gestation, IFN- α/β of secreting cells are detected in the fetal liver, which may represent an early mechanism of antiviral protection.

The research by A. Shakhov et al. [2] established the expression of the IL-1 α cytokine gene and the presence of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , INF- γ in the blood serum in piglets before receiving colostrum, and during their rearing under clinically healthy sows, the level of these mediators increases due to the intake from the colostrum (milk) of sows and synthesis by the cells of their own immune system.

In the suckling piglets with gastrointestinal bacterial infections, in comparison with the clinically healthy animals of the same age, there was noted an increase in the content of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and especially interferon- γ , as well as IL-2 and IL-4, which induce cellular and humoral immunity, respectively [10].

The objective of the research was to study the cytokine profile in the piglets reared under the sows that have had postpartum diseases.

MATERIAL AND METHODS

The studies were conducted on an industrial pig breeding farm on piglets of the control group ($n = 11$) and the experimental group ($n = 11$), reared under clinically healthy sows and the sows, that manifested the diseases by an increase in body temperature up to 39.7 °C after farrowing, depression, loss

© Shakhov A. G., Sashnina L. Yu., Vladimirova Yu. Yu., Akulova K. O., Nikonenko G. V., 2023

of appetite, mastitis, mucous and purulent discharges from the genital tract, which were recorded within 4–5 days.

The treatment of animals with the use of metramag, uteroton and ainil ensured their complete clinical recovery. In piglets with a satisfactory condition, diarrhea was recorded on days 2 and 4 after birth.

The experiment was carried out in accordance with the requirements of current international and Russian legislative acts (Directive 2010/63/EU dtd. September 22, 2010, the European Convention (ETS123), Strasbourg, 1986), as well as the requirements of the bioethics commission of FSBSI “ARVRIPP&T” (protocol No. 1—02/23 dtd. February, 10, 2023).

The blood was taken from piglets of both groups at the age of 5 and 20 days; the content of cytokines in the blood serum was determined: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , INF- γ , INF- α — by enzyme immunoassay analysis using commercial test systems of CJSC “Vektor-Best” in accordance with the approved instructions for diagnostic kits.

The assessment of the cytokine balance and direction of the immune response was determined by calculating indices of the ratios of pro-inflammatory

and anti-inflammatory mediators: IL-1 β /IL-4; IL-1 β /IL-10; IFN- γ /IL-4; IFN- γ /IL-10, index of inflammatory activity (IIA), total cytokine index (TCI) and the index characterizing the ratio of T-helper cytokines (CI ThI/ThII) [3, 11].

The statistical processing of the obtained data was carried out using applied computer programs “Statistica 10.0” (Stat Soft Inc., USA) and Microsoft Excel. The reliability assessment was determined using the Student’s t test.

RESULTS AND DISCUSSION

In the piglets of the experimental group at the age of 5 days, compared with the control, an increased content of pro-inflammatory cytokines was noted: IL-1 β , which is the most important mediator of inflammation, initiating the development and regulation of nonspecific and specific mechanisms of immunity [1] — by 18.4 %, TNF- α , stimulating T- and B-lymphocytes, regulating the intensity of inflammation and enhancing the phagocytic activity of monocytes [2] — by 8.9 %, and INF- γ , activating cellular defense mechanisms and inhibiting humoral factors of the immune response [3] — by 19.5 % (Table 1).

Table 1

Cytokine content in piglets

Indicators	Piglets at the age of 5 days, reared under sows		Piglets at the age of 20 days, reared under sows	
	healthy	have had the disease	healthy	have had the disease
IL-1 β , pg/ml	4.73 \pm 0.2	5.65 \pm 0.31*	4.37 \pm 0.23	5.53 \pm 0.36*
IL-2, pg/ml	2.45 \pm 0.07	2.75 \pm 0.12*	2.90 \pm 0.13 ⁺	2.57 \pm 0.06*
IL-4, pg/ml	1.98 \pm 0.09	2.02 \pm 0.17	1.90 \pm 0.19	1.71 \pm 0.09
IL-10, pg/ml	2.78 \pm 0.04	3.3 \pm 0.26	3.41 \pm 0.23 ⁺	3.15 \pm 0.11
TNF- α , pg/ml	6.10 \pm 0.04	6.64 \pm 0.07*	5.56 \pm 0.08 ⁺	5.71 \pm 0.21 ⁺
INF- γ , pg/ml	118.8 \pm 4.87	142.0 \pm 7.95*	136.7 \pm 2.6 ⁺	178.8 \pm 7.34**
INF- α , pg/ml	21.7 \pm 0.33	21.1 \pm 1.83	16.9 \pm 0.18 ⁺	18.0 \pm 0.96 ⁺

* $p < 0.05$ — 0.001 — in relation to the indicators in the piglets reared under healthy sows

⁺ $p < 0.05$ — 0.001 — in relation to the indicators of the previous period

There was also recorded an increased level of the anti-inflammatory cytokine IL-10, which is an antagonist of inflammatory cytokines and induces humoral immunity [12], by 18.7 %, which is due to a compensatory reaction aimed at inhibiting the excessive synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α .

In the animals of the experimental group, there was an increased content of IL-2 (by 12.2 %), which is an inducer of the secretion of immunopotentiating lympho- and monokines, affecting the factors of natural immunity and participating in the formation of humoral and cell-mediated immune responses [1],

The total activity of endogenous inflammatory mediators and the index reflecting the ratio of cytokines produced by Th-1 and Th-2 cells the piglets of the experimental group were higher by 12.7 and 7.0 %, respectively (Table 2). The ratios of IL-1 β /IL-4 and INF- γ /IL-4 in them exceeded the control values by 19.1 and 19.7 %, which indicated the active production of pro-inflammatory cytokines in the animals of the experimental group, indicating the tension of compensatory and adaptive mechanisms [3, 11]. The results obtained are consistent with the clinical manifestation of diarrhea syndrome in them at the age of 2—4 days.

At the age of 20 days, in the piglets reared under healthy sows, the concentration of IL-1 β decreased by 7.6 %, in the animals of the experimental group, a tendency to a decrease in its content was also noted, while their level of IL-1 β was by 26.5 % higher than the control indicator.

In addition, in the piglets of the experimental and control groups, a decrease in the amount of TNF- α , which is the most important mediator of the activation of inflammatory immune processes, affecting macrophages, T- and B-lymphocytes, NK cells [4], was found to decrease by 14.0 and 8.9 %, and INF- α , which exhibits immunomodulatory properties, increasing the

activity of natural killer cells, T-helper cells, phagocytes, and the intensity of B-lymphocyte differentiation [1] — by 14.7 and 22.1 %.

With a general tendency to increase in the piglets of both groups the amount of INF- γ , responsible for the induction of the production of pro-inflammatory cytokines [4], by 15.1 and 25.9 %, its value in the animals of the experimental group exceeded by 30.8 %, which indicated an increase in the activity of ThI type lymphocytes.

In the piglets reared under recovered sows, a decrease in the level of IL-2 by 6.5 % and IL-10 — by 4.5 % was noted, while in the piglets of the control group their number increased by 18.4 and 22.7 %, respectively.

During this period, the piglets of the experimental group showed a decrease in the content of IL-4 (by 15.3 %), which is a differentiation factor for T- and B-lymphocytes and induces humoral immunity [12].

At the same time, in the animals of the experimental group the content of IL-2, IL-4 and IL-10 was less by 11.4, 10.0 and 7.6 %, respectively, compared with the similar control indicators, which indicated a decrease in cellular and especially humoral protection and compensatory adaptive mechanisms.

Table 2

Indices of inflammatory activity and the ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines

Indicators	Piglets at the age of 5 days, reared under sows		Piglets at the age of 20 days, reared under sows	
	healthy	have had the disease	healthy	have had the disease
IIA	5.5 \pm 0.28	6.2 \pm 0.59	5.3 \pm 0.49	6.6 \pm 0.36*
TCI	33.5 \pm 1.37	34.1 \pm 3.17	31.5 \pm 1.88	43.1 \pm 2.09**
CI Th1/Th2	26.8 \pm 1.29	28.6 \pm 3.08	27.4 \pm 1.82	38.3 \pm 2.03**
IL-1 β /IL-10	1.71 \pm 0.08	1.73 \pm 0.14	1.29 \pm 0.05 ⁺	1.75 \pm 0.06*
IL-1 β /IL-4	2.41 \pm 0.16	2.87 \pm 0.37	2.33 \pm 0.14	3.26 \pm 0.29*
INF γ /IL-10	42.7 \pm 1.64	43.4 \pm 4.63	40.1 \pm 2.99	56.5 \pm 2.99**
INF γ /IL-4	60.4 \pm 4.18	72.3 \pm 7.06	72.3 \pm 4.71	104.8 \pm 8.79**

* $p < 0.05$ —0.001 — in relation to the indicators in the piglets reared under healthy sows

⁺ $p < 0.05$ —0.001 — in relation to the indicators of the previous period

The total activity of endogenous inflammatory mediators and the total cytokine index in the animals of the experimental group increased by 6.4 and 26.5 %, and in the piglets of the control group there was a ten-

dency towards their decrease, as a result of which the values of IIA and TCI in the piglets reared under recovered sows were higher by 24.0 % and 37.0 %, respectively.

The cytokine index, reflecting the ratio of mediators, produced by ThI and ThII lymphocytes, in the animals of the experimental group, increased by 33.8 % and was higher by 39.8 %, which indicated the prevalence of the cellular immune response in them.

Significant changes in the experimental piglets also occurred in the ratios of individual pro-inflammatory cytokines to anti-inflammatory mediators. In the piglets of the experimental group, there was found an increase in IL-1 β /IL-4 by 13.6, INF- γ /IL-10 — by 30.2 and INF- γ /IL-4 — by 45.0 %, while the animals in the control group showed a decrease in IL-1 β /IL-10 by 24.6 %, INF- γ /IL-10 — by 6.0 % with an increase in INF- γ /IL-4 by 19.8 %.

As a result, in the piglets reared under sick sows, the values of IL-1 β /IL-10 were higher by 35.7 %, IL-1 β /IL-4 — by 39.9 %, INF- γ /IL-10 — by 41.0 %, INF- γ /IL-4 — by 44.9 %, relative to the control.

The analysis of the results revealed the presence of an immune imbalance, manifested by an increase in the concentration of INF- γ , the main cytokine, secreted by ThI lymphocytes against the background of a decrease in the level of IL-4, which is responsible for the development of the immune response along the ThII pathway. Increased production of INF- γ in the newborn piglets reared under recovered sows may be a physiological protective response and determines the ability to normalize the neonatal period [12]. However, the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines is an important point in the regulation of the inflammatory response and determines the advantage of the cellular or humoral immune response [4].

CONCLUSION

The studies conducted in the piglets reared under the sows that have had postpartum diseases, compared with the offspring under clinically healthy animals, on day 5 revealed an increased content of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-2, anti-inflammatory mediators IL-4 and IL-10 and an increase in the total activity of endogenous inflammatory mediators, the cytokine index and the ratios of IL-1 β /IL-4 and IFN- γ /IL-4, indicating a high degree of tension in the adaptation mechanisms. On day 20, an imbalance of cytokines was revealed, manifested by an increase in the overall ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines, the Th1/Th2 index, the IL-1 β /IL-10 and IFN- γ /IL-10 ratios, IL-1 β /IL-4 and IFN- γ /IL-4, a significant increase in the content of IFN- γ with a decrease in the level of IL-2, IL-4 and IL-10, which indicated the prevalence of the cellular immune response over the humoral one.

The identified changes in the piglets reared under the sows that have had postpartum diseases indicate a more pronounced pro-inflammatory reaction, which mediates the development of immunosuppression and the occurrence of diseases of various etiologies. The results obtained substantiate the need for the use of immunomodulatory agents to improve immune status.

REFERENCES

1. *Simbirtsev A. S.* Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases / A. S. Simbirtsev // St. Petersburg — Foliant Publishing House LLC. — 2018. — 512 p.
2. *Shakhov A.* Cytokine pattern in piglets in the early postnatal period / A. Shakhov, L. Sashnina, M. Adodina, E. Mikhaylov, M. Zheyne, K. Kopytina, M. Syromyatnikov // Adv. Anim. Vet. Sci. — 2022. — V. 10. — No. 1. — P. 120—125.
3. *Shakhov A. G.* Cytokine profile in piglets with actinobacillus pleuropneumonia and its correction with tsipropig / A. G. Shakhov, L. Yu. Sashnina, Yu. Yu. Vladimirova, M. I. Adodina // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii (International Bulletin of Veterinary Medicine). — 2021. — No. 3. — P. 60—65.
4. *Tarasova I. V.* Cytokines — “conductors” of intercellular interactions. (End. Beginning in No. 1, 2 for 2011) / I. V. Tarasova // Allergologiya i immunologiya v pediatrii (Allergology and immunology in pediatrics). — 2011. — No. 3 (26). — P. 36—41.
5. *Chistyakova G. N.* Immunological aspects of the relationship between the mother and fetus during physiological and pathological gestation course // Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki (Bulletin of the Ural Medical Academic Science). — 2009. — No. 4. — P. 59—62.
6. *Zheyne M. Yu.* Immune status and cytokine profile in piglets in the early postnatal period and their correction: thesis ... Cand. of Vet. Sciences. 4.2.3. / M. Yu. Zheyne // Voronezh. — 2022, P. 15.
7. *Nechvatalova K.* Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs / K. Nechvatalova, H. Kudlackova, L. Leva, K. Babickova, M. Faldyna // Veterinary immunology and immunopathology. — 2011. — V. 142. — No. 1—2. — P. 95—100.
8. *Elahi S.* Protective role of passively transferred maternal cytokines against Bordetella pertussis infection in newborn piglets / S. Elahi, D. R. Thompson, J. V. Kessel et al. // Infect Immun. — 2017. — Vol. 85. — e01063—16.
9. *Sinkora M.* The ontogeny of the porcine immune system / M. Sinkora, J. E. Butler // Dev. Comp. Immunol. — 2009. — Vol. 33. — P. 273—283.
10. *Shakhov A. G.* State of cellular immunity and cytokine profile in piglets with intestinal infections / A. G. Shakhov, L. Yu. Sashnina, M. I. Adodina [et al.] // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya Vitebskaya ordena Znak pocheta gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy

meditsiny (Transactions of the educational establishment "Vitebsk the Order of the 'Badge of Honor' State Academy of Veterinary Medicine"). — 2019. — V. 55. — No. 4. — P. 146—150.

11. *Karpunina T. I.* Methodical approaches to assessing the cytokine balance and leukocyte reaction during obstruction of the biliary tract of various origins / T. I. Karpunina, A. P. Godovalov, Yu. B. Busyrev // *Meditinskaya immunologiya (Medical immunology)*. — 2018. — V. 20. — No. 6. — P. 825—832.

12. *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—152.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

A. G. Shakhov — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Chief Scientific Associate of the Laboratory of Immunology and Serology;

L. Yu. Sashnina — Doctor of Veterinary Sciences, Chief Scientific Associate of the Laboratory of Immunology and Serology;

Yu. Yu. Vladimirova — Candidate of Veterinary Sciences, Junior Scientific Associate of the Laboratory of Immunology and Serology;

K. O. Akulova — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Immunology and Serology;

G. V. Nikonenko — Junior Scientific Associate of the Laboratory of Immunology and Serology.

The article was submitted 08.09.2023.

Научная статья

УДК 619:616—091:618.19—002

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.185

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРОВ ПРИ КАТАРАЛЬНОМ МАСТИТЕ

Евгений Владимирович Михайлов[✉], Ольга Борисовна Павленко,
Борис Викторович Шабунин, Николай Алексеевич Стрельников,
Валерия Сергеевна Болотова, Михаил Юрьевич Сыромятников,
Ирина Николаевна Лацигина, Надежда Валерьевна Пасько¹

*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии, Воронеж, Россия, voronezh81@rambler.ru[✉]*

Аннотация. В статье представлены результаты цито-гистологических и молекулярно-генетических исследований при катаральном мастите у коров. Установлено, что в секрете молочной железы коров, больных катаральным маститом, отмечено наличие дегенеративных изменений в клетках (конденсированный хроматин, пикноз и рексис ядер), разрушенных лейкоцитов, скопление бактерий. Гистологические исследования свидетельствуют о том, что при клиническом катаральном мастите происходит утолщение альвеолярных перегородок вследствие лейкоцитарной инфильтрации. Из них клетки воспаления мигрируют в просвет альвеол, вследствие чего выделяются с молоком. Молекулярно-генетический анализ экспрессии гена цитокина TGF β показал, что его уровень у больных животных в 35,5 раз больше, чем у здоровых. Показатели IL-10 в 2,7 раз были больше у здоровых животных, чем у больных. Уровень экспрессии IL-1 α был больше у коров, больных маститом в 20,8 раз. Экспрессия гена IL-1 β была выше в 82,7 раза у больных коров, чем у здоровых. Экспрессия гена цитокина IFN α была выше в 14,8 раз у больных коров, чем у здоровых. При проведении молекулярно-генетических исследований было выявлено течение острого воспалительного процесса.

Ключевые слова: мастит, молекулярно-генетический анализ, экспрессия генов, гистология, цитология

Заболевания молочной железы являются наиболее распространенной проблемой животноводства и наносят огромный экономический ущерб сельскому хозяйству. Так, по разным данным, клинический мастит регистрируется у 2,0—10,0 % животных от дойного поголовья, а субклиническим маститом может болеть до 30,0 % коров в период лактации. Помимо этого, у животных, которые болели маститом, часто случаются рецидивы, при этом поражается одна и та же доля [1].

Известно, что наиболее частым этиологическим фактором возникновения мастита выступает условно-патогенная микрофлора, которая чаще всего проникает в молочную железу через сосковый канал. После чего в большинстве случаев развивается клинически выраженное катаральное воспаление молочной железы. Катаральный мастит требует больших экономических затрат на лечение и чаще

рецидивирует, что также снижает молочную продуктивность животного [2].

Поэтому изучение патогенеза мастита является важным шагом к созданию эффективных методов лечения и профилактики данного заболевания. Одним из способов, который позволяет изучить механизмы воспалительных процессов при мастите, является метод оценки уровня экспрессии генов. Данный метод позволяет не только определить, какие гены активизируются в ответ на воспалительные процессы, вызванные возбудителями мастита, но и также возможные паттерны работы изучаемых генов, их активизацию, ингибирование друг друга и так далее [3].

Методологические принципы анализа уровня экспрессии основаны на количественной оценке содержания транскриптов (мРНК) данных генов в анализируемой ткани методом ПЦР в реальном

© Михайлов Е. В., Павленко О. Б., Шабунин Б. В., Стрельников Н. А., Болотова В. С., Сыромятников М. Ю., Лацигина И. Н., Пасько Н. В., 2023

времени. Данная технология может быть использована для молекулярно-генетического анализа возможного риска осложнения воспалительного процесса [4].

Морфологические исследования включают проведение цитологического, гистологического исследования материала. Материалом для цитологических исследований служит секрет молочной железы, а для гистологических — ткани вымени, которые отбираются при помощи биопсии или аутопсии [5].

Необходимость гистологического и цитологического исследования определяется сложностью дифференциальной диагностики [6].

Цель исследования изучить патоморфологические и молекулярно-генетические изменения молочной железы коров при катаральном мастите.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения исследований были сформированы две группы животных по 6 голов в каждой. Животные первой группы — клинически здоровые коровы, второй группы — больные, клинически выраженным катаральным маститом. Диагноз

на катаральный мастит устанавливали в соответствии с «Наставлением по диагностике, терапии и профилактике мастита у коров» (М., 2000).

Для проведения цитологических исследований от всех животных был отобран секрет молочной железы с целью формирования клеточных блоков («Cell-blok»).

Материалом для гистологических исследований служили образцы ткани молочной железы от коров с подтвержденным диагнозом катаральный мастит и от здоровых животных. Гистологические исследования также проводили по общепринятой методике.

Материалом для экспрессии служила ткань молочной железы коров обеих групп, отобранная в пробирки с фиксатором IntactRNA для стабилизации РНК в образцах. Затем из нее была выделена РНК с использованием набора РНК-Экстран (Синтол, Россия), после чего была проведена обратная транскрипция с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия). ПЦР — смеси наводились с учетом специально подобранных праймеров для каждого из цитокинов (табл. 1) с использованием коммерческой смеси реактивов 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия).

Таблица

Перечень последовательностей праймеров цитокинов

Название цитокина	Последовательность
TGF β	F: CTGAGCCAGAGGCGGACTAC R: TGCCGTATTCCACCATTAGCA
IL-10	F: CTTGTTCGGAAATGATCCAGT R: TCTCTTGGAGCTCACTGAAG
IL-1 α	F: TCTTGGGAGGACTGAGGCTA R: CAGCAGCAAACCTGAGAC
IL-1 β	F: AAATGAACCGAGAAGTGGTGTT R: TTCCATATTCCTCTTGGGGTAGA
IFN α	F: CCGATGGCCCCAGCCTGGTCC R: GGATGGATCCTCAGTCCTTTCTCCTGAA

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ

При цитологическом исследовании секрета вымени коров, больных катаральным маститом, 80,0 % клеток составили полиморфоядерные нейтрофилы. У части клеток отмечается кариопикноз и кариорексис. Также отмечалось большое количество деформированных лейкоцитов и оформленной же-

лезистой структуры, что указывает на деструкцию паренхимы органа. Эпителиальные клетки имели округлую цитоплазму, ядра были частично смещены к полюсу и у некоторых клеток отмечали конденсацию хроматина и пикноз ядер. В секрете молочной железы присутствовали бактерии, окруженные лейкоцитами, что указывает на бактериальную природу катарального мастита (рис. 1) [7].

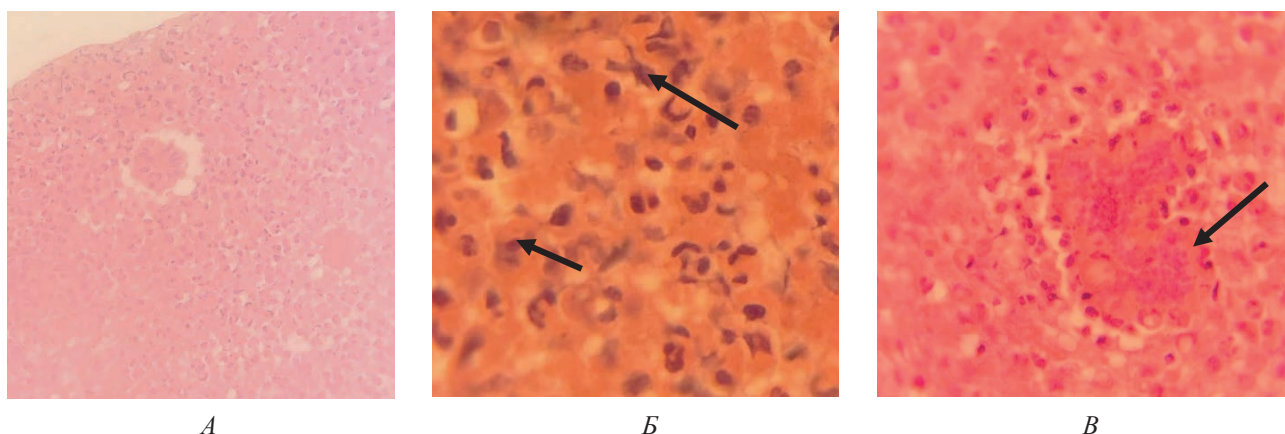


Рис. 1. Клеточный состав секрета молочной железы при катаральном мастите, окраска гематоксилин-эозин: *А* — железистая структура (стрелка), ув. 400х; *Б* — клеточный детрит и деструкция ядер нейтрофилов (стрелка), ув. 2000х, *В* — бактерии, окруженная лейкоцитами, ув. 1000х. Окраска — гематоксилин-эозин

При цитологическом исследовании секрета молочной железы здоровых коров выявлены белковые массы, которые окрашивались эозинофильно (рис 2 Б, стрелка) и присутствовали небольшие скопления лейкоцитов. Клетки, представлены по большей части нейтрофилами, с округлой цито-

плазмой и ядром с 2—3 сегментами. Макрофаги составляли 10,0 % клеток и имели округлое центрально расположенное ядро с округлой цитоплазмой. Эпителиальные клетки имели округлое ядро, смещенное к полюсу и оксифильно-окрашенную цитоплазму (рис. 2).

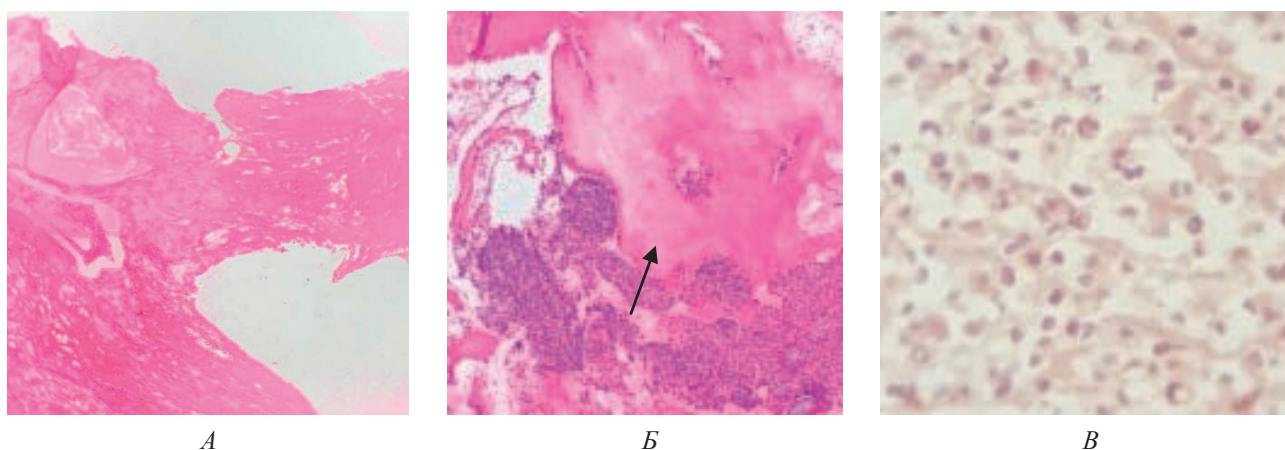


Рис. 2. Клеточный состав секрета здоровой молочной железы, окраска гематоксилин-эозин: *А, Б* — общий вид, ув. 400х; *В* — вид на клеточный состав, ув. 1000х

Так, в секрете молочной железы коров, больных катаральным маститом, отмечали наличие дегенеративных изменений в клетках (конденсированный хроматин, пикноз и рексис ядер), разрушенных лейкоцитов, скопление бактерий. Наличие железистой структуры в секрете при катаральном мастите, может служить маркером разрушения паренхимы молочной железы.

При гистологическом исследовании здоровой молочной железы отмечали тонкие соединительнотканые перегородки, на которых располагались железистые структуры. В просвете альвеол

отмечали структуры, по морфологии напоминающие обломки клеток, а также капли жира и единичные эритроциты. Капилляры были кровенаполнены. Клетки железистого эпителия имели характерное строение — смещенное к полюсу ядро и цитоплазму (рис. 3)

В ткани молочной железы при катаральном мастите отмечали утолщение межальвеолярных перегородок, которое было связано с инфильтрацией лейкоцитами.

В просвете альвеол визуализировались лейкоциты, представленные нейтрофилами, эозинофи-

лами и макрофагами. Эпителиальные клетки альвеол имели признаки дистрофии, что выражалось в вакуолизации их цитоплазмы (рис. 4)

Проведенными гистологическими исследованиями было установлено, что при катаральном мастите происходит утолщение альвеолярных перегородок вследствие лейкоцитарной инфильтрации, а также наличие в альвеолах железы катарального экссудата.

При анализе уровня экспрессии генов в секрете молочной железы, полученного от здоровых и больных катаральным маститом коров были получены следующие результаты: уровень экспрессии гена TGF β был в 35,5 раз выше у больных животных, без достоверных различий. Это может свидетельствовать о процессе активации клеточного пула в молочной железе на фоне катарального мастита (рис. 5).

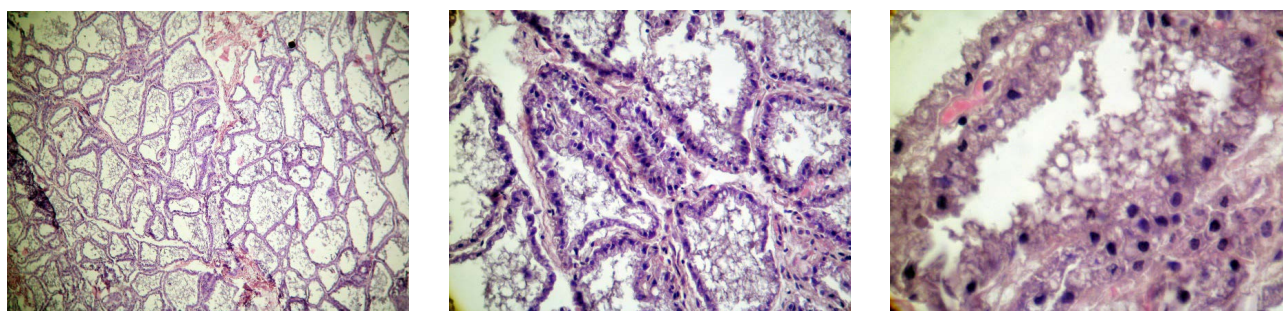


Рис. 3. Гистологическое строение здоровой молочной железы лактирующей коровы, окраска гематоксилин-эозин:

A — общий вид, ув. 40x; B, B' — вид на альвеолы с секретом в просвете. B — ув. 400x; B' — ув. 1000x

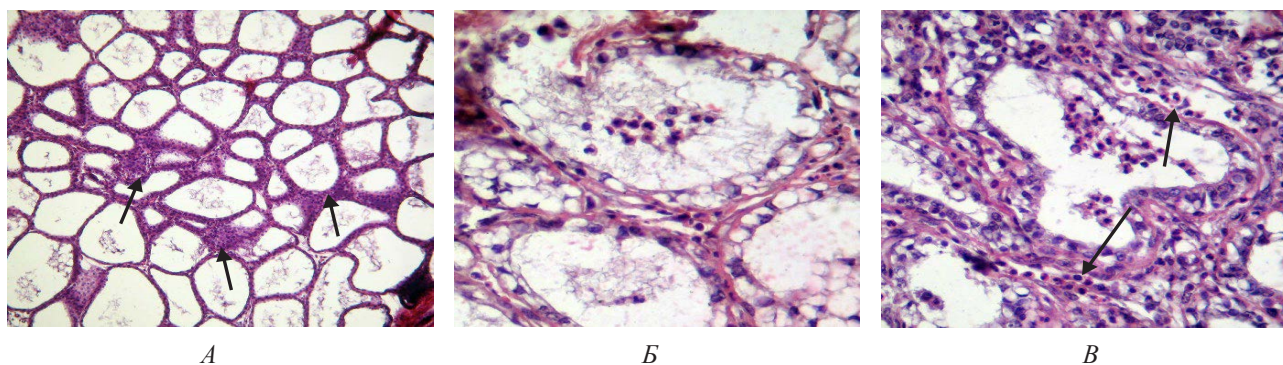


Рис. 4. Молочная железа при катаральном мастите коровы, окраска гематоксилин-эозин:

A — общий вид, стрелками указаны утолщенные вследствие инфильтрации перегородки, ув. 40x; B — молочный секрет с примесью лейкоцитов, ув. 400x; B' — альвеола с лейкоцитами в просвете и инфильтратом в стенке, ув. 400x

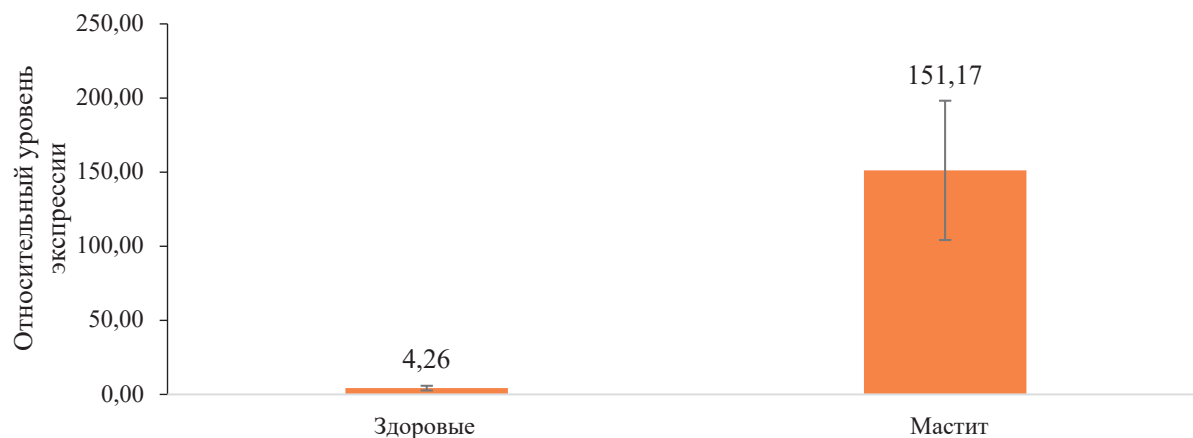


Рис. 5. Экспрессия гена цитокина TGF β у здоровых и больных катаральным маститом коров

Экспрессия гена IL-10 была больше в 2,7 раза у здоровых коров (рис. 6). Данный цитокин относится к группе противовоспалительных, ответственный за купирование цитокинового шторма в организме. При катаральном мастите работа данного гена снижена, что не позволяет своевременно ингибировать активность воспалительного ответа.

Экспрессия гена IL-1 α была больше у коров, больных катаральным маститом, в 20,8 раз ($P < 0,05$). Данный ген играет одну из основных ролей в индуцировании и поддержании раннего воспаления, т. к. цитокин является провоспалительным (рис. 7).

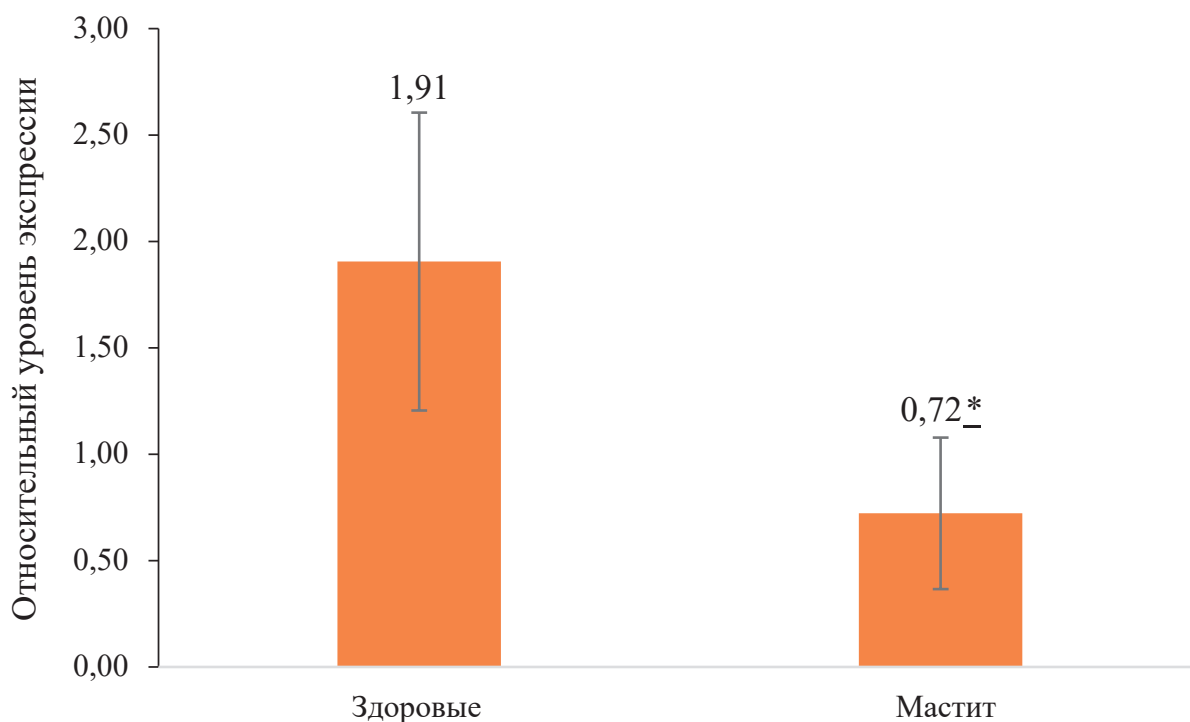


Рис. 6. Экспрессия гена цитокина IL-10 у здоровых и больных катаральным маститом коров

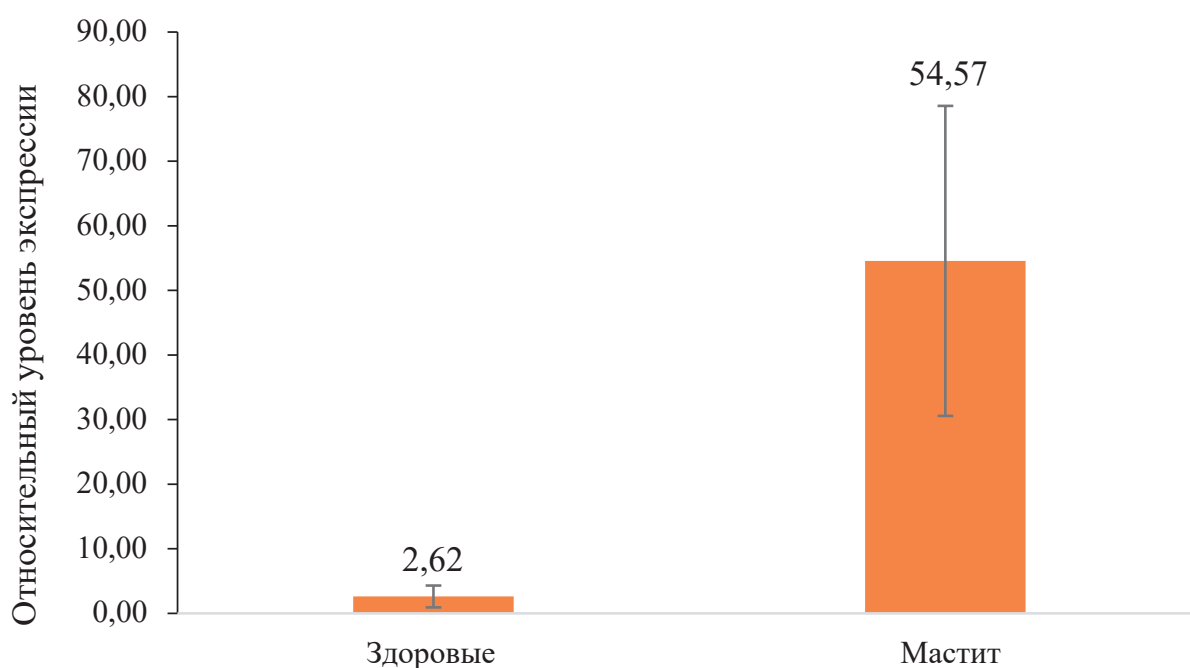


Рис. 7. Экспрессия гена цитокина IL-1 α у здоровых и больных катаральным маститом коров

Экспрессия гена IL-1 β была выше в 82,7 раза у больных коров (рис. 8). Данный цитокин относится к провоспалительным и одним из первых включается в процесс раннего воспаления, как

и ген IL-1 α . Оба интерлейкина-1 при катаральном мастите значительно повышают свою активность, развивая каскад реакций воспаления и провоцируя цитокиновый шторм.

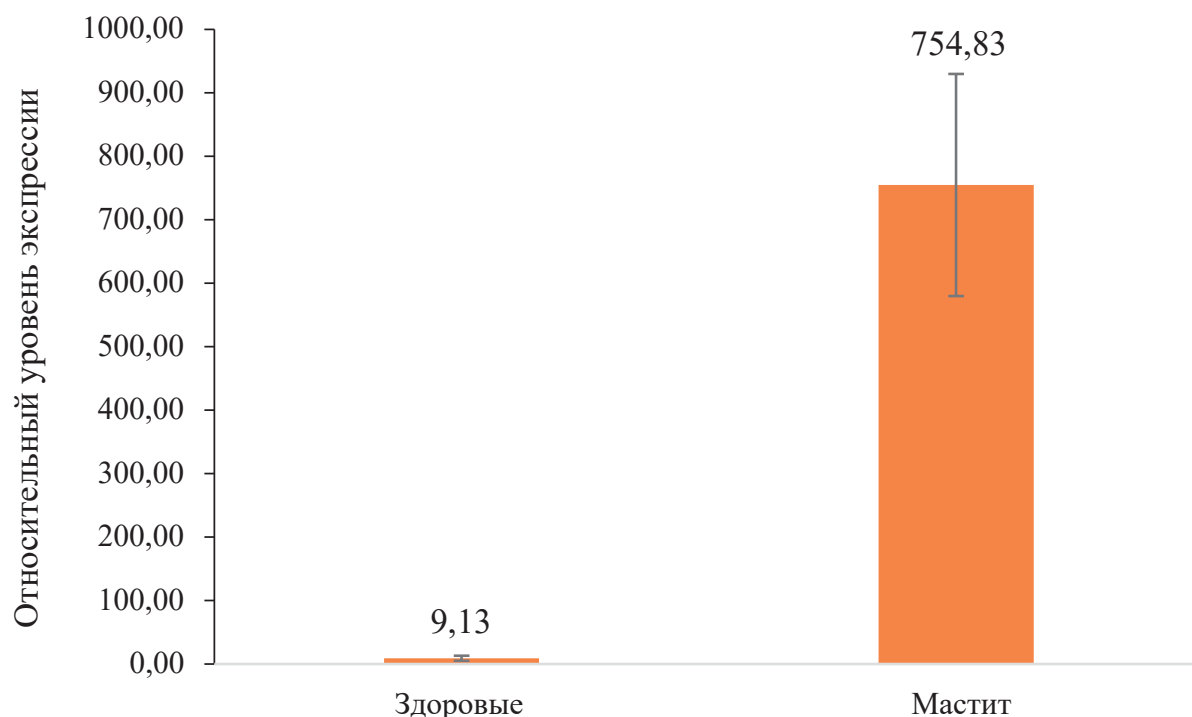


Рис. 8. Экспрессия гена цитокина IL-1 β у здоровых и больных катаральным маститом коров

Экспрессия IFN α была выше у больных особей в 14,8 раз (рис. 9) Это может свидетельствовать о реакции врожденного иммунитета в ответ на патоген. Анализ данных уровня экспрессии генов свидетельствует о том, что у больных коров с острым течением катаральным маститом происходит активная выработка провоспалительных цитокинов, что приводит к развитию воспаления в молочной железе.

Полученные нами данные гистологических исследований соотносятся с результатами других авторов. Так, для катарального мастита характерны следующие изменения — лейкоцитарный инфильтрат, катаральный экссудат в просвете молочных альвеол, деструкция и некроз железистого эпителия [8—10].

Цитологические исследования также соответствуют ранее полученным результатам других исследователей. Так Janka Turbók продемонстрировала, что при мастите в клеточном составе молока нейтрофилы занимают 70,0—80,0 %, а макрофаги — до 20,0 %, при этом доля эпителиальных клеток падает до 1,0 % [11]. Также по данным Canisso I., при катаральном мастите у коров часть

нейтрофилов претерпевает качественные изменения — кариопикноз и гиперсегментацию ядра [12].

Анализ молекулярно-генетических исследований соотносятся с исследованиями других ученых. Цитокины IL-1 α , IL-1 β и TGF β являются основными для развития воспалительного процесса в молочной железе, что подтверждается повышением экспрессии.

Однако точные механизмы все еще недостаточно изучены. Экспрессия генов TGF β у животных с катаральным маститом на наш взгляд может отражать тот факт, что данный ген стимулирует подавление воспаления через ингибирование провоспалительных цитокинов. Рассматривая экспрессию IFN α иммунный ответ достигается за счет иммуномодуляции и антипролиферативных свойств через связывание с рецепторами плазматической мембраны. Влияние на экспрессию генов про- и противовоспалительных цитокинов еще недостаточно изучено [13, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, катаральный мастит характеризуется деструкцией железистых структур выме-

ни, воспалительной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, наличием катарального экссудата и выходом лейкоцитов в просвет молочных альвеол с последующей секрецией их с молоком.

Молекулярно-генетические исследования указывают на острое течение катарального мастита у коров с возможной активизацией работы противовоспалительных цитокинов.

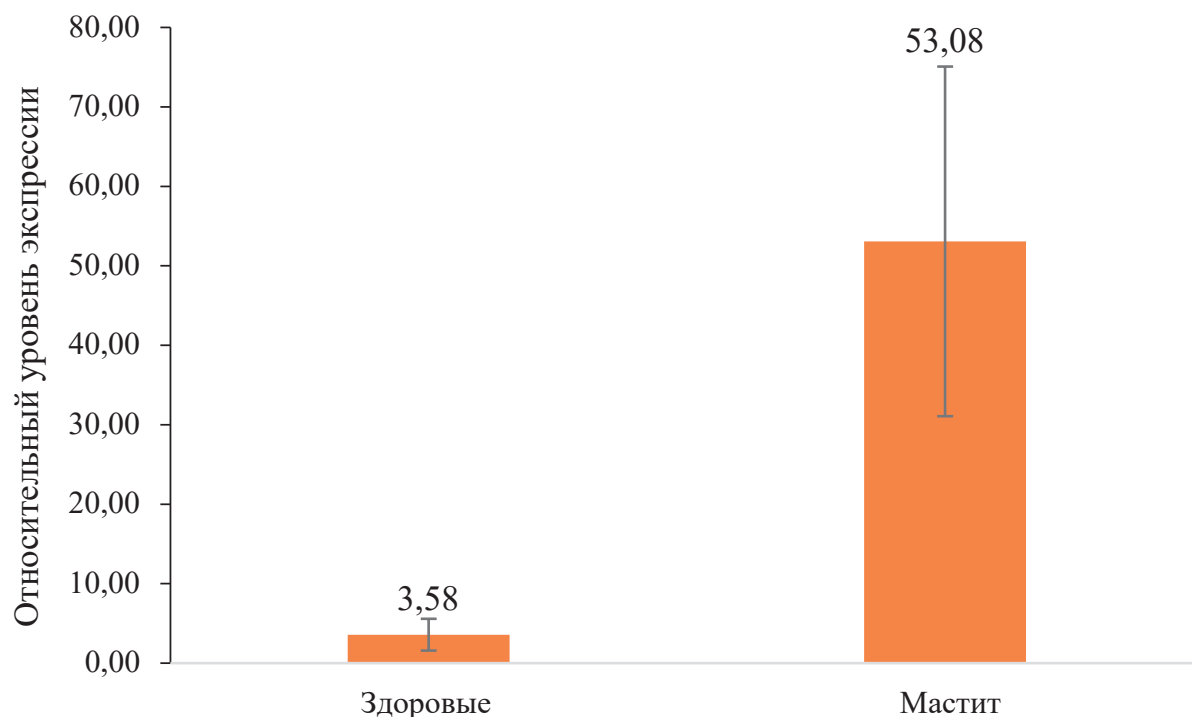


Рис. 9. Экспрессия гена цитокина IFNα у здоровых и больных катаральным маститом коров

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Золотова Т. Е., Аносов И. П. Гистология: учебное пособие для среднего профессионального образования // 2-е изд., Москва: Издательство Юрайт, 2023. 278 с.

2. Кондакова И.А., Ленченко Е. М., Ломова Ю. В. Исследование нозологического профиля инфекционной патологии телят // Вестник рязанского государственного агротехнологического университета им. П. А. Костычева. 2017. № 2(34). С. 17—21.

3. Ладанова М.А., Джавадов Э. Д., Племяшов К. В., Стекольников А. А., Новикова О. Б. Современный взгляд на этиологию, патогенез и диагностику мастита у коров //Международный вестник ветеринарии. — 2021. — № 4. — С. 29—34. doi.org/10.52419/issn2072—2419.2021.4.29

4. Курдеко А. П., Ковалев С. П., Алешкевич В. Н., Белова Л. М., Бобрик Д. И., Братушкина Е. Л., Гурин В. П., Карасев Н. Ф., Карпенко Л. Ю., Коваленок Ю. К., Кудряшов А. А., Кузьмич Р. Г., Максимов В. И., Мацнинович А. А., Мотузко Н. С., Никулин И. А., Племяшов К. В., Прудников В. С., Самсонович В. А., Стасюкевич С. И., Сухинин А. А., Холод В. М., Щербаков Г. Г., Ятусевич А. И. Методы диагностики болезней сельскохозяйственных животных: учебное пособие 2-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 208 с.

5. Стволинская Н. С. «Цитология». Учебник для бакалавров по направлению подготовки «Педагогическое образование и Биология». МПГУ. Москва, Прометей, 2012.

6. CHANG J., YU, D. B., LIANG, J. B., Jia, C. H. E. N., WANG, J. F., Fang, W. Mycoplasma leachii causes bovine mastitis: Evidence from clinical symptoms, histopathology and immunohistochemistry //Journal of integrative agriculture. 2019. Т. 18. № 1. С. 160—168.

7. Шабунин Б. В., Зимников В. И. Клеточный блок как новый метод исследования клеточного состава секрета молочной железы // Международный вестник ветеринарии. 2022. № 4. С. 254—259. — DOI 10.52419/issn2072—2419.2022.4.254

8. Павленко О. Б., Зимников В. И., Сулин В. Ю., Мартынова А. В., Плюхина И. С., Емельянов Ю. В. Распространение мастита среди лактирующих коров различных пород // Ветеринарный фармакологический вестник. 2022. № 2(19). С. 72—83

9. Gogoi-Tiwari J., Williams, V., Waryah, C. B., Costantino, P., Al-Salami, H., Mathavan S Mammmary gland pathology subsequent to acute infection with strong versus weak biofilm forming Staphylococcus aureus bovine mastitis isolates: a pilot study using non-invasive mouse mastitis model//PLoS One. 2017. Т. 12. № 1. С. e0170668. doi: 10.1371/journal.pone.0170668. eCollection 2017.

10. *Turbók J.*, Tornyo, G., Kocsis, R., Süle, J., Tóth, T., Buzás, H., Zomborszky, Z. Cytological and microbiological examination of bovine milk in Prototheca-infected dairy herd: Preliminary report // *Acta Agraria Kaposváriensis*. — 2022. — Т. 26. — № 2. — С. 87—104.

11. *Canisso I. F.* *Diagnosis and treatment of mastitis in mares* / *Canisso I. F., Podico G., Ellerbrock R. E.* // *Equine Veterinary Education*. 2021. Т. 33. № 6. С. 320—326.

12. *Kawecka-Grochocka, E., Zalewska, M., Rzewuska, M.* et al. Expression of cytokines in dairy cattle mammary gland parenchyma during chronic staphylococcal infection // *Vet Res* 52, 132 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13567-021-01003-y>.

13. *Tabasum Shaheen, Sheikh Bilal Ahmad, Muneeb U. Rehman, Showkeen Muzamil, Rahil Razak Bhat, Ishraq Hussain, Nazirah Bashir, Manzoor Ur Rahman Mir, Bilal Ahamad Paray, Mahmoud A. O. Dawood*, Investigations on cytokines and proteins in lactating cows with and without naturally occurring mastitis, *Journal of King Saud University — Science*, Volume 32, Issue 6, 2020, Pages 2863—2867, ISSN1018—3647, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.07.009>.

14. *Rosenberger C. M., Scott M. G., Gold M. R., Hancock R. E., Finlay B. B.* *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. // *J. Immunol.* 2000. 164:5894—5904.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. В. Михайлов — кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник;

О. Б. Павленко — доктор биологических наук, главный научный сотрудник;

Н. А. Стрельников — младший научный сотрудник;

Б. В. Шабунин — старший лаборант;

В. С. Болотова — младший научный сотрудник;

М. Ю. Сыромятников — старший научный сотрудник;

И. Н. Лацигина — младший научный сотрудник;

Н. В. Пасько — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 02.11.2023 г.

Original article

UDC 619:616—091:618.19—002

PATHOMORPHOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC CHANGES IN THE MAMMARY GLAND OF COWS WITH CATARRHAL MASTITIS

Evgeniy Vladimirovich Mikhaylov[✉], Olga Borisovna Pavlenko, Boris Viktorovich Shabunin, Nikolay Alekseevich Strelnikov, Valeriya Sergeevna Bolotova, Mikhail Yuryevich Syromyatnikov, Irina Nikolaevna Latsigina, Nadezhda Valerievna Pasko¹

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy (ARVRIPP&T), Voronezh, Russia, voronezh81@rambler.ru[✉]

Abstract. The article presents the results of cytohistological and molecular-genetic studies of catarrhal mastitis in cows. It was established that in the secretion of the mammary gland of cows with mastitis, the presence of degenerative changes in cells (condensed chromatin, pyknosis and rhexis of nuclei), destroyed leukocytes and accumulation of bacteria were noted. Histological studies indicate that in case of clinical catarrhal mastitis, thickening of the alveolar septa occurs due to leukocyte infiltration. Out of them inflammatory cells migrate into the lumen of the alveoli, as a result of which they are excreted in milk. Molecular-genetic analysis of the expression of the TGF β cytokine gene showed that its level in sick animals was by 35.5 times higher than in healthy ones. IL-10 levels were by 2.7 times higher in healthy animals than in sick ones. The expression level of IL-1 α was by 20.8 times higher in the cows with mastitis. IL-1 β gene expression was by 82.7 times higher in sick cows than in healthy ones. The expression of the cytokine gene IFN α was by 14.8 times higher in sick cows than in healthy ones. When conducting molecular-genetic studies, the course of an acute inflammatory process was revealed.

Keywords: mastitis, molecular-genetic analysis, gene expression, histology, cytology

Mammary gland diseases are the most common problem in livestock production and cause huge economic losses to agriculture. Thus, according to various sources, clinical mastitis is registered in 2.0—10.0 % of animals from milking livestock, and up to 30.0 % of cows during lactation can suffer from sub-clinical mastitis. In addition, relapses often occur in the animals that have suffered from mastitis, and the same lobe is affected [1].

It is known that the most common etiological factor in the occurrence of mastitis is opportunistic microflora, which most often penetrates the mammary gland through the nipple canal. After which, in most cases, clinically pronounced catarrhal inflammation of the mammary gland develops. Catarrhal mastitis requires high economic costs for treatment and recurs more often, which also reduces the milk productivity of the animal [2].

Therefore, studying the pathogenesis of mastitis is an important step towards creating effective methods for treating and preventing this disease. One of the methods that allows us to study the mechanisms of in-

flammatory processes in case of mastitis is the method of assessing the level of gene expression. This method allows not only to determine which genes are activated in response to inflammatory processes caused by mastitis pathogens, but also possible patterns of operation of the studied genes, their activation, inhibition of each other and so on [3].

The methodological principles of expression level analysis are based on quantitative assessment of the transcript (mRNA) content of these genes in the analyzed tissue using the real-time PCR. This technology can be used for molecular-genetic analysis of the possible risk of complications of the inflammatory process [4].

Morphological studies include cytological and histological examination of the material. The material for cytological studies is the secretion of the mammary gland, and for histological studies — udder tissue, which is selected using a biopsy or autopsy [5].

The need for histological and cytological examination is determined by the complexity of differential diagnosis [6].

© Mikhaylov E. V., Pavlenko O. B., Shabunin B. V., Strelnikov N. A., Bolotova V. S., Syromyatnikov M. Yu., Latsigina I. N., Pasko N. V., 2023

The objective of the research was to study the pathomorphological and molecular-genetic changes in the mammary gland of cows with catarrhal mastitis.

MATERIAL AND METHODS

To conduct the research, two groups of animals of 6 animals each were formed. The animals of the first group were clinically healthy cows, the animals of the second group suffered from clinically pronounced catarrhal mastitis. The diagnosis of catarrhal mastitis was established in accordance with the Manual on the Diagnosis, Treatment and Prevention of Bovine Mastitis (M., 2000).

For cytological studies, mammary gland secretion was collected from all animals in order to form cell blocks (“Cell-block”).

The material for histological studies was samples of mammary gland tissue from the cows with a confirmed catarrhal mastitis and from healthy animals. Histological studies were also carried out according to generally accepted methods.

The material for expression was mammary gland tissue from the cows of both groups, collected in tubes with IntactRNA fixative to stabilize the RNA in the samples. Then RNA was isolated from it using the RNA-Extran kit (Syntol, Russia), after which reverse transcription was performed using the MMLV RT Kit (Evrogen, Russia). PCR mixtures were adjusted taking into account specially selected primers for each of the cytokines (Table 1) using a commercial mixture of 5X qPCRmix-HS SYBR reagents (Evrogen, Russia).

Table

List of cytokine primer sequences

Cytokine name	Sequence
TGFb	F: CTGAGCCAGAGGCGGACTAC R: TGCCGTATTCCACCATTAGCA
IL-10	F: CTTGTTCGGAAATGATCCAGT R: TCTCTGGAGCTCACTGAAG
IL-1α	F: TCTTGGGAGGACTGAGGCTA R: CAGCAGCAAACCTGAGAC
IL-1β	F: AAATGAACCGAGAAGTGGTGTT R: TTCCATATTCCTCTTGGGGTAGA
IFNα	F: CCGATGGCCCCAGCCTGGTCC R: GGATGGATCCTCAGTCCTTTCTCCTGAA

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

In a cytological study of the udder secretion of cows with catarrhal mastitis, 80.0 % of the cells were polymorphonuclear neutrophils. Some cells showed karyopyknosis and karyorrhexis. A large number of destroyed leukocytes and a formed glandular structure were also noted, which indicated the destruction of the organ parenchyma. Epithelial cells had rounded cytoplasm, the nuclei were partially shifted to the pole, and in some cells, chromatin condensation and nuclear pyknosis were noted. The secretion of the mammary gland contained bacteria surrounded by leukocytes, which indicated the bacterial nature of catarrhal mastitis (Fig. 1) [7].

A cytological examination of the mammary gland secretion of healthy cows revealed protein masses that

were stained eosinophilically (Fig. 2 B, arrow), and small accumulations of leukocytes were present. The cells were represented mostly by neutrophils, with round cytoplasm and a nucleus with 2—3 segments. Macrophages made up 10.0 % of the cells and had a round, centrally located nucleus with rounded cytoplasm. The epithelial cells had a rounded nucleus, shifted to the pole and oxyphilic-stained cytoplasm (Fig. 2).

Thus, in the secretion of the mammary gland of the cows with catarrhal mastitis, the presence of degenerative changes in cells (condensed chromatin, pyknosis and rhexis of nuclei), destroyed leukocytes and accumulation of bacteria were noted. The presence of a glandular structure in the secretion of catarrhal mastitis can serve as a marker of destruction of the mammary gland parenchyma.

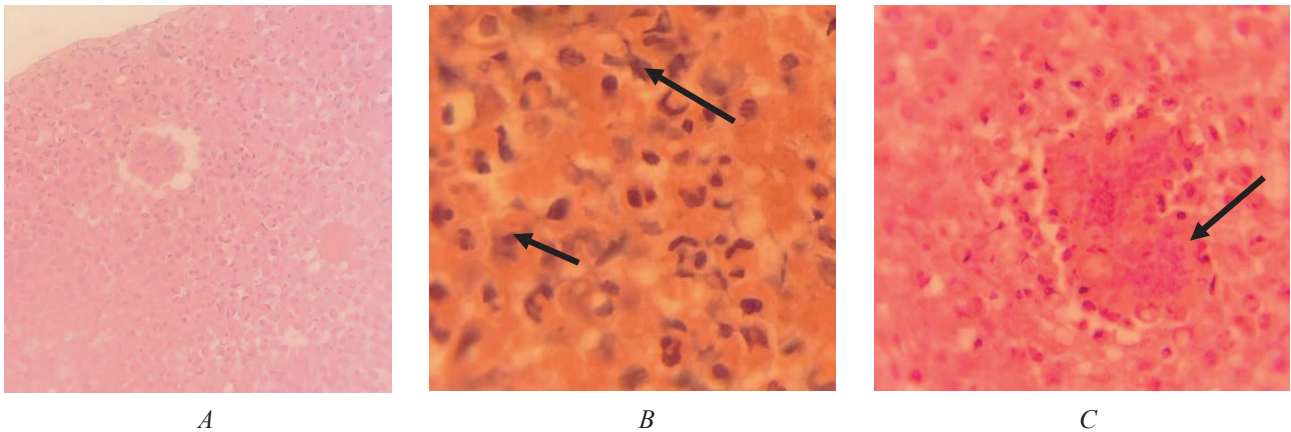


Fig. 1. Cellular composition of the secretion of the mammary gland in case of catarrhal mastitis, hematoxylin-eosin staining:

A — glandular structure (arrow), 400x; *B* — cellular detritus and destruction of neutrophil nuclei (arrow), 2000x; *C* — bacteria surrounded by leukocytes, 1000x. Hematoxylin-eosin staining

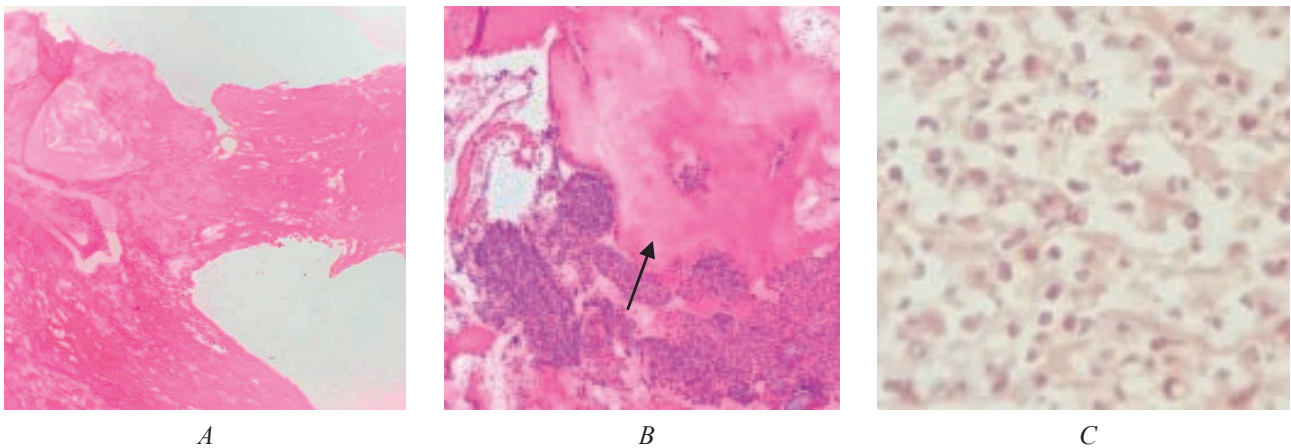


Fig. 2. Cellular composition of the secretion of a healthy mammary gland, hematoxylin-eosin staining:

A, B — general view, 400x; *B* — view of the cellular composition, 1000x

Histological examination of a healthy mammary gland revealed thin connective tissue septa, on which glandular structures were located.

In the lumen of the alveoli, there were noted the structures, the morphology of which resembled cell

fragments, as well as fat droplets and single erythrocytes. The capillaries were filled with blood. The cells of the glandular epithelium had a characteristic structure — a pole-shifted nucleus and cytoplasm (Fig. 3)

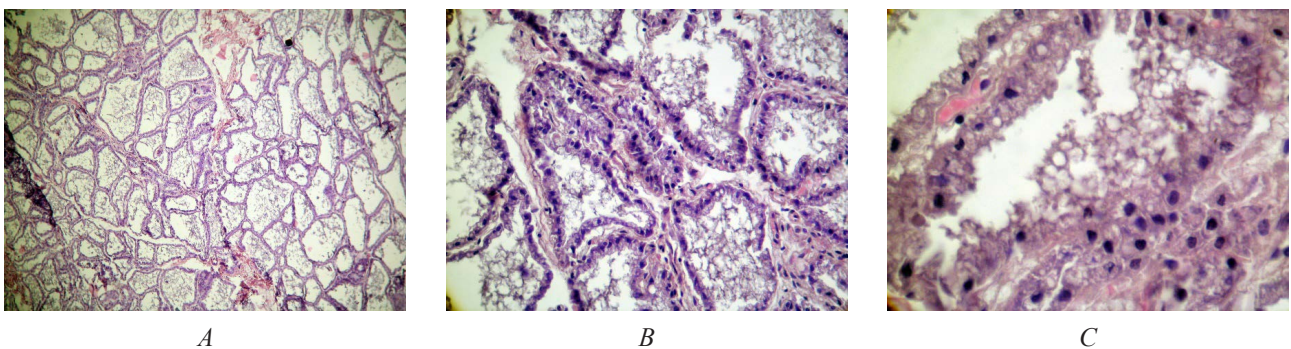


Fig. 3. Histological structure of a healthy mammary gland of a lactating cow, hematoxylin-eosin staining:

A — general view, 40x; *B, C* — view of the alveoli with the secretion in the lumen; *B* — 400x, *C* — 1000x

In the mammary gland tissue in case of catarrhal mastitis, thickening of the interalveolar septa was noted, which was associated with infiltration by leukocytes. In the lumen of the alveoli, leukocytes were vi-

sualized, represented by neutrophils, eosinophils and macrophages. The epithelial cells of the alveoli had signs of degeneration, which was expressed in the vacuolization of their cytoplasm (Fig. 4)

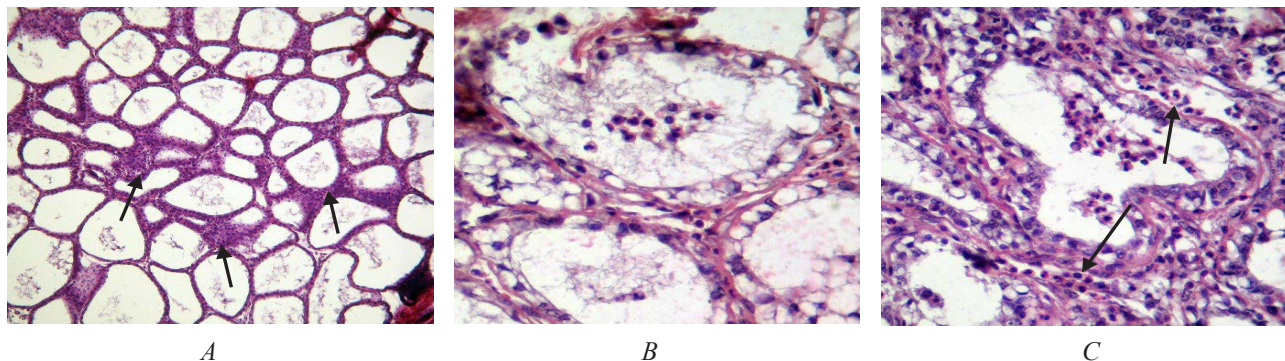


Fig. 4. Mammary gland in case of bovine catarrhal mastitis, hematoxylin-eosin staining. A — general view, arrows indicate thickened septa due to infiltration, 40x. B — milk secretion with an admixture of leukocytes, 400x. B — alveolus with leukocytes in the lumen and infiltrate in the wall, 400x.

Histological studies have established that in case of catarrhal mastitis, thickening of the alveolar septa occurs due to leukocyte infiltration, as well as the presence of catarrhal exudate in the alveoli of the gland.

When analyzing the level of gene expression in mammary gland secretion obtained from healthy and

sick cows with catarrhal mastitis, the following results were obtained: the level of expression of the gene TGFb was by 35.5 times higher in sick animals, without significant differences. This may indicate the process of activation of the cell pool in the mammary gland against the background of catarrhal mastitis (Fig. 5).

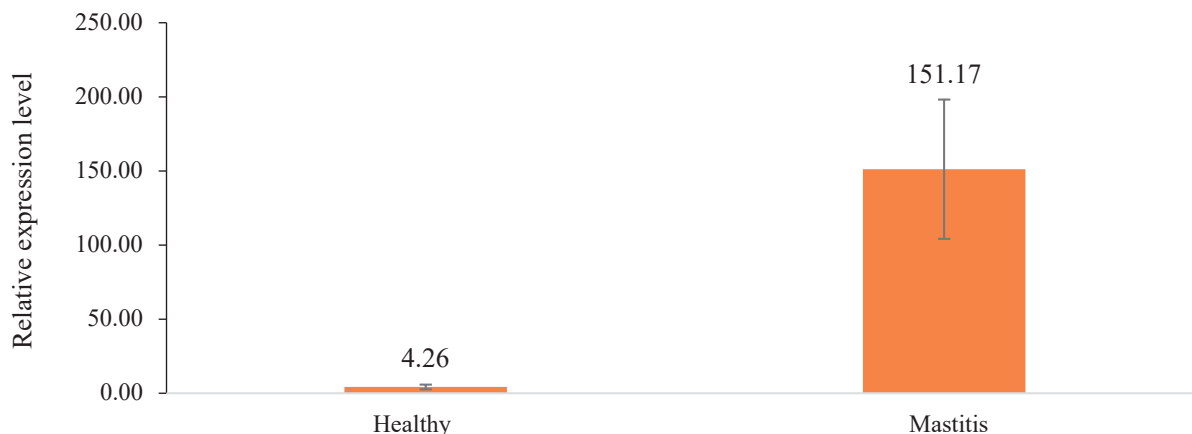


Fig. 5. Expression of the cytokine gene TGFb in healthy cows and cows with catarrhal mastitis

IL-10 gene expression was by 2.7 times higher in healthy cows (Fig. 6). This cytokine belongs to the group of anti-inflammatory drugs, responsible for stopping the cytokine storm in the body. In case of catarrhal mastitis, the work of this gene is reduced, which does not allow timely inhibition of the inflammatory response activity.

Expression of the gene IL-1 α was by 20.8 times higher in the cows with catarrhal mastitis ($P < 0.05$). This gene plays a major role in the induction and main-

tenance of early inflammation, because the cytokine is pro-inflammatory (Fig. 7).

IL-1 β gene expression was by 82.7 times higher in sick cows (Fig. 8). This cytokine is pro-inflammatory and is one of the first to be included in the process of early inflammation, like the gene IL-1 α . Both interleukins-1 significantly increase their activity in case of catarrhal mastitis, developing a cascade of inflammatory reactions and provoking a cytokine storm.

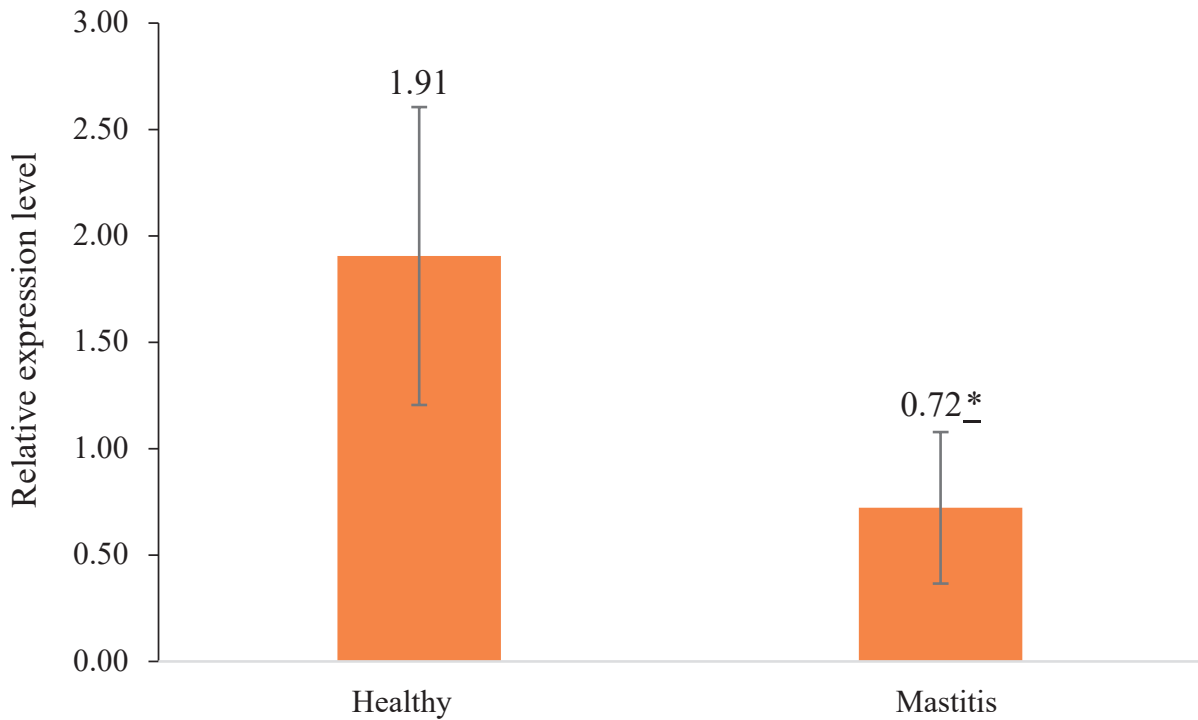


Fig. 6. Expression of the cytokine gene IL-10 in healthy cows and cows with catarrhal mastitis.

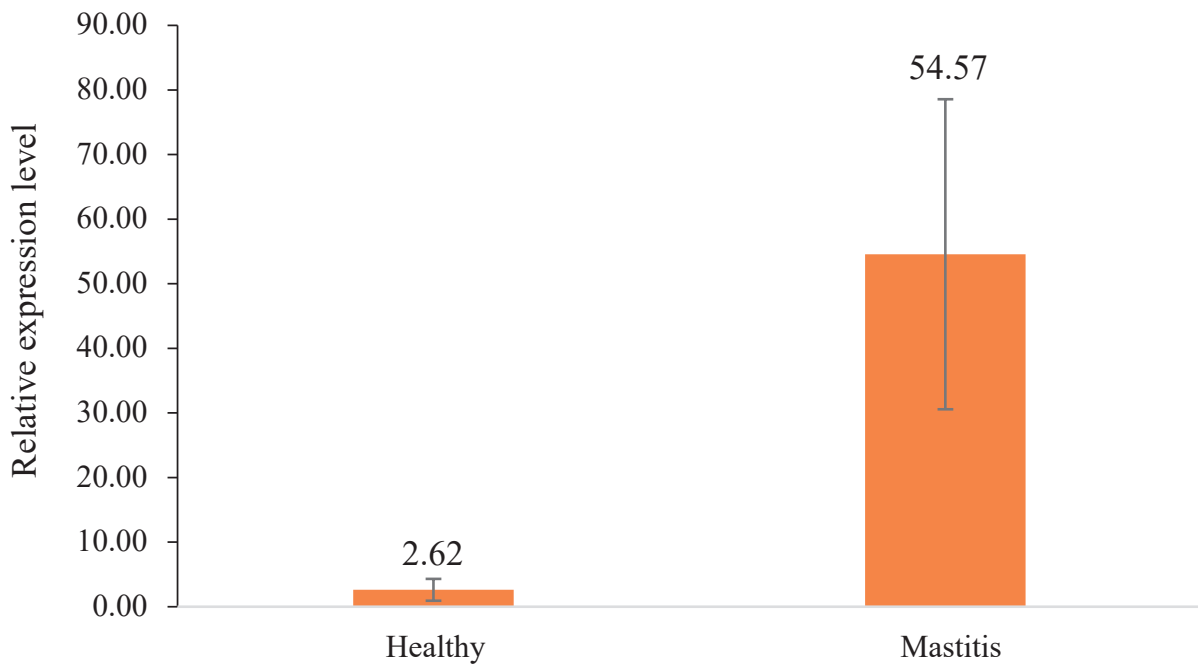


Fig. 7. Expression of the cytokine gene IL-1 α in healthy cows and cows with catarrhal mastitis

The expression of IFN α was by 14.8 times higher in sick individuals (Fig. 9).

This may indicate an innate immune response to the pathogen. The analysis of gene expression level data indicates that in the sick cows with acute catarrhal mastitis, active production of pro-inflammatory cytokines occurs, which leads to the development

of inflammation in the mammary gland. The histological data we obtained correlate with the results of other authors. Thus, catarrhal mastitis is characterized by the following changes: leukocyte infiltrate, catarrhal exudate in the lumen of the mammary alveoli, destruction and necrosis of the glandular epithelium [8—10].

Cytological studies are also consistent with previous results from other investigators. Thus, Janka Turbók demonstrated that in case of mastitis, in the cellular composition of milk, neutrophils occupy 70.0—80.0 %, and macrophages — up to 20.0 %, while

the proportion of epithelial cells drops to 1.0 % [11]. According to Canisso I., in case of catarrhal mastitis in cows, some neutrophils also undergo qualitative changes — karyopyknosis and hypersegmentation of the nucleus [12].

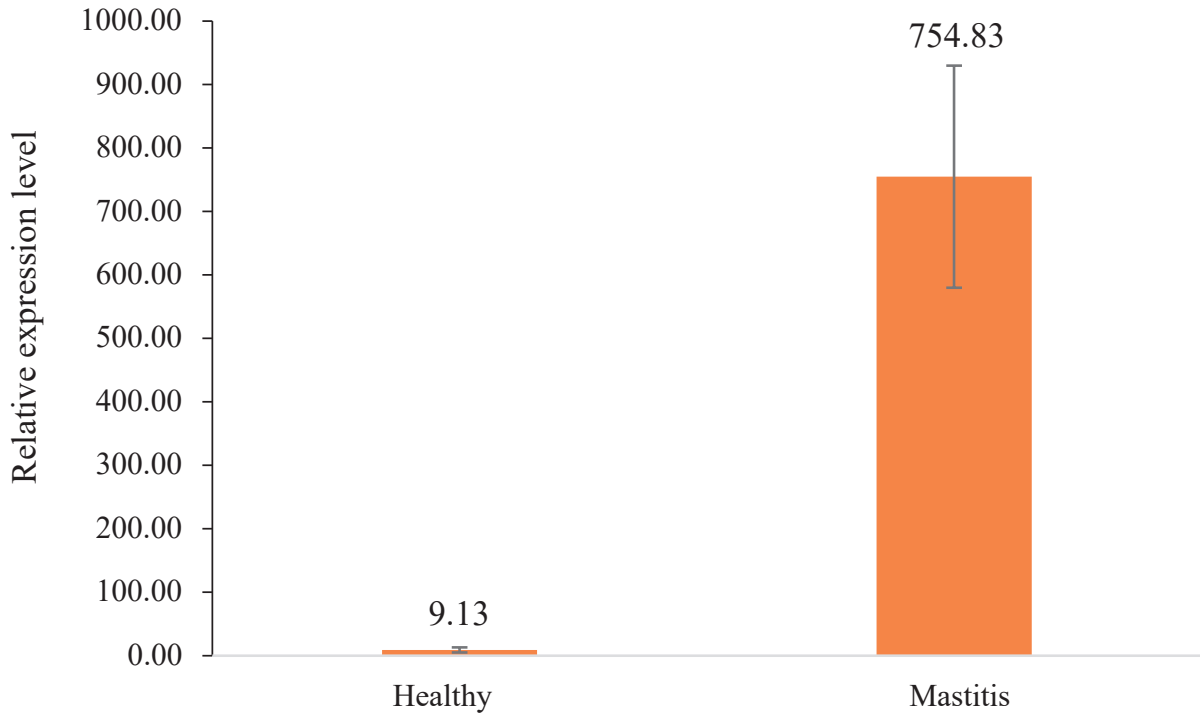


Fig. 8. Expression of the cytokine gene IL-1 β in healthy cows and cows with catarrhal mastitis

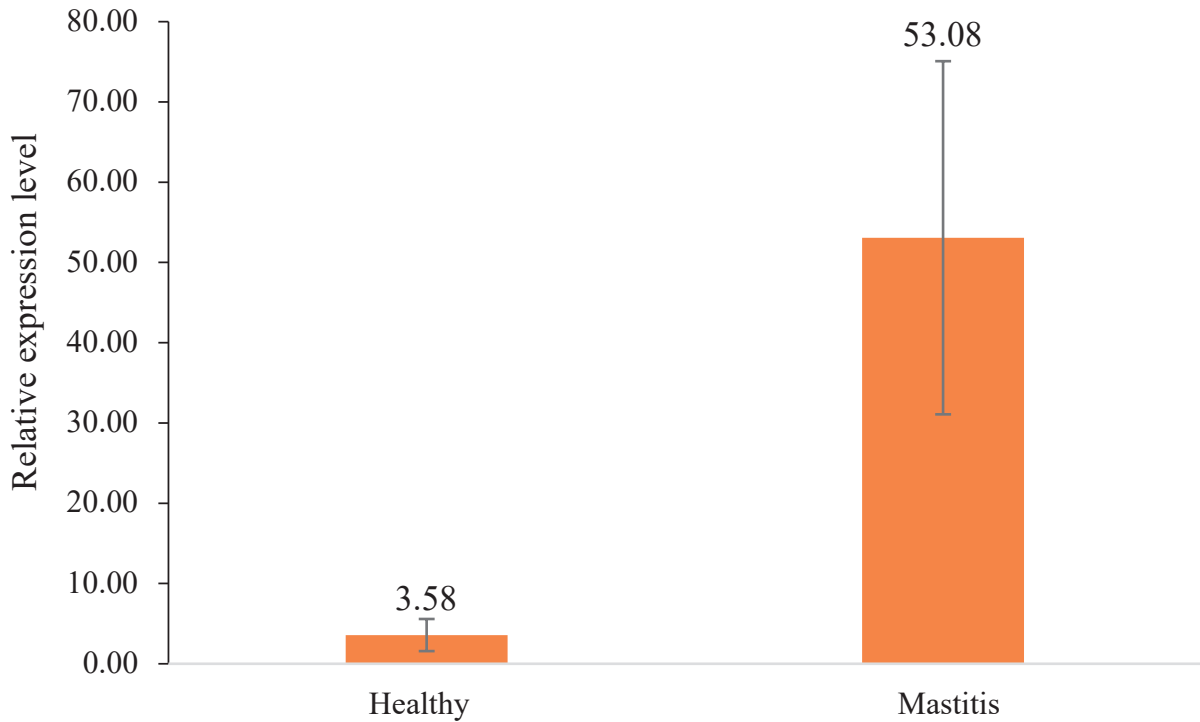


Fig. 9. Expression of the cytokine gene IFN α in healthy cows and cows with catarrhal mastitis

The analysis of molecular-genetic studies correlates with the studies of other scientists. The cytokines IL-1 α , IL-1 β and TGF β are essential for the development of the inflammatory process in the mammary gland, as evidenced by increased expression. However, the exact mechanisms are still poorly understood. The expression of the gene TGF β in the animals with catarrhal mastitis, in our opinion, may reflect the fact that this gene stimulates the suppression of inflammation through the inhibition of pro-inflammatory cytokines. Considering the expression of IFN α , the immune response is achieved through immunomodulation and anti-proliferative properties through binding to plasma membrane receptors. The effect of pro- and anti-inflammatory cytokines on gene expression has not yet been sufficiently studied [13, 14].

CONCLUSION

Thus, catarrhal mastitis is characterized by destruction of the glandular structures of the udder, inflammatory infiltration of the interalveolar septa, the presence of catarrhal exudate and the release of leukocytes into the lumen of the milk alveoli with their subsequent secretion with milk. Molecular-genetic studies indicate an acute course of catarrhal mastitis in cows with a possible activation of anti-inflammatory cytokines.

REFERENCES

1. Zolotova T. E., Anosov I. P. Histology: textbook for secondary vocational education // 2nd ed., Moscow: Yurayt Publishing House, 2023. 278 p.
2. Kondakova I. A., Lenchenko E. M., Lomova Yu. V. Study of the nosological profile of infectious pathology in calves // Vestnik ryazanskogo gosudarstvennogo agrotekhnologicheskogo universiteta im. P. A. Kostycheva. (Bulletin of Ryazan State Agrotechnological University named after. P. A. Kostychev). 2017. No. 2(34). P. 17—21.
3. Ladanova M. A., Javadov E. D., Plemiyashov K. V., Stekolnikov A. A., Novikova O. B. Modern view on the etiology, pathogenesis and diagnosis of mastitis in cows // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii (International Bulletin of Veterinary Medicine). — 2021. — No. 4. — P. 29—34. doi.org/10.52419/issn2072—2419.2021.4.29
4. Kurdeko A. P., Kovalev S. P., Aleshkevich V. N., Belova L. M., Bobrik D. I., Bratushkina E. L., Gurin V. P., Karasev N. F., Karpenko L. Yu., Kovalenok Yu. K., Kudryashov A. A., Kuzmich R. G., Maksimov V. I., Matsinovich A. A., Motuzko N. S., Nikulin I. A., Plemiyashov K. V., Prudnikov V. S., Samsonovich V. A., Stasyukevich S. I., Sukhinin A. A., Kholod V. M., Shcherbakov G. G., Yatusевич A. I. Methods for diagnosing diseases of farm animals: textbook, 2nd ed., stereotype. — St. Petersburg: Lan, 2020. — 208 p.
5. Stvolinskaya N. S. “Cytology”. Textbook for bachelors, training program “Pedagogical education and Biology”. MPGU (MSPU). Moscow, Prometheus, 2012.
6. CHANG J., YU, D. B., LIANG, J. B., Jia, C. H. E. N., WANG, J. F., Fang, W. Mycoplasma leachii causes bovine mastitis: Evidence from clinical symptoms, histopathology and immunohistochemistry // Journal of integrative agriculture. 2019. V. 18. No. 1. P. 160—168.
7. Shabunin B. V., Zimnikov V. I. Cell block as a new method for studying the cellular composition of mammary gland secretion // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii (International Bulletin of Veterinary Medicine). 2022. No. 4. P. 254—259. — DOI 10.52419/issn2072—2419.2022.4.254
8. Pavlenko O. B., Zimnikov V. I., Sulin V. Yu., Martynova A. V., Plyukhina I. S., Emelyanov Yu. V. Distribution of mastitis among lactating cows of various breeds // Bulletin of Veterinary Pharmacology. 2022. No. 2(19). P. 72—83
9. Gogoi-Tiwari J., Williams, V., Waryah, C. B., Costantino, P., Al-Salami, H., Mathavan S. Mammary gland pathology subsequent to acute infection with strong versus weak biofilm forming Staphylococcus aureus bovine mastitis isolates: a pilot study using non-invasive mouse mastitis model//PLoS One. 2017. V. 12. No. 1. P. e0170668. doi: 10.1371/journal.pone.0170668. eCollection 2017.
10. Turbók J., Torniyos, G., Kocsis, R., Süle, J., Tóth, T., Buzás, H., Zomborszky, Z. Cytological and microbiological examination of bovine milk in Prototheca-infected dairy herd: Preliminary report //Acta Agraria Kaposváriensis. — 2022. — V. 26. — No. 2. — P. 87—104.
11. Canisso I. F. Diagnosis and treatment of mastitis in mares / Canisso I. F., Podico G., Ellerbrock R. E. //Equine Veterinary Education. 2021. V. 33. No. 6. C. 320—326.
12. Kawecka-Grochocka, E., Zalewska, M., Rzewuska, M. et al. Expression of cytokines in dairy cattle mammary gland parenchyma during chronic staphylococcal infection // Vet Res 52, 132 (2021). https://doi.org/10.1186/s13567—021—01003-y.
13. Tabasum Shaheen, Sheikh Bilal Ahmad, Muneeb U. Rehman, Showkeen Muzamil, Rahil Razak Bhat, Ishraq Hussain, Nazirah Bashir, Manzoor Ur Rahman Mir, Bilal Ahamad Paray, Mahmoud A. O. Dawood, Investigations on cytokines and proteins in lactating cows with and without naturally occurring mastitis, Journal of King Saud University — Science, Volume 32, Issue 6, 2020, Pages 2863—2867, ISSN1018—3647, https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.07.009.
14. Rosenberger C. M., Scott M. G., Gold M. R., Hancock R. E., Finlay B. B. Salmonella typhimurium infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. //J. Immunol. 2000. 164:5894—5904.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

E. V. Mikhaylov — Candidate of Veterinary Sciences, Principal Scientific Associate;

O. B. Pavlenko — Doctor of Biological Sciences, Chief Scientific Associate;

B. V. Shabunin — Senior Laboratory Assistant;

N. A. Strelnikov — Junior Scientific Associate;

V. S. Bolotova — Junior Scientific Associate;

M. Yu. Syromyatnikov — Senior Scientific Associate;

I. N. Latsigina — Junior Scientific Associate;

N. V. Pasko — Candidate of Biological Sciences, Principal Scientific Associate.

The article was submitted 02.11.2023.

Научная статья

УДК 636.2.082.453.1

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2023.4.201

КОНТРОЛЬ ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ У КОРОВ НА МОЛОЧНЫХ ПРЕДПРИЯТИЯХ

Владимир Семенович Авдеенко*✉, Георгий Сергеевич Никитин*,
Вадим Вадимович Ачиллов*, Виктория Александровна Гальченко**1

*Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной
медицины, Санкт-Петербург, Россия, avdeenko0106@mail.ru✉

**Волгоградский государственный аграрный университет, Волгоград, Россия

Аннотация. В данной работе установлен факт регрессии желтого тела у бесплодных коров после инъекции два дня подряд сниженной дозы в два раза препарата PGF2α-«Фертадин». Изменение уровня концентрации прогестерона в течение 72 часов составили 0,2...0,55 нг/мл при исходном значении показателя 1,7 ± 0,24 нг/мл, межгрупповые цифровые значения составляли 1,78 ± 0,33, 1,92 ± 0,76 и 1,90 ± 5,7 нг/мл, а эстрадиола — 29,0 ± 2,34, 25,0 ± 3,7 и 27,0 ± 3,70 пкг/мл. Снижение содержания концентрации прогестерона до 0,08 ± 0,02 нг/мл после проведенной инъекции препарата GnRG-«Фертагил» в дозе 2 мл произошло у животных через 48 часов. Применение препарата GnRG-«Фертагил» за 7 дней до УЗИ диагностики на беременность, у не стельных самок уменьшает количество дней для последующего введения гормонов, применяемых при синхронизации половой охоты. Процент осеменения по усовершенствованной программе синхронизации половой охоты у коров подопытной группы выше на 17,5 % в сравнении с рекомендованной программой схемы синхронизации Ovsynch-48. Это связано с тем, что применение препарата GnRG-«Фертагил» на 18 день после инсеминации у бесплодных коров способствует овуляции фолликула, что позволяет провести повторное плодотворное осеменение коров.

Ключевые слова: синхронизация половой охоты, GnRG-«Фертагил», PGF2α-«Фертадин», «Тетрамаг» и «Е-селен», инсеминация, оплодотворение.

Благодарность: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00284, <https://rsct.ru/project/23-25-00284/>

В связи с последними достижениями геномной селекции в молочном скотоводстве России возникла диспропорция между продуктивностью и фертильностью основного маточного стада [1—3]. В связи с высокими удоями молока у коров увеличились сроки прихода коров после отела в охоту, что привело к нарушению технологического темпа и ритма воспроизводства, увеличению межотельного периода, и в целом плодовитости у высокопродуктивных коров [6]. Высокая изменчивость и непредсказуемость реакции яичников на гормональную обработку у коров по-прежнему создает проблемы, влияющие на эффективность гормональных протоколов синхронизации процесса репродукции после отела [10, 12]. Предложено несколько подходов, включая определение фолликулярного статуса перед гормональной стимуляцией [9, 15] и устранение подавляющих эффектов

доминантного фолликула [5, 8], кроме того были использованы некоторые гормональные протоколы для уменьшения непредсказуемости суперовуляторной реакции яичников крупного рогатого скота [16]. Однако эти протоколы не устранили вариабельность овуляторной реакции у коров, и лучшее прогнозирование по-прежнему имеет решающее значение для применения гормональных протоколов синхронизации охоты в оптимальные технологические сроки. Растущий спрос в мире на цельномолочную и кисломолочную продукцию привел к увеличению численности молочного скота на высокотехнологических молочных предприятиях, использующих роботизирующие технологии доения, на которых изменилась репродуктивная физиология молочного скота [4, 7]. Поэтому совершенствование более эффективных протоколов синхронизации половой охоты у высокопродуктивных мо-

лочных коров является базовой для актуальных вопросов ветеринарной медицины, биотехнологии репродукции и фармацевтики [11].

Цель работы состояла в совершенствовании контроля воспроизводительной способности у коров применительно протокола синхронизации «Ovsynch-48».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для определения эффективности разработанного гормонального контроля воспроизводительной способности был проведен научно-производственный опыт в предприятиях Волгоградской

(молочный комплекс «Держава» СП «Донское» Калачаевского района) и Ленинградской (АО племенной завод «Бугры») областей по производству молока использующих системы роботизированного доения GEA Dairy ProQ и Ley Astronaut с продуктивностью коров более 11 тонн молока за лактацию в период с 2020 по 2023 гг., для этого были отобраны 100 коров голштинской породы, которых разделили поровну по принципу аналогов на две группы подопытную и контрольную.

Опыты были проведены в два этапа. На первом этапе эксперимента двум бесплодным коровам применили схему № 1, рис. 1, двум другим бесплодным коровам схему № 2, рис. 2.

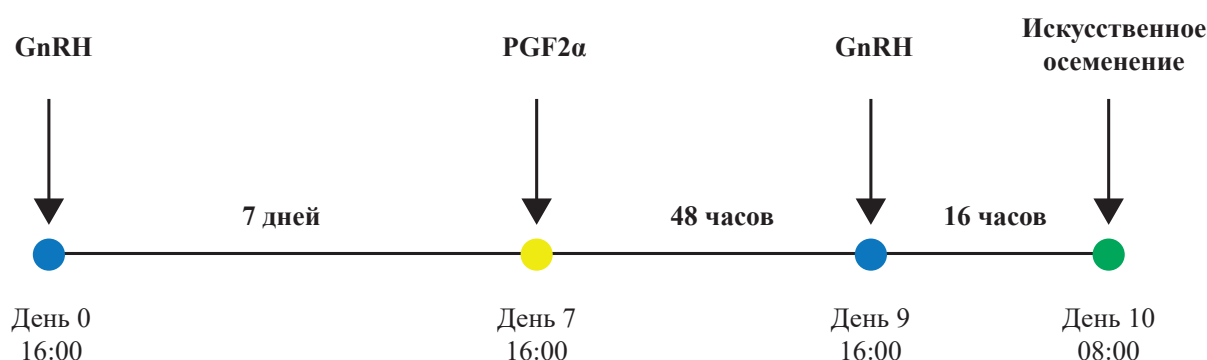


Рис. 1. Дизайн программы синхронизации половой охоты «Ovsynch-48» (контрольная группа, схема № 1)

Для определения эффективности двукратного применения препарата «Фертагил» в дозе 2,5 мл в нулевой день и на девятый день в комбинации с препаратами «Тетрамаг» в дозе 5 мл и «Е-селен» в дозе 15 мл в сочетании с препаратом «Фертадин» в дозе 2 мл с интервалом в 24 часа на седьмой день

проводили сонографическое исследование яичников, с помощью УЗИ сканера Easi-can Curve фирмы VCF Technology с диапазоном частот от 5,0 до 7,5 МГц. После получения изображений яичников интерпретировали полученные результаты снимков соноэхограмм.

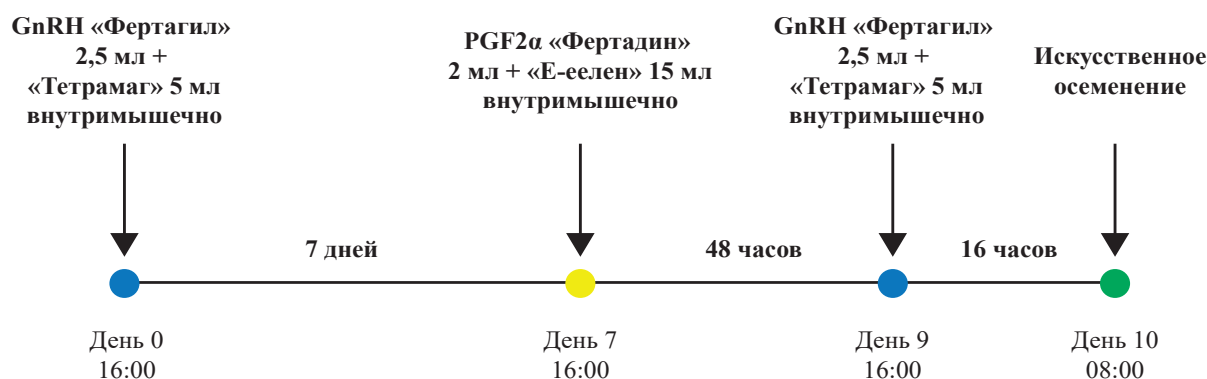


Рис. 2. Дизайн усовершенствованной программы синхронизации половой охоты (подопытная группа, схема № 2).

После завершения полного цикла клинической оценки препаратов на гормональный отклик яичников животных, после их уоя изымали яичники

фотографировали и подвергали гистологическому исследованию по методам, описанным [13]. Кровь после получения центрифугировалась в течение

5 мин со скоростью 3 000 оборотов в минуту, [14]. Определение ФСГ, ЛГ, прогестерона и эстрадиола проводили методом иммуноферментного анализа с использованием автоматического планшетного анализатора для ИФА (Германия, Human GmbH) с помощью наборов реагентов фирмы ХЕМА (Россия, Хема-Medica Co. Ltd.) — тест ФСГ-ИФА, тест ЛГ-ИФА, тест эстрадиол-ИФА.

Второй этап научно-производственного опыта провели согласно совершенствованной программы синхронизации по схеме № 2 (подопытная группа) на 48 бесплодных коровах. Для этого внутримышечно вводили гормональный препарат GnRG-«Фертагил» в дозе 2,5 мл, а также препарат «Тетрамаг», содержащий комбинацию витаминов А, D₃, Е, F. Затем через 7 дней внутримышечно инъецировали препарат PGF₂α-«Фертадин» в дозе 2 мл, а также препарат «Е-селен» и на 8 день снова препарат PGF₂α-«Фертадин» в дозе 2 мл. На 9 день инъецировали препарат GnRG-«Фертагил»

в дозе 2,5 мл в сочетании с препаратом «Тетрамаг» в дозе 5 мл, а через 16 часов проводили искусственное осеменение. В контрольной группе (48 бесплодных коров) для синхронизации половой охоты применяли гормональную схему по программе «Ovsynch-48», которая предусматривала две внутримышечные инъекции препарата GnRG-«Фертагил» в дозе 2,5 мл на 0-й и 9-й день, в промежутке между которыми на 7-й день внутримышечно инъецировали PGF₂α-«Фертадин» в дозе 5 мл.

Статистическую обработку экспериментального материала проводили на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование динамики эстрогенов в сыворотке крови у бесплодных коров, участвующих в эксперименте, максимальная концентрация эстрадиол-17β (16,1 нмоль/мл) наблюдалась, через 2...4 часа после начала эструса (рис. 3).



Рис. 3. Динамика изменения концентрации эстрадиол-17β, нмоль/мл у коров, участвующих в эксперименте

Наиболее высокую концентрацию прогестерона (6,4 нг/мл) наблюдали на 16-й день и на 12-й день (5,9 нг/мл) (рис. 4).

Размер и цифровая динамика трансформации желтого тела при пиковых значениях прогестерона после полного завершения изучения препаратов в эксперименте представлены на рисунке 5.

Объем желтых тел по данным наших исследований находился в зависимости от гормонального контроля воспроизводительной способности и зависит от концентрации эстрадиола (рис. 6).

В результате ультразвуковой диагностики желтого тела в яичниках установили, что за 2 дня до инъекции простагландина в яичниках у х коров, участвующих в первом эксперименте, наблюда-

ли большое желтое тело с лакуной посередине (рис. 7).

Гистологическое исследование гонад полученных после убоя коров, участвовавших в эксперименте, в строме яичника лютеиновая ткань проявляется в виде отчетливых экзогенных участков (рис. 8).

В центре желтого тела располагается лакуна, что хорошо просматривается на рисунке 8 (А). Размер лакуны составляет не менее 1/3 от размера желтого тела. После внутримышечной инъекции препарата GnRG-«Фертагил» и под действием двойной инъекции препарата PGF₂α-«Фертадин» с интервалом в 24 часа, происходила регрессия желтого тела, при этом лакуна исчезала и формируются фолликулы (рис. 8, В).

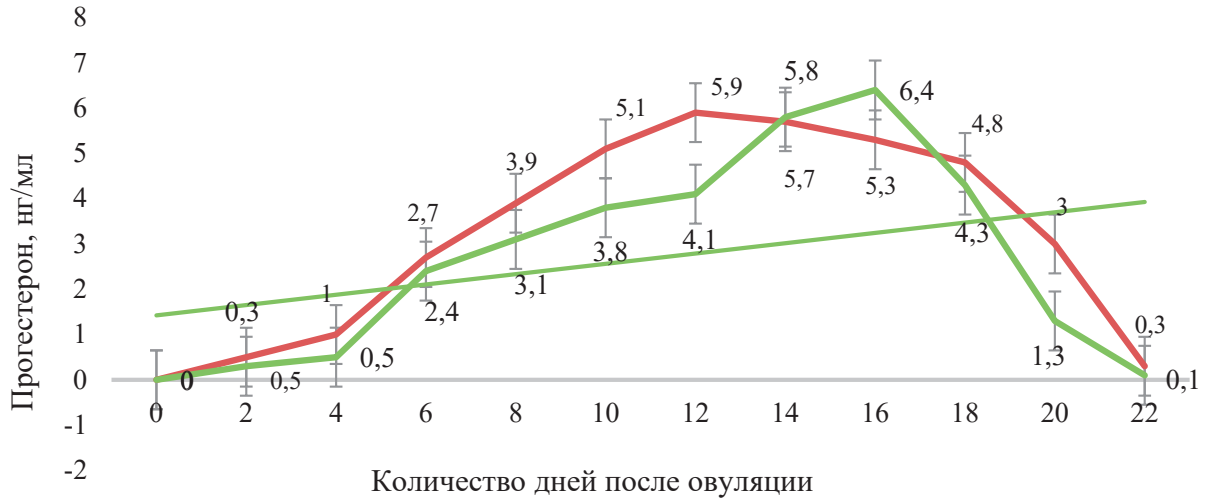


Рис. 4. Динамика концентрации прогестерона, нг/мл у х коров, участвующих в эксперименте

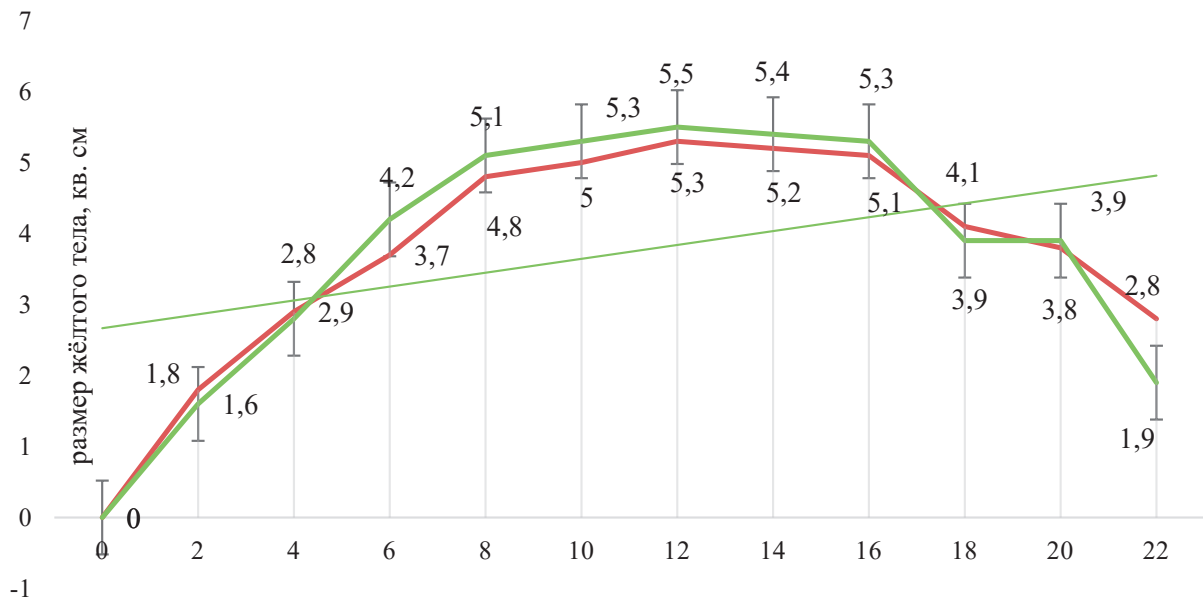


Рис. 5. Размер (см²) и трансформация желтого тела у коров, участвующих в эксперименте

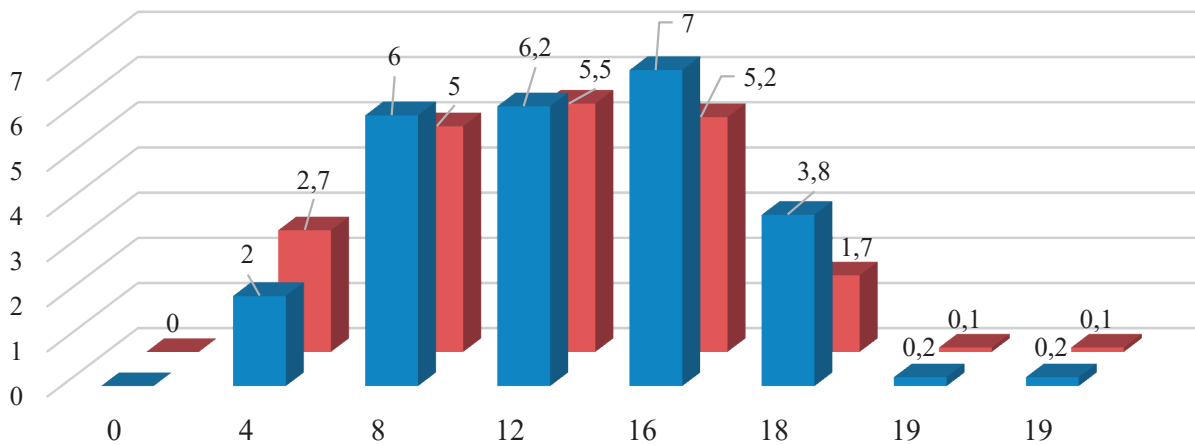


Рис. 6. Динамика объема желтого тела (см³) у коров, участвовавших в научно-производственном опыте

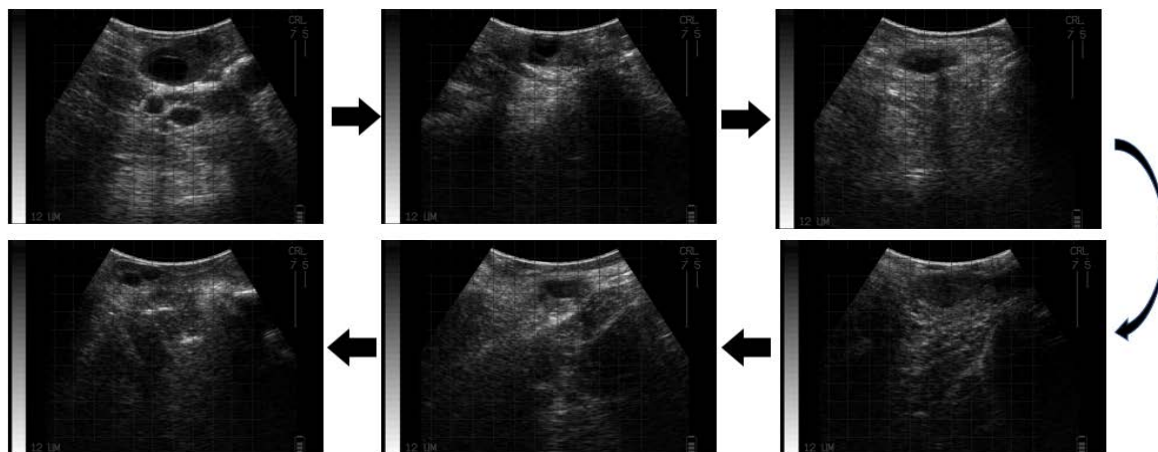


Рис. 7. Этапы регрессии желтого тела после инъекции GnRG- «Фертагил» и под действием двойной инъекции PGF2α-«Фертадин» с интервалом в 24 часа

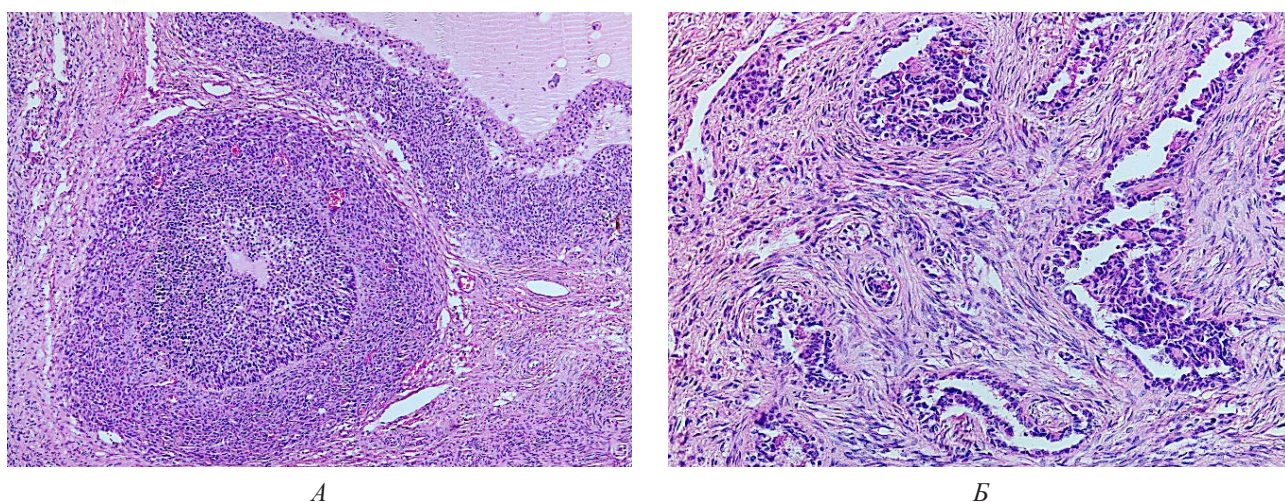


Рис. 8. Желтое тело до применения препарата «Фертадин» в комбинации с препаратом «Фертагил»: А — до введения; Б — после введения; О.х 200 ГЭ

С целью изучения параметров продолжительности регрессии желтого тела, диаметра фолликулов и интервала времени до овуляции был про-

веден научно-производственный опыт на коровах с различным протоколом контроля воспроизводительной способности (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительный гормональный контроль воспроизводительной способности у коров по программе Ovsynch-48

Показатели	Усовершенствованная программа синхронизации «Ovsynch-48», n = 48	Программа синхронизации «Ovsynch-48», n = 48
Продолжительность регрессии желтого тела, дней	2,12 ± 0,35*	3,65 ± 0,17
Диаметр фолликула перед овуляцией, мм	13,3 ± 0,62**	15,38 ± 0,32
Интервал времени от начала течки до овуляции, час	21,63 ± 0,55*	25,71 ± 0,71

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Интервал времени от первых признаков охоты после синхронизации охоты по программе «Ovsynch-48» до овуляции составил $25,71 \pm 0,71$ часа, против $21,63 \pm 0,55$ часов по предлагаемому протоколу, $p < 0,05$. При этом продолжительность существования желтого тела у коров, при синхронизированном половом цикле составляла $3,65 \pm 0,17$ дней, а в усовершенствованную — $2,12 \pm 0,35$ дней.

Диаметр фолликула составил, в среднем, $15,38 \pm 0,32$ мм, $p < 0,05$ при синхронизации охоты

по программе «Ovsynch-48» (схема № 1), против — $13,3 \pm 0,62$ мм в усовершенствованную программу (схема № 2).

Изменения уровня концентрации прогестерона в течение 72 часов составили лишь $0,2 \dots 0,55$ нг/мл при исходном значении показателя $1,7 \pm 0,24$ нг/мл. Концентрация прогестерона по группам после синхронизации составляла $18,52 \pm 0,76$ нг/мл у коров через 48 часов. Эффект снижения концентрации прогестерона у коров, участвующих в опыте представлен в данных рисунок 9.

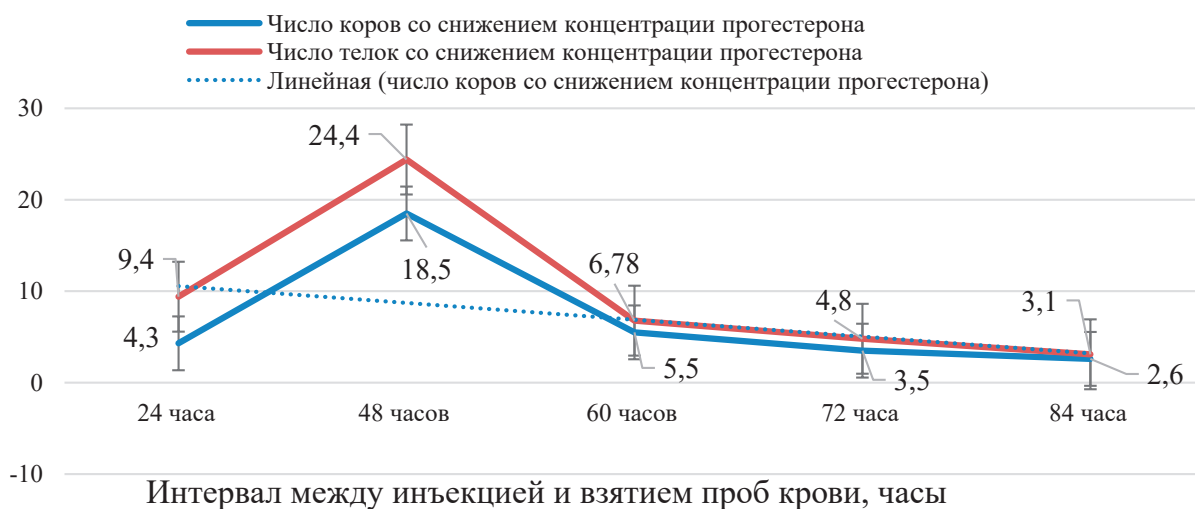


Рис. 9. Динамика гормонального профиля прогестерона у коров, участвовавших в научно-производственном опыте

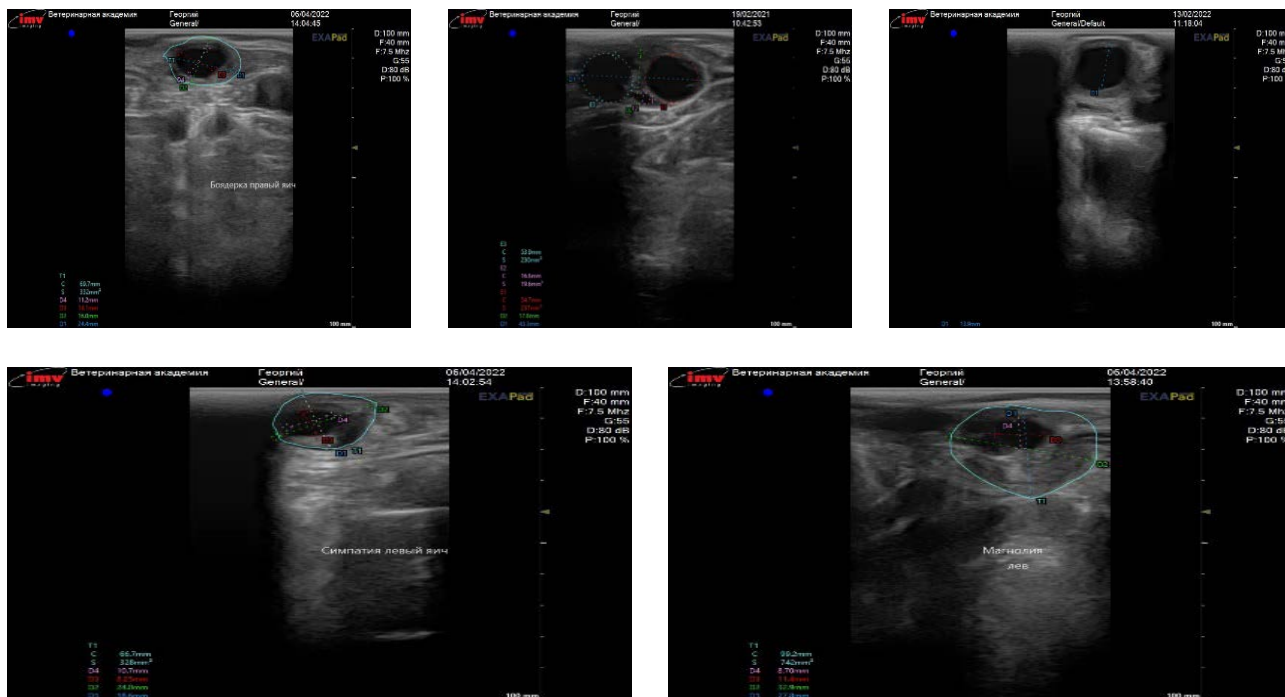


Рис. 10. Эхограмма яичников у коров после применения различных способов синхронизации: 1 — программа «Ovsynch-48»; 2 — усовершенствованная программа «Ovsynch-48»; 3 — контрольная, спонтанная

Эффективность после синхронизации охоты по программе «Ovsynch-48» определяли в результате сравнительного анализа количества стельных животных при ректальном УЗИ — исследовании через 32 дня, таблица 2.

Из данных табл. 2 следует, что процент осеменения по испытанной и предлагаемой программе синхронизации половой охоты у коров подопытной группы выше на 15,05 % по сравнению с базовой схемой «Ovsynch-48» использующейся на молочных предприятиях, рекламируемых зарубежными специалистами.

Это связано с тем, что инъекция GnRG-«Фертагил» в сочетании с препаратом PGF₂α-

«Фертадин» в комбинации с препаратами «Тетрамаг» и «Е-селен» на 18 день после первого искусственного осеменения у не стельных коров способствует овуляции доминирующего фолликула, что позволяет провести повторное осеменение коров. При наличии стельных коров на 18 день беременности инъекция GnRG-«Фертагил» позволяет профилактировать раннюю эмбриопатию. Также на 25 день, что составляет за 7 дней до УЗИ на беременность, введение GnRG-«Фертагил» для не стельных самок сокращает количество дней для последующего введения гормонов для синхронизации половой охоты, тем самым сокращая количество дней до плодотворного осеменения.

Таблица 2

Сравнительная оценка эффективности программ синхронизации половой охоты

Показатели	Усовершенствованная программа синхронизации Ovsynch-48 = 40	Программа синхронизации Ovsynch-48, n = 40
Количество отобранных коров, n	48	48
Процент коров, проявивших эструс, %	40/83,12	38/79,19
Количество стельных коров, n	33	28
Процент коров от первого осеменения, %	25/80,33	18/64,28

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлены результаты сравнительной оценки эффективности усовершенствованного способа синхронизации половой охоты в сравнении с программой синхронизации «Ovsynch-48». Продолжительность цикла, в среднем, в синхронизированную охоту по программе «Ovsynch-48» составила $18,79 \pm 0,91$ дней, против $21,19 \pm 0,44$ дней в усовершенствованную программу синхронизации «Ovsynch-48». Размеры доминантного фолликула составили, в среднем, $15,38 \pm 0,32$ мм, $p < 0,05$ в диаметре при синхронизации охоты по программе «Ovsynch-48», против — $13,3 \pm 0,62$ мм в усовершенствованную программу синхронизации охоты. Установлено, что внутримышечное введение два дня подряд уменьшенной дозы простагландина PGF₂α-«Фертадин» способствует быстрой регрессии желтого тела. Процент осеменения по программе синхронизации половой охоты у коров подопытной группы выше на 15,05 % по сравнению со схемой синхронизации «Ovsynch-48». Это связано с тем, что инъекция GnRG- «Фертагил» на 18 день после первого искусственного осеменения

у бесплодных коров способствует овуляции доминирующего фолликула, что позволяет провести повторное плодотворное осеменение коров.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Апробация гормональных препаратов для синхронизации полового цикла и индукции овуляции у мясного скота. /Авдеенко В. С., [и др.] // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — № 3(71). — 2018. — № 4. — С. 190—193.
2. Биотехника воспроизводства с основами акушерства. /Авдеенко В.С., Федотов С. В.// Москва. — 2022. — 454 с.
3. Информативные методы диагностики заболеваний молочной железы и матки в ранний пуэперальный период. / Кочарян В. Д., [и др.] // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. — 2020. — № 3 (59). — С. 308—317.
4. Гальченко В. А. Определение эффективности ультразвукового исследования яичников при синхронизации половой охоты у коров / В. А. Гальченко, С. П. Перерядкина, Г. О. Лисиченко // Международный вестник ветеринарии. — 2022. — № 1. — С. 180—185.

5. Galchenko V. A. The determination of the hormonal program efficiency in estrus synchronization of high-yield cows for sustainable agricultural development / Galchenko V. A., [et. al.] // В сборнике: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Сер. «AgroINNOVATION: Innovative Solutions in the Agro-Industrial Complex, AroINNOVATION2021» 2022. — С. 012—02
6. Townson D. H. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. / Townson, D. H., Tsang, C. W., Butler // J. Arum. Sci. — 2002. — 80: P. 1053—1058.
7. Fontaubert Y. Synchronisation des chaleurs chez la vache laitière: bilan de l'utilisation du Synchro-Mate. / Fontaubert, Y., Cochaud J., Terqui M. // В pendant cinq années successives. Prod. anim. — 1989. — V.2. — N.5. — С.317—323.
8. Fontaubert Y. La maîtrise des cycle sexuel chez les bovines. Le point en 1988 // Prod. anim. — 1988. — N.3. — P. 179—187.
9. Extending the duration of the voluntary waiting period from 60 to 88 days in cows that received timed artificial insemination after the Double-Ovsynch protocol affected the reproductive performance, herd exit dynamics, and lactation performance of dairy cows / M. L. Stangaferro, [et. al.] // J. Dairy Sci. — 2018. — Jan; 101(1). — P.717—735. doi: 10.3168/jds.2017—13046.
10. Lactating dairy cows managed for second and greater artificial insemination services with the Short-Resynch or Day 25 Resynch program had similar reproductive performance / M. M. Pérez, [et. al.] // J. Dairy Sci. — 2020. Nov; 103(11). — P.10769—10783. doi: 10.3168/jds.2020—18607.
11. Reproductive performance and herd exit dynamics of lactating dairy cows managed for first service with the presynch-ovsynch or double-ovsynch protocol and different duration of the voluntary waiting period / M. L. Stangaferro, [et. al.] // J. Dairy Sci. — 2018. — 101(2). P.1673—1686. doi: 10.3168/jds.2017—13425.
12. Sauls-Hiesterman, J. A., Stevenson First postpartum ovulation, metabolites and hormones in follicular fluid and blood in transition dairy cows supplemented with a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product. / Sauls-Hiesterman J. A., [et. al.] // Theriogenology. — 2021 Apr 1; 164: C. 12—21.
13. Hadjilobcas S. Measurements of Leaf Water Content Using Terahertz. — IEEE / Hadjilobcas S., Karata's L.S., Bowen J. W. // Trans on microwave theory and techniques. — 1999. — v. — 47 — № 2. — С. 342—357.
14. A predictive model for pregnancy development thoroughbred mares with placental insufficiency and its correction. / Avdeenko V. S., [et. al.] // Biomedical and Pharmacology Journal. — 2015. — Т.8.№ 2. — С. 581—589.
15. Механизм развития синдрома «кетоз-гестоз» у беременных коров и эффективность применения антиоксидантных препаратов. / Авдеенко В. С. [et. al.] // Аграрный вестник Урала. 2016. № 8 (150). С. 4—9.
16. Honnens A. Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle. Uterine blood flow in superovulated cattle. Theriogenology. — 2008. — 70(5). P.859—867. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

В. С. Авдеенко — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий;

Г. С. Никитин — кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий;

В. В. Ачилов — кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий;

В. А. Гальченко — аспирант кафедры акушерства и терапии.

Статья поступила в редакцию 15.11.2023 г.

CONTROL OF THE REPRODUCTIVE ABILITY OF COWS AT DAIRY ENTERPRISES

Vladimir Semenovich Avdeenko*✉, Georgiy Sergeevich Nikitin*, Vadim Vadimovich Achilov*,
Viktoriya Aleksandrovna Galchenko**1

*St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia, avdeenko0106@mail.ru✉

**Volgograd State Agrarian University, Volgograd, Russia

Abstract. This work established the fact of regression of the corpus luteum in infertile cows after injection for two days in a row of a halved dose of the drug PGF2 α -“Fertadin”. The change in the level of progesterone concentration within 72 hours was 0.2...0.55 ng/ml with the initial value of 1.7 \pm 0.24 ng/ml, intergroup digital values were 1.78 \pm 0.33, 1.92 \pm 0.76 and 1.90 \pm 5.7 ng/ml, and estradiol — 29.0 \pm 2.34, 25.0 \pm 3.7 and 27.0 \pm 3.70 pg/ml. A decrease in progesterone concentration to 0.08 \pm 0.02 ng/ml after injection of the drug GnRG-“Fertagyl” at a dose of 2 ml occurred in animals in 48 hours. The use of the drug GnRG-“Fertagyl” 7 days before ultrasound diagnostics for pregnancy in non-pregnant females reduces the number of days for the subsequent administration of hormones used to synchronize estrus. The percentage of insemination according to the improved estrus synchronization program in the cows of the experimental group was by 17.5 % higher, in comparison with the synchronization scheme “Ovsynch-48” recommended by the program. This is due to the fact that the use of the drug GnRG-“Fertagyl” on day 18 after insemination in infertile cows promotes ovulation of the follicle, which allows for repeated successful insemination of cows.

Keywords: estrus synchronization, GnRG-“Fertagyl”, PGF2 α -“Fertadin”, “Tetramag” and “E-selen”, insemination, fertilization.

Acknowledgment: The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-26-00284, <https://rsct.ru/project/23-25-00284/>

In connection with the latest achievements of genomic selection in dairy cattle breeding in Russia, a disproportion has arisen between the productivity and fertility of the main breeding stock [1—3]. Due to the high milk yields of cows, there increased the timing of the estrus onset in cows after calving, which led to a violation of the technological pace and rhythm of reproduction, an increase in the calving interval period, and in general fertility in high yielding cows [6]. The high variability and unpredictability of the ovarian response to hormonal treatment in cows still creates problems affecting the efficacy of hormonal programs for synchronizing the reproduction process after calving [10, 12]. Several approaches have been proposed, including determining the follicular status before hormonal stimulation [9, 15] and eliminating the suppressive effects of the dominant follicle [5, 8], in addition, some hormonal programs have been used to reduce the unpredictability of the superovulatory reaction of the ovaries of cattle [16]. However, these methods have not eliminated the variability of the ovulatory

response in cows, and better prediction is still crucial for the application of hormonal estrus synchronization programs in optimal technological terms. The growing demand for whole milk and fermented milk products in the world has led to an increase in the number of dairy cattle at high-tech dairy enterprises using robotic milking technologies, which have changed the reproductive physiology of dairy cattle [4, 7]. Therefore, the improvement of more effective programs for estrus synchronization in high yielding dairy cows is the basis for topical issues of veterinary medicine, reproduction biotechnology and pharmacy [11].

The objective of the work was to improve the control of reproductive ability in cows using the synchronization protocol “Ovsynch-48”.

MATERIAL AND METHODS

To determine the efficacy of the developed hormonal control of reproductive ability, scientific and production experience was conducted at enterprises of Volgograd (dairy complex “Derzhava”, JV (Joint

Venture) “Donskoye”, Kalachaevskiy r.) and Leningrad (JSC breeding plant “Bugry”) regions for milk production using GEA Dairy ProQ and Ley Astronaut robotic milking systems with cow productivity of more than 11 tons of milk per lactation in the period from 2020 to 2023. One hundred (100) Holstein cows were selected for this purpose and were divided equally according to the principle of analogues into two groups, experimental and control.

The experiments were carried out in two stages. At the first stage of the experiment, scheme No. 1 was used for two infertile cows, Fig. 1 and scheme No. 2 were used for two other infertile cows (Fig. 2).

To determine the efficacy of the double use of the drug “Fertagyl” at a dose of 2.5 ml on day 0 and on day 9 in combination with the drugs “Tetramag” at a dose of 5 ml and “E-selen” at a dose of 15 ml in combination with the drug “Fertadin” at a dose of 2 ml with an

interval of 24 hours on day 7, a sonographic examination of the ovaries was performed using the Easi-scan Curve ultrasound scanner of BCF Technology with a frequency range from 5.0 to 7.5 MHz. After receiving ovarian images, the results of sonoechogram images were interpreted.

After completing a full cycle of clinical evaluation of drugs for the hormonal response of the ovaries of animals, after their slaughter, the ovaries were removed, photographed and subjected to histological examination according to the methods described [13]. After obtaining, the blood was centrifuged for 5 minutes at a speed of 3000 rpm, [14]. Determination of FSH, LH, progesterone and estradiol was carried out by enzyme immunoassay using an automatic plate analyzer of ELISA/IEA (Germany, Human GmbH), using reagent kits of XEMA (Russia, Xema-Medica Co. Ltd.) — FSH-IEA test, LH-IEA test, estradiol-IEA test.

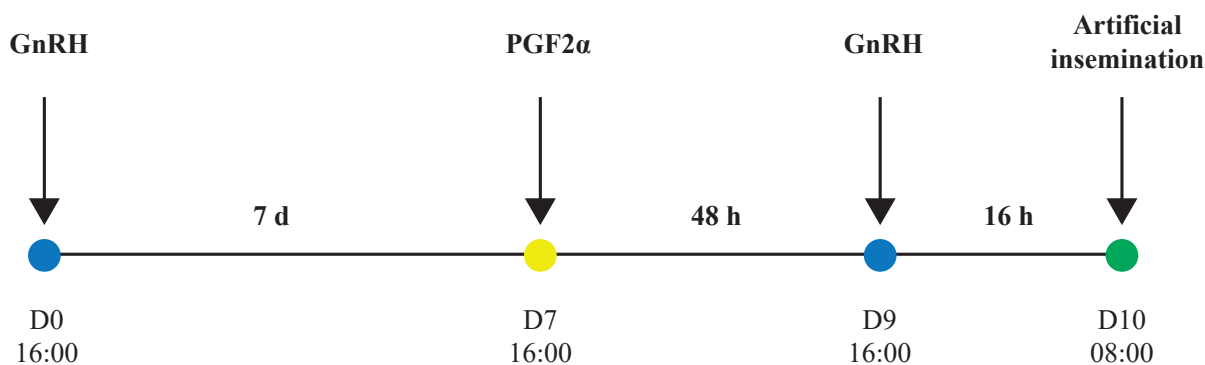


Fig. 1. Design of the estrus synchronization program “Ovsynch-48” (control group, scheme No. 1)

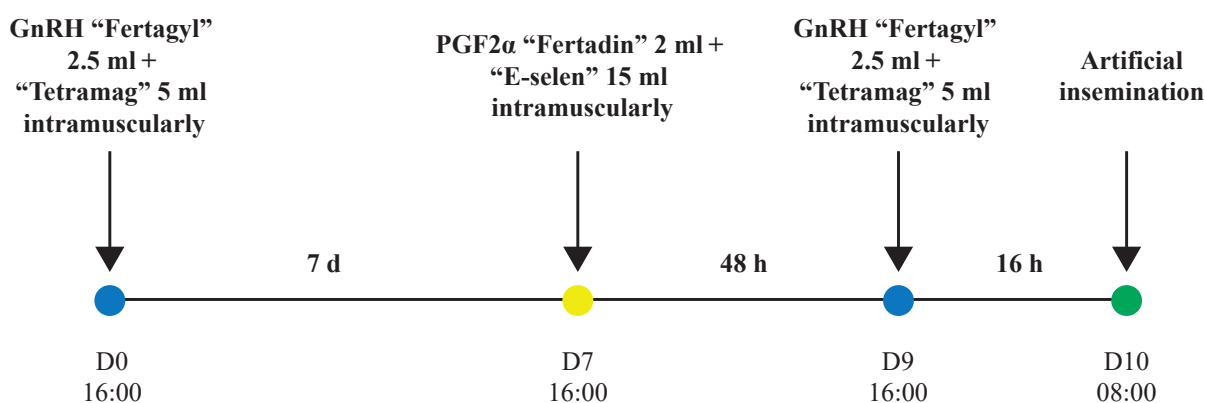


Fig. 2. Design of an improved estrus synchronization program (experimental group, scheme No. 2)

The second stage of the research and production experiment was carried out according to the improved synchronization program according to scheme No. 2 (experimental group) on 48 infertile cows. To do this, the hormonal drug GnRH-“Fertagyl” was intramuscularly injected at a dose of 2.5 ml, as well as the drug

“Tetramag” containing a combination of vitamins A, D₃, E, F. Then, 7 days after, the drug PGF₂α-“Fertadin” was intramuscularly injected at a dose of 2 ml, as well as the drug “E-selen”, on day 8 again, the drug PGF₂α-“Fertadin” at a dose of 2 ml. On day 9, GnRH-“Fertagyl” was injected at a dose of 2.5 ml in combi-

nation with “Tetramag” at a dose of 5 ml, and artificial insemination was performed 16 hours later. In the control group (48 infertile cows), a hormonal scheme according to the program “Ovsynch-48” was used to synchronize estrus, which provided for two intramuscular injections of GnRG-“Fertagyl” at a dose of 2.5 ml on day 0 and day 9, between which PGF₂α-“Fertadin” was intramuscularly injected at a dose of 5 ml on day 7.

Statistical processing of the experimental material was carried out on a personal computer using the Microsoft Excel program.

STUDY RESULTS

The study of the dynamics of estrogen in the blood serum of infertile cows included in the experiment showed that the maximum concentration of estradiol-17β (16.1 nmol/ml) was observed 2...4 h after the estrus onset (Fig. 3).

The highest concentration of progesterone (6.4 ng/ml) was observed on day 16 and on day 12 (5.9 ng/ml) (Fig. 4).

The size and digital dynamics of the transformation of the corpus luteum at peak values of progesterone after the complete study of the drugs in the experiment are presented in Fig. 5.

The volume of corpora lutea according to our studies is dependent on hormonal control of reproductive ability and depends on the concentration of estradiol (Fig. 6).

As a result of ultrasound diagnostics of the corpus luteum in the ovaries, it was established that 2 days before the injection of prostaglandin in the ovaries of the cows included in the first experiment, a large corpus luteum with a lacuna in the middle was observed (Fig. 7).

In the center of the corpus luteum there is a lacuna, which is clearly visible in Fig. 8 (A). The size of the lacuna is at least 1/3 of the corpus luteum size. After an intramuscular injection of the drug GnRG-“Fertagyl” and under the effect of a double injection of the drug PGF₂α-“Fertadin” with an interval of 24 hours, regression of the corpus luteum occurred, while the lacuna disappeared and follicles were formed (Fig. 8 (B)).

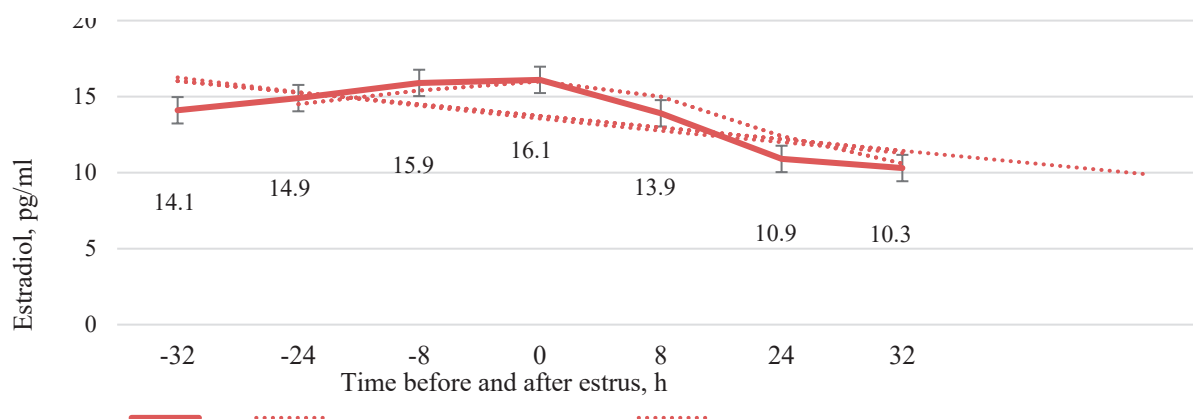


Fig. 3. Dynamics of changes in the concentration of estradiol-17β (nmol/ml) in cows included in the experiment.

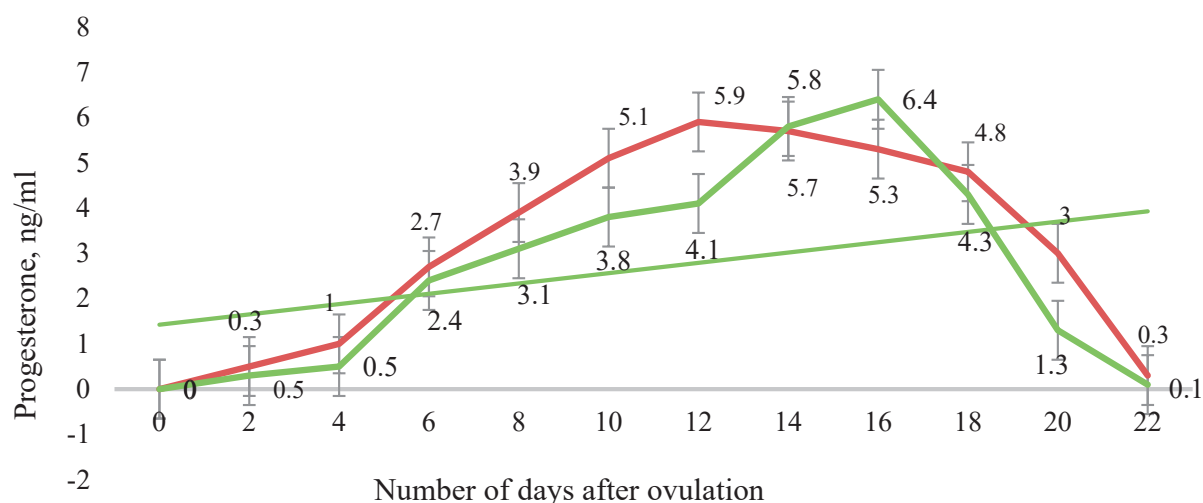


Fig. 4. Dynamics of progesterone concentration (ng/ml) in the cows included in the experiment

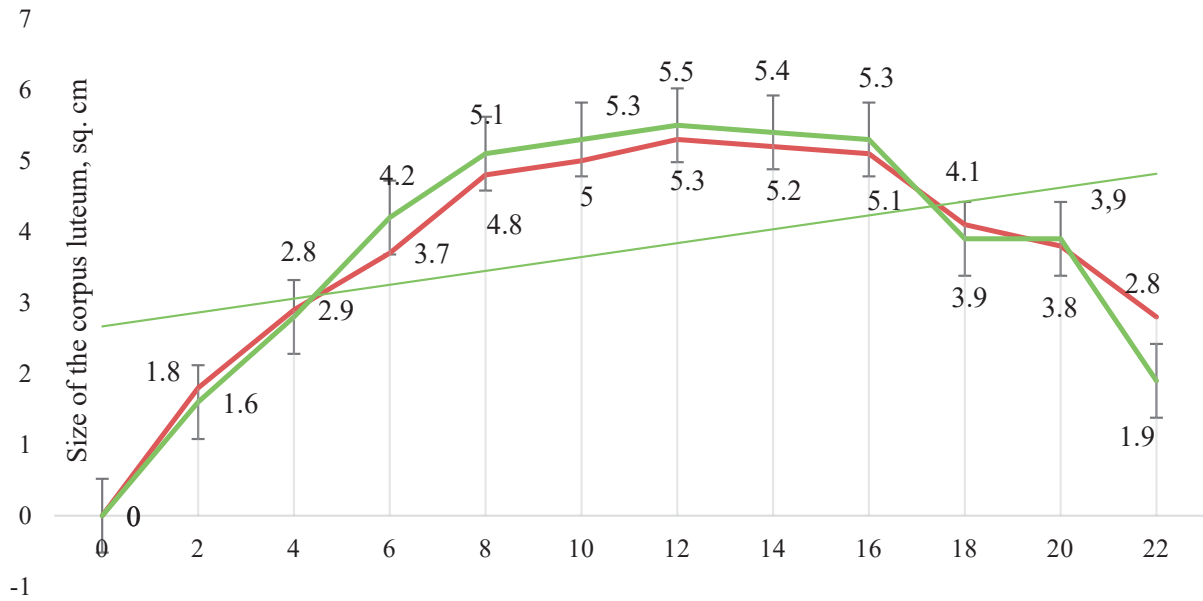


Fig. 5. Size and transformation of the corpus luteum in the cows included in the experiment, cm²

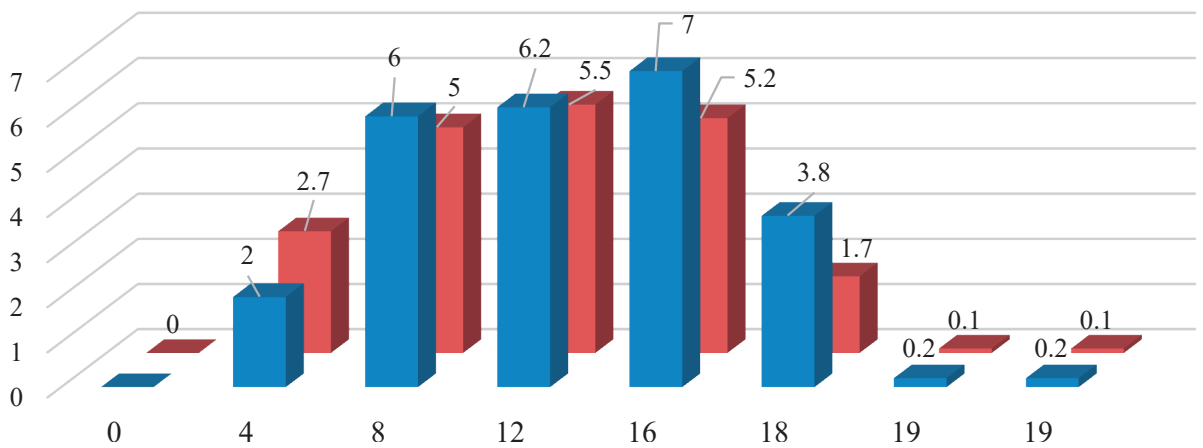


Fig. 6. Dynamics of the volume of the corpus luteum in the cows included in the research and production experiment, cm³

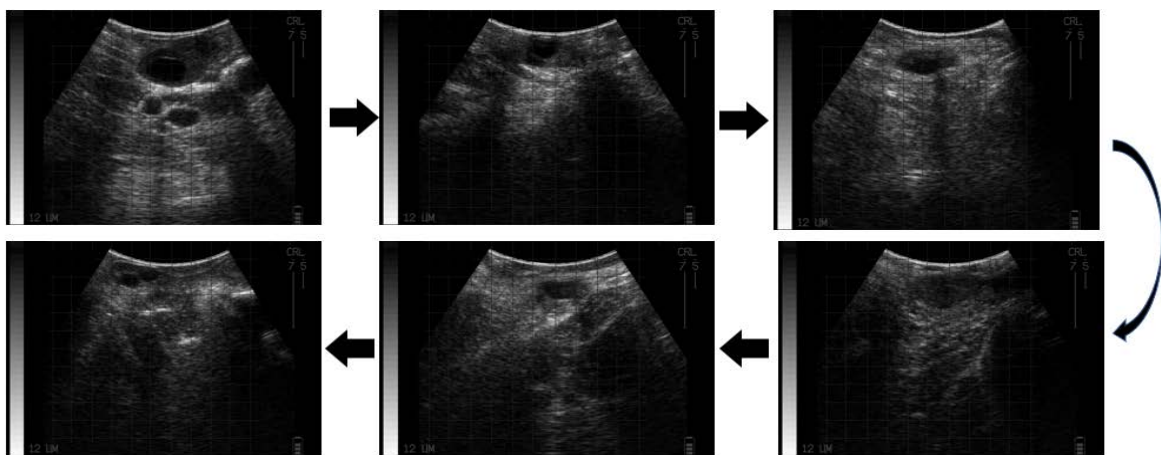


Fig. 7. Stages of the corpus luteum regression after injection of GnRG-“Fertagyl” and under the effect of double injection of PGF₂α-“Fertadin” with an interval of 24 hours

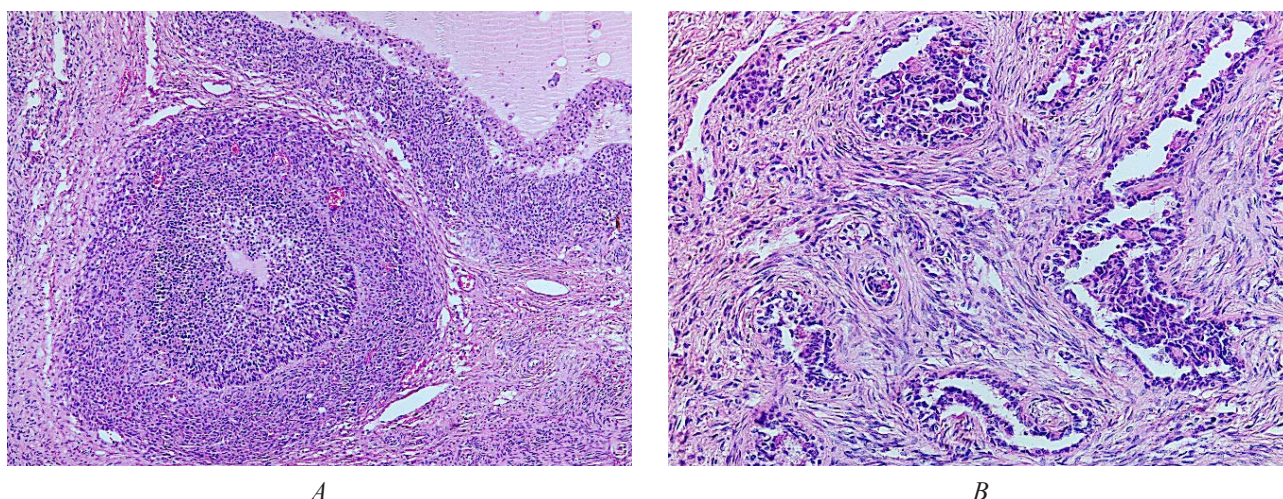


Fig. 8. Corpus luteum before using the drug “Fertadin” in combination with the drug “Fertagyl”:
A — before administration; B — after administration, x200

In order to study the duration parameters of the regression of the corpus luteum, the diameter of the follicles and the time interval before ovulation, a sci-

entific and production experiment was carried out on cows with different protocols for monitoring reproductive ability (Table 1).

Table 1

Comparative hormonal control of reproductive capacity in cows using the program “Ovsynch-48”

Indicators	Improved synchronization program «Ovsynch-48», <i>n</i> = 48	Synchronization program «Ovsynch-48», <i>n</i> = 48
Duration of the corpus luteum regression, d	2.12 ± 0.35*	3.65 ± 0.17
Follicle diameter before ovulation, mm	13.3 ± 0.62**	15.38 ± 0.32
Time interval from the estrus onset to ovulation, h	21.63 ± 0.55*	25.71 ± 0.71

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

The time interval from the first signs of estrus after estrus synchronization to ovulation according to the program “Ovsynch-48” was 25.71 ± 0.71 h versus 21.63 ± 0.55 h according to the proposed protocol, $p < 0.05$. At the same time, the duration of the corpus luteum existence in the cows with a synchronized sexual cycle was 3.65 ± 0.17 d, and in an improved one — 2.12 ± 0.35 d.

The follicle diameter was, on average, 15.38 ± 0.32 mm, $p < 0.05$ at the estrus synchronization according to the program “Ovsynch-48” (scheme No. 1) versus 13.3 ± 0.62 mm in the improved program (scheme No. 2).

The changes in the level of progesterone concentration within 72 hours were only 0.2...0.55 ng/ml with an initial value of 1.7 ± 0.24 ng/ml. Progesterone

concentration in the groups after synchronization was 18.52 ± 0.76 ng/ml in cows in 48 hours. The effect of reducing progesterone concentration in the cows included in the experiment is presented in Fig. 9.

This is due to the fact that the injection of GnRG-“Fertagyl” in combination with the drug PGF₂α-“Fertadin” in combination with the drugs “Tetramag” and “E-selen” on day 18 after the first artificial insemination in non-pregnant cows promotes ovulation of the dominant follicle, which allows for the re-insemination of cows. If there are pregnant cows, on day 18 of pregnancy, the injection of GnRG-“Fertagyl” helps prevent early embryopathy.

On day 25, which is 7 days before pregnancy ultrasound, the administration of GnRG-“Fertagyl” for non-pregnant females also reduces the number of

days for the subsequent administration of hormones to synchronize estrus, thereby reducing the number of days before successful insemination. Efficacy after estrus synchronization according to the program

“Ovsynch-48” was determined as a result of a comparative analysis of the number of pregnant animals during rectal ultrasound examination in 32 days (Table 2).

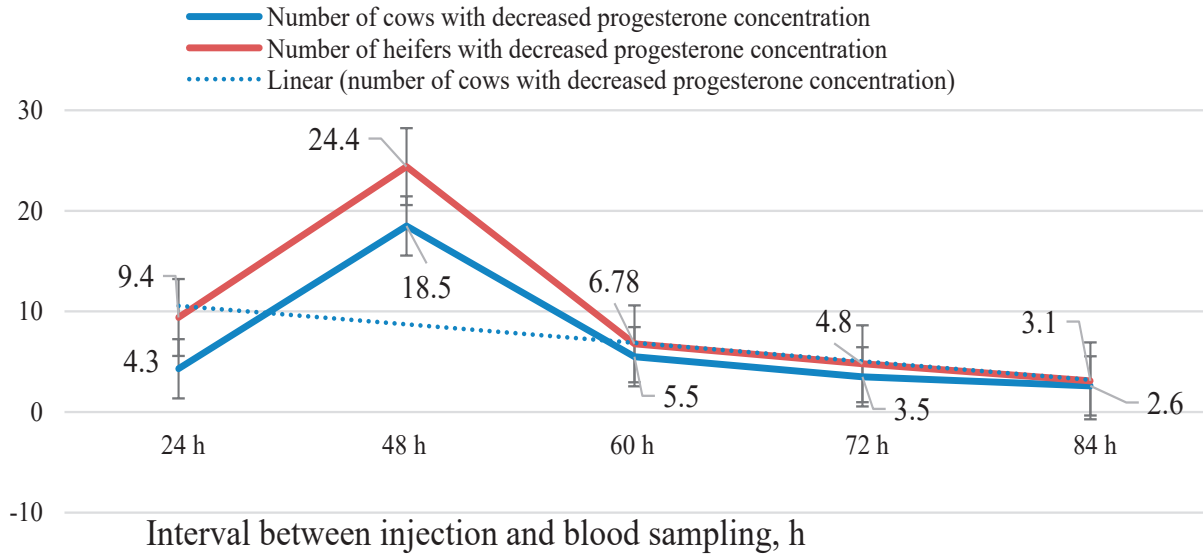


Fig. 9. Dynamics of the hormonal profile of progesterone in the cows included in the research and production experiment, ng/ml

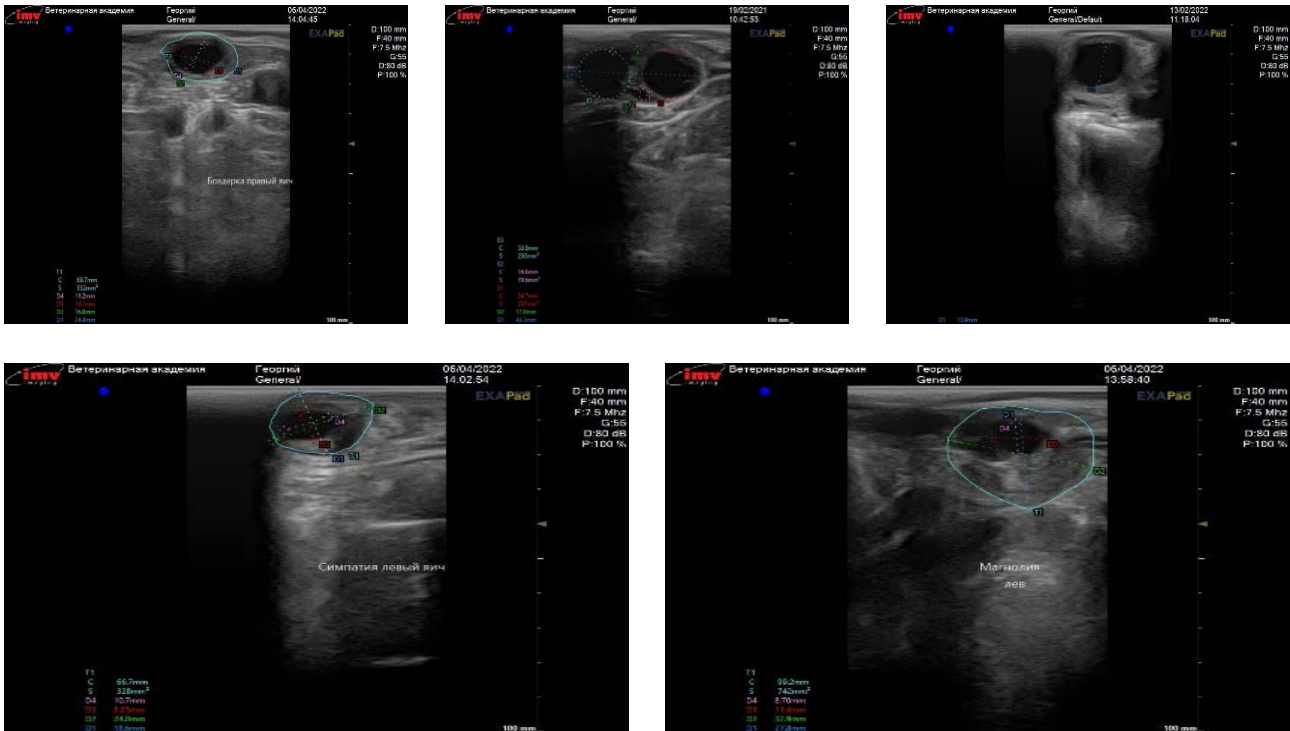


Fig. 10. Echogram of the ovaries in cows after using various synchronization methods: 1 — program “Ovsynch-48”; 2 — improved program “Ovsynch-48”; 3 — control, spontaneous

From the data in Table 2 it follows that the percentage of insemination according to the tested and proposed estrus synchronization program in the cows

of the experimental group is by 15.05 % higher, compared to the basic “Ovsynch-48” scheme used at dairy enterprises advertised by foreign experts.

Table 2

Comparative assessment of the efficacy of estrus synchronization programs

Indicators	Improved synchronization program «Ovsynch-48», <i>n</i> = 40	Synchronization program «Ovsynch-48», <i>n</i> = 40
Number of selected cows, <i>n</i>	48	48
Percentage of cows showing estrus, %	40/83.12	38/79.19
Number of pregnant cows, <i>n</i>	33	28
Percentage of cows from first insemination, %	25/80.33	18/64.28

CONCLUSION

The results of a comparative assessment of the efficacy of the improved method of synchronizing estrus in comparison with the synchronization program “Ovsynch-48” are presented. The duration of the cycle, on average, in synchronized estrus according to the program “Ovsynch-48” was 18.79 ± 0.91 d versus 21.19 ± 0.44 d according to the improved synchronization program “Ovsynch-48”. The size of the dominant follicle was, on average, 15.38 ± 0.32 mm, $p < 0.05$ in diameter at estrus synchronization using the program “Ovsynch-48” versus 13.3 ± 0.62 mm according to the improved estrus synchronization program. It has been established that intramuscular administration of a reduced dose of prostaglandin $\text{PGF}_2\alpha$ —“Fertadin” for two days in a row promotes rapid regression of the corpus luteum. The percentage of insemination according to the estrus synchronization program in the cows of the experimental group is by 15.05 % higher, compared to the synchronization scheme “Ovsynch-48”. This is due to the fact that the injection of GnRG—“Fertagyl” on day 18 after the first artificial insemination in infertile cows promotes ovulation of the dominant follicle, which allows for repeated successful insemination of cows.

REFERENCES

1. Testing of hormonal drugs to synchronize the sexual cycle and induce ovulation in beef cattle. / *Avdeenko V. S.*, [et al.] // *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [News of Orenburg State Agrarian University]. — No. 3(71). — 2018. — No. 4. — P. 190—193.
2. Biotechnology of reproduction with the basics of obstetrics. / *Avdeenko V. S.*, *Fedotov S. V.* // Moscow. — 2022. — 454 p.
3. Informative methods for diagnosing diseases of the mammary gland and uterus in the early puerperal period. / *Kocharyan V. D.*, [et al.] // *Izvestiya Nizhnevolzhskogo agrouniversitetskogo kompleksa: Nauka i vysshee profes-*

sionalnoe obrazovanie [News of Nizhnevolzhskiy Agrouniversity Complex: Science and higher professional education]. — 2020. — No. 3 (59). — P. 308—317.

1. *Galchenko V. A.* Determination of the efficacy of ultrasound examination of the ovaries during the estrus synchronization in cows / *V. A. Galchenko, S. P. Pereryadkina, G. O. Lisichenko* // *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii* (International Bulletin of Veterinary Medicine). — 2022. — No. 1. — P. 180—185.

2. *Galchenko V. A.* The determination of the hormonal program efficiency in estrus synchronization of high-yield cows for sustainable agricultural development / *Galchenko V. A.*, [et. al.] // In the collection of papers: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Ser. “AgroINNOVATION: Innovative Solutions in the Agro-Industrial Complex, AroINNOVATION2021” 2022. — P. 012—02

3. *Townson D. H.* Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. / *Townson, D. H., Tsang, C. W., Butler* // *J. Arum. Sci.* — 2002. — 80: P. 1053—1058.

4. *Fontaubert Y.* Synchronisation des chaleurs chez la vache laitière: bilan de l’utilisation du Synchro-Mate. / *Fontaubert, Y., Cochaud J., Terqui M.* // B pendant cinq années successives. *Prod. anim.* — 1989. — V.2. — N.5. — S.317—323.

5. *Fontaubert Y.* La maîtrise des cycle sexuel chez les bovines. Le point en 1988 // *Prod. anim.* — 1988. — N.3. — P. 179—187.

6. Extending the duration of the voluntary waiting period from 60 to 88 days in cows that received timed artificial insemination after the Double-Ovsynch protocol affected the reproductive performance, herd exit dynamics, and lactation performance of dairy cows / *M. L. Stangaferro*, [et. al.] // *J. Dairy Sci.* — 2018. — Jan; 101(1). — P.717—735. doi: 10.3168/jds.2017—13046.

7. Lactating dairy cows managed for second and greater artificial insemination services with the Short-Resynch or Day 25 Resynch program had similar reproductive performance / *M. M. Pérez*, [et. al.] // *J. Dairy Sci.* — 2020. Nov;103(11). — P.10769—10783. doi: 10.3168/jds.2020—18607.

8. Reproductive performance and herd exit dynamics of lactating dairy cows managed for first service with the presynch-ovsynch or double-ovsynch protocol and different duration of the voluntary waiting period /M. L. Stangaferro, [et. al.] // J. Dairy Sci. — 2018. — 101(2). P.1673—1686. doi: 10.3168/jds.2017—13425.

9. *Sauls-Hiesterman, J. A.*, Stevenson First postpartum ovulation, metabolites and hormones in follicular fluid and blood in transition dairy cows supplemented with a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product. / *Sauls-Hiesterman J. A.*, [et. al.] // *Theriogenology*. — 2021 Apr 1; 164: P. 12—21.

10. *Hadjilobcas S.* Measurements of Leaf Water Content Using Terahertz. — *IEEE / Hadjilobcas S.*, Karata's

L.S., Bowen J. W. // *Trans on microwave theory and techniques*. — 1999. — v. — 47 — No. 2. — P. 342—357.

11. A predictive model for pregnancy development thoroughbred mares with placental insufficiency and its correction. / *Avdeenko V. S.*, [et. al.] // *Biomedical and Pharmacology Journal*. — 2015. — V.8. No. 2. — P. 581—589.

12. The mechanism of development of the “ketosis-gestosis” syndrome in pregnant cows and the efficacy of the use of antioxidant drugs. / *Avdeenko V.S.* [et. al.] // *Agrarnyy vestnik Urala (Agrarian Bulletin of the Urals)*. 2016. No. 8 (150). P. 4—9.

13. *Honnens A.* Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle. Uterine blood flow in superovulated cattle. *Theriogenology*. — 2008. — 70(5). P. 859—867. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

V. S. Avdeenko — Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Genetic and Reproductive Biotechnologies;

G. S. Nikitin — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of Genetic and Reproductive Biotechnologies;

V. V. Achilov — Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department Genetic and Reproductive Biotechnologies;

V. A. Galchenko — Postgraduate Student of the Department of Obstetrics and Therapy.

The article was submitted 15.11.2023.

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ И ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Редакция журнала «Ветеринарный фармакологический вестник» Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии приглашает научных сотрудников, преподавателей вузов, соискателей ученых степеней и практикующих специалистов для публикации результатов экспериментальных исследований, теоретических и обзорных статей, касающихся актуальных вопросов ветеринарной фармакологии.

Цель журнала «Ветеринарный фармакологический вестник» — представление основных направлений развития ветеринарной фармакологии, привлечение внимания научных работников и специалистов к актуальным проблемам, продвижение инновационных разработок.

Основные тематические направления журнала:

1. Экспериментальная фармакология.
2. Клиническая фармакология.
3. Биохимическая и молекулярная фармакология.
4. Фармация.
5. Новые лекарственные средства и препараты для терапии и профилактики болезней.
6. Средства зоогигиены, дезинфекции, дезинсекции и дератизации.
7. Лечебные премиксы и кормовые добавки.
8. Патофизиология, патобиохимия и экспериментальная терапия.

Тематическое содержание журнала может меняться в зависимости от текущих задач науки и практики.

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ

Авторам необходимо предоставить в редакцию следующие материалы:

1. Статью, оформленную в соответствии с требованиями, на почту vetfarm.journal@yandex.ru («В редакцию журнала «Ветеринарный фармакологический вестник»).

Материал, предлагаемый для публикации, должен быть тщательно **отредактирован и подписан всеми авторами**.

Статьи, направляемые в редакцию, проходят рецензирование и выносятся на рассмотрение редколлегии. При необходимости редакция связывается с авторами по телефону или электронной почте. По результатам обсуждения принимается решение о возможности включения статьи в журнал, об отказе или доработке.

Статья, направленная автору на доработку, должна быть возвращена в исправленном виде в максимально короткие сроки. К рукописи необходимо приложить письмо от авторов, содержащее 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».