

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Ветеринарная медицина

№ 3-4
2012

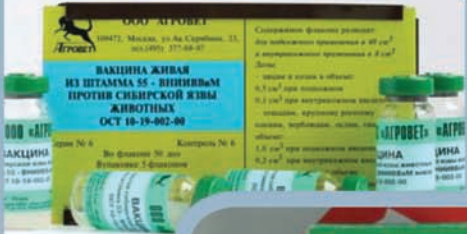


Сайт журнала <http://www.veterinarymedicine.ru>

issn 2073-1108

общество с ограниченной ответственностью «АГРОВЕТ»

Продукция ООО «Агровет» –
надежная защита животных
от инфекций и паразитов



г. Москва, ул. Ташкентская, д. 34, корпус 5
Тел.: 7-495-377-69-97, 7-495-638-52-74
Факс: 7-495-377-69-87
www.agrovet.ru
E-mail: agrovet@agrovet.ru, info@agrovet.ru



Содержание

Биотехнология

- А.Я. Самуйленко, Э.Ф. Токарик, В.И. Еремец, Т.А. Скотникова, Л.А. Неминущая, Н.К. Еремец, И.В. Бобровская, И.В. Тихонов**
Технологическая документация предприятия, выпускающего лекарственные средства для ветеринарии 6
- А.А. Башкирова**
Оценка влияния разных доз пробиотика на организм лошадей русской рысистой породы в условиях ипподромного тренинга 8
- Л.С. Люлькова, Т.А. Скотникова, М.А. Малышева, Н.К. Еремец, А.Я. Самуйленко**
Изучение термостабильности компонентов набора для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК 10
- А.А. Антипов, А.А. Дельцов**
Морфологические изменения органов крыс при изучении хронической токсичности железодекстрановых препаратов 12
- В.М. Бакулин, Е.А. Мартинсон, М.К. Бакулин, И.В. Тихонов**
Влияние перфтордекалина на рост и антибиотическую активность культур *Streptomyces albus* и *S. rimosus* в жидкой среде 15
- В.М. Бакулин, Е.А. Мартинсон, Н.С. Мячина, М.К. Бакулин, И.В. Тихонов**
Использование почвенных глифосатустойчивых изолятов бактерий рода *Pseudomonas* в биотехнологии деградации фосфометилглицина 17
- В.М. Бакулин, Н.С. Мячина, М.К. Бакулин, И.В. Тихонов**
Интенсификация целлюлозолитической активности микроорганизмов в биотехнологических процессах глубокого культивирования 19

- Н.В. Стратонова, В.С. Леонов, Н.А. Литвинова**
Разработка промышленного способа культивирования штамма-продуцента гибридного белка-предшественника безметионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b 22
- Н.В. Стратонова, В.С. Леонов, Н.А. Литвинова**
Способ выделения и очистки телец включений штамма-продуцента гибридного белка-предшественника безметионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b 24
- Н.В. Лобанова, А.А. Нурбаков, А.А. Клишин, Ю.А. Серегин, Л.В. Ермолина, Е.Н. Сауткина, Р.А. Хамитов**
Сравнение эффективности технологий культивирования клеток *CHO*, продуцентов рекомбинантного интерферона бета-1a, в биореакторах различного типа 26

Биохимия, биофизика

- В.Л. Голубева, Т.Ш. Адеишвили, В.В. Белова, О.Б. Брускова**
Некоторые особенности показателей крови коз-доноров иммунной плазмы — сырья для производства антитимоцитарного иммуноглобулина 30
- М.Н. Шапошников, Д.Б. Чудаков, А.А. Генералов, С.Ю. Зайцев**
Получение конъюгата хитозана с фотоактивируемым флуоресцентным красителем и его применение в клеточной микроскопии 32
- А.А. Олешкевич**
«Биосенсорный потенциал» люминесцирующих бактерий 35

Вирусология

- Бехзадпур Дарьюш, Р.В. Белоусова**
Чувствительность перевиваемых культур клеток к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота 38

Учредитель и издатель: ООО «Агровет»

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

Редакционная коллегия:

Василевич Ф.И. – академик РАСХН (главный редактор (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ))
Воронин Е.С. – академик РАСХН (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)
Гулюкин М.И. – академик РАСХН (ГНУ ВИАЭ)
Панин А.А. – академик РАСХН (ФГБУ ВГНКИ)
Самуйленко А.Я. – академик РАСХН (ГНУ ВНИТИБП)
Уша Б.В. – академик РАСХН (Институт ветеринарной экспертизы, санитарии и экологии ФГБОУ ВПО МГУПП)
Девришов Д.А. – член-корр. РАСХН (председатель редакционно-экспертного совета (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ))
Джавадов Э.Д. – член-корр. РАСХН (ГБНУ ВНИИВЭ)
Дорожкин В.И. – член-корр. РАСХН (ГБНУ ВНИИВСЭ)
Иванов А.И. – член-корр. РАСХН (ФГБУ ФЦТРБ-ВНИИВ)
Кочиш И.И. – член-корр. РАСХН (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)
Стекольников А.А. – член-корр. РАСХН
Непоклонов Е.А. – профессор (Россельхознадзор)

Редакционно-экспертный совет:

Тихонов И.В. – профессор: заместитель председателя (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)
Балакирев Н.А. – академик РАСХН (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)
Антипов В.А. – член-корр. РАСХН (Краснодарский НИВИ)
Мирзаев М.Н. – профессор (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)
Обухов И.Л. – профессор (ФГБУ ВГНКИ)
Грубый В.А. – профессор (ФГБУ ВНИИЗЖ)
Скляров О.Д. – профессор (ФГБУ ВГНКИ)
Волков М.Ю. – профессор (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)
Гаврилов В.А. – профессор (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)

Ответственный редактор – Девришова Ю.Д.
Дизайн, верстка – В.В. Котов
Корректура – В.А. Мальцева

Адрес редакции:

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23
Тел. редакции: (495) 376-70-01.
Факс: (495) 377-69-97, (495) 377-69-87
E-mail: sci@mgavm.ru, vetmed@agrovvet.ru,
WWW-адрес: vm.agrovvet.ru
Подписной индекс: 209064 («Пресса России»)

Рукописи не возвращаются и не редактируются.
Подписано в печать 30.11.2012 г.
Формат 60x90 1/8, печать офсетная.
Заказ № 129, тираж 3000 экз.

© «Ветеринарная медицина», 2012 г.
Индексирование журнала: РУНЭБ

Дезинфекция

А.А. Заболоцкая

Эффективность дезинфицирующего препарата «АлкоПерит» в промышленных птицеводческих комплексах.40

М.Ю. Волков, А.А. Заболоцкая, А.А. Сысоев

Гистологическая картина тканей легких мышей после экспериментальной аэрозольной обработки дезинфекционным средством «АлкоПерит».42

Радиобиология

Э.Н. Елаев, Ц.Ц. Содбоев, В.Е. Брылина, Т.Г. Киласония

Белковый спектр крови крыс, подвергшихся воздействию йода-131 в эмбриональный период развития.44

Иммунология, онкология

Ханиех Саттари Фард, Д.А. Девришов

Лечение патологии суставов с использованием мезенхимных стволовых клеток у животных как экспериментальная модель.46

В.И. Буторин, Е.И. Ярыгина

Разработка нового экономичного метода получения высокоактивного и специфичного антивидового иммунопероксидазного конъюгата.48

Б.К. Ильясов, А.Б. Ильясов, С.Нуралиев

Оценка диагностической значимости иммунологических исследований при лептоспирозе.50

Т.П. Жарова, Г.Н. Печникова, М.Н. Мирзаев,

Д.А. Девришов, А.А. Николаев
Изучение влияния препарата Биокан на биохимические и иммунологические показатели собак.53

Г.Н. Печникова, Т.П. Жарова, М.Н. Мирзаев,

Д.А. Девришов, А.А. Николаев
Действие препарата Биокан на гематологические и иммунологические показатели белых мышей.55

Ханиех Саттари Фард, Д.А. Девришов

Экспериментальное воспроизведение остеоартроза у овец.57

Микробиология

В.И. Буторин

Разработка метода определения титра антител к вирусу парагриппа-3, вирусу инфекционного ринотрахеита и вирусу диареи в сыворотке крови крупного рогатого скота в одном разведении.58

Паразитология

А.М. Бегинина, Ф.И. Василевич

Распространение клещей семейства Ixodidae в г. Калуге и Калужской области.60

Т.Т. Мадияров, Ф.И. Василевич

Акарицидная активность пурифена в отношении иксодовых клещей.63

Л.Ю. Гаврильева

Коррекция энтеробиоценоза жеребят, зараженных кишечными нематодозами, пробиотиком «сахабактисубтил» при дегельминтизации.65

Терапия

Д.И. Гильдигов, В.Н. Байматов

Особенности диагностики аденокарциномы поджелудочной железы у кошек.68

М.М. Гусейнов

Энтеросорбция при острых кишечных инфекциях молодняка крупного рогатого скота.70

М.В. Батаева, Л.А. Гнездилова, Т.Н. Петрова

Применение лактобифадола для профилактики патологии послеродового периода у овцематок.72

Анатомия, физиология

Т.О. Азарнова, С.Ю. Зайцев, М.С. Найденский,

А.Е. Бобылькова, И.С. Ярцева
Профилактика и коррекция физико-биохимических нарушений при стрессе в развитии систем тканей и органов у эмбрионов кур яичного направления продуктивности.74

М.В. Волконский, В.Д. Фомина, И.В. Тихонов

Влияние системного введения ультрамикрореготерогенного железа на физиологические параметры сердца крыс.77

Ханиех Саттари Фард, Д.А. Девришов

Животные модели остеоартроза.78

Т.О. Азарнова, И.С. Ярцева, И.И. Кочиш, С.Ю. Зайцев,

М.С. Найденский
Динамика альфа-фетопротейна и интенсивность перекисного окисления липидов у яичных цыплят при действии некоторых естественных метаболитов.80

Н.А. Слесаренко, М.Е. Обухова

Морфобиомеханические критерии адаптивной пластичности позвоночника у собак.82

Хирургия, офтальмология

Д.А. Девришов, С.В. Тимофеев, Ю.А. Пилюга

Лечебное действие препарата «Гемобаланс» на неспецифические факторы иммунитета жеребят.85

Ю.А. Пилюга

Морфофункциональные нарушения сухожилий сгибателей пальца при контрактуре у подсосных жеребят.87

Н.А. Слесаренко, В.В. Фроленко

Оценка структурно-функционального состояния сухожильно-связочного аппарата у спортивных лошадей.90

Ю.А. Ватников

Морфофункциональный анализ эритроцитов крыс под воздействием различного вида травм.92

А.Б. Комиссар

Факторы риска развития эндогенной хориоретинопатии у кошек.95

Эпизоотология

М.Г. Газимагомедов, А.М. Атаев, М.М. Зубаирова

Эпизоотология наиболее опасных гельминтозов крупного рогатого скота в разрезе высотной поясности Дагестана.98

Н.В. Пименов

Совершенствование системы противоэпизоотической борьбы с сальмонеллёзом птиц.101

М.Г. Газимагомедов, А.М. Атаев, Н.Т. Карсаков

Фауна гельминтов овец и крупного рогатого скота в дагестане.103

Б.К. Ильясов, А.Б. Ильясов, С. Нуралиев

Лептоспиросительство грызунов в Республике Казахстан.106

S. Nyamdorj, V. Batbaatar, J. Erdenebaatar,

Yang Zheng Qi
The results of trials of vaccines against animal brucellosis in Mongolia.110

Тихонову Игорю Владимировичу 60 ЛЕТ



Тихонов Игорь Владимирович — доктор биологических наук, профессор, с декабря 1998 года по настоящее время заведует кафедрой биотехнологии ФБГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина» (МГАВМиБ).

До работы в МГАВМиБ Тихонов И.В. занимал руководящие должности в НИИМ МО РФ и Центральном аппарате МО РФ (Управление биологической защиты Министерства обороны). Участвовал в создании средств защиты животных и людей от особо опасных инфекционных заболеваний. Научный руководитель и соавтор большого ряда биотехнологических разработок и изобретений в области создания средств дезинфекции и защиты животных и людей от особо опасных инфекционных болезней.

Своими работами (более 200 научных статей и учебно-методических пособий, учебников, руководств, па-

тентов) внес весомый вклад в дело совершенствования биотехнологии как науки в Российской Федерации.

При его участии в 1998 г. в МГАВМиБ организована кафедра биотехнологии. К настоящему времени на кафедре защищены 18 кандидатских и 6 докторских диссертаций. Профессор И.В. Тихонов в настоящее время продолжает руководить научно-исследовательскими работами в области технологии производства биопрепаратов, средств индикации, диагностики и вакцинопрофилактики животных и человека.

На протяжении 10 лет является главным редактором журнала «Ветеринарная медицина», а также членом нескольких диссертационных Советов по защите докторских диссертаций.

**Уважаемый Игорь Владимирович!
Редакционный совет журнала поздравляет Вас
со славным ЮБИЛЕЕМ.**

Ватникову Юрию Анатольевичу 50 ЛЕТ



3 октября 2012 г. исполнилось 50 лет со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора, заведующего кафедрой клинической ветеринарии аграрного факультета ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» Ватникова Юрия Анатольевича.

Жизненный путь Юрия Анатольевича прочно связан с научной и педагогической деятельностью. После службы в рядах Советской Армии, в войсках противовоздушной обороны (1982–1984 гг.), Ватников Ю.А. поступил на ветеринарный факультет в Московскую ветеринарную академию им. К.И. Скрябина. За время учебы он показывал пример целеустремленности, трудолюбия и активной жизненной позиции. Во время учебы и после ее окончания (1989 г.) работал врачом-ординатором кафедры оперативной хирургии МВА им. К.И. Скрябина.

По окончании вуза — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и генетики Всероссийского института гельминтологии имени К.И. Скрябина. За время работы в НИИ под руководством профессора Э.Х. Даугалиевой подготовил и в 1993 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук. В 2000 г. Ватников Ю.А. зачислен в докторантуру при МГУПБ по специальности 16.00.02 – Патология, онкология и морфология животных. В докторантуре закончил выполнение диссертационной работы и в 2004 г. защитил докторскую диссертацию «Структурная и функциональная организация репаративного остеогенеза у животных (экспериментальные и клинические исследования)».

В 2006 г. назначен на должность профессора кафедры незаразных болезней по курсу ветеринарной хирургии. С 1-го сентября 2007 года — заведующий кафедрой анатомии, физиологии и хирургии животных, а с 1-го сентября 2012 г. — заведующий кафедрой клинической ветеринарии аграрного факультета РУДН.

Научный кругозор Ватникова Ю.А. охватывает многие разделы ветеринарной медицины. В настоящее время он специализируется на вопросах общей хи-

рургии животных, им изучены, проанализированы и представлены в научной печати данные структурных и функциональных изменений, раскрывающие закономерность организации репаративного остеогенеза. На основе разработанных Ю.А. Ватниковым теоретических положений, экспериментальных и клинических исследований представлена система коррекции репаративной регенерации костной ткани животных. Для осуществления контроля над процессом репарации тканей предложен метод оценки структурно-функционального состояния центральных и периферических органов иммуногенеза.

Ю.А. Ватников за время своей научной и педагогической деятельности опубликовал более 130 трудов: из них 2 монографии и 19 учебно-методических публикаций. Научные работы Ю.А. Ватникова опубликованы в таких журналах, как «Ветеринария», «Ветеринарная патология», «Российский ветеринарный журнал», «Ветеринарная медицина». Профессор Ватников Ю.А. подготовил 8 кандидатов ветеринарных наук, которые работают в различных высших учебных заведениях и ветеринарных предприятиях. Ватников Ю.А. является членом диссертационного совета при Российском университете дружбы народов и Московском государственном университете пищевых производств.

В 2011 г. за вклад в подготовку высококвалифицированных кадров награжден Грамотой Министерства Сельского хозяйства и продовольствия.

Ватников Юрий Анатольевич — известный ученый, талантливый педагог и организатор высшего профессионального образования. Мы, его коллеги, желаем юбиляру больших научных побед, качественных и быстрых решений всех возникающих проблем. Желаем здоровья, оптимизма, долголетия, счастья, семейного благополучия, верных друзей и единомышленников.

Мы всегда с Вами!

Ректорат ФГБОУ ВПО МГАВМиБ

Девришову Давуду Абдулсемедовичу 60 лет

60 лет со дня рождения и 35 лет научной и педагогической деятельности доктора биологических наук, профессора, члена-корреспондента РАСХН, Заслуженного ветеринарного врача Российской Федерации, заведующего кафедрой иммунологии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина **Девришова Давуда Абдулсемедовича**.

Девришов Д.А. родился 24 июля 1952 года в с. Рутул, ДА ССР, семье служащего. В 1972 году поступил и в 1977 году окончил ветеринарный факультет Московской ветеринарной академии и с 1977 года работает в МГАВМиБ им. К.И. Скрябина (Московская ветеринарная академия).

с 1977 г. — ветеринарный врач-ординатор кафедры болезней молодняка МВА;

с 1980 г. — младший научный сотрудник в проблемной лаборатории по изучению патологии обмена веществ МВА;

с 1984 г. — старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории болезней молодняка МВА;

с 1989 г. — ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории болезней молодняка ФГОУ ВПО МГАВМиБ;

с 1992 г. — заведующий лабораторией болезней молодняка ФГОУ ВПО МГАВМиБ;

с 1999 г. — заведующий научно-исследовательской лабораторией инфекционной патологии и биотехнологии ФГОУ ВПО МГАВМиБ;

с 2003 г. по настоящее время — заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВПО МГАВМиБ (по совместительству 2008–2011 гг. проректор по инновационным технологиям).

В 1986 году защитил диссертацию на ученую степень кандидата ветеринарных наук по специальностям: 16.00.03 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология и 16.00.01 – Диагностика и терапия животных. В 1989 году присвоено ученое звание старший научный сотрудник по специальности 16.00.03–Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

В 2000 году защитил диссертацию на ученую степень доктора биологических наук по специальностям: 16.00.03 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология и 03.00.23 –Биотехнология, в 2003 ему присвоено ученое звание профессора.

В 2005 году избран член-корреспондентом РАСХН по отделению ветеринарной медицины. С 2010 года — академик Академии сельскохозяйственных наук Монголии.

Девришов Д.А. внес большой вклад в ветеринарную науку и практику. Под его руководством и личном участии проводятся научно-исследовательские работы по изучению этиопатогенеза, диагностике и профилактике инфекционных болезней, определению иммунного статуса и иммунных расстройств у продуктивных животных, конструированию новых иммунобиологических, иммуномодулирующих и пробиотических препаратов. Его фундаментальными исследованиями установлены новые данные об определяющей роли клеточных и гуморальных факторов в патогенезе кишечной и респираторной патологии у молодняка животных. Новизна научных решений подтверждена 16 патентами, 27 новыми иммунобиологическими препаратами (вакцина ОКЗ, вакцина эмульгированная против пастереллёза животных, гипермунная сыворотка против ОКЗ, вакцина против бруцеллёза животных инактивированная, вакцина комбинированная против сибирской язвы животных, вакцина против сапа ло-

шадей инактивированная; диагностикумы для диагностики, контроля эффективности вакцинопрофилактики, мониторинга иммунного фона и прогнозирования инфекционных болезней животных, бактериофаги, иммуномодуляторы, пробиотики противопаразитарные и др. препараты) и биотехнологии их производства. Им разработаны принципы селекции, отбора и подбора производственных штаммов микроорганизмов, универсальные питательные среды для глубинного культивирования микроорганизмов в промышленных условиях, методические рекомендации по иммунологическому мониторингу и прогнозированию болезней животных. Разработанные ресурсосберегающие и экологически безопасные биотехнологии производства иммунобиологических препаратов являются новыми; многие вакцинные препараты не имеют аналогов по антигенному составу и протективному эффекту и используются в ветеринарной практике для обеспечения эпизоотологического благополучия как в России, так в странах СНГ. Использование научных разработок Девришова Д.А. в ветеринарной практике позволило повысить эффективность противоэпизоотических и лечебно-профилактических мероприятий против инфекционных болезней животных. Под его руководством проведены исследования по изучению, получению и определению перспективы использования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток тканей животных в биомедицине по восстановлению крупных повреждений различных тканей.

Являясь ведущим ученым иммунобиотехнологом и опираясь на современные научные достижения, организовал первую в 2003 году в России кафедру ветеринарной иммунологии в ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, которой руководит со дня ее создания. На кафедре готовят кадры с углубленным изучением фундаментальных и прикладных дисциплин со специализацией: ветеринарная иммунология и лабораторная диагностика.

Д.А. Девришовым опубликовано более 240 научных работ в ведущих российских и зарубежных научных изданиях. Автор 32 учебников и учебных пособий для вузов, в том числе «Иммунология», «Ветеринарная иммунология», «Фундаментальные основы», 21 авторского свидетельства, патентов и информационных карт.

Им создана научная школа биотехнологов и иммунологов, подготовлено 5 докторов и 20 кандидатов наук, многие из которых возглавляют научные лаборатории и кафедры и являются руководителями ветеринарных учреждений.

Большой вклад Д.А. Девришов вносит в координацию работ по внедрению новых биотехнологий на предприятиях биологической промышленности, соответствующих требованиям GMP (ООО «Агровет», ОАО «Покровский завод биопрепаратов», ФГУП «Ставропольская биофабрика»).

Девришов Д.А. ведет большую общественную работу, член рабочей группы МСХ по формированию научных направлений и тематик по бионанотехнологиям в ветеринарной медицине; заместитель председателя секции инфекционной патологии животных отделения ветеринарной медицины РАСХН, советник председателя Комитета по экономическому развитию, промышленности и предпринимательству Законодательного собрания Кировской области, член 4-х специализированных советов ВАК РФ по защите докторских и кандидатских диссертаций.

За вклад в научно-образовательную и производственную работу ему присвоено звание «Заслуженный ветеринарный врач РФ», награжден Золотой медалью МСХ РФ и многими грамотами.

УДК 619:615.37.12

**А.Я. САМУЙЛЕНКО, Э.Ф. ТОКАРИК, В.И. ЕРЕМЕЦ, Т.А. СКОТНИКОВА,
Л.А. НЕМИНУЩАЯ, Н.К. ЕРЕМЕЦ, И.В. БОБРОВСКАЯ**
*ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности» (ГНУ ВНИТИБП) Россельхозакадемии, г. Щелково*

И.В. ТИХОНОВ
*ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени К.И.Скрябина»*

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ ПРЕДПРИЯТИЯ, ВЫПУСКАЮЩЕГО ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ

В статье представлена информация о технологической документации предприятия и о новом национальном стандарте ГОСТ Р 54763-2011 «Средства лекарственные для животных. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения».

Ключевые слова: лекарственные средства, качество, технологическая документация, технологический регламент.

**A.Ya. SAMUILENKO, E.F. TOKARIK, V.I. EREMETS, T.A. SKOTNIKOVA,
L.A. NEMINUSHCHAYA, N.K. EREMETS, I.V. BOBROVSKAYA**
*All-Russia research and institute of technology of the biological
the industries (GNU VNITIBP) Rosselkhosacademy, Shcholkovo*

I.V. TIKHONOV
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

THE FABRICATION DOCUMENTATION OF THE ENTERPRISE, LETTING OUT MEDICAL PRODUCTS FOR VETERINARY SCIENCE

In article the information on the new national standard of ГОСТ Р 54763-2011 «Means medicinal for animals is presented. Production production schedules. The maintenance, order of working out, the coordination and the statement».

Key words: medical products, quality, the fabrication documentation, production schedules.

Одно из неперемных условий успешности предприятия связано с разработкой, утверждением и ведением технологической документации (ТД) в строгом соответствии с требованиями отрасли. Необходимость упорядочения технологической документации согласно современным требованиям для разработчиков новых лекарственных средств (ЛС) и предприятий, выпускающих ЛС для ветеринарии, актуальна с начала экономических реформ. В связи с вступлением России в ВТО требуется полный пересмотр действующей документации и разработка новой, отвечающей международным требованиям и имеющей строгую, детально проработанную систему, соответствующую разрешительной документации, регистрационному досье и требованиям надзорных органов, нормативным и нормативно-правовым документам [1].

Технологическая документация (ТД) — документация, которая содержит последовательное изложение технологических способов изготовления и контроля продукции с указанием оборудования, технологической оснастки, санитарно-гигиенических мероприятий относительно персонала, производственных помещений и оборудования, а также мер обеспечения их безопасности и чистоты окружающей среды. ТД создается при разработке (проектировании) технологических систем или процессов, оценивается с определенной долей достоверности (вероятности) при контроле и проверках, полностью выявляется в результатах применения по назначению, при этом наследует качество технических условий (СТО) и действующей нормативной документации на конкретный объект (продукт) производства.

Требования отрасли производства ЛС для ветеринарии учитывают специфику продукции, состоящую в том, что потребитель не имеет возможности оценить качество ЛС до применения. В настоящее время под качеством ЛС понимают их соответствие всем условиям регистрации производства и применения. Только при таком соответствии непосредственный потребитель (ветеринарный врач) вправе рассчитывать на предсказуемый терапевтический или профилактический эффект [2].

В последнее десятилетие много сделано в реорганизации отечественной контрольно-разрешительной системы в сфере производства и обращения ЛС для животных, в результате чего достаточно точно определены отраслевые требования к качеству и безопасности* лекарственных средств.

Условия регистрации ЛС определены приказом Минсельхоза России от 01.04.2005 г. № 48 «Об утверждении Правил государственной регистрации лекарственных средств для животных и кормовых добавок». Порядок производства и контроля качества регламентируется стандартом ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» [3]. Что касается непосредственно ЛС для ветеринарии, то за последние годы введена в действие серия национальных стандартов под рубрикой «Средства лекарственные для животных», представляющая собой результат деятельности Технического комитета по стандартизации ТК 454

* В общем случае (согласно терминологии ГОСТ Р ИСО 9001-2008) безопасность является составной частью свойств, характеризующих качество объекта.

«Охрана жизни, здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов».

Последним по времени утверждения стандартом этой серии является национальный стандарт ГОСТ Р 54763-2011 «Средства лекарственные для ветеринарии. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения».

Стандарт разработан сотрудниками ВНИТИБП при участии представителей ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ВГНКИ), ФГУП «Курская биофабрика» и ФГУП «Щелковский биокombинат». Руководитель организации-разработчика и разработки стандарта доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАСХН А.Я. Самуйленко. Стандарт ГОСТ Р 54763-2011 вводится впервые, распространяется на фармакологические, биологические и гомеопатические лекарственные средства для ветеринарии и устанавливает общие требования к содержанию, порядку разработки, согласованию и утверждению технологических регламентов производства. Согласно требованиям Федерального закона Российской Федерации № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (ст. 45, п. 3) [4], российских национальных стандартов (ГОСТ Р 52249-2009, ГОСТ Р 52550-2006) и международных правил GMP («Good Manufacturing Practice»), технологический регламент (ТР) производства каждого продукта является обязательным документом предприятия, выпускающего ЛС, и должен охватывать все аспекты технологического процесса, требования к качеству сырья, внутрипроизводственному контролю, контролю качества, безопасности труда, экологической безопасности, утилизации отходов и пр.

При разработке стандарта ГОСТ Р 54763-2011 учтены требования федеральных законов [4, 5, 6], основного действующего стандарта ГОСТ Р 52249-2009 и стандартов Системы «Безопасность труда», Системы технического обслуживания и ремонта техники, серий стандартов «Средства лекарственные для животных», «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды», «Менеджмент риска», «Единая система технологической документации», «Единая система конструкторской документации», «Статистические методы» и др.

Предшественником нового стандарта является ОСТ 10083-95 «Продукция агробиологической промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, построения, согласования и утверждения», разработанный ВНИТИБП с участием специалистов правления АО «Росагробропром», биопредприятий и центрального органа по сертификации ветеринарных препаратов (ВГНКИ). ОСТ 10083-95 с момента его утверждения активно использовался разработчиками ЛС, специалистами предприятий биологической промышленности с целью документирования и организации технологических процессов производства ЛС для животных.

Технологический регламент производства каждого ЛС устанавливает методы изготовления продукции и условия, позволяющие обеспечить воспроизводимость технологических процессов со стабильными выходами продукта. Только в том случае, если ТР будет дополнен и взаимосвязан путем ссылок и приложений с другими документами на производство данного вида

продукции (спецификации, инструкции, методики, описание конкретных процедур), может существовать четко упорядоченная система организационно-технологической документации. Обширная и полезная информация о разработке системы ТД содержится в информационно-справочном документе «Руководство по разработке системы технологической документации на предприятии биологической промышленности или опытном производстве при организациях соответствующего профиля», разработанном сотрудниками ВНИТИБП [7], не утратившем актуальности до сегодняшнего дня.

Технологические документы должны содержать минимальное количество текстовой информации и оформляться с использованием различного рода схем и таблиц, что делает эту информацию более доступной для понимания. Чем детальнее описаны методики, процедуры и операции, которым должен следовать персонал, тем надежнее воспроизводимость и стабильность технологического процесса. Чтобы система ТД предприятия стала востребованной и действующей, необходимо организовать обучение персонала производства конкретного продукта и специалистов обслуживающих подразделений (отдел главного инженера, главного механика, планово-экономический, служба техники безопасности и др.), в программу которого входит изучение технологических документов.

Создание на предприятии технологической комиссии, призванной рассматривать и оценивать проекты важных технологических и организационных документов, способствует повышению уровня знаний об особенностях технологических процессов производства продукции и усилению ответственности за проведение этих процессов и качество продукции.

Значение системы технологической документации в жизни предприятия трудно переоценить. Кроме обеспечения воспроизводимости и стабильности технологического процесса в целом и отдельных его операций ТД служит источником информации для оценки экономической эффективности используемой технологии. Тщательный анализ этой информации позволяет построить модель бизнес-процесса производства любого ЛС, выпускаемого предприятием, и снизить производственные потери без вмешательства в специфику технологического процесса, а также проследить изменение затрат в случае каких-либо совершенствований. Для экономического анализа технологического процесса используется маршрутная карта производства каждой серии продукта.

При разработке ТД соответствующего уровня и статуса должны быть использованы профессиональный опыт специалистов, их уникальные знания и навыки, чтобы документирование технологических процессов стало составным элементом «ноу-хау». В этом случае технологическая документация становится интеллектуальной собственностью предприятия, обладающей вполне конкретной материальной ценностью.

Введение в действие стандарта ГОСТ Р 54763-2011 исключает возможность разработки и написания технологического регламента производства лекарственного средства в произвольной форме. Требования к содержанию технологического регламента возводят этот стандарт в ранг системообразующего документа при разработке и утверждении всего комплекта ТД на производство каждого лекарственного средства для ветеринарии.

Список литературы

1. Панин А.Н., Кириллов Л.В., Гарбузов А.Ф. и др. Состояние и проблемы обеспечения качества лекарственных средств для животных: Сб. научн. тр. ВГНКИ, 2007. Т. 68. – С. 3-9.
2. Смоленский В.И., Козырев Ю.А., Сергеева С.П. и др. Надзор за качеством лекарственных средств для животных и кормов: Сб. научн. тр. ВГНКИ, 2007. Т. 68. – С. 35-44.
3. ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля лекарственных средств».
4. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010, № 61-ФЗ.
5. Федеральный закон «О техническом регулировании» от 27.12.2002, № 184-ФЗ.
6. Федеральный закон «О ветеринарии» № 4979-1 от 14.05.1993 в редакции от 18.07. 2011, № 242-ФЗ.

7. Руководство по разработке системы технологической документации на предприятии биологической промышленности или опытном производстве при организациях соответствующего профиля». – Утв. РАСХН 23.11.04 г. Сб. Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины. Методы исследований в области паразитологии, эпизоотического мониторинга, биотехнологии (РАСХН отд. Ветеринарной медицины). – М., 2006. – Ч. 2. – С. 312-348.

Контактная информация:
 Скотникова Татьяна Анатольевна
 тел.: 8(496) 56-325-43.;
 E-mail: ook_vnitibp@mail.ru

УДК 636.12.088:612.014.469

А.А. БАШКИРОВА

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАЗНЫХ ДОЗ ПРОБИОТИКА
 НА ОРГАНИЗМ ЛОШАДЕЙ РУССКОЙ РЫСИСТОЙ ПОРОДЫ
 В УСЛОВИЯХ ИППОДРОМНОГО ТРЕНИНГА**

Исследование и анализ влияния пробиотика «Лактобифадол» на биохимические и морфологические параметры крови лошадей, проходящих тренинг и испытания в условиях Центрального Московского ипподрома, а также оценка влияния различных доз пробиотика на клиническое состояние и гомеостаз подопытных лошадей.

Ключевые слова: рысак, пробиотик, морфологические и биохимические показатели крови.

A.A. BASHKIROVA

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

**ESTIMATION OF INFLUENCE OF DIFFERENT DOSES OF THE PROBIOTIC
 ON AN ORGANISM OF HORSES OF THE RUSSIAN TROTTERS
 IN CONDITIONS OF TRAINING ON A HIPPODROME**

Research and the influence analysis of the probiotic «Laktobifadol» on biochemical and morphological parameters of a blood of the horses passing training and tests in the conditions of the Central Moscow hippodrome, and also an estimation of influence of various doses of the probiotic on a clinical condition and a homeostasis of experimental horses.

Key words: trotter, probiotic, morphological and biochemical parameters of a blood.

Ипподромные испытания являются основным видом использования лошадей рысистых пород. Повышение резвости и быстрая адаптация животных к усиленным тренировкам являются необходимым условием успешности рысистого коннозаводства. Ежедневный тренинг в условиях ипподрома связан со значительной физической нагрузкой на фоне психоэмоционального воздействия, что не может не сказаться на физиологическом состоянии организма лошади. При этом чрезмерно интенсивная физическая нагрузка является мощным стрессом и ослабляет естественную защиту [2].

Повышение работоспособности рысистых лошадей требует изыскания способов и методов, способствующих быстрой адаптации лошади к условиям тренировочного процесса, адекватной и своевременной коррекции физиологического состояния, минимизации психологического и физиологического стресса, что обеспечит животному условия для наиболее полного раскрытия генетического потенциала и расширения физиологических возможностей организма совершать мышечную работу [1].

Одним из перспективных методов является применение пробиотиков как современных средств, не относящихся к разряду допингов. Пробиотики содержат живые микроорганизмы, оказывают положительное влияние на физиологический статус организма хозяина через улучшение его микроэкологического статуса [1, 4, 7]. В последние годы опубликовано много исследований, свидетельствующих о том, что нормальная микрофлора желудочно-кишечного тракта улучшает обмен веществ, нормализует пищеварение, иммунитет и др. [7]. Однако данная тема остаётся актуальной в связи с недостаточностью исследований о влиянии пробиотика на организм лошади на фоне интенсивных физических нагрузок.

Цель работы заключалась в изучении влияния разных доз пробиотика Лактобифадол на биохимические и гематологические показатели крови лошадей рысистых пород в условиях активного тренинга на Центральном Московском ипподроме (ЦМИ).

Материалы и методы. Опыт проводили в январе-марте 2011 г. на ЦМИ. Были сформированы 2 подопытные группы животных по 6 голов лошадей русской ры-

систой породы в возрасте 2–5 лет, к которым по принципу пар-аналогов были подобраны лошади контрольной группы. Подопытные животные 1-й группы получали пробиотик «Лактобифадол» в течение 3-х месяцев в количестве 25 г в сутки, подопытные животные 2-й группы получали пробиотик в течение того же времени, но в дозе 50 г в сутки. Данный пробиотик содержит в 1 г не менее 80 млн живых клеток бифидобактерий и 1 млн живых клеток лактобактерий, а также элементы культуральной среды и продукты жизнедеятельности микроорганизмов, положительно влияющие на организм животных [4].

Условия содержания исследуемых лошадей соответствовали санитарно-гигиеническим нормам, кормление проводилось с учётом рекомендованных ВНИИК норм. Тренировочные нагрузки были одинаковыми.

До начала эксперимента и после его завершения были определены основные биохимические и клинические показатели крови лошадей в состоянии относительного покоя в ветеринарной лаборатории «АРТВЕТ». Количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, лейкоцитарную формулу определяли на гематологическом анализаторе NIHON KOH DEN Celltac OX. Биохимические показатели определяли на анализаторе Stat Fax 1904 Plus. Полученные количественные показатели обрабатывали с помощью пакета статистического анализа «Microsoft Excel».

Результаты исследований. В ходе клинических наблюдений за подопытными животными установили, что у лошадей, которые ежедневно с кормом получали пробиотик Лактобифадол, не возникло каких-либо отклонений от физиологической нормы в течение всего срока наблюдений. Тренерский персонал отмечал, что у подопытных лошадей со второй недели эксперимента повысилась работоспособность, улучшились показатели резвости и выносливости по сравнению с контролем.

Тренировка с позиции современной физиологии заключается в постепенном приспособлении организма к интенсивной мышечной нагрузке. Эта адаптация сопровождается глубокими функциональными изменениями как в организме в целом, так в органах и тканях, что нашло отражение в количественных изменениях некоторых показателей крови [3]. В ходе клинического исследования крови как 1-й, так и 2-й подопытных групп гематологические показатели крови оставались в рамках физиологических границ на протяжении всего эксперимента. Однако у животных, получавших пробиотик Лактобифадол, статистически значимо повысился уровень лимфоцитов. В 1-й группе исследуемых животных по отношению к значениям на момент начала наблюдений количество лимфоцитов достоверно возросло на 64,89% ($p < 0,001$) в крови подопытных животных и на 36,98% в крови лошадей контрольной группы. Во 2-й группе лошадей количество лимфоцитов по отношению к фоновому уровню достоверно увеличилось на 47,20% ($p < 0,001$) в крови подопытных лошадей и на 41,08% ($p < 0,05$) в крови животных контрольной группы. Полученные нами результаты изменения уровня лимфоцитов в крови подопытных лошадей согласуются с исследованиями Зинченко Е.В. и др., которые отметили, что оральное введение *Lactobacillus* приводит к повышению уровня лимфоцитов в крови животных, что в свою очередь подтверждает иммуностимулирующее действие молочнокислых бактерий [4, 5]. Данный эффект отмечался в крови подопытных животных как 1-й, так и 2-й групп.

При биохимическом исследовании сыворотки крови подопытных животных 1-й и 2-й групп установлено, что в течение всего срока наблюдений в уровнях общего белка, альбумина, билирубина, мочевины и креатинина достоверных изменений не происходило, данные показатели не выходили за границы референтных значений для данного вида животных. Однако в сыворотке крови всех животных была отмечена повышенная концентрация ферментов аспаратаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), креатинфосфокиназы (КФК) и гаммаглутамилтрансферазы (ГГТ), что связано с интенсивной мышечной нагрузкой. Под влиянием мышечной работы в организме происходят закономерные изменения внутренней среды, зависящие от характера и интенсивности нагрузки. Отклонение одного из биохимических показателей запускает каскад компенсаторных и адаптационных реакций всей биологической системы. Именно ферментам принадлежит основная роль в поддержании важнейших физиологических констант и биохимических параметров крови [3, 6]. Так, на момент окончания эксперимента активность фермента скелетной мускулатуры АСТ по сравнению с фоновыми значениями снизилась на 22,93% в сыворотке крови подопытных лошадей 1-й группы и на 21,36% в сыворотке крови подопытных животных 2-й группы.

Повышение в крови активности КФК также характерно для интенсивной мышечной работы и, как правило, отражает значительное изменение проницаемости мембранных структур миоцита [3, 6]. Нами было отмечено повышение среднего содержания КФК в сыворотке крови подопытных животных 1-й группы с $278,33 \pm 28,04$ Ед./л до $335 \pm 30,25$ Ед./л (с $277 \pm 19,89$ Ед./л до $367,5 \pm 47,84$ Ед./л в крови лошадей контрольной группы). В крови исследуемых животных 2-й группы наблюдалась схожая тенденция.

Систематические физические нагрузки приводят к значительному повышению активности ЩФ [3, 6]. Спустя три месяца с момента начала опытного периода у животных 1-й группы уровень ЩФ снизился на 7,87% в сыворотке подопытных животных и вырос на 1,54% в крови лошадей контрольной группы. У лошадей 2-й группы отмечено повышение уровня ЩФ по отношению к фоновому уровню на 3,40% в сыворотке крови подопытных лошадей и на 52,70% в крови лошадей контрольной группы.

Уровень ГГТ в сыворотке крови лошадей не превышал границы физиологической нормы в начале опытного периода. После его окончания было отмечено повышение активности ГГТ в крови лошадей всех групп, но в крови животных, получавших пробиотик, оно было незначительно.

Заключение. При применении пробиотика Лактобифадол в дозах 25 г и 50 г в сутки лошадям русской рысистой породы в течение 3 месяцев было отмечено повышение активности и работоспособности животных. Гематологические и биохимические исследования подтверждают клинические наблюдения о положительном стимулирующем влиянии пробиотика. Отмечен статистически значимый рост количества лимфоцитов в крови лошадей опытных групп, а также меньшие изменения содержания АСТ, КФК, ЩФ, ГГТ по сравнению с возрастающей концентрацией данных ферментов в крови животных контрольных групп, что свидетельствует о благоприятном воздействии пробиотика Лактобифадол на физиологическое состояние животных.

Список литературы

1. Андреева А.В., Заварзина Р.Р. Биохимические показатели крови спортивных лошадей при использовании «Бификола» и аскорбиновой кислоты. – Уфа: ФГОУ ВПО «Башкирский ГАУ», 2009. – С. 88-89.
 2. Вогралик М.В., Послов Г.А. Механизм стрессорных реакций у спортивных лошадей // Ветеринария, 1981, № 4. – С. 59-60.
 3. Волков И.И. Закономерности биохимической адаптации в процессе спортивной тренировки. – М.: ГЦОЛИФК, 1986, 64 с.
 4. Данилевская Н.В., Ливанова Т.К., Ливанова М.А. Фармакокоррекция в перинатальный период у жеребых кобыл // Ветеринар, 2004, № 4.

5. Зинченко Е.В., Панин А.Н. Иммунобиотики в ветеринарной практике. – Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2000, 164 с.
 6. Никулин Б.А., Родионова И.И. Биохимический контроль в спорте. – М.: Советский спорт, 2011, 229 с.
 7. Титова Е.И., Самуйленко А.Я., Неминущая Л.А., Еремец В.И. Применение синбиотического комплекса в последнюю четверть жеребости кобыл // Коневодство и конный спорт, 2011, № 2. – С. 22-23.

Контактная информация:
 passiflora14@bk.ru

УДК 619:615.37.012

**Л.С. ЛЮЛЬКОВА, Т.А. СКОТНИКОВА, М.А. МАЛЫШЕВА,
 Н.К. ЕРЕМЕЦ, А.Я. САМУЙЛЕНКО**

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ВНИТИБП) Россельхозакадемии, г. Щелково

**ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ КОМПОНЕНТОВ НАБОРА
 ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА
 СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В РСК И РДСК**

В статье представлены результаты изучения термостабильности компонентов набора для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в реакции связывания комплемента (РСК) и реакции длительного связывания комплемента (РДСК) методом «ускоренного старения» с целью определения его срока годности.

Ключевые слова: метод «ускоренного старения», срок годности, хламидиоз, активность, специфичность компонентов набора.

**L.S. LYULKOVA, T.A. SKOTNIKOVA, M.A. MALYSHEVA,
 N.K. EREMETS, A.Ya. SAMUYLENKO**

All-Russia research and institute of technology of the biological. The industries (GNU VNITIBP) Rosselkhozacademy, Shcholkovo

**STUDYING OF STABILITY OF QUALITY OF THE PANEL
 FOR DIAGNOSTICS OF THE CLAMIDIOSIS
 OF AGRICULTURAL ANIMALS IN RFC AND RFLC**

In article results of studying of thermostability of quality of a panel for diagnostics of infection of *Chlamydiaceae* of agricultural animals in reaction of fixation complement (RFC) and reaction of long fixation of the complement (RFLC) by «accelerated stability» method for the purpose of definition of its working life are presented.

Key words: «accelerated stability» method, expire date, activity, specificity of components of a panel.

Целью настоящей работы явилось исследование термостабильности компонентов набора для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК методом «ускоренного старения» для определения его срока годности.

Федеральным законом № 86-ФЗ «О лекарственных средствах», национальными стандартами ГОСТ Р 52249-2004, ГОСТ Р 52537-2006 предусмотрено, что производство лекарственных средств (ЛС), в том числе диагностических препаратов, должно гарантировать их соответствие своему назначению. В настоящее время под качеством ЛС понимают их соответствие всем условиям регистрации (приказ Минсельхоза России от 01.04.2005 г., № 48 «Об утверждении Правил государственной регистрации лекарственных средств для животных и кормовых добавок»), условиям изготовления (требования к производственным помещениям, оборудованию, технологическому процессу, персоналу) и свойствам (безопасность, эффективность, активность, специфичность и др.). Согласно рекомендациям ВОЗ,

важным показателем качества иммунобиологических препаратов является стабильность, так как обеспечивает сохранение их свойств в процессе хранения и транспортировки. Стабильность зависит от внешних факторов (температура, освещенность и влажность окружающей среды) и от внутренних (химических, физических — для составляющих субстанций), а также биологических свойств — для иммунобиологических препаратов [1]. Кроме того, стабильность показателей качества (активность, специфичность) компонентов наборов для диагностики инфекционных заболеваний является важным фактором при выявлении больных животных.

Требования к углубленному изучению стабильности ЛС, в том числе диагностических препаратов, содержатся в GMP «Надлежащая производственная практика лекарственных средств» [2]. Изучение стабильности, согласно Правилам GMP, необходимо проводить до маркетинга и пострегистрационный период. В комплект документов, представляемых для регистрации

ЛС, в обязательном порядке должна быть включена информация о стабильности. В Российской Федерации стабильность декларируется при регистрации препаратов, но не проверяется на серийной продукции в рамках выходного, потребительского или государственного контроля качества, и поэтому должна быть объектом особого внимания на этапах разработки и регистрации препаратов [6].

На современном этапе исследований наиболее объективным и перспективным для оценки стабильности биологических препаратов различной природы считается метод «ускоренного старения» при повышенных температурах [4, 5]. Известно, что стабилизация белка к нагреванию делает его более устойчивым к другим денатурирующим факторам. Действие тепловой денатурации на биообъекты может быть оценено по величине тех изменений в системе, которые измеряются количественно. К таким показателям относится снижение биологической активности (вирулентности, иммуногенности, ферментативной активности и др.), скорость которой повышается с ростом температуры. Наиболее широко распространенным методом, характеризующим изменение показателей системы (биообъекта), является исследование их термостабильности, так как самым экстремальным воздействием окружающей среды на биологический объект любой сложности обладает температура.

В настоящее время тест термостабильности или «ускоренного старения» применяется для определения срока годности препаратов при предполагаемых температурах хранения, а также для оценки пригодности различных биологических препаратов к последующему хранению и применению в зонах с неблагоприятными климатическими условиями, организации «холодовой цепи» (системы хранения и транспортировки препаратов в заданном температурном режиме на всех этапах). Последнее является особенно актуальным в связи с аномально жарким летом 2010 г.

Метод «ускоренного старения» заключается в выдерживании исследуемого иммунобиологического препарата при температуре, превышающей среднюю температуру хранения с целью ускорения протекающих в нем физико-химических процессов. По результатам, полученным методом «ускоренного старения», можно установить температуру хранения, обеспечивающую заданный срок годности.

В ГНУ ВНИТИБП проводится изучение стабильности качества вирусных вакцин, диагностических наборов, пробиотиков. На основании многолетних исследований разработаны «Методические рекомендации по исследованию стабильности иммунопрепаратов на этапе их разработки и в условиях действующего производства» [7].

Материалы и методы. На базе опытного производства ГНУ ВНИТИБП в 1994 г. организован серийный выпуск наборов для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК по оригинальной технологии [3]. Набор состоит из четырех лиофилизированных компонентов: антиген хламидийный (специфический) — 10 ампул; антиген контрольный — 2 ампулы; сыворотка хламидийная (специфическая) — 5 ампул; сыворотка контрольная — 3 ампулы. В соответствии с требованиями ТУ антиген хламидийный должен иметь титр в РСК не ниже 1:64; хламидийная сыворотка — не ниже 1:40.

С целью определения сроков годности и условий хранения наборов были проведены исследования тер-

мостабильности его компонентов. Критерием оценки служила термостабильность активности (титра) в РСК компонентов набора — специфических хламидийных антигена и сыворотки. На образцах опытно-промышленных серий наборов и лабораторных рабочих эталонных компонентов набора исследовали сохранность специфической активности в РСК при повышенных температурах и при длительном хранении.

Проведение испытаний. В эксперименте при выборе значений температуры исходили из того, что температура «ускоренного старения» должна превышать стандартную температуру хранения (20°C) минимум на 10°C. Продолжительность эксперимента определялась снижением активности в РСК хламидийных антигена и сыворотки до критических значений, то есть не соответствующих требованиям ТУ. Образцы из трех серий наборов с активностью антигена 1:64, 1:128, 1:256 и сыворотки, соответственно, 1:40, 1:80, 1:160 и трех серий лабораторных рабочих эталонных компонентов набора хранили при стандартных условиях (20°C) в течение 18 месяцев — заявленного срока годности и в условиях опыта «ускоренного старения» при значениях температуры 40°C и 60°C. Препараты контролировали в РСК по следующей схеме: 1) при стандартных условиях хранения через каждые 30 сут.; 2) при хранении в термостате при 40°C — через каждые 10 сут.; 3) при хранении в термостате при 60°C — через 1 час. За титр антигена и сыворотки в РСК принимали их максимальное разведение, при котором фиксировалась 100%-ная задержка гемолиза эритроцитов.

В результате исследований установлено, что специфические антиген и сыворотка при стандартных условиях хранения сохраняли свою активность в течение 18 месяцев — заявленного срока годности, что также соответствовало теоретическим расчетам, которые проводили согласно «Методическим рекомендациям» [7]. Компоненты набора — специфические антиген и сыворотка — сохраняли свою активность при условии хранения при температуре 40°C в течение 45 сут., при 60°C — не менее 6 часов (срок наблюдения).

Выводы

1. Метод «ускоренного старения» при повышенных температурах может быть успешно применен в условиях действующего производства для определения срока годности иммунобиологических препаратов.

2. Гарантированный срок годности набора для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК составляет 18 мес. при условии хранения при температуре до 20°C в сухом помещении.

3. Компоненты набора являются термостабильными, сохраняя активность при условии хранения при 40°C в течение 45 сут. и не менее 6 часов (срок наблюдения) при 60°C.

4. Термостабильность компонентов набора позволяет транспортировать их в течение непродолжительного периода (не более 40 суток при температуре, не превышающей 40°C) без использования рефрижераторов.

Список литературы

1. Волков М.Ю., Заблоцкая А.А. Применение метода «ускоренного старения» для установления сроков годности биологических препаратов ветеринарного назначения // Ветеринарная медицина, 2011, № 1. — С. 7-10.
2. ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля лекарственных средств».

3. Люлькова Л.С., Еремец В.И., Самуйленко А.Я. Опытное производство наборов для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК (РДСК) // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных препаратов. – Щелково, 2003. – С. 118-120.

4. Обеспечение качества фармацевтических препаратов: Сб. реком. и тематич. материалов. – Т. 1. ВОЗ. – Женева, 1998, 270 с.

5. Руководство по испытанию стабильности фармацевтических препаратов, содержащих широко распространенные лекарственные вещества в соответствующих лекарственных формах. 34-й доклад: Комитет экспертов ВОЗ по спецификациям для фармацевтических препаратов. Приложение 5. – Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1998 (СТД ВОЗ № 863). – С. 79-99.

6. Смоленский В.И., Козырев Ю.А., Сергеева С.П. и др. Надзор за качеством лекарственных средств для животных и кормов: Сб. научн. тр. ВГНКИ, 2007. Т. 68. С. 35-44.

7. Скотникова Т.А., Неминущая Л.А., Токарик Э.Ф., Еремец Н.К. Методические рекомендации по исследованию стабильности иммунопрепаратов на этапе их разработки и в условиях действующего производства. М., 2009.

Контактная информация:
Люлькова Лариса Сергеевна,
8-496-56-3-21-96, 8-496-56-3-25-43
e-mail: ook_vnitibp@mail.ru

УДК 619:615.273.4

А.А. АНТИПОВ, А.А. ДЕЛЬЦОВ

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ ИЗУЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЖЕЛЕЗОДЕКСТРАНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Оценка токсических свойств фармакологического вещества при его длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма. В соответствии с «Положением о порядке экспертизы, испытания и регистрации ветеринарных препаратов в РФ» изучена токсичность нового железосодержащего лекарственного средства Ферранимал-75М.

Ключевые слова: железодекстран, гемосидероз, токсичность, лабораторные животные.

A.A. ANTIPOV, A.A. DEL'TSOV

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

MORPHOLOGICAL CHANGES OF BODIES OF RATS STUDYING OF CHRONIC TOXICITY OF IRONDEXTRAN PREPARATIONS

Assessment of toxic properties of pharmacological substance at its long introduction, identification of the most sensitive bodies and organism systems. According to «the provision on an order of examination, test and registration of veterinary preparations in the Russian Federation» studied toxicity of new ferrous Ferranimal-75M medicine.

Key words: iron dextran, haemosiderosis, toxicity, laboratory animals.

Целью экспериментов являлось изучение хронической токсичности препарата Ферранимал-75М, разработанного на базе широко известного и применяющегося Ферранимала-75. Отличие и преимущество состоят в том, что некоторые атомы железа (III) в полимерном ядре соединения $[\text{Fe}_m\text{O}_m(\text{OH})_n][\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]_p$ замещены атомами меди, кобальта и селена. В 1 см³ препарата содержится 75 мг железа (III) в декстрановом комплексе, 0,10 мг меди (II) в декстрановом комплексе, 0,20 мг кобальта (II) в декстрановом комплексе, 0,05 мг селена (IV) стабилизированного.

Хроническую токсичность Ферранимала-75М изучали на белых крысах обоего пола, массой тела 80–100 г. Для этого были сформированы 5 групп животных, по 30 особей в каждой. Первые две группы являлись опытными, три последние служили контролем (третьей и четвертой группе вводили препарат сравнения — Ферроглюкин-75, пятой группе вводили изотонический раствор натрия хлорида). Препараты вводили в двух различных дозировках (75, 150 мг/кг Fe(III)), внутримышечно, в заднебедренную группу мышц, в течение 14 дней, соблюдая меры асептики.

В конце эксперимента все животные были подвергнуты эвтаназии с дальнейшим патологоанатомическим исследованием и одновременным проведением гистологического изучения тканей печени, почек, селезенки и мышечной ткани из места инъекции. Указанные органы извлекали при вскрытии животных и фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина. Кусочки органов заливали в парафин и готовили гистосрезы толщиной 5–7 мкм на микротоме МНС-2 по общепринятым методикам с последующим их окрашиванием для обзорных целей гематоксилином Майера и эозином, а также использовали метод Перлса для выявления железа (III) с помощью реакции берлинской лазури.

Результаты исследования. Введение препаратов не вызывало клинически выраженных негативных изменений.

В результате проведения патологоанатомического исследования установлено, что у всех животных, получавших железосодержащие препараты, включая контрольные группы, получавшие Ферроглюкин-75, были обнаружены общие патологоанатомические из-

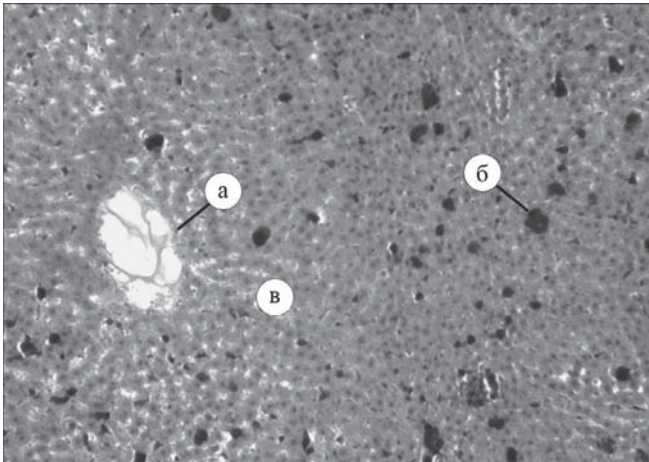


Фото 1. Печень крысы опытной группы животных. Видны увеличенные в диаметре центральные вены (а), зёрна гемосидерина (б) и гепатоциты в состоянии зернистой дистрофии (в). Окраска гематоксилином и эозином. Окуляр ×10, объектив ×10

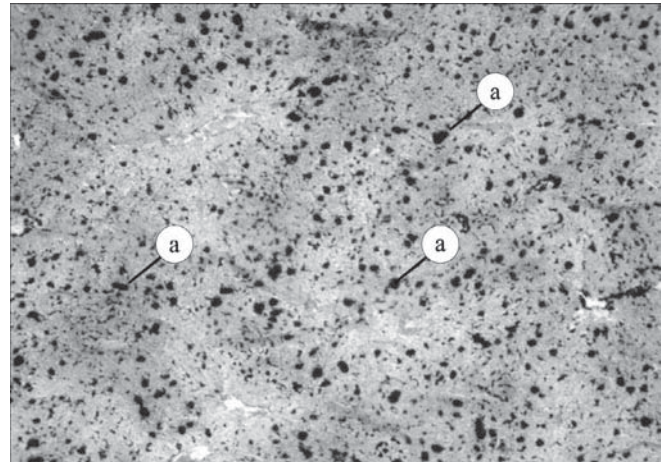


Фото 2. Печень крысы опытной группы животных. Видны сидерофаги, в цитоплазме которых располагаются зёрна гемосидерина, окрашенные в синий цвет (а). Окраска по Перлсу. Окуляр ×10, объектив ×4

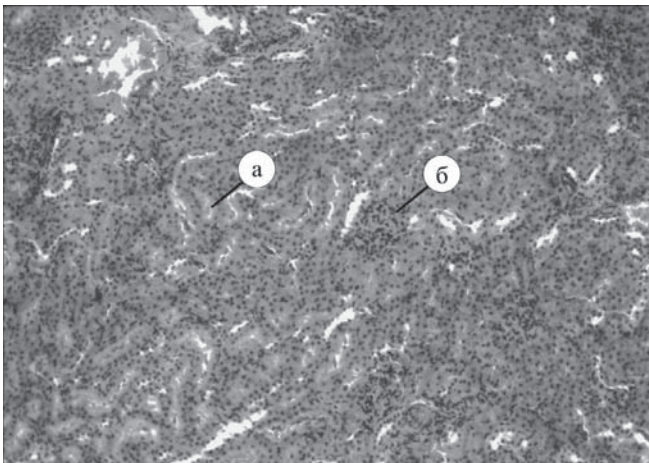


Фото 3. Почка крысы опытной группы животных. Видны скопления белковых цилиндров в просвете канальца почки (а) и плохо различимые увеличенные клубочки с набухшим эндотелием капилляров (б). Окраска гематоксилином и эозином. Окуляр ×10, объектив ×4

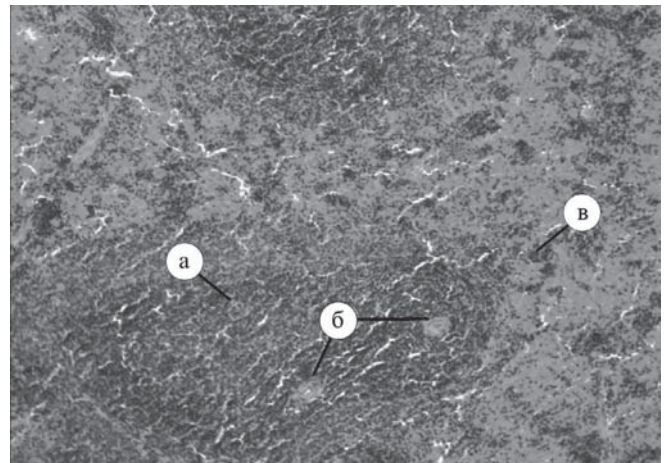


Фото 4. Селезёнка крысы опытной группы животных. Видны неправильной формы сливные фолликулы (а), центральные артерии (б) и сидерофаги, в цитоплазме которых располагаются зёрна гемосидерина (в). Окраска гематоксилином и эозином. Окуляр ×10, объектив ×10

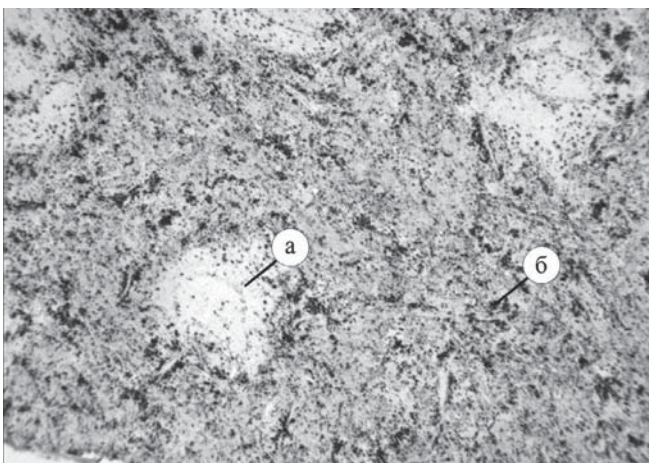


Фото 5. Селезёнка крысы опытной группы животных. Видны фолликулы (а) и сидерофаги, в цитоплазме которых располагаются зёрна гемосидерина синего цвета (б). Окраска по Перлсу. Окуляр ×10, объектив ×10

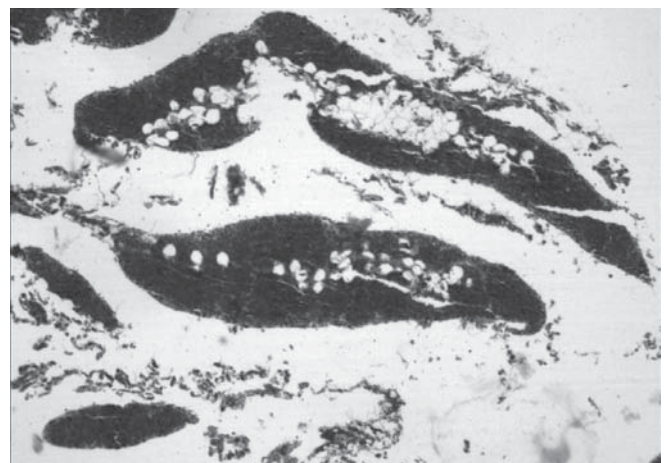


Фото 6. Узелки в сальнике крысы опытной группы животных. Вся их паренхима заполнена сидерофагами, в цитоплазме которых располагаются зёрна гемосидерина. Окраска гематоксилином и эозином. Окуляр ×10, объектив ×4

менения в органах и тканях, характеризующиеся преимущественно гемосидерозом и белковой дистрофией. На сальнике небольшого размера (2–3 мм) округлой и овальной формы образования красно-бурого цвета, мягкие, блестящие, однородные. Для выяснения природы этих новообразований было решено провести их гистологическое исследование вместе с другими образцами, взятыми при вскрытии.

Других патологоанатомических изменений на макрокартине отмечено не было.

Микроскопическое изучение показало, что во всех пробах органов и тканей наблюдаются сходные изменения, которые являются следствием отложения железа при избыточном его поступлении.

Гистологические изменения печени (фото 1, 2) характеризуются развитием токсической дистрофии и гемосидероза. Балочное строение печени сохранено, дольчатость плохо выражена. Гепатоциты округлой формы, резко набухшие, их границы сглажены, цитоплазма мутная, окраска неравномерная. Ядра гепатоцитов окрашены неравномерно: преимущественно бледно базофильные, хроматин в них образует крупноглыбчатые диффузные скопления. В отдельных клетках наблюдаются кариопикноз и кариорексис. Клетки Купфера набухшие, число их увеличено. В цитоплазме гепатоцитов, клеток Купфера и межклеточном веществе располагаются множественные зёрна буро-коричневого цвета, которые дают положительную реакцию на железо при окраске по Перлсу. Синусные сосуды расширены в центральных участках. Диаметр центральных вен их увеличен.

Изменения структуры почек крыс (фото 3) можно охарактеризовать как дистрофические изменения паренхимы с дисциркуляторными нарушениями. Клубочки увеличены, плохо различимы. Петли капилляров полнокровны, а их эндотелий набухший, нередко имеет вакуолярные включения. Эпителий канальцев округлой формы, набухший, границы клеток сглажены, цитоплазма помутневшая, ядра окрашены неравномерно. При этом отмечали пикноз ядер, апикальную или полную деструкцию эпителия. Просвет некоторых канальцев резко сужен, в других находится скопление большого количества аморфных белковых масс в виде гиалиновых цилиндров. Изменения в собирательных трубочках менее выражены. Просвет их сохранен, а цитоплазма эпителиальных клеток имеет явления вакуолизации, вокруг ядер отмечаются участки просветления цитоплазмы. Дисциркуляторные изменения характеризуются явлениями стаза, а также множественными мелкими кровоизлияниями.

Капсула селезёнки (фото 4, 5) и отходящие от неё трабекулы истончены. Белая пульпа представлена фолликулами с нарушенной архитектурой: граница их нечетко выражена, они отличаются крупными размерами, нередко гигантские, сливные, неправильной формы, со светлыми центрами. Мантийная зона фолликула резко увеличена и представлена скоплением редко расположенных Т- и В-лимфоцитов. Лимфоидная ткань образует диффузные скопления вне фолликула. Красная пульпа селезёнки представлена хорошо развитыми венозными синусами, переполненными гиперхромными эритроцитами, среди которых обнаруживаются фагоциты, в цитоплазме которых располагаются зёрна буро-коричневого цвета, которые дают положительную реакцию на железо при окраске по Перлсу.

Межмышечные прослойки соединительной ткани в месте инъекции препарата содержат множество фагоцитов, в цитоплазме которых располагаются зёрна буро-коричневого цвета, которые дают положительную реакцию на железо при окраске по Перлсу. Поперечная исчерченность мышечных волокон сохранена, но трудно различима.

Найденные при вскрытии новообразования на сальнике (фото 6) представляют собой скопление сидерофагов в толще серозной оболочки. По-видимому, это так называемые млечные пятна (*macula lactea*, франц. *taches laiteuses*) [6], состоящие из скопления макрофагов, в данном случае перегруженных пигментом, дающим положительную реакцию на железо при окраске по Перлсу.

Строение органов крыс контрольной группы, получавших на протяжении опыта изотонический раствор натрия хлорида, соответствует норме.

Несмотря на обнаруженные патологические процессы, можно утверждать, что в организме существуют механизмы, способствующие предотвращению губительного действия избытка железа на клетки, ткани и органы. Большая часть железа хранится в депо, которыми являются печень и селезёнка, в виде гемосидерина в макрофагах, то есть в неактивной и безопасной для организма форме.

Изучение влияния препарата Ферранимал-75М в течение 14 дней в дозировках 75 и 150 мг/кг Fe(III) внутримышечно показало, что изучаемый препарат обладает хронической токсичностью, поскольку приводит к морфологическим изменениям в органах, преимущественно печени, которые характеризуются накоплением железа в фагоцитарных клетках в виде гемосидерина, зернистой дистрофией гепатоцитов с последующим некрозом. Выявленные изменения связаны с оксидативным стрессом в клетках, возникающим в результате усиления интенсивности процессов перекисного окисления липидов [4, 5, 6].

Список литературы

1. Алексеев Н.А. Анемии. – СПб: Гиппократ, 2004, 512 с.
2. Арунов М.Н. Проблемы экологии и токсикологии животных // Теоретические и практические аспекты возникновения и развития болезней животных и защита их здоровья в современных условиях: Мат. межд. научн. конф. – Воронеж, 2000. – Т. 2. – С. 4-7.
3. Хабриев Р.У., Денисов И.Н., Герасимов В.Б. и др. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Изд. дом «Русский врач», 2005, 832 с.
4. Jacobs A., Worwood M., editors. The pathology of iron overload / In Iron in Biochemistry and Medicine // Academic Press.– London. II: 1980, 427-459.
5. Minotti G., Aust S.D. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation // Chem. Phys. Lipids. 44, 1987, 191-208.
6. Takemori N. Histogenesis of the omental milk spot of the mouse // Hokkaido Igaku Zasshi, 1980; 55: 223-34.
7. Wills E.D. Effects of iron overload on lipid peroxide formation and oxidative demethylation by the liver endoplasmic reticulum // Biochem. Pharmacol., 1972. 21: 239-247.

Контактная информация:
Антипов Александр Александрович
axis83@mail.ru
тел.: 377-70-44

В.М. БАКУЛИН, Е.А. МАРТИНСОН, М.К. БАКУЛИН
ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

И.В. ТИХОНОВ
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ВЛИЯНИЕ ПЕРФТОРДЕКАЛИНА НА РОСТ И АНТИБИОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУР *STREPTOMYCES ALBUS* И *S. RIMOSUS* В ЖИДКОЙ СРЕДЕ

Показано, что добавление перфторорганических соединений с газотранспортной функцией в жидкую среду при глубинном культивировании стрептомицетов *Streptomyces albus* и *S. rimosus* приводит к интенсификации их роста и антибиотической активности культуральной среды.

Ключевые слова: перфторорганические соединения, стрептомицеты, глубинное культивирование, биомасса, антибиотическая активность.

V.M. BAKULIN, E.A. MARTINSON, M.K. BAKULIN
Vyatka state university, Kirov

I.V. TIKHONOV
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

EFFECT OF PERFLUORODECALIN ON GROWTH AND ANTIBIOTIC ACTIVITY OF *STREPTOMYCES ALBUS* AND *S. RIMOSUS* IN LIQUID MEDIA

It has been shown that the addition of perfluororganic substances with a gas-transporting function to the liquid media upon a deep cultivation streptomycetes *Streptomyces albus* and *S. rimosus* of results in intensification their growth rate and antibiotic activity of in liquid media.

Key words: perfluoroorganic compounds, streptomycetes, deep cultivation, biomass, antibiotic activity.

Антибактериальные средства являются одной из наиболее широко используемых и дорогостоящих фармакологических групп, применяемых в различных областях клинической медицины [1]. Около 75% всех известных антибиотических веществ, используемых в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве, образуются актиномицетами рода *Streptomyces* [2].

Современная биотехнология ведет активный поиск новых способов получения и повышения эффективности биосинтеза антибиотиков, продуцируемых данными микроорганизмами [3].

В последние годы нами проводятся систематические исследования возможности использования перфторорганических соединений (ПФОС) с газотранспортной функцией для интенсификации скорости роста и повышения биосинтетической продуктивности микроорганизмов разных групп при глубинном культивировании для последующего внедрения полученных результатов в биотехнологическое производство [4].

Целью настоящей работы являлась экспериментальная оценка влияния карбогала и перфтордекалина на процессы глубинного роста культур стрептомицетов *S. albus* и *S. rimosus* и на антимикробную активность получаемой культуральной жидкости.

Материал и методы. В опытах использовали перфтордекалин (ПФД, $C_{11}F_{20}$) производства ОАО «Кирово-Чепецкий химкомбинат им. Б.П. Константинова».

Штаммы микроорганизмов. Исследовали два штамма стрептомицетов: *S. albus* 327-А и *S. rimosus* К514 с типичными родовыми и видовыми свойствами; тест-штаммы бактерий *E. coli* М 17, *Staphylococcus aureus* 208 и *Pseudomonas putida* ВУ38 использовали для определения антибактериальной активности культур стрептомицетов [4].

Питательные среды. Для выращивания тест-микроорганизмов использовали мясопептонный агар (МПА), стрептомицетов — «овсяный» агар, приготовленные по рекомендованным прописям и технологиям [5].

Для глубинного выращивания стрептомицетов использовали жидкую питательную среду с соевой мукой, содержащую крахмал 3,0%; соевую муку — 3,0%; $(NH_4)_2C_4H_4O_6$ — 0,5%; $(NH_4)_2SO_4$ — 0,4%; $CaCO_3$ — 0,8%; K_2HPO_4 — 0,01%; глюкозу — 1,5% (вводится в стерильную питательную среду); воду водопроводную до 100% [5].

Микробиологические методы. Для приготовления посевного материала культуры выращивали на овсяном агаре в чашках Петри при температуре 27°C в течение 10 сут.

Для глубинного выращивания стрептомицетов на втором этапе использовали жидкую питательную среду на основе соевой муки. Культуры стрептомицетов выращивали в колбах Эрленмейера объемом 500 см³ при температуре 27°C на шуттеле со скоростью вращения платформы 230 об./мин. В стерильные колбы вносили 7,5 см³ (5,0 об.%) ПФД. Культуры, выросшие на плотной среде, смывали физиологическим раствором и разводили до концентрации $1,5 \cdot 10^7$ спор/см³, по 10 см³ вносили в колбы, в которые добавляли по двадцать стерильных стеклянных бусин диаметром 0,4 см, а затем готовой средой доводили общий объем рабочей смеси до 150 см³ (100%). Через каждые 48 часов культивирования отбирали пробы по 15 см³, в которых оценивали чистоту культуры и ее морфологическую типичность путем микроскопии мазков, а также накопление биомассы и антибактериальную активность культуральной среды. Прирост биомассы определяли весовым методом с использованием бумажных фильтров, доведенных до по-

стоянной массы. Фильтры с биомассой высушивали при 105° в течение 2 ч.

Антибактериальную активность определяли на плотной среде путем нанесения 20 мкл фильтрата культуральной жидкости на свежесаянный газон тест-культур (0,1 см³ тест-культуры в концентрации 1·10⁷ КОЕ·см⁻³, растертой по поверхности агаровой среды в чашках Петри) с последующим подрачиванием культуры при 28°С в течение 2 сут. Усредненный размер зон ингибирования роста трех тест-культур использовали в качестве условных единиц (УЕ) антибактериальной активности культуральной среды [2].

Результаты исследования. Культуры обоих использованных в экспериментах штаммов стрептомицетов обеспечивали одинаковую динамику роста биомассы при глубинном культивировании в жидкой питательной среде с соевой мукой (рис. 1). При этом максимумы биомассы в стандартных условиях выращивания культур (в пробах, взятых на 192 ч роста) составили для штамма *S. albus 327-A* 5,2 мг%, а для штамма *S. rimosus K514* — 7,3 мг%.

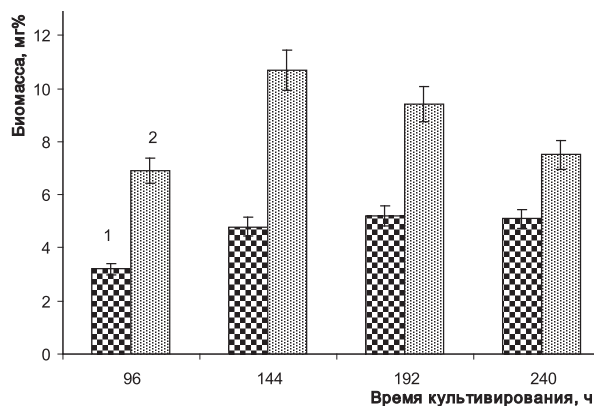
При внесении в среду культивирования ПФД в количестве 5,0 об.% отмечалось ускорение роста культур обоих штаммов и увеличение достигаемой концентрации биомассы. Уже через 144 ч роста концентрация биомассы в культуральной среде, содержащей 5,0 об.% ПФД, достигала для *S. albus 327-A* 10,7 мг%, для штамма

S. rimosus K514 — 18,5 мг%, что превысило максимальные показатели концентрации биомассы стрептомицетов в среде без ПФД, достигаемые только на 192 ч роста, в 2,1 и 2,5 раза соответственно.

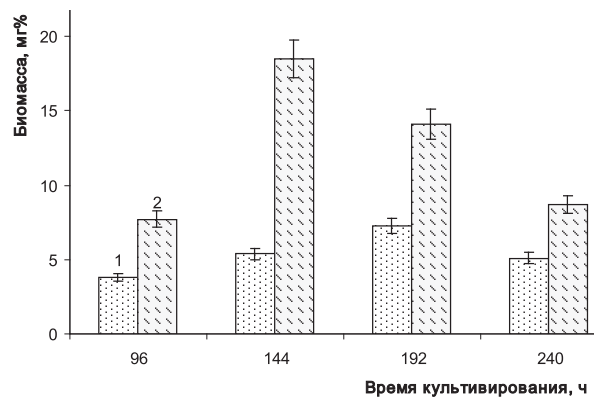
Динамика антибактериальной активности фильтрата культуральной среды в отношении тест-штаммов бактерий при глубинном выращивании стрептомицетов в случае каждого штамма имела свои особенности (рис. 2).

При выращивании культуры *S. albus 327-A* наблюдался типичный двухфазовый рост стрептомицетов с максимальным приростом биомассы в тропофазе с последующим нарастанием антибактериальной активности культуральной среды в идиофазе и сдвигом максимумов активности по отношению к максимумам накопления биомассы на 48 ч. При этом наличие в среде ПФД интенсифицировало процессы прироста биомассы и образования антибиотических веществ как во временном, так и в количественном отношении, и обеспечило почти трехкратное превышение активности культуральной среды с ПФД на 192 ч роста в сравнении с активностью среды в контроле.

Выращивание культуры *S. rimosus K514* без ПФД сопровождалось теми же закономерностями при относи-



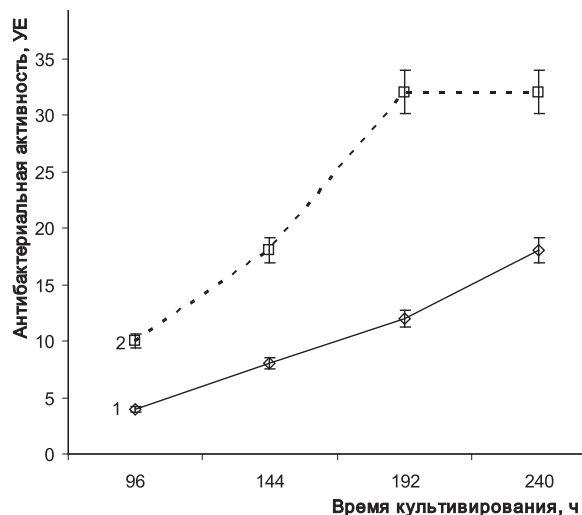
А



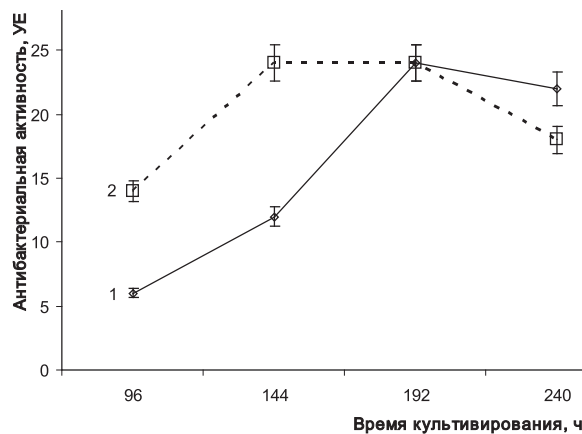
Б

Рис. 1. Накопление биомассы в культуральной среде при глубинном культивировании штаммов:

А) *S. albus 327-A*; Б) *S. rimosus K514*
1 – без добавления ПФД – контроль;
2 – в среде, содержащей 5 об.% ПФД



А



Б

Рис. 2. Антибактериальная активность культуральной жидкости при глубинном культивировании штаммов:

А) *S. albus 327-A*; Б) *S. rimosus K514*
1 – без добавления ПФД – контроль;
2 – в среде, содержащей 5 об.% ПФД

тельно более низкой продукции биомассы и более высоким росте активности культуральной среды, при этом на 144 ч роста антибактериальная активность среды с ПФД в два раза превосходила активность в контроле, совпадая с максимумом прироста биомассы при отсутствии фазового сдвига. На 192 ч роста культуры активность культуральной среды в контроле сравнялась с активностью культуры с ПФД.

Вывод. Внесение 5 об.% ПФД в среду культивирования *S. albus 327-A* и *S. rimosus K514* привело к ускорению роста, увеличению биомассы стрептомицетов и росту антибактериальной активности культуральной среды. Максимальные концентрации биомассы в среде с 5 об.% ПФД, получаемые на 144 ч роста, превышали максимумы накопления биомассы в контроле на 192 ч роста в 2,1–2,5 раза.

Список литературы

1. Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств / Под ред. Г.Л. Вышковского. – М.: РЛС-МЕДИА, 2010, 1294 с.
2. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках. – М.: МГУ, 2004, 528 с.
3. *Theuretzbaher U.* Future antibiotics: is the tide starting to turn? // International Journal of Antimicrobial Agents, 2009. В. 34, № 1. – Р. 15–20.
4. *Бакулин М.К., Дармова С.В., Бакулин В.М. и др.* Интенсификация биосинтеза даунорубицина и роста *Streptomyces purpurogeniscleroticus* под влиянием перфтор-1,3-диметилциклогексана // Ветеринарная медицина, 2010, № 3-4. – С. 16–19.
5. *Равилов А.З., Гильмутдинов Р.Я., Хусаинов М.Ш.* Микробиологические среды. – Казань, 1999, 398 с.

Контактная информация:
Бакулин В.М. vladbakulin@rambler.ru

УДК [632.95.028+632.954+579.26]

В.М. БАКУЛИН, Е.А. МАРТИНСОН, Н.С. МЯЧИНА, М.К. БАКУЛИН
ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

И.В. ТИХОНОВ
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЧВЕННЫХ ГЛИФОСАТУСТОЙЧИВЫХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *Pseudomonas* В БИОТЕХНОЛОГИИ ДЕГРАДАЦИИ ФОСФОНОМЕТИЛГЛИЦИНА

В работе представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о перспективности использования глифосатустойчивых изолятов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из загрязненной фосфонатом N-фосфонометилглицином почвы, в биотехнологических процессах глубинного культивирования и биодеградации этого ксенобиотика, загрязняющего окружающую среду.

Ключевые слова: бактерии, биодеградация, N-фосфонометилглицин, глубинное культивирование.

V.M. BAKULIN, E.A. MARTINSON, N.S. MYACHINA, M.K. BAKULIN
Vyatka state university, Kirov

I.V. TIKHONOV
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

USE OF THE GLYPHOSATE RESISTANT ISOLATES FROM SOIL OF THE GENUS *PSEUDOMONAS* BACTERIA IN BIOTECHNOLOGY DEGRADATION N-PHOSPHONOMETHYLGLYCIN

In the work presented the experiment data of the perspectives of using glyphosateresistant isolates of the genus *Pseudomonas* bacteria from soil polluted with phosphonates N-phosphonomethylglycin in biotechnological processes of deep cultivating and degradation that xenobiotics contaminating the environment.

Key words: bacteria, biodegradation, N-phosphonomethylglycin, deep cultivating.

Одним из наиболее широко используемых в мире фосфонатов является гербицид системного действия глифосат (фосфонометилглицин — ФМГ), который служит основой более трех десятков препаратов под разными фирменными названиями, производителями которых являются такие известные фирмы как «Монсанто», «Дау Агро Сайэнс» и др. [1]. Только в Украине ежегодно применяется около 1500 тонн, в США — 22000 тонн этого гербицида [2]. Пути деградации глифосата в объектах окружающей среды и растениях включают фотохимическое и химическое разложение и разрушение под действием микроорганизмов [3]. Использование биологических методов утилизации токсичных фосфонатов, к которым относится и глифосат, отходов их производства и продуктов разложения рассматривается российскими

и зарубежными специалистами в качестве главной альтернативы физическим и химическим методам защиты окружающей среды от токсикантов этого типа [4, 5].

В этом плане актуальными являются исследования, проводимые биотехнологами и микробиологами ВятГУ и МГАВМиБ им. К.И.Скрябина, по созданию биологических консорциумов на основе штаммов-биодеструкторов, разработке новых биотехнологических подходов комплексного использования их для уничтожения фосфонатов в природных и искусственных средах [6].

Практический интерес представляет использование глифосатустойчивых изолятов псевдомонад, выделенных из почвы в местах интенсивного использования глифосата, в биотехнологии деградации N-фосфонометилглицина [6].

Целью настоящей работы являлась сравнительная оценка эффективности разложения глифосата почвенными изолятами бактерий рода *Pseudomonas* с разным уровнем устойчивости к этому гербициду.

Материалы и методы исследования. Для тестирования чувствительности псевдомонад к глифосату использовали препарат Раундап («Монсанто», США), содержащий 36% глифосата.

Штаммы микроорганизмов. В работе использованы изоляты бактерий рода *Pseudomonas* с типичными родовыми и видовыми свойствами из коллекции ВятГУ, выделенные и описанные нами ранее [6].

Питательные среды. Для выращивания микроорганизмов использовали плотную питательную среду, содержащую: картофельный крахмал — 1,0%; соевую муку — 3,0%; $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ — 0,6%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,4%; CaCO_3 — 0,8%; K_2HPO_4 — 0,01%; глюкозу — 2,0%; агар — 2%, воду водопроводную до 100% и жидкую среду того же состава без агара — «соевая среда» [5].

Микробиологические методы. В качестве посевного материала использовали двухсуточные культуры бактерий рода *Pseudomonas*, выращенные на плотной среде при температуре 28°C. Культуры, выросшие на плотной среде, смывали физиологическим раствором и разводили до концентрации $1,5 \cdot 10^9$ бактерий в см^3 .

В колбы Эрленмейера объемом 500 вносили по 62,5; 250,0 и 1000,0 мкл препарата Раундап (22,5; 90,0 и 360,0 мг глифосата), затем готовой жидкой средой доводили объем рабочей смеси в колбах до 140 см^3 и вносили по 10,0 см^3 исследуемых посевных культур. Конечная концентрация бактерий в среде при посеве составляла $1,0 \cdot 10^8$ бактерий в см^3 , глифосата — 150; 600 и 2400 $\text{мкг} \cdot \text{см}^{-3}$. Выращивание вели при температуре 28°C на шуттеле со скоростью вращения платформы 250 об./мин. Через 24 часа культивирования проводили определение количества живых бактерий в средах путем высева серийных разведений на плотные среды и количественный анализ содержания глифосата хроматографическим методом [7].

Результаты исследования. На основе первичных изолятов *P. fluorescens* 040 и *P. putida* 540, устойчивых к 0,4 $\text{мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ глифосата, путем семи пассажей культур в жидкой соевой среде с возрастающими концентрациями N-фосфонометилглицина и отбора наиболее устой-

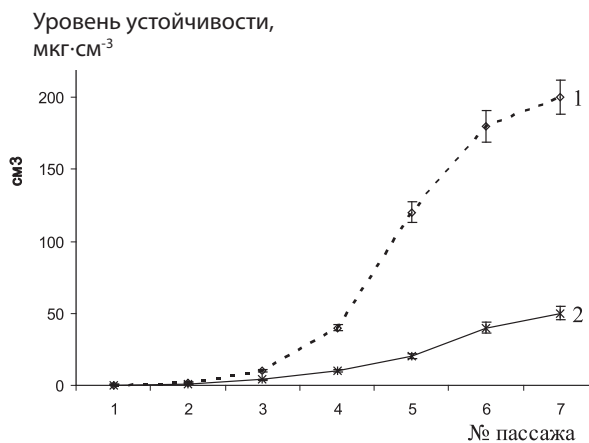


Рис. Изменение уровней устойчивости псевдомонад в процессе семи пассажей культур изолятов на жидкой соевой среде с возрастающими концентрациями N-фосфонометилглицина при получении штаммов *P. fluorescens* 047 (1) и *P. putida* 547 (2)

чивых клонов были получены штаммы *P. fluorescens* 047 и *P. putida* 547 с резистентностью к 200 и 50 $\text{мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ глифосата соответственно (рис.).

Как видно из рисунка, при равной исходной чувствительности к глифосату нарастание устойчивости к нему у изолята псевдомонад вида *fluorescens* происходило более интенсивно, чем у изолята вида *putida*. В результате семи пассажей на средах с возрастающими концентрациями глифосата культура *P. fluorescens* 047 повысила уровень устойчивости первичного изолята 500 раз, в то время как культура *P. putida* 547 — в 125 раз.

Далее представлялось целесообразным оценить возможность использования культур полученных штаммов в процессах деструкции N-фосфонометилглицина в лабораторных условиях глубинного культивирования и при их интродукции в контаминированную данным гербицидом почву.

При глубинном культивировании исследуемых культур в «соевой среде» без гербицида при посевной концентрации $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ· см^{-3} через сутки биомасса составляла $(5,2-5,7) \cdot 10^9$ КОЕ· см^{-3} (табл.). Внесение в среду 150 $\text{мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ глифосата сопровождалось через сутки снижением исходной концентрации бактерий при засеве в случае культур первичных изолятов *P. putida* 540 и *P. fluorescens* 040 до $(0,3-0,4) \cdot 10^8$ КОЕ· см^{-3} , при этом концентрация глифосата в среде снижалась на 27-37%. Культуры глифосатустойчивых штаммов были способны расти в данной среде, приводя к полной инактивации фосфонометилглицина. Культура *P. fluorescens* 047 была способна расти на среде, содержащей 600 $\text{мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ гербицида, при этом она способствовала инактивации за сутки 92% гербицида, хотя концентрация бактерий повысилась за сутки только в 7,2 раза, что в 7,6 раза ниже, чем в среде

Таблица

Инактивация глифосата в жидкой «соевой среде» при глубинном культивировании псевдомонад

Микроорганизм	Концентрация глифосата в жидкой среде, ... $\text{мкг} \cdot \text{см}^{-3}$		Содержание живых бактерий в среде через 24 ч, КОЕ· см^{-3}
	исходная	после культивирования (% от исходной)	
<i>P. fluorescens</i> 040	0	0	$5,7 \cdot 10^9$
	150	95 (63)	$0,4 \cdot 10^8$
	600	480 (80)	0
	2400	2300 (96)	0
<i>P. fluorescens</i> 047	0	0	$5,5 \cdot 10^9$
	150	0	$3,7 \cdot 10^9$
	600	50 (8)	$7,2 \cdot 10^8$
	2400	1600 (67)	$<1 \cdot 10^7$
<i>P. putida</i> 540	0	0	$5,4 \cdot 10^9$
	150	110 (73)	$0,3 \cdot 10^8$
	600	490 (82)	0
	2400	2200 (92)	0
<i>P. putida</i> 547	0	0	$5,2 \cdot 10^9$
	150	0	$0,8 \cdot 10^9$
	600	400 (67)	$<1 \cdot 10^7$
	2400	1800 (75)	0
Контроль (инактивация гербицида в среде без бактериальных культур)	150	135 (90)	-
	600	540 (90)	-
	2400	2200 (92)	-

без глифосата. Следует отметить, что до 10% глифосата в средах инактивировалось без участия бактерий (табл.).

Далее был поставлен эксперимент по контаминации образцов стерильной глинистой и черноземной почвы (рН 6,5) глифосатом из расчета 2400 мкг·см⁻³ с последующей инокуляцией в нее культуры *P. fluorescens* 047, выращенной в «соевой среде» с 600 мкг·см⁻³ глифосата до конечной концентрации в почве 1,0·10⁸ КОЕ·см⁻³. В качестве контроля была использована та же почва без инокуляции микробной культуры. Уже через 3 часа глифосат в почве с внесенной в нее культурой *P. fluorescens* 047 не определялся, в то время как в контрольных образцах его содержание в этот период снизилось за счет связывания с частицами почвы, действия почвенных солей и других факторов только до 1200–1800 мкг·см⁻³. Следует отметить, что период полураспада глифосата в почве в зависимости от типа почв, по данным специалистов US EPA, находится в диапазоне от 3 до 130 дней [8].

Выводы

1. В результате семи пассажей на средах с возрастающими концентрациями N-фосфометилглицина получены штаммы *P. putida* 547 и *P. fluorescens* 047 с устойчивостью к 50 и 200 мкг·см⁻³ глифосата, что превышает уровень устойчивости исходных культур в 125 и 500 раз соответственно.

2. Внесение культуры *P. fluorescens* 047 в концентрации 1,0·10⁸ КОЕ·см⁻³ в жидкую среду с 600 мкг·см⁻³ глифосата привело к деградации 92% гербицида в течение первых суток, в почве с 2400 мкг·см⁻³ глифосата он не определялся уже через 3 часа после внесения биодеструктора.

Список литературы

1. Franz J.K., Mao M.K., Sikorski J.A. Glyphosate: A unique global herbicide // American Chemical Society, 1997. Chap. 4. – P. 65-97.
2. Кузнецова Е.М., Чмиль В.Д. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков // Современные проблемы токсикологии, 2010, № 1. – С. 87-95.
3. Жариков М.Г., Спиридонов Ю.Я. Изучение влияния глифосатсодержащих гербицидов на агроценоз // Агрохимия, 2008, № 8. – С. 81-89.
4. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия, 2002, Т. 67. Вып. 2, № 6. – С. 220-233.
5. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Гудков Д.А. и др. Экологически безопасная биодеградация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2010. Т. 54, № 4. – С. 19-24.
6. Бакулин В.М., Мартинсон Е.А., Бакулин М.К. и др. Выделение бактерий рода *Pseudomonas* из почвы, загрязненной ксенобиотиком фосфометилглицином // Ветеринарная медицина, 2012, № 1. – С. 9-11.
7. Клисенко М.А., Калинина А.А., Холькова Г.А. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник в 2 тт. – М.: Колос, 1992. Т. 1, 567 с.
8. Pesticide Fact Handbook: US EPA / Noyes Data Corporation. Park Ridge. – New Jersey, 1990. Vol. 2. – P. 301-312.

Контактная информация:

Бакулин В.М. vladbakulin@rambler.ru

УДК 579.26

В.М. БАКУЛИН, Н.С. МЯЧИНА, М.К. БАКУЛИН

ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

И.В. ТИХОНОВ

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ЦЕЛЛЮЗОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Показано, что добавление перфторуглерода (ПФУ) с газотранспортной функцией в жидкую среду при биотехнологических процессах глубинного культивирования микроорганизмов родов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas* приводит к интенсификации прироста биомассы и целлюлозолитической активности.

Ключевые слова: микроорганизмы, перфторуглероды, глубинное культивирование, биомасса, целлюлаза.

V.M. BAKULIN, N.S. MYACHINA, M.K. BAKULIN

Vyatka state university, Kirov

I.V. TIKHONOV

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

INTENSIFICATION OF THE CELLULOSELYTIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS IN BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES OF DEEP CULTIVATING

It has been shown that the addition of perfluororganic substances with a gas-transporting function to the liquid media in biotechnological processes of deep cultivating microorganisms *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas* kinds has provides increase of the biomass rate and acelluloselytic activity.

Key words: microorganisms, perfluorocarbene, deep cultivation, biomass, cellulose.

Целлюлоза является главной составной частью растительного материала, ее синтез на Земле по своим масштабам превосходит синтез всех других природных

соединений (высшие растения на 40-70% состоят из целлюлозы) [1]. Разнообразие микрофлоры, способной разлагать целлюлозу в природных условиях, позволяет

использовать её для трансформации этого наиболее распространенного биотехнологического продукта для практических целей [2].

Целлюлозолитический процесс проходит с использованием ферментной системы, которая носит название целлюлазного комплекса. Этот процесс осуществляют прокариотические и эукариотические микроорганизмы: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas* и др.

Ранее была показана перспективность использования для интенсификации микробиологических процессов перфторуглеродов, выполняющих функции наноконтейнеров [3, 4].

Целью настоящей работы являлась экспериментальная оценка перспективности использования перфторуглеродов с газотранспортной функцией для интенсификации процессов роста глубинных культур и повышения целлюлозолитической активности микроорганизмов, относящихся к прокариотам и эукариотам.

Материалы и методы. В работе использован перфтордекалин (ПФД, химическая формула $C_{11}F_{20}$), ТУ 95-2241-91, производство ОАО «Кирово-Чепецкий химический комбинат им. Б.П. Константинова».

Штаммы микроорганизмов. В работе использованы штаммы микромицетов *Aspergillus fumigates D-12*, *Trichoderma viride 34-7*, *Fusarium oxysporum K-17* и бактерий *Streptomyces cellulose 57-3*, *Cellulomonas flavigena 182*, *Pseudomonas fluorescens 1457* с типичными родовыми и видовыми свойствами, выделенные из почвы и в районе многолетнего сброса отходов лесопромышленного комплекса.

Питательные среды. Для выращивания микроорганизмов использовали плотную питательную среду, содержащую: картофельный крахмал — 1,0%; соевую муку — 2,0%; $(NH_4)_2C_4H_4O_6$ — 0,6%; $(NH_4)_2SO_4$ — 0,4%; $CaCO_3$ — 0,8%; K_2HPO_4 — 0,01%; глюкозу — 2,0%; карбоксиметилцеллюлозу — 5%; агар — 2%, воду во-

допроводную до 100% и жидкую среду того же состава без агара [5].

Микробиологические методы. Культуры микроорганизмов для получения посевного материала выращивали на агаровой среде в чашках Петри при температуре 22-28 °С в течение 3 суток (бактерии) и 6 суток (микромицеты). Выращенные культуры смывали физиологическим раствором, разводили до концентрации 5×10^8 бактерий или конидий в $см^3$. Культуры микроорганизмов выращивали в колбах Эрленмейера объемом 500 $см^3$ при температуре 22-26 °С на шуттеле со скоростью вращения платформы 230 об./мин. в течение 8 суток. Для этого в стерильные колбы вносили: ПФД по 1,5 и 15,0 $см^3$ (0,5; 5,0 об.%); по 3 $см^3$ стандартизованных культур микроорганизмов, содержащих $5 \cdot 10^8$ конидий или бактерий в $см^3$, по десять стерильных стеклянных бусинок диаметром 0,4 см, а затем готовой средой доводили общие объемы культур до 150 мл (100%). В контрольных культурах ПФД отсутствовал. Пробы по 20 $см^3$ отбирали через каждые 48 часов. Выросшую биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, фильтры высушивали при температуре 105 °С. Сухой остаток определяли гравиметрическим методом [6]. О целлюлозолитической активности культур судили по скорости образования редуцирующих сахаров под действием целлюлазного комплекса микроорганизмов в культуральной среде модифицированным методом Шомодьи-Нельсона (в процентах от взятого субстрата — карбоксиметилцеллюлозы) [7-9].

Результаты исследования. Результаты экспериментальных исследований показали, что динамика прироста биомассы культур разных штаммов целлюлозолитиков при глубинном выращивании на среде на основе соевой муки и карбоксиметилцеллюлозы имеет общие закономерности и характерна для прироста биомассы стандартной микробной культуры при периодическом культивировании. Внесение в среду

Таблица 1

Динамика накопления биомассы целлюлозолитиков в исследуемых глубинных культурах при росте на среде с перфтордекалином

Микроорганизм	Концентрация ПФД в среде, об.%	Содержание биомассы ($г \cdot дм^{-3}$) в культуральной среде на ... ч роста ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)			
		48	96	144	192
<i>A. fumigates D-12</i>	0	<2,0	<2,0	3,5±0,8	5,7±0,8
	0,5	<2,0	3,2±0,7	8,2±1,1	11,8±1,4
	5,0	<2,0	9,7±1,2	16,7±1,7	25,4±2,1
<i>T. viride 34-7</i>	0	<2,0	<2,0	<2,0	3,7±0,6
	0,5	<2,0	<2,0	3,9±0,7	8,2±1,3
	5,0	<2,0	3,3±0,6	10,3±1,4	14,7±1,6
<i>F. oxysporum K-17</i>	0	<2,0	2,8±0,5	7,1±1,3	9,5±1,5
	0,5	<2,0	7,7±1,2	16,1±1,8	24,8±1,6
	5,0	<2,0	9,8±1,2	21,1±2,1	29,5±2,3
<i>S. cellulose 57-3</i>	0	<2,0	3,6±2,5	7,6±2,8	14,9±1,3
	0,5	2,5±0,5	19,4±2,4	30,2±3,4	29,7±1,7
	5,0	5,4±0,7	21,2±3,1	34,2±3,8	33,0±1,9
<i>C. flavigena 182</i>	0	<2,0	7,9±1,9	15,4±2,9	21,7±2,2
	0,5	<2,0	18,5±1,6	31,2±3,6	27,5±1,4
	5,0	5,4±0,6	23,1±2,5	38,1±3,1	33,9±1,7
<i>P. fluorescens 1457</i>	0	2,9±0,5	14,1±1,2	20,5±1,9	26,4±1,6
	0,5	3,4±0,4	15,2±1,4	29,3±2,0	31,1±1,4
	5,0	5,7±0,6	33,7±2,3	51,1±4,2	46,5±4,5

Целлюлозолитическая активность микробных культур при росте на среде с перфтордекалином

Микроорганизм	Содержание ПФД в среде, об.%	Степень осахаривания карбоксиметилцеллюлозы (процент от исходного количества) под влиянием целлюлаз культур, взятых на ... ч роста ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)		
		96	144	192
<i>A. fumigates D-12</i>	0	7±2	12±3	17±3
	0,5	13±3	15±3	21±4
	5,0	22±4	30±4	32±4
<i>T. viride 34-7</i>	0	6±3	8±3	11±3
	0,5	9±3	17±3	18±4
	5,0	15±4	19±3	23±4
<i>F. oxysporum K-17</i>	0	17±3	21±4	22±3
	0,5	24±3	24±3	27±4
	5,0	28±4	38±5	40±4
<i>S. cellulose 57-3</i>	0	16±4	24±4	23±3
	0,5	28±4	34±4	29±4
	5,0	41±5	44±5	34±4
<i>C. flavigena 182</i>	0	9±2	27±4	31±3
	0,5	16±4	29±6	27±5
	5,0	35±5	37±6	34±4
<i>P. fluorescens 1457</i>	0	17±4	29±5	32±5
	0,5	23±4	34±5	33±5
	5,0	39±5	57±6	49±5

ПФД интенсифицировало процесс роста всех исследуемых культур (табл. 1). При этом максимумы получаемой биомассы у микромицетов и бактерий приходились на 144–192 ч их роста в жидкой среде.

Полученные данные свидетельствуют, что перфторуглерод интенсивнее стимулирует процессы биосинтеза у медленно растущих микромицетов. Максимумы накопления биомассы у исследуемых микромицетов на 192 ч роста при культивировании с 5,0 об.% ПФД в 3,1–4,5 раза превышали контрольные показатели (рост без ПФД). Для бактериальных культур целлюлозолитиков максимумы накопления биомассы в культурах с 5,0 об.% ПФД наступали на 144 ч роста, что свидетельствовало о более раннем выходе культур с ПФД в стационарную фазу роста. При этом концентрация биомассы в 1,8–2,3 превышали контрольные показатели максимального накопления биомассы на 192 ч роста.

Оценка глубины осахаривания карбоксиметилцеллюлозы (процент от исходного количества) под влиянием комплексов целлюлаз глубинных культур, взятых на 96–192 ч роста, позволила оценить динамику их целлюлозолитической активности (табл. 2).

Уже через 96 ч роста целлюлозолитическая активность культур в средах с 5 об.% ПФД в 1,6–3,1 раза у микромицетов и в 2,3–3,9 раза у бактерий превышала аналогичные показатели для контрольных культур. Максимальная глубина осахаривания карбоксиметилцеллюлозы под влиянием целлюлаз в культурах бактерий с 5 об.% ПФД наблюдалась на 144 ч роста, в культурах микромицетов — на 192 ч роста.

Выводы

1. Внесение 5 об.% перфтордекалина в жидкую среду с карбоксиметил-целлюлозой, использованной для глубинного выращивания *P. fluorescens 1457*, *C. flavigena 182*, *S. cellulose 57-3*, *F. oxysporum K-17*, *T. viride 34-7*, *A. fumigates D-12*, привело к увеличению в 1,8–4,5 раза

достигаемых концентраций их биомассы в культуральной среде.

2. Минимальную целлюлозолитическую активность в сравнительных условиях проведенных экспериментов показали культуры *T. viride 34-7* и *A. fumigates D-12*, максимальную — *P. fluorescens 1457* и *S. cellulose 57-3*, степень осахаривания карбоксиметилцеллюлозы культурами, выросшими в присутствии ПФД, была в 1,6–3,9 раза выше, чем у контрольных культур.

Список литературы

1. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. – М.: Изд-во МГУ, 2005, 445 с.
2. Яровенко В.Л., Калунянц К.А., Голгер Л.И. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий. – М.: Пищ. пром-сть, 1970, 314 с.
3. Бакулин М.К., Дармова С.В., Бакулин В.М. Теория и практика использования перфторуглеродов «голубой крови» при глубинном культивировании биодеструкторов // Теоретические проблемы экологии, 2010, № 4. – С. 4-8.
4. Иваницкий Г.Р. Наноконтейнеры на основе перфторуглеродов с функцией переноса оксида азота // Биофизика, 2008, № 2. – С. 367-377.
5. Равилов А.З., Гильмутдинов Р.Я., Хусаинов М.Ш. Микробиологические среды. – Казань, 1999, 398 с.
6. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005, 608 с.
7. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982, 552 с.
8. Фениксова Р.В., Туинова Н.А., Родионова Н.А. Определение активности целлюлазы // Методы современной биохимии. – М.: Наука, 1975. – С. 23-28.
9. Somodgy M. Effect of insulin hypoglycemia on alimentary hyperglycemia // J. Biol. Chem., 1952. V. 193, № 19. – P. 195-197.

Контактная информация:
Бакулин В.М. vladbakulin@rambler.ru

Н.В. СТРАТОНОВА, В.С. ЛЕОНОВ, Н.А. ЛИТВИНОВА
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва

РАЗРАБОТКА ПРОМЫШЛЕННОГО СПОСОБА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ГИБРИДНОГО БЕЛКА- ПРЕДШЕСТВЕННИКА БЕЗМЕТИОНИНОВОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2b

Разработана схема высокоэффективного промышленного культивирования штамма-продуцента гибридного белка-предшественника безметионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b с использованием трехкомпонентной подпитки углеродсодержащими субстратами глицерином и глюкозой и индуктором лактозой.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон альфа-2b, ферментация.

N.V. STRATONOVA, V.S. LEONOV, N.V. LITVINOVA

The state research institute for genetics and selection of industrial microorganisms, Moscow

DEVELOPMENT OF INDUSTRIAL FERMENTATION OF STRAIN PRODUCING OF HYBRID PRECURSOR PROTEIN RECOMBINANT INTERFERON ALPHA-2b WITHOUT THE N-TERMINAL METHIONINE

Industrial method of cultivation of hybrid precursor protein without the N-terminal methionine recombinant interferon alpha-2b was developed. The process of industrial cultivation of strain producer hybrid protein recombinant interferon alpha-2b with 3-componet feeding consist of glycerol, glucose and lactose.

Key words: recombinant interferon alpha-2b, fermentation.

Технология получения рекомбинантного интерферона альфа-2b в прокариотах существует уже несколько десятилетий и занимает крупный сегмент биотехнологического рынка. Преимуществами рекомбинантного интерферона являются удешевление производства и отсутствие риска передачи инфекции при использовании сырья на основе крови доноров. Но при экспрессии рекомбинантных интерферонов альфа-2b в *Escherichia coli* у некоторой части молекул на N-конце имеется дополнительный остаток метионина (формилметионина), тогда как N-концевым аминокислотным остатком природных интерферонов альфа-2b является цистеин, связанный дисульфидной связью с 98 цистеином белка [1]. Избыточный N-концевой метионин может влиять на стабильность и иммуногенность белков [2], а также в ряде случаев приводит к потере их биологической активности [3]. С 2005 г. Европейская Фармакопея ограничила производство и использование на территории европейских стран препаратов, содержащих модифицированный интерферон альфа-2b [4]. В связи с этим проблема удаления N-концевого метионина из состава интерферона альфа-2b бактериального происхождения приобрела большое значение.

Был разработан и запатентован способ производства [5] безметионинового интерферона, основанный на синтезе в клетках *Escherichia coli* гибридного белка, содержащего в своем составе последовательность интерферона альфа-2b человека, слитую с последовательностью белка Smt3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, относящегося к семейству убиквитин-подобных белков, и последующем ферментативном расщеплении гибридного белка специфичной протеиназой ULP275 и выделении безметионинового интерферона альфа-2b.

Целью работы была разработка процесса высокоэффективного промышленного культивирования

штамма-продуцента гибридного белка-предшественника безметионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b.

Методы исследований. В работе были использованы штаммы *Escherichia coli* ECR-HSI-T (депонирован в ВКПМ под номером В-10414) и ECR-HSI-2aT (номер ВКПМ В-10700), продуценты гибридных белков-предшественников безметионинового интерферона альфа-2b и интерферона альфа-2a.

Культивирование штаммов-продуцентов проводили в ферментере Biostat C DCU (BBI, Германия) в объеме 15 л при температуре 38°C и $pO_2=80\%$. Питательную среду (пептон (гидролизат соевого белка) — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, Na_2HPO_4 — 7,05 г/л, KH_2PO_4 — 6,8 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ — 3,3 г/л) стерилизовали при 121°C 20 мин. В остывшую среду вносили $MgSO_4$ до концентрации 0,24 г/л и канамицина сульфат до 40 мг/мл. Посевная доза составляла 10% от объема культуральной среды. Инокулят выращивали в колбах Эрленмейера при температуре 38°C и перемешивании 200 об./мин. до конечной оптики 1,5 о.е.

На 10–12 ч роста в ферментере клетки штамма-продуцента накапливали гибридный белок в виде телец включения, видимых при увеличении $\times 1000$ в фазово-контрастный микроскоп. Для выделения телец включений биомассу суспендировали в буфере, разрушали в дезинтеграторе APV 1000 (APV, Дания). Клеточный гомогенат осаждали на проточной центрифуге Heraeus Stratos (Termo, Германия).

Результаты и их обсуждение. Для подбора оптимального вида индукции было проведено сравнительное культивирование штамма-продуцента ECR-HSI-T с индукцией изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) и лактозой. Было показано, что индукция ИПТГ тормозит рост культуры ECR-HIS-T и приводит к более низкой конечной оптической плотности культуральной

жидкости. Напротив, индукция лактозой не тормозит рост культуры и позволяет достигнуть высокого выхода по биомассе. Одновременно с этим индукция лактозой дает более высокий уровень экспрессии целевого белка.

Для активного роста культуры даже при наличии сложной комплексной среды необходим источник углерода и энергии. Штамм ECR-HSI-T может расти на разных углеродсодержащих субстратах — глюкозе, лактозе, глицерине, фруктозе, мальтозе и сорбите. Лактоза, одновременно являясь индуктором синтеза белка, может поддерживать рост штамма, служа источником энергии. Продуктами катаболизма лактозы являются глюкоза и галактоза. ECR-HSI-T не способен утилизировать галактозу, таким образом, половина углерода и энергии, содержащейся в лактозе, недоступна. Использование одной лактозы в качестве субстрата неэффективно, необходим дополнительный источник углерода и энергии, способный обеспечить активный рост культуры до высокой оптической плотности. Глюкоза — самый эффективный субстрат для ECR-HSI-T, но одновременно глюкоза является ингибитором *lacUV5*-промотора и экспрессии целевого белка. Глицерин является менее эффективным субстратом, нейтральным по отношению к *lacUV5*-промотору.

В качестве углеродсодержащих субстратов были исследованы глюкоза и глицерин в сочетании с индуктором лактозой. Были исследованы следующие варианты подпитки:

- углеродсодержащий субстрат глюкоза / индуктор лактоза;
- углеродсодержащий субстрат глицерин / индуктор лактоза;
- углеродсодержащий субстрат глюкоза / глицерин / индуктор лактоза.

Кривые роста штамма-продуцента при использовании различных подпиток приведены на рисунке.

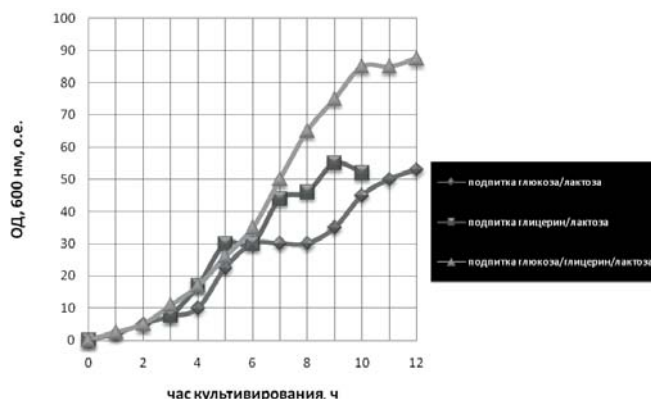


Рис. Кривые роста штамма-продуцента ECR-HIS-T при использовании различных вариантов подпиток при культивировании в объеме 15 л

Из данных, представленных на рисунке, видно, что при использовании подпитки глюкоза/лактоза культура до 6 часа растет активно, затем после начала подпитки индуктором лактозой рост клеток замедляется. Возобновление роста клеток через 8 часов после начала культивирования обусловлено их адаптацией к лактозе в качестве субстрата.

При использовании подпитки глицерин/лактоза торможения роста при переходе с глицерина на лактозу не происходит, но в целом культура растет менее активно.

При использовании подпитки глюкоза/глицерин/лактоза торможения роста не наблюдается, при этом культура растет активно до 12 часа культивирования.

Сравнение технологических параметров процесса, таких как выход тел включений и биомассы, при использовании подпитки глюкоза/лактоза, глицерин/лактоза и глюкоза/глицерин/лактоза показано в таблице.

Таблица

Технологические параметры процесса культивирования штамма ECR-HIS-T при использовании различных видов подпиток

Схема подпитки	Выходные параметры культивирования	
	Выход биомассы с 1 л КЖ	Выход тел включений с 1 л КЖ
Подпитка глюкоза/лактоза	54,7 ± 5,5 г/л	13,14 ± 1,5 г
Подпитка глицерин/лактоза	81,7 ± 8,2 г/л	13,77 ± 1,4 г
Подпитка глюкоза/глицерин/лактоза	77,2 ± 7,7 г/л	29,53 ± 3,0 г

Вывод. При использовании трехкомпонентной подпитки выход телец включений с 1 л культуральной жидкости увеличился на 114% по сравнению с подпиткой глицерин/лактоза и на 125% по сравнению с подпиткой глюкоза/лактоза. Трехкомпонентная подпитка показала свою высокую эффективность и была адаптирована и валидирована для использования в промышленной технологии.

Список литературы

1. Bodo G., Fogy I. Molecular species of recombinant human interferon Alpha-2 detected in affinity purified preparations // The interferon system, 1985.
2. Ben-Bassat K., Bauer. K. Amino-terminal processing of proteins // Nature, 1987.
3. Rabbani S.F. et al. Recombinant human parathyroid hormone synthesized in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem., 1988.
4. Eur. Pharm. – 5th ed., 2004.
5. Патент 2453604 – гибридный белок (варианты), штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент гибридного белка (варианты) и способ получения безметионинового интерферона альфа-2 человека, 2011.
6. Патент (№ заявки 2011151105/10(076712)) – Способ промышленного культивирования штаммов *E. coli*, полученных на основе штамма BL21(DE3), несущего ген T7 RNA полимеразы под контролем *lacUV5* промотора, с повышенным синтезом биомассы и выходом целевого белка в тельцах включения.

Контактная информация:
 тел.: 8 (495) 315 37 65
 E-mail: stratonova@gmail.com

Н.В. СТРАТОНОВА, В.С. ЛЕОНОВ, Н.А. ЛИТВИНОВА
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЙ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ГИБРИДНОГО БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА БЕЗМЕТИОНИНОВОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2b

Был разработан промышленный способ выделения и очистки телец включений штамма-производителя гибридного белка-предшественника безметионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b, позволяющий получать ренатурат с содержанием целевого белка 70 % и концентрацией 0,38 мг/мл.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон альфа-2b, тельца включения.

N.V. STRATONOVA, V.S. LEONOV, N.V. LITVINOVA
The state research institute for genetics and selection of industrial microorganisms, Moscow

PROCESS FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF INCLUSION BODIES OF HYBRID PRECURSOR PROTEIN RECOMBINANT INTERFERON ALPHA-2b WITHOUT THE N-TERMINAL METHIONINE

Method for isolation and purification of inclusion bodies of hybrid precursor protein without the N-terminal methionine recombinant interferon alpha-2b was developed, which yields renaturat containing the protein of 70 % and a concentration of 0,38 mg/ml.

Key words: recombinant interferon alpha-2b, the inclusion bodies.

В технологиях, основанных на производстве рекомбинантных белков в виде нерастворимых телец включений и дальнейшем растворении белка, рефолдинге и биохимической очистке, наиболее критичным этапом является рефолдинг белка. Потери белка на этой стадии могут достигать 80%. С другой стороны, после проведения процесса ренатурации получают раствор белка с высокой чистотой и концентрацией, благодаря чему биохимическая очистка целевого продукта упрощается. При производстве рекомбинантных белков в больших масштабах отмывка телец включений, удаляя примеси, повышает воспроизводимость процесса хроматографии, срок эксплуатации дорогостоящих хроматографических сорбентов, снижает уровень пирогенов. Для получения ренатурата с малым количеством примесей необходимо получить препарат чистых телец включения, но при этом необходимо избежать потерь продукта в ходе процесса очистки телец включений.

Очистка телец включений состоит из получения клеточного гомогената, выделения из него телец включений и отмывки их от примесей. В процессе гомогенизации необходимо разрушить не менее 95 % клеток, так как неразрушенные клетки в процессе центрифугирования будут оседать вместе с тельцами включений и загрязнять осадок. Тельца включений имеют большую плотность, чем клеточный дебрис, поэтому эффективно выделяются центрифугированием. Гомогенат клеток содержит множество компонентов, включая растворимые белки, нерастворимый клеточный дебрис, мембраны, нуклеиновые кислоты и др. Центрифугирование при 15 000–20 000 г успешно седиментирует тела включения от растворимого материала.

Использование ингибиторов протеаз необходимо для предотвращения нежелательного протеолиза. Выбор ингибитора зависит от вида протеазы. Для ингибирования сериновых протеаз используется фенил-

метилсульфонилфторид (PMSF), комплексообразователь ЭДТА — для ингибирования металлозависимых протеаз.

В процессе отмывки телец включений основной задачей является удаление протеаз, которые могут вызвать деградацию белка в процессе дальнейшей очистки, молекул ДНК, фосфолипидов, посторонних растворимых клеточных белков. Каждый белок имеет собственные уникальные характеристики растворимости, поэтому ни один буфер не будет универсальным для всех видов телец включений.

Главными факторами, влияющими на эффективность отмывки тел включений, являются pH буферного раствора, температура процесса, эффективность гомогенизации, соотношение буфер : белок, концентрация действующих веществ в буферном растворе.

Целью работы являлась разработка промышленного способа очистки телец включений штамма-производителя гибридного белка-предшественника безметионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b.

Материалы и методы. В работе использовали биомассу штамма-производителя гибридных белков-предшественников безметионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b.

Выделение телец включений. Биомассу размораживали в течение 12 часов при температуре +4°C и диспергировали в *буфере № 1* (50 mM Tris-HCl, 5 mM ЭДТА, 1 mM PMSF, pH 7,5) в соотношении биомасса : буфер 1:10. Суспензию клеток разрушали в дезинтеграторе APV 1000 (APV, Дания) при давлении 650-700 бар. Степень дезинтеграции контролировали микроскопией в фазово-контрастном микроскопе при увеличении ×1000. Клеточный гомогенат осаждали на проточной центрифуге Heraeus Stratos (Termo, Германия) при 15 000 об./мин. и скорости потока 55 мл/мин. при температуре +4°C.

Исследованные четыре варианта процесса отмывки телец включений

Этап процесса	Параметры процесса			
	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
Этап 1. Выделение телец включений	Буфер № 1			
Этап 2	Буфер № 1	Буфер № 2	Буфер № 3	Буфер № 4
Этап 3	Буфер № 1	Буфер № 2	Буфер № 3	Буфер № 5
Этап 4	Отмывка водой	Отмывка водой	Отмывка водой	Отмывка водой

Отмывка телец включений. Для дальнейшей отмывки телец включений использовали буферные растворы:

Буфер № 2 — 10 mM NaHCO₃, 1 mM ЭДТА pH 10

Буфер № 3 — 1M раствор мочевины, 50 mM Tris-HCl, 1 mM ЭДТА, 0,05 %-ный раствор Triton X-100

Буфер № 4 — 0,1 % Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0

Буфер № 5 — 2,5 M Urea, 20 mM Tris-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0

Осадок телец включений диспергировали в буферных растворах в соотношении 1:10 и осаждали центрифугированием. Процедуру повторяли дважды. Далее осадок суспендировали в воде и центрифугировали. Полученный осадок анализировали методом электрофореза. Осадок телец включений растворяли в 6 M GuHCl, растворенный белок подвергали рефолдингу. Образец ренатурировавшего белка анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе Dionex на сорбенте C18. В качестве стандарта использовали гибридный белок-предшественник альфа-2b интерферона — очищенный и характеризованный внутривидовой стандарт.

Результаты и их обсуждение.

Для окончательного выбора схемы отмывки все тела включения были растворены и ренатурированы, ренатурационный буфер проанализирован методом ВЭЖХ. Выход во всех вариантах был одинаковым, но белок, полученный в варианте № 2, имел нестандартную форму хроматограммы, что говорило о модификации белка в процессе отмывки. Тельца включения, полученные по варианту 1, были нестабильны при хранении. Для дальнейших исследований были выбраны варианты 3 и 4.

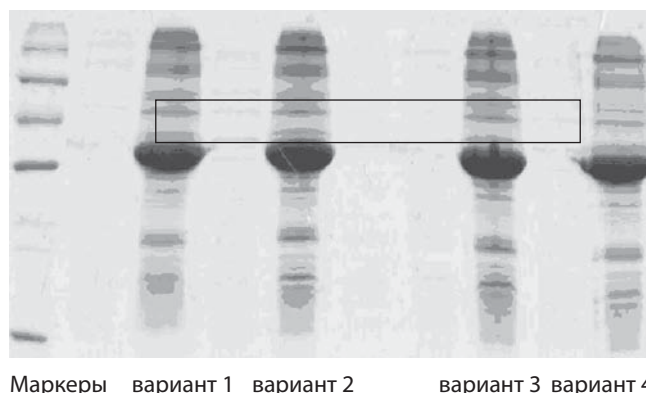
Как показали дальнейшие эксперименты, критической является стадия дезинтеграции на втором этапе отмывки. Тела включения, полученные по схеме с дезинтеграцией только на 1 стадии, при растворении давали опалесцирующий мутный раствор, который практически не фильтровался. Анализ методом электрофореза не показывал различий между телами. Видимо, примеси, создающие опалесценцию в растворе, носили небелковый характер. Из-за примесей, оставшихся в телах включений, фильтрация раствора была затруднена, выход в ренатурации снижался.

После введения однократной дезинтеграции на 2 стадии отмывки опалесценция в растворе тел включений исчезла, выход в ренатурации вырос с 4 % до 7 % по отношению к сырому весу тел включений.

Введение 4 стадии отмывки не изменяло такие параметры препарата телец включений, как вес осадка, прозрачность раствора тел включений, выход в ренатурации, поэтому была выбрана схема 3-стадийной

отмывки с трехкратной дезинтеграцией на 1-м этапе и однократной дезинтеграцией на 2-м этапе с использованием буферных растворов № 1, № 4 и № 5.

В результате была разработана эффективная промышленная схема выделения и очистки телец включений гибридного белка-предшественника безметионинового интерферона альфа-2b со средним выходом процесса отмывки тел включений 30,57±3 %, позволяющая стабильно получать ренатурат с содержанием целевого белка 70% и концентрацией 0,38±0,04 мг/мл (рис. 2). В процессе выделений и очистки тел включений были максимально снижены потери целевого белка, трудовые и материальные затраты.



Маркеры вариант 1 вариант 2 вариант 3 вариант 4

Рис. 1. Анализ методом электрофореза финальных препаратов четырех вариантов процесса отмывки телец включений. Выделен рамкой целевой белок

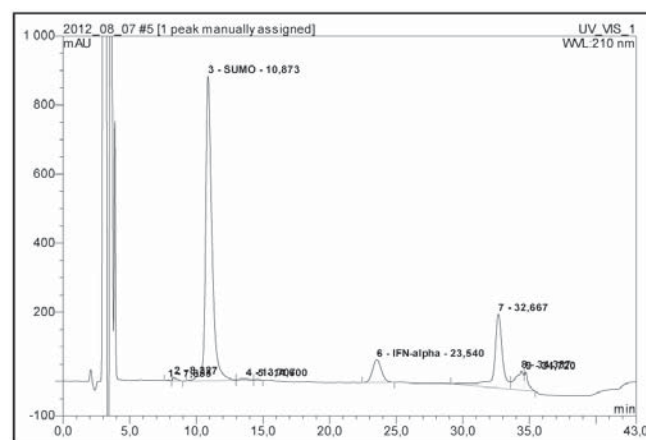


Рис. 2. Анализ методом ВЭЖХ ренатурата телец включений, полученных по финальному варианту отмывки

Список литературы

1. Jhansi Maachupalli-Reddy, Brian D. Kelley, Eliana De Bernardes Clark. Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme // *Biotechnology Progress*. Vol. 13, 1997.
 2. Langley K.E., Berg T.F., Strickland T.W. et al. Recombinant-DNA-derived bovine growth hormone from *Escherichia coli*. 1. Demonstration that the hormone is expressed in reduced form, and isolation of the hormone in oxidized, native form // *Eur. J. Biochem.*, Mar. 2, 1987.

3. Nambiar K.P., Stackhouse J., Presnell S.R. & Benner S.A. Expression of bovine pancreatic ribonuclease A in *Escherichia coli* // *Eur. J. Biochem.*, 163, 1987.
 4. Bowden G.A., Paredes A.M., Georgiou G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli* // *Biotechnology*, Aug; 9(8), 1991.

Контактная информация:
 тел.: 8 (495) 315 37 65
 E-mail: stratonova@gmail.com

УДК 602.6:612

Н.В. ЛОБАНОВА, А.А. НУРБАКОВ, А.А. КЛИШИН, Ю.А. СЕРЕГИН
 Общество с ограниченной ответственностью «Фармапарк», Москва
 Л.В. ЕРМОЛИНА, Е.Н. САУТКИНА, Р.А. ХАМИТОВ
 ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕХНОЛОГИЙ
 КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК *CHO*,
 ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА БЕТА-1а,
 В БИОРЕАКТОРАХ РАЗЛИЧНОГО ТИПА

Проведена отработка условий культивирования клеток *CHO* — продуцентов рекомбинантного интерферона бета-1а, позволяющих достичь максимальной продукции белка, с последующим масштабированием процесса в биореакторах различного типа. Показано, что оптимальным для сохранения динамики клеточного роста и продуктивности является использование биореактора волнового типа на основе одноразовых мешков.

Ключевые слова: интерферон бета-1а, клетки *CHO*, оптимизация, культивирование, биореактор.

N.V. LOBANOVA, A.A. NURBAKOV, A.A. KLISHIN, Yu.A. SERVOGIN
 Limited liability company «Pharmapark», Moscow
 L.V. ERMOLINA, E.N. SAUTKINA, R.A. KHAMITOV
 The state research institute for genetics and selection of industrial microorganisms, Moscow

PROCESS DEVELOPMENT OF *CHO*-CELL BASED RECOMBINANT INTERFERON BETA-1a PRODUCTION IN DIFFERENT TYPES OF BIOREACTORS

Culture conditions for *CHO*-cells producing interferon-beta-1a were optimized to achieve maximal protein expression with subsequent scaling-up to different types of bioreactors. It has been demonstrated that cultivation in single-use wave bioreactor was optimal for cell growth rate and productivity.

Key words: interferon beta-1a, *CHO*-cells, optimization, cultivation, bioreactor.

Создание отечественного производства интерферона бета (ИФН-β) по рекомбинантной технологии является актуальной задачей российской экономики. Данный препарат входит в список жизненно необходимых лекарств как эффективное средство борьбы с рассеянным склерозом.

Один из двух коммерчески доступных вариантов интерферона бета ИФН-β-1а является гликозилированным белком, и его получение возможно только в эукариотических клетках [1]. Гликозилирование способствует уменьшению агрегации, увеличивает стабильность белка и снижает иммуногенность препарата [2].

В настоящее время для производства гликозилированных рекомбинантных белков в основном используют культуру клеток яичников китайского хомяка — *CHO*. К положительным особенностям клеток *CHO* можно отнести высокую скорость пролиферации, простоту культивирования и изученность, которые упрощают регистрацию рекомбинантных лекарственных препаратов [3].

Оптимизация условий культивирования — один из основных этапов разработки технологии, позволяющий повысить продуктивность культуры и качество получаемого продукта [4]. Особенно он важен для продуцентов сложных белков [5]. ИФН-β — сильно гидрофобный, склонный к образованию агрегатов белок, что приводит к токсическим эффектам для клеток-продуцентов [6]. Для решения данной проблемы оптимальным является использование индуцируемой экспрессионной системы, а также двухфазного температурного режима культивирования [7, 8]. Важным этапом разработки технологии является выбор способа культивирования продуцентов. Культивирование в биореакторе является оптимальным для производства, поскольку облегчает масштабирование процесса, дает возможность точно поддерживать его параметры и тем самым снижает себестоимость конечного продукта. Использование суспензионных клеток *CHO*, растущих до высоких плотностей, позволяет применять биореакторы различных типов для достижения максимальной продукции белка [9].

В настоящее время промышленное культивирование суспензионных клеток осуществляется, главным образом, в стерилизуемых биореакторах с механическими перемешивающими элементами. Однако при высоких скоростях перемешивания (более 200 об./мин.) они могут повреждать клетки. Кроме того, биореакторы данного типа требуют полного цикла очистки и обеззараживания перед каждым циклом культивирования. Другим, не менее перспективным направлением, является культивирование в одноразовых биореакторах, например, на основе мешков. В биореакторах данного типа перемешивание осуществляется за счёт вращательных движений платформы, на которой установлен мешок с клеточной культурой [10]. При этом в среде создаются волны, способствующие интенсивному массообмену и сводящие к минимуму гидродинамические нагрузки, повреждающие клетки. Преимуществами одноразовых биореакторов также являются значительное снижение риска контаминации культуры и простота валидации процесса, сокращение времени обслуживания биореактора.

Целью данной работы было сравнительное изучение динамики роста и продуктивности клеточной линии продуцента рекомбинантного ИФН-β-1а при культивировании в биореакторах различного типа: стеклянного с механическим перемешивающим элементом и одноразового волнового.

Материалы и методы. Клоны-продуценты были созданы на основе куматной системы индуцируемой экспрессии [7], путем введения в клетки линии CHO-S конструкции, содержащей ген ИФН-β под контролем индуцируемого промотора CR5. Первоначально клетки культивировали в колбах Эрленмейера в бессывороточной питательной среде Power CHO-2 (Lonza) с добавлением 4 мМ аланил-глутамин, 16 мкМ тимидина и 0,1 мМ гипоксантина (Invitrogen), пересевая каждые 2-3 суток путем разбавления суспензии до плотности $(0,2-0,3) \times 10^6$ кл./мл. Культивирование проводилось в шейкере CO₂-инкубаторе Multitron Cell (Infors) во влажной среде с 5%-ным содержанием CO₂, при перемешивании со скоростью 120 об./мин. при температуре 37° в течение 2 суток, затем 5 суток при 30°. Плотность и жизнеспособность клеток определяли микроскопически с использованием камеры Горяева после окрашивания клеток трипановым синим (Sigma).

Для масштабного культивирования использовали биореактор перемешивающего типа объемом 3 л (Applikon) и одноразовые мешки объемом 10 л (GE Healthcare), помещенные на платформу волнового шейкера-CO₂-инкубатора Multitron Cell (Infors). В биореакторе перемешивающего типа скорость вращения мешалки составляла 150±50 об./мин., скорость вращения платформы шейкера волнового типа составляла 40±2 об./мин. Посевная плотность составляла $(0,3 \pm 0,05) \times 10^6$ кл./мл, значение pH и содержание растворенного кислорода поддерживались на уровне 7,0±0,1 и 50±10 % соответственно. Скорость подачи сжатого воздуха и CO₂ составляла 0,50±0,01 и 25±5 мл/мин. соответственно.

Определение концентрации ИФН-β-1а проводили методом Вестерн-блоттинга с использованием мышиных антител к ИФН-β-1а (R&D Systems), вторичных антител к IgG мыши (Jackson) и преципитирующего хромогенного субстрата пероксидазы хрена (биотест системы).

Результаты исследований. Первым этапом работ служило определение ростовых характеристик и продуктивности клона при культивировании в замкнутом объеме в колбах Эрленмейера. В данных условиях во всех проведенных экспериментах максимальная клеточная плотность составила 3,5±0,5 млн кл./мл среды, жизнеспособность на 7 сутки — 90% (рис. 1), а продуктивность, определенная методом Вестерн-блоттинга, — 15-25 мг/л целевой гликозилированной формы ИФН-β-1а (рис. 2). Помимо основной гликоформы белка клетками также синтезируется ряд изоформ с большими молекулярными массами. Однако они отсутствуют в стандартном образце ИФН-β-1а и удаляются из культуральной жидкости при хроматографической очистке. Нами было показано, что увеличение продолжительности

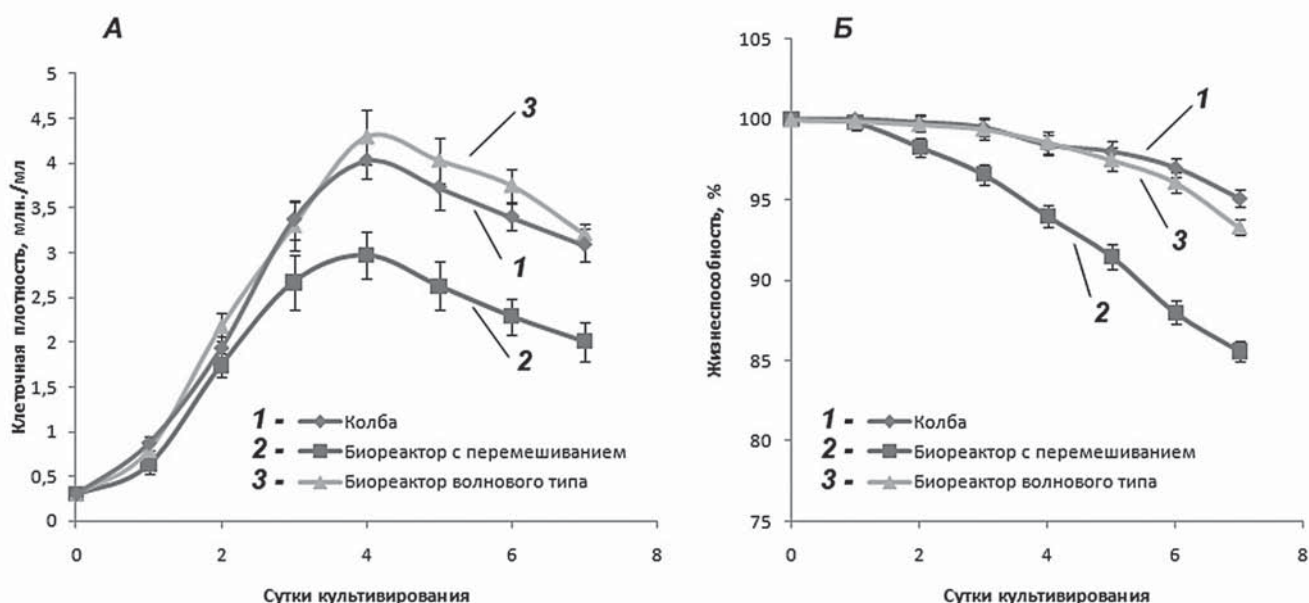


Рис. 1. Кривые роста (А) и жизнеспособности (Б) клеток-продуцентов рекомбинантного ИФН-β-1а, культивируемых в колбе и биореакторах

сти цикла продукции более 7 суток не является целесообразным, поскольку приводит к ухудшению качества производимого белка (появляется нецелевая гликозилированная форма с меньшей молекулярной массой, рис. 2, дор. 7).

Следующим этапом данного исследования являлось масштабирование процесса культивирования продуцента ИФН-β-1а до биореактора перемешивающего или волнового типа. Основным фактором, принимаемым во внимание при масштабировании процесса культивирования, является эффективность перемешивания,

которая влияет на равномерность концентрации питательных веществ и насыщения среды кислородом. В колбах перемешивание осуществляется за счет кругового движения среды внутри сосуда, в классическом биореакторе — при работе механической мешалки, а в мешке — за счёт волнообразных движений среды. Кроме того, объём воздуха над средой в колбе составляет не менее 2/3 от общего объёма ёмкости, тогда как в биореакторе и мешке — около 1/2 общего объёма, откуда возникают различия в насыщении среды кислородом и в массообмене. Поэтому было необходимо сравнить

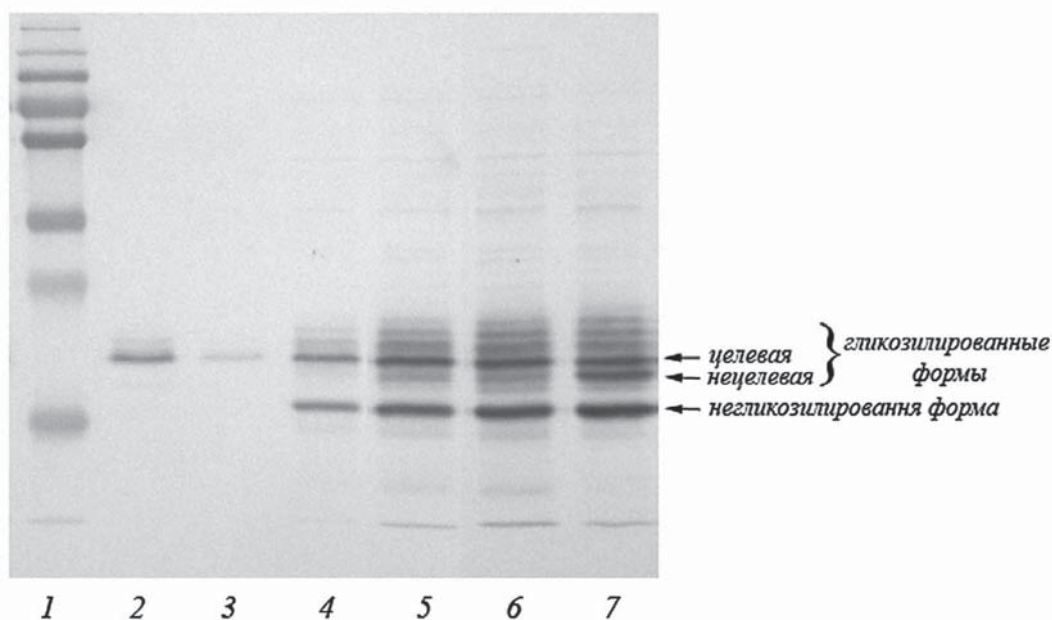


Рис. 2. Вестерн-блот образцов культуральной жидкости, содержащих ИФН-β-1а, отобранных в разные дни: дор. 1 – маркер молекулярных масс; дор. 2, 3 – стандарт ИФН-β-1а, 5 и 1 нг соответственно; дор. 4, 5, 6, 7 – 3-и, 5, 7, 8-е сутки культивирования соответственно

А. Культивирование в биореакторе перемешивающего типа

Б. Культивирование в биореакторе волнового типа

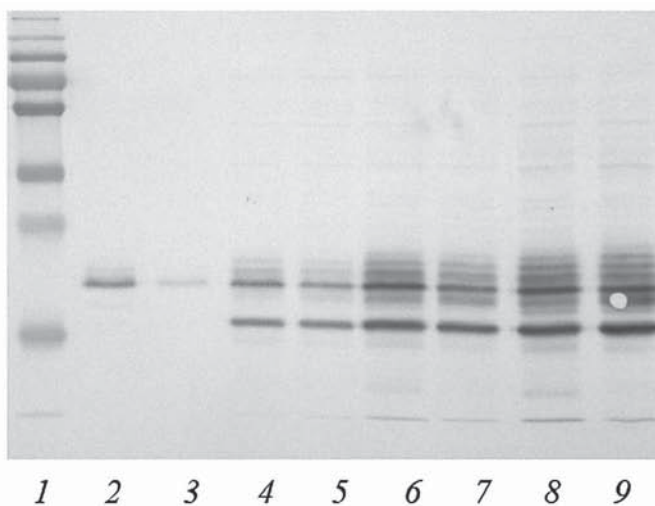
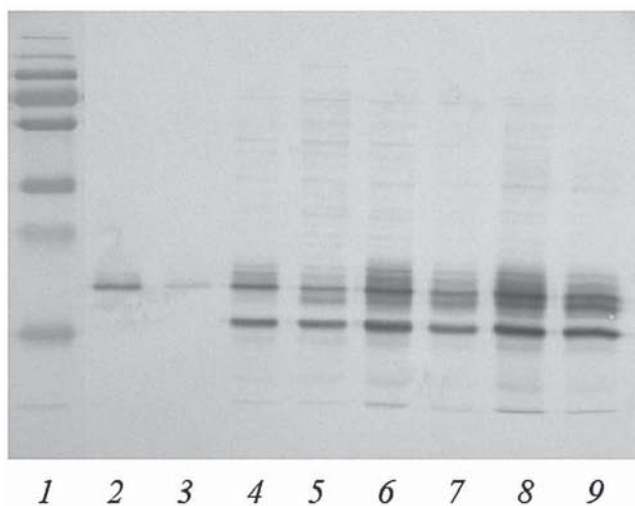


Рис. 3. Вестерн-блот образцов культуральной жидкости, содержащей ИФН-β-1а, отобранных в разные дни культивирования: дор. 1 – маркер молекулярных масс; дор. 2, 3 – стандарт ИФН-β-1а, 5 и 1 нг соответственно; дор. 4, 5 – 3-и сутки в колбе и соответствующем биореакторе; дор. 6, 7 – 5-е сутки в колбе и соответствующем биореакторе; дор. 8, 9 – 7-е сутки в колбе и соответствующем биореакторе

динамику роста и продуктивность клеток, культивируемых в колбе и в биореакторах.

Проведено по три запуска циклов культивирования клеток *CHO* с целью продукции ИФН- β -1а в каждом из двух типов биореакторов, в качестве контроля использовали процесс культивирования в колбе. Типичный вид кривых роста и жизнеспособности клеток-продуцентов представлены на рис. 1. Для контрольной культуры максимальная клеточная плотность была достигнута на 4 сутки культивирования — $4,03 \pm 0,20$ млн кл./мл, жизнеспособность на 7-е сутки составила $95,1 \pm 1,3\%$ (рис. 1 А, Б). Продуктивность клеточной линии, определенная методом вестерн-блоттинга, составила 20 ± 5 мг/л (рис. 3).

Для клеток, культивировавшихся в биореакторе перемешивающего типа, отмечено небольшое снижение скорости роста, по сравнению с контрольной культурой (рис. 1, А). Кроме того, в данном случае просматривалось более резкое снижение жизнеспособности клеток в зависимости от дня культивирования (рис. 1, Б). На наш взгляд, снижение жизнеспособности клеток может быть обусловлено их травмированием при перемешивании (механический стресс), а также повреждением пузырьками воздуха, пропускаемыми через среду при барботировании. Снижение темпа роста и жизнеспособности клеток привело к уменьшению концентрации ИФН- β -1а в культуральной жидкости (15 ± 5 мг/л) (рис. 3, А).

Динамика роста клеточной линии в биореакторе волнового типа оказалась сходной с ростом клеток в колбах. Максимальная клеточная плотность, достигнутая на 4-е сутки, была на $7 \pm 2\%$ выше по сравнению с контрольной культурой. Снижение жизнеспособности клеток было аналогичным контрольной культуре, растущей в колбе (рис. 1, А, Б). По результатам вестерн-блоттинга образцов культуральной жидкости из волнового биореактора продуктивность составила около 15-20 мг/л, что несколько ниже по сравнению с контролем (рис. 3, Б). Однако в целом в проведенных экспериментах удельная продуктивность процесса культивирования в одноразовых мешках была сопоставима с культивированием в колбах, при этом объём культуральной жидкости возрастал на 2 порядка (2 л в мешке по сравнению с 30 мл в колбе).

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что культивирование линии клеток-продуцентов ИФН- β -1а хорошо поддается масштабированию в одноразовых мешках объемом 10 л на качающейся платформе. При

этом сохраняются основные характеристики процесса, такие как удельная продуктивность и жизнеспособность клеток. Таким образом, подтверждена простота и эффективность масштабирования процесса культивирования в волновых биореакторах.

Работа финансировалась из средств государственного контракта Министерства образования и науки РФ № 2010-218-02-189 «Организация высокотехнологичного производства и проведение испытаний интерферона бета-1а человека как жизненно необходимого и важнейшего лекарственного средства».

Список литературы

1. Andersen D.C., Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications // *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002. V. 13. – P. 117-123.
2. Markowitz C.E. Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues // *Neurology.*, 2007. V. 68. – P. 8-11.
3. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnol.*, 2004. V. 22. – P. 1393-1398.
4. Hacker D.L., Jesus M., Wurm F.M. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells: where do we go from here? // *Biotechnol. Adv.*, 2009. V. 27. N. 6. – P. 1023–27.
5. Holliday S.M., Benfield P. Interferon-beta-1a: A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in multiple sclerosis // *BioDrugs.*, 1997. V. 8. – P. 317-330.
6. Rodriguez J., Spearman M., Huzel N. et al. Enhanced production of monomeric interferon- β by CHO-cells through the control of culture conditions // *Biotechnol. Prog.*, 2005. V. 21. – P. 22-30.
7. Mullick A., Xu Y., Warren R. et al. The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells // *BMC Biotechnol.*, 2006. V. 6. – P. 43.
8. Лобанова Н.В., Трусова И.Н., Благодатских Е.Г. и др. Оптимизация процесса культивирования клеток *CHO*, экспрессирующих рекомбинантный интерферон-бета // *Биотехнология*, 2011. Т. 6, № 11. – С. 55-62.
9. Sinacore M.S., Charlebois T.S., Harrison S. et al. CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serumfree suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins // *M. Oakes Biotechnol. Bioeng.*, 1996. V. 52. – P. 518–528.
10. Haldankar R. Serum-free suspension large-scale transfection of CHO cells in Wave bioreactors // *Molecular Biotechnology*, 2006. V. 34. N. 2. – P. 191-199.

Контактная информация:

Лобанова Н.В.

e-mail: natalya.lobanova@bioprocess.ru,

тел.: 8 (495) 315 07 90

В.Л. ГОЛУБЕВА, Т.Ш. АДЕИШВИЛИ, В.В. БЕЛОВА

*Филиал ГБОУ ВПО Российского национального исследовательского
медицинского университета им. Н.И. Пирогова «НКЦ геронтологии», Москва*

О.Б. БРУСКОВА

ООО «Научно-производственная компания «Медбиофарм», г. Обнинск

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КОЗ-ДОНОРОВ ИММУННОЙ ПЛАЗМЫ — СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИТИМОЦИТАРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

В работе представлены результаты влияния многолетней иммунизации коз на увеличение количества общего белка и глобулинов плазмы за счет повышения γ -глобулиновой фракции, свидетельствующей о напряженном иммунитете, выражающемся в высоких титрах специфической активности плазмы.

Ключевые слова: козы, иммунизация, белок, белковые фракции крови.

V.L. GOLUBEVA, T.Sh. ADEISHVILY, V.V. BELOVA

*Branch of Russian Nation Research Medical University named N.I. Pirogov
«Research and Clinical Center of Gerontology», Moscow*

O.B. BRUSKOVA

Research-production company «Medbiopharm», Obninsk

SOME CHARACTERISTICS OF GOATS-DONORS OF IMMUNE PLASMA — RAW FOR PRODUCTION OF ANTITHYMOCYTE IMMUNOGLOBULIN

Dates of influence of perennial goats immunisation on quantitative changes concentration of total proteins and globulin fractions of blood serum, as an indicator of intensive immunity with high titres of specific activity, were presented in the article.

Key words: goats, immunization, protein and protein fractions of blood.

В современной медицине значительная роль принадлежит препаратам иммуноглобулинов, получаемых из иммунной плазмы крови животных-доноров (лошадей, коз, кроликов). К таким препаратам относятся, например, антиtimoцитарные иммуноглобулины (АТГАМ, США; АТГ-Фрезениус, Германия; Тимоглобулин, Франция; Антилимфолин, Россия), обладающие выраженным иммуносупрессивным действием и применяемые для лечения апластической анемии, реакций отторжения при пересадке органов и тканей. Антилимфолин, разработанный В.Н. Шабалиным и Л.Д. Серовой (1976), получают по оригинальной технологии (В.Л. Голубева с соавт., 2004) из плазмы крови коз, иммунизированных клетками вилочковой железы (timoцитами) человека. Препарат зарегистрирован (Р N002359/01), имеется более чем 20-летний опыт его эффективного применения в дозах 15–25 мг/кг массы тела в лечебной практике при вышеназванных состояниях (Р.Н. Шишина с соавт., 2001; В.Л. Голубева с соавт., 2006). Установлено также его дозозависимое действие дозы 0,5–0,8 мг/кг оказывают выраженное стимулирующее действие на врожденное звено иммунитета при использовании в комплексных программах лечения гнойно-воспалительных заболеваний в хирургической практике (Епифанова Н.Ю., 2012).

В производстве подобных лекарственных препаратов одной из важнейших стадий технологического процесса, определяющих в дальнейшем их лечебную эффективность, является стадия получения иммунного сырья, обладающего высокой специфической активностью. Так, в производстве антилимфолина многократная иммунизация коз тимоцитами по специальной схеме обеспечивает получение высокого титра антилимфоцитарных антител в плазме крови. Вместе с тем многолетняя иммунизация ксеногенным белком и регулярное

донорство могут вносить определенные изменения в систему белков и в состав периферической крови животных. В литературе нам не удалось найти полных достоверных сведений относительно крови коз, которые являются удобным видом животных-доноров иммунной плазмы — сырья для производства АТГ.

Целью работы явилось сравнительное исследование ряда показателей крови (общего белка и белковых фракций сыворотки крови, форменных элементов периферической крови, гемоглобина, титра антилимфоцитарных антител) интактных и иммунизированных коз для определения нормы и выявления степени воздействия длительной иммунизации на изменение гемограммы и состава белков крови коз-доноров.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служила цельная кровь и сыворотка крови 32 кастрированных козлов местной молочной породы в возрасте 5–7 лет, весом 55–60 кг, составлявших стадо иммунных животных Центра геронтологии и находившихся в зимний период на стойловом содержании, летом — на свободном выпасе. Животные находились под постоянным ветеринарным надзором, получали регламентированный рацион питания, включающий витамины и микроэлементы. Для получения иммунной плазмы — сырья для производства лекарственного препарата Антилимфолин — животных подвергали вначале 6-кратной (по специальной схеме) первичной, а затем плановой (ежемесячной) иммунизации суспензией тимоцитов для поддержания требуемого (не ниже 1:1024) титра антител к лимфоцитам. Животные выполняли функцию доноров иммунной плазмы на протяжении 5–7 лет, заготовку крови производили один раз в 2 месяца, в количестве 400 мл в полимерные контейнеры с консервантом. Выделенную центрифугированием

иммунную плазму замораживали при -20°C и хранили до использования в производстве. Для исследования гемограммы периферической крови образцы крови заготавливали в пробирки с гепарином. Контрольную группу составляли 10 здоровых животных того же возраста, находившихся в тех же условиях, но не получавших иммунизации.

В образцах сыворотки крови животных исследовали уровень общего белка спектрофотометрическим методом с применением биуретового реактива, белковый состав методом электрофореза на ацетатцеллюлозных мембранах в буфере с веронал-мединалом при pH 8,6 на установке УЭФ-01 с применением красителя Понсо (метод позволяет выделить альбумин и 4 глобулиновые фракции), уровень гемоглобина — спектрофотометрически, титр антилимфоцитарных антител — лимфоцитотоксическим методом, отражающий специфическую активность иммунной плазмы.

Результаты исследования подвергались вариационно-статистической обработке в соответствии с общепринятыми принципами.

Результаты исследований. Наши ранние многолетние наблюдения за козами-донорами показали, что состав периферической крови коз в основном постоянен на протяжении 5–7 и даже 10 лет донорства (Бодина З.К. с соавт., 2003). Настоящие исследования подтвердили это наблюдение. Концентрация гемоглобина (колебания от 90 до 120 г/л в течение года наблюдения), количество эритроцитов ($3\text{--}4,6 \times 10^{12}/\text{л}$) и лейкоцитов ($3,8\text{--}12,1 \times 10^9/\text{л}$) у животных определялись в пределах физиологической нормы. Без патологических изменений оставалась и лейкоцитарная формула крови коз.

Что касается распределения белковых фракций плазмы крови коз, то нам не удалось найти достоверных полных сведений об их нормальных значениях, поэтому мы сравнивали полученные данные с соответствующими показателями мелкого рогатого скота — овец (Кондрахин И.П., 2005).

Результаты исследований показали, что в группе интактных коз (контроль) величины общего белка и альбумина определялись близкими к норме (табл.).

Что касается иммунизированных животных, то у них наблюдалось достоверное увеличение общего белка за счет увеличения глобулиновой фракции, а именно γ -глобулинов, которые в абсолютных цифрах вдвое превышали этот показатель у интактных коз (табл., рис. 1 и 2). Эти данные вполне объяснимы с иммунологических позиций — в процессе иммунизации животных в их крови увеличивались титры антилимфоцитарных антител, представляющих собой иммуноглобулины классов G и M, которые при электрофорезе белков плазмы определяются во фракции γ -глобулинов. Титры антител

у иммунизированных животных достигали значений 1:1024 – 1:4048, при этом они у подавляющего большинства животных коррелировали с высокими показателями γ -глобулинов, в то время как в группе интактных коз титры антител не превышали 1:16 – 1:32.

Учитывая, что иммунизированные козы являлись донорами крови (объемы эксфузии составляли 400 мл один раз в 2 месяца) для получения иммунной

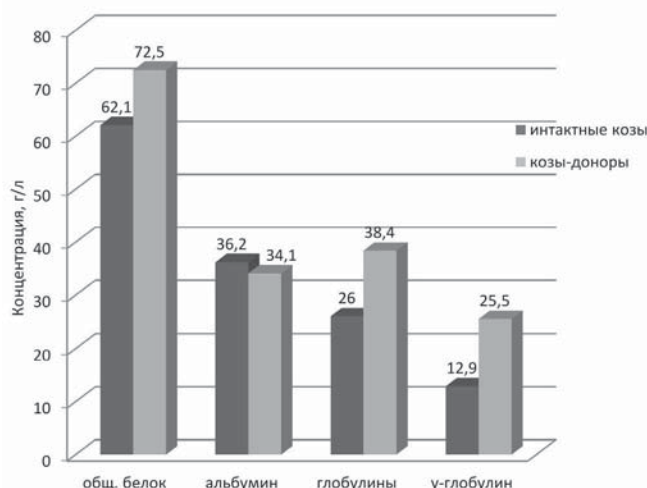


Рис. 1. Динамика изменений содержания общего белка, альбумина, глобулинов в сыворотке крови коз, г/л. Различия показателей общего белка, глобулинов и γ -глобулинов коз-доноров достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с интактными козами

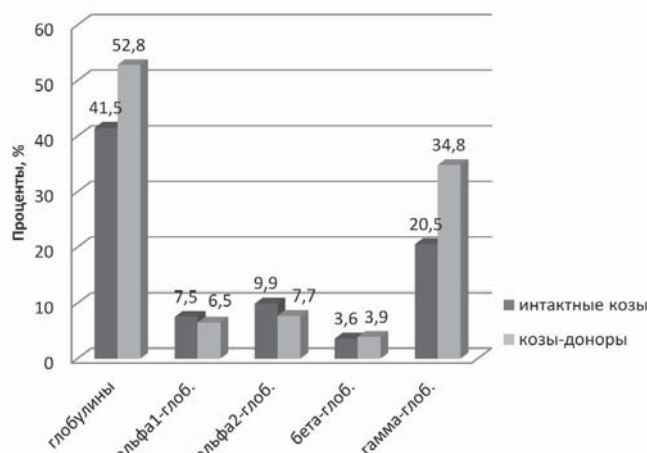


Рис. 2. Содержание глобулинов в сыворотке крови коз, %. Различия содержания глобулинов и γ -глобулинов интактных и иммунизированных коз достоверны ($p < 0,05$)

Таблица

Сравнительный анализ белковых фракций коз ($M \pm m$)

Объект	Общ. белок, г/л	Альб., %	Альб., г/л	Глоб., %	Глоб., г/л	α_1 , %	α_2 , %	β , %	γ , %	γ , г/л
Норма (овцы, Кондрахин И.П.)	65–75	35–50	23–37,5	–	–	$\alpha_1 + \alpha_2$ 13–20		7–11	20–46	–
Козы интактные, n=10	62,1 \pm 1,7	58,5 \pm 2,0	36,2 \pm 0,6	41,5 \pm 2,0	25,5 \pm 1,9	7,5 \pm 0,4	9,9 \pm 0,6	3,6 \pm 0,5	20,5 \pm 1,9	12,9 \pm 1,4
Козы, иммунизируем., n=32	72,5 \pm 1,5*	47,2 \pm 0,8	34,1 \pm 0,8	52,8 \pm 0,8	38,4 \pm 1,1	6,5 \pm 0,2	7,7 \pm 0,3	3,9 \pm 0,4	34,8 \pm 0,7*	25,5 \pm 0,8*

* $p < 0,05$ в сравнении с интактными козами

плазмы — сырья для производства лекарственного препарата — мы осуществляли контроль за уровнем гемоглобина. В среднем в группе интактных животных уровень гемоглобина составлял $114 \pm 5,0$ г/л, в группе иммунных доноров — $102 \pm 2,0$ г/л, что не выходило за рамки физиологических значений (90–145 г/л).

Заключение. В результате исследований крови коз определены нормальные величины общего белка ($63 \pm 1,7$ г/л) и белковых фракций сыворотки крови (альбумин — $36,8 \pm 0,6$ г/л; глобулины — $26,5 \pm 1,9$ г/л; α_1 -глобулины — $7,4 \pm 0,4\%$; α_2 -глобулины — $10,0 \pm 0,6\%$; β -глобулины — $3,6 \pm 0,5\%$; γ -глобулины — $20,3 \pm 1,9\%$). Установлено, что систематическая иммунизация коз-доноров способствовала возникновению ряда изменений в составе белков крови: увеличению общего белка плазмы и общего количества глобулинов за счет повышения γ -глобулиновой фракции ($34,8 \pm 0,7\%$), свидетельствующей о напряженном иммунитете, что отражалось в высоких титрах специфической активности плазмы. Подтверждены наши предыдущие данные о поддержании количества форменных элементов периферической крови в пределах физиологической нормы. Некоторое снижение гемоглобина (до $102 \pm 2,0$ г/л) крови иммунных коз-доноров по сравнению с интактными ($114 \pm 5,0$ г/л), не выходящее, однако, за рамки нормальных величин, можно объяснить регулярными экфузиями достаточно больших объемов крови. Этот факт требует внимания со стороны ветеринарной службы,

работающей с подобными животными, и, возможно, принятия при необходимости мер для профилактики анемии у животных-доноров.

Список литературы

1. Бодина З.К., Голубева В.Л., Серова Л.Д. и др. Опыт получения иммунного сырья для производства ксеногенных иммуноглобулинов // Вестник службы крови России. – М., 2003, № 2. – С. 14-15.
2. Голубева В.Л., Титова Е.В. и др. Способ получения анти-тимоцитарного глобулина для внутривенного введения. – Патент № 2264826 от 30.12.2004 г.
3. Голубева В.Л., Серова Л.Д., Титова Е.В. и др. Лечебное действие антилимфолина (козьего иммуноглобулина) // Альманах «Геронтология и гериатрия». – М., 2006. – Вып. 5. – С. 177-182.
4. Епифанова Н.Ю. Иммуномодуляторы в комплексном лечении гнойно-воспалительном периоде у больных пожилого и старческого возраста: Автореф. дисс. ... докт., 2012.
5. Шабалин В.Н., Серова Л.Д., Смирнова А.И. и др. Способ получения антилимфоцитарного иммуноглобулина: Авт. свид-во № 523696 от 15.04.1976 г.
6. Шишина Р.Н., Голубева В.Л. и др. Эффективность антилимфолина при апластической анемии // Альманах «Геронтология и гериатрия», 2001. – Вып. 1. – С. 134-136.

Контактная информация:

Голубева В.Л.

E-mail antilympholin@rambler.ru

Тел.: 8 (499) 187-78-11

УДК 577.352.336

М.Н. ШАПОШНИКОВ, Д.Б. ЧУДАКОВ, А.А. ГЕНЕРАЛОВ, С.Ю. ЗАЙЦЕВ
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТА ХИТОЗАНА С ФОТОАКТИВИРУЕМЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ КРАСИТЕЛЕМ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В КЛЕТочНОЙ МИКРОСКОПИИ

Новый фотоактивируемый флуоресцентный краситель (ФФК) изначально существует в нефлуоресцирующей форме. ФФК могут быть легко преобразованы во флуоресцентную форму облучением при длине волны 405 нм. Предложена схема синтеза конъюгата хитозана (ММ 50 000) с ковалентно-связанным ФФК. После инкубации конъюгата с клетками линии HaCaT и приготовления препарата для микроскопии получили микрофотографии монослоя клеток с внутриклеточным распределением хитозана. Разработанная методика окрашивания клеток является перспективной для медицины человека и животных.

Ключевые слова: флуоресцентные красители, фотоактивация, окрашивание клеток, внутриклеточные распределение, флуоресцентная микроскопия, хитозан.

M.N. SHAPOSHNIKOV, D.B. CHUDAKOV, A.A. GENERALOV, S.Yu. ZAITSEV
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

PREPARATION OF THE CHITOSAN CONYUGATE WITH PHOTOACTIVATED FLUORESCENT DYE AND ITS APPLICATION IN CELL MICROSCOPY

A novel photoactivated fluorescent dye (PFD) originally is existing in the non-fluorescent form. The PFD can be easily transform to fluorescence form by 405 nm irradiation. The scheme of the conjugate synthesis of chitosan (MM 50 000) with covalently bound PFD was proposed. After incubation of the cell line HaCaT with the conjugate and making cell preparations, the micrographs of the cell monolayers with the intracellular distribution of chitosan were obtained. The developed methodology of the cell staining is promising for human and animal medicine.

Key words: fluorescent dyes, photoactivation, cell staining, intracellular distribution, fluorescent microscopy, chitosan.

Флуоресцентные красители в настоящее время активно применяются в биологии, химии и медицине. Они способны специфически окрашивать различные структуры тканей и клеток, что позволяет использовать со-

временные методы флуоресцентной микроскопии [1]. Фотоактивируемые флуоресцентные красители (ФФК) изначально существуют в нефлуоресцентной форме, которая может быть преобразована во флуоресцент-

ную форму путем облучения светом с длиной волны около 400 нм [2-4]. Поэтому ФФК представляют огромный интерес для микроскопии биологических объектов и могут быть использованы для отслеживания белков [5, 6], создания многоцветных приложений [7], во флуоресцентной наноскопии, например, в схемах визуализации с высокими разрешающими параметрами («PALM, F-PALM, STORM») [8-10].

В клеточной биологии и медицине постоянно ведется поиск перспективных носителей для контролируемой доставки различных биологически активных веществ (БАВ) в клетки организма. Отслеживать внутриклеточный транспорт таких носителей лучше с использованием изначально иммобилизованных на них флуоресцентных красителей. В роли носителя БАВ перспективно использовать хитозан — биodeградируемый полимер, который легко поддается химическим модификациям. В качестве метки для изучения внутриклеточного транспорта хитозана удобно использовать новый ФФК, который можно активировать только в ин-

тересующей области клетки, для дальнейшего наблюдения за перемещением молекул хитозана.

Целью работы являлось получение конъюгата хитозана с иммобилизованными молекулами ФФК и исследование полученного продукта на клеточной культуре методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Материалы и методы. Новые фотоактивируемые флуоресцентные красители были синтезированы Беловым В.Н. и сотрудниками в Макс-Планк-Институте биофизической химии, Гёттинген, ФРГ; параметры синтеза и физико-химические характеристики этих ФФК опубликованы [11]. В данной работе представлены новые красители — ФФК-813 и ФФК-NHS (N-сукцинимидиловый эфир ФФК), структуры которых приведены на рис. 1.

На примере ФФК-813 показан фотолиз нефлуоресцентной формы ФФК, который сопровождается отщеплением азота и присоединением воды, приводящих к флуоресцирующей форме красителя (Род-813) (рис. 2).

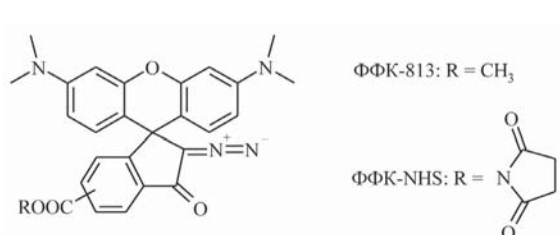


Рис. 1. Структурные формулы ФФК-813 и ФФК-NHS

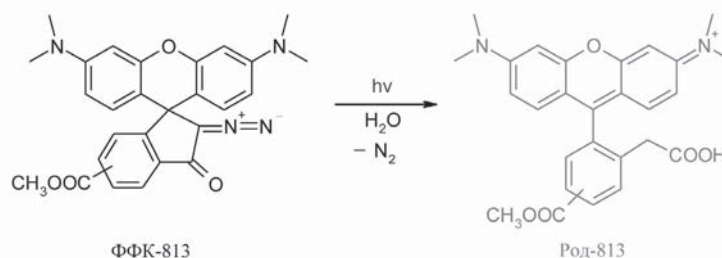


Рис. 2. Схема фотолиза ФФК-813 с образованием флуоресцирующей формы – Род-813

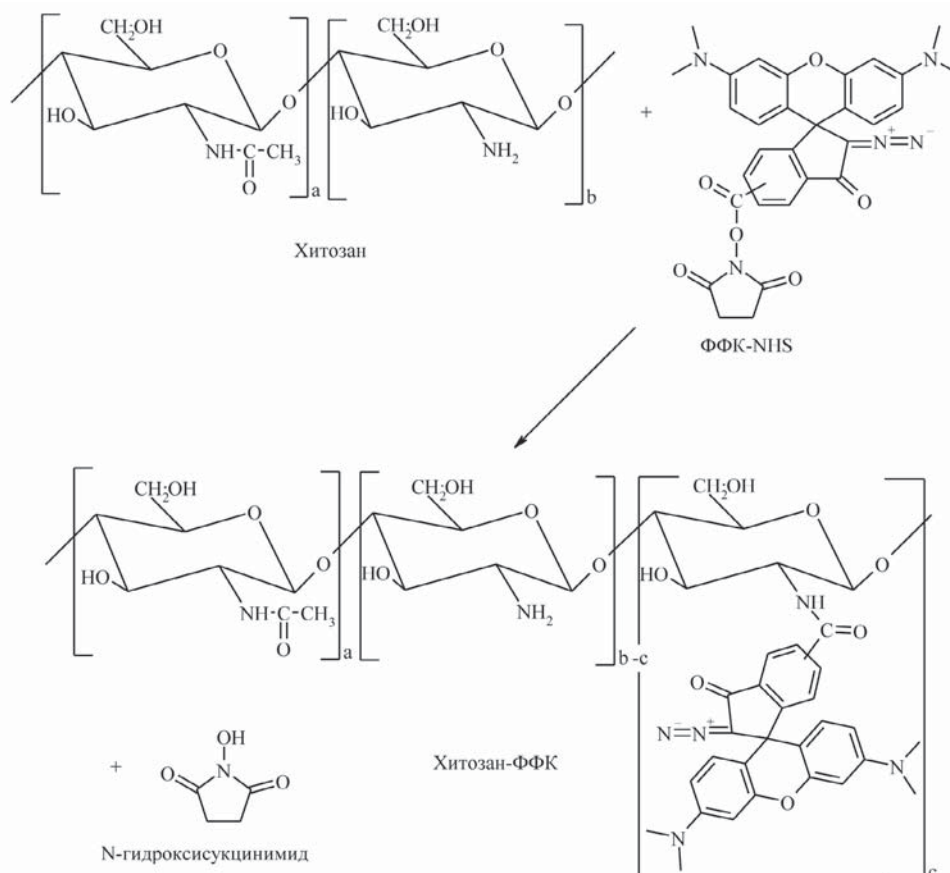


Рис. 3. Схема синтеза конъюгата «Хитозан-ФФК» из хитозана и ФФК-NHS

Для получения конъюгата «Хитозан-ФФК» использовали хитозан с молекулярной массой 50 000 и степенью деацетилирования 96%. Синтез конъюгата проводили по схеме, приведенной на рис. 3. К хитозану, высушенному из раствора уксусной кислоты в виде пленки, предварительно нейтрализованной раствором щелочи, прибавляли ФФК-NHS, растворенный в ДМСО, при интенсивной тряске на лабораторном шейкере. Выдержку реакционной массы проводили в течение 2-х часов на шейкере без доступа света, после чего отмывали пленку ДМСО и дистиллированной водой. Для выделения и очистки конъюгата использовали 0,1 н. раствор уксусной кислоты и 1 н. раствор гидроксида натрия центрифугированием осадка хитозана в слабощелочной среде. Для использования конъюгата «Хитозан-ФФК» в клеточных экспериментах растворяли в 0,1 н. уксусной кислоте. Содержание хитозана в конъюгате проверяли в ходе «нингидриновой реакции», в результате которой образуется продукт, интенсивность окраски продукта при 565 нм пропорциональна концентрации хитозана [12].

Степень ацилирования хитозана в полученном конъюгате оценивали путем измерения спектра флуоресценции продукта, получаемого после фотолиза, с помощью ртутной лампы (100 Вт) в течение 5 мин., и сравнением интенсивности флуоресценции с интенсивностью раствора с концентрацией ФФК-813 5 мкг/мл.

Измеряли спектры поглощения и флуоресценции на спектрометре «Ocean Optics USB 4000-FL» с источником света «Ocean Optics PX-2».

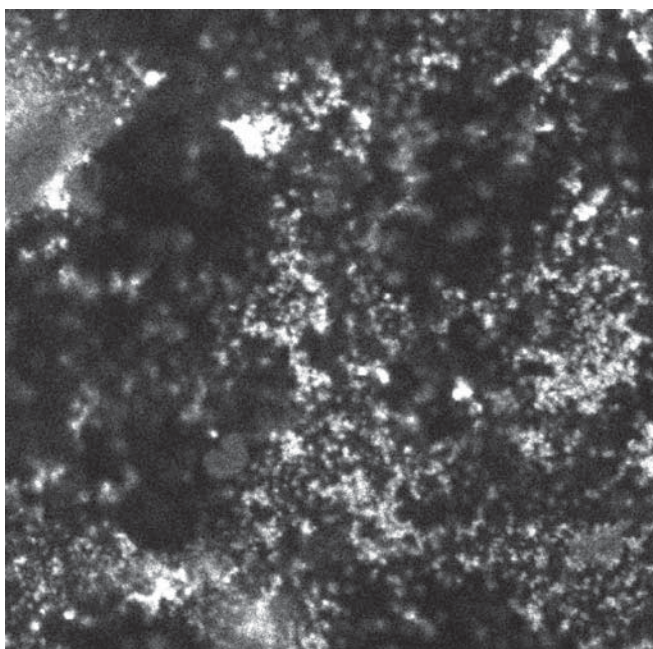
Красители ФФК-813 предварительно растворяли в ДМФА, а затем разводили в 0,1 н. уксусной кислоте до концентрации 200 мкг/мл.

В работе использовали клеточную линию HaCaT (клетки кератиноциты человека). Клетки культивировали на среде DMEM. В среду добавляли фетальную бычью сыворотку (FBS) 8%, L-глутамин (300 мкг/мл), ампицилин/стрептомицин (50 мкг/мл), 2-меркаптоэтанол (5×10^{-5} М). Клетки

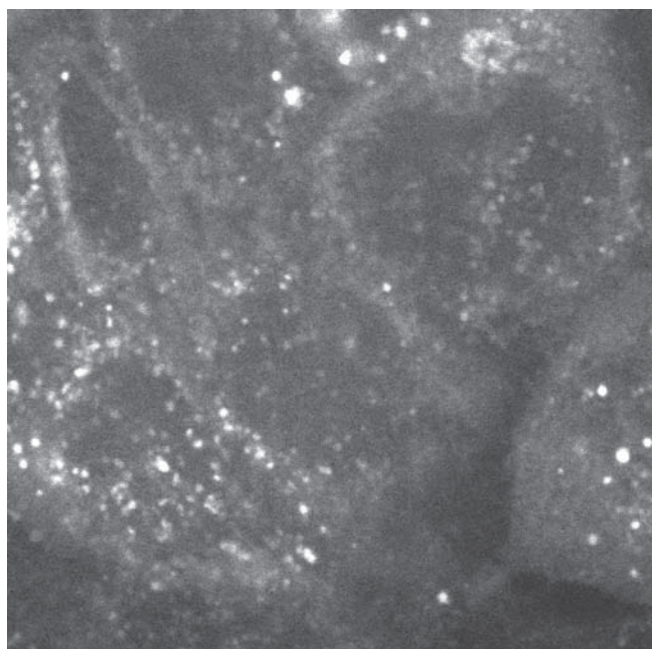
культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C. Для подготовки образцов клетки трипсинизировали и наносили на стерильные покровные стекла. Клетки использовали по достижении ими «полуконфлюэнтного монослоя».

Растворы ФФК-813 с хитозаном (для сравнения) и конъюгата «Хитозан-ФФК» добавляли в ячейки планшета с предварительно выращенными на покровных стеклах монослоями клеток в объемах для получения концентраций растворов в ячейках 2,2 мкг/мл. Клетки инкубировали 60 минут в CO₂-инкубаторе. После окрашивания клетки трижды отмывали фосфатным буфером и полимеризовали на предметных стеклах с помощью смолы Mowiol 4.88 (Calbiochem, Германия). Детекцию проводили с помощью конфокальной микроскопии на микроскопе Eclipse TE2000 (фирмы Nikon Япония), оснащенном лазерами 405, 488 и 543 нм.

Результаты и их обсуждение. Результаты получения индивидуального ФФК-813 для окрашивания клеток животных и человека были описаны в наших предыдущих работах [2-4]. Перед фотоактивацией использовали лазер возбуждения (543 нм) и соответствующий канал для детекции флуоресценции. Флуоресценция отсутствовала. После чего использовали «активируемый» лазер (405 нм) в режиме сканирования, таким образом детектировали ядра, окрашенные ядерным красителем «Хёхст», необходимым для лучшей визуализации отдельных клеток (на микрофотографиях отсутствует). В момент облучения ядер ФФК, иммобилизованный ковалентно на молекулах хитозана, подвергался фотолизу, в результате чего образовывалась флуоресцирующая форма красителя за счет деструкции светочувствительной diaзокетонной группы. Используя лазер возбуждения (543 нм) и соответствующий канал для детекции флуоресценции, получили микрофотографию после фотоактивации ФФК, иммобилизованного на молекулах хитозана (рис. 4а). Для сравнения получили микрофотографию клеток, окрашенных раствором ФФК-813 с хитозаном в 0,1 н. уксусной кислоте (рис. 4б).



а



б

Рис. 4. Клетки HaCaT окрашены:
а) конъюгатом «Хитозан-ФФК» (конц. 2,2 мкг/мл) после фотоактивации;
б) ФФК-813 (конц. 5 мкг/мл) с хитозаном (2,2 мкг/мл) после фотоактивации

На рис. 4а с помощью ФФК (точнее, активированной формы Род) можно наблюдать распределение хитозана внутри клеток, вокруг темных ядер, в виде неоднородных скоплений. На рис. 4б клетки окрашены с помощью ФФК-813 в присутствии хитозана (после фотоактивации Род-813), видно более однородное распределение красителя, что является следствием его свободного нахождения от хитозана.

Таким образом, синтезированный конъюгат хитозана с иммобилизованными на нем молекулами ФФК («Хитозан-ФФК») показал свою пригодность для визуализации хитозана внутри клеток с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Полученные данные позволили сделать вывод, что ФФК-NHS может быть с успехом использован для визуализации внутриклеточного распределения различных биологически активных веществ. Разработанная методика внутриклеточной визуализации хитозана с использованием конъюгата «Хитозан-ФФК» перспективна для диагностических задач в области медицины человека и животных, что подтверждено соответствующими документами, утвержденными научно-техническим советом ФГБОУ ВПО МГАВМиБ.

Список литературы

1. Селиванов Е.В., Звягинцев Е.Н. Красители в биологии и медицине: Справочник. – Барнаул: Азбука, 2003, 40 с.
2. Шапошников М.Н., Бартов М.С., Зайцев С.Ю. Инновационный метод окрашивания клеток новыми фотоактивируемыми флуоресцентными красителями // Ученые записки КГАВМ: Сб. тр. конф., 2010. Т. 201. – С. 360-365.

3. Зайцев С.Ю., Шапошников М.Н., Свищевская Е.В. Окрашивание клеток новыми фотоактивируемыми флуоресцентными красителями // Ветеринарная медицина. – М., 2010, № 3. – С. 32-34.

4. Шапошников М.Н. Чудаков Д.Б., Генералов А.А. и др. Зависимость флуоресценции нового фотоактивируемого красителя от параметров среды // Фундаментальные исследования, 2012, № 9(2). – С. 322-327.

5. Lidke D.S., Wilson B.S. Caught in the Act: Quantifying Protein Behavior in Living Cells // Trends Cell Biol., 2009. V. 11. – P. 566-574.

6. Lippincott-Schwartz J., Snapp E., Kenworthy A. Studying protein dynamics in living cells // Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2001. V. 2. – P. 444-456.

7. Neher R.A., Mitkovski M., Kirchhoff F. et al. Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images. // Biophys. J., 2009. V. 96. – P. 3791-3800.

8. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R. et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution // Science, 2006. V. 313. – P. 1642-1645.

9. Hess S.T., Girirajan T.P., Mason M.D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy // Biophys. J., 2006. V. 91(11). – P. 4258-4272.

10. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) // Nature Methods, 2006. V. 3. – P. 793-795.

11. Belov V.N., Wurm C.A., Boyarskiy V.P. Rhodamines NN: a novel class of caged fluorescent dyes // Angew. Chem. Int. Ed., 2010. V. 49. – P. 3520-3523.

12. Prochazkova S., Varum K.M., Ostgaard K. Quantitative determination of chitosans by ninhydrin // Carbohydrate Polymers, 1999. Vol. 38. – P. 115-122.

Контактная информация:
mihan2404@mail.ru,
тел.: 8 (495) 377-91-32

УДК 53+577.3

А.А. ОЛЕШКЕВИЧ

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

«БИОСЕНСОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ» ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Исследована степень изменения характерных для обычного физиологического состояния бактерий *Alivibrio fischeri* параметров — интенсивности люминесценции, скорости ростовых процессов и величины клеточного урожая — в ответ на различные физико-химические агенты. Результаты могут использоваться для оценки степени ингибиторного воздействия, в том числе лечебных препаратов и при анализе их дозировки.

Ключевые слова: биосенсоры, интенсивность люминесценции, физиологический отклик, тестирование токсичности препарата.

А.А. OLESHKEVICH

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

BIOSENSOR POTENTIAL OF LUMINOUS BACTERIA

The degree of characteristic changes of the normal physiological state of bacteria *Alivibrio fischeri* parameters — the luminescence intensity, the growth rate, cell abundance value — in response to various physical and chemical agents was investigated. The results can be used to assess the inhibitory effects, including therapeutic drugs and their dosage in the analysis.

Key words: biosensors, intensity of luminescence, physiological reply, toxic-test.

Под понятием «биосенсор» подразумевают устройство (или систему), имеющее биологически чувствительный элемент — биоиндикатор и связанный с ним преобразователь сигнала (либо интегрированный с ним в систему) [1]. Такие системы в настоящее время становятся распространенным инструментом для биотестирования поверхностных водоёмов, промышленных стоков, почв, определения степени токсичности вновь

синтезированных химических соединений и фармацевтических препаратов.

Биосенсоры конструируют на основе растительных и животных тканей, а также микроорганизмов. Микроорганизмы как биоиндикаторы могут служить показателем естественных процессов антропогенных изменений среды обитания в экологии, в медицине, в ветеринарии для контроля безопасности кормов, то

есть для оценки интегрального воздействия токсикантов различного происхождения. Быстродействие, точность и чувствительность к интегральному действию поллютантов — важные особенности люминесцентных тест-систем.

Привлекательной особенностью сенсоров на основе биолюминесценции является то, что они не требуют источника возбуждения, поскольку свет генерируется в ходе реакции, обеспечивающей чрезвычайно высокую чувствительность. Не менее важным преимуществом эмиссии света является простота детектирования и наличие современной аппаратуры для счета фотонов.

Светящиеся бактерии найдены почти во всех морских средах как сапрофиты, свободноживущие организмы и симбионты. Одними из наиболее известных являются морские люминесцирующие бактерии *Alivibrio fischeri*. Испускание света происходит за счет комплекса люциферазы, восстановленного флавина (ФМНН) и длинноцепочечного насыщенного альдегида. Люцифераза, участвующая в реакции, использует обычные кофакторы — ФМНН, НАДН или НАД(Ф)Н, играющие центральную роль в метаболических процессах.

Цель настоящего исследования — нахождение оптимальных условий эмиссии морских люминесцирующих бактерий *Alivibrio fischeri* и изучение их реакции на воздействие ряда факторов и лечебных препаратов. В задачи входило изучение факторов, определяющих характер изменения бактериального свечения. В качестве таких факторов, влияющих на физиологический отклик бактерий — интенсивность люминесценции, были выбраны следующие: плотность бактериальной популяции, концентрация белка в среде и время его контакта с клетками, различный температурный и pH-режимы инкубации.

Материалы и методы исследований. В качестве люминесцентной системы была использована культура морской бактерии *Alivibrio fischeri* шт. 6. Культивирование бактерии осуществляли на среде следующего состава (в г/л): пептон — 10, дрожжевой экстракт — 1, NaCl — 30, Na₂HPO₄ — 5,3, KH₂PO₄ — 2,1, (NH₄)₂SO₄ — 0,5, MgSO₄ · 7H₂O — 0,1, глицерин — 3 мл; pH 7,4. В качестве посевной служила культура, выращенная на той же среде до стационарной фазы роста. Для культивирования использовали круглодонные колбы ёмкостью 100 мл с 50 мл среды, которые помещали на качалку со скоростью перемешивания 90 об./мин. при 20°C. Об интенсивности роста культуры судили по оптической плотности суспензии выросших клеток, которую определяли на колориметре КФК-2МП при 290 нм. Интенсивность биолюминесценции клеток измеряли при комнатной температуре на люминометре, состоящем из фотоумножителя ФЭУ-85 и микровольтметра В2-15, при использовании специальных кювет.

При анализе физиологического отклика микроорганизмов на воздействие pH, длительности инкубации, температурного режима использовали количественную оценку тест-реакции, которую выражали в виде величины индекса токсичности. Она была равна отношению $(I_0 - I/I_0) \cdot 100\%$, где I_0 и I — интенсивности биолюминесценции контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции и температуре (30 мин., 22°C) исследуемой инкубационной смеси с клетками бактерии. В качестве сравнительного контроля качества оценки определяли чувствительность бактерий на модельный токсикант — ZnSO₄·7H₂O (1 мг·л⁻¹), при действии которого в течение 30 мин. гашение свечения составляет 50% (LD₅₀).

При использовании светящихся бактерий в качестве тест-системы для оценки воздействия различных доз лекарственных препаратов — доксорубина и циклофосфана (применяемых для лечения злокачественных новообразований) — на живые бактерии анализировали излучение света и реакции, сопряженные с ростом культуры. Те же характеристики биосенсорной культуры исследовали при экспресс-контроле на отсутствие токсичности синтезированного α-интерферона.

Определение оптимальных условий эмиссии люминесцирующих бактерий *Alivibrio fischeri*. Плотность популяции. Было установлено, что интенсивность биолюминесценции растущих клеток зависит от плотности популяции. Максимальной интенсивностью люминесценции характеризуется состояние популяции растущих клеток *A. fischeri* шт. 6, называемое «quorum sensing» [2]. Свечение отсутствовало при малых концентрациях клеток ОП = 0,2–0,3 и резко увеличивалось и достигало максимума при достижении популяцией критической плотности через 20 ч (ОП = 2) (рис. 1). Синтезирующееся клетками аутоиндукции (АИ) люминесценции ацильное производное L-гомосерина, N-3-оксогексаноиллактон L-гомосерина, свободно диффундируя через клеточные мембраны, принимает участие при коммуникативном общении клеток в системе «quorum sensing» и является основным фактором, влияющим на экспрессию *lux*-генов *A. fischeri* [2, 3].

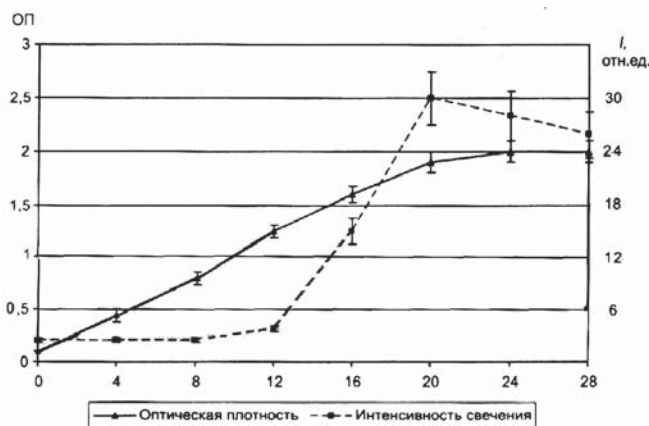


Рис. 1. Рост и интенсивность люминесценции *A. fischeri*

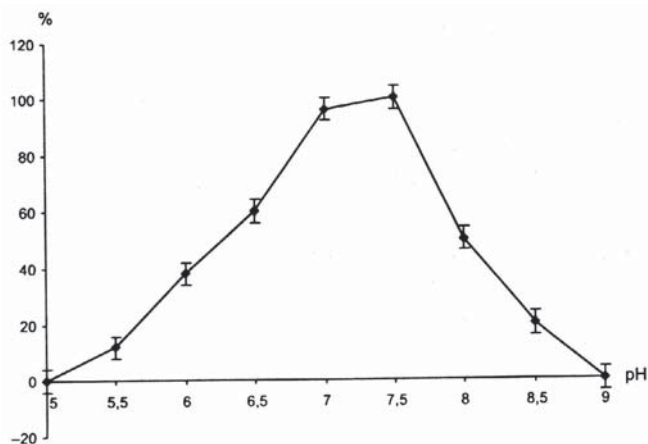


Рис. 2. pH-зависимость свечения интактных клеток *A. fischeri* в 0,1 М Na-фосфатно-карбонатном буфере с 3% NaCl при 20°C

Влияние температуры и pH. Показано, что в физиологических характеристиках морских бактерий *A. fischeri* шт. 6 проявляется адаптация к физико-химическим условиям среды обитания. Так, температурный диапазон свечения клеток глубоководной культуры регистрировали при 10–35°C и в диапазоне начальных значений pH среды 5,5–8,5. Растущая популяция имела близкие максимальные уровни интенсивности люминесценции при pH среды 7,0–7,5 и в диапазоне температур 15–27°C. Изучение биолюминесценции интактных клеток бактерий показало, что при температурах, превышающих приблизительно на 15°C оптимальные, происходила полная утрата свечения; не детектировали свечения интактных клеток и в области pH инкубационной среды, превышающей величину 9,0. Гашение свечения на 50% (и более) наблюдали при pH < 6,5 и > 8,0 (рис. 2) и в области температур роста менее 10°C и более 37°C. Вероятно, в таких условиях происходит разобщение системы переноса электронов на люциферазу [4].

Воздействие белков. При изучении воздействия разных концентраций белков — лейкоинтерферона и сывороточного альбумина — на характер изменения бактериального свечения наблюдали двухфазное изменение биолюминесценции с максимумом при концентрации белка 20–35%. При увеличении времени контакта клеток бактерий с белками более 20–30 мин. белки в указанных концентрациях начинали подавлять свечение. Изменение уровня люминесценции при этом характеризовалось «колоколообразной» кривой. При увеличении концентрации белка наблюдали дозозависимое тушение люминесценции. Изменение температурного режима, от 5 до 37°C, продемонстрировало стимуляцию эмиссии при 25–27°C. Таким образом, люминесцентная система *Alivibrio fischeri* выступала как система индикаторная и репортерная.

Люминесцирующие бактерии как тест-система для оценки лекарственных препаратов. Эффекты доксорубина и циклофосфана. Исследовали воздействие различных доз лекарственных препаратов доксорубина и циклофосфана на характеристики живых бактерий — показатели роста и эмиссию клеток *A. fischeri*. Препараты лекарств вносили в колбы с растущей культурой в разных концентрациях.

Было показано, что препараты доксорубина и циклофосфана ингибировали рост культуры и тушили свечение в концентрациях 0,8 мг/мл и 0,2 мг/мл соответственно. При этом в присутствии доксорубина величина оптической плотности клеток культуры и скорость роста уменьшались в 2 раза, в присутствии циклофосфана — в 1,2 раза. Интенсивность люминесценции уменьшалась соответственно в 1,4 и 1,8 раза.

Таким образом, установлено быстрое торможение метаболизма и клеточного деления светящихся бактерий (через 15–20 часов культивации) концентрациями препаратов, значительно более низкими, чем используемые в лечебных целях. Обычно антибиотики определяют с помощью турбидиметрического и титриметрического микробиологического анализа; однако методики такого определения довольно сложны и непригодны для экспрессных анализов.

Оценка интерферона. Было показано, что культуру *Alivibrio fischeri* можно использовать и при экспресс-контроле с целью определения токсичности синтезированного интерферона. В этих экспериментах изучали реакцию бактерии на внесение интерферона различной активности (концентрации) от 125 до 1250 МЕ. Иссле-

довали изменение показателей оптической плотности и интенсивности люминесценции сразу после внесения препарата, а также в динамике роста культуры. Отрицательный эффект препарата интерферона на рост и показатель оптической плотности суспензии выросших клеток и биолюминесценцию не наблюдали, что свидетельствовало о достаточной чистоте и отсутствии токсичности проверяемого препарата.

Таким образом, можно заключить, что культура *Alivibrio fischeri* быстро и определенным образом реагирует на присутствие внешних факторов, поэтому применение подобной тест-системы в качестве биосенсора вполне оправдано и перспективно. Люминесцирующие бактерии легко культивируются; из них можно получить большое количество люциферазы — до 5% от массы клеток, люциферин-люциферазные комплексы, в том числе иммобилизованные на носителях, и использовать в биотестировании.

Список литературы

1. Тернер Э., Карубе И., Уилсон Дж. Биосенсоры: основы и приложения. — М.: Мир, 1992. — С. 448-504.
2. Ulitzur S. and Dunlop P. Relulatory circuitry controlling luminescence autoinduction in *Alivibrio fischeri* // Photochem. Photobiol., 1995. Vol. 65. — С. 625-632.
3. Lirbanowski M.L., Lostroh C.P., Greenberg T.P. Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Alivibrio fischeri* LuxR protein // J. Bacteriol., 2004. Vol. 186. — С. 631-637.
4. Gitelson J.I., Vydryakova G.A., Kuznetsov A.M. et al. Luminous bacteria culture collection biodiversity and applied aspects // Bio-luminescence and Chemiluminescence / Eds Case J.F. et al. — Singapore: World Sci. Publ. Co., 2000. — P. 63-66.

Контактная информация:
Тел.: 8 (495) 377-72-80 (служ.).

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК К ВИРУСУ ПГ-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В статье представлены результаты исследований по определению чувствительности перевиваемых клеток к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота (КРС), влияние заражающей дозы вируса и способа культивирования на накопление вируса. Определены оптимальные условия репродукции вируса в двух линиях перевиваемых клеток.

Ключевые слова: перевиваемые культуры клеток, заражение, титр вируса, накопление вируса, инфекционная активность.

BEHZADPOUR DARYOUSH, R.V. BELOUSOVA

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

SENSITIVITY OF CONTINUOUS CELL CULTURES TO VIRUS ПГ-3 OF LARGE HORNED LIVESTOCK

In article results of researches by definition of sensitivity of continuous cells to virus ПГ-3 of large horned livestock and influence of different infecting doze of virus and cultivation method on virus accumulation are presented. Definition of optimum conditions of virus reproduction in two continuous cell lines is investigated.

Key words: continuous cell cultures, infecting, virus titer, virus accumulation, infection activity.

Современное ведение животноводства сопровождается большой концентрацией на ограниченных площадях одновозрастных и одновидовых животных, это создает условия для быстрого распространения заболеваний респираторных, желудочно-кишечных и репродуктивных органов у крупного рогатого скота.

Такие заболевания наносят большой ущерб животноводству, а в последние годы они нашли широкое распространение и в небольших товарных хозяйствах.

В этиологической структуре респираторных заболеваний большую роль играют вирусы ИРТ, ПГ-3, диарея, РС, бактерии — пастереллы, сальмонеллы, стафилококки, хламидии, микоплазмы, а предрасполагающими факторами массовых респираторных болезней являются: состояние иммунной системы макроорганизма, режим кормления и содержания животных, стрессовые ситуации, экологическое состояние внешней среды [1–9].

Респираторные и желудочно-кишечные болезни телят протекают в основном по типу ассоциативных (смешанных) инфекций, и проявление их происходит при кумулятивном действии возбудителей, причём их пусковым механизмом являются вирусы, а бактерии играют вторичную роль. Большой удельный вес в этой патологии принадлежит вирусу ПГ-3, распространение которого очень велико как в нашей стране, так и за рубежом. Терапевтические меры борьбы с возникшим заболеванием малоэффективны. Поэтому в комплексе противоэпизоотических мероприятий при этих инфекциях ведущее место занимает специфическая профилактика.

В ветеринарной практике против вирусных пневмоэнтеритов телят используют как моно, так и ассоциированные вакцины [2–8].

Особенностью изготовления вакцин является накопление вируса в высоких инфекционных титрах при его репродукции в культурах клеток.

Использование для этих целей первично триксинизированных культур клеток метод довольно тру-

доемкий и малопродуктивный, требует наличие большого количества животных-доноров почечной и тестикулярной ткани. Перевиваемые культуры клеток исключают трудоёмкий процесс трипсинизации. Важным этапом в изготовлении вакцины является подбор соответствующего вида перевиваемых культур клеток, обеспечивающих накопление вируса с высоким инфекционным титром.

Цель работы — подобрать наиболее чувствительную культуру клеток для вируса ПГ-3 крупного рогатого скота для изготовления вакцины.

Материалы и методы. В работе использовали:

- вирус ПГ-3 крупного рогатого скота, шт. «ЗКСМ»;
- перевиваемые культуры клеток: ПТ-80 — почка телёнка (эпителиоподобные клетки); ЛЭК — лёгкое плода коровы (эпителиоподобные клетки);
- питательные среды и растворы: среда Игла с двойным набором аминокислот, среда 199, фетальная сыворотка крупного рогатого скота, 0,02 %-ный раствор версена, химопсин, антибиотики (пенициллин, стрептомицин);
- матрасы из стекла и пластика емкостью от 50 мл до 1,5 л и 96-луночные планшеты.

Поддержание перевиваемых культур клеток проводили путем периодических пассажей, использовали бесцентрифужный метод. Концентрацию клеток рассчитывали по общепринятой методике. Культуры клеток выращивали при температуре 36,5–37°C в стационарных условиях. Инфекционную активность вируса определяли методом титрования в культуре клеток (ПТ-80, ЛЭК) микрометодом. Расчет титра вируса проводили по общепринятой методике Кербера и выражали в ТЦД 50/мл.

Результаты исследований. Вирус ПГ-3 КРС ранее был адаптирован к первично трипсинизированной культуре клеток ПЭК (почка эмбриона коровы). На первом этапе работы были выбраны 2 линии перевиваемых клеток (ПТ-80 и ЛЭК), в которых, согласно литературным

данным, успешно репродуцируются вирусы (ИРТ, адено-вирусы и др.), вызывающие пневмоэнтериты у телят.

Первоначально проведена адаптация вируса ПГ-3 в течение 15 пассажей на ПТ-80 и ЛЭК.

Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Определение чувствительности перевиваемых культур клеток к вирусу ПГ-3 КРС

№ пассажира	Инфекционная активность вируса (lgТЦД 50/мл)	
	ПТ-80	ЛЭК
1	4,0	3,25
2	4,0	3,25
3	4,0	3,5
4	4,25	3,5
5	4,25	3,5
6	4,5	3,5
7	5,0	3,5
8	5,0	3,75
9	5,0	3,75
10	5,5	4,0
15	5,75	4,0

Из данных табл. 1 видно, что вирус ПГ-3 инфицировал обе линии перевиваемых клеток. На первых пассажах (до 7-го) титр вируса отличается незначительно (от 0,5 до 1,0 lg ТЦД 50/мл). Затем наиболее активная репродукция вируса была отмечена в культуре клеток ПТ-80. Разница в инфекционной активности вируса (с 7-го пассажа) составляла 1,25–1,7 lg ТЦД 50/мл.

Таким образом, наиболее эффективной для культивирования вируса ПГ-3 является перевиваемая культура клеток ПТ-80.

Следующим этапом работы было определение оптимальной заражающей дозы вируса, время инфицирования монослоя клеток и способа их культивирования с целью получения максимального накопления вируса.

Свежеприготовленные для посева суспензии и сформировавшиеся монослой клеток инфицировали

вирусом в дозах 0,1; 0,01; 0,001 ТЦД 50/кл. Монослойные культуры заражали через 24, 48, 72 и 96 часов. Результаты представлены в табл. 2.

Установлено, что при множественности заражения 0,1 и 0,01 ТЦД 50/кл в суспензии клеток максимальное накопление вируса в ПТ-80 происходило на вторые сутки культивирования и на 4–7 сутки в ЛЭК. Снижение дозы заражения до 0,001 ТЦД 50/кл приводило к увеличению срока культивирования вируса в обеих культурах до 3-х и 9 суток и к снижению титра вируса на 0,25–1,0 lg ТЦД 50/мл соответственно.

Максимальное накопление вируса в монослойных культурах при заражающих дозах 0,1 и 0,01 ТЦД 50/мл отмечено на 3–4 сутки в ПТ-80 и на 6–9 сутки в ЛЭК. Инфекционная активность составляла 5,5–4,5 lg ТЦД50/мл и 4,0–3,25 ТЦД 50/мл соответственно. При дозе заражения 0,001 ТЦД50/мл титр вируса снижался в обеих культурах до 4,25–4,0 и 2,5–2,0 lg ТЦД50/мл соответственно.

Влияние срока инфицирования (от 1 до 4 суток) сформировавшегося монослоя клеток на «урожай» вируса в ПТ-80 и ЛЭК различалось незначительно — в пределах 0,25–0,5 lg ТЦД50/мл.

Заключение. Результаты полученных данных позволяют сделать вывод, что наилучшее накопление вируса ПГ-3 крупного рогатого скота происходит в культуре клеток ПТ-80 при заражающей дозе 0,1 ТЦД 50/мл в течение 2–4 суток после инфицирования клеточных культур.

Список литературы

1. Баева Е.В. Функции иммунной системы при стрессовых воздействиях в раннем постнатальном онтогенезе: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Ленинград, 1991, 34 с.
2. Белова Н.Б. Антигенные и протективные свойства ассоциированной инактивированной вакцины против ротавирусного, коронавирусного энтерита телят и вирусной диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – М., 2005, 34 с.
3. Девришов Д.А. и др. Испытание ассоциированных вакцин против вирусных и бактериальных болезней крупного рогатого скота // Вестник Российской Академии с.-х. наук. – М., 2011, № 2, 64 с.
4. Девришов Д.А. и др. Изучение иммуногенных свойств ассоциированных инактивированных вакцин // Вестник Российской Академии с.-х. наук. – М., 2011, № 3, 58 с.
5. Зеленев А.В. и др. Профилактика вирусных диарей новорожденных телят рота- и коронавирусной этиологии // Животновод для всех, 2002, № 9, 14–15 с.
6. Зелютков Ю.Г. Ассоциированная ротавирусная и коронавирусная инфекция, осложненная эшерихиозом у новорожденных телят (диагностика, профилактика, лечение): Автореф. дис. ... докт. вет. наук. – Минск, 2006, 32 с.
7. Карышева А.Ф. и др. Эпизоотология, меры профилактики и борьбы с острыми респираторными болезнями крупного рогатого скота. – Кишинёв, 1983, 100 с.
8. Красочко П.А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – М., 2008, 40 с.
9. Литвин В.П. и др. Инфекционные и инвазионные болезни телят. – Киев: Наукова Дума, 1991, 208 с.
10. Плященко С.И. и др. Стрессы у сельскохозяйственных животных. – М.: Агротромиздат, 1987, 192 с.
11. Самуйленко А.Я. и др. Инфекционная патология животных. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 1-2, 1717 с.

Контактная информация:
8 (495) 377 67 31 (служ.)

Таблица 2

Влияние дозы вируса и метода заражения культур клеток ПТ-80 и ЛЭК вирусом ПГ-3 КРС

Культура клеток	Метод заражения	Доза заражения ТЦД 50/кл	Время максимального накопления вируса, сутки	Титр вируса (lgТЦД 50/мл)
ПТ-80	В суспензию	0,1	2	5,5
		0,01	2	5,25
		0,001	3	5,0
	На монослой	0,1	3–4	5,25–5,5
		0,01	4	4,5–5,0
		0,001	5–6	4,0–4,25
ЛЭК	В суспензию	0,1	4	4,0
		0,01	7	3,5
		0,001	9	3,0
	На монослой	0,1	6–7	4,0
		0,01	9	3,25
		0,001	13–14	2,0–2,5

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА «АЛКОПЕРИТ» В ПРОМЫШЛЕННЫХ ПТИЦЕВОДЧЕСКИХ КОМПЛЕКСАХ

В статье приведены результаты изучения эффективности дезинфекции воздушной среды и технологических поверхностей производственного помещения птицеводческого комплекса при аэрозольном применении дезинфицирующего средства «АлкоПерит».

Ключевые слова: аэрозольное применение, воздушная среда, дезинфицирующие препараты, эффективное обеззараживание.

А.А. ZABOLOTSKAYA

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

EFFICIENCY OF A DISINFECTANT PREPARATION OF «ALKOPERIT» IN INDUSTRIAL POULTRY-FARMING COMPLEXES

In article results of studying of efficiency of disinfection of the air environment and technological surfaces of an industrial premise of a poultry-farming complex are resulted at aerosol application of a disinfectant of «AlkoPerit».

Key words: aerosol application, disinfectant preparations, air environment, effective disinfecting.

Важным условием эффективности промышленного птицеводства, несомненно, является надежная дезинфекция производственных помещений для содержания птицы. Наиболее значимым параметром эффективности проведенной дезинфекции является снижение микробной контаминации воздушной среды комплекса [1, 2].

Цель исследований. В задачу исследований входила оценка эффективности аэрозольного применения дезинфекционного средства «АлкоПерит» для санации воздушной среды производственного помещения птицеводческого комплекса.

Материалы и методы исследований. Исследуемым препаратом явилось дезинфицирующее средство «АлкоПерит». Вещество представляет собой бесцветную жидкость, включающую 6% перекиси водорода, 40% этилового спирта и комплекс добавок по рецептуре до 3%. Выпускается по ТУ 9392-001-72164173-2012 ООО «БИО Агат Групп» и ОАО «МЕДХИМПРОМ» СГР № RU.77.99.27.002.Е.011918.07.12 от 25.07.2012 г. и рекомендовано ФБУН НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора для обеззараживания воздуха в помещениях аэрозольным методом при инфекциях бактериальной этиологии; поверхностей и санитарно-технического оборудования аэрозольным методом, способами орошения и протирания при инфекциях бактериальной (включая туберкулез), вирусной и грибковой (кандидозы, дерматофитии) этиологии [3].

Аэрозолирование осуществлялось перед посадкой птицы, а также дважды в присутствии молодняка птицы на 7 и 23 дни содержания, с расходом 5,0 мл средства на 1 м³ помещения. Распыление препарата проводили в виде тонкодисперсного аэрозоля со среднегеометрическим размером частиц от 3 до 25 мкм, составляющих 95%. Содержание птицы в данном хозяйстве напольное, срок содержания — 36 дней. Общий объем помещения 1750 м³.

Равномерное распределение дезинфектанта в воздухе помещения достигалось с помощью принудитель-

ной вентиляции и путем распыления средства в 15 точках здания. Время обработки помещения при расходе 5 мл на м³ составило 15 мин. [5].

Контроль микробной обсемененности воздушной среды помещения осуществлялся ветеринарной лабораторией ЗАО «Моссельпром».

Оценку эффективности (определение микробной обсемененности воздуха до и после дезинфекции) проводили по стандартной методике (седиментационный метод) с последующим подсчетом по формуле Омелянского (на 100 см² поверхности агара за 5 мин. оседают бактерии из 10 л воздуха) перед началом работ по дезинфекции и после 15-минутной экспозиции по завершении дезинфекции [4].

Инкубацию посевов проводили при 37°C в течение 24 часов и учитывали наличие колониеобразующих единиц (КОЕ) в дальнейшем определяли видовую принадлежность микроорганизмов на основании изучения их биохимической активности. Рассчитывали среднее арифметическое и проводили перерасчет числа микроорганизмов на 1 см² поверхности с учетом площади отбора проб [2, 4].

Результаты и обсуждение. В ходе проведенного опыта и последующего наблюдения за состоянием молодняка птицы в течение 36 суток превышения процента падежа по сравнению с необработанным поголовьем не было. Отклонений от физиологических норм также не отмечалось. Результаты определения эффективности аэрозольной санации воздушной среды птичника представлены в таблице. Проведенные бактериологические исследования выявили значительное снижение микробной загрязненности воздуха птицеводческого комплекса в результате аэрозольного применения исследуемого перекисьсодержащего дезинфектанта. Эффективность препарата была достаточно высокой как при его использовании в помещении свободном от птицы (рис. А), так и при обработке в присутствии птицы (рис. Б).



А — обработка помещения перед посадкой цыплят-бройлеров



Б — обработка производственного помещения в присутствии птицы

Рис. Аэрозольная дезинфекция помещения птицеводческого комплекса

Таблица

Результаты контроля микробной обсемененности воздушной среды птичника после аэрозольной дезинфекции средством «АлкоПерит»

№ п/п	Дата контроля	Результат, колониеобразующие единицы (КОЕ) / м ³		Норматив общего микробного числа, КОЕ/м ³
		общее микробное число до обработки	общее микробное число после обработки	
1	04.05.2012	4800	2133	5000
2	15.05.2012	5200	2400	
3	29.05.2012	4133	2000	

Из приведенных данных следует, что общая микробная загрязненность воздушной среды птичника после аэрозольной дезинфекции снижалась более чем в два раза. Незначительное превышение нормативов микробной обсемененности перед проведением второй обработки производственного помещения объясняется тем, что отбор проб проводили сразу после заполнения производственного помещения поголовьем цыплят-бройлеров. Последующая обработка привела к значительному снижению обсемененности, в дальнейшем нормативы микробной обсемененности воздуха оставались в пределах нормы. При этом в результате наблюдений установлено, что сниженный уровень обсемененности сохранялся в течение 3 суток с последующим незначительным ростом.

Заключение. Проведенная аэрозольная обработка дезинфекционным средством «АлкоПерит» в производственном помещении птицеводческого комплекса в указанных режимах обеспечивает эффективную санацию воздушной среды и может применяться в ветеринарной практике.

При аэрозольной дезинфекции воздушной среды дезинфектантом «АлкоПерит» в присутствии молодняка птицы токсического действия на организм не отмечено.

Список литературы

1. Волков М.Ю., Заболоцкая Т.В., Заболоцкая А.А. Определение эффективности аэрозольного дезинфектанта «АлкоПерит» в производственных условиях // Ветеринарная медицина, 2011, № 3-4. – С. 34-36.
2. Заболоцкая Т.В., Тихонов И.В., Волков М.Ю., Заболоцкая А.А. Определение эффективности и токсических свойств перекисьсодержащего дезинфектанта при аэрозольном применении // Ветеринарная медицина, 2011, № 3-4. – С. 38-40.
3. Волков М.Ю., Заболоцкая А.А., Сысов А.А. Патогистологические изменения в легких мышей в результате экспериментальной аэрозольной обработки дезинфекционным средством «АлкоПерит» // Ветеринарная медицина, 2011, № 3. – С. 53-55.
4. Методические рекомендации по токсико-экологической оценке лекарственных средств, применяемых в ветеринарии, одобренных секцией отделения ветеринарной медицины РАСХН (1988).
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М., 2000.

*Контактная информация:
8 (495) 376 70 01 (служ.)*

М.Ю. ВОЛКОВ, А.А. ЗАБОЛОЦКАЯ

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»

А.А. СЫСОЕВ

ООО «Ветеринарная лаборатория «ВЕТТЕСТ», г. Москва

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА ТКАНЕЙ ЛЕГКИХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЭРОЗОЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ ДЕЗИНФЕКЦИОННЫМ СРЕДСТВОМ «АЛКОПЕРИТ»

В статье приведены результаты экспериментального исследования действия на легкие мышей дезинфицирующего средства «АлкоПерит» при аэрозольном применении.

Ключевые слова: аэрозольное применение, воздушная среда, дезинфицирующие препараты.

M.Yu. VOLKOV, A.A. ZABOLOTSKAYA

Moscow state academy of veterinary medicine
and biotechnology named K.I. Skryabin

A.A. SYSOEV

Veterinary laboratory «VETTEST», Moscow

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE LUNGS OF MICE IN THE EXPERIMENTAL TREATMENT OF AEROSOL DISINFECTANT «ALKOPERIT»

The paper presents the results of an experimental study of the effect of disinfectant «AlkoPerit» with aerosol administration to the lungs of mice.

Key words: aerosol application, air environment, disinfectant preparations.

Применение дезинфицирующих средств в сельскохозяйственных помещениях неизбежно ведет к воздействию препарата не только непосредственно на микроорганизмы, но и на организм животных, содержащихся в обрабатываемых помещениях. Поэтому одним из основных свойств разрабатываемого дезинфицирующего средства является безопасность для животных и человека, потребляющего сельскохозяйственную продукцию.

Целью настоящих исследований являлось определение степени влияния дезинфицирующего средства «АлкоПерит» на организм животных (беспородные белые мыши).

Материалы и методы. Аэрозольную обработку животных (белые мыши) проводили на кафедре биотехнологии МГАВМиБ, где создан стенд оценки аэрозольной дезинфекционной обработки и контроля, состоящий из герметичного шкафа с переменным объемом от 0,1 до 0,3 м³, с вентилируемым отсеком для дыхания животных (имитация искусственного содержания животных) и клапаном сброса давления, регулируемой распыливающей головкой для создания аэрозоля пневматическим приводом (компрессор сжатого воздуха), системой отбора аспирационного воздуха, регулируемой в зависимости от применяемых лабораторных животных, освещением и устройствами содержания животных.

Подопытные животные (белые мыши массой 20 г) находились в кювете в камере распыла в течение 10 минут.

Материалом для исследования служили ткани легких мышей, взятых у животных через 10 минут после аэрозольной обработки дезинфицирующим препаратом и через трое суток после обработки. В качестве контроля отбирали и исследовали легкие животных, не подвергавшихся обработке исследуемым препаратом.

Отбор проб от животных осуществляли непосредственно после убоя путем дислокации шейных позвонков. Фиксацию материала проводили в 10%-ном растворе формалина. Обработку материала и изготовление микросрезов осуществляли по стандартной методике. Окрашивание срезов проводили гематоксилином.

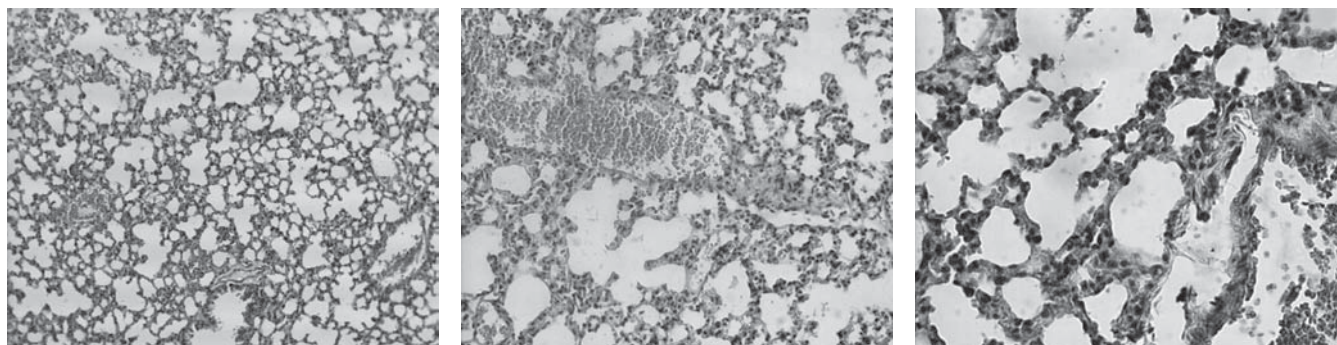
Гистологические исследования образцов тканей легких и анализ результатов проводили в лаборатории ВЕТТЕСТ. Исследования представленных образцов проведены по стандартной методике.

Результаты исследований. В гистологических препаратах легкого первого образца (контроль) легкие умеренно кровенаполнены, нормальная структура сохранена. Легочная плевро без видимых изменений (рис. 1).

В гистологических препаратах второго образца легкие с умеренным кровенаполнением. Наблюдается утолщение межальвеолярных перегородок, незначительные участки ателектаза, а также очаговые скопления мононуклеарных клеток (рис. 2).

В гистологических препаратах третьего образца легкие с умеренным кровенаполнением, на небольших участках наблюдается незначительное утолщение межальвеолярных перегородок и легкая инфильтрация мононуклеарными клетками воспаления (рис. 3).

Заключение. В результате непосредственной аэрозольной обработки мышей дезинфицирующим средством «АлкоПерит» необратимого негативного действия на организм животных не выявлено. Через 10 минут после воздействия отмечается многоочаговое интерстициальное мононуклеарное воспаление легкой степени, незначительная гиперемия легких. На 3-и сутки в ткани легких лабораторных животных патологических изменений не выявлено.

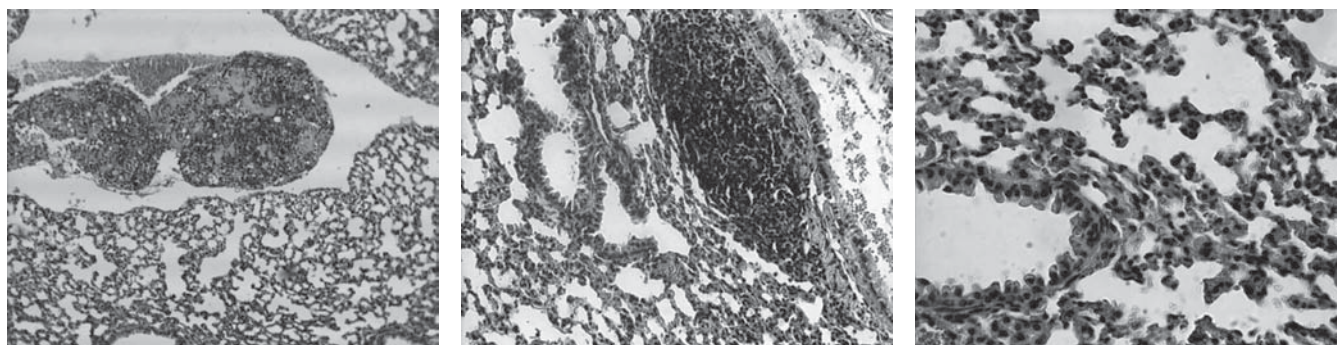


ув. ок. ×10, об. 4

ув. ок. ×10, об.10

ув. ок. ×10, об. 20

Рис. 1. Срез ткани легкого мыши, не подвергавшейся аэрозольной обработке дезинфицирующим препаратом (контроль)

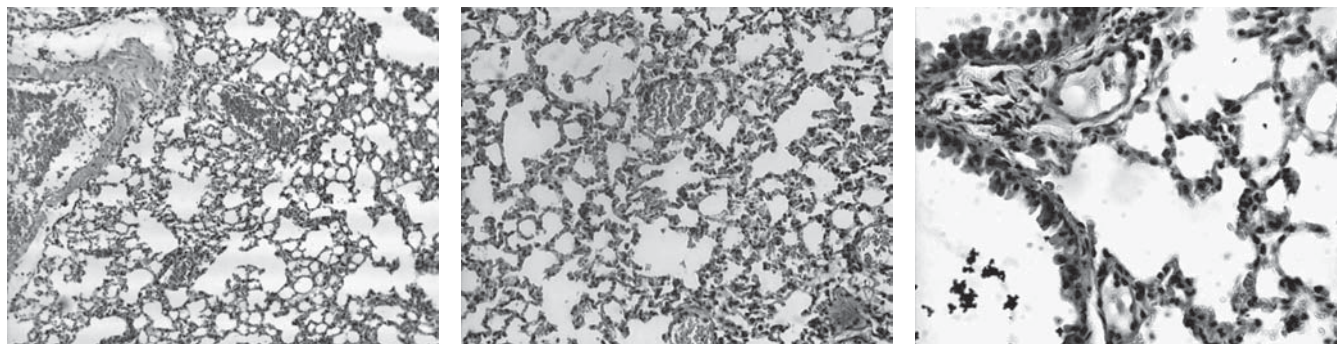


ув. ок. ×10, об. 4

ув. ок. ×10, об. 10

ув. ок. ×10, об. 20

Рис. 2. Срез ткани легкого мыши через 10 минут после обработки дезинфицирующим средством



ув. ок. ×10, об. 4

ув. ок. ×10, об. 10

ув. ок. ×10, об.20

Рис. 3. Срез ткани легкого мыши через 3 суток после обработки дезинфицирующим средством

Таким образом, аэрозольное применение перекисьсодержащего дезинфицирующего средства «АлкоПерит» вызывает незначительное раздражающее действие на ткани легких. На 3-и сутки ткани полностью восстанавливаются.

Список литературы

1. Волков М.Ю., Заболоцкая Т.В., Заболоцкая А.А. Определение эффективности аэрозольного дезинфектанта «АлкоПерит» в производственных условиях // Ветеринарная медицина. – М., 2011, № 3-4. – С. 34-36.
2. Заболоцкая Т.В., Тихонов И.В., Волков М.Ю., Заболоцкая А.А. Определение эффективности и токсических свойств

перекисьсодержащего дезинфектанта при аэрозольном применении // Ветеринарная медицина. – М., 2011, № 3-4. – С. 38-40.

3. Методические рекомендации по токсико-экологической оценке лекарственных средств, применяемых в ветеринарии, одобренных секцией отделения ветеринарной медицины РАСХН (1988).

4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М., 2000.

Контактная информация:
8 (916) 235 64 83

БЕЛКОВЫЙ СПЕКТР КРОВИ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЙОДА-131 В ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

Дефицит тиреоидных гормонов, вызванный инкорпорацией йода-131 in utero, приводит в отдаленные сроки к изменению белкового спектра. По мере нарастания тяжести клинических проявлений гипотиреоза усиливаются явления диспротеинемии, гипоальбуминемии.

Ключевые слова: йод-131, гипотиреоз, диспротеинемия, гипоальбуминемия.

E.N. ELAEV, Ts.Ts. SODBOEV, V.E. BRYLINA, T.G. KILASONIYA
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

ALBUMINOUS RANGE OF BLOOD OF THE RATS WHO HAVE UNDERGONE INFLUENCE OF IODINE-131 IN THE EMBRYONIC DEVELOPMENT PERIOD

The deficiency of tireoidny hormones caused by incorporation of in utero iodine-131, brings into the remote terms to change of an albuminous range. In process of increase of weight of clinical manifestations of a hypothyroidism the phenomena of a disproteiniya, a gipoalbuminiya amplify.

Key words: iodine-131, hypothyroidism, disproteiniya, gipoalbuminiya.

Радионуклиды йода при поступлении в организм беременных животных надолго задерживаются в нем и способны переходить через плаценту к плоду. Установлено, что накопление радиоактивного йода в плоде начинается с функционирования щитовидной железы [2]. Дефект, который возникает в результате эмбрионального облучения, может стать причиной физиологической несостоятельности организма в постнатальный период развития. Нарушение функций щитовидной железы отрицательно сказывается на росте и развитии организма животных [1]. Дефицит тиреоидных гормонов приводит к нарушению метаболизма белка. Расстройство белкового обмена может привести к нарушению механизмов регуляции функций иммунной системы, являющейся его составной частью, и последующему развитию иммунодефицитного состояния организма животного [3].

Целью работы являлось изучение характера изменений белковых показателей крови крыс, подвергшихся воздействию йода-131 в эмбриональный период развития в отдаленные сроки.

Материалы и методы. Работа была выполнена на кафедре радиобиологии, рентгенологии и гражданской обороны имени академика А.Д. Белова, на кафедре иммунологии ФГБОУ ВПО МГАВМиБ имени К.И.Скрябина и в лаборатории ветеринарной клиники «ЛЕБЕДИ». Объект исследования — самцы беспородных крыс в возрасте 7 месяцев (период максимальной активности). В опытной группе были крысы, подвергшиеся воздействию йода-131 in utero. Поглощенная доза на щитовидную железу беременной самки крысы составила ~60 Гр. Контрольная группа не подвергалась облучению. Животные содержались в условиях специализированного вивария кафедры радиобиологии, рентгенологии и гражданской обороны имени академика А.Д. Белова на полноценном сбалансированном рационе в пластиковых клетках по 4–5 голов, доступ к воде был свободен. Исследования проводились с учетом всех рекомендаций Европейской конвенции по вопросам этики по защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и научных целей (1993). Выводили животных из эксперимента декапитацией после эфирного наркоза. Общий

белок сыворотки крови определяли на биохимическом анализаторе «IDEXXVETTEST 8008» (США) в лаборатории ветеринарной клиники «ЛЕБЕДИ» (рис.).

Выражаем благодарность генеральному директору ветеринарной клиники «ЛЕБЕДИ» Сергею Ивановичу Лебедько за своевременную и качественную помощь.

Исследование фракционного состава сыворотки крови проводили на кафедре иммунологии в соответствии с инструкцией «Диагностический набор для электрофоретического разделения белков сыворотки на агарозе» P.Z. CORMAY (Люблин, Польша), лицензированный в России. Данные подвергались статистической обработке с вычислением среднего значения изучаемого признака по группе и ошибки среднего ($M \pm m$). Достоверность различий сравниваемых параметров рассчитывали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считались значимыми при $p \leq 0,05$. Математический расчет выполнялся с помощью статистической программы «Microsoft Excel».



Рис. Определение общего белка крови на биохимическом анализаторе «IDEXXVETTEST 8008» (США)

Результаты исследования. Известно, что основное значение в регуляции уровня белка в организме животных играет печень. Белки сыворотки крови синтезируются преимущественно в цитоплазме гепатоцита. Результаты содержания общего белка у крыс контрольной и опытной групп отличаются большой стабильностью и имеют очень незначительные колебания ($27,2 \pm 0,4$ г/л и $27,6 \pm 0,5$ г/л соответственно). Таким образом, определение количества общего белка выявило, что нарушений белоксинтезирующей функции печени на уровне клетки нет, и высокая протеиновая продуктивность печени обеспечивает постоянство концентрации белка в крови крыс обеих групп.

Электрофорез белков сыворотки крови в настоящее время является одним из наиболее информативных тестов, позволяющих определить качественный и количественный состав белка сыворотки крови. Изменения белковых фракций крови дают оценку состояния защитных сил организма, причем согласно мнению некоторых авторов (Д.Л. Сигалов и др.), они важнее гематологических показателей количества лейкоцитов, лейкоцитарной формулы белков крови, СОЭ и др. При электрофоретическом разделении белков на отдельные фракции (табл.) у крыс опытной группы мы наблюдали диспротеинемия, её проявлением была гипоальбуминемия — концентрация альбумина составила $46,1 \pm 0,6\%$, что достоверно ниже ($p \leq 0,05$) определяемого значения у крыс контрольной группы — $49,0 \pm 1,1\%$. Снижение уровня альбумина, который легко поддается обратимым конформационным изменениям вследствие сильно выраженного аффинитета к ионами молекулам, затрудняет в организме крыс опытной группы выполнение транспортной функции. В этой электрофоретической зоне находится белок, связывающий тироксин, нарушение обмена этого гормона щитовидной железы были ранее нами описаны.

Таблица

Концентрации белковых фракций сыворотки крови крыс

Белковые фракции, %	Контроль	Опыт
Альбумин	$49,0 \pm 1,1$	$46,1 \pm 0,6^*$
Альфа ₁ -глобулин	$16,0 \pm 0,6$	$19,6 \pm 1,0^*$
Альфа ₂ -глобулин	$5,2 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,3^*$
Бета-глобулин	$14,1 \pm 0,5$	$14,0 \pm 0,5$
Гамма-глобулин	$16,0 \pm 1,5$	$14,1 \pm 1,0$

* При сравнении результатов в опытной и контрольной группах $p \leq 0,05$

Организм животных экспериментальной группы компенсирует потерю альбумина достоверным повышением ($p \leq 0,05$) концентрации белковых фракций альфа₁- и альфа₂-глобулинов соответственно на 22,5% и 23,0% относительно значений контрольной группы. Согласно данным литературы, альфа₁- и альфа₂-глобулины синтезируются быстрее альбуминов, и их увеличение является отражением экссудативного характера воспалительной реакции организма. Так, при вскрытии у 60% животных опытной группы в грудной полости отмечали патологические изменения: легкие были гиперемированы, при разрезе и надавливании на легкие появлялась жидкость, а в носовой полости и трахее наблюдали значительное количество вязкой жидкости. Полученные данные патолого-анатомического исследования дают основание предполагать, что у животных, подвергшихся воздействию йода-131 в период эмбрионально-

го развития, наблюдалась воспалительная реакция в органах дыхания. Хотя при осмотре животные внешне выглядели здоровыми и их поведенческие реакции не отличались от таковых контрольных крыс.

Уровень гамма-глобулинов в сыворотке крови контрольной группы составил $16,0 \pm 1,5\%$, а в опытной — $14,1 \pm 1,0\%$, т.е. мы наблюдаем у крыс, облученных йодом-131, снижение функции гуморального звена системы иммунитета, ответственного за продукцию иммуноглобулинов. В этом случае становится понятным высокая степень подверженности животных опытной группы заболеваниям органов дыхания.

При изучении белковых спектров сыворотки крови крыс обеих групп обращает на себя внимание стабильность значений бета-глобулиновой фракции, свидетельствующая об отсутствии дегенеративных изменений в печени.

Уменьшение концентрации альбуминов и увеличение альфа₁- и альфа₂-глобулинов в сыворотке крови опытной группы приводит к незначительному снижению альбумино-глобулинового коэффициента — 0,86% (в контрольной группе 0,93%). Согласно многочисленным научным сообщениям дисбаланс концентраций в системе альбумины/глобулины в сыворотке крови служит признаком нарушения обмена белка в организме животных.

Заключение. Ранее нами [4] было установлено, что инкорпорация йода-131 в щитовидную железу развивающегося плода приводит в отдаленные периоды развития (через 7 мес. после рождения) к снижению гормонообразовательной функции, т.е. гипотиреозу. Развитие гипоальбуминемии у крыс опытной группы связано с повышением проницаемости капилляров, которая приводит к накоплению альбумина вне кровеносных сосудов, и, как следствие, в крови животных регистрируются потери сывороточного альбумина. Проведенные исследования показали, что в отдаленный период в организме животных, облученных йодом-131 *in utero*, функциональный резерв печени обеспечивает постоянство концентрации общего белка в сыворотке крови. Дефицит тиреоидных гормонов в организме крыс, вызванный инкорпорацией йода-131 в ранние периоды онтогенеза, приводит со временем к изменению белкового спектра — снижению уровня альбуминов и повышению глобулиновых фракций (альфа₁- и альфа₂-глобулины). Выявленная нами диспротеинемия может быть расценена как начальная фаза нарушения белкового обмена. Таким образом, по мере нарастания тяжести клинических проявлений гипотиреоза у крыс, облученных йодом-131 *in utero*, увеличиваются явления диспротеинемии, гипоальбуминемии снижается активность функционирования иммунной системы, что может способствовать повышению восприимчивости животных к инфекциям.

Список литературы

1. Дедов В.И., Дедов И.И., Степаненко В.Ф. Радиационная эндокринология. — М.: Медицина, 1993, 208 с.
2. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия ионизирующих излучений. — М.: Медицина, 1991, 464 с.
3. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. — М.: Мир, 1989, 656 с.
4. Сдобоев Ц.Ц. и др. Функциональная активность щитовидной железы крыс, облученных внутриутробно йодом-131 // Ветеринарная медицина. — М., 2007, № 1. — С. 21.

Контактная информация:
ceden@mail.ru

ЛЕЧЕНИЕ ПАТОЛОГИИ СУСТАВОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ЖИВОТНЫХ КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ

В статье приведены данные об использовании ММСК в лечении суставной патологии в особенности ОА у домашних и лабораторных животных. Дана характеристика стволовых клеток используемых в биомедицине, этиологии и патогенезе ОА и перспективы применения ММСК у животных страдающих остеоартрозом.

Ключевые слова: ММСК, суставная патология, остеоартроз, хондроцит.

HANIEH SATTARI FARD, D.A. DEVRISHOV
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY OF JOINTS DISEASES IN ANIMALS AS A MODEL

This article about is the prospects of MSC usage in treatment of articular pathologies, particularly OA in domestic and laboratory animals. The characteristic of stem cells used in biomedicine, the etiology and pathogenesis of OA and perspectives of ITCs in animals suffering from osteoarthritis.

Key words: MSC, pathological diseases, osteoarthritis, chondrocyte.

Одной из распространенных патологий суставов является остеоартроз (ОА). ОА традиционно определяется как «хроническое прогрессирующее невоспалительное заболевание суставов неизвестной этиологии, характеризующееся дегенерацией суставного хряща и структурными изменениями субхондральной кости, а также явно или скрыто протекающим умеренно выраженным синовитом». Данное определение противопоставляет остеоартроз «воспалительным» артропатиям, таким как ревматоидный артрит или анкилозирующий спондилит [12, 6]. При ОА в процесс вовлекаются все структуры сустава, включая хрящ, синовию и подлежащую кость. ОА является «хронической недостаточностью сустава», при которой различные провоцирующие факторы приводят к однотипным структурным изменениям. Клетки каждой из перечисленных тканей имеют независимые возможности для инициирования и поддержания ответа на повреждение, приводящее к разрушению хряща.

ОА характеризуется двумя последовательными фазами:

1. Биосинтетическая стадия — хондроцит пытается восстановить поврежденный внеклеточный матрикс.

2. Стадия дегенерации — матрикс разрушается ферментами, продуцируемыми хондроцитами, ингибируется синтез матрикса, и в конечном итоге возникает эрозия хряща [7, 19].

В нормальном хряще взрослого организма компоненты матрикса синтезируются хондроцитами с невысокой скоростью. Существует строгая регуляция скорости обновления матрикса — тонкий баланс между синтезом и разрушением. При ОА баланс нарушается, причем усиливается как синтез, так и распад матрикса, однако преобладают катаболические процессы [13, 7].

В исследованиях показано, что хондроциты при ОА обладают очень низкой пролиферативной активностью в отличие от нормальных хондроцитов, которые такой активностью практически не обладают. Предполагалось, что центральную роль в патологии хряща играет гибель хондроцитов за счет увеличения апоптоза этих

клеток. Однако в последних работах показано, что хотя относительная частота апоптотической гибели хондроцитов при ОА повышена по сравнению со здоровым хрящом, абсолютное число клеток, претерпевающих апоптоз, очень невелико и составляет около 0,1% от общей популяции хондроцитов. Вряд ли апоптоз в таких масштабах оказывает существенное влияние на патологию хряща. Погибшие клетки не могут быть эффективно удалены из хряща, и продукты распада клеток могут активировать процесс дальнейшего разрушения матрикса [12, 16, 15, 5].

Несмотря на большое количество исследований, до настоящего времени не существует целостного представления о патогенезе остеоартроза в связи с достаточно сложной комбинацией как дистрофических, как и инволютивных изменений, происходящих в хряще и субхондральной кости.

Развитие заболевания на современном этапе все чаще связывают с нарушениями в системе иммунитета [6].

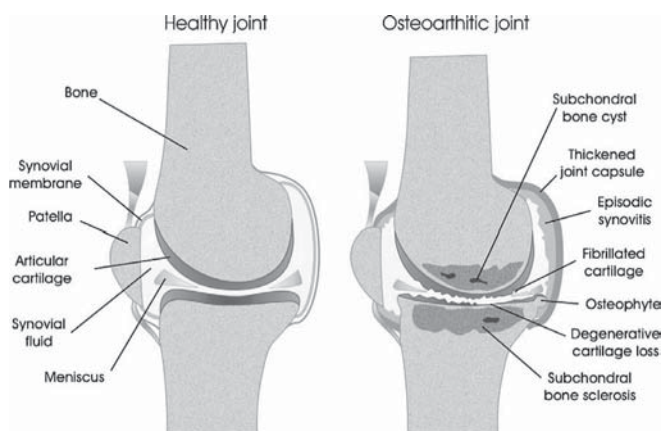


Рис. 1. Сравнение сечения здорового (слева) и ОА суставов (справа) (Gerwin N. et al., 2006)

Использование животных в качестве модели (овца, крыса, мышь, собака, морская свинка, кролик и лошадь) при изучении ОА, несмотря на то, что имеет свои недостатки, помогает понять детали патологического процесса, происходящего при ОА у человека. Исследования *in vitro* не могут выявить специфические молекулярные и клеточные изменения, происходящие при деградации хряща. В связи с этим животная модель широко использовалась при изучении ОА [18, 17, 21, 19].

Стволовые клетки и клеточная терапия в последние годы стали одной из самых популярных тем. Перспективы клеточной терапии для лечения множества заболеваний привлекают внимание исследователей и практикующих врачей во всем мире. Стволовым клеткам отводится роль инструмента, с помощью которого можно восстановить поврежденные ткани и скорректировать нарушения функций многих органов [4]. В качестве источника стволовых клеток могут выступать многие ткани организма: от костного мозга до пульпы зуба и волосяного фолликула, а технологии терапевтического клонирования, индуцирования плюрипотентности или трансдифференцировки клеток предполагают возможность получения стволовых клеток из уже специализированных. Процедуры получения и применения стволовых клеток достаточно дорогостоящие, но все же главным ограничением внедрения новейших методов клеточной терапии является их безопасность, включающая в себя в первую очередь медицинский аспект, а также этическую и юридическую составляющие [2, 4].

К настоящему моменту выделены следующие типы стволовых клеток взрослого организма: гемопоэтические, мышечные, нервная ткань, кожа, эндотелий, кишечник, миокард и мезенхимные стволовые клетки (МСК) [10].

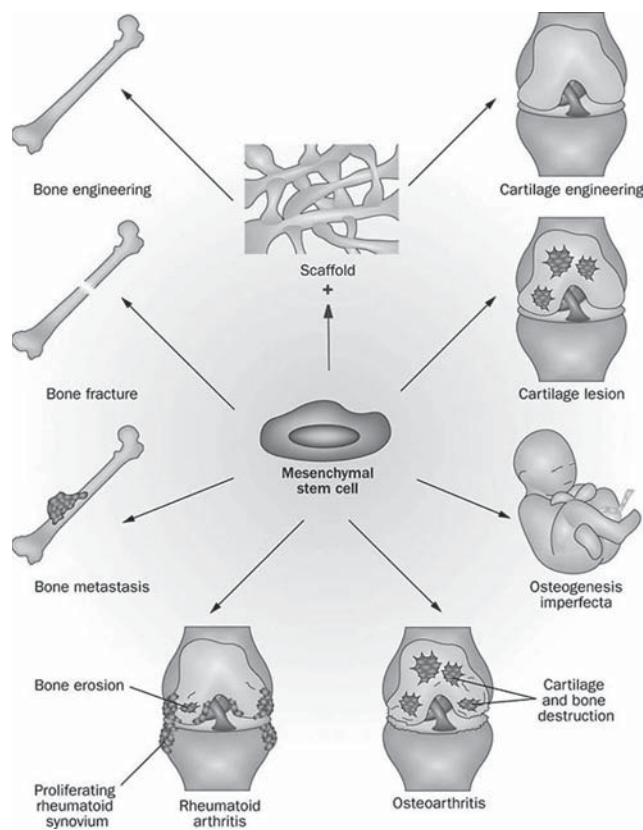


Рис. 2. Основные терапевтические применения ММСК для лечения ревматических и аутоиммунных заболеваний (Djouad F. et al., 2009)

Мезенхимные стволовые клетки — резиденты строма костного мозга, присутствующие в нем в небольшом количестве (1 на 10^4 – 10^5 клеток). Они обладают всеми свойствами мультипотентных стволовых клеток — способностью к самоподдержанию и дифференцировке в нескольких направлениях. МСК взрослого организма обнаружены и выделены не только из КМ, но и из жировой и мышечной тканей, кожи и головного мозга. Основным источником МСК в настоящее время считается красный костный мозг. Дифференцировочный потенциал МСК экспериментально активно исследовался в последние 10 лет. Показано, что эти клетки могут дифференцироваться *in vitro* в направлении остеоцитов, адипоцитов, хондроцитов, миоцитов, фиброцитов, гепатоцитов, клеток стромы КМ, кардиомиоцитов, эндотелиоцитов и эпителия [4, 9].

Дифференцировочный потенциал МСК, их паракринные свойства позволили многим исследователям рассматривать эти клетки как очень перспективный материал для клеточной терапии различных заболеваний. Более того, возможность использования аутологичного материала многократно увеличила интерес к МСК, как к агентам клеточной терапии. МСК применяют для экспериментального восстановления костной, хрящевой и мышечной тканей, связок, покровов и миокарда. В современных исследованиях используют различные подходы к применению МСК. При восстановлении костной, хрящевой тканей и связок используют матрицы, позволяющие восстанавливать трехмерную структуру, смоченные или засеянные МСК. Схожие технологии применяются и при пластике хрящевой ткани и связок взрослого организма. В качестве матриц используют коллагеновые пленки, аллогенный донорский материал, фибриновые планки, полимер лактогликолиевой кислоты и шелк [14, 8].

Инъекция клеточной суспензии МСК в область хирургического повреждения хряща приводит к формированию хрящевой ткани *de novo*. При инъекции МСК в межпозвоночный диск увеличивалась продукция компонентов межклеточного вещества хряща, а клетки дифференцировались в хондроциты. На основании имеющихся данных можно предположить, что стволовые клетки взрослого организма могут являться агентами клеточной терапии повреждений и заболеваний тех органов и тканей, откуда они выделены [4, 3].

Есть несколько примеров использования стволовых клеток для восстановления суставного хряща животных. Имеются также сведения об использовании этих клеток для восстановления сегментарных дефектов в длинных костях [15].

Исследования на козах показывают, что введение ММСК в сустав, пораженный ОА, оказывает лечебный эффект и препятствует апоптозу хондроцитов [16].

Возможность применения многофункциональных мезенхимальных прогенерирующих клеток для восстановления хрящевой ткани является в последние годы предметом активного изучения. Многие медицинские умы занимает проблема создания дифференцированного роста клеток, трансформации мезенхимальных стволовых клеток в устойчивые хондроциты [20].

Несмотря на большое количество публикации и еще большее научно-клинических попыток, метод находится фактически на стадии эксперимента. До тех пор пока не будут решены очень многие проблемы этого обнадешивающего метода лечения, в особенности проблема дифференциации клеток, в широкую клиническую практику он не будет внедрен [1, 5].

Список литературы

1. Аурих М., Глуз А. Современные направления в лечении повреждений хряща голеностопного сустава // Украинський журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можаєва, 2008, № 4(9). – С. 1-8.
2. Кирик М.В., Бутенко Г.М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине // АМН України, 2010, № 4(16). – С. 576-604.
3. Яргин С.В. Стволовые клетки и клеточная терапия: на пути к доказательной медицине // Наукові дискусії, 2010, №(6). – С. 1-3.
4. Кругляков П.В., Соколова Д.Г., Полицев Д.Г. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма // Цитология, 2008, 7(50). – С. 557-567.
5. Яргин С.В. Стволовые клетки и клеточная терапия: на подступах к научному подходу // Цитология, 2010, 11(52). – С. 918-920.
6. Сазонова Н.В., Чепелева М.В., Волокитина Е.А. и др. Идиопатический остеоартроз коленного сустава I-II стадии: иммунологические аспекты // Травматология и ортопедия России, 2008, 3(49). – С. 11-14.
7. Синяченко О.В., Добровинская Е.В., Науменко Н.В. Гендерные особенности остеодифицита у больных остеоартрозом // УРЖурнал, 2010, 1(39) – С. 31-37.
8. Ким И.И. Выделение и культивирование хондроцитов, полученных из различных источников // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2006, 4(6). – С. 48-51.
9. Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р. и др. Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоаспирата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода // Цитология, 2009, 51(1). – С. 6-11.
10. Михайлов В.М., Евтифеева Е.В., Сериков В.Б. и др. Участие стволовых клеток костного мозга в дифференцировке

поперечно-полосатых мышц мышей mdx // Цитология, 2006, 48(5) – С. 410-416.

11. Gerwin N., Hops C., Lucke A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis // Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, 58. – P. 226-242.

12. Blanco F.J., Guitan R., Vazquez-Martel E. et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology // Arthritis Rheum, 1998, No 41. – P. 284-289.

13. Ziagang G.E., Yang H.U., Heng B.C. et al. Osteoarthritis and therapy // Arthritis & Rheumatism, 2006, 3(55). – P. 493-500.

14. Wei N., Beard Sh., Delauter Sh. et al. Guided mesenchymal stem cell layering technique for treatment of osteoarthritis of the knee // The Journal of Applied Research, 2011, 1(11). – P. 44-48.

15. Murphy J.M., Fink D.J., Hunziker E.B. et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis // Arthritis & Rheumatism, 2003, 48(12). – P. 3464-3474.

16. Djouad F., Bouffi C., Ghannam S. et al. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases // Nature Reviews rheumatology, 2009, (5). – P. 392-399.

17. Pritzker P.H. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects // Annals of the Rheumatic Diseases, 1994, (53). – P. 406-420.

18. Little C.B., Smith M.M. Animals models of osteoarthritis // Current Rheumatology Reviews, 2008, 3(4). – P. 1-7.

19. Mastbergen S.C., Lafeber F.P. Animals models of osteoarthritis-why choose a larger model? // Osteoarthritis, 2009. – P. 11-14.

20. Lee K.B., Hui J.H., Song I.C. et al. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects – a porcine model // Minimal Invasive Mesenchymal Stem Cell Delivery, 2007, (25). – P. 2964-2971.

21. Bendele A.M. Animals models of osteoarthritis // J. Musculoskel Neutron Interact., 2001, 1(4). – P. 363-376.

Контактная информация:
8(495)377-69-83 (служ.)

УДК 619:616.98:578

В.И. БУТОРИН, Е.И. ЯРЫГИНА

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

РАЗРАБОТКА НОВОГО ЭКОНОМИЧНОГО МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОАКТИВНОГО И СПЕЦИФИЧНОГО АНТИВИДОВОГО ИММУНОПЕРОКСИДАЗНОГО КОНЬЮГАТА

Разработан новый метод выделения иммуноглобулиновой фракции из сыворотки крови, который позволил исключить дополнительные методы очистки и концентрирования. Благодаря сокращению этапов очистки и концентрирования новый метод отличается экономичностью и скоростью получения антивидового конъюгата.

Ключевые слова: конъюгат, методы очистки и концентрирования антител, сыворотка крови.

V.I. BUTORIN, E.I. YARYGINA

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

DEVELOPMENT OF NEW COST-EFFECTIVE METHOD FOR OBTAINING HIGHLY ACTIVE AND SPECIFIC IMMUNOPEROXIDASE ANTISPECIFIC CONHUGATE

Developed a new method of isolating immunoglobulin fraction of serum, which allowed to exclude additional methods of purification and concentration. By reducing purification and concentration stages, the new method differs efficiency and speed of obtaining antispecific conyugate.

Key words: conyugate, antibodies purification and concentration methods, blood serum.

Респираторные заболевания крупного рогатого скота (КРС) ежегодно наносят серьезный экономический ущерб животноводческим хозяйствам. Большую опасность представляют: вирус парагриппа-3 (ПГ-3), вирус инфекционного ринотрахеита (ИРТ) и вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (ВД-БС) [1].

Для создания тест-системы иммуноферментного анализа возникла необходимость разработки антивидового иммунопероксидазного конъюгата (анти-IgG). На сегодняшний день известно несколько способов получения конъюгатов, отличающихся способами очистки антител [2, 3].

Известные методики получения анти-IgG КРС имеют ряд недостатков. Так, после очистки исходного препарата антител требуется проводить концентрирование [2, 4]. Оценка титра в реакции диффузионной преципитации (РДП) не позволяет оценить специфичность, так как сыворотки могут отличаться высокой преципитирующей активностью, но обладать низкой специфичностью в ИФА.

Целью данной работы является разработка метода получения конъюгата анти-IgG КРС для использования в ИФА, отличающегося большей активностью и специфичностью, а также низкой себестоимостью.

Материалы и методы. В работе использованы сыворотки КРС, сыворотки кролика, содержащие анти-IgG КРС, полученные в результате гипериммунизации кроликов. Очистка IgG проводилась двумя способами.

Первый способ включает двукратное переосаждение полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 Д (ПЭГ-6000) и центрифугирование при 14000 г. С целью повышения чистоты препарата IgG ввели стадию доочистки с помощью гель-хроматографии.

Второй способ заключается в пятикратном переосаждении ПЭГ-6000 и центрифугировании при 14000 г без последующей очистки на колонке.

С целью получения анти-IgG КРС проводили гипериммунизацию кроликов общепринятым методом. Для выделения анти-IgG КРС использовали метод аффинной хроматографии на колонках 26×40. Специфические сорбенты получали ковалентной иммобилизацией IgG КРС на активированной BrCN — сефарозе 4В. Оценку титра кроличьих анти-IgG КРС проводили в РДП и ИФА с IgG КРС.

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы проводили выделение и очистку IgG из сыворотки КРС.

По первому способу иммуноглобулиновую фракцию выделяли путем переосаждения ПЭГ-6000 в концентрации 3,5% (вес/объем). Затем центрифугировали при 14000 г в течение 15 мин. После центрифугирования определяли условия доочистки фракции, обогащенной IgG, на колонках типа К 26/100, для чего глобулиновую фракцию наносили на подготовленную и откалиброванную колонку, заполненную сефадексом G-200. Согласно полученному графику, первому пику соответствует выход примесных белков, а второму — чистая фракция IgG (рис.).

Фракции полученных белков объединяли (объем каждой фракции составлял 3–4 см³). Собранную с колонки фракцию IgG концентрировали стерилизующей ультра-

трафильтрацией до концентрации 6 мг/см³ на мембране УАМ-150 с диаметром пор 0,22 мкм.

По второму способу иммуноглобулиновую фракцию выделяли путем переосаждения ПЭГ-6000 в концентрации 3,5% (вес/объем). Затем супернатант подвергали пятикратному переосаждению ПЭГ-6000 с концентрацией 12%. Полученную фракцию подвергали центрифугированию при 14000 г в течение 10–15 мин. Преципитирующую активность препаратов IgG определяли в РДП по методу Оухтерлони [4]. Оказалось, что по чистоте и специфичности препарат IgG, полученный путем пятикратного переосаждения ПЭГ и центрифугирования при 14000 г, не отличается от препаратов, полученных с использованием метода доочистки на колонке G-200 (см. табл. 1).

Таблица 1

Молекулярные массы белков в пробах 5-кратного переосаждения IgG ПЭГ-6000 и фракция чистого белка с колонки

Маркер, мол. м. (кД)	Молекулярная масса белка в пробах IgG	
	5-кратный переосажденный IgG ПЭГ-6000	Чистый препарат IgG с колонки
205	160	160
116	151	151
97	142	142
66		

Специфичность чистых препаратов IgG определяли в иммуноэлектрофорезе в 1%-ном агаре Дифко на веронал-мединаловом буфере с pH 8,6. Специфичность подтверждена наличием одной дуги преципитации.

На втором этапе работы с целью получения анти-IgG КРС полученный препарат IgG КРС использовали в качестве антигена для гипериммунизации кроликов. Для выделения кроличьих анти-IgG КРС применили метод аффинной хроматографии. В качестве специфических сорбентов использовали иммобилизованные на активированной BrCN — сефарозе 4В IgG КРС. Общий выход антител колебался в пределах 10–20 мг. Концентрировали полученные антитела ультрафильтрацией на УАМ-150 до 5 мг/см³.

Специфичность и активность кроличьих гипериммунных сывороток к IgG КРС проверяли в РДП и ИФА. Для получения высокого титра анти-IgG КРС оказалось достаточно одной ревакцинации, тогда как при очистке IgG КРС классическими методами требуется две и более ревакцинаций.

На третьем этапе конъюгировали аффинноочищенные анти-IgG КРС с пероксидазой хрена периодатным методом. Для осуществления конъюгации требовался высокоочищенный фермент с показателем чистоты (RZ) не менее 2,8. Количество гипериммунной сыворотки, необходимой для конъюгации определяли на основе данных, полученных в результате определения активности кроличьих анти-IgG в серологических реакциях (РДП, ИФА).

Для сравнения эффективности методов выделения IgG из сыворотки КРС с целью получения конъюгата, приготовили три образца антивидовых иммунопероксидазных конъюгатов. Антитела из сыворотки КРС для первого образца выделяли первым методом (2-кратное переосаждение ПЭГ-6000, центрифугирование и доочистка на колонке), кроличьи анти-IgG титровали в РДП. Антитела для второго образца выделяли аналогично, кроличьи анти-IgG

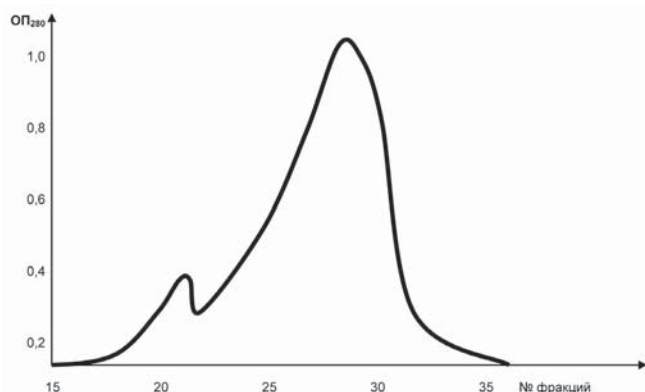


Рис. Хроматограмма очистки иммуноглобулинов класса G на колонке с сефадексом G-200

Таблица 2

Активность конъюгатов в непрямом ИФА

Образец конъюгата анти-IgG КРС	Активность конъюгата		Затрачено анти-IgG на одну процедуру конъюгирования, мл
	рабочее разведение	оптическая плотность, о.е.	
№ 1	1:3000	не менее 0,8	60,0
№ 2	1:3000	не менее 1,0	30,0
№ 3 (предлагаемый метод)	1:8000	не менее 1,5	7,5

титровали в ИФА. Антитела для третьего образца выделяли вторым методом (5-кратное переосаждение ПЭГ-6000, центрифугирование), анти-IgG титровали в ИФА.

Сравнительные данные активности и специфичности полученных разными методами конъюгатов приведены в табл. 2.

Анализ результатов получения высокоактивного и специфичного анти-IgG на соответствие требованиям

показателей качества позволяет сделать вывод о том, что примененный метод 5-кратного переосаждения ПЭГ-6000 дает возможность получить препарат анти-IgG, имеющий более высокую степень очистки, для дальнейшего использования в ИФА с целью индикации и идентификации антител в сыворотке крови КРС.

Список литературы

1. Тюрина И.Н., Быкова Н.Н., Лукина В.А. и др. Сравнительная оценка методов очистки вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота при разработке диагностического ИФА-набора // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии. – Владимир, 1990. – С. 63-64.

2. Перепечев К. Разработка тест-системы для диагностики герпесвирусной инфекции кошек на основе иммунологических методов: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Щелково, 2007, 24 с.

3. Рахманин П. Иммуноферментная тест-система определения уровня антирабических антител в сыворотках крови привитых против бешенства кошек и собак: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Щелково, 2008, 28 с.

4. Иммунология / Под ред. У.Пола. – М.: Мир, 1987. – Т. 3, 360 с.

Контактная информация:
8-(495) 377-00-40 (служ.)

УДК 636.09.42

Б.К. ИЛЬЯСОВ, А.Б. ИЛЬЯСОВ, С.НУРАЛИЕВ

Южно-Казахстанский Государственный университет имени Аuezова, Казахстан
Институт экспериментальной биологии, г. Алматы

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ЛЕПТОСПИРОЗЕ

Обобщены результаты иммунологических исследований при лептоспирозе. Доказано, что наиболее иммунологическая эффективность среди изучаемых препаратов и тест-систем при исследовании лептоспирозных сывороток лошадей и свиней отмечена для ИФА по сравнению с РПГА и РМАЛ — 10-20 раз.

Ключевые слова: лептоспирозоносительство, тест-система, сыворотка, лошади, свиньи.

B.K. ILYASOV, A.B. ILYASOV S.NURALIEV

Southern-Kazakhstan state university named M. Auezov, Kazakhstan
Institute of experimental biology, Almaty

EVALUATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE OF IMMUNOLOGICAL STUDIES IN LEPTOSPIROSIS

The results of immunological investigations of leptospirosis. Proved that the most immunological efficacy of study drugs and test systems in the study of leptospiral serum of horses and pigs marked for ELISA compared with PHA and RMAL — 10-20.

Key words: leptospirosis, test-system, leptospiral serum, horses, pigs.

Методы иммунологической диагностики лептоспироза достаточно обширны по набору реакций и диагностических препаратов, однако не все из них имеют широкое распространение и признание среди исследователей и на практике.

Слабая распространенность некоторых методов объясняется многими причинами, среди которых основные — бесперспективность и громоздкость реакции (РСК преципитации и др.), отсутствие в производстве диагностических препаратов, несмотря на высокую значимость методов (РПГА, ИФА и др.). Кроме того, одной из причин, сдерживающих применение этих методов, является недостаток сведений по их сравнительной диагностической эффективности. Например, есть сведения о чувствительности методов гибридизации нуклеино-

вых кислот, выделения культур и РИФ при определении лептоспироз в моче крупного рогатого скота (Bolin C. et al., 1989). Из 75 проб мочи методом гибридизации лептоспиры определены в 60 пробах, РИФ — в 24 и культурным способом — в 13.

M. Seki (1937) сообщает о значительных преимуществах предложенного им родоспецифического микрокапсульного агглютинационного теста на лептоспироз по сравнению с РМАЛ, особенно на ранних стадиях заболелания. Антитела определяли на 3-4-й день, а в РМАЛ — на 5-7-й. Е.Г. Волина и соавторы (1988, 1990) сообщили о возможности определения антител с помощью ИФА в 5,3 раза (средний уровень антител), а с помощью микрокапсульного агглютинационного теста — в 3,3 раза выше, чем в РМАЛ.

РСК с антигеном Patos и РМАЛ имели равную эффективность при исследовании сывороток 5988 больных дептоспирозом (Nicoleski et al., 1986).

При исследовании 232 лептоспирозных, 73 нелептоспирозных и 382 нормальных сывороток установлена полная корреляция результатов РПГА и РМАЛ (Бернасовская Е.П. и др., 1978). Титр лептоспирозных сывороток в РПГА составлял от 1:20 до 1:2560, а в РМАЛ от 1:100 до 1:2000 при выявлении антител в РПГА на 2-3-й день заболевания, против 5-7 — в РМАЛ (Бернасовская Е. П. и др., 1979).

По нашему мнению, при совершенствовании диагностических возможностей последних следует ориентироваться на получение антигенов с большим диапазоном внутри и между серогруппами лептоспир и поиском способов получения высокоэффективных диагностических препаратов и тест-систем.

Задачей данной работы является апробация и оценка диагностической эффективности изучаемых методов иммунологических исследований, основанных на феноменах агглютинации (РМАЛ, РПГА) и иммунорсорбции на твердой фазе (ИФА) с обследованием сывороток крови больных лептоспирозом лошадей и свиней, подтвержденных в РМАЛ в сравнении с результатами исследования сывороток крови больных нелептоспирозной этиологии (бруцеллез), а также здоровых групп животных.

Эксперименты проводились в Казахском противочумном институте совместно с доктором медицинских наук В.А. Шамардиным и кандидатом биологических наук Н.В. Рудь. Изучение диагностической значимости реакции проводили путем однократного обследования сывороток крови больных и здоровых лошадей и свиней. Уровень активности антител для каждого метода при исследовании всего массива сывороток приведен в табл. 1.

Наиболее высокий титр отмечен для ИФА с конъюгатом на основе антивидовой сыворотки (в том числе тест системы НПО "Аллерген"). Из эритроцитарных диагностикумов наибольший титр РПГА отмечен с препаратом на основе антигена Буавена.

Анализ подтвердил, что метод ИФА при лептоспирозе является наиболее эффективным по сравнению с реакциями на основе феномена агглютинации. Среди вариантов ИФА наиболее чувствительны с использованием конъюгатов на основе антительных Ко-диагностикумов. Среди них наиболее эффективными являются варианты ИФА, основанные на принципе последовательной иммунорсорбции с использованием конъюгатов на основе лептоспирозной сыворотки. Что касается эритроцитарных антигенных диагностикумов, то чувствительность РПГА колеблется в зависимости от специфичности определяемых антител. Как и при экспериментальных исследованиях, чувствительность РПГА с диагностикумом на основе антигена Буавена выше при выявлении антител к лептоспирам серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Bataviae*, *Australis*, *Ballum*, *Synepteri*.

В дальнейшем нами было приведено определение степени специфичности методов и препаратов при исследовании 176 сывороток крови от здоровых и больных нелептоспирозной этиологии. Установлено, что сыворотки крови здоровых людей, больных сальмонеллезом, отмечены отрицательными результатами как в реакциях, основанных на феномене агглютинации, так и в реакциях, основанных на феномене иммунорсорбции на твердой фазе.

Сыворотки исследовались в разведении 1:100. У больных бруцеллезом людей в 15 (16,3%) случаях они дали положительный результат РПГА в титре от 1:100 до 1:400, в РМАЛ — в титре от 1:100 до 1:200 с расшифровкой в основном антител к лептоспирам, серогрупп *Pomona* 25% *Irippytyposa* (21%), *Conicola* (16%), *Tarassovi* (12%), *Hebdomadis* (26%).

У этой группы обследуемых отмечен в анамнезе постоянный контакт с крупным рогатым скотом, свиньями, лошадьми.

Исследование с помощью ИФА сывороток крови бруцеллезных людей позволило отметить в 23 случаях (25%) положительные результаты в титре от 1:200 до 1:6400. Наиболее высокие титры наблюдали с вариантами ИФА по типу последовательной иммунорсорбции с конъюгатами на основе антивидовой сыворотки — от 1:800 до 1:6400. Наивысший среднегеометрический титр отмечен у варианта ИФА с использованием антительного Ко-диагностикума. Как оказалось, все сыворотки, положительные в РПГА и РМАЛ, были такими же во всех вариантах ИФА.

Полученные результаты свидетельствуют о достаточной степени специфичности изучаемых методов и препаратов, предназначенных для иммунологической диагностики лептоспироза по определению антител.

Исследование 62 сывороток крови работников мясокомбината и животноводческих комплексов и хозяйств (свинотоварные фермы, ипподром и др.) всем набором изучаемых препаратов к методов показало, что выявлено от 19 до 32 положительно реагирующих сывороток (табл. 2). При этом с помощью РПГА и РМАЛ обнаружено 19,3% сывороток, содержащих антитела в основном к серогруппам лептоспир *Pomona*, *Irippytyposa*, *Conicola*, *Tarassovi* (91%) в титре от 1:100 до 1:1600. Примечательно, что среди работающих на свиноводческих фермах в подавляющем большинстве отмечены антитела к лептоспирам серогрупп *Pomona* и *Tarassovi* (83%), у работников ипподрома — *Irippytyposa* и *Canicola* (75%), у рабочих мясокомбината — *Pomona*, *Irippytyposa*, *Canicola*, *Tarassovi* (91%). Положительные результаты РМАЛ полностью совпали с РПГА. Что касается ИФА, то результативность была в 1,68 раза выше, чем у РПГА и РМАЛ; с помощью ИФА выделено 32,2% положительно реагирующих сывороток в титре от 1:100 до 51200.

Наиболее высокий специфический титр получен с вариантом ИФА на основе антительного антивидового Ко-диагностикума. Подтверждением уже установленной закономерности является высокий среднегеометрический титр для варианта ИФА, где использованы конъюгаты антивидовой сыворотки.

Более подробный анализ распределения положительных результатов показывает, что разница в результативности РПГА и РМАЛ по сравнению с вариантом ИФА получена за счет более высокой чувствительности ИФА, преимущество которой особенно значительно при низких уровнях активности антител. Основное различие в количестве положительно реагирующих сывороток приходится на ИФА с титром от 1:100 до 800 — тот диапазон, где наблюдаются отрицательные результаты РПГА и РМАЛ. Все остальные сыворотки, положительно реагирующие в реакциях агглютинации, расположились для методов ИФА в графах с титром от 1:400 до 12800, в зависимости от его варианта, что и демонстрирует более высокую чувствительность, а в данном случае и его результативность.

Результативность иммунологических методов

Препараты и методы	Распределение положительных случаев с титром (1/Т)								
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	средне-геометрич. титры
РМАЛ	3	2	4	2	1				317,0±1,043
РГПА (Буавена)	2	2	5	1	2				378,0±1,048
РГПА (Вестфалья)	3	4	2	1	1				336,0±1,044
ИФА	N 1	3	3	5	4	2	1	2	1858±1,076
	N 2	3	4	3	3	2	2	1	1131±1,054
	N 3	3	3	3	3	3	3	3	2393±1,079
	N 4	3	4	3	4	3	1	2	1120±1,056
	N 5	4	4	5	3	2	1	1	771,0±1,032

Примечание: Здесь и в табл.2 — РГПА (Б) — эритроцитный диагностикум на основе антигена Буавена; РГПА (В) — эритроцитный диагностикум Вестфалья.

Таблица 2.

Уровень активности антител в сыворотках крови работников мясокомбината и животноводческих хозяйств

Препараты и методы	Распределение положительных случаев с титром (1/Т)									
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	средне-геометрич. титры	
РМАЛ	3	2	4	2	1				317,0±1,043	
РГПА (Б)	2	2	5	1	2				378,0±1,048	
РГПА (В)	2	3	4	2	1				336,0±1,044	
ИФА	N 1	1	3	2	5	4	2	1	2	1858±1,076
	N 2	2	2	3	3	3	2	2	1	1131±1,054
	N 3	1	3	2	3	3	3	2	3	2393±1,079
	N 4	2	2	3	3	4	2	1	2	1120±1,056
	N 5	2	3	3	4	3	2	1	1	771,0±1,032

Большое значение для практики имеет величина условно-диагностического титра, позволяющая с определенной долей уверенности оценивать результаты. Всем понятно значение динамики уровня антител, когда повышение титра в 3-4 раза и выше признается как начало и разгар лептоспирозной инфекции, а снижение титра в несколько раз — выздоровление, т.е. состояние постинфекционное.

Отсутствие однозначных результатов по величине условно-диагностического титра РГПА и РМАЛ по данным разных авторов — свидетельство применения нестандартных диагностических препаратов собственного приготовления, имеющих разную степень чувствительности, что может зависеть и от набора лептоспир, применяемого для получения родоспецифического антигена.

Для РМАЛ такие величины предусмотрены инструкциями по применению иммунологических методов исследования сывороток людей (Ин-т им. Н.Ф. Гамалея. М., 1991) и различных животных (Главное управление ветеринарии. М., 1977). При установлении диагностического титра среди различных животных следует учитывать несколько серьезных и сложных факторов: видовую принадлежность животного, прививочный фон и возраст. По инструкции Главного управления ветеринарии (1977), животные с титром сыворотки в РМАЛ 1:100, кроме лошадей и крупного рогатого скота, считаются подозреваемыми в заражении. Крупный рогатый скот, реагирующий с лептоспирами серогруппы *Hebdomadis* (-) и лошади, реагирующие с лептоспирами любой серогруппы в титре 1:500, считаются подозреваемыми в заражении. Для окончательного вывода условно-диагно-

стического титра необходимы дальнейшие исследования разных групп животных на различных территориях единым диагностикумом.

Выводы.

1. Наибольшая иммунологическая эффективность (чувствительность и результативность) среди изучаемых препаратов и тест-систем при исследовании лептоспирозных сывороток лошадей и свиней отмечена для ИФА с конъюгатом антивидовой сыворотки и фермента каталазы по сравнению с РГПА и РМАЛ — в 10-20 раз.

2. Из методов, основанных на феномене агглютинации, наибольшей чувствительностью обладали эритроцитарные диагностикумы на основе антигенов Буавена и Вестфалья.

Список литературы

1. Шамардин В.А., Каральник Б.В. Способ приготовления эритроцитарных иммуноглобулинов – диагностикумов // Микробиология, – 1980, – 9. – С. 49-52.
2. Шамардин В.А., Рудь Н.В. Новый способ иммунологической диагностики лептоспироза: Тез. межд. конф. по аллергологии и клинич. иммунологии. – Алма-Ата. 1992. – Т. 6. – С. 138^
3. Бернасовская Е.П. и др. Итоги исследования по применению эритроцитарнолептоспирозного диагностикума // Лептоспирозы. – Киев. 1979. – С.221-222.
4. Ильясов Б.К., Рудь Н.В. Диагностическая эффективность определения антител при лептоспирозе : Тез.докл. I Межд. конф. по аграрным проблемам. – Алматы, 1993. – С. 275-276.

Контактная информация:
8 (495) 377-69-87

Т.П. ЖАРОВА, Г.Н. ПЕЧНИКОВА, М.Н. МИРЗАЕВ, Д.А. ДЕВРИШОВ, А.А. НИКОЛАЕВ
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА БИОКАН НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОБАК

В статье представлена динамика показателей биохимического состава крови, факторов естественной резистентности, фагоцитоза, количественных и относительных величин Т- и В-лимфоцитов. Полученные результаты свидетельствуют о достоверном повышении у опытных животных лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности нейтрофилов при одновременной нормализации микрофлоры кишечника и биохимических показателей.

Ключевые слова: препарат Биокан, иммунологическая реактивность, лизоцим, нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты, естественная резистентность

T.P. JAROVA, G.N. PECHNIKOVA, M.N. MIRZAEV, D.A. DEVRISHOV, A.A. NIKOLAEV
FGBOU VPO 'Moscow state Academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin »

THE STUDY OF THE INFLUENCE OF THE DRUG BIOKAN ON THE BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF DOGS

The article describes the dynamics of indicators of the biochemical composition of blood, factors of natural resistance, phagocytosis, quantitative and relative values of T — and b-lymphocytes. The results obtained demonstrate the significant increase in experimental animals lysozyme and bactericidal activity in the blood serum, phagocytic activity of neutrophils with a simultaneous normalization of microflora of intestines and biochemical parameters.

Key words: drug, Biokan, immunological reactivity, lysozyme, neutrophils, T- and B-lymphocytes, natural resistance.

Профилактикой заболеваний опорно-двигательной системы служит обеспечение нормального развития скелета и обеспечение достаточного количества питательных веществ для костей и суставов у собак, прежде всего крупных пород, использование препаратов на основе комбинированных пищевых добавок.

Среди широкого круга лекарственных средств, применяемых при заболеваниях опорно-двигательного аппарата собак, в последнее время ведущее место занимают препараты на основе гликозамингликана, коллагенового или желатинового гидролизата и хондроитин сульфат натрия, рекомендуемые при дегенеративно-дистрофических заболеваниях суставов и позвоночника. Прием хондропротекторов улучшает структуру хряща, способствует замедлению прогрессирования артроза, но не снимает воспаление в суставе.

Несмотря на многообразие отечественных и зарубежных препаратов, нельзя не отметить наличие у них определенных недостатков — все они имеют узконаправленный характер и малоэффективны в тех случаях, когда у животных одновременно с заболеваниями опорно-двигательной системы имеет место нарушение нормального микробиоценоза кишечника, что в связи с ухудшением экологических условий среды, низким качеством кормов и антибиотикотерапией в последнее время встречается довольно часто. В такой ситуации наблюдается снижение всасывания кальция и других минеральных компонентов в кишечнике, что, естественно, сказывается на регенерации хрящевой и костной ткани.

Поэтому не вызывает сомнения актуальность исследований, направленных на создание новых форм и композиций препаратов, содержащих в своем составе вещества, стимулирующие как процессы регенерации в тканях, так и размножение полезной микрофлоры кишечника животных (лакто- и бифидобактерии). Этим требованиям соответствует препарат Биокан, используемый для профилактики и лечения заболеваний опорно-двигательной системы собак и содержащий в своем составе источники белка, минеральные элементы, глюкозамин, желатин, лакто- и бифидобактерии.

Для проверки эффективности применения препарата Биокан были сформированы опытная (10 голов) и контрольная (5 голов) группы. Перед обработкой животных препаратом в лабораторных условиях проводилось гематологическое, микробиологическое и биохимическое исследование отобранных проб, которое показало, что опытные и контрольные животные имели практически одинаковые исходные показатели.

Препарат Биокан скармливали опытным животным после тщательного смешивания с кормом в дозе 1г/1 кг живой массы.

Фоновые показатели физиологического состояния собак представлены в табл. № 1.

Таблица 1

Показатели физиологического состояния собак

Контролируемые параметры	Опытная группа	Контрольная группа
Эритроциты, млн/мкл	6,12	6,48
Лейкоциты, тыс/мкл	10,54	11,06
Гемоглобин, г/л	105,1	103,7
Белок общий, г/л	59,4	56,3
Сахар, г/л	0,97	0,91
АСТ, ммоль/л	0,64	0,58
АЛТ, ммоль/л	0,78	0,71
Мочевина, ммоль/л	5,8	5,9
Креатинин, ммоль/л	83	77
Бифидобактерии, КОЕ/г	8,4	8,1
Лактобактерии, КОЕ/г	7,3	7,5

Как видно из данных, представленных в табл. 1, гематологические показатели находятся в пределах физиологической нормы, а содержание общего белка и сахара в сыворотке крови находится на нижней границе или даже ниже физиологической нормы для собак, что свидетельствует как о нарушении обменных процессов в целом, так и о влиянии заболевания на общее состояние животных.

Проведенные нами микробиологические исследования, представленные в таблице 2, показали, что через 15 дней получения препарата Биокан у всех опытных животных было отмечено достоверное повышение количества бифидо- и лактобактерий при одновременном значительном снижении количества условно-патогенной микрофлоры кишечника собак.

Оценка действия препарата на традиционно контролируемые биохимические показатели крови животных проводилась с целью получения полной информации о состоянии опытных животных, получавших препарат. При определении биохимических показателей дополнительно контролировали также состояние минерального обмена, особенно кальция, магния и фосфора.

Представленные в таблице 3 биохимические показатели крови собак свидетельствуют о положительной ди-

намике, наблюдаемой к 30 дню опыта, что выражается не только в интенсификации углеводного и белкового обмена, но и в тенденции к нормализации соотношения кальция и фосфора.

Кроме того, в лабораторных условиях нами было изучено влияние препарата Биокан на такие показатели естественной резистентности, как лизоцимная и бактерицидная активность сыворотки крови. Кровь брали до дачи препарата, на 7, 15 и 30 день.

Как видно из данных табл. 4, уровень бактерицидной активности у опытных животных достоверно повышается к 15 дню, тогда как лизоцимная активность на 7 день была достоверно выше фоновых значений. К 30 дню эти показатели были близки к фоновым значениям.

Наряду с изучением факторов естественной резистентности, характеризующими состояние гуморального звена иммунитета, нами были изучены показатели, позволяющие оценить состояние клеточного иммунитета — фагоцитарная активность, абсолютное и относительное количество Т- и В-лимфоцитов

В табл. 5 представлены результаты определения фагоцитарной активности нейтрофилов крови на стадии поглощения, свидетельствующие о достоверном увеличении к 14 дню опыта таких показателей, как процент фагоцитоза и индекс фагоцитоза.

В табл. 6 представлены результаты исследования количества Т- и В-лимфоцитов у опытных и контрольных животных до дачи препарата Биокан, через 14 и 30 дней получения этого препарата.

Анализ данных, представленных в табл. 6, показывает, что абсолютное и относительное количество иммунокомпетентных клеток в крови опытных животных существенно не изменяется и остается практически одинаковым на протяжении опыта, что свидетельствует об отсутствии иммунодепрессивных свойств у препарата Биокан.

Таблица 2

Микроорганизмы	До опыта	Через 15 суток
	кол-во Ig/г;	кол-во Ig/г;
Бифидобактерии	8,25	9,83
Лактобактерии	7,30	9,40
Энтерококки	6,90	6,30
Эшерихии, всего	7,30	6,90
в т.ч. со слабой лактазной активн. % гемолитические %	0,45 % 0 %	0 % 0 %
Лактозонегативные энтеробактерии %	1,40 %	0 %
Proteus spp.	0 %	0 %
Аэробные бациллы	3,50	3,20
Стафилококки	4,20	2,90
Дрожжи, плесени	2,5-3,0	1,50
Candida spp.	1,50	1,20

Таблица 3

Параметры	Единица изм.	15 дней	30 дней	Нормы для собак
Общий белок	g/L	49,90±3,49	59,90±2,99	51-73
Альбумины	g/L	29,70±1,33	28,40±1,7	27-35
Глобулины	g/L	24,00±1,44	34,00±2,04	27-44
Глюкоза	mmol/L	4,43±0,22	6,43±0,38	4,2-7,2
Общий билирубин	u mol/L	2,30±0,16	4,2±0,29	3,4-12
Прямой билирубин	u mol/L	1,40±0,07	1,40±0,08	0-4,7
АСТ	IU/L	13,00±1,12	13,00±0,78	7,2-17,3
АЛТ	IU/L	14,00±0,7	14,00±0,84	8-92
Триглицериды	mmol/L	1,67±0,05	1,07±0,06	0,4-1,62
Щелочная фосфатаза	IU/L	43,00±2,58	43,00±3,01	10-158
Амилаза	IU/L	1060,00±63,6	1060,00±74,3	165-1300
Кальций	mmol/L	1,73±0,08	2,03±0,12	2,3-3,2
Фосфор	mmol/L	1,81±0,11	1,51±0,09	0,67-2,9
Магний	mmol/L	1,02±0,05	1,01±0,07	0,82-1,1
Железо	mmol/L	21,20±1,27	24,10±1,2	19,8-32

Таблица 4

Время взятия материала (сутки)	Бактерицидная активность сыворотки крови (%)		Содержание лизоцима, мкг/мл	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
До опыта	31,6±0,64	30,9±0,76	412,6±23,4	454,4±45,6
7 сутки	35,2±0,52	49,2±0,59	409,5±35,72	532,3±64,2
15 сутки	37,9±0,33	53,1±0,36	431,0±42,77	498,1±46,3
30 сутки	34,3±0,43	47,3±0,30	436,4±44,20	454,7±51,4

Таблица 5

Показатели фагоцитарной активности	Фон	Через 14 дней	Через 30 дней	Контроль
	1	2	3	4
Процент фагоцитоза	41 %	67,5 %	55,7 %	45,7 %
Индекс фагоцитоза	0,44	1,24	0,75	0,50
Фагоцитарное число	1,25	1,56	1,41	1,20
% убитых микробов на стадии поглощения	24 %	45,2 %	37,3 %	30,3 %

Таблица 6

Интервал	Т+О лимфоциты		В-лимфоциты	
	Абсолютное кол-во	Относительное кол-во	Абсолютное кол-во	Относительное кол-во
Фоновые показатели	3,200	71,91 %	1,250	28,09 %
Через 14 дней	3,500	73,68 %	1,250	26,32 %
Через 30 дней	3,300	75,0 %	1,100	25,0 %

Заключение. Из анализа представленных результатов следует, что препарат Биокан оказывает позитивное влияние на состав кишечной микрофлоры. Отмечено достоверное повышение количества бифидо- и лактобактерий в содержимом кишечника при одновременном снижении количества условно-патогенной микрофлоры кишечника собак. Эти данные хорошо согласуются с

информацией о том, что производные хитина (хитодекстрины, хитозан, глюкозамин) оказывают стимулирующее действие на развитие молочнокислых бактерий.

Отмечены нормализация биохимических показателей к 30 дню опыта и увеличение белка и углеводов на второй месяц получения препарата соответственно на 15-30 %, нормализуется соотношение кальция и фосфора и приближается к 2:1.

Препарат Биокан не оказывает негативного влияния на иммунную систему, о чем свидетельствует достоверное повышение бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, а также показателей фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Биокан не оказывал негативного влияния на количество Т- и В-лимфоцитов, на их процентное соотношение.

Список литературы

1. Метревели Т.В. Биохимия животных: Учебное пособие для вузов под ред. Шевелева Н.С. – СПб, 2005
2. Панин А.Н., Серых Н.И. и др. Пробиотические препараты в ветеринарии, // М., 1997.
3. Субботин В.В., Степанов К.М. Влияние бифацидобактерина на кишечную микрофлору поросят. // Ветеринарная газета, № 5, 1998.
4. Субботин В.В. Новые пробиотики. – Омск, 1998.
5. Тихонов И.В., Грязнева Т.Н., Лиморенко А.П. и др. Совершенствование технологии производства пробиотика Биод-5 и методов его контроля // Ветеринарная медицина, 2004.
6. Емельяненко П.А., Брылина В.Е., Печникова Г.Н., Жарова Т.П. Тестирование врожденного иммунитета крупного рогатого скота: Методический сборник. – М., 2011.

Контактная информация:
тел.: 8(495) 377-69-87 (служ.)

УДК 636.91:612.15.017.046

Г.Н. ПЕЧНИКОВА, Т.П. ЖАРОВА, М.Н. МИРЗАЕВ, Д.А. ДЕВРИШОВ, А.А. НИКОЛАЕВ
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА БИОКАН НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

Изучено влияние препарата Биокан, применяемого для профилактики и лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата у собак, на гематологические и иммунологические показатели белых мышей.

Полученные результаты свидетельствуют о достоверном увеличении лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови, а также фагоцитарной активности нейтрофилов.

Ключевые слова: Биологически активная добавка, Биокан, гематология, хондропротектор, естественная резистентность, фагоцитоз.

G.N. PECHNIKOVA, T.P. JAROVA, M.N. MIRZAEV, D.A. DEVRISHOV, A.A. NIKOLAEV
Moscow state Academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin»

THE ACTION OF THE DRUG BIOKAN ON HEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF WHITE MICE

We studied the influence of the drug Biokan used for the prevention and treatment of musculoskeletal system diseases in dogs, hematological and immunological parameters of white mice.

The results obtained demonstrate the credibility of the increase of the lysozyme and bactericidal activity in the blood serum, and also of the phagocytic activity of neutrophils.

Keywords: Biologically active additive, Biokan, Hematology, chondroprotector, natural resistance, phagocytosis.

Заболевания опорно-двигательного аппарата встречаются довольно часто и являются одной из важнейших проблем ветеринарии. Основными признаками внешнего проявления патологий опорно-двигательной

системы животных является скованность движений, болевые ощущения, изменение формы позвоночника и конечностей. Что касается патологических явлений на уровне метаболизма в тканях, то следует отметить,

что анализ опубликованной информации не оставляет сомнений в наличии конкретных биохимических показателей, прямо или косвенно связанных с состоянием хрящевой и костной ткани. Многие исследователи при изучении действия того или иного фактора на регенерацию поврежденных тканей костей и хрящей в качестве биохимического теста используют метаболизм кальция, фосфора, магния, т.е. тех минеральных элементов, которые непосредственно связаны с регенерацией тканей суставов. При этом биохимические показатели анализируются с учетом общего физиологического состояния опытных животных.

В связи с этим перед нами на первом этапе стояла задача изучить влияние данного препарата на гематологические и иммунологические показатели на лабораторных животных и в дальнейшем провести аналогичное исследование на собаках.

Исследования проводились на белых мышах, для чего по принципу аналогов были сформированы опытные и контрольные группы. Животные опытной группы (15 голов) получали препарат Биокан в дозе 100 мг, контрольные животные (10 голов) — обычный корм.

Гематологические исследования проводили по общепринятой методике, гуморальное звено иммунной системы оценивали по определению бактерицидной и лизоцимной активности. Для оценки клеточного иммунитета определяли уровень фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Материал для исследования получали до дачи препарата, на 14 и 30 день.

В табл. 1 представлены средние гематологические показатели крови мышей опытной и контрольной групп.

Из данных, представленных в табл. 1 следует, что на 14 день после дачи препарата отмечено существен-

ное повышение уровня гемоглобина и эритроцитов, на 30 день увеличивается число сегментоядерных нейтрофилов, что может свидетельствовать о стимуляции фагоцитоза, за который как раз и отвечают эти форменные элементы. В контрольной группе указанные параметры находились в пределах физиологической нормы.

В табл. 2 представлены данные о фагоцитарной активности нейтрофилов крови мышей, получавших препарат Биокан.

Как видно из данных табл. 2, фагоцитарная активность нейтрофилов крови мышей на 14 день дачи препарата достоверно возрастает. Так, на стадии поглощения процент фагоцитоза в этот период увеличился почти в 2 раза и составил 58,7% против 32% до дачи препарата. Индекс фагоцитоза в этот же период возрос почти в 3 раза и был равен 1,02. К 30 суткам перечисленные показатели фагоцитарной активности снижались и были близки к исходным.

В контрольной группе показатели фагоцитарной активности были близки к уровню фоновых показателей опытной группы.

Кроме того, в лабораторных условиях нами было изучено влияние препарата Биокан на такие показатели естественной резистентности, как лизоцимная и бактерицидная активность сыворотки крови. Кровь брали до дачи препарата, на 7, 15 и 30 день.

Как следует из результатов, представленных в табл. 3, уровень бактерицидной активности сыворотки крови повышался к 15 дню на 13% и оставался на этом уровне до 30 дня. Активность лизоцима сыворотки крови достоверно повышалась на 7 сутки, к концу наблюдения эти показатели выравнивались в опытной и контрольной группах и были близки к фоновым.

Таблица 1

Время взятия проб	Гемоглобин, г/%	Эритроциты, млн/л	Лейкоциты, тыс/мл	Лейкограммы				
				Палочко-ядерные	Сегментоядерные	Эозинофилы	Моноциты	Лимфоциты
Фон	7,8	6,31	6,56	0,33	35,6	1,66	3,66	58,66
14 дней	11,4	8,12	6,45	1,33	36,3	2,33	2,66	56,6
30 дней	10,4	7,33	6,72	1,0	39,0	3,0	3,33	54,0
Контроль	10,4	7,11	6,9	1,0	37,0	2,0	2,0	57,0
Норма	14-16	8-11	6-13	1-5	18-30	0-4	1-5	60-75

Таблица 2

Показатели Фагоцитарной активности	Фон	Через 14 дней	Через 30 дней	Контроль
	1	2	3	4
Процент фагоцитоза	32 %	58,7	40 %	36 %
Индекс фагоцитоза	0,34	1,02	0,57	0,44
Фагоцитарное число	1,07	1,34	1,21	1,20
% убитых микробов на стадии поглощения	19 %	42,13 %	34,33 %	34,3 %

Таблица 3

Время взятия материала	Бактерицидная активность сыворотки крови (%0)		Содержание лизоцима, мкг/мл	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
До опыта	37,6±0,64	30,9±0,76	412,6±23,4	494,4±45,6
7 сутки	41,2±0,52	39,2±0,59	409,5±35,72	532,3±64,2
15 сутки	40,9±0,33	43,1±0,36	431,0±42,77	498,1±46,3
30 сутки	34,3±0,43	43,3±0,30	436,4±44,20	454,7±51,4

Заключение. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют об отсутствии отрицательно-го воздействия препарата на гематологические показатели, которые оставались в пределах физиологической нормы на протяжении всего эксперимента.

Отмечено достоверное увеличение к 14 дню опыта таких показателей, характеризующих фагоцитарную активность, как процент фагоцитоза — почти в 2 раза, и трехкратное увеличение индекса фагоцитоза в опытной группе.

Важным и достаточно чувствительным тестом для оценки влияния того или иного препарата на организм животного является контроль показателей естественной резистентности — содержание лизоцима в сыворотке крови и бактерицидная активность. Проведенные исследования показали достоверное повышение к 15 дню бактерицидной активности сыворотки крови и к 7 дню — лизоцимной активности.

Список литературы

1. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. — Минск, 1986.
2. Девришов Д.А., Печникова Г.Н., Жарова Т.П., Брылина В.Е. Методы оценки специфических и неспецифических факторов иммунитета. — М., 2012.
3. Емельяненко П.А., Брылина В.Е., Печникова Г.Н., Жарова Т.П. Тестирование врожденного иммунитета крупного рогатого скота: Методический сборник. — М., 2011.
4. Малик Н.И., Панин А.Н. Ветеринарные пробиотические препараты // Ветеринария, 2001, № 1.

Контактная информация:
тел.: 8 (495) 377-69-87 (служ.)

УДК 619.616.72-002-076.5

ХАНИЕХ САТТАРИ ФАРД, Д.А.ДЕВРИШОВ
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии им.К.И.Скрябина»

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ОСТЕОАРТРОЗА У ОВЕЦ

Изучено влияние интраартикулярного введения в карпальный сустав трипсина у овец. Результатами исследований установлено, что трипсин является эффективным индуктором ОА.

Ключевые слова: *остеоартроз, внутрисуставная инъекция, трипсин, овца.*

HANIEH SATTARI FARD, D.A.DEVRISHOV
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS INDUCTION IN SHEEPS

The effect of intra-articular trypsin injection in carpal joint of sheep has been studied. Results show that trypsin is an OA inductor.

Key words: *osteoarthritis, intra-articular injection, trypsin, sheep.*

Остеоартроз (ОА) — хроническое прогрессирующее невоспалительное заболевание суставов неизвестной этиологии, характеризующееся дегенерацией суставного хряща и структурными изменениями субхондральной кости, а также явно или скрыто протекающим умеренно выраженным синовитом.

ОА — медленно прогрессирующее заболевание, распространённость и тяжесть которого увеличивается с возрастом. Существует несколько предрасполагающих факторов в формировании ОА, но важным триггерным звеном является механический фактор. Для изучения изменений, связанных с дегенерацией хряща при ОА *in vivo*, были применены биохимические, механические, хирургические и др. методы. Индуцирование патологических изменений происходит путём внутрисуставного введения различных агентов, в том числе ферментов (папаин, коллагеназа, трипсин, гиалуронидаза), цитокинов, трансформирующего фактора роста (TGF) и химических веществ (натрия йод ацетата). Исследования *in vitro* не могут выявить специфические молекулярные и клеточные изменения, происходящие при дегенерации хряща. В связи с этим при изучении ОА широко используются животные в качестве модели исследования.

Целью нашего исследования является изучение влияния 0,1%-ного раствора трипсина на индукцию ОА у овец.

Материалы и методы. Наши исследования проводились в виварии кафедры ветеринарной хирургии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина. В наших исследованиях мы использовали 5 овец романовской породы возрастом более 7 лет, средним весом 30 кг, обоих полов. До исследования животных содержали в оптимальных условиях в течение 2 недель. Затем при соблюдении асептики и антисептики ввели 1 мл 0,1%-ного трипсина в правый запяльный сустав каждой овце. Левые карпальные суставы, в которые ввели 0,9%-ный физраствор, служили контролем.

Каждый день, в течение 2 недель после инъекций, проверяли суставы на клинические симптомы. 14 дней после инъекции проводили рентгенографическое исследование суставов.

Результаты исследования. Через 2 недели после инъекции в правом карпальном суставе всех овец наблюдались клинические симптомы патогномоничные для ОА. Рентгенографические исследования подтвердили разрушение сустава. В то время как в левом карпальном суставе никаких изменений не наблюдалось.

Заключение. По результатам наших исследований можно сказать что, трипсин оказывает дегенеративное действие на сустав и в то же время он легко доступен, и тем самым может широко использоваться в научных

исследованиях. Значение индукции ОА высоко, так как даёт возможность изучить терапевтические действия различных лекарственных веществ и стволовых клеток от самого начала заболевания до конца поэтапно. В настоящее время существует большое количество веществ и методов, оказывающих разрушительное действие на суставы. Каждый из этих методов имеет свои положительные и отрицательные стороны. Мы надеемся, что наши результаты будут полезны в медицине и ветеринарии и откроют путь к дальнейшим исследованиям.

Список литературы

1. Bendele A.M. Animals models of osteoarthritis // J. Musculoskel Neutron Interact, 2001, 1(4). – P. 363-376.
2. Blanco F.J., Guitan R., Vazquez-Martel E. et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology // Arthritis Rheum., 1998. No 41. – P. 284-9.

3. Buckwalter J.A., Mankin H.J., Grodzinsky A.J. Articular cartilage and osteoarthritis // AAOS Instructional Course Lectures, 2005. No 54. – P. 465-480.

4. Gerwin N., Hops C., Lucke A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis // Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. No 58. – P. 226-242.

5. Goranov N.V. Experimental osteoarthritis models in veterinary medicine-relevance, potential and challenges // Bulgarian J. of Veterinary Medicine, 2011. No 4(14). – P. 191-200.

6. Little C.B., Smith M.M. Animals models of osteoarthritis // Current Rheumatology Reviews., 2008. No 3(4). – P. 1-7.

7. Mastbergen S.C., Lafeber F.P. Animals models of osteoarthritis-why choose a larger model? // Osteoarthritis, 2009. – P. 11-14.

8. Snibbe J.C., Gambardella R.A. Use of injections for osteoarthritis in joints and sports activity // Clin. Sports Med., 2005. No 24. – P. 83-91.

9. Ziagang G.E., Yang H.U., Heng B.C. et al. Osteoarthritis and therapy // Arthritis & Rheumatism, 2006. 3(55). – P. 493-500.

Контактная информация:
Тел.: 8 (495) 377-54-59

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 619:616.98:578

В.И. БУТОРИН

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ПАРАГРИППА-3, ВИРУСУ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА И ВИРУСУ ДИАРЕИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ОДНОМ РАЗВЕДЕНИИ

Разработан новый математический метод определения титра антител в сыворотках крупного рогатого скота. Доказана линейная зависимость между тремя переменными: разведение сыворотки, титр антител в сыворотке и величины оптической плотности (ОП), что позволяет определить титр в одном разведении, установив значение оптической плотности.

Ключевые слова: титр антител, линейная регрессия, респираторные заболевания, сыворотка крови.

V.I. BUTORIN

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINING ANTIBODY TITER TO PARAINFLUENZA-3, IBR VIRUS AND VIRUS DIARRHEA IN SERUM BOVINE IN SINGLE DILUTION

A new mathematical method for determining antibody titers in the sera of cattle was developed. A linear relationship between the three variables was proved: serum dilution, titer of antibodies in the serum and the OD values, which allows to determine the titer in single dilution by setting the value of the optical density.

Key words: antibody titer, linear regression, respiratory disease, serum.

Среди респираторных заболеваний крупного рогатого скота (КРС) наиболее губительными для молодняка являются: вирус парагриппа-3 (ПГ-3), вирус инфекционного ринотрахеита (ИРТ) и вирус диареи крупного рогатого скота (ВД-БС). Респираторные заболевания отличаются высокой контагиозностью и поражают до 100% голов. Больше всех страдает молодняк до 6-месячного возраста. Хозяйства несут убытки не только из-за задержки роста, расходов на лечение и летальности забо-

леваний, но и из-за затрат на ветеринарно-санитарные мероприятия [1, 5].

ПГ-3 отличается высокой контагиозностью и поражает до 100% стада, особенно молодняк. Это приводит к задержке роста и набора веса и, как следствие, к убыткам. Летальность невысокая. Экономический ущерб от ИРТ КРС определяется высокой заболеваемостью животных — болезнь может охватить 50–70% поголовья и более, летальность составляет около 2–18%.

Кроме того, снижается упитанность и молочная продуктивность животных, случаются аборт, а также убытки включают дополнительные затраты на ветеринарно-санитарные мероприятия. Наибольшую заболеваемость ВД-БС регистрируют осенью, зимой и весной, но спорадические случаи и сравнительно небольшие вспышки наблюдают и летом. Болезнь поражает от 10 до 100% животных, особенно молодняк 5-месячного возраста. Летальность до 90%.

За последние годы было разработано и внедрено в практику много высокочувствительных и специфичных методов иммуноферментного анализа (ИФА) [1, 2, 3]. Однако данные наборы позволяют провести идентификацию одного инфекционного агента и не позволяют установить титр антител в одном разведении в короткие сроки [3, 4].

Цель данной работы — разработать метод экспрессного определения титра антител в исследуемой сыворотке.

Материалы и методы. В работе использовали антигены вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вируса парагриппа-3 (ПГ-3) и вируса диареи крупного рогатого скота (ВД-БС), полученные нами в предыдущих работах. Вирусы ИРТ и ПГ-3 репродуцировали на культурах клеток ПТ-80, вирус ВД-БС репродуцировали на культуре КСТ. В работе также использовали конъюгат, 168 положительных сывороток с разными титрами (от 1:6400 до 409600), установленными в ИФА. ИФА проводили на полистироловых планшетах. В лунку с адсорбированными антигенами вносили сыворотки

с разными титрами антител в разных разведениях: от 1:400 до 1:102400.

Полученные величины оптической плотности (ОП) рассчитывали методом регрессионного анализа при помощи программы IBM SPSS Statistics 17.0.

Результаты и обсуждение. Регрессионный анализ — статистический метод исследования зависимости, позволяющий установить связь между зависимой переменной Y и несколькими независимыми переменными X_1, X_2, \dots, X_p . Независимые переменные иначе называют регрессорами, или предикторами, а зависимые переменные — критериальными. На основе полученных данных провели регрессионный анализ с целью установить зависимость между тремя переменными:

- x — характеристика разведения сыворотки — это степень, в которую возводится число 2 в выражении для разведения $1:(100 \times 2^x)$; варьирует в диапазоне от 1 до 12;
- y — показатель ОП, варьирующий в исследованном массиве данных от 369 до 2409;
- z — характеристика титра антител — это степень, в которую возводится число 2 в выражении для титра антител: $1:(100 \times 2^z)$, варьирует в диапазоне от 1 до 10.

Функцию $y = F(x, z)$ вычисляли на основе метода линейной регрессии. Значимость коэффициентов уравнений определяли для уровня вероятности $P=0,95$. Были получены следующие уравнения регрессии:

- для сывороток с антителами к вирусу ПГ-3: $y = 296,63 - 168,77x + 175,27z$;
- для сывороток с антителами к вирусу ИРТ: $y = 301,28 - 140,82x + 146,27z$;
- для сывороток с антителами к вирусу ВД-БС: $y = 346,06 - 155,78x + 160,63z$.

Уравнения хорошо описывают экспериментальные данные. На основе обработанных по полученным уравнениям данных для исследования сывороток крови к каждому вирусу были построены диаграммы (рис. 1, 2, 3). Для удобства использования диаграмм прямые с одинаковыми ОП были расположены друг от друга на интервал одного разведения.

Согласно полученным диаграммам установили, что наиболее оптимальное разведение сывороток при исследовании на наличие антител находится в интервале 1:800 — 1:3200. При данных разведениях и титре антител в сыворотке, равном 1:6400, полученное значение ОП превышает фон более чем в три раза, что не оставляет сомнений в достоверности полученного результата.

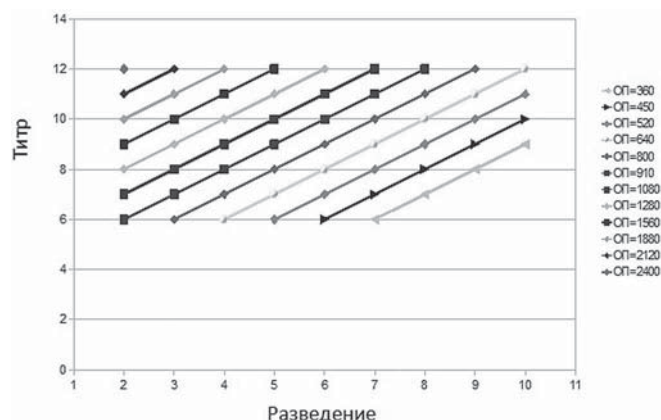


Рис. 1. Диаграмма для работы с вирусом ПГ-3

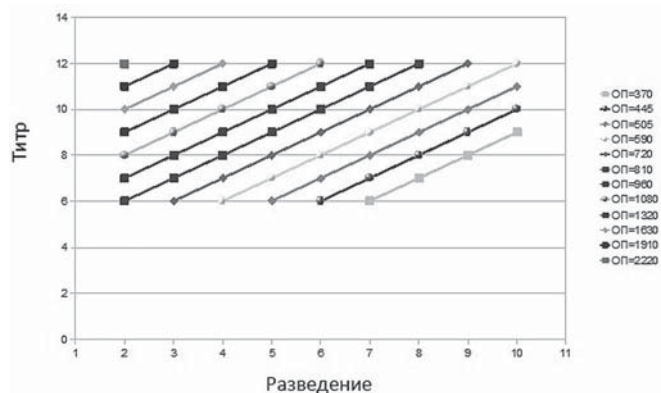


Рис. 2. Диаграмма для работы с вирусом ИРТ

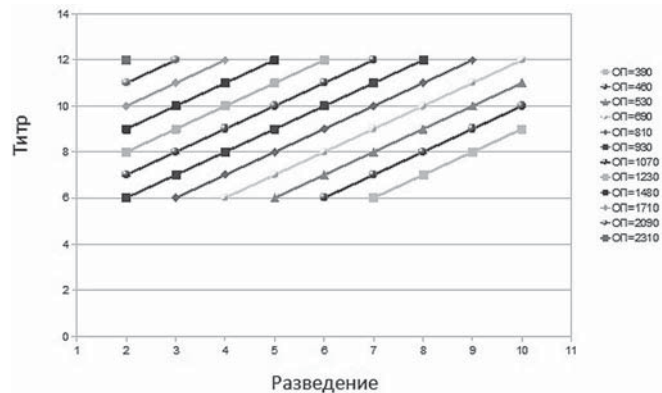


Рис. 3. Диаграмма для работы с вирусом ВД-БС

Найденные линейные зависимости позволяют установить титр антител в одном разведении, что значительно облегчает исследование, снижает трудозатраты и себестоимость исследования. На основании исследований, проведенных Быковой Н.Н., для определения титра антител с вероятностью 0,95 и ошибкой, не превышающей половины интервала разведения необходимо проводить исследование более чем в семи повторах и более чем в трех с вероятностью 0,80 [2].

Результат наших исследований подтверждает установленную Быковой Н.Н. линейную зависимость трех переменных: разведение сыворотки, титр антител в сыворотке и величины ОП [6].

Кроме того, разработанная тест-система предоставляет возможность провести исследование на наличие антител сразу к трем часто встречающимся вирусам, обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Список литературы

1. *Амиров А.* Иммуноферментный анализ в диагностике вирусной диареи крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Смоленск, 2004, 28 с.
2. *Быкова Н.Н.* Разработка иммуноферментного анализа для индикации антигенов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота и антител к нему: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1989, 27 с.
3. *Кузнецов Д.П., Самуйленко А.Я., Белоусов В.И.* Иммуноферментная диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота // Ветеринария, 2002, № 5. – С. 17-18.
4. *Перепечаев К.* Разработка тест-системы для диагностики герпесвирусной инфекции кошек на основе иммунологических методов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Щелково, 2007, 24 с.
5. *Рахманин П.* Иммуноферментная тест-система определения уровня антирабических антител в сыворотках крови привитых против бешенства кошек и собак: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Щелково, 2008, 28 с.

Контактная информация:
8 (495) 377 00 40 (служ.)

ПАРАЗИТОЛОГИЯ

УДК 619:616.995.421.-085.28

А.М. БЕГИНИНА, Ф.И. ВАСИЛЕВИЧ

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КЛЕЩЕЙ СЕМЕЙСТВА IXODIDAE В КАЛУГЕ И КАЛУЖСКОЙ ОБЛАСТИ

В статье отражен видовой состав иксодовых клещей в г. Калуге и 5 районах области, сезонная динамика их паразитирования на животных.

Ключевые слова: *Калужская область, видовой состав клещей, фауна, климат, сезонная динамика, распространение иксодид, распространение, Калужская область.*

A.M. BEGININA, F.I. VASILEVICH

Moscow state Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology by K.I. Skryabin.

CIRCULATION IXODIDAE TICKS IN KALUGA REGION

The article presents species ticks family Ixodidae in Kaluga and Kaluga region and season parasitic on the cattle.

Keywords: *Kaluga region, species ticks family Ixodidae season circulate.*

Иксодовые клещи (семейство Ixodidae) встречаются во всех природно-климатических зонах мира, являются эктопаразитами, более того, служат природным резервуаром и переносчиками основных групп возбудителей трансмиссивных заболеваний животных и человека, включая вирусы, риккетсии, бактерии, спирохеты, анаплазмы, пироплазмиды, тейлери. Причиняют большой вред организму как с-х, так и мелких домашних животных, ибо являются активными кровососами [1].

На территории нашей страны зарегистрированы представители 6 родов, обитающие на разнообразных географических ландшафтах: от южных границ до Балтийского моря на севере и от западных границ до восточных — от Карелии, через Ханты-Мансийск, севернее Красноярска и Байкала до Сахалина.

Калужская область, где мы проводили исследования, имеет площадь 29,9 тыс. кв. км. С севера на юг область протянулась более чем на 220 км – от 53° 30' до 55° 30' северной широты, с запада на восток — на 220 км, площадь территории составляет 29,9 тыс. кв. км. Административный центр — город Калуга. Область входит в состав Центрального федерального округа. Калужская область граничит с Московской, Тульской, Брянской, Смоленской, Орловской областями (Малюфеева Н.А., Акбаев М.Ш.).

Климат Калужской области умеренно континентальный с резко выраженными сезонами года: умеренно жарким и влажным летом и умеренно холодной зимой с устойчивым снежным покровом. Средняя температура июля +18°C, января –9°C. Теплый период (с по-

ложительной среднесуточной температурой) длится 215–220 дней. На земную поверхность территории области поступает значительное количество солнечной радиации — около 115 ккал на 1 см². Средняя годовая температура воздуха колеблется от 3,5–4,0 на севере и северо-востоке и до 4,0–4,6 °С на западе и юге области. Продолжительность безморозного периода в среднем по области составляет 113–127 дней. Наиболее холодная северная часть области. К умеренно холодной относится её центральная часть. На юге области, в зоне лесостепи климат относительно тёплый. По количеству выпадающих осадков территорию Калужской области можно отнести к зоне достаточного увлажнения. Распределение осадков по территории неравномерное. Их количество колеблется от 780 до 826 мм на севере и западе до 690–760 мм на юге. Особенностью климата области являются частые весенние заморозки, а также чередование жаркого сухого и холодного влажного лета.

Общая площадь лесов составляет около 1380 тыс. га (46 % территории) (2006). В лесном фонде доминируют мягколиственные породы (березовые и осиновые). Лесистость региона составляет 44 %. На юго-востоке области крупный массив широколиственных лесов.

В Калужской области обитают кабан, лось, лисица, заяц, белка, норка, хорек и др. Из птиц наиболее распространены тетерев, рябчик, перепел, бекас, дятел, глухарь.

Заболоченность сравнительно невелика — около 0,5 % общей площади и уменьшается с запада на восток, преобладают низинные болота.

Преобладающими почвами региона являются дерново-подзолистые почвы (занимают примерно 75,6 %). На водоразделах распространены дерново-сильноподзолистые почвы. В северной части территории на востоке и юго-востоке области преимущественно дерново-слабоподзолистые, в поймах рек — аллювиальные. На юге широко распространены дерново-подзолистые глеевые и глееватые почвы. В центральной части и на востоке — преимущественно серые и светло-серые почвы (занимают около 12,4 %).

Основа водной системы — река Ока, прочие крупные реки области — Угра, Жиздра, Болва, Протва, Воря, Ресса, Шаня, Яченка. В области насчитывается 19 водохранилищ.

Материалы и методы. Распространение клещей более подробно изучали с апреля по вторую декаду октября 2010 г. в Боровском, Дзержинском, Козельском, Малоярославецком районах и в г. Калуга и пригороде («Калугал-Бор» детский санаторий, «Сокол» детский санаторий, ДОК «Звездный», «Чайка», ДОЛ «Орлёнок» ДОЛ «Белка» и «Строитель»). Методом сбора в открытых местностях, а также по договоренности из ветеринарных клиник Калуги.

Клещи могут находиться в естественных и гостальных биотопах. К первым относятся пастбища, места водопоя и выгула животных, ко вторым — гнезда птиц, норы, логовища наземных позвоночных, помещения для домашних животных, различные хозяйственные постройки. Иксодовых клещей можно собирать как непосредственно на местности в их природных, так и с животных.

Мы применяли стандартные методики по сбору и учету иксодовых клещей («Сбор, учёт и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих — переносчиков возбудителей природно-очаговых болезней». Методические указания. М., 2002).

Для сбора иксодовых клещей в природе использовали следующие приспособления: волокушу и флажок; также осуществлялся сбор «на себя» и метод приманки (собака).

1. Волокуша — представляет собой кусок шерстяной светлой ткани размером 1х1,5 м, лучше со следами пота животных, или выделанную овчину. Ее протаскивают по траве и через каждые 50–100 шагов осматривают.

2. Флажок — отрезок марли или белой бязи размером 60х80 см, прикрепленный к рукоятке длиной 1 м. Его медленно протаскивают по траве и кустарникам, время от времени осматривают и снимают прицепившихся клещей. [5]

3. Метод сбора «на себя». Для этой цели в различных местах обследуемого участка человек останавливался

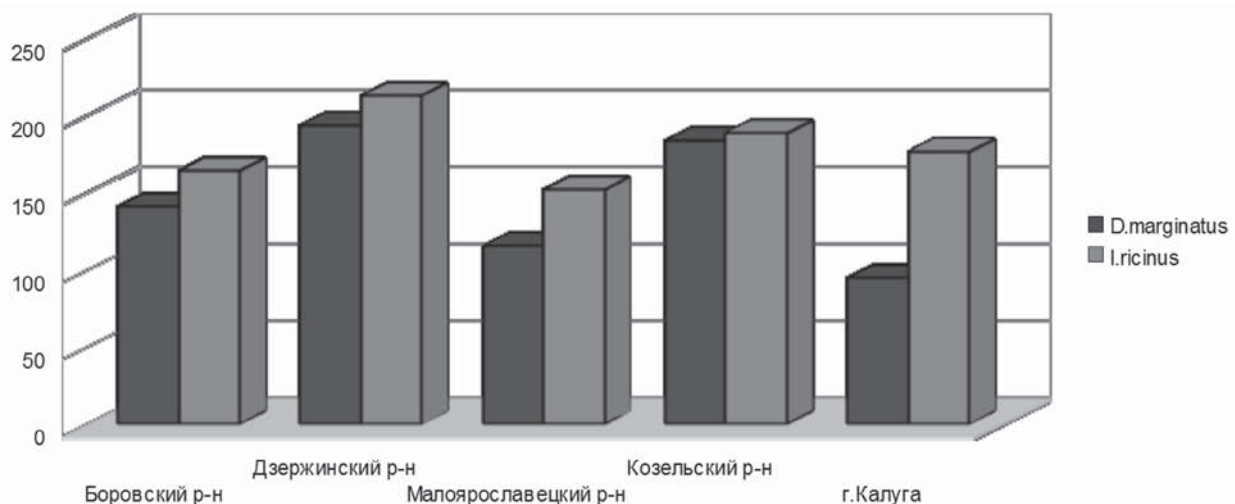


Рис. 1. Распространение иксодовых клещей *D. reticulatus* и *I. ricinus* по территориальному признаку в некоторых районах Калужской области в 2010 году

на 10-15 минут. В это время клещи устремлялись к наблюдателю, нападая на ноги.

4. При низкой численности клещей использовался сбор иксодовых клещей на живую приманку (собаку). Для этой цели животное предварительно освобождалось от клещей, а затем выпускалось на обследуемый участок, в конце «прогулки» животное осматривалось на наличие клещей.

Клещей собирали на маршрутах, в разных биотопах: в пойменных лесах по опушкам, поросшим балкам, лесополосам, по обвалованиям оросительных систем, вдоль дачных участков, на территориях детских оздоровительных лагерей и базах отдыха и т. д., непосредственно с растительности и почвы. Маршруты прокладывали по методу случайной выборки. Длина маршрута не превышала 1 км.

Пойманных клещей складывали по 20 штук в лабораторные пробирки и закрывали ватно-марлевыми пробками. Чтобы клещи не высохли, в каждую пробирку клали несколько свежесорванных травинок.

Для определения вида имаго клещей пользовались бинокулярной лупой, иногда микроскопом МБС-1. С этой целью живые клещи помещались на столик бинокуляра на специальную пробку или фильтровальную бумагу. Детали анатомо-физиологического строения были хорошо видны при увеличении от 30 до 120 раз с обязательных сильным освещением клещей.

При определении видовой принадлежности собранных иксодовых клещей использовали определители Б.И. Померанцева (1950), Н.А. Филипповой (1966), а также по определителю, представленному в Атласе В.Н. Шевкопляса (2008) и Атласу иксодоидных клещей И.М. Ганиева и А.А. Аливердиева (1968).

Результаты исследований. Анализ данных собственных исследований по названным районам показал, что на территории Калужской области обитает всего 2 вида клещей семейства Ixodidae, относящихся к 2 родам: *Ixodes* (*I. ricinus* (Linnaeus, 1758)) и *Dermacentor* (*D. reticulatus* (Fabricius, 1794)).

На территории Калуги обнаружены следующие роды клещей: *D. marginatus* – 44 самки, 31 самец, 20 нимф; *Ixodes ricinus* – 76 самок, 46 самцов, 54 нимфы. На территориях Дзержинского, Козельского, Малоярославецкого, Боровского районов обнаружены вышеперечисленные роды клещей в следующем численном различии по половому признаку и фазам развития: *D. marginatus*: 84 самки, 63 самцов, 92 нимфы; *Ixodes ricinus*: 214 самок, 151 самец, 110 нимф.

Всего найдено 239 особей *D. reticulatus* и 475 особей *I. ricinus*.

Результаты сбора клещей показали, что в 2010 году все исследуемые 4 района неблагополучны по иксодовым клещам. Проанализировав полученные данные, видно, что по степени заклещёванности выделяются Дзержинский и Козельский районы, которые отличаются наибольшим преобладанием лесистой зоны и неровным ландшафтом и менее урбанизированы, что нельзя сказать о Боровском и Малоярославецком районах. Боровский район отличается холмистыми участками, при том, как Малоярославецкий район относительно плоский, с чем мы и связываем наименьшее количество найденных клещей. В самом г. Калуга клещи обнаруживались в основном на окраинах города, где меньше развита промышленная зона, и в ветеринарных клиниках с животных, привезенных с периферийных частей города.

Анализируя рисунок, можно сделать вывод, что в 2010 году по паразитированию иксодовых клещей лидировал Дзержинский район. На последнем месте оказался Малоярославецкий район. Самое меньшее количество иксодовых клещей вида *I. ricinus* нами обнаружено в пригороде г. Калуги.

D. reticulatus паразитирует круглый год, но главным образом весной и осенью. У самца тело яйцевидной формы, не резко суженное в передней трети. Эмалевая пигментация не полностью покрывает спинной щиток, конечности и хоботок. Пунктировка неравномерная — мелкая и крупная. Цервикальные бороздки глубокие, продолжают в виде поверхностных линий значительно дальше уровня глаз. Глаза краевые, плоские. Основание хоботка с широкими тупыми корнуа. Пальпы с закругленными тупыми краями. Перитрема удлинено-овальная, с загнутым спинным отростком, каемка со спинным утолщением. Самка продолговато-овальной формы, с сердцевидным щитком вокруг глаз, цервикальных бороздок и медиального поля темно-коричневые пятна без эмалевого пигмента. Пунктировка и глаза, как у самца. Основание хоботка с тупым корнуа и овальными, расходящимися впереди, поровыми полями. Перитрема с заостренным отростком, хитиновая каемка со спинным утолщением [2].

Самок и нимф собрано почти равное количество (35,3% самок, 38,8% нимф), предположительно в связи с тем, что данный вид паразитирует круглый год.

I. ricinus небольшие. Хоботок, ноги и спинной щиток темно-коричневые, глянцевые. Щиток равномерно покрыт мелкой пунктировкой и редкими тонкими светлым волосками. Ноги прикреплены к передней трети тела. Хоботок длинный, на гипостоме нижние зубцы узкие, их вершины направлены назад и не выступают за его основание.

У самца тело овальной формы, слегка суженное впереди, спинной щиток с хорошо выраженным краевым валиком. Основание хоботка с дорсальной стороны с прямым заднеспинным краем без выступов (корнуа) по углам. Пальпы прилегают к гипостому неплотно. Скапулы хорошо развиты. Перитрема крупная, кругловато-овальная. У самок спинной щиток кругловато-овальный с едва заметными боковыми и цервикальными бороздками. Тело в средней части с хорошо заметным переухватом. Хоботок при сложенных пальпах имеет форму треугольника с коротким широким основанием, без дорсальных корнуа; заднеспинной край его вогнут вовнутрь. Поровые поля узкие, вытянутые. Половое отверстие дугообразное, лежит на уровне четвертой пары кокс. Перитрема крупная, неправильно-округлая, слегка вытянутая [2].

Взрослые особи паразитируют весной, летом и осенью, личинки и нимфы — летом. По нашим данным, собрано 45,2% самок и 22,9% нимф, нимф меньше, т. к. они паразитируют только летом.

Заключение

По полученным данным, *I. ricinus* собрано на 236 особей больше, чем *D. reticulatus*, вследствие чего вид *I. ricinus* можно назвать доминирующим. Возможно, в связи с тем, что данный вид более влаголюбивый, его ареал приурочен в основном к лесным участкам с неровным ландшафтом, что и характерно для Калужской области, а в нашем исследовании таковыми являются Дзержинский, Козельский районы, также Боровский и Малоярославецкий. Лидирование Дзержинского и Козельского районов мы оправдываем меньшей урба-

низацией и отдаленностью от областного центра этих районов, нежели Боровского или Малоярославского. В самой Калуге клещи обнаруживались в основном на окраинах города, где меньше развита промышленная зона, и в ветеринарных клиниках с животных, привезенных с периферийных частей города.

Список литературы:

1. Алексеев А.Н., Кондрашова З.Н. Организм членистоногих как среда обитания возбудителей. – Свердловск: Уральск. науч. центр АН СССР, 1985, 181 с.
2. Ганиев И.М., Аливердиев А.А. Атлас иксододных клещей. – М.: Колос, 1968. – С. 21-22; 15-16.
3. Щелканов М.Ю., Аристова В.Н., Куликова Л.Н. и др. Распространение иксодовых клещей *Rhipicephalus pumilio* Sch., 1935 на территории Северо-Западного Прикаспия: Мат. Межд.

научн. конф. (Краснообск, 30 июня 2004 г.). – Новосибирск: РАСХН, Сиб. отд., Мин-во с/х РФ, Гос. научн. учреждение, Ин-т эксперим. ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, Ин-т вет. медицины (НГАУ), 2004. – С. 290-292.

4. Малюфеева Н.А., Акбаев М.Ш. Распространение иксодовых клещей в Рязанской области // Ветеринария, 2006, №2. – С. 36-39.

5. Христиановский П.И., Быстров И.В., Белименко В.В. и др. Методические рекомендации по выявлению природных очагов пироплазмозов животных. – Оренбург: Изд. центр ОГАУ, 2009. – С. 14-15.

6. Сбор, учёт и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых болезней: Методические указания. – М., 2002.

Контактная информация:
8 (495) 377-69-87 (служ.)

УДК 619:616.995.421-085.28

Т.Т. МАДИЯРОВ, Ф.И. ВАСИЛЕВИЧ

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

АКАРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ПУРОФЕНА В ОТНОШЕНИИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ

В статье представлены экспериментальные данные по изучению акарицидной активности нового отечественного препарата Пурофен в отношении клещей сем. Ixodidae и его влияния на организм крупного рогатого скота.

Ключевые слова: пулофен, иксодовые клещи, акарицидная активность, пулон, гематологические и биохимические показатели.

T.T. MADIYAROV, F.I. VASILEVICH

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

THE CONTROL OF IXODID TICKS ON THE USE ACARICIDE PUROPHEN

The article presents the experiment data of the control ixodid ticks (Ixodidae) on the use new Russian acaricid purophen and have influence on organism cattle.

Key words: purophen, ixodid ticks, acaricid active, pouren, haematological and biochemical index.

За последние годы достигнуты определенные успехи в борьбе с иксодовыми клещами с помощью различных химических средств, однако значительным представлением к применению акарицидов является быстрая выработка у клещей резистентности.

Кроме того, срок ожидания в отношении использования молока после обработки животных составляет 1–2 недели.

В этой связи актуальной задачей является разработка и изыскание эффективных и избирательно действующих препаратов, рациональных форм и методов их практического применения для борьбы с клещами-переносчиками возбудителя бабезиоза крупного рогатого скота с учётом сезонности и зональных особенностей переносчиков, а также ландшафтных зон и биогеохимических провинций.

Цель и задачи — изучить эффективность нового отечественного акарицида пулофена против иксодовых клещей в условиях южного региона республики Казахстан.

Материалы и методы. Для оценки акарицидной активности пулофена и изучения его контактного действия на клещей были подобраны опытные и кон-

трольные группы крупного рогатого скота в возрасте 10–12 месяцев по 10 голов в каждой, при этом контролем служили животные, не подвергшиеся обработке. Всего было сформировано четыре группы животных. Перед обработками животные осматривались на наличие клещей с учётом их мест локализации и степени насыщения. Интенсивность поражения составляла от 1 до 15 иксодовых клещей на одном животном.

Препарат применяли в виде пулона методом поливания кожи вдоль позвоночного столба с помощью шприца Жанэ в дозе 2 мл, 2,5 мл и 3 мл на 10 кг массы тела. Животных оставляли на привязи до полного их освобождения от клещей.

Результаты опытов учитывали с начала через 12-24-48-72 часа после обработки и далее ежедневно путём тщательного осмотра поверхности тела крупного рогатого скота на наличие клещей. При этом учитывали состояние клещей на кожном покрове животных, а также регистрировали время их гибели и отпадения.

Результаты исследований. Обследование животных, обработанных пулофеном в дозе 3 мл/10 кг массы тела, показало, что данная доза является наиболее

Акарицидная активность пурофена в производственных условиях

Доза препарата, мл/10 кг массы тела	Количество животных в группе, гол.	Гибель иксодовых клещей через ... часов			
		12	24	48	72
2	10	28,1	32,5	44,8	57,2
2,5	10	35,2	43,7	73,2	82,6
3	10	72,1	94,2	100	-

Клинико-гематологические и биохимические показатели крупного рогатого скота до и после применения пурофена в дозе 3 мл/10 кг массы тела

Исследуемый показатель	До применения препарата	5-е сутки	12-е сутки	19-е сутки	30-е сутки
Т, °С	38,5±0,17	38,6±0,20	38,2±0,17	38,24±0,21	38,32±0,12
П, уд./мин.	67,21±0,57	66,1±0,66	69,5±0,81	71,2±0,51	70,9±0,27
Д, д.дв./мин.	20,31±0,57	21,25±0,55	22,17±0,81	22,30±0,43	21,19±0,85
Эритроциты, млн/мкл	6,56±0,17	6,47±0,19	6,55±0,16	6,51±0,15	6,43±0,17
Лейкоциты, тыс./мкл	8,31±0,62	8,62±0,41	8,43±0,42	8,54±0,50	8,39±0,72
Гемоглобин, г/л	110,2±1,6	111,5±2,3	110,7±1,8	110,5±1,3	111,1±1,9
Общий белок, г%	8,31±0,15	8,16±0,17	8,21±0,19	8,51±0,12	8,38±0,18
Альбумины, %	42,31±0,27	42,02±0,25	43,31±0,22	44,15±0,36	45,29±0,19
Глобулины, %					
α-глобулины	17,13±0,16	16,25±0,18	16,90±0,11	15,82±0,21	16,37±0,12
β-глобулины	14,22±0,16	14,31±0,21	13,92±0,22	13,76±0,19	14,16±0,10
γ-глобулины	25,3±0,23	24,59±0,18	26,12±0,25	27,02±0,10	26,91±0,23
АСТ, мЕ/л	73,56±3,5	72,9±2,8	71,62±4,1	73,21±2,4	72,33±2,4
АЛТ, мЕ/л	23,7±2,6	23,9±2,5	22,19±2,6	22,98±3,1	23,1±2,2

эффективной в отношении иксодовых клещей, обеспечивая через 48 часов 100%-ную их гибель, в то время как акарицидная эффективность препарата уже через 12 часов составила 72,1 %, а через сутки после обработки 94,2 %.

За данный период времени гибель клещей на контрольных животных мы не регистрировали.

Учитывая, что количество клещей на крупном рогатом скоте не бывает строго постоянным, мы считаем, что обработку животных пурофеном следует проводить с первых дней начала пастбищного сезона до третьей декады июня и с конца первой – начала второй декады августа и до постановки на стойловое содержание.

Изучая влияние пурофена на организм животного, мы установили, что на 5-е сутки среднее количество эритроцитов в крови животных составило 6,47±0,19 млн/мкл, лейкоцитов — 8,62±0,41 тыс./мкл, а гемоглобина — 111,5±2,3 г/л. Достоверной разницы в биохимических показателях крови по сравнению с таковыми, регистрируемыми до применения препарата, мы также не установили. Так, количество общего белка составило 8,16±0,17 г%, альбуминов — 42,02±0,25 %, α-глобулинов — 16,25±0,18 %, β-глобулинов — 14,31±0,21 %, γ-глобулинов — 24,59±0,18 %. На этом фоне клинические показатели у животных находились в пределах физиологических норм, а уровень ферментативной активности АСТ составил 72,9±2,8 мЕ/л и АЛТ 23,9±2,5 мЕ/л.

На 12-е сутки количество эритроцитов составило 6,55±0,16 млн/мкл, лейкоцитов — 8,43±0,42 тыс./мкл и гемоглобина — 110,7±1,8 г/л. Что касается изучаемых биохимических показателей крови, то каких-либо значительных колебаний в белковом спектре сыворотки крови, а также в уровне ферментативной активности трансаминаз установлено не было. Так, как видно из табл. 2 уровень общего белка составил 8,21±0,19 г%, альбуминов — 43,31±0,22 %, α-глобулинов — 16,90±0,11 %, β-глобулинов — 13,92±0,22 %, γ-глобулинов — 26,12±0,25 %, активность АСТ — 71,4±2,9 мЕ/л и АЛТ — 22,19±2,6 мЕ/л.

На 30-е сутки количество эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина составило соответственно 6,43±0,17 млн/мкл, 8,39±0,72 тыс./мкл и 111,1±1,9 г/л. На этом фоне уровень общего белка составлял 8,38±0,18 г%, альбуминов — 45,29±0,19 %, α-глобулинов — 16,37±0,12 %, β-глобулинов — 14,16±0,10 %, γ-глобулинов — 26,91±0,23 %, активность АСТ — 72,33±2,4 мЕ/л, а АЛТ — 23,1±2,2 мЕ/л.

Таким образом, изучение клинико-гематологических и биохимических показателей крови у крупного рогатого скота при двукратном применении пурофена в дозе 3 мл/10 кг массы тела методом поливания кожи вдоль позвоночного столба с интервалом 18 дней показало, что данный препарат в установленной нами дозе и кратности применения не оказывает неблагоприятного влияния как на клиническое состояние животных, так и морфологический и белковый составы крови, а

также на ферментативную активность АСТ и АЛТ, а следовательно, не вызывает нарушений функциональной активности органов и систем организма животных.

Изложенное выше в совокупности с полученными нами положительными результатами по изучению акарицидной активности пурофена позволяют рекомендовать данный препарат в дозе 3 мл/10 кг массы тела животного методом поливания кожи вдоль позвоночного столба для борьбы с клещами-переносчиками возбудителя бабезиоза крупного рогатого скота.

Заключение. Пурофен пурон в дозе 3 мл/10 кг массы тела показал 100%-ную эффективность против иксодовых клещей, паразитирующих у крупного рогатого скота. Клещи погибали в течение 48 часов, при этом персистенция препарата составила 18–19 суток.

Препарат в данной дозе не оказывал влияния на клинико-гематологические и биохимические показатели крови у животных.

Список литературы

1. Акбаев М.Ш. *с соавт.* Паразитология и инвазионные болезни животных: Учебник. – М.: КолосС, 2008, 775 с.
2. Арисов М.В. Паразитозы крупного рогатого скота в среднем, нижнем Поволжье и новые химические средства борьбы с ним: Автореф. докт. дисс. – Н. Новгород, 2008, 41 с.
3. Василевич Ф.И. Эффективность пурофена при демодекозе КРС: Сб. науч. тр. // Всерос. НИИ вет. энтомологии и арахнологии, 2006, № 48. – С. 26-28.
4. Василевич Ф.И. Изучение сезонного распространения клещей-переносчиков возбудителя бабезиоза КРС // Ветеринарный врач, 2010, № 4. – С. 63-64.
5. Удавлиев Д.Н. Инсектоакарицидные средства на основе перетройдов и циодрина: Автореф. докт. дисс. – М., 2001, 46 с.
6. Ятусевич И.А. Противопаразитарные препараты на основе макроциклических лактонов: Автореф. докт. дисс. – Минск, 2010, 43 с.

Контактная информация:
Тел.: 8 (495) 377-69-97 (служ.).

УДК 619:616.99:619:576.8

Л.Ю. ГАВРИЛЬЕВА

ГНУ «Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии», Якутск

КОРРЕКЦИЯ ЭНТЕРОБИОЦЕНОЗА ЖЕРЕБЯТ, ЗАРАЖЕННЫХ КИШЕЧНЫМИ НЕМАТОДОЗАМИ, ПРОБИОТИКОМ «САХАБАКТИСУБТИЛ» ПРИ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ

Установлено, что у жеребят табунного содержания при дегельминтизации препаратом «Эквисект» происходит развитие кишечного дисбактериоза, сопровождающегося уменьшением количества лакто- и бифидобактерий и увеличением уровня условно-патогенных микроорганизмов. Для нормализации энтеробиоценоза дегельминтизированных жеребят рекомендовано использовать пробиотик «Сахабактисубтил».

Ключевые слова: жеребята, табунное содержание, гельминты, дисбактериоз, антгельминтный препарат, пробиотик, микробиоценоз, желудочно-кишечный тракт, коррекция.

L.Yu. GAVRIL'eva

Yakut scientific research institute of agriculture, Yakutsk

CORRECTION OF ENTERO BIOCEINOSIS OF FOALS INFECTED WITH INTESTINAL NEMATODES BY PROBIOTIC «SAKHABAKTISUBTIL» AT DEHELMINTHIZATION

Found that in herd keeping dehelminthized foals with drug "Ekvisekt" the intestinal dysbiosis is development accompanied by decrease in the number of bifidobacteria and lactobacilli and increasing levels of opportunistic pathogens. To normalize the entero biocenosis of dehelminthized foals recommended using probiotics «Sakhabaktisubtil».

Key words: foals, herd keeping, helminths, bacteria overgrowth, anthelmintic drug, probiotic, microbiocenosis, gastrointestinal tract, correction.

В хозяйствах Республики Саха (Якутия) существенным фактором, сдерживающим рост поголовья и снижающим продуктивность животных, являются гельминтозы лошадей, которые имеют довольно широкое распространение [2]. Нематоды, заселяя желудочно-кишечный тракт лошадей на всем протяжении, вызывают не только морфофункциональные изменения со стороны этой системы, но и нарушают микробную экосистему, в частности, в желудочно-кишечном тракте увеличивается число факультативной микрофлоры (клостридии, протей, патогенные стафилококки и ки-

шечные палочки, гемолитические стрептококки) при одновременном, резком уменьшении нормальной, облигатной микрофлоры (лактобактерии, бифидобактерии, непатогенные кокковые формы и т.д.). Отмеченные изменения состава микрофлоры кишечника у инвазированных нематодами животных характерны для дисбактериоза [3].

В Якутии на основе штаммов бактерий *Bac. subtilis* «ТНП-3» и «ТНП-5» разработан препарат-пробиотик «Сахабактисубтил», который обладает выраженным антагонистическим действием в отношении условно-

Таблица

**Динамика микрофлоры
желудочно-кишечного тракта жеребят
при совместном применении препарата
«Эквисект» и пробиотика «Сахабактисубтил»**

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, КОЕ/г, М±m	
	До применения препаратов «Эквисект»+ «Сахабактисубтил»	После применения препаратов «Эквисект»+ «Сахабактисубтил» на 7 сутки
МАФАНМ	$(2,4 \pm 1,3) \cdot 10^5$	$(3,7 \pm 1,8) \cdot 10^5$
Лактобактерии	$(1,4 \pm 9,2) \cdot 10^4$	$(3,1 \pm 2,5) \cdot 10^4$
Эшерихии: лактозоположительные лактозоотрицательные	$(3,6 \pm 1,1) \cdot 10^4$ $(2,03 \pm 4,3) \cdot 10^5$	$(1,02 \pm 5,2) \cdot 10^6$ $(2,9 \pm 2,3) \cdot 10^4$
Стафилококки: патогенные непатогенные	$(5,6 \pm 4,8) \cdot 10^{-2}$ $(1,7 \pm 9,2) \cdot 10^5$	$(3,2 \pm 2,7) \cdot 10^{-2}$ $(5,5 \pm 3,3) \cdot 10^5$
Бифидобактерии		
10^{-1}	+++	+++
10^{-3}	++	+++
10^{-6}	+	+++
Микроскопические грибы: Mucor ramosissimus Aspergillus nidulans Fusarium dimerum	н/р н/р н/р	н/р н/р н/р

Примечание: «н/р» — нет роста бактерий и микроскопических грибов; «+» — единичный рост бактерий и микроскопических грибов; «++» — умеренный рост бактерий и микроскопических грибов; «+++» — интенсивный рост бактерий и микроскопических грибов.

патогенных и патогенных микроорганизмов (бактерии, грибы и вирусы), интерферониндуцирующей активностью, иммуностимулирующим эффектом, способностью продуцировать ферменты и стимулировать рост и развитие полезной микрофлоры кишечника [4].

В связи с этим необходимо дальнейшее изучение влияния препаратов, используемых для дегельминтизации, на энтеробиоценоз организма, а также методов их коррекции пробиотиками.

Целью исследований было изучение влияния антигельминтика «Эквисект» на энтеробиоценоз жеребят, а также возможности использовать пробиотик «Сахабактисубтил» в качестве средства, корректирующего качественный и количественный составы микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Материалы и методы. Работа проводилась в коневодческом хозяйстве «Дохсун» Центральной Якутии, лабораториях паразитологии и микробных препаратов Якутского научно-исследовательского института сельского хозяйства.

Для исследования по принципу аналогов были отобраны 10 голов молодняка лошадей в возрасте до 1 года табунного содержания, спонтанно зараженные параскаридозом, стронгилятозами и оксиурозом. Средняя живая масса животных составляла $100,2 \pm 3,2$ (M±m). Зараженность жеребят гельминтами устанавливалась трехкратным овоскопическим исследованием. Животных разделили на две группы — контрольную (n=5) и опытную (n=5). Опытная группа получала в течение

6 суток смесь пробиотика «Сахабактисубтил» с овсом в дозе 10 мл ($50 \cdot 10^9$ КОЕ/Vac. subtilis), 1 раз в сутки, на 3-и сутки проводили дегельминтизацию пастой «Эквисект» внутрь, однократно, из расчета 200 мг/кг массы тела по ДВ. В контрольной группе проведена дегельминтизация пастой «Эквисект» без применения пробиотика «Сахабактисубтил». У экспериментальных животных до лечения и на 7-е сутки после дегельминтизации брали пробы фекалий для проведения копроовоскопических исследований по методу Фюллеборна и Бермана [1] и бактериологических исследований. Материалом для бактериологических исследований служили свежесыводенные фекалии отдельных животных. Все микробиологические манипуляции проводили с соблюдением правил стерильности. Фекалии лошадей разводили физиологическим раствором в соотношении 1:9. После гомогенизации полученную взвесь подвергали последовательным десятикратным разведениям со сменой пипеток в физиологическом растворе от 10^1 до 10^6 . Затем по 0,1 мл каждого разведения засеивали на чашки с твердыми питательными средами, а по 1 мл — в пробирки с полужидкой питательной средой. Для определения количества МАФАНМ (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов) использовали мясопептонный агар (МПА). Для выделения и количественного учета бактерий использовали следующие среды: Эндо — для энтеробактерий, бифидум-среда — для бифидобактерий, лактобакагар — для молочнокислых микроорганизмов, Байрд-Паркера — для стафилококков, Чапека — для микроскопических грибов. Учет результатов посевов проводили через 24 ч для бактерий и 5 дней для грибов. Количество микроорганизмов определяли в колониеобразующих единицах (КОЕ) в 1 г. Родовую и видовую идентификацию микроорганизмов проводили согласно «Справочнику по микробиологическим и вирусологическим методам исследований», «Определителю санитарно значимых микроорганизмов», «Определителю бактерий Берджи» [5, 6, 7].

Математическую обработку полученных данных осуществляли с использованием прикладной программы Snedecor, Microsoft Excel. Результаты опытов подвергли также статистической обработке по методу Стьюдента.

Результаты исследования. В результате проведенных микробиологических исследований фекалий жеребят препаратом «Эквисект» микрофлора желудочно-кишечного тракта жеребят до дегельминтизации составляла: количество мезофильно-аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ) — $(2,7 \pm 6,4) \cdot 10^5$ КОЕ/г, лактобактерий — $(1,5 \pm 1,4) \cdot 10^4$ КОЕ, количество непатогенных стафилококков — $(1,9 \pm 3,8) \cdot 10^3$ КОЕ/г, эшерихий лактозоположительных — $(4,9 \pm 1,1) \cdot 10^5$ КОЕ/г, лактозоотрицательных — $(8,0 \pm 1,3) \cdot 10^3$ КОЕ/г. Отмечается интенсивный рост бифидобактерий и отсутствие патогенных стафилококков и плесневых и токсигенных видов грибов.

После дегельминтизации на 7 сутки после применения препарата «Эквисект» количество лактобактерий уменьшилось до $(1,9 \pm 6,4) \cdot 10^3$ КОЕ/г, непатогенных стафилококков — до $(6,2 \pm 3,2) \cdot 10^2$ КОЕ/г, лактозоположительных эшерихий — $(2,2 \pm 1,3) \cdot 10^4$ КОЕ/г, в то же время число патогенных стафилококков увеличилось до $(3,5 \pm 5,6) \cdot 10^4$ КОЕ/г, лактозоотрицательных эшерихий — $(3,8 \pm 1,7) \cdot 10^4$ КОЕ/г, МАФАНМ до $(1,8 \pm 6,4) \cdot 10^5$ КОЕ/г. Отмечен единичный рост бифидобактерий и насыщен-

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КОШЕК

В данной статье показаны клинические проявления аденокарциномы поджелудочной железы у кошек. Показаны факторы риска аденокарциномы поджелудочной железы у кошек: возраст, пол, изменение гормонального фона после кастрации, а также наличие в анамнезе хронического панкреатита.

Ключевые слова: аденокарцинома поджелудочной железы, рак поджелудочной железы, хронический панкреатит, диспепсия, иктеричность.

D.I. GILDIKOV, V.N. BAYMATOV

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

FEATURES OF DIAGNOSTICS ADENOCARCINOMA A PANCREAS AT CATS

In this article clinical manifestations adenocarcinoma a pancreas at cats are shown. Risk factors adenocarcinoma a pancreas at cats are shown: age, sex, change of a hormonal background after castration, and also existence in the anamnesis of chronic pancreatitis.

Key words: adenocarcinoma pancreas, cancer of a pancreas, chronic pancreatitis, dispepsiya, ikterus.

Патологии поджелудочной железы (ПЖ) у животных вызывают в последнее время все больший интерес. Это связано с увеличением роста её заболеваний, что обусловлено нарушением кормления, гиподинамией, с открытием возможностей «увидеть» ПЖ при помощи ультразвукового и эндоскопического исследований, компьютерной томографии и др., а также с лучшим пониманием патогенеза и патоморфоза её заболеваний [1, 3, 7].

У кошек установлено развитие аденокарциномы поджелудочной железы (АПЖ), что сообщается в работе И.П. Кондрахина (2007). АПЖ — железистый рак, развивающийся из эпителия слизистой оболочки выводящих протоков [2]. У кошек АПЖ — это довольно редкая, сложно диагностируемая патология, встречающаяся в практике ветеринарного врача, с высоким процентом метастазирования — до 81 % случаев [8].

Целью исследования было установление клинических проявлений у кошек при АПЖ и использование их в диагностике.

Материалы и методы. В эксперименте находились 22 кошки, из которых 12 особей контрольные и 10 опытные. Исследования проводили с 2007 по 2012 гг. на базе

кафедры патологической физиологии им. В.М. Коропова ФГБОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И.Скрябина. Диагноз АПЖ ставили на основании клинической симптоматики — анорексии и кахексии, рвоты, коликам, диареи, иктеричности слизистых оболочек и кожного покрова. Также проводили биохимические и гематологические исследования венозной крови, делали общий клинический анализ кала, ультразвуковое исследование брюшной полости, рентгенографию, лапаротомию и гистологические исследования образцов ткани ПЖ.

Результаты исследований. Установлено, что средний возраст кошек с диагностируемой АПЖ составил 14,8 года. Данному заболеванию большей степени подвержены кастрированные коты (n = 6), в меньшей — кастрированные кошки (n = 3) и в редких случаях некастрированные самцы (n = 1).

Выявлено, что АПЖ чаще регистрируется у беспородных особей кошек (n = 4) и метисов (n = 2), также в единичных случаях отмечены случаи заболевания у британской, персидской, сиамской пород и у представителя турецкого вана.

В табл. 1 показано, что у больных кошек с АПЖ часто встречаются диспептические явления: анорексия, рвота, кахексия, иктеричность и общая слабость. При пальпации эпигастральной области, особенно у худых животных и при увеличении в размерах ПЖ, удается обнаружить её бугристую поверхность плотной консистенции. При этом в 40 % случаях отмечена её болезненность.

У значительного числа больных кошек с АПЖ зарегистрированы нарушения моторики желудочно-кишечного тракта: в 40 % случаев констипация и в 30 % диарея. В единичных случаях отмечены зуд и повреждение кожного покрова, а также скопление жидкости в брюшной полости.

В табл. 2 приведены данные о влиянии АПЖ на процессы пищеварения у кошек. Следует выделить изменение цвета каловых масс, наличие резкого и зловонного запаха, присутствие в кале крахмала, нейтральных жиров и жирных кислот, а также наличие неизмененных мышечных волокон и растительной клетчатки.

Таблица 1

**Клинические проявления аденокарциномы
поджелудочной железы у кошек**

Клинический симптом	Количество животных, гол.	Процентное соотношение
Анорексия	9	90
Кахексия	5	50
Слабость	5	50
Иктеричность	5	50
Болезненность в эпигастральной области	4	40
Рвота	7	70
Констипация	4	40
Диарея	3	30
Зуд кожного покрова	2	20
Асцит	1	10

Таблица 2

Клинический анализ кала у кошек с аденокарциномой поджелудочной железы

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа (животные с АПЖ)	Количество животных, гол.	Процентное соотношение
<i>Физико-химические свойства</i>				
Консистенция	Оформленная	Жидкая	3	30
		Плотная	4	40
		Мазеобразная	3	30
Цвет	Коричневый	Серо-коричневый,	8	80
		Серо-белый	2	20
Запах	Не резкий	Резкий, зловонный	4	40
рН	6,5 – 7,5	6,0	2	20
		6,5 – 7,0	8	80
Скрытая кровь	–	+	1	10
Билирубин	–	–	5	50
		+	5	50
Стеркобилин	+	+	8	80
		–	2	20
Крахмал	–	+	10	100
<i>Микроскопическое исследование</i>				
Слизь	–	+	2	20
Эритроциты	0 – 2	2 – 4	1	10
Лейкоциты	1 – 2	2 – 4	1	10
Переваримость мышечных волокон корма	+	–	10	100
Переваримость растительной клетчатки	+	–	10	100
Жир	–	+	10	100
		–	10	100

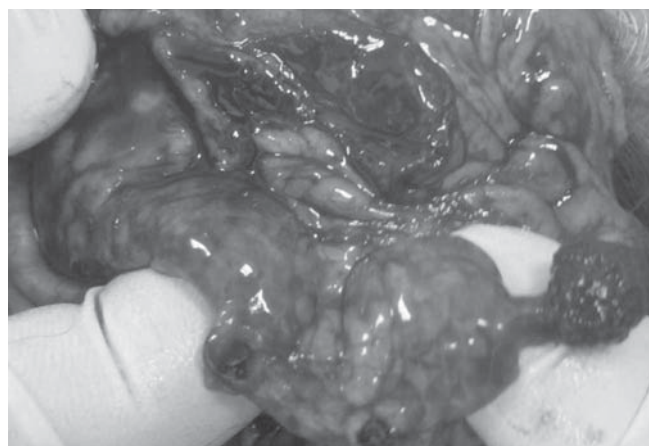
При лапароскопии и патологоанатомическом исследовании ПЖ увеличена в размерах, бугристая, цвет ее варьировал от светло-красного до серого и бурого (рис.). Нередко ткань ПЖ была некротизирована и сморщена, также отмечали наличие абсцессов.

Полученный материал показывает, что АПЖ встречается преимущественно у старых кошек. Фактором риска в развитии АПЖ у кошек является их пол. В исследовании установлено, что коты чаще болеют АПЖ, чем кошки. Изменения гормонального фона и обмена веществ после проведенной кастрации предрасполагают к появлению у них рака ПЖ. Выявленная диспропорция подтверждается исследованиями отечественных и зарубежных коллег [1, 7, 9].

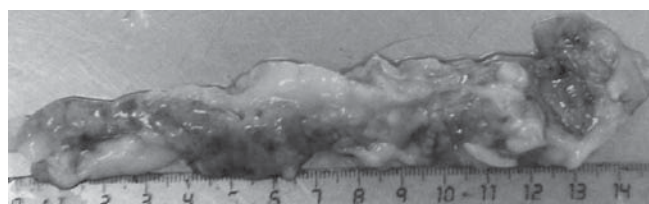
АПЖ сопряжена с хроническим панкреатитом, что не противоречит работам отечественных и зарубежных исследователей [6, 10]. Симптоматика при раке ПЖ обусловлена хроническим панкреатитом. Преобладают нарушения пищеварения: жидкий с резким или зловонным запахом стул, в котором обнаруживаются неизменные мышечные волокна и клетчатка, частицы жира и жирных кислот. Данные расстройства характеризуются снижением экболической и гидрокинетической функции ПЖ.

Иктеричность слизистых оболочек и кожного покрова, а также появление в кале билирубина характеризуют сочетанное поражение ПЖ и гепатобилиарной системы при раке ПЖ. Известно, что желчные кислоты и их метаболиты обладают канцерогенными свойствами [7]. Спазм и отек общего выводного протока ПЖ и печени у кошек [5] приводят к затруднению оттока желчи и способствуют повышению давления в желчевыводящих протоках и увеличению желчного пузыря. Попавшая в панкреатический проток желчь способствует развитию внутриэпителиальной неоплазии [10].

Заключение. Таким образом, факторами риска в появлении аденокарциномы поджелудочной железы (АПЖ) у кошек являются их возраст, пол, изменение гормонального фона после кастрации, наличие в анамнезе хронического панкреатита. Клиническими проявлениями аденокарциномы поджелудочной железы у кошек



А



Б

Рис. Аденокарцинома поджелудочной железы у кошки

являются: диспепсия вследствие снижения функциональной активности поджелудочной железы, иктеричность слизистых оболочек и кожного покрова, а также увеличение размера желчного пузыря. Эти данные дают возможность делать заключение о наличии АПЖ у кошек, что следует подтвердить рентгенографией, ультразвуковым и морфологическим исследованиями.

Список литературы

1. Байматов В.Н., Мешков В.М., Жуков А.П., Ермолаев В.А. Клинический ветеринарный лексикон. – М.: КолосС, 2009.
2. Блохин Н.Н., Итин А.Б., Клименков А.А. Рак поджелудочной железы и внепеченочных желчных путей. – М.: Медицина, 1982, 270 с.
3. Кондрахин И.П. Эндокринные, аллергические и аутоиммунные болезни животных: Справочник. – М.: КолосС, 2007.

4. Найгер Р. Заболевания поджелудочной железы у собак и кошек. – М.: ПАЛЬМА-Пресс, 2003. – С. 5.
5. Ноздрачев А.Д. Анатомия кошки. – Л.: Наука, 1973. – С. 232.
6. Паклина О.В. Морфогенез хронического панкреатита и протоковой аденокарциномы поджелудочной железы: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – М., 2009.
7. Скуя Н.А. Заболевания поджелудочной железы. – М.: Медицина, 1986. – С. 5-17.
8. Andrews L.K. Tumors of the exocrine pancreas / In: Holzworth J. / Ed: Diseases of the Cat. Philadelphia: WB Saunders, 1987. – P. 50
9. Garvey M.S., Zawie D.A. Feline pancreatic disease // Vet. din. North. Am. (sm. Anim. Pract.) 14, 1231, 1984.
10. Hruban R.H., Iacobuzio-Donahue C., Wilentz R.E. et al. Molecular pathology of pancreatic cancer // Cancer J., 2001. Vol. 7. – P. 251.

Контактная информация:
GildikovDmlv@mail.ru,
тел.: 8(926) 285 34 95

УДК 619:616.37

М.М. ГУСЕЙНОВ

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ЭНТЕРОСОРБЦИЯ ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают одно из ведущих мест в инфекционной заболеваемости 60–65 % всех случаев ОКИ регистрируется у молодняка, при этом особенно высока заболеваемость телят и поросят раннего возраста (до 70 %).

Исследованиями патологического материала больных и павших телят от острых кишечных инфекций в более чем 60 % случаях) выделяли *S. Enteritidis* и *E.coli*. Серологически устанавливали наличие антител против ротавирусной инфекции (20–70 % случаев).

При применении энтеросорбента полисорбин у больных телят отмечена быстрая динамика купирования симптомов интоксикации, нормализация характера испражнений и исчезновение патологических примесей по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: диарея, острые кишечные инфекции, телята, энтеросорбция, энтеросорбент, Полисорбин.

М.М. GUSEYNOV.

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I. Skryabin

НАЗВАНИЕ (EN)

Diarrheal diseases rank among the leaders in infectious disease-tion. 60-65 % of all cases of acute intestinal infections recorded in the young, with a particularly high incidence of calves and piglets early age (70 %).

Studies of pathological material from sick and dead calves from acute intestinal infections in over 60 % of cases) were isolated *S. Enteritidis* and *E.coli* ..Serologically established antibodies against rotavirus infection (20-70 % of cases).

In applying enterosorbent polysorb patients calves marked dynamics is fast relief of symptoms of intoxication, the nature of the normalization of bowel movements and the disappearance of pathological impurities compared to the control group

Key words: acute intestinal infection, calves, enterosobtsiya, enterosorbent, polysorb

В настоящее время в ветеринарной практике успешно применяется активный метод терапии — энтеросорбция. Это метод лечения различных заболеваний, основанный на способности энтеросорбентов связывать и выводить из организма различные экзогенные вещества, микроорганизмы и их токсины, эндогенные промежуточные и конечные продукты обмена. Энтеросорбенты — препараты, обладающие высокой сорбционной емкостью, не разрушающиеся в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и способные связывать экзо- и эндогенные вещества, которые входят в состав химуса и выделяются в полость ЖКТ через его стенки, путем ад- и абсорбции, ионообмена или комплексообразования.

Энтеросорбция является составной частью эфферентной терапии, т.е. группы лечебных мероприятий, конечной целью которых является прекращение действия токсинов различного происхождения и их элиминация из организма.

Основные требования, которым должны соответствовать энтеросорбенты, следующие:

- не обладать токсическими свойствами;
- быть нетравматичными для слизистых оболочек;
- хорошо эвакуироваться из кишечника;
- иметь хорошие функциональные (сорбционные) свойства;
- не вызывать дисбактериозов;
- иметь удобную лекарственную форму.

В ветеринарной практике применяется большое количество различных энтеросорбентов на основе как природных, так и химически синтезированных материалов. Проведенными нами исследованиями нового энтеросорбента полисорбина, наиболее соответствующим вышеизложенным требованиям, получены результаты его высокой эффективности. Препарат Полисорбин — энтеросорбент нового поколения, создан на основе высокодисперсной сурьмы, который обладает полифункциональными неселективными сорбционными свойствами, выпускается в виде порошка, размер частиц — от 5 до 20 нм.

Основное предназначение полисорбина — это выведение из организма токсинов. В просвете ЖКТ полисорбин связывает и выводит из организма эндогенные и экзогенные токсические вещества различной природы, включая микроорганизмы и микробные токсины, антигены, соли тяжелых металлов. Полисорбин сорбирует также некоторые продукты обмена веществ организма, в том числе избыток билирубина, холестерина и липидных комплексов, метаболитов азотистого обмена, вещества «средней молекулярной массы», ответственные за развитие метаболического токсикоза.

Полисорбин не всасывается в кишечнике и выводится из организма в неизменном виде, благодаря чему практически не имеет противопоказаний к применению.

Полисорбин применяли в дозе 100–200 мкг/кг массы тела в сутки в виде водной взвеси.

Для приготовления водной взвеси берут необходимое количество препарата, помещают в флакон, содержащий 100 мл воды, и тщательно перемешивают. Полученную взвесь препарата выпаивают за 1 час до или через 1–2 часа после кормления.

Материалы и методы. За 2009–2010 гг. исследовано 350 телят в хозяйствах Московской и Кировской областей. Для оценки эффективности препарата использовались клинические данные по оценке явлений интоксикации (обезвоживание, отказ от корма), выраженности клинических признаков заболевания (длительность диареи, наличие патологических примесей в фекалиях), по лабораторной оценке — использованы бактериологический и серологические методы.

Результаты исследований. Острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают одно из ведущих мест в инфекционной заболеваемости. 60–65% всех случаев ОКИ регистрируется у молодняка, при этом особенно высока заболеваемость телят и поросят раннего возраста (до 70%).

Исследованиями патологического материала от больных и павших телят (преимущественно — 56–80% случаев) выделяли такие этиологические агенты, как *Salmonella*, *E.coli*.

Серологически устанавливали наличие антител против ротавирусной инфекции (20–70% случаев).

Полиэтиологичность ОКИ у молодняка животных, рост резистентности бактерий к антибактериальным препаратам диктуют необходимость поиска новых и совершенствование имеющихся методов лечения при ОКИ.

Энтеросорбция при инфекционных заболеваниях является не только патогенетическим способом терапии, но и этиологическим, так как сорбенты способны поглощать не только эндо- и экзотоксины возбудителей, но и фиксировать на своей поверхности возбудителей бактериальной и вирусной природы, выключая их таким образом из патологического процесса. Способ-

ность энтеросорбентов связывать эндо- и экзотоксины возбудителей вносит существенный вклад в дезинтоксикацию макроорганизма. В этой связи целью работы: явилась оценка клинической эффективности препарата Полисорбин при ОКИ у молодняка КРС, сопровождающихся синдромом диареи.

Были выделены 2 группы телят: исследуемая группа № 1 — 25 телят в возрасте 2–7 дней, получавших наряду с традиционной базисной (в том числе антибактериальной) терапией препарат-энтеросорбент Полисорбин, и контрольная группа № 2 — 25 телят, по клинико-физиологическим показателям аналогичным 1-й группе, получавших только традиционную базисную (антибактериальную и специфическую гипериммунную сыворотку) терапию.

Оценка синдрома интоксикации. Исчезновение симптомов интоксикации в группе исследования полностью отмечено на 4-е сутки, с угасания на 1–2-е сутки; в группе контроля симптомы интоксикации сохранялись до 7-го дня, с угасания на 2–4-й день.

Динамика исчезновения диарейного синдрома в группе 1 в подавляющем большинстве к 3 суткам фекалий стал оформленным, в контрольной группе в 35% случаев сохранялся жидким до 8-го дня лечения. В группе 1 патологические примеси (слизь) исчезли к концу 2–3-х суток, в группе контроля сохранялись до 6-х суток.

Выводы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что:

1. При применении энтеросорбента Полисорбин у телят с ОКИ отмечены быстрая динамика купирования симптомов интоксикации, нормализация характера испражнений и исчезновение патологических примесей по сравнению с контрольной группой.

2. На фоне проводимой терапии в исследуемой группе достигнута лучшая санация кишечника от патогенных возбудителей.

3. Лечебное действие препарата Полисорбин связано с сокращением длительности течения инфекционного заболевания и более низкой стоимостью (сравнительно с аналогами), что позволяет предположить возможный положительный экономический эффект.

Метод энтеросорбции с применением препарата Полисорбин может быть рекомендован для лечения острых кишечных инфекций у телят, протекающих с синдромом интоксикации и диареи.

Список литературы

1. Плешакова В.И. и др. Диарейный симптомокомплекс (диагностика, лечение, профилактика): Методич. рекомендации. — Омск: Изд-во ИВМ ОмГАУ, 2010, 17 с.
2. Учайкин В.Ф., Молочный В.П. Инфекционные токсикозы у детей. — М., 2002.
3. Колова А.Е. Сравнительная оценка поглотительной способности полисорба ВП и зоокарба в отношении *E. coli* (шт. 113.3) в опытах *in vitro* // Новые фармакологич. средства в ветеринарии: Мат. XVI Межд. межвуз. науч.-практич. конф. — СПб, 2004. — С. 55–56.
4. Колова А.Е. Терапевтическая эффективность энтеросорбентов при диарее поросят бактериальной этиологии // Проблемы и перспективы свиноводства: Мат. межд. конф. по свиноводству (24–25 дек. 2004 г.). — Омск: Ом. гос. аграр. ун-т, 2005. — С. 132–135.
5. Урсова Н.И., Горелов А.В. Современный взгляд на проблему энтеросорбции. Оптимальный подход к выбору препарата // Русский мед. журнал, № 19, 2006.

Контактная информация:
Гусейнов М.М., тел. +7495 6385274:

М.В. БАТАЕВА, Л.А. ГНЕЗДИЛОВА, Т.Н. ПЕТРОВА
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАКТОБИФАДОЛА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПАТОЛОГИИ ПОСЛЕРОДОВОГО ПЕРИОДА У ОВЦЕМАТОК

Установлено, что применение овцематкам перед родами пробиотика Лактобифадол увеличивает показатели общей резистентности организма беременных животных, профилактирует патологии родов и послеродового периода, способствует рождению здорового жизнеспособного потомства.

Ключевые слова: овцы, пробиотик Лактобифадол, резистентность организма, патологии родов, профилактика.

M.V. BATAEVA, L.A. GNEZDILOVA, T.N. PETROVA
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

THE APPLICATION OF LAKTOBIFADOL FOR PREVENTION OF PATHOLOGY IN POSTPARTUM PERIOD IN EWES

The application of probiotic lactobifadol in ewes before the accouchement increases the general resistance of organism of the pregnant animal, prevents the pathology in accouchement and postpartum period, promotes the birth of healthy and viable posterity.

Key words: sheeps, probiotic laktobifadol, resistance of organism the pathology in accouchement, prevention.

Одной из причин бесплодия у овцематок является патология родов, которая встречается у 4,9–34% животных. Нарушение технологии содержания и кормления, дисбаланс параметров микроклимата животноводческих помещений, зооветеринарные мероприятия являются серьезными стресс-факторами для беременных овец [2].

Развитию акушерско-гинекологической патологии способствует нарушение нейрогуморального регулирования, обмена веществ, кроветворения, иммунной защиты, снижение естественной резистентности организма. Результат всего этого — аборт, патология родов, задержание последа, субинволюция матки, развитие внутриутробной гипоксии молодняка [3].

В последние годы в нашей стране и за рубежом в животноводстве возрос интерес к пробиотическим препаратам. Они во многих случаях позволяют улучшить процессы пищеварения, обмен веществ, продуктивность животных; повысить экономические результаты производства; добиться экологической безопасности продуктов. Все это обеспечивает на свободном рынке конкурентные преимущества. Особого внимания заслуживает пробиотик Лактобифадол. Он является источником пристеночной микрофлоры кишечника, включает высокоэффективные производственные штаммы: содержит в 1 г не менее 80 млн живых клеток бифидобактерий (*B. adolescentis*) и 1 млн живых лактобактерий (*L. acidophilum*). Именно эти микроорганизмы у здоровых животных преобладают в кишечнике, обеспечивают у жвачных животных активность рубца, высокую конверсию корма. Они вытесняют условно-патогенную микрофлору, что обеспечивает нормализацию микробного пейзажа желудочно-кишечного тракта и выращивание здоровых животных с хорошо развитой системой пищеварения, иммунной и других физиологических систем. В последние годы пробиотик Лактобифадол широко применяется жвачным животным (как крупному, так и мелкому рогатому скоту). В отличие от споровых микроорганизмов, которые в норме не характерны для микрофлоры рубца, лакто- и бифидобактерии препарата не только ее стимулируют, но и существенно улучша-

ют использование клетчатки и органического фосфора за счет высоких ферментативных свойств бактерий. Кроме того, микроорганизмы синтезируют органические кислоты и витамины, которые способствуют увеличению мясной и молочной продуктивности, улучшению обменных процессов в организме и повышению показателей иммунной системы [1].

Целью исследований являлась профилактика патологии родов и послеродового периода овцематок путем применения пробиотика Лактобифадол.

Перед нами была поставлена задача — оценить возможность использования пробиотика Лактобифадол для повышения естественной резистентности организма овец в период ягнения, профилактики патологий родов и послеродовых осложнений, а также для улучшения продуктивных качеств ягнят.

Материал и методы исследований. Из овцематок ставропольской породы возраста 1,5 года были сформированы опытная и контрольная группы по 15 голов в каждой. Проводили клинические, акушерско-гинекологические обследования животных.

В течение 30 дней до ягнения овцематкам опытной группы давали лактобифадол в дозе 0,2 г на кг массы тела; вторая группа являлась контрольной — животным не давали лактобифадол. У животных проводили контроль естественной резистентности организма, определяли неспецифические иммунные факторы местной защиты, проводили биохимический, физико-химический, морфологический анализы крови.

Результаты и обсуждение. Анализ результатов проведенных исследований показал, что применение лактобифадола не оказывает отрицательного влияния на организм животных до и после родов. Все показатели крови овец в процессе эксперимента находились в пределах физиологических норм. Установлено достоверное повышение количества эритроцитов в крови овцематок опытной группы в послеродовой период по сравнению с контролем. Данные сочетаются с уровнем гемоглобина, что подчеркивает усиление процессов кроветворения у животных после применения лактобифадола. Введение лигфола не провоцирует наруше-

Таблица

Результаты исследования крови овцематок при испытании препарата Лактобифадол

Группа	БАСК, %	ЛАСК, %	ФАК, %
Опытная — до родов	50,4±0,2*	31,33±1,05*	28,2±0,2*
Контроль — до родов	49,32±0,01	30,02±0,3	26,8±1,02
Опыт — через 7 дней после родов	56,4±1,8*	34,34±1,2*	32,8±0,1*
Контроль — через 7 дней после родов	50,0±0,2**	30,9±1,4**	24,2±0,8
Опыт — через 14 дней после родов	60,4±0,2*	36,0±0,12	34,1±0,2
Контроль — через 14 дней после родов	50,4±0,1	30,8±0,4	24,8±0,2

* $p < 0,05$, ** $p > 0,05$

ний обменных процессов и дисфункций внутренних органов, гомеостаза, не вызывает изменений в биохимической картине крови, характерных для токсигенных процессов. При изучении показателей естественной резистентности организма животных отмечено повышение в опытной группе всех показателей: лизоцимной, бактерицидной активности сыворотки крови, фагоцитарной функции в динамике проведения исследований (табл.).

В опытной группе овцематок бактерицидная активность сыворотки крови после введения препарата Лактобифадол увеличилась в динамике на 10% к 14 дню после родов (с 50,4% до 60,4%), в контрольной группе — на 1,1%. Прирост показателя бактерицидной активности в опытной группе повысился в 9 раз по сравнению с контролем.

Показатель лизоцимной активности сыворотки крови животных опытной группы увеличился после применения препарата в динамике на 4,67%, в контрольной — на 0,8%. Прирост показателя лизоцимной активности в опытной группе повысился в 5,8 раза по сравнению с контролем (рис. 2).

Установлено также повышение фагоцитарной активности крови овец в опытной группе к 14 дню после родов на 6%, в то время как в контрольной группе после родов у животных имело место снижение указанного показателя (рис. 3).

Применение овцематкам перед родами пробиотика Лактобифадол увеличивает показатели общей резистентности организма беременных животных, профилактирует патологии родов и послеродового периода, способствует рождению здорового жизнеспособного потомства.

Подтверждением этого является отсутствие случаев заболеваемости овец опытной группы в процессе эксперимента. У всех животных благополучно прошли роды, не было зарегистрировано субинволюции матки, задержания последа, послеродовых эндометритов. Родились полноценные здоровые ягнята. Имело место достоверное увеличение живой массы баранчиков и ярок при рождении, полученных от овцематок опытной группы (в среднем 4,5±0,32 кг и 3,7±0,1 кг соответственно) по сравнению с живой массой ягнят контрольной группы (4,2±0,3 кг и 3,5±0,3 кг).

Заключение. Ежедневное применение суягным овцематкам пробиотика Лактобифадол в дозе 0,2 г на килограмм массы тела в течение 30 дней до родов способствует повышению естественной резистентности их

Показатели бактерицидной активности сыворотки крови овцематок при испытании препарата Лактобифадол (%)



Рис. 1.

Показатели лизоцимной активности сыворотки крови овцематок при испытании препарата Лактобифадол (%)

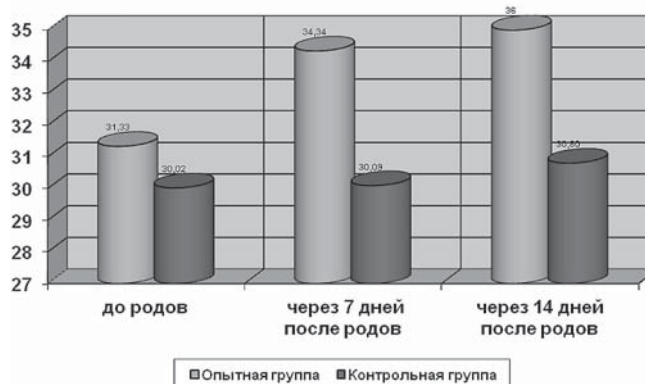


Рис. 2.

Показатели фагоцитарной активности крови овцематок при испытании препарата Лактобифадол (%)

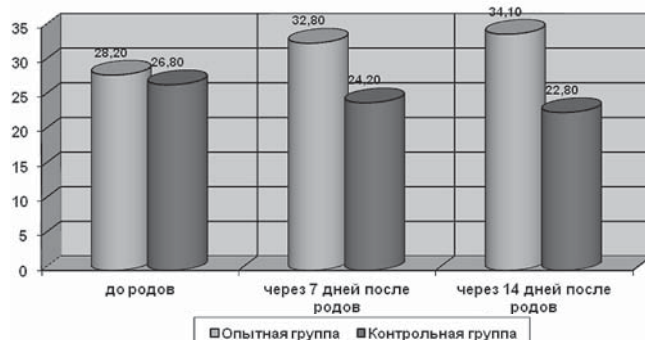


Рис. 3.

организма, профилактирует патологию родов и послеродовые осложнения, а также улучшает продуктивные качества ягнят.

Список литературы

1. Данилевская Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков // Ветеринария, № 11, 2005. – С. 23-26.
2. Дорош М. Болезни овец и коз. – Серия «Домашний ветеринар». – М., 2007, 85 с.
3. Шахов А.Г. Экологические проблемы патологии сельскохозяйственных животных // Экологические проблемы патологии и терапии животных. – Воронеж, 1997. – С. 17-20.

Контактная информация:
8 (916) 948-35-00

УДК 636.5.082.474:591.3

Т.О. АЗАРНОВА, С.Ю. ЗАЙЦЕВ, М.С. НАЙДЕНСКИЙ, А.Е. БОБЫЛЬКОВА, И.С. ЯРЦЕВА
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ПРОФИЛАКТИКА И КОРРЕКЦИЯ ФИЗИКО-БИОХИМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СТРЕССЕ В РАЗВИТИИ СИСТЕМ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ У ЭМБРИОНОВ КУР ЯИЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ

Интенсивная промышленная инкубация подвергает организм цыпленка дополнительным нагрузкам — стрессам в процессе эмбриогенеза, что сопровождается образованием чрезмерного количества свободных радикалов, которые в свою очередь являются причиной метаболических нарушений. Следствием данных негативных процессов является дистрофия тканей, что приводит к дисплазии органов у эмбриона и в итоге негативно проецируется на процент выводимости цыплят. Аэрозольная обработка комплексом натуральных метаболитов: коламином, миковитом (Рибав) и янтарной кислотой позволяет скомпенсировать и предотвратить данные процессы.

Ключевые слова: цыплята, инкубация, стресс, развитие, перекисное окисление липидов, биологическое окисление.

T.O. AZARNOVA, S.Yu. ZAITSEV, M.S. NAIDENSKIY, A.E. BOBYL'KOVA, I.S. YARTSEVA
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

PREVENTION AND CORRECTION OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL DISTURBANCES IN THE DEVELOPMENT OF SYSTEMS OF TISSUES AND ORGANS IN THE EMBRYOS OF EGG CHICKENS

Intensive industrial incubation exposes the organism of the chicken to additional loads of stress in the process of embryogenesis. This results in the formation of excessive amounts of free radicals, which, in their turn, cause metabolic disturbances. All these negative processes result in tissue dystrophy, which leads to the dysplasia of the embryo and, consequently, has a negative influence upon the percentage of chickens' hatchability. Aerosol processing of eggs by the complex of natural metabolites: kolamin, mikovit (Ribav) and succinic acid makes it possible to compensate and prevent these processes.

Key words: chickens, incubation, stress, development, lipid peroxidation, biological oxidation.

В настоящее время промышленное птицеводство значительно расширило свои границы на рынке продуктов животного происхождения, в связи с чем повсеместно применяется промышленная инкубация. Однако даже самые современные и дорогостоящие инкубаторы до конца не отвечают всем особенностям эмбриогенеза птицы. Стоит также обратить внимание на тот факт, что в масштабах промышленной инкубации невозможно исключить сбои в работе машины. Кроме того, негативное действие на развитие эмбрионов оказывают: перенос яиц в выводные шкафы, их обработка антисептическими растворами и ряд других. Важно учитывать и так называемый «человеческий» фактор на производстве.

Данные недостатки инкубаториев влекут за собой патологические изменения в метаболизме на уровне клеток, тканей, органов. В результате наблюдаются дистрофические явления и дисплазия последних. Как следствие, высокий показатель отходов инкубации, вывод некондиционного молодняка, низкие весовые показатели цыплят, уровень естественной резистентности, задержка роста. Всё это обуславливает значительное снижение рентабельности хозяйства, отрасли.

Важнейшей причиной ранее указанных негативных явлений являются чрезмерная активизация свободно-радикальных процессов, значительное повышение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и, как было отмечено ранее, дисбаланс обменных процессов. Одними из наиболее значимых следствий нарушения метаболизма являются патологии питания и дыхания тканей, что приводит к некрозу, изменению функциональной активности и чрезмерной активации

апоптоза клеток, вследствие чего орган неправильно развивается, теряет возможность выполнять свою функцию в организме [1].

С учётом литературных данных и наших предыдущих исследований мы пришли к выводу, что естественный метаболит коламин может быть интересен для коррекции вышеописанного процесса. Так, за счёт возможного превращения в холин он может через флавинаденин-динуклеотид поддерживать работу митохондриальной дыхательной цепи, препятствуя энергетическим потерям, предотвращая возможность развития гипоксических состояний. Кроме того, коламин является предшественником важнейших фосфолипидов — кефалинов и лецитинов [2].

Однако для любых синтетических процессов необходимы энергетические субстраты. Опытным путём в качестве такового мы подобрали янтарную кислоту — это важнейший участник цикла Кребса. С помощью анаплеротических (возмещающих) реакций это вещество способно протекционировать нарушение синтеза АТФ [2]. Кроме того, участвуя в работе митохондриальной дыхательной цепи, метаболит имеет возможность препятствовать развитию гипоксии.

В свою очередь Рибав, являясь преимущественно смесью аминокислот, способен поставлять мономеры белка, необходимые для развития эмбрионов, отдельные из которых также обладают антиоксидантной активностью.

В связи с этим в представленной работе особое внимание было уделено профилактике структурных нарушений тканей, возникающих при стрессе, путем одно-

Таблица 1

Показатели ПОЛ и антиоксидантной защитной системы (АОСЗ), n = 5

Группа	Пероксидаза, ед.опт.пл./лхс	СОД, акт/мг гемоглобина	ОШ, отн.ед./мл	МДА, мкмоль/л
Контрольная	26±1,4	1,5±0,16	0,4±0,01	1,6±0,05
Опытная	48±1,2***	2,9±0,09***	0,2±0,04**	1,1±0,17

Примечание. Здесь и далее: * — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001.

кратного использования комплекса вышеуказанных естественных метаболитов.

Рядом экспериментов нами была разработана оптимальная схема сочетанного применения данных биологически активных веществ для стимуляции эмбриогенеза кур.

Целью работы было изучение эффективности использования комплекса коламина, янтарной кислоты и Рибав для профилактики и коррекции физико-биохимических нарушений в развитии систем тканей и органов, возникающих при стрессе.

Результаты исследования. На первые сутки после вывода у цыплят опытной и контрольной группы была взята кровь и сыворотка для биохимического анализа по общепринятым методикам.

Влияние предложенных биологически активных веществ на обменные процессы, очевидно, стало следствием протекторного действия препаратов на реакции биологического окисления, благодаря чему произошло значительное снижение выработки цитотоксичных продуктов пероксидного окисления липидов в виде малонового диальдегида (МДА) и оснований Шиффа (ОШ) (табл. 1).

Всё это обусловлено также повышением активности в опытной группе ферментов антиоксидантной защиты организма, в частности пероксидазы и супероксиддисмутазы, в 1,9 раза соответственно по сравнению с контролем при достоверном снижении уровня ОШ в 2 раза.

Следует отметить, что все вышеуказанные биохимические показатели не превышают референтных значений.

Снижение интенсивности пероксидного окисления липидов оказало стимулирующее влияние на развитие внутренних органов (табл. 2).

Из материалов, представленных в табл. 2, видно, что в опытной группе достоверно снизилось количество остаточного желтка на 24,5 %, что свидетельствует о лучшем использовании питательных веществ организмом цыплят, и увеличилась масса печени на 3,65 %, селезенки — на 25 %, мышечного желудка — на 2 %, железистого желудка — на 19,95 %, фабрициевой сумки — на 12,65 %.

Увеличение масс органов происходит не за счет соединительной ткани, а за счет структурных компонентов (рис. 1–6).

Из рис. 1 можно сделать вывод, что фабрициева сумка у цыплят контрольной группы мало дифференцирована на корковое и мозговое вещество, слабо выражена дольчатость. Однако присутствует хорошая наполненность лимфоцитами. В сравнении с данным микропрепаратом фабрициева сумка цыплят опытной группы (рис. 2) лучше дифференцирована на корковое и мозговое вещество, лучше выражены лимфоидные фолликулы с большим количеством лимфоцитов.

При анализе рис. 3 можно сделать вывод, что дольчатая структура печени цыплят контрольной

Таблица 2

Интерьерные показатели суточных цыплят (г), n = 10

Показатель	Контрольная	Опытная
Масса цыпленка, г	39,922±0,48	41,123±0,50
Желточный мешок, с остаточным желтком	6,401±0,27	4,973±0,33*
Печень	1,341±0,01	1,390±0,01*
Сердце	0,226±0,02	0,250±0,01
Селезенка	0,013±0,0004	0,015±0,0005*
Мышечный желудок	2,894±0,019	2,951±0,017*
Железистый желудок	0,406±0,015	0,487±0,017*
Фабрициева сумка	0,079±0,003	0,089±0,003*

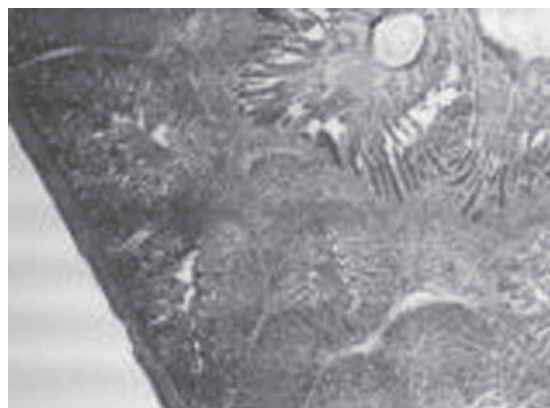


Рис. 1. Гистологический срез фабрициевой сумки цыпленка из контрольной группы

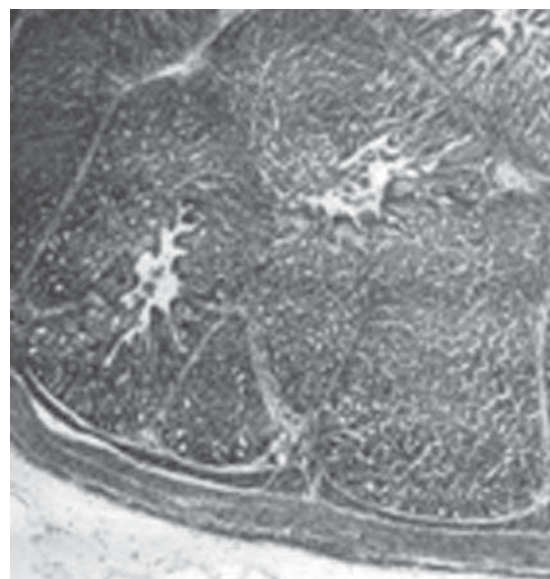


Рис. 2. Гистологический срез фабрициевой сумки цыпленка из опытной группы

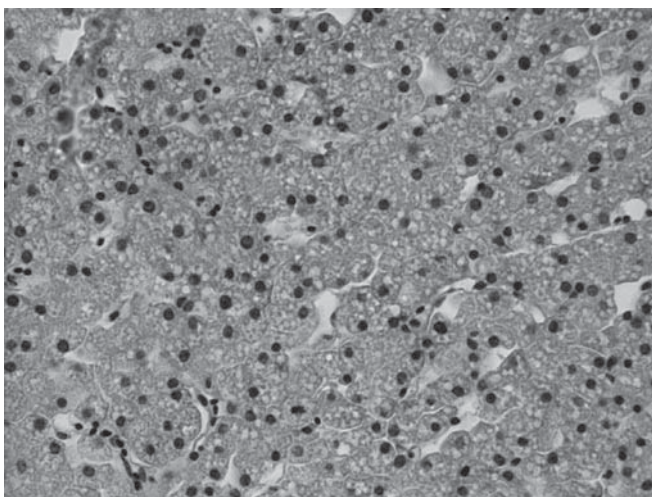


Рис. 3. Гистологический срез печени цыпленка из контрольной группы

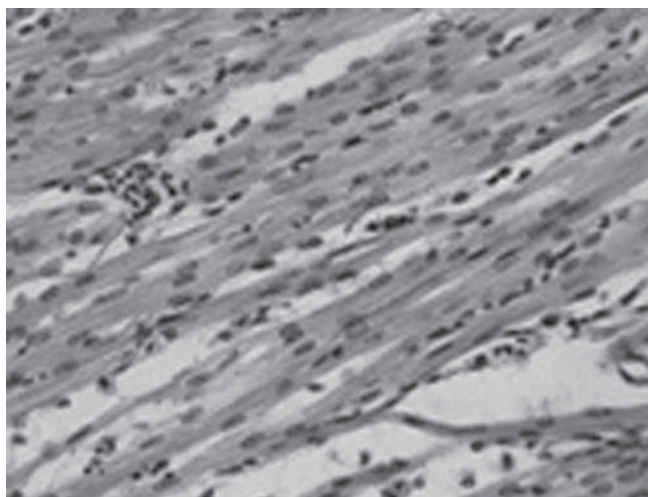


Рис. 5. Гистологический препарат миокарда цыпленка из контрольной группы

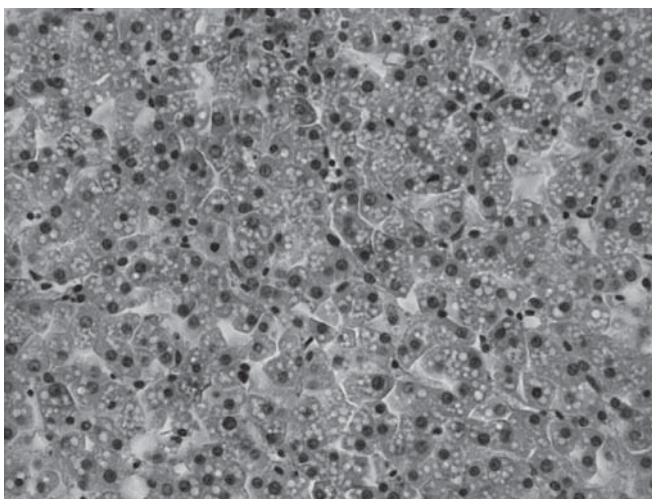


Рис. 4. Гистологический срез печени цыпленка из опытной группы

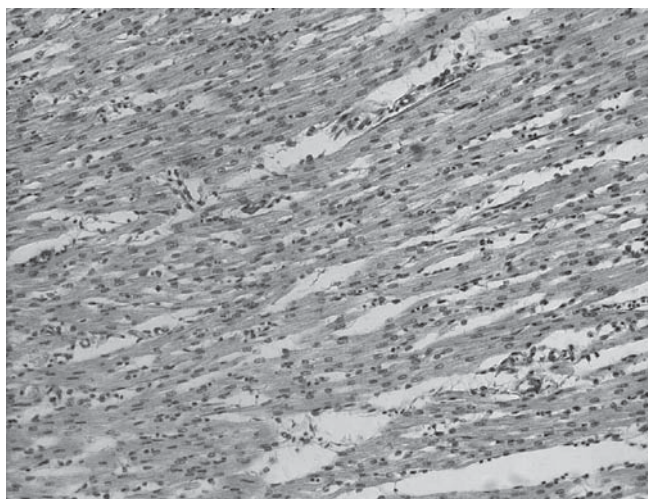


Рис. 6. Гистологический препарат миокарда цыпленка из опытной группы

группы слабо визуализируется. Печеночные пластинки неравномерно распределены. Большое количество соединительной ткани. В опытной же группе (рис. 4) дольчатая структура органа также слабо визуализируема, в то время как более выражены печеночные пластинки, образованные гепатоцитами. Имеется незначительное разветвление соединительной ткани. В обеих группах отмечена среднекапельная жировая дистрофия печени, которая, по данным Г.К. Отрыганьева (1964), не является патологией для с.-х. птицы.

У цыплят контрольной группы (рис. 5) волокна миокарда структурированы. Хорошо выражена рыхлая волокнистая соединительная ткань. Исчерченность средняя. У цыплят опытной группы (рис. 6.) волокна расположены структурно. Рыхлая соединительная ткань выражена плохо. Большое количество сократительных и проводящих кардиомиоцитов. Исчерченность высокая.

Основываясь на данных табл. 1–2 и рис. 1–6 можно судить о том, что уменьшение количества свободных радикалов и протекционирование перекисного окисления липидов обуславливают стимуляцию развития и формирования органов.

Кроме того, положительное влияние препаратов на органогенез способствовало высокой эмбриональной

жизнеспособности, что выразилось в снижении всех отходов инкубации и обусловило повышение вывода цыплят и выводимости яиц в опытной партии на 10,0% и на 7,34% соответственно по сравнению с контролем.

На основе всего изложенного можно сделать **ВЫВОДЫ**, что комплекс исследуемых биологически активных веществ эффективно предотвращает чрезмерную генерацию свободных радикалов, а значит, препятствует интенсификации процессов перекисного окисления липидов и сбоям в работе митохондриальной дыхательной цепи. Это является важным условием для полноценного развития и функционирования тканевых и органных систем, а также жизнеспособности особи.

Список литературы

1. Бессарабов Б.Ф. Влияние стрессов на здоровье и продуктивность с.-х. птицы: Сб. лекций. – М.: МГАВМиБ им. К.И.Скрябина, 1990, 52 с.
2. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека. – Т. 1. – М.: Мир, 2009, 129 с.

Контактная информация:
Azarena@list.ru, ine98@yandex.ru,
Bobykova@yandex.ru.

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕНИЯ УЛЬТРАМИКРОГЕТЕРОГЕННОГО ЖЕЛЕЗА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СЕРДЦА КРЫС

В статье приведены результаты системного внутривенного введения УЖ крысам в различных дозах. Установлено, что введение УЖ в оптимальной дозе (100 мг/кг) в коллоидной системе со скоростью 1 мл/мин. ($\Sigma=10$ мин.) не влияет на физиологические параметры работы сердца.

Ключевые слова: ультрамикроретерогенное железо, системное введение, физиология сердца, ЭКГ, крысы.

M.V. VOLKONSKY, V.D. FOMINA, I.V. TIKHONOV

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

EFFECT OF SYSTEMIC ADMINISTRATION ULTRAMICROGETEROGEN OF FERRIC ON PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF RAT HEART

The results of systemic intravenous UZH rats at various doses. It is established that the introduction of UZH in optimal dose (100 mg/kg) in a colloidal system with a rate of 1 ml/min ($\Sigma=10$ min) did not affect the physiological parameters of the heart.

Key words: ultramicrogeterogen of ferric, system administration, physiology of the heart, ECG, rats.

В ветеринарной онкологии существует потребность в разработке новых методов лечения злокачественных поражений. Значительно ухудшают прогноз и эффективность терапии метастатические поражения печени, как наиболее частое осложнение практически любой опухоли [1]. Одним из новых методов терапии солитарных поражений печени у животных является метод селективной ферроэмболизации с применением внешнего источника магнитного поля. При данном методе лечения существует опасность «утекания» частиц УЖ из злокачественного узла в систему общего кровотока и повреждения частями железа различных органов и систем [2, 3]. К сожалению, на сегодняшний день нет данных о влиянии системного введения УЖ на физиологические параметры работы организма животного, его органы и системы, в том числе и на деятельность сердечной мышцы [3].

Целью настоящего исследования было оценить влияние системного внутривенного введения УЖ в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг на физиологические параметры работы сердечной мышцы животного.

Материалы и методы. Были сформированы 3 группы животных по принципу аналогов (по 5 крыс самцов в каждой группе с массой тела 250 г). Животным группы 1 внутривенно (в хвостовую вену) вводили 10 мл коллоидного плазмозамещающего 4%-ного раствора сукцинированного желатина — гелофузина, самцам группы 2 — 100 мг/кг ультрамикроретерогенного железа, суспензированного в 10 мл гелофузина, крысам группы 3 — 500 мг/кг ультрамикроретерогенного железа, суспензированного в том же объеме гелофузина. За день до введения лекарственного препарата регистрировали контрольные электрокардиограммы в стандартных отведениях от конечностей. Животных перед записью ЭКГ наркотизировали путем внутримышечного введения раствора зоветила в дозе 25 мг/кг для предотвращения возможных побочных эффектов, связанных с возникновением стресса. Для внутривенного введения препарата в хвостовую вену предварительно наркотизированной крысе нагревали хвост в воде (при температуре воды 37°C) и пережимали его жгутом. Затем под визуальным контролем вводили иглу в вену до появления капли крови в пунктирующей игле, после чего жгут снима-

ли и проводили инфузию лекарственного препарата со скоростью 1 мл/мин. Через 7 минут и 24 часа после введения УЖ у животных повторно снимали электрокардиограммы. При анализе ЭКГ учитывали следующие показатели: частоту сердечных сокращений в минуту (ЧСС), вольтаж зубцов P, R, S, T, длительность интервала Q-T.

Статистическая обработка данных исследования проведена с использованием общепринятого метода Фишера—Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова.

Результаты исследований. Данные исследований приведены в табл. 1 и 2.

Через 7 минут после введения УЖ в дозе 100 мг/кг на ЭКГ регистрировались следующие изменения: увеличивалась частота сердечных сокращений на 28 сокращений в минуту, снижался вольтаж зубцов P — на 0,01 мВ, R — на 0,14 мВ, S — на 0,1 мВ, T — на 0,01 мВ, удлинялся интервал Q-T на 0,003 сек. Через 24 часа после введения ЧСС оставалась на прежнем уровне, вольтаж зубцов продолжал снижаться, длительность интервала Q-T не изменялась. Эти показатели ЭКГ свидетельствуют о начале функциональных изменений автоматии и проводящей системы сердца.

После введения УЖ в дозе 500 мг/кг через 7 минут на ЭКГ регистрировались следующие изменения: ЧСС увеличивалась на 30 сокр./мин., вольтаж зубца P снижался на 0,03 мВ, зубца R — на 0,1 мВ, зубца S — на 0,02 мВ, зубца T — на 0,04 мВ, интервал Q-T удлинялся на 0,008 сек. Через 24 часа после введения УЖ ЧСС находилась на 25 сокр./мин. выше исходного уровня, вольтаж зубца P был снижен на 0,04 мВ, зубца R — на 0,11 мВ, зубца S — на 0,16 мВ, зубца T — на 0,05 мВ, интервал Q-T был удлинен на 0,008 сек., сегмент S-T смещен ниже изолинии. Наблюдаемые изменения в ЭКГ крыс свидетельствуют о более глубоких нарушениях трофики миокарда и функции проводящей системы сердца при использовании УЖ в дозе 500 мг/кг.

Таким образом, на ЭКГ, записанных спустя 7 минут и 24 часа после введения препарата, наблюдались синусовая тахикардия, достоверное уменьшение вольтажа всех зубцов ЭКГ и в некоторых случаях смещение сегмента S-T ниже изолинии, что свидетельствовало о нарушении процессов возбуждения, кровообращения и трофики в миокарде.

Таблица 1

Показатели ЭКГ у крыс после однократного внутривенного введения УЖ в дозе 100 мг/кг

Период исследования	ЧСС, сокр./мин. (m±sd)	Зубец P, мВ (m±sd)	Зубец R, мВ (m±sd)	Зубец S, мВ (m±sd)	Зубец T, мВ (m±sd)	Интервал QT, сек. (m±sd)
За 24 часа до введения	358±14,4	0,13±0,01	0,84±0,04	0,44±0,04	0,10±0,02	0,084±0,004
Через 7 минут после введения	386±10,5	0,12±0,01	0,70±0,08	0,34±0,04	0,09±0,01	0,087±0,003
Через 24 часа после введения	386±16,3	0,11±0,01	0,60±0,1	0,38±0,04	0,08±0,02	0,087±0,002

Примечание. Во всех показателях $p < 0,05$; M — среднее арифметическое значение; SD — стандартное отклонение.

Таблица 2

Показатели ЭКГ у крыс после однократного внутривенного введения УЖ в дозе 500 мг/кг

Период исследования	ЧСС, сокр./мин. (m±sd)	Зубец P, мВ (m±sd)	Зубец R, мВ (m±sd)	Зубец S, мВ (m±sd)	Зубец T, мВ (m±sd)	Интервал QT, сек. (m±sd)
За 24 часа до введения	360±18,2	0,12±0,01	0,72±0,02	0,24±0,08	0,15±0,02	0,084±0,003
Через 7 минут после введения	390±10,5	0,09±0,01	0,62±0,06	0,22±0,06	0,11±0,03	0,087±0,006
Через 24 часа после введения	385±14,4	0,08±0,01	0,61±0,06	0,08±0,02	0,10±0,02	0,092±0,006

Примечание. Во всех показателях $p < 0,05$; M — среднее арифметическое значение; SD — стандартное отклонение.

Заключение. Однократное внутривенное введение ультрамикрорегерогенного железа в дозе 100 мг/кг и 500 мг/кг вызывает изменения в проводящей системе сердца и трофических процессах миокарда. Однако доза препарата 500 мг/кг вызывает более значительное замедление проведения возбуждения по миокарду и снижение вольтажа зубцов ЭКГ, что может быть связано с нарушением кровообращения, питания и электрических процессов в сердечной мышце.

Основываясь на полученных результатах исследования, считаем, что препарат УЖ, применяемый для лечения онкологически больных животных, может оказывать в больших дозах отрицательное влияние на функциональное состояние сердца и должен применяться с осторожностью.

Список литературы

1. Волконский М.В. Инновационный подход к лечению метастатических поражений печени у животных // Ветеринарная медицина, 2011, № 3-4. – С. 79.
2. Волконский М.В. Изменения в клинико-гематологических показателях крови при внутривенном введении ультрадисперсных ферромагнитных частиц // Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии: Сб. научн. тр. мол. ученых. – М.: ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, 2011, № 7. – С. 3-5.
3. Волконский М.В. Распределение в организме и воздействие на опухоль лабораторных животных иттрия – ⁹⁰Y и ультрадисперсного железа: Дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2012. – С. 32-46.

Контактная информация:
 Волконский Михаил Викторович
 Mux19@yandex.ru.
 тел.: 8 (926) 381-30-71

УДК 619.616.72-008.8-076.5

ХАНИЕХ САТТАРИ ФАРД, Д.А. ДЕВРИШОВ
 ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
 ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ ОСТЕОАРТРОЗА

Животные модели используются для изучения патогенеза дегенерации хряща и оценки потенциала клинического использования клеточной терапии в борьбе с остеоартрозом. В качестве модели ОА используются лошади, овцы, собаки, кролики, крысы и мыши.

Ключевые слова: остеоартроз, внутрисуставная инъекция, животные модели, хрящ.

HANIEH SATTARI FARD, D.A. DEVRISHOV
 Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named after K.I.Skryabin

ANIMAL MODELS OF OSTEOARTHRITIS

Animal models of osteoarthritis (OA) are used to study the pathogenesis of cartilage degeneration and to evaluate potential anti-arthritic drugs for clinical uses. As a model in OA most often used horses, sheep, dogs, rabbits, rats, and mice.

Key words: osteoarthritis, intra articular injection, animal models, cartilage.

Остеоартроз является гетерогенной группой заболеваний суставов различной этиологии со сходными биологическими, морфологическими и клиническими признаками. Остеоартроз всегда связан с деформацией

костной ткани, в связи с чем его также называют остеоартритом или деформирующим артрозом [12]. При ОА в процесс вовлекаются все структуры сустава, включая хрящ, синовиальный и подлежащая кость. В основе

Методы индуцирования ОА у животных

Метод индуцирования остеоартроза	Вид животных	Источник литературы
Самопроизвольный (спонтанный)	Мышь, морская свинка, макака	Little C.B., et al., 2008
Генетическая модификация	мышь, крыса, кролик, лошадь, овца	Little C.B., et al., 2008
Внутрисуставная инъекция (стероиды, коллагеназа, йодацетата, цитокины, трипсин)	Крыса, кролик, собака, овца	Snibbe J.C., et al., 2005; Guzman R.E., et al., 2003; Goranov N.V., 2012
Иммобилизация	Крыса, кролик, собака	Little C.B., et al., 2008
Хирургически индуцированные / дестабилизация		
ACL перерезки	Крыса, морская свинка, кролик, собака, овца, обезьяна	Goranov N.V., 2011; Arsever C.L., et al., 1986
Менискэктомия	Крыса, морская свинка, кролик, собака, кошка	Goranov N.V., 2011; Arsever C.L., et al., 1986
Дестабилизация мениска	Мышь	Little C.B., et al., 2008
Комбинация хирургических методов	Мышь, крыса, кролик, морская свинка	Alam M.R., et al., 2011
Воздействия нагрузки; скарификация хрящи	Кролик, собака	Alam M.R., et al., 2011
Физические упражнения	Лошадь	Little C.B., et al., 2008
Овариоэктомия	Крыса, овца, макака	Little C.B., et al., 2008

этого заболевания лежит нарушение равновесия между анаболическими и катаболическими процессами в тканях сустава и прежде всего в гиалиновом хряще [7, 12, 14]. ОА является «хронической недостаточностью сустава», при которой различные провоцирующие факторы приводят к однотипным структурным изменениям.

Остеоартроз — медленно прогрессирующее заболевание, распространенность и тяжесть которого увеличивается с возрастом. Существует несколько предрасполагающих факторов в формировании ОА, но важным триггерным звеном является механический фактор [17].

Для изучения изменений, связанных с дегенерацией хряща при ОА *in vivo*, многочисленные животные как модели были использованы лошади, козы, овцы, собаки, морские свинки, крысы и мыши, к ним были применены биохимические, механические, хирургические и другие методы индуцирования ОА. Модели животных нужны для того, чтобы разработать методы профилактики, диагностики, лечения заболевания на разных стадиях развития процесса. С этой целью были использованы разные методы индуцирования ОА. Эти методы приведены в табл. 1 [3, 12, 13, 15].

Индукция ОА чаще всего производится путём внутрисуставного введения различных агентов, в том числе ферментов (папаин, коллагеназа, трипсин, гиалуронидаза), цитокинов, трансформирующего фактора роста (TGF) и химических веществ (натрия йодацетата). Нередко для дестабилизации суставов использовались хирургические методы (частичная и тотальная менискэктомия, пересечение мениска и дестабилизация мениска) [2, 4, 10, 12, 16].

Метод иммобилизации суставного хряща вызывает атрофические изменения, подобные ранней стадии ОА. Самопроизвольный (спонтанный) ОА происходит у различных видов мышей, морских свинок и макак [5, 8, 9, 11].

Каждый метод индуцирования ОА и каждый вид животного имеет свои положительные и отрицательные стороны, которые в конечном итоге не в полной мере объясняют дегенеративные молекулярные изменения, а также клинические и функциональные расстройства в суставе [12, 13]

Заключение. Научные исследования показывают, что животные модели имеют большое значение для исследования ОА у человека. Они дают реальные представления о ранних дегенеративных изменениях в суставах и возможность изучать различные аспекты этого заболевания. Крупные животные, такие как овцы и лошади, являются лучшими моделями в изучении ОА, так как процессы клеточной и медикаментозной терапии на них легче проводить. Таким образом, животные модели являются надёжными моделями в изучении этиологии, патогенеза, профилактики и лечения ОА как у человека, так и у самих животных. Полученные результаты этого исследования помогают глубже понимать суть ОА и эффективно его лечить.

Список литературы:

1. Аурих М., Глуз А. Современные направления в лечении повреждений хряща голеностопного сустава // Украинський журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можаєва, 2008, №4(9). – С. 01-08.
2. Alam M.R., Lee H.B., Kim M.S. et al. Surgical model of osteoarthritis secondary to medial patellar luxation in dogs // Veterinary Medicine, 2011, No 56(3). – P. 123-130.
3. Altman R., Tenenbaum J., Latta L. et al. Biomechanical and biochemical properties of dog cartilage in experimentally induced osteoarthritis // Annals of Rheumatic Diseases, 1984, No 43. – P. 83-90.
4. Arsever C.L., Bole G.G. Experimental osteoarthritis induced by selective myectomy and tendotomy // Arthritis and Rheumatism, 1986, No 2(29). – P. 251-261.
5. Bendele A.M. Animals models of osteoarthritis // J. Musculoskel Neutron Interact., 2001, 1(4). – P. 363-376.
6. Blanco F.J., Guitan R., Vazquez-Martel E. et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology // Arthritis Rheum., 1998, No 41. – P. 284-9.
7. Buckwalter J.A., Mankin H.J., Grodzinsky A.J. Articular cartilage and osteoarthritis // AAOS Instructional Course Lectures, 2005, No 54. – P. 465-480.
8. Gerwin N., Hops C., Lucke A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis // Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, No 58. – P. 226-242.

9. Goranov N.V. Clinical changes in sodiummonoiodoacetate – induced stifle osteoarthritis model in dogs // *Vet.World*, 2012, No 5(3). – P. 138-144.

10. Goranov N.V. Experimental osteoarthritis models in veterinary medicine-relevance, potential and challenges // *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2011, No 4(14). – P. 191-200.

11. Guzman R.E., Evans M.G., Bove S. et al. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis // *Toxicologic Pathology*, 2003, No 31. – P. 619-624.

12. Little C.B., Smith M.M. Animals models of osteoarthritis// *Current Rheumatology Reviews*, 2008, No 3(4). – P. 1-7.

13. Mastbergen S.C., Lafeber F.P. Animals models of osteoarthritis-why choose a larger model? // *Osteoarthritis*, 2009. – P. 11-14.

14. Murphy J.M., Fink D.J., Hunziker E.B. et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis // *Arthritis & Rheumatism*, 2003, 48(12). – P. 3464-3474.

15. Pritzker P.H. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects // *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1994. (53). – P. 406-420.

16. Snibbe J.C., Gambardella R.A. Use of injections for osteoarthritis in joints and sports activity // *Clin. Sports Med.*, 2005, No 24. – P. 83-91.

17. Ziangang G.E., Yang H.U., Heng B.C. et al. Osteoarthritis and therapy // *Arthritis & Rheumatism*, 2006, 3(55). – P. 493-500.

Контактная информация:
Тел.: 8 (495) 377-69-87 (служ.)9

УДК 636.5.082.474:591.3

Т.О. АЗАРНОВА, И.С. ЯРЦЕВА, И.И. КОЧИШ, С.Ю. ЗАЙЦЕВ, М.С. НАЙДЕНСКИЙ
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ДИНАМИКА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА И ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У ЯИЧНЫХ ЦЫПЛЯТ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ ЕСТЕСТВЕННЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Двукратная обработка инкубационных яиц комплексным раствором естественных метаболитов: коламина, янтарной кислоты и серина препятствовала развитию свободно-радикальных процессов у суточного молодняка, что выразилось в снижении интенсивности перекисного окисления липидов и в увеличении антиоксидантной защиты организма. Указанное обусловило определённую динамику альфа-фетопротеина, необходимую для стимуляции развития эмбрионов и повышения их жизнеспособности.

Ключевые слова: цыплята, эмбриогенез, перекисное окисление липидов, биологическое окисление, альфа-фетопротеин, антиоксиданты, выводимость, этаноламин, янтарная кислота, серин.

T.O. AZARNOVA, I.S. YARTSEVA, I.I. KOCHISH, S.Yu. ZAITSEV, M.S. NAYDENSKIY
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

DYNAMICS OF ALPHA-FETOPROTEIN AND LIPID PEROXIDATION IN THE CHICKEN

Double handling of hatching eggs comprehensive solution drugs kolamine, succinic acid and serine aerosol delivery influenced catalytic on embryogenesis of agricultural bird, that resulted in a decrease in indices of free-radical processing and increased antioxidant defenses. Above-listed helped to increase the viability of experimental chickens and acceleration of embryogenesis. Above contributed to positive dynamics of alpha-fetoprotein.

Key words: chickens, embryogenesis, lipid peroxidation, biological oxidation, alpha-fetoprotein, antioxidants, hatchability, ethanolamine, succinic acid, serine.

В условиях промышленного выращивания сельскохозяйственная птица сталкивается с целым комплексом стрессов (миражирование, перенос в выводные шкафы, вакцинация и ряд других), которые способствуют образованию избыточного количества свободных радикалов, что приводит к накоплению продуктов перекисного окисления липидов в виде цитотоксичных веществ: диеновых конъюгатов, малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа (ОШ) и других, что негативно влияет на развитие куриного эмбриона [2]. Известно также, что развитие зародыша имеет прямую зависимость с уровнем альфа-фетопротеина как в сыворотке крови, так и в гомогенате печени [5]. Альфа-фетопротеин относится к гликопротеинам, является маркером состояния эмбриона. Он выполняет преимущественно транспортную функцию, тем самым участвуя в клеточном метаболизме. В процессе эмбриогенеза его содержание постепенно

увеличивается, а затем к концу эмбрионального развития постепенно снижается и в постэмбриональном развитии исчезает. Увеличение его содержания в эмбриональный и быстрое снижение в постэмбриональный периоды свидетельствуют о полноценном развитии особи [5]. Однако всё вышеуказанное было доказано только на эмбрионах человека.

Для профилактики оксидативного стресса, проводимой с целью интенсификации развития зародышей яичных кур, в ряде предшествующих экспериментов нами было разработано эффективное в этом отношении сочетание препаратов: коламина, серина и янтарной кислоты. Как показали предшествующие исследования, указанный комплекс метаболитов эффективно препятствует деструкции фосфолипидных компонентов, а также оказывает протекторное влияние в реакциях митохондриальной дыхательной цепи [1].

Так, коламин может превращаться в организме животных и птицы в фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин [4], а благодаря серину также образуется фосфатидилсерин, что позволяет пополнить основные структурные компоненты бислоя мембран клеток [1].

Однако все процессы синтеза энергозатратны, поэтому в предложенный нами комплекс опытным путём в ряде предшествующих экспериментов была подобрана янтарная кислота, которая также имеет возможность как поддерживать синтез АТФ в организме на необходимом уровне за счёт участия в цикле трикарбоновых кислот, так и вследствие участия в биологическом окислении [3, 4].

В связи с вышеизложенным **целью нашей работы** было установить эффективность использования комплекса — коламина, янтарной кислоты и серина — для профилактики процессов липопероксидации, а также для активизации синтеза альфа-фетопротеина в эмбриональный период как фактора, стимулирующего развитие зародыша.

Для этого нами были проведены эксперименты в условиях ФГУП ППЗ «Птичное» на яйцах кур кросса «Шейвер 2000», которые показали, что максимальная эффективность применения данных препаратов возможна при двукратной аэрозольной обработке — перед инкубацией и на 19-е сутки при переводе в выводные шкафы.

Для проведения эксперимента были подобраны контрольная и опытная партии яиц по принципу аналогов с учетом времени снесения, сроков хранения и массы. Количество яиц в каждой группе составило 306 штук.

Результаты исследований. Для исследований у цыплят суточного возраста опытной и контрольной групп была взята кровь и сыворотка для проведения биохимических анализов по общепринятым методикам. В итоге установлено, что комплекс препаратов оказал стимулирующее влияние на активность ферментативной антиоксидантной защиты организма при снижении процессов перекисдного окисления липидов у цыплят суточного возраста (табл. 1).

Из таблицы видно, что интенсивность ПОЛ в опытной группе значительно ниже, чем в контроле. Так, уровень МДА достоверно снизился на 11,8%, ОШ — на 25%. Следует отметить, что на фоне уменьшения интенсивности ПОЛ повысилась антиоксидантная ферментативная защита организма цыплят суточного возраста, что выра-

зилось в увеличении СОД в 1,7 раза, пероксидазы — на 20,8% по сравнению с контролем.

Следует отметить, что содержание альфа-фетопротеина мы исследовали в сыворотке крови эмбрионов в динамике на 13-е, 16-е, 19-е и цыплят на 1-е, 2-е сутки после вывода. Результаты исследований представлены на диаграммах.

Диаграмма 1

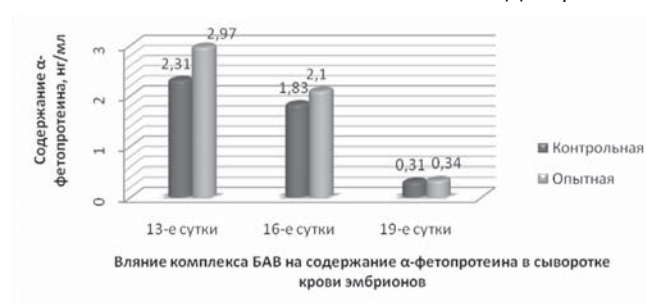


Диаграмма 2



Из диаграмм видно, что на 13-е сутки инкубации в опытной группе уровень альфа-фетопротеина по сравнению с контролем был выше на 28,6%, на 16-е — на 14,8%, на 19-е — на 9,7%, указанное свидетельствует о стимуляции эмбрионального развития [5]. Следует также отметить, что на 1-е сутки указанный гликопротеин стал снижаться в опытной группе, уступая контролю на 23,1%, а на 2 сутки после вывода данный показатель в сыворотки крови ни в одной из групп зарегистрирован не был. Подобная динамика так же свидетельствует о лучшем развитии цыплят опытной группы [5]. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что снижение процессов ПОЛ, вызванное действием предложенных метаболитов, отразилось положительно на динамике альфа-фетопротеина.

Таблица 1

Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защитной системы (АОЗС) (n=5)

Группа	Пероксидаза, ед.опт.пл./л·с	СОД, акт/мг гемоглобина	ОШ, отн.ед./мл	МДА, мкмоль/л
Контрольная	24±2,00	1,0±0,15	0,4±0,018	1,7±0,181
Опытная	29±1,22**	1,7±0,13***	0,3±0,014***	1,5±0,13***

Примечание. Здесь и далее: * — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001

Таблица 2

Показатели биоконтроля инкубации (% , n= 544)

Партия	Неоплод.	Кровяные кольца	Замершие	Задохлики	Слабые	Выводимость	±Δ	Вывод	±Δ
Контроль	7,72±1,14	2,76±0,70	8,27±1,18	3,86±0,83	2,39±0,65	81,27±1,67	—	75,00±1,86	—
Опыт	6,80±1,08	1,29±0,48	3,68±0,81	1,84±0,58	2,02±0,60	90,53±1,26***	9,26	84,38±1,56***	9,38

Указанное повлияло позитивно на показатели био-контроля инкубации. Так, вывод цыплят и выводимость яиц в опытной партии были выше, чем в контроле на 9,38% и на 9,26% соответственно. Данные представлены в табл. 2. Это обусловлено снижением в опытной группе таких отходов инкубации, как «кровяные кольца» в 5,6 раз, «замершие» — в 2,2 раза, «задохлики» — в 2 раза, «слабые» — на 0,4%.

Заключение. На основе проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что обработка яиц перед инкубацией и на 19-е сутки комплексом растворов препаратов: коламина, янтарной кислоты и серина эффективно снижает процессы ПОЛ (уровень МДА достоверно снизился на 11,8%, ОШ — на 25% по сравнению с контролем), что оказало положительное влияние на динамику альфа-фетопротейна в эмбриональный и постэмбриональный периоды развития цыплят и способствовало более полноценному развитию и улучшению жизнеспособности молодняка.

Список литературы

1. Азарнова Т.О., Кочиш И.И., Найденский М.С. и др. Мембранопротекторные, обменостимулирующие и антиоксидантные свойства комплекса естественных метаболитов: серина, сукцината и коламина // Прикладная аналитическая химия. – М., 2012, № 1(7). – С. 46-49.
2. Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран // Биофизика, 1987, 32(5). – С. 830-844.
3. Кондрашова М.Н. Регуляция янтарной кислотой энергетического обеспечения и функционального состояния ткани. – Пушкино, 1979, 34 с.
4. Найденский М.С., Зайцев С.Ю., Азарнова Т.О. «Коламин» как стимулятор жизнеспособности цыплят-бройлеров // Эффективное животноводство. – М., 2010, № 2/51. – С. 36-37.
5. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А. и др. Альфа-фетопротейн. – Екатеринбург, 2004, 376 с.

Контактная информация:
Азарнова Т.О. Azarena@list.ru,
Ярцева И.С. ine98@yandex.ru

УДК 636.7:611.711

Н.А. СЛЕСАРЕНКО, М.Е. ОБУХОВА
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

**МОРФОБИОМЕХАНИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ
АДАПТИВНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ПОЗВОНОЧНИКА У СОБАК**

Показано, что индекс кривизны грудопоясничного отдела позвоночника является одним из объективных критериев оценки степени его подвижности, влияющей на морфофункциональное состояние мышечно-связочного аппарата этой области.

Ключевые слова: позвоночник, межпозвонковый диск, спондилёз, остеофитоз, ножки диафрагмы, поясничные мышцы, грудопоясничный отдел, коэффициент кривизны.

N.A. SLESARENKO, M.E. OBUKHOVA
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

MORPHOBIOMECHANIC CRITERIA ADAPTIVE PLASTICITY SPINE IN DOGS

It is shown that the index of curvature of thoraco-lumbar spine is one of the objective criteria for assessing the degree of mobility, which affects the morphology and function of muscles and ligaments that area.

Key words: spine, intervertebral disc, spondylosis, osteophytosis, crus of the diaphragm, psoas muscle, thoraco-lumbar, coefficient of curvature.

В доступной литературе имеются обстоятельные данные, касающиеся морфологической организации отдельных элементов позвоночника у собак [1-6], но вместе с тем практически отсутствуют данные о функциональной морфологии поясничного отдела позвоночного столба как единой биомеханической системы с учетом структурных особенностей костно-связочного и мышечного аппарата и их функциональной взаимосвязи.

Цель исследования — установить морфобиомеханические критерии адаптивной пластичности грудопоясничного отдела позвоночника у собак разных породных и возрастных групп в зависимости распределения стато-локомоторной нагрузки.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Оценить функциональную морфологию грудопоясничного отдела с учетом биомеханических особенностей двигательного поведения собак.

2. Выявить структурные преобразования грудопоясничного отдела и позвоночного двигательного сегмента у собак городского содержания по сравнению с волком — природной нормой строения изучаемой области.

3. Провести морфометрический анализ биотканей грудопоясничного отдела позвоночника.

4. На основании полученных данных представить морфофункциональную характеристику грудопоясничного отдела собак различных породных и возрастных групп.

Материалы и методы. Исследования проводили на базе кафедры анатомии и гистологии животных в период с 2006 по 2011 годы. Объектом исследования служил кадаверный материал (собаки мелких, средних и крупных пород, а также волки, добытые в охотхозяйствах Тверской области). Всего изучено 46 особей в возрастном диапазоне от 3 месяцев до 20 лет. В исследовании использовали комплексный методический подход, включающий биомеханический анализ механизма

подвижности позвоночника, анатомическое макро- и микропрепарирование, обзорную рентгенографию, функциональный анализ изучаемых структур, морфометрию и статистическую обработку полученных цифровых данных. При проведении морфометрии мышц определяли длину их брюшка и сухожилия, диаметр в различных топических зонах: в краниальной, средней и каудальной, массу и объем мышцы. Подвижность позвоночника оценивали на основании определения индекса кривизны по Масловскому с использованием радиусной линейки, посредством моделирования максимального флексионного и экстензионного изгиба изучаемого отдела. При этом учитывали структурное оформление дорсального и вентрального мышечных тяжей, вентральной продольной связки, межпозвоночных дисков и тел позвонков, а также ножек диафрагмы.

Результаты исследования. В результате исследований установлено, что собаки, принадлежащие к разным породным и возрастным группам, характеризуются неодинаковыми показателями индекса кривизны груднопоясничного отдела позвоночника. При этом обнаружена прямая зависимость между его величиной и степенью флексионно-экстензионного изгиба изучаемого отдела позвоночного столба. Анализ полученных данных позволил выделить 3 группы животных, характеризующихся различной степенью подвижности позвоночника.

1 группа — собаки с максимальной степенью подвижности позвоночника, приближающиеся по индексу его кривизны к волку. При этом мышечно-связочный аппарат имел хорошее структурное оформление с массивной краниальной порцией большой поясничной мышцы (рис. 1). Остеофитов в местах контакта вентральной продольной связки и концевых пластин позвонка, а также признаков дегенерации межпозвоночных дисков нам обнаружить не удалось. У особей этой группы индекс кривизны по своему цифровому выражению соответствовал таковому у волка. Дорсальный и вентральный мышечные тяжи, вентральная продольная связка и межпозвоночные диски имели хорошее структурное оформление. Признаки возрастной инволюции (спондилез тел позвонков) были выявлены только у 20-летнего животного.

2 группа — собаки со средней степенью подвижности позвоночника, выявленной на основании анализа индекса кривизны. У животных этой группы установлена зависимость между степенью развития мышечного аппарата поясницы и состоянием межпозвоночных дисков и тел позвонков. Так, при слабой обмускуленности поясничного отдела в 37% случаев часто выявляли остеофитоз, спондилёзы и дегидратацию межпозвоночных дисков.

3 группа — собаки со слабой степенью подвижности позвоночника. У них выявлена трансформация мышц из динамического типа в статический, что подтверждается недоразвитием большой поясничной мышцы (рис. 2). В зрелом возрасте у таких животных нами выявлены остеофиты и спондилёзы на уровне L7-S1, у особей старше 7-8 лет спондилёзы и гиперостозы в различных сегментах поясничного отдела, а у молодых собак — признаки дегенерации межпозвоночных дисков (смещение пульпозных ядер).

При оценке распределения спондилезов тел позвонков нами установлена общая закономерность: преимущественная их локализация в наиболее подвижном пояснично-крестцовом отделе на уровне L7-S1 (26%),

а также в области прикрепления ножек диафрагмы — L2-L3 (26%) (рис. 3, диаграмма). Приближаются к этим показателям по количеству остеофитов и спондилезов сегменты на уровне L6-L7 (19,6%) и Th13-L2 (по 15,2%).

Нами установлены не описанные ранее топические особенности фиксации ножек диафрагмы. Так они прикрепляются к телам поясничных позвонков и межпозвоночным дискам на уровне L2-L5. При этом каждая

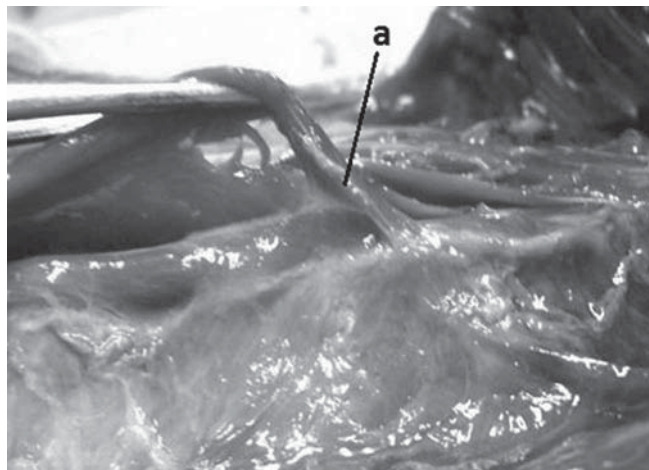


Рис. 1. Макроморфология поясничного отдела позвоночника у собаки 1-й группы. Краниальная порция большой поясничной мышцы (а). Макропрепарат

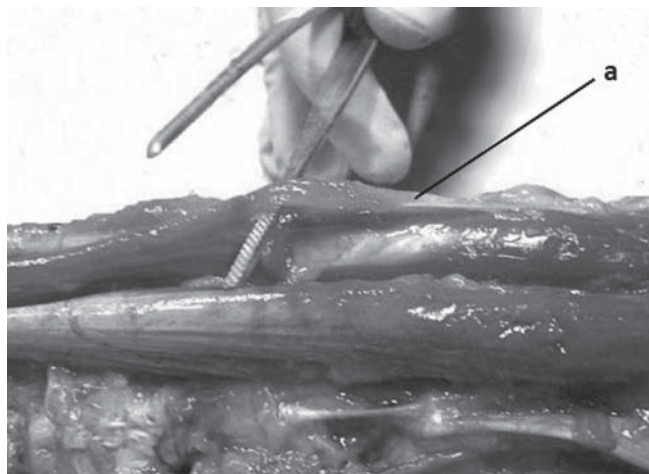


Рис. 2. Поясничный отдел позвоночника у собаки 3 группы. Недоразвитие большой поясничной мышцы (а). Макропрепарат



Рис. 3. Обзорная рентгенограмма поясничного отдела позвоночника у 14-летней собаки. Спондилёзы тел позвонков

Диаграмма

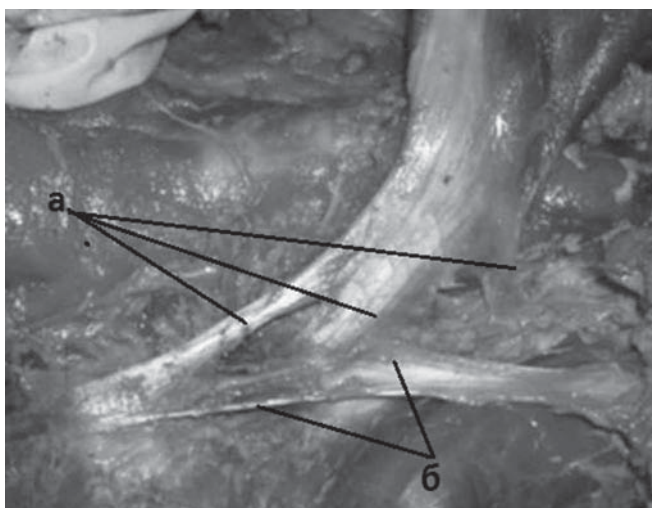
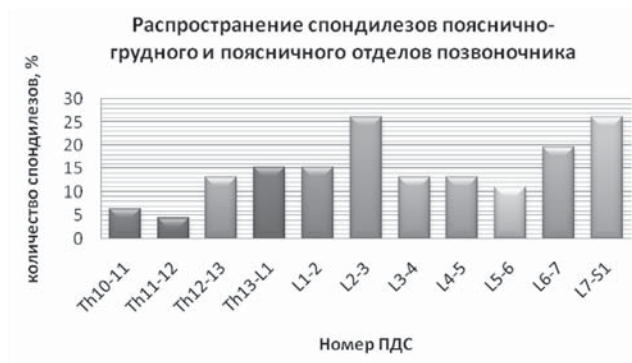


Рис. 4. Поясничный отдел позвоночника у 9-месячного волка. Ножки диафрагмы, деление на сухожильные ветви (а – правая ножка, б – левая ножка). Макропрепарат

ножка дифференцируется на несколько сухожильных ветвей, количество и толщина которых зависят от подвижности поясничного отдела. У собак 1-й группы с ярко выраженной подвижностью поясницы так же, как и у волка, правая ножка диафрагмы подразделяется на 3 сухожильные ветви, а в одном случае даже на 4, а левая на 2 (рис. 4). У особей 2-й группы обе ножки были представлены двумя сухожильными ветвями, а в некоторых случаях даже одной. При флексии ярко выражено напряжение каудальной и в некоторых случаях средней порции правой ножки, а при экстензии — краниальной.

Кроме того, прослеживается зависимость между степенью развития каждой ветви и характером преобладающих движений в позвоночнике. Так, при преобладании флексии большую толщину имеет каудальная ветвь ножки диафрагмы, в то время как при преобладании экстензии — краниальная.

Выводы

1. Индекс кривизны грудопоясничного отдела позвоночника является одним из объективных критериев оценки степени его подвижности. Так, его увеличение соответствует возрастанию подвижности изучаемого отдела позвоночного столба.

2. Установлена взаимосвязь между степенью подвижности грудопоясничного отдела позвоночника и морфофункциональным состоянием мышечно-связочного аппарата этой области.

3. Особи с высокой подвижностью поясничного отдела отличаются хорошим структурным оформлением дорсального и вентрального мышечных тяжей, вентральной продольной связки, тел позвонков и межпозвонковых дисков.

4. Уменьшение степени подвижности (представители 2-й группы) и обмускуленности поясничного отдела сопровождается остеофитозом, спондилезом тел позвонков и признаками дегидратации межпозвонковых дисков.

5. У представителей со слабой подвижностью поясничного отдела (животные 3-й группы) выявлены признаки возрастного остеофитоза и спондилеза тел позвонков, трансформация мышц из динамического типа в статический, а также дегенеративные процессы в межпозвонковых дисках.

6. Максимальное количество остеофитов и спондилезов тел позвонков выявлено в зонах с наибольшей обремененностью позвоночника — в пояснично-крестцовом отделе и в области прикрепления ножек диафрагмы.

7. Возрастание подвижности поясничного отдела сопряжено с увеличением площади фиксации ножек диафрагмы, что выражается в количественном увеличении их сухожильных ветвей.

Полученные данные являются базовыми в вопросах оценки структурно-функционального состояния позвоночника, а также при прогнозировании возникновения повреждений и развития вертеброгенных дискинезий.

Список литературы

1. Савельева Т.С. Дископатия мелких домашних животных: Мат. 9-го Моск. межд. вет. конгресса. – М., 2001. – С. 11-12.
2. Слесаренко Н.А., Бабичев Н.В., Борхунова Е.Н. Морфофункциональное обоснование повреждения позвоночного столба и сухожильно-связочной системы у мелких животных: Тезисы 6-й межд. конф. по проблемам вет. медицины мелких домашних животных. – М., 1997. – С. 42-43.
3. Evans F.G., Lissner H.R. Biomechanical studies on the lumbar spine and pelvis // J. Bone Jt. Surg. (Am.), № 41, 1959. – P. 142-144.
4. Hansen H.J. A patologic anatomical study of disk degenerations in dogs // Acta Orthop scand., 1952. – P. 53-56.
5. Stigen O. Calcification of intervertebral discs in the dachshund: A radiographic study of 21 stud-dogs // Acta veter. scand., № 3, 1995. – P. 329-334.

Контактная информация:
Sagittarius-86@mail.ru,
тел.: 8 926 820 40 80

Д.А. ДЕВРИШОВ, С.В. ТИМОФЕЕВ, Ю.А. ПИЛЮГА
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ЛЕЧЕБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА «ГЕМОБАЛАНС» НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА ЖЕРЕБЯТ

В ходе проведенного исследования установлено, что комплексный препарат «Гемобаланс» способствует не только нормализации минерального обмена веществ, но и обладает иммуномодулирующим действием на клеточные факторы неспецифического звена иммунитета подсосных жеребят.

Ключевые слова: подсосные жеребята, комплексное лечение, неспецифический иммунитет жеребят.

D.A. DEVRISCHOV, S.V. TIMOFEEV, Yu.A. PILYUGA
Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

THERAPEUTIC ACTION OF «GEMOBALANCE» MEDICINE ONTO NONSPECIFIC IMMUNITY FACTORS

In the course of conducted research «Gemobalance» medicine was determined not only to assist to normalize mineral metabolic processes, but to possess immune-response modulating action onto cellular factors of nonspecific component of immune system in foals.

Key words: foals, complex treatment, nonspecific component.

В современной ветеринарной медицине широко применяются разнообразные комплексные препараты, восстанавливающие нарушение обмена веществ и при этом обладающие иммуномодулирующим эффектом на факторы естественной резистентности и иммунологическую реактивность животных [4]. Одним из таких препаратов является «Гемобаланс» — лечебно-профилактический препарат, содержит комплекс биологически активных веществ, благодаря которым он оптимизирует обменные процессы в организме, стимулирует гемопоэз, повышает устойчивость к повышенным нагрузкам и стрессу [3].

Цель исследования — изучить лечебное действие комплексного препарата «Гемобаланс» при нарушении обмена веществ, сопровождающегося вторичным иммунодефицитом у подсосных жеребят.

Задачами исследования являлись: изучение результатов биохимических экспертиз крови подсосных жеребят, проведение иммунобиологических исследований неспецифического звена иммунитета.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на базе лаборатории кафедры Иммунологии ФГБОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И.Скрябина. Биохимические исследования сыворотки крови проводили на биохимическом анализаторе Стат Факс 3300 (Stat Fax 3300). Фагоцитарную активность нейтрофилов, лизоцимную и бактерицидную активность сыворотки крови

жеребят исследовали по методикам Емельяненко П.А. с соавт. (1980).

Эксперимент проводили в производственных условиях без изменения технологии выращивания жеребят, принятой в конном заводе, в летне-осенний период с 16.08.11 г. по 08.09.11. Для выполнения поставленных задач были сформированы три группы животных (возраст 5–5,5 мес.): опытная и две контрольных группы по принципу пар-аналогов. В опытную группу вошли 11 гол. подсосных жеребят с клиническими признаками контрактуры сгибателей пальца, в 1-ю контрольную группу — 5 гол. с первичными клиническими признаками контрактуры, во 2-ю контрольную группу — 5 гол. клинически здоровых жеребят.

Результаты проведенных исследований представлены в таблицах в виде среднего арифметического и стандартного отклонения. Статистическую обработку полученных результатов в начале и в конце опыта провели с помощью парного непараметрического теста Уилкоксона (Wilcoxon test). Достоверными принимали значения при $p < 0,05$.

Результаты исследований. В начале эксперимента при изучении результатов биохимических экспертиз сыворотки крови животных опытной и 1-й контрольной групп выявили нарушение минерального обмена веществ, кальциево-фосфорного соотношения; живот-

Таблица 1

Уровень Т- и В-лимфоцитов в крови опытных животных в начале опыта

Группа	Показатели			
	ТL, M±m		ВL, M±m	
	абс. кол-во, тыс./мл	отн. кол-во, %	абс. кол-во, тыс./мл	отн. кол-во, %
Опытная, n=11	1690±308,8	73,8±1,94	586±308,8	26,2±1,94
1-я контрольная, n=5	1710±198,1	74,6±1,95	570±75,8	25,4±1,95
2-я контрольная, n=5	2270±329,01	75,4±2,51	720±115,1	24,6±2,51

ные 2-й контрольной группы были клинически здоровы. При проведении иммунобиологических исследований у животных опытной и 1-й контрольной группы выявили: лимфопению, характеризующуюся снижением содержания абсолютного количества Т-, В-лимфоцитов в крови опытных животных (табл. 1), а также установлено уменьшение поглощающей и переваривающей активности нейтрофилов. Уровень лизоцимной активности имел невысокое значение: опытная группа — 38,7 мкг/мл, 1-я контрольная группа — 25,8 мкг/мл, 2-я контрольная группа — 31,65 мкг/мл (табл. 2). Значения показателей бактерицидной активности сыворотки крови были достаточно высокими во всех трех группах: в опытной группе — 99%, в 1-й контрольной группе — 99,4%, во 2-й контрольной группе — 98,5% (табл. 3).

Для устранения нарушения минерального обмена веществ, сопровождающегося вторичным иммунодефицитом, животным опытной группы был назначен

2-недельный курс лечения посредством комплексного препарата «Гемобаланс».

Схема лечения: 8 инъекций по 4 мл внутривенно, однократно через 48 ч., в течение 2-х недель (примерный вес животных 200 кг, дозировка 1 мл на 45 кг); для коррекции функциональных нарушений сухожильно-связочного аппарата конечностей жеребят применили ортопедическую расчистку копыт.

По окончании курса лечения провели повторные исследования. После проведенного курса лечения у животных опытной группы нарушений минерального обмена веществ не было выявлено. По результатам биохимических исследований сыворотки крови у жеребят опытной группы все параметры находились в пределах физиологической нормы. Функциональные нарушения сухожильно-связочного аппарата также не выявлены, все животные опытной группы были клинически здоровы.

У животных 1-й и 2-й контрольных групп выявили нарушение минерального обмена веществ. Кроме того, у жеребят 1-й контрольной группы контрактура стремительно развивалась, клинические симптомы болезни, очевидно, усугубились, животным было необходимо назначить курс лечения.

В результате иммунобиологических исследований было установлено: у животных опытной группы уровень абсолютного количества Т-лимфоцитов возрос на 44%, уровень абсолютного количества В-лимфоцитов увеличился на 45% по сравнению с началом эксперимента (табл. 4).

Таблица 2

Показатели бактерицидной активности (БАСК), лизоцимной активности сыворотки крови в начале опыта

Группа	Показатели	
	БАСК, % M±m	Лизоцим, мкг/мл M±m
Опытная, n=11	99,07±2,06	38,78±6,87
1-я контрольная, n=5	99,48±1,16	25,85±7,94
2-я контрольная, n=5	98,5±3,35	31,65±9,01

Таблица 3

Фагоцитарная активность нейтрофилов в начале опыта

Группа	Показатели			
	ФИ M±m	ФЧ M±m	% фагоцитоза M±m	% переваримости на стадии поглощения
Опытная, n=11	1,44±0,28	2,11±0,43	69,09±9,48	7,29±6,87
1-я контрольная, n=5	1,67±0,3	2,42±0,27	68±8,0	6,2±6,57
2-я контрольная, n=5	1,9±0,6	2,64±0,62	69,6±8,76	3,8±4,82

Таблица 4

Уровень Т- и В-лимфоцитов в крови опытных животных в конце эксперимента

Группа	Показатели			
	ТL, M±m		ВL, M±m	
	абс. кол-во, тыс./мл	отн. кол-во, %	абс. кол-во, тыс./мл	отн. кол-во, %
Опытная, n=11	2986±138,01	73,2±1,37	1063±71,03	26,8±1,1
1-я контрольная, n=5	2180±275,23	74,6±1,52	730±103,68	25,4±1,52
2-я контрольная, n=5	1910±285,2	75,4±1,14	640±129,42	24,6±1,14

Таблица 5

Фагоцитарная активность нейтрофилов в конце эксперимента

Группа	Показатели			
	ФИ, M±m	ФЧ, M±m	% фагоцитоза, M±m	% переваримости на стадии поглощения
Опытная, n=11	2,51±0,35	3,15±0,37	80±3,1	8,64±3,59
1-я контрольная, n=5	2,15±0,6	2,98±0,85	71,2±3,35	7,6±2,88
2-я контрольная, n=5	2,3±0,36	3,16±0,73	73,6±6,07	10,6±4,45

Таблица 6

Показатели БАСК, лизоцимной активности сыворотки крови в конце эксперимента

Группа	Показатели	
	БАСК, % M±m	Лизоцим, мкг/мл M±m
Опытная, n=11	86,37±10,49	19,89±4,75
1-я контрольная, n=5	85,99±6,04	68±10,6
2-я контрольная, n=5	94,4±5,58	83,8±30,4

Фагоцитарная активность нейтрофилов значительно выросла по сравнению с началом опыта: фагоцитарный индекс увеличился на 44 %, фагоцитарное число — на 23 %, процент фагоцитоза также увеличился на 11 %, процент переваримости на стадии поглощения остался на том же уровне (табл. 5).

Показатели бактерицидной активности сыворотки крови во всех трех группах незначительно снизились: опытная группа — 83,3 %, 1-я контрольная группа — 85,9 %, 2-я контрольная группа — 94,4 %. Значения лизоцимной активности сыворотки крови изменились: опытная группа — 19,8 мкг/мл, 1-я контрольная группа — 68 мкг/мл, 2-я контрольная группа — 83,8 мкг/мл (табл. 6).

Снижение лизоцимной активности сыворотки крови в опытной группе, вероятно, связано с фагоцитарной активизацией нейтрофилов, с высоким повышением показателей фагоцитоза.

Заключение. Таким образом, экспериментально установлено, что при внутривенном введении «Гемобаланса» в дозе 1 мл на 45 кг живой массы и 2-недельном курсе (8 инъекций, однократно в 48 часов) у подсосных жеребят усиливается лимфопоэз и созревание Т-, В-лимфоцитов, а также поглощающая и переваривающая активности нейтрофилов. Однако препарат не оказал достоверного влияния на бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови животных.

Тем не менее, полученные результаты дают основание рекомендовать комплексный препарат «Гемобаланс» для восстановления минерального обмена веществ и профилактики вторичного иммунодефицита факторов естественной резистентности подсосных жеребят при лечении контрактуры сухожилий сгибателей у подсосных жеребят.

Список литературы

1. Жаров А.В. Роль иммунодефицитов в патологии животных // Ветеринарная патология, 2003, № 3. – С. 7-12.
2. Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И. и др. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник. – М.: КолосС, 2004, 520 с.
3. Карпенко Л.Ю., Андреева А.Б. Влияние препарата «Гемобаланс» на факторы неспецифической резистентности лошадей // Зооиндустрия, 2007, № 3. – С. 17-19.
4. Пламб Д.К. Фармакологические препараты в ветеринарной медицине. – М.: Аквариум, 2002, 855 с.

Контактная информация:
8 (495) 377 69 87

УДК 619:616.74-018.38-009.12:636.1

Ю.А. ПИЛЮГА

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ СУХОЖИЛИЙ СГИБАТЕЛЕЙ ПАЛЬЦА ПРИ КОНТРАКТУРЕ У ПОДСОСНЫХ ЖЕРЕБЯТ

В ходе проведенного исследования установлено, что при контрактурах сухожилий сгибателей пальца у подсосных жеребят развиваются морфофункциональные нарушения в глубоком сгибателе и его добавочной головке, а также в поверхностном сгибателе.

Ключевые слова: подсосные жеребята, добавочная головка глубокого сгибателя пальца, контрактура сухожилия глубокого сгибателя.

Yu.A. Pilyuga

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

MORPHOFUNCTIONAL ABNORMALITIES OF DIGITAL FLEXOR TENDONS WITH CONTRACTURES IN FOALS

In the course of conducted research there was determined development of morphofunctional abnormalities in deep digital flexor tendon and check ligament of deep digital flexor tendon as well as in superficial flexor tendon.

Key words: foals, the check ligament of the deep digital flexor tendon, contracted deep digital flexor tendon.

Контрактура сухожилий сгибателей пальца является достаточно распространенным заболеванием подсосных жеребят, независимо от региона и климатической зоны. Особенно часто выявляют клинические случаи болезни на конфермах и конных заводах, занимающихся разведением английской чистокровной верховой породы лошадей [5]. Возможно,

причиной повсеместного распространения заболевания служит тот факт, что во многие полукровные породы лошадей для улучшения работоспособности «приливают» кровь английской чистокровной породы.

По литературным данным зарубежных [3, 4] и российских авторов [2], причиной развития клинических

симптомов болезни являются морфофункциональные нарушения сухожилий сгибателей пальца.

Цель исследования: произвести патологоанатомическое и гистологическое исследования сухожильно-связочного аппарата жеребят с выявленными клиническими симптомами контрактуры.

Материалы и методы исследований. Исследование проводили на базе кафедры Анатомии и гистологии животных им. А.Ф. Климова ФГБОУ ВПО МГАВМиБ имени К.И.Скрябина. Материалом для исследования служили сухожилия трупов 3-х жеребят будённовской и 2-х гол. траккененской пород с диагнозом «контрактура сгибателей пальца», павших в возрасте 6 месяцев. Пат-материал получен в ФПКЗ им. С.М. Буденного и Кировском конном заводе. Исследованы образцы сухожилий мышц-сгибателей пальца:

- поверхностного пальцевого сгибателя (*tendo musculi flexoris digitale superficiale*);
- глубокого пальцевого сгибателя (*tendo musculi flexoris digitale profndi*);
- добавочной головки сухожилия глубокого пальцевого сгибателя (*caput tendineus*);
- межкостного III мускула (*musculus interosseus tertium*).

В качестве контрольных образцов использованы неизменённые сухожилия возрастных аналогов.

Для гистологических исследований образцы сухожилий фиксировали в 10%-ном растворе формалина. После 24-часовой промывки в проточной воде его обезживали в спиртах восходящих концентраций, заливали в парафин по общепринятой методике [1] и готовили срезы толщиной 6–7 мкм на ротационном микротоме фирмы Leука. Срезы, депарафинированные ксилолом, окрашивали гематоксилином и эозином для выявления общей морфологической картины и по Ван-Гизону для определения состояния коллагеновых волокон, орсеином для селективного окрашивания эластических волокон [1].

Светооптические, микроморфометрические исследования и микрофотосъёмку осуществляли с помощью микроскопа Jenamed-2 фирмы Carl Zeiss Jena, совмещённого с компьютерной программой анализа изображений ImageScore версия Lite S (производство ООО «Электронный и рентгеновский анализ»). Программа позволяет осуществить и статистическую обработку цифрового материала.

Результаты исследований. В контрольных образцах сухожилий глубокого сгибателя пальцев (ГПС), его добавочной головки (ДГ) и поверхностного сгибателя пальцев (ППС) выявлена сходная морфологическая картина.

Все сухожилия построены типично и состоят из плотно оформленной соединительной ткани. Пучки коллагеновых волокон (КВ) ориентированы однонаправленно, обладают волнистой конфигурацией и формируют ритмичные структуры. Лишь в ДГ наблюдаются пучки КВ, расположенные под углом к основной массе пучков, ориентированных прямолинейно.

Среди пучков КВ наблюдаются клетки фибробластического дифферона. Преобладают типичные теноциты веретеновидной формы с тёмным ядром и небольшим объёмом цитоплазмы. Наряду с этим видны цепочки тенобластов овальной или треугольной формы с большим объёмом цитоплазмы, что соответствует процессу коллагеногенеза в ткани сухожилия.

Сухожилия покрыты перитеноном, который сформирован рыхлой соединительной тканью, содержат кровеносные сосуды. Пучки КВ разделены прослойками эндотенона. Здесь определяются сосуды гемомикроциркуляторного русла, окружённые тонким слоем рыхлой соединительной ткани.

Сухожилия сгибателя при контрактуре. При изучении сухожилий глубокого сгибателя пальцев (ГПС), его добавочной головки (ДГ) и поверхностного сгибателя пальцев (ППС) наибольшие изменения выявлены в сухожилии ГПС.

В структуре сухожилия ГПС определяется плотная оформленная соединительная ткань, в толще которой видны многочисленные мелкие очаги рубцовой ткани (рис. 1). Одни рубцы невелики и захватывают несколько пучков КВ II порядка, другие распространяются на несколько пучков КВ III порядка. В глубоких слоях сухожилия обращает на себя внимание утолщение эндотенона за счёт его склеротических изменений. При этом наблюдается утолщение пучков КВ соединительной ткани, окружающей сосуды, и уплотнение их расположения, паравазально наблюдаются умеренные клеточные инфильтраты. Эти признаки могут свидетельствовать об ухудшении трофических процессов в сухожилии. В перитеноне наблюдается склероз. Он проявляется в его утолщении, а также в утолщении и уплотнении расположения пучков КВ.

В отличие от контрольных образцов длина волны (L) здесь меньше ($45,7 \pm 5,6$ мкм), что соответствует большей извитости пучков КВ. Наряду с этим в одном случае наблюдали сочетание пучков III порядка с повышенной и сглаженной извитостью. Толщина пучков КВ I порядка от контрольных образцов не отличается или отличается незначительно и составляет $6,8 \pm 1,1$ мкм. В то же время толщина пучков КВ II и III порядков несколько увеличивается — соответственно 85 ± 12 мкм и 291 ± 35 мкм.

Добавочная головка сухожилия ГПС сформирована плотной оформленной соединительной тканью (рис. 2). Обращает на себя внимание деформация многих пучков КВ: сглаженность волнистой конфигурации или, напротив, повышение «волнистости», а также изогнутость групп пучков КВ.

При измерении длины волны отмечена крайняя вариабельность этого показателя. Так, наряду с пучками

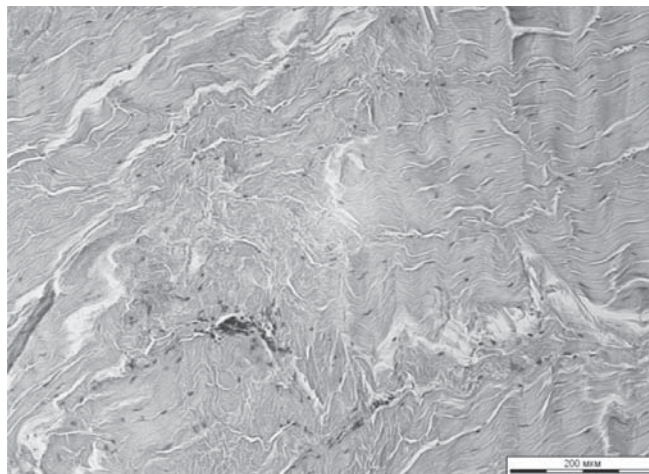


Рис. 1. Гистологический срез сухожилия глубокого сгибателя пальца при контрактуре.

Окраска гематоксилином и эозином, ок.10, об.20

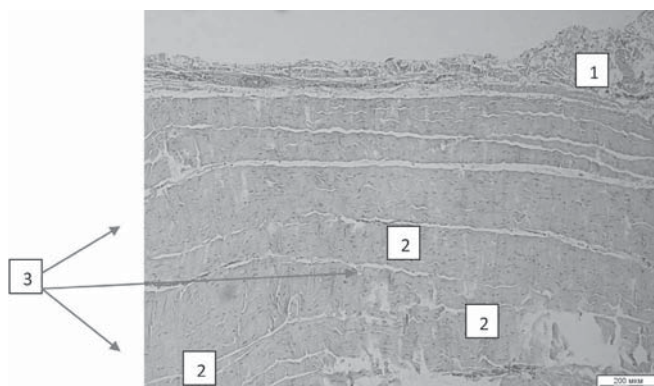


Рис. 2. Гистологический срез

добавочной головки сухожилия ГПС.

Общий вид: 1 – перитенон, 2 – пучки КВ III порядка, 3 – эндотенон. Окраска гематоксилином и эозином, ок.10, об.10

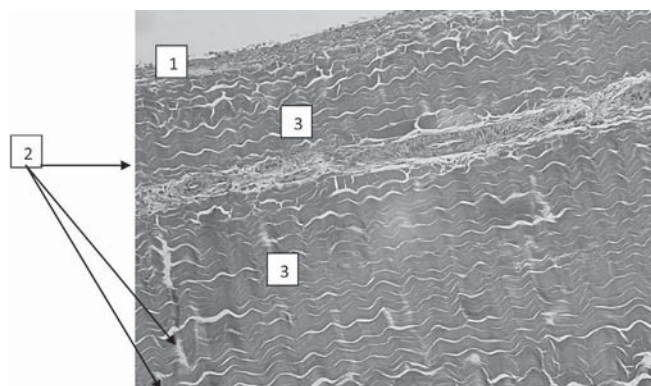


Рис. 3. Гистологический срез сухожилия

поверхностного сгибателя пальца:

1 – перитенон, 2 – пучки КВ II порядка, 3 – пучки КВ III порядка. Окраска по Ван-Гизону, ок.10, об.10

КВ с нормальной волнистостью многочисленны пучки КВ с небольшой длиной волны 54 ± 11 мкм. Встречаются пучки КВ со сглаженной волнистостью. Толщина пучков КВ I порядка меньше по сравнению с контрольными образцами и составляет $6,0 \pm 1,5$ мкм. В то же время толщина пучков КВ II и III порядков несколько увеличивается — соответственно 102 ± 15 мкм и 353 ± 18 мкм.

При изучении образцов сухожилия ППС установлено, что его структура на большей площади среза сохранна, выявлены единичные очаги дезорганизации, расположенные в толще сухожилия (рис. 3). Сухожилие ППС имеет типичную структуру. Пучки КВ расположены взаимопараллельно, волнистой конфигурации. По показателю длины волны (L) сухожилия при контрактуре уступают контрольным образцам — $58,3 \pm 13$; $45 \pm 5,4$. Толщина пучков КВ I порядка больше, чем в контрольных образцах ($7,2 \pm 1,8$ мкм). Толщина пучков КВ II и III порядков изменяется незначительно и составляет соответственно 78 ± 12 мкм и 335 ± 22 мкм.

Заключение. Наибольшим изменениям при контрактуре сгибателей пальца у жеребят подвергается сухожилие ГПС. Об этом свидетельствуют обнаруженные признаки: мультиочаговые рубцовые изменения ткани сухожилия; утолщение пучков КВ разных порядков, увеличение «волнистости» пучков КВ, что соответствует склеротическим изменениям; склеротические изменения в пери- и эндотеноне, что, очевидно, ухудшает трофическое обеспечение сухожилий. По-видимому, в сухожилии ГПС имеет место хронический фиброзирующий процесс, усугубляющийся трофическими нарушениями. В такой ситуации рубцовый процесс замыкается в «порочный круг».

В добавочной головке ГПС на первый план выступает изменение конфигурации пучков КВ: чередуются регионы с повышенной и пониженной волнистостью, наблюдается изогнутость пучков КВ. Это может негативно влиять на упруго-деформативные и прочностные характеристики этого сухожильного органа. Вместе с тем рубцовых и деструктивных изменений здесь обнаружено не было.

В сухожилии ППС наблюдается усиление извитости пучков КВ и небольшие единичные очаги дезорганизации.

В межкостном III мускуле рубцовые изменения и признаки дезорганизации не выявлены.

Список литературы

1. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. Микроскопическая техника: Руководство. – М.: Медицина, 1996, 544 с.
2. Семенов Б.С., Лебедев А.В., Елисейев Ф.Н. и др. Частная ветеринарная хирургия. – М: КолосС, 2006, 496 с.
3. Arnbjerg J. Changes in the distal phalanx in foals with deep flexor tendon contraction // *Veterinary Radiology*, 1988, № 2. – P. 65-69.
4. McGladdery A.J. Three cases of acquired flexural deformity of the distal interphalangeal joint in growing foals on a stud farm // *Equine Veterinary Education*, 1992. – P. 173-176.
5. Tanaka K., Asai Y., Kuwano A. Survey of the occurrence of equine deep flexor contraction (Clubfoot) in the main thoroughbred breeding area in Japan // *Journal of Equine Science*, 2009. – P. 15-17.

Контактная информация:
8 (495) 377-69-87 (служ.)

ОЦЕНКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СУХОЖИЛЬНО-СВЯЗОЧНОГО АППАРАТА У СПОРТИВНЫХ ЛОШАДЕЙ

В статье рассмотрены вопросы оценки структурно-функционального состояния сухожильно-связочного аппарата у спортивных лошадей на основании результатов морфобиомеханических и ультразвуковых исследований.

Ключевые слова: ультразвуковая диагностика, сухожильно-связочный аппарат грудных конечностей, спортивные лошади.

N.A. SLESARENKO, V.V. FROLENKO

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

EVALUATION OF STRUCTURAL-FUNCTIONAL STATUS TENDON-LIGAMENT APPARATUS OF SPORTS HORSES

The questions assess the structural and functional state of the tendon-ligament in sport horses on the basis of morphobiomechanical and ultrasound studies.

Key words: ultrasound diagnostic, tendon-ligamentous apparatus of the thoracic limbs, sports horses.

Совершенствование классических и разработка новых схем лечебно-профилактических мероприятий при тендинитах и энтезопатиях у лошадей остаётся до настоящего времени одной из актуальных проблем спортивного коневодства в связи с их широким распространением и снижением репродуктивных качеств травмированных животных, вплоть до их выбраковки. Следует отметить, что хромота перемежающегося типа может быть вызвана не тендинитом, а энтезопатией или их сочетанием. Клиническая картина тендинитов у лошадей достаточно хорошо изучена [1, 2, 3].

Что касается энтезопатий, то в ветеринарной литературе имеются единичные фрагментарные сообщения [4].

Клинически энтезопатия сходна с тендинитом, вместе с тем вызывает большое затруднение определение локализации патологического процесса. Рентгенографически в костно-сухожильных соединениях выявляются локальный гиперостоз и остеопения [2]. Аналогичная картина обнаруживается случайно при рентгенографическом и ультразвуковом исследованиях и не сопровождается нарушением функции конечности [4].

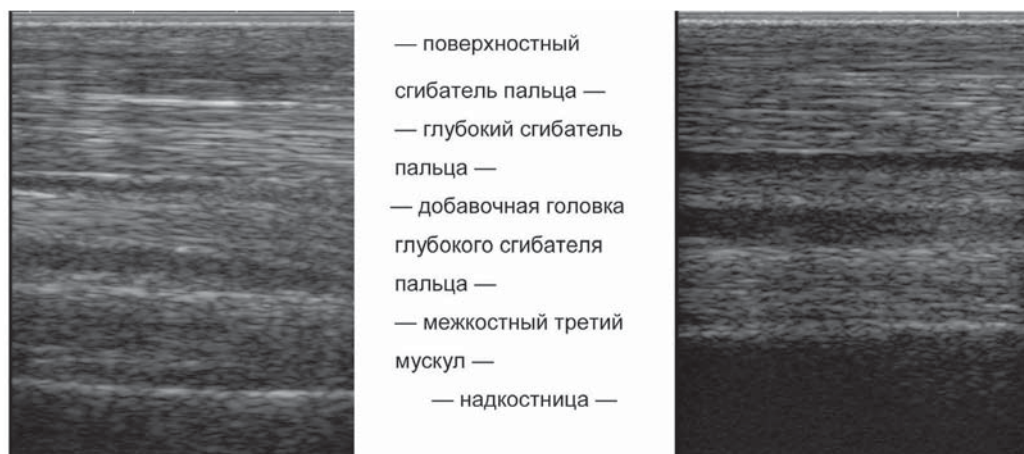
Вместе с тем данные по этиологии, патогенезу, дифференциальной диагностике данных патологий практически не разработаны.

Анализ проведения тренировочных программ свидетельствует о том, что перед началом периода интенсивных нагрузок лошади не подвергаются морфофункциональному обследованию сухожильно-связочного аппарата на предмет оценки физиологических возможностей локомоторного аппарата и наличия его патологий. Нагрузки подбираются эмпирическим путём, без учёта индивидуальных возможностей организма. Уровень теоретических знаний о локомоторном аппарате лошади у тренеров и берейторов достаточно низкий.

Всё вышеизложенное позволяет сделать заключение о необходимости качественной профилактики перенагрузок сухожильно-связочного аппарата конечностей, следствием которых могут быть его различные патологии.

Цель настоящего исследования — разработать алгоритм оценки структурно-функционального состояния сухожильно-связочного аппарата у спортивных лошадей в период интенсивных нагрузок для профилактики и своевременного выявления его патологий.

Материалы и методы исследования. Для проведения исследований было отобрано 50 лошадей спортивного и хобби класса. Все животные поступали с признаками хромоты различной степени выраженности при



Надрывы волокон сухожилия поверхностного сгибателя пальца

Рис. 1. Эхограммы сухожилий сгибателей пальца в продольной проекции в области средней трети пясти

но, что при значительном повреждении сухожильного тяжа в области свежего разрыва волокон визуализируется скопление соединительной ткани более чем в 70% случаев. Этот факт указывает на то, что данные локусы были подвержены деструктивному воздействию систематически и микротравмы в них носили хронический характер.

При макроморфологическом изучении кадаверного материала был подтвержден факт проявления патологий в зонах риска, освещенных в литературе другими исследователями [1, 4]. На патологическом материале в большинстве случаев выявлялись микронадрывы и скопления соединительной ткани в зонах проксимальнее путового сустава, дистальнее запястного сустава, а также в средней трети общего сухожильного тяжа сгибателей пальца.

Анализируя материалы исследований и сходство локализации патологий при различных испытаниях, можно выделить зоны наименьшей устойчивости сухожилий к испытываемой биомеханической нагрузке (рис. 2).

Зонами риска травмирования сухожилия поверхностного сгибателя пальца с учетом планиметрических, биомеханических и морфологических параметров являются: область средней трети пясти, путового сустава. В то время как глубокого пальцевого сгибателя: средняя треть пясти и зона, расположенная дистальнее путового сустава. Межкостная третья мышца чаще всего подвержена травмированию в области латеральной и медиальной ножек, которые испытывают растягивающую нагрузку и характеризуются минимальными показателями площади поперечного сечения.

Полученные результаты хорошо ассоциируются с данными клинической практики о наиболее часто встре-

чающихся повреждениях сухожилий сгибателей пальца с преимущественным травмированием поверхностного сгибателя.

Заключение. Таким образом, зоны риска повреждения сухожилий отличаются сочетанием морфологических и планиметрических показателей (уменьшение площади поперечного сечения сухожилия при одновременном увеличении механической нагрузки на регион, морфомеханические особенности), которые обуславливают снижение устойчивости к перегрузкам, а в случаях повреждения ослабляют регенеративный потенциал сухожильной ткани.

Полученные результаты являются базовыми в вопросах дифференциальной диагностики патологий сухожильно-связочной системы кисти у лошадей.

Список литературы

1. Слесаренко Н.А., Борхунова Е.Н., Алекперова В.Г. Морфофункциональные характеристики сухожилий и костно-сухожильных соединений пальца у рысистых лошадей: Учебное пособие. – СПб: Изд. «Лань», 2005, 96 с.: ил.: (Учебники для вузов. Специальная литература).
2. Гуди П. Топографическая анатомия лошади. – М.: Аквариум, 2006, 151 с.
3. Зеленецкий Н.В. Анатомия лошади: Атлас-учебник. – Т. 1. – СПб: ООО «Информационно-консалтинговый центр», 2007, 267 с.
4. Denoix J.M. The Equine Distal Limb.: An Atlas of Clinical Anatomy and Comparative Imaging. – London. Manson Publishing, 2002. – P. 390.

Контактная информация:
E-mail: Vladimirom85@mail.ru
тел.: 8 (929) 628-09-52

УДК 619:616.71-001.636

Ю.А. ВАТНИКОВ

ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Москва

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНОГО ВИДА ТРАВМ

В работе представлен анализ морфофункциональных изменений эритроцитов на фоне травм различного генеза. Остеосинтез, выполненный на 1-е сутки после перелома конечности, сопровождается более выраженными изменениями со стороны эритрона. После остеосинтеза, выполненного на 3-и и 5-е сутки, происходят аналогичные изменения, но морфофункциональные изменения эритроцитов проявляются в более ровной динамике, что следует считать прогностически благоприятным признаком для определения сроков проведения остеосинтеза.

Ключевые слова: крысы, травма, эритроциты, перелом, морфология, функция.

Yu.A. VATNIKOV

Peoples' friendship university of Russia, Moscow

MORPHOFUNCTIONAL ANALYSIS OF RED BLOOD CELLS IN RATS UNDER THE INFLUENCE OF INJURIES OF DIFFERENT GENESIS

In this work an analysis of morphofunctional changes of red blood cells is presented on the background of injuries of various origins. Osteosynthesis which is made on the first day after breaking limbs, accompanied by more significant changes from erythron. The same changes happen after osteosynthesis performed on the 3rd and 5th day, but morphofunctional changes of red blood cells appear smoother dynamics that should be considered prognostically favorable sign for the determination of the timing of the osteosynthesis.

Key words: rats, injury, red blood cells, fracture morphology, function.

Решение задач посттравматической стабилизации животных и создание условий контролируемой коррекции основных систем организма остается актуаль-

ной проблемой ветеринарной медицины. При этом недостаточно обоснованы критерии проведения постоперационной терапии с точки зрения структуры и

функции эритроцитов. В этой связи изучение состояния эритроцитов при спонтанных и операционных травмах, интерпретация результатов исследования в динамике травматической болезни, разработка методов посттравматической стабилизации организма с позиций морфофункциональных особенностей эритроцитов в сравнительном аспекте различных видов травм представляется актуальной.

Целью исследования было изучение морфофункциональных изменений эритроцитов у крыс под воздействием спонтанных и операционных травм.

Материалы и методы. В эксперименте было задействовано 18 клинически здоровых белых крыс-самцов гибридных линий в возрасте 2 мес., живой массой (МТ) 200 г. Под общей анестезией после перелома бедренной кости всем лабораторным крысам для сопоставления отломков проводили остеосинтез через латеральный доступ спицей Киршнера, вводимой ретроградно на 1, 3, 5-е сутки. Анализ эритроцитов проводили через сутки после остеосинтеза. Экспериментальные исследования и содержания крыс соответствовали требованиям приказов МЗ СССР № 755 от 12.08.1977, № 701 от 27.07.1978, № 1179 от 10.10.1983 и МЗ РФ № 267 от 19.06.2003. Морфофункциональные исследования эритроцитов экспериментальных крыс проводили по методу В.В. Долгова, С.А. Луговской с соавт. [1], их состояние контролировали по клиническим признакам, принятым в ветеринарной травматологии. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2007.

Результаты исследований. Главная задача эритроцитов заключается в том, что они должны сохраняться в циркулирующей крови как можно дольше и при этом сохранять гемоглобин в таком состоянии, чтобы можно было переносить кислород для удовлетворения в нем потребностей тканей, а также переносить CO_2 в систему циркуляции легких. Вместе с этим нарушение структуры и метаболизма эритроцитов приводит к их преждевременной гибели, усилению интоксикации, осложняет реабилитационный период в целом [3].

Исследования состояния эритроцитов показали, что их количественный показатель после нанесения экспериментальной травмы бедренной кости с $(8,8 \pm 0,4) \times 10^{12}$ /л снизился до $(3,3 \pm 0,1) \times 10^{12}$ /л, при этом остеосинтез, проведенный через сутки после травмы, вызвал еще большее снижение количества эритроцитов (до $(2,6 \pm 0,2) \times 10^{12}$ /л), что было в 3 раза ниже по сравнению с физиологическим показателем (ФП). Операция, проведенная через 3-е суток, вызвала снижение количества эритроцитов до $(4,7 \pm 0,8) \times 10^{12}$ /л, при этом данный показатель уступал ФП, но превышал значения экспериментальной травмы в 1,5 раза. Проведение операции через 5 суток также сопровождалось снижением, но превышало значения ранее проведенных операций в 1,5 и 1,2 раза соответственно (табл.).

Концентрация гемоглобина (HGB) после травмы конечности составила $8,5 \pm 1,1$ г/дл, этот показатель в 1,7 раза был ниже исходных данных. Операционная травма также вызвала снижение концентрации гемоглобина до $6,2 \pm 0,8$ г/дл, уступая при этом ФП и экспериментальной травме. Проведение оперативного вмешательства через 3 и 5 суток не привнесло каких-либо изменений в постоперационный процесс, и нами также отмечено снижение показателя гемоглобина до $11,0 \pm 1,3$ и $12,7 \pm 1,3$ г/дл соответственно.

Значения гематокрита после травмы находились в пределах $24,4 \pm 3,3$ %, данный показатель уступал ФП в 1,7 раза. Оперативное вмешательство, проведенное на 1, 3 и 5-е сутки выявило близкие значения, которые уступали ФП, но превышали значения экспериментально травмированной группы крыс.

Снижение цветового показателя по отношению к ФП ($0,86 \pm 0,06$) отмечено нами после травмы на уровне $0,65 \pm 0,01$. Оперативное вмешательство на 1-е сутки выявило аналогичное с травмой уменьшение цветности до $0,74 \pm 0,01$. В дальнейшем нами установлено постепенное увеличение цветового показателя применительно к операциям, проведенным на 3-и и 5-е сутки.

Количество ретикулоцитов после перелома бедра незначительно увеличилось и составило $4,7 \pm 0,3$ % при ФП $4,0 \pm 0,06$ %. Интрамедуллярный остеосинтез крыс

Таблица

Динамика морфофункциональной активности эритроцитов крыс

Показатели крови	Физиологические показатели (ФП)		Экспериментальный перелом		Оперативное вмешательство					
					1 сутки		3 сутки		5 сутки	
	М	м	М	м	М	м	М	м	М	м
RBC $\times 10^{12}$ /л	8,8	0,4	3,3	0,1	2,6	0,2	4,7	0,8	7,1	0,1
HGB, г/дл	14,9	0,4	8,5	1,1	6,2	0,8	11,0	1,3	12,7	1,3
НСТ, %	41,5	3,3	24,4	3,3	27,7	3,5	33,3	3,6	38,6	3,2
ЦП, %	0,86	0,06	0,65	0,01	0,74	0,01	0,78	0,01	0,72	0,01
Ретикулоциты, %	4,0	0,06	4,7	0,3	12,0	0,4	7,9	0,3	6,2	0,3
Нормоциты, %	86,5	2,4	76,9	3,1	69,8	3,1	74,0	3,3	82,0	2,7
Микроциты, %	8,2	0,6	11,1	0,9	4,2	0,8	7,5	1,2	11,1	1,6
Макроциты, %	5,3	0,6	12	2,9	26,0	1,6	18,5	0,6	6,9	2,3
Дискоциты, %	88,0	3,6	77,0	3,3	69,6	2,6	78,2	3,6	86,2	3,2
Эхиноциты, %	6,8	0,3	12,3	1,6	15,1	1,1	12,7	0,7	9,1	1,2
Стоматоциты, %	3,6	0,2	6,1	0,5	9,1	0,6	6,2	0,6	3,5	0,2
Сфероциты, %	1,6	0,01	4,6	0,9	6,2	0,1	2,9	0,2	1,2	0,6
Т. Жолли, %	3,2	0,06	4,0	0,03	11,1	2,1	6,1	0,1	5,2	0,8

Примечание. RBC – эритроциты; HGB – гемоглобин; НСТ – гематокрит; ЦП – цветовой показатель

через сутки после травмы стимулировал рост количества ретикулярных клеток до $12,0 \pm 0,4$ %, что в 3 раза превышало исходные данные и в 2,7 значения экспериментальной травмы. На 3-и сутки после выполненной операции увеличение количества ретикулоцитов произошло в 2 раза по отношению к ФП, но достоверно уступало предыдущему сроку исследований. После операции на 5-е сутки количество ретикулоцитов установлено в пределах $6,2 \pm 0,3$ %, что превышало показатели ФП, но в 2 раза уступало значению, полученному от крыс, оперированных через сутки. Проявленные изменения функциональной активности эритроцитов возникают по причине кровопотери нарастания токсического воздействия за счет появления мертвых тканей, а также накопления протеолитических ферментов, что незамедлительно сказывается на динамике клеток.

Экспериментальная травма вызвала снижение количества нормоцитов до $74,9 \pm 3,1$ % при исходных значениях $86,5 \pm 2,4$ %, оперативное вмешательство на 1-е сутки после травмы усилило их снижение, которое достигло $69,8 \pm 3,1$ %. В результате операции, выполненной через 3 суток после травмы, процентное содержание нормоцитов снизилось до $74,0 \pm 3,3$ %, а после остеосинтеза на 5-е сутки их количество уменьшилось незначительно и составило $82,0 \pm 2,7$ %. Как представлено в табл., содержание микроцитов при костной травме увеличилось до $11,1 \pm 0,9$ % при физиологических показателях (ФП) $8,2 \pm 0,6$ %. Остеосинтез, проведенный через сутки, спровоцировал выраженное снижение их количества, которое отмечено на уровне $4,2 \pm 0,8$ %. В последующем операция, выполненная на 5-е сутки, сопровождалась достаточно стойким увеличением количества макроцитов до окончания наблюдений. Значение макроцитарной активности возросло до $17,0 \pm 2,9$ % после перелома, а через сутки после операции содержание макроцитов увеличилось до $26,0 \pm 1,6$ %, что превысило ФП в 1,6 раза. Через 3-е суток показатель был также высок ($18,5 \pm 0,6$ %), но уступал данным предыдущего срока в 1,4 раза. На 5-е сутки количество макроцитов было на уровне ФП.

Количество дискоцитов (ФП $88,0 \pm 3,6$ %) снизилось после нанесения травмы до $77,0 \pm 3,3$ %, после операции их концентрация снизилась в большей степени и составила $69,6 \pm 2,6$ %. Оперативное вмешательство через 3 и 5 суток не выявило превышения ФП, а процентное содержание клеток было на уровне $78,2 \pm 3,6$ и $86,2 \pm 3,2$ % соответственно.

Процентное содержание эхиноцитов (ФП $6,8 \pm 0,3$ %) возросло после экспериментальной травмы до $12,3 \pm 1,6$ %, а после оперативного вмешательства достигло $15,1 \pm 1,1$ %, что достоверно превышало значения ФП и посттравматического показателя. Операция, выполненная через 3 суток, также вызвала значительный подъем количества эхиноцитов, превосходящий ФП, но уступающий количеству, отмеченному при травме и операции на 1-е сутки. Результаты операции через 5 суток можно сравнить с результатами остеосинтеза через 3 суток. В процентном отношении содержание клеток, отмеченное в этот день, превосходило значения ФП, но уступало значениям аналогичного показателя в остальных группах.

Травма бедренной кости сопровождалась увеличением количества стоматоцитов до $6,1 \pm 0,05$ % при ФП $3,6 \pm 0,2$ %, через сутки после хирургического вмешательства количество стоматоцитов в крови увеличи-

лось и составило $9,1 \pm 0,6$ %. Через 3 суток увеличение было незначительным и составило $6,2 \pm 0,6$ %, аналогичные данные получены нами и на следующий срок исследований. Данные изменения показывают достаточно глубокие преобразования в морфофункциональных особенностях эритроцитов. При этом следует отметить, что кроме кислородно-транспортной эритроциты выполняют и ряд других функций: они участвуют в регуляции кислотно-основного равновесия, агрегатного состояния крови, в белковом, липидном, водно-солевом обменах, в некоторых ферментных реакциях, а также являются адсорбентами и переносчиками аминокислот, многих токсинов, антигенов, лекарственных средств [3]. Изменение формы клетки можно объяснить агрегацией спектрина, вызванной кальцием, и связанным с этим изменением конфигурации и площади мембраны [6, 7].

Увеличение содержания сфероцитов после травмы составило $4,6 \pm 0,9$ % при ФП $1,6 \pm 0,01$ %. Значения показателя у группы животных, перенесших операцию через сутки, превосходили данные предыдущей группы, а также ФП. Значения этого показателя у группы животных, которым операция сделана через 3 суток ($2,9 \pm 0,2$ %), превосходили ФП, но уступали значениям предыдущей группы; операция у крыс, проведенная через 5 суток после травмы, также сопровождалась увеличением количества сфероцитов до $1,2 \pm 0,6$ %, что превосходило значения ФП.

По нашему мнению, уменьшение эластичности мембраны эритроцитов может быть следствием гипоксии, ацидоза, влияния продуктов липопероксидного обмена, а также механических воздействий. Способность к деформации эритроцитов обеспечивается также особыми свойствами липидного бислоя мембраны и белкового каркаса, их составом и структурой; внутренней вязкостью клетки, которая зависит прежде всего от концентрации и физико-химических свойств гемоглобина [4, 5]. Уменьшение эластичности мембраны эритроцитов может быть следствием гипоксии, ацидоза, влияния продуктов липопероксидного обмена, механических воздействий и др. [2].

Процентное содержание телец Жолли в эритроцитах увеличивалось после экспериментальной травмы до $4,0 \pm 0,03$ %. Оперативное вмешательство выявило резкое увеличение количества телец Жолли в эритроцитах крыс, оперированных через сутки после травмы ($11,2 \pm 2,1$ %). У крыс, оперированных на 3-и сутки, процентное содержание данных клеток составило $6,1 \pm 0,1$ %, что в 1,8 раза было ниже, чем в предыдущий срок исследований. Остеосинтез на 5-е сутки также спровоцировал увеличение количества телец Жолли в эритроцитах до $5,2 \pm 0,8$ %, что превышало ФП, но уступало значениям, полученным в других оперированных группах.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что эритроциты подвержены значительной деформации на фоне травм различного генеза. Исследованиями установлено снижение процентного содержания гемоглобина, гематокрита, цветового показателя при значительном снижении эритроцитов, особенно через сутки после остеосинтеза. Наряду с этим — увеличение разнородности эритроцитов после оперативного вмешательства; возрастание количества макроцитов, эхиноцитов, стоматоцитов и сфероцитов увеличилось, что свидетельствует о влиянии травм на структурную перестройку эритроцитов. При этом снижается количе-

ство нормоцитов и дискоцитов, микроцитов. и эритроцитов с тельцами Жолли. Остеосинтез, выполненный на 1-е сутки после перелома, сопровождается более выраженными изменениями со стороны эритрона по сравнению с показателями, полученными после травматического перелома конечности. В дальнейшем после остеосинтеза, выполненного на 3-и и 5-е сутки, происходят схожие изменения, но морфофункциональные изменения эритроцитов отличаются ровной динамикой, что является благоприятным в прогностическом отношении признаком для проведения остеосинтеза.

Список литературы

1. Долгов В.В., Луговская С.А., Морозова В.Т. с соавт. Лабораторная диагностика анемий. – Тверь: Губернская медицина, 2001.
2. Barosi G. Red cell membrane defect: uncertainty about splenectomy // *Pediatr. Res.*, 2001. V. 50. – P. 136.

3. Clark M., Mohandas N., Shonet S., Hoesch R. Ostomic gradient ektacytometry; comprehensive characterisation of red cell volume and surface maintenance // *Blood.*, 1983. V. 61. – P. 899-910.

4. Higgs D.R., Wood W.G. Erithropoiesis / Inc. Hoffbrand A.V., Catovsky D., Tuddenham E.D.S.G. Eds // *Postgraduate haematology.* – Blackwell, 2005. – P. 143-167.

5. Huang C.H., Liu Z., Cheng G. Rh50 glycoprotein gene and Rh50 disease: a silent splice donor is trans to a Gly₂₇₉ missense mutation in the conversed transmembrane segment // *Blood.*, 1998. V. 93. – P. 1176.

6. Singer S.J. The molecular organisation of membranes // *Ann Rev. Biochem.*, 1994. V. 43. – P. 805-833.

7. Zhang D., Kiyatkin A., Bolin J. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3 // *Blood.*, 2000. V. 96. – P. 2925.

Контактная информация:
vatnikov@yandex.ru.
Тел.: 8 (905) 587-32-91

УДК 619:617.713-002-6:636.1

А.Б. КОМИССАР

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ЭНДОГЕННОЙ ХОРИОРЕТИНОПАТИИ У КОШЕК

По современным данным зарубежной литературы, от 38 до 70 % кошек с хориоретинопатиями страдают сопутствующими системными заболеваниями, и иногда офтальмологическая патология может быть первым исследуемым клиническим признаком.

Ключевые слова: хориоретинопатии, кошки, фундускопия, электроретинография, глазное дно, диск зрительного нерва.

А.Б. КОМИССАР

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

RISK FACTORS OF ENDOGENOUS CHORIORETINOPATHY IN CATS

This article is about the ophthalmic pathology in cats, diagnosed as chorioretinitis and degeneration by modern complex of methods including funduscopy and electroretinography.

Key words: chorioretinopathy, cats, funduscopy, electroretinography, fundus, papilla.

В последние годы отмечается увеличение числа больных животных с хориоретинопатиями различной этиологии. При этом наблюдается значительный рост не инфекционных (вирусных, бактериальных, токсоплазмозных) хориоретинитов, а хориоретинопатий при системных заболеваниях, а также хориоретиниты смешанной этиологии. Довольно часто клиническое течение хориоретинитов различной этиологии, отличающихся от передних увеитов более длительным и тяжелым воспалительным процессом, сопровождается такими серьезными осложнениями, как помутнения и кровоизлияния в стекловидное тело, преретинальные кровоизлияния и геморрагии сетчатки, формирование субретинальных неоваскулярных мембран, витреоретинальных шварт. Эти осложнения приводят к снижению зрения, вплоть до слепоты.

Хориоретинит (chorioretinitis) — сочетанное воспаление заднего отдела сосудистой оболочки и сетчатки глаза. Наряду с увеитом хориоретинит является одним из наиболее примечательных и наименее изученных офтальмологических заболеваний у кошек. По современным данным зарубежной литературы, от 38 до 70 %

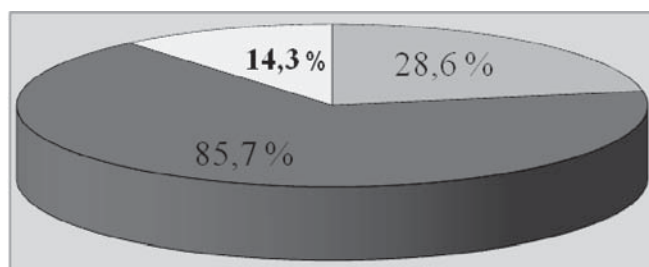
кошек с указанной патологией страдают сопутствующими системными заболеваниями, и иногда офтальмопатия может быть первым исследуемым клиническим признаком.

Целью работы было изучение факторов риска развития клинико-диагностических показателей хориоретинопатии как симптомокомплекса заболеваний общесоматических органов у кошек.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили кошки, поступавшие в клинику кафедры биологии и патологии мелких домашних, лабораторных и экзотических животных ФГБОУ ВПО МГАВМиБ. После осуществления первичных офтальмологических клинико-диагностических мероприятий и постановки диагноза «хориоретинопатия» были сформированы экспериментальные группы для проведения дальнейших лабораторных и специальных исследований до установления окончательного диагноза «вторичная хориоретинопатия». По результатам мониторинга в экспериментальную группу были отобраны 14 голов больных животных. Одновременно была сформирована группа контроля в количестве 10 голов.

В ходе экспериментальной работы по диагностике и клинической характеристике вторичной хориоретинопатии у кошек использовались общепринятые методики сбора анамнеза, клинической характеристики больных животных, оценки анатомического состояния органа зрения, прямой и непрямой офтальмоскопии (офтальмоскоп Riester), фундускопии (Kowa Genesis), электроретинографии (Retiport ERG Laptop Version), клинического и биохимического анализов крови, ультразвукографического исследования.

Результаты исследования. В результате клинических дифференциально-диагностических мероприятий было выявлено, что основными факторами риска возникновения и развития вторичных хориоретинопатий у кошек являются заболевания общесоматических органов. У кошек экспериментальной группы хориоретинопатии протекали преимущественно в виде хориоретинита и являлись симптомокомплексом панкреатита (12 гол., 85,7% животных), хронической почечной недостаточности (4 гол., 28,6% животных), хронического гепатита (2 гол., 14,3% животных). То есть из 14 кошек опытной группы у 4 животных (28,6% случаев) наблюдалось одновременное проявление клинических признаков хронического воспаления общесоматических органов.



- Хроническая почечная недостаточность
- Панкреатит
- Хронический гепатит

Рис. 1. Факторы риска возникновения и развития вторичной хориоретинопатии у кошек

При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости у кошек, страдающих вторичной хориоретинопатией, были обнаружены диффузное увеличение, смешанная экзогенность и изменения очертаний поджелудочной железы (12 гол., 85,7% случаев), диффузная акустическая неоднородность паренхимы печени и почек (4 гол., 28,6% случаев и 2 гол., 14,3% случаев соответственно).

Выявлено, что клинические формы течения вторичной хориоретинопатии у кошек характеризуются полиморфизмом, при этом установлены патогномичные признаки, затрагивающие хориоидею, сетчатку, диск зрительного нерва и проявляющиеся наличием структурного и функционального изменений вышеназванных составляющих глазного дна.

Передний отрезок глаза (роговица, передняя камера и радужная оболочка) без видимых изменений. Очаговое воспаление хориоидеи наблюдали у 12 кошек (85,7% случаев). При тяжелой форме вторичной хориоретинопатии с вовлечением в патологический процесс диска зрительного нерва (хорионейроретинит) регистрировали помутнение преретинальных слоев стекловидного тела (28,6% случаев), очаговое или диффузное воспаление сетчатки (14,3 и 71,4% случаев соответственно), серозно-фибринозный и геморрагический экссудат (14,3 и 28,6% случаев соответственно). Рассматриваемые в качестве осложнений вторичной хориоретинопатии гемофтальм, токсическая катаракта, отслоение сетчатки сопровождалась гипопионом (7,2% кошек) и гифемой (28,6% животных), помутнением капсулы хрусталика (7,2% кошек) соответственно.

Изучая характер течения хориоретинопатии у кошек, выявили 13 животных (92,9% случаев) с воспалительными признаками в сетчатой оболочке и хориоидее и 7,2% случаев с дегенеративными изменениями вышеуказанных структур.

При изучении данных электроретинографического исследования кошек с воспалительными и дегенеративными изменениями глазного дна выявлена корреляционная зависимость между показателями ретинограммы и характером течения вторичной хориоретинопатии.

Из таблицы следует, что в результате электроретинографического исследования было выявлено резкое снижение показателей а- и в-волн у кошек, страдающих вторичной хориоретинопатией, вплоть до $24,6 \pm 4$ мкВ

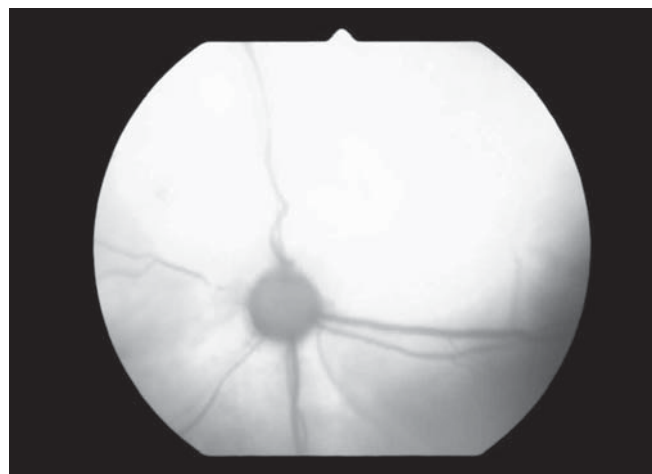
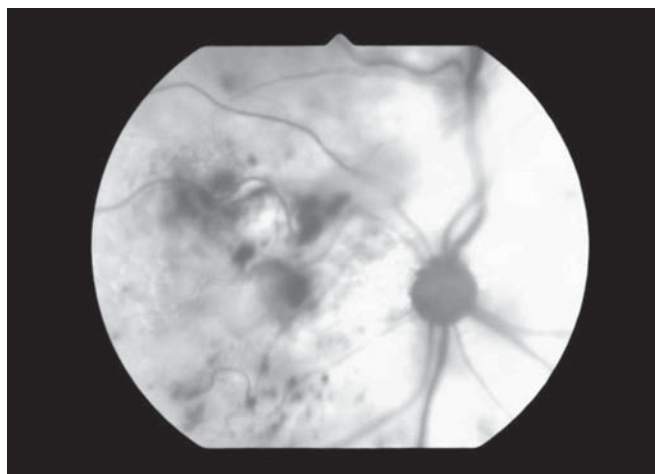


Рис. 2. Глазное дно кошки. Эндогенный хориоретинит

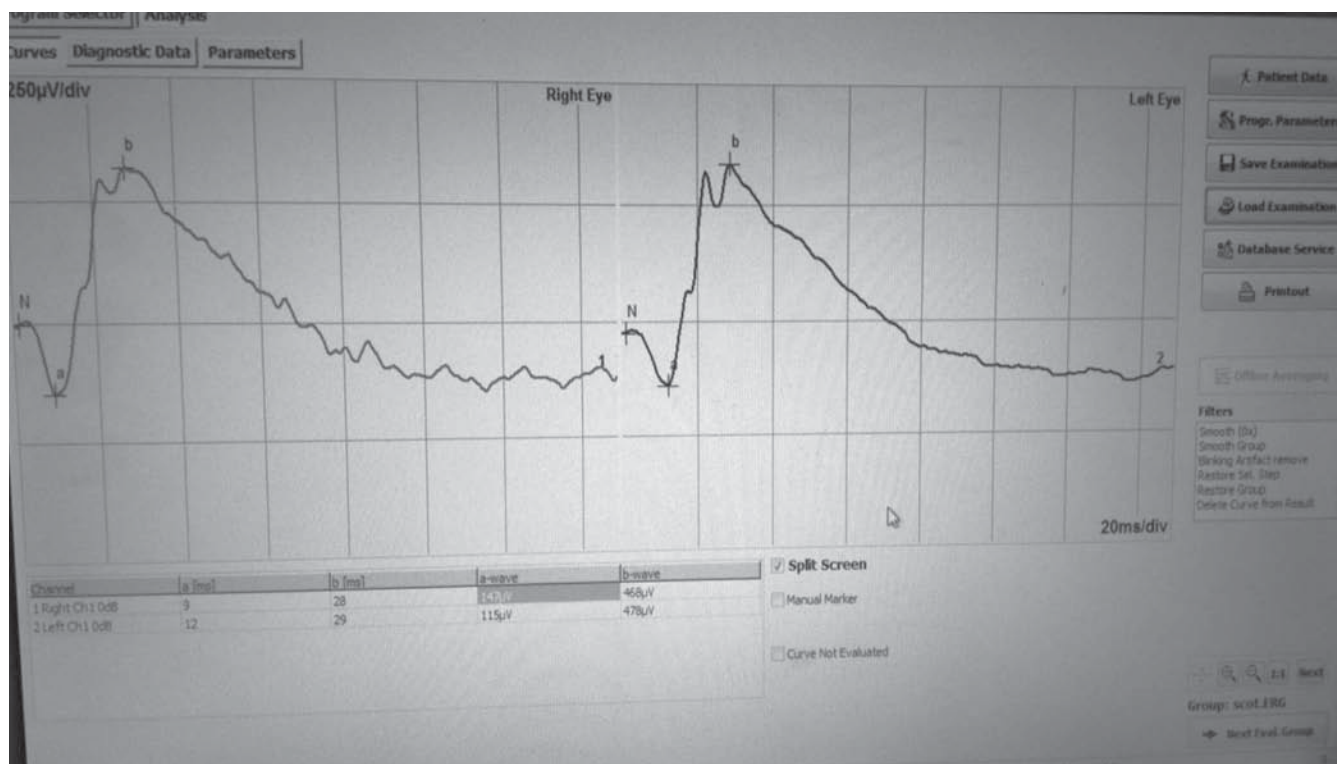


Рис. 3. Электроретинограмма кошки с признаками вторичной хориоретинопатии

Таблица
Результаты электроретинографии у кошек при эндогенной хориоретинопатии

Компоненты ЭРГ	Группа контроля	Хориоретинит	Дегенеративные изменения
a ₁ -волна, мкВ	55±6	24,6±4	25±5
a ₂ -волна, мкВ	85±10	26,2±4	30±10
b ₁ -волна, мкВ	230±15	53,8±10	20±15
b ₂ -волна, мкВ	250±15	61,0±10	30±15
Осцилляторные потенциалы	5±2	4±1	3±1
Всего животных, гол.	10	13	1

$p \leq 0,05$

по a₁-волне и 26,2±4 по a₂-волне и 20±15 и 30±15 мкВ по b₁- и b₂-волне соответственно при воспалительном процессе в тканях сетчатки и хориоидеи.

Дегенеративные изменения глазного дна у кошек характеризовались заметным снижением b₁- и b₂-волны (20±15, 30±15 мкВ соответственно); по сравнению с группами контроля показатели активности скотопической системы сетчатки также были уменьшены (25±5 мкВ — a₁-волна, 30±10 мкВ — a₂-волна). Таким образом, у животных с различными формами вторичной хориоретинопатии электроретинограмма является отображением дегенеративных процессов в фоторецепторах, снижения функциональных показателей работы скотопической и фотопической систем сетчатки, а также уменьшения волн осцилляторных потенциалов, т. е. уменьшения активности нейронов второго порядка.

На основании результатов проведенного исследования можно сделать следующие **выводы**.

1. Эндогенная хориоретинопатия является многофакторным заболеванием кошек, проявляется воспалительными и дегенеративными изменениями глазного дна. Клинически обоснованными факторами риска возникновения заболевания являются панкреатит (12 гол., 85,7%), хроническая почечная недостаточность (4 гол., 28,6%), хронический гепатит (2 гол., 14,3%).

2. Офтальмоскопия, фундускопия и электроретинография являются основными методами диагностики вторичной хориоретинопатии у кошек, позволяющими определить критерии морфофункционального состояния сосудистой и сетчатой оболочек и топографически сопряженных структур при воспалении и дегенерации.

Список литературы

1. Копенкин Е.П., Сотникова Л.Ф., Азуреева Н.П. Хориоретиниты лошадей: Методич. указания. – М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И.Скрябина, 2007.
2. Сароян С.В. Диагностика, клинико-морфологическая характеристика и лечение экзогенного и эндогенного увеита у собак: Автореф. дисс. ... канд. вет. наук. – М., 2009.
3. Bistner S., Shaw D. Disease of the uveal tract (part I) / In: Glaze M.B. The compendium collection: ophthalmology in small animal practice. – New Jersey: Veterinary Learning Systems, 1996. – P. 161-185.
4. Bjerkaas E. Uveitis of the cat related to systemic diseases // Norwegian School of Veterinary Science, 2008. – P. 4.
5. Clerc B.; Laforge H. Ocular manifestations of systemic disease / In: Ettinger S.J.; Feldman E.C. Textbook of veterinary internal medicine. – Philadelphia: Saunders, 1999. V.1. Cap.78. – P. 524-532.
6. Mirza A. Chorioretinitis // University of Florida College of Medicine Jacksonville, 2006.
7. Slatter D. Uvea // Fundamentals of veterinary ophthalmology / 3. ed. – Philadelphia: Saunders, 1990. Cap.12. – P. 338-364.

Контактная информация:
тел.: 8-903-248-57-43

М.Г. ГАЗИМАГОМЕДОВ, А.М. АТАЕВ, М.М. ЗУБАИРОВА
ФГБОУ ВПО «Дагестанская государственная
сельскохозяйственная академия имени М.М. Джамбулатова»

ЭПИЗООТОЛОГИЯ НАИБОЛЕЕ ОПАСНЫХ ГЕЛЬМИНТОЗОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В РАЗРЕЗЕ ВЫСОТНОЙ ПОЯСНОСТИ ДАГЕСТАНА

Анализируются особенности эпизоотологии фасциолёза, дикроцелиоза, парамфистоматидозов, личиночного эхинококкоза, стронгилятозов пищеварительного тракта (хабертиоз, буностомоз, трихостронгилёз, нематодироз, гемонхоз), гонгилонемоз, телязиоз крупного рогатого скота в разрезе высотной поясности Дагестана.

Ключевые слова: эпизоотология, гельминт, экстенсивность, интенсивность, инвазия, пищеварительный тракт, крупный рогатый скот, Дагестан.

M.G. GAZIMAGOMEDOV, A.M. ATAEV, M.M. ZUBAIROVA
Dagestan state agricultural academy named M.M. Dzhambulatov,

EPIZOOTOLOGIYA OF THE MOST DANGEROUS HELMINTHOSIS OF HORNED CATTLE IN A CUT OF HIGH-RISE BELT OF DAGESTAN

Features of epizootology of fascioloses, dicroecoeliosis, paramphistomatosis, larval echinococcosis, strongilyatosis of the digestive path (Chabertiosis, Bunostomum, Trichostrongylus, Nematodirus, Haemonchosis), thelaziosis of horned cattle in a cut of high-rise belt of Dagestan are analyzed.

Key words: epizootologia, helminth, extensiveness, intensity, an invasion, a digestive path, a horned cattle, Dagestan.

Гельминтозы являются наиболее распространенными патологиями крупного рогатого скота в Дагестане [1–5, 7]. К сожалению, за последние 20 лет наблюдается «нездоровая» тенденция несоблюдения, иногда отказ хозяев животных от проведения плановых профилактических дегельминтизаций крупного рогатого скота. Указанное непонимание проблемы связано с тем, что в настоящее время за здоровье животных отвечает сам хозяин. Такое положение способствует осложнению эпизоотической обстановки по гельминтозам. При этом необходимо иметь в виду, что около 70% возбудителей гельминтозов в регионе являются общими для домашних жвачных животных. Все указанное является причиной постепенного роста показателей зараженности жвачных животных возбудителями гельминтозов, интенсивного обсеменения биотопов пастбищ, источников водопоя инвазионным началом и стабилизации очагов.

Основными гельминтозами крупного рогатого скота, по нашим многолетним исследованиям и данным других ученых [1–6], в Дагестане являются фасциолёз, дикроцелиоз, парамфистоматидозы (в равнинном поясе), личиночный эхинококкоз, стронгилоидоз, буностомоз, трихостронгилёз, нематодироз, гемонхоз, хабертиоз, гонгилонемоз, телязиоз (очагово).

Комплексно эпизоотология этих гельминтозов в Дагестане не изучена, а имеющиеся данные фрагментарны.

Целью данной работы является охарактеризовать эпизоотологию наиболее опасных гельминтозов крупного рогатого скота в высотном аспекте.

Материал и методы. Исследование по эпизоотологии гельминтозов проведены в 2002–2010 годы. Всего по сезонам года в равнинном, предгорном, горном Дагестане вскрыто по 120 голов крупного рогатого скота, в том числе по 30 гол. молодняка до 1 года, от 1 до 2 лет и взрослых животных. Исследование проведено первые 3–5 часов после убоя животных.

В работе использованы результаты копрологических исследований 1200 проб фекалий, 120 проб растительности, 60 проб почвы, 600 экз. пресноводных, 300 экз. сухопутных моллюсков, 900 экз. муравьев.

В исследовании использованы методы полного гельминтологического вскрытия по академику К.И. Скрябину, последовательного промывания фекалий, флотации с насыщенным раствором аммиачной селитры по методике Бермана–Орлова, культивирование в фекалиях личинок стронгилят пищеварительного тракта. Моллюски, муравьи исследовались компрессионно.

Статистическая обработка цифрового материала проведена компьютерной программой «Биометрия».

Результаты исследований. Анализ материалов показал, что крупный рогатый скот инвазирован в биоценозах Дагестана 51 видом гельминтов, в том числе по 5 из классов трематода, цестода и 41 нематода. Причем среди нематод доминируют представители подотряда стронгилята 27 видов. В равнинном Дагестане животные заражены 51 видом гельминтов при общей зараженности 78,0%, интенсивности инвазии (ИИ) 1–2850 экз. Экстенсивность инвазии отдельными видами гельминтов варьирует от 3,3 до 46,6%, ИИ — 1–2850 экз. Среди возбудителей доминируют *F.hepatica*, *F.gigantica*, *D.lanceatum*, *P.cervi*, *C.calicophorum*, *E.granulosus* (I), *S.papillosus*, *B.trigonocephalum*, *T.axei*, *T.vitrinus*, *H.contortus*, *N.filicollis*, *N.spathiger*, *G.pulchrum*, *O.gutturosa*, ЭИ — 16,6–46,6%, ИИ — 4–2850 экз. В предгорном Дагестане крупный рогатый скот инвазирован 42 видами гельминтов при общей зараженности 69,0%, ИИ 1–3100 экз. Отдельными видами животные заражены с ЭИ 3,3–50,0%, ИИ 1–3100 экз. Относительно высокие показатели ЭИ (16,6–50,0%), ИИ (9–3100 экз.) отмечены *D.lanceatum*, *E.granulosus* (I), *S.papillosus*, *B.trigonocephalum*, *N.filicollis*, *N.spathiger*, *T.axei*, *T.vitrinus*. В горном Дагестане выше 2000 м над уровнем моря (н.у.м.) крупный рогатый скот заражен

18 видами гельминтов при общей инвазированности 43,0%, ИИ 1–175 экз. Зараженность отдельными видами колеблется: ЭИ — 3,3–13,3%, ИИ — 1–175 экз. ЭИ 10,0–13,3%, ИИ 5–175 экз. отмечены *D.lanceatum*, *S.papillosus*, *B.trigonocephalum*, *T.axei*, *T.vitrinus*, *N.filicollis*, *N.spathiger*, *N.vitulum*, *Th.rhodesi*. Последние 9 видов являются наиболее экологически пластичными, так как ими животные заражены во всех природно-климатических поясах и экосистемах региона. Крупный рогатый скот слабо заражен *S.bovis*, *B.phlebotomum*, видами родов *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus* (кроме *T.axei*, *T.vitrinus*), *Ostertagia*, *Marshallagia*, *Cooperia*, *N.helvetianus*, *N.oiratianus*, *Th.gulosa*, *Th.skrjabini*, *S.labiato-papillosa*, *O.lienalis*, *S.assamensis*, *S.stilesi*, *T.ovis*, *T.skrjabini*, *P.bovicola*.

Фасциолёз. Крупный рогатый скот инвазирован фасциолами в равнинном, предгорном поясах, ЭИ 3,3–20,0%, ИИ 3–56 экз., и слабо в горах до 2000 м н.у.м. (*F.hepatica*), соответственно 3,3% и 2–7 экз. Заражение животных происходит с апреля по конец ноября, в горах — с мая по октябрь, заболевание проявляется с декабря. При вскрытии в желчных протоках регистрируются три группы фасциол: молодые, еще без яиц в матках; зрелые особи с наполненными яйцами матками; старые, с атрофированными семенниками, желточниками и с единичными яйцами в матках. Указанное отмечается среди поголовья животных, не подвергнутых дегельминтизации и обусловлено накоплением фасциол разных лет заражения, так как мариты могут паразитировать в желчных протоках до 5–6 лет. Промежуточные хозяева фасциол — малый, ушковидный и овальный прудовики — инвазированы партенитами фасциол от 0,5 до 14,0% в равнинной, 0,1–0,3% в предгорной и 0,05–0,08% в горной зонах. Основные очаги фасциолёза расположены на низинных переувлажненных биотопах пастбищ равнинного пояса, особенно в междуречье Сулака, Терека, Таловки и Самурской долине. Интенсивно обсеменены адолескариями фасциол пышная зелень вблизи источников водопоя, особенно привлекают животных во второй половине осени.

Фасциолёз крупного рогатого скота практически всегда проявляется в хронической форме. За все годы наблюдений нами зарегистрировано 7 случаев острого фасциолёза среди молодняка от 1 до 2 лет. При вскрытии установлен острый гепатит в паренхиме печени, в жидкости в брюшной полости обнаружено от 280 до 720 экз. ювенальных *F.gigantica* размерами от 0,7 до 1,2 см.

В эпизоотологическом отношении большую опасность представляет поголовье животных, которое нерегулярно подвергается дегельминтизациям.

Дикроцелиоз. Крупный рогатый скот заражен *D.lanceatum* в равнинной, предгорной зонах, ЭИ 46,6–50,0%, ИИ 78–3100 экз., в горах до 2000 м н.у.м. — 10,0% и 36–175 экз. Животные заражаются дикроцелиями в равнинном, предгорном поясах с июня по конец октября, в горах — с июля по конец сентября. Заболевание в виде хронического дикроцелиоза регистрируется среди животных старше одного года в любое время года, так как у поголовья трех и старше лет отмечается накопление дикроцелий прошлых годов. Промежуточные хозяева — сухопутные моллюски — инвазированы партенитами гельминта в равнинном, предгорном поясах от 0,3 до 5,8%, в горах до 2000 м н.у.м. — 0,1–0,4%, выше — до 0,06%, дополнительные хозяева заражены соответственно 0,2–2,0%, 0,1–0,3% и до 0,03%.

Основные очаги дикроцелиоза расположены на суходольных, степных угодьях, а в горах — на плато и солнечных склонах.

В эпизоотологическом отношении опасность представляет вся инвазированная дикроцелиями часть поголовья крупного рогатого скота, так как современные трематоды малоэффективны против данного возбудителя, а в желчных протоках они паразитируют до 6–7 лет [6].

Эхинококкоз ларвальный. Крупный рогатый скот инвазирован личинками *E.granulosus* в равнинном, предгорном поясах: ЭИ 8,5–17,0%, ИИ 1–47 экз., в горах до 2000 м н.у.м. — 5,0–10,0% и 1–16 экз., выше — 1,0–3,0 и 1–4 экз. Животные заражаются эхинококками в равнинном, предгорном поясах и горах до 2000 м н.у.м. практически круглый год, выше — с июня по конец сентября. Эхинококкоз крупного рогатого скота регистрируется среди скота старше одного года в любое время года. Животные инвазируются на пастбищах, на территориях ферм, а также около водоемов. Крупный рогатый скот не инвазирован эхинококкозом при стационарном содержании. При вскрытии более 96% случаев регистрируют ацефалоцисты.

Стронгилоидоз. Крупный рогатый скот инвазирован *S.papillosus* в равнинном, предгорном поясах: ЭИ 20,0–23,3%, ИИ 9–67 экз., в горах до 2000 м н.у.м. — соответственно 3,3–10,0% и 5–13 экз., выше — до 3,3% и 1–3 экз. Заражение животных инвазионными личинками стронгилоидозов происходит с мая по конец ноября в равнинном, предгорном районах, с июня по октябрь — в горах до 2000 м н.у.м. и в июле–сентябре — до 3000 м н.у.м. Возбудителями стронгилоидоза преимущественно инвазирован молодняк в первые два года жизни, зараженность животных старших возрастов достигает 3,3% при ИИ 2–3 экз.

Буностомоз, хабертиоз, трихостронгилоидоз, нематодироз, гемонхоз. Крупный рогатый скот заражен фоточными возбудителями этих гельминтозов (*B.trigonocephalum*, *Ch.ovina*, *T.axei*, *T.vitrinus*, *H.contortus*, *N.filicollis*, *N.spathiger*), ЭИ 13,3–20,0%, ИИ 7–59 экз. в равнинном, предгорном поясах — 6,6–13,3%, 6–27 экз. — в горах до 2000 м н.у.м. ЭИ 3,3–10,0%, ИИ 5–12 экз. Заражение животных возбудителями стронгилоидозов пищеварительного тракта происходит с апреля по конец ноября в равнинном, предгорном поясах, с мая по конец октября — в горах до 2000 м н.у.м. и с июля по конец сентября — в горах выше 2500 м н.у.м. Имаго стронгилят пищеварительного тракта паразитирует в кишечнике животных до 4–6 месяцев, исключение составляют виды р. *Bunostomum*, соответственно инвазированная часть поголовья животных освобождается от этих возбудителей к весне (естественная элиминация). В равнинном, предгорном поясах формирование инвазионной личинки стронгилят в биотопах пастбищ происходит в течение 8–14 дней, в горах до 2000 м н.у.м. — 12–15 дней, выше — 14–19 дней. В горах выше 2000 м н.у.м. инвазионное начало стронгилят не перезимовывает к весне. На степных, суходольных угодьях равнинного пояса в июле, августе инвазионное начало стронгилят развивается крайне слабо и только вблизи водоисточников, из-за засухи и высоких температур (до +50°C).

В эпизоотологическом отношении опасность представляет вся инвазионная часть поголовья крупного рогатого скота, тем более они практически не подвергаются профилактическим дегельминтизациям.

Неаскаридоз телят. Крупный рогатый скот инвазирован *N.vitulorum* в равнинном, предгорном поясах слабо, ЭИ 3,3–6,6%, ИИ 5–11 экз., в горах выше 2000 м н.у.м. животные не заражены этим возбудителем. За все годы наблюдений зарегистрирован один случай внутриутробного заражения в кишечнике мертворожденного теленка (2 экз.). Болезнь имеет ограниченное распространение, в эпизоотологическом отношении опасность представляет инвазированная часть поголовья животных.

Гонгионемоз. Крупный рогатый скот инвазирован *G.pulchrum* в равнинном, предгорном поясах, ЭИ 13,3–16,6%, ИИ 5–10 экз., в горах до 2000 м н.у.м. соответственно до 6,6% и 3–5 экз., выше — 3,3% и 2–3 экз. Гонгилонами животные заражаются на территории ферм, на пастбищах равнинного, предгорного поясов с мая по конец октября, в горах до 2000 м н.у.м. — с июня по конец сентября, выше — июль–сентябрь соответственно.

Промежуточными хозяевами *G.pulchrum* являются 36 видов жуков-копрофагов [7], которые инвазируются личинками гельминта от 1,0 до 15,0%, в равнинном, предгорном поясах, 0,6–2,0% в горах до 2000 м н.у.м. и 0,3–0,5% — выше 2500 м. В эпизоотическом отношении значение имеет инвазированная часть поголовья крупного рогатого скота, тем более заболевание прижизненно не диагностируется, соответственно профилактические дегельминтизации против гонгионемоза не проводятся.

Телязиоз крупного рогатого скота вызывают *Th.rhodesi*, *Th.gulosa*, *Th.skrjabini*, где доминирует первые два вида, ЭИ 10,0–13,0%, ИИ 3–15 экз. в равнинном, предгорном поясах и 3,3–6,6%, 2–3 экз. — в горах до 1500 м н.у.м. Телязиоз является очаговым гельминтозом. Промежуточные хозяева, в основном *M.autumnalis*, инвазируются в очагах болезни до 0,3%. Гельминтоз регистрируются среди молодняка в первые два года жизни в июле–сентябре.

В эпизоотологическом отношении значение имеют как показатели зараженности животных, так и промежуточные хозяева.

Таким образом, 18 нозологических наименований гельминтозов — фасциолёз, дикроцелиоз, парамфистоматидозы, эхинококкоз, тениюкольный, цистицеркоз, стронгилоидоз, буностомоз, трихостронгилёз, гемонхоз, хабертиоз, остертагиоз, коопериоз, нематодироз, неаскариоз, телязиоз, гонгилонемоз, онхоцеркоз, стефанофиляриоз являются фоновыми. Единичные регистрации отмечены возбудителями мониезиоза, цистицеркоза бовисного, эзофагостомоза, маршаллагриоза, сетариоза, трихоцефалёза, парафиляриоза.

Крупный рогатый скот всегда инвазирован множественными инвазиями гельминтов от 4 до 11 видов, среди которых чаще регистрируются сочетание фасциол, дикроцелий, личинок эхинококкусов, буностом, трихостронгилюсов, нематодир, гонгилоном.

Список литературы

1. Атаев А.М. Эпизоотическая ситуация по паразитозам животных в Дагестане // Ветеринария, 2002, № 4. – С. 23-29.
2. Карсаков Н.Т., Зубаирова М.М., Атаев А.М. Опыт борьбы с гельминтозами в Дагестане // Ветеринария, 2009, № 11. – С. 29-31.
3. Зубаирова М.М., Атаев А.М. Опыт профилактики филяриатозов крупного рогатого скота // Ветеринария, 2011, № 5. – С. 33-36.
4. Зубаирова М.М. Спируриды крупного рогатого скота в юго-восточной части Северного Кавказа (видовой состав, распространение, биология, экология, совершенствование мер борьбы): Дисс. ... докт. биол. наук. – М., 2011, 358 с.
5. Кадырбеков М.М. Эпизоотология гельминтозов крупного рогатого скота и совершенствование мер борьбы с ними в Терско-Кумской низменности: Дисс. ... канд. вет. наук. – Махачкала, 2010, 137 с.
6. Газимагомедов М.Г. Фауна и биоэкология гельминтов аборигенного крупного рогатого скота в горном поясе Дагестана, совершенствование мер борьбы: Дисс. ... канд. биол. наук, 2009, 125 с.
7. Твердохлебов П.Т., Аюпов Х.В. Дикроцелиоз животных. – М.: Агропромиздат, 1988, 115 с.

Контактная информация:
+7(8722) 3922264)+79882769902

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПРОТИВОЭПИЗООТИЧЕСКОЙ БОРЬБЫ С САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ ПТИЦ

Бактериофаг тифимуриум против сальмонеллеза голубей и способ его применения, метод терапии и профилактики сальмонеллеза птиц бивалентным бактериофагом, метод селективной деконтаминации с использованием фаговых препаратов и пробиотика Лактобифадол, вакцина «Виросальм», разработанные нами, способствуют эффективной борьбе с сальмонеллезом птиц. Включение в систему противозооэпидемиологической борьбы предложенных средств и методов, позволит оздоровить неблагополучные хозяйства, ликвидировать бактерионосительство, повысить сохранность птицепоголовья.

Ключевые слова: сальмонеллез, птицы, оздоровление, профилактика.

N.V. PIMENOV

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

IMPROVING THE SYSTEM OF ANTI-EPIZOOTIC STRUGGLE WITH SALMONELLOSIS OF BIRDS

Bacteriophage tifimurium against salmonellosis of pigeons and method of its using, a method of treatment and prevention of salmonellosis birds by bivalent bacteriophage, a method of selective decontamination with using of phage preparations and probiotic «Laktobifadol». The vaccine «Virosalm», which developed by us, contribute to effective struggle against salmonellosis of birds. The inclusion to system of anti-epizootic struggle proposed tools and techniques will improve the unfavorable farmings, will eliminate bacteriocarrier and will improve the protection of poultry stock.

Key words: salmonellosis, birds, rehabilitation, prevention.

Сальмонеллез птиц продолжает оставаться серьезной социально-экономической проблемой большинства стран мира. Возрастает проблема сальмонеллеза птиц в условиях мелких ферм, вольеров, голубятен, индивидуальных хозяйств, частных подворий, зоопарков. Учащаются случаи сальмонеллеза в голубеводстве, уток-водстве, гусеводстве, фазановодстве, перепеловодстве, страусоводстве. Установленные экзогенный и эндогенный пути заражения сальмонеллезом птиц делают проблематичной санацию птицепоголовья и обеспечение защиты, особенно птенцов. Растет вирулентность циркулирующих изолятов сальмонелл, инфицирующая доза может составлять от десятков до нескольких тысяч клеток. Меняется этиологический профиль сальмонеллеза, возрастает роль сероварианта *Salmonella typhimurium* как возбудителя сальмонеллеза птиц. Для птиц многих видов данный возбудитель является доминирующим. Возбудители сальмонеллеза птиц *S. typhimurium* и *S. enteritidis* являются основными возбудителями пищевых токсикоинфекций сальмонеллезной этиологии у человека. Усиливается влияние синантропных птиц и продуктов птицеводства в провокации вспышек сальмонеллеза у людей. При этом циркулирующие патогенные штаммы сальмонелл обладают множественной антибиотикорезистентностью.

Нормативные акты, рекомендованные мероприятия по борьбе с сальмонеллезом в птицеводстве ориентированы преимущественно на крупные промышленные предприятия и борьбу с энтеритидис и пуллорум-инфекцией. Медикаментозные подходы, применяемые при оздоровлении неблагополучного птицепоголовья, требуют изменения в сторону применения безвредных, экологически безопасных, активных препаратов и методов. Бактериофаг тифимуриум против сальмонеллеза голубей и способ его применения, метод терапии и профилактики сальмонеллеза птиц бивалентным бактериофагом, метод селективной деконтаминации с ис-

пользованием фаговых препаратов и пробиотика Лактобифадол, вакцина «Виросальм», разработанные нами, способствуют эффективной борьбе с сальмонеллезом птиц, совершенствуют существующие методы и средства борьбы с опасным зооантропонозом.

Препараты Бактериофаг тифимуриум против сальмонеллеза голубей и бивалентный бактериофаг против сальмонеллеза птиц сконструированы на выделенных и селекционированных нами бактериофагах Phagum *Salmonella typhimurium* с литической активностью 10^8 – 10^{10} по методу Аппельмана и депонированных ранее в качестве производственных бактериофагов Phagum *Salmonella enteritidis* A-1, ЮН-1, ЮН-2. Фаги характеризовались негативными колониями преимущественно типа «А», специфичностью в отношении вида *Salmonella enterica* и высоким диапазоном литической активности, в т.ч. к другим серовариантам, адаптированным к организму птиц. По морфологии структурных элементов селекционированные бактериофаги отнесены к семейству Siphoviridae и четвертой морфологической группе по А.С. Тихоненко. Штаммы Phagum *Salmonella typhimurium* № 5 ТЗ, Ph. *S. typhimurium* № 8 МЕ, Ph. *S. typhimurium* № 9 ММ характеризовались выраженной интенсивностью формирования литического фермента, минимальным латентным периодом внутриклеточного развития, высокой урожайностью, периодом стабилизации лизиса 6–8 минут, скоростью адсорбции $(4,0–4,96) \times 10^{-9} \text{ см}^3 \text{ мин}^{-1}$.

При проведении опытов одиночного цикла развития по методу Эллипса и Дельбрюкка у фагов выявился минимальный латентный период внутриклеточного развития, что особенно проявилось у Ph. *S. typhimurium* № 8 МЕ. Период стабилизации лизиса по всем фагам был в пределах 6–8 минут. Наиболее высокая урожайность отмечена у Ph. *S. typhimurium* № 5 ТЗ. Средняя урожайность остальных фагов на одну бактериальную клетку также отмечена на достаточно

высоком уровне для производственных штаммов — 185–206 фаговых частиц. Эти данные удовлетворяют требованиям производственных штаммов для создания лечебно-профилактических препаратов.

У созданных на основе штаммов *Ph. S. typhimurium* лечебно-профилактических препаратов Бактериофаг тифимуриум против сальмонеллеза голубей и бивалентный сальмофаг против сальмонеллеза птиц установлена выраженная активность в исследованиях на белых мышах и голубях: сохранность в опытных группах (инфицированных и обработанных препаратом) составила 100% при 90–100% гибели лабораторных объектов в контроле.

На основе применения фаговых препаратов и пробиотика Лактобифадол нами предложен метод селективной деконтаминации для эффективного лечения при сальмонеллезе птиц.

Лактобифадол содержит бифидобактерии вида *Bifidobacterium adolescentis* и лактобактерии *Lactobacillus acidophilum*, характерные для микробиоценоза животных и птиц. Микроорганизмы этих родов и видов у птицы преобладают в кишечнике и имеют наибольшее физиологическое значение. Штаммы отличаются выраженными антагонистическими свойствами к патогенным и условно-патогенным бактериям, имеют выраженные адгезивные свойства, устойчивы к широкому диапазону рН, к желчи, фенолу, повышенной концентрации хлорида натрия, имеют выраженную кислотообразующую, антагонистическую, биохимическую и ферментативную активность. Штаммы препарата образуют органические кислоты, витамины, ферменты, повышающие продуктивность и конверсию корма у птиц.

Сочетание конкурентного действия на патогенную микрофлору лактобифадола со специфическим литическим действием бактериофага тифимуриум или бивалентного бактериофага обеспечивает выраженный лечебный и профилактический эффект против сальмонеллеза птиц.

Метод селективной деконтаминации был успешно апробирован при пероральном применении цыплятам и голубям бактериофага тифимуриум с питьевой, кипяченой и остуженной до 25–30°C водой в разведении из расчета по объему 1:10–1:20 и одновременно пробиотика Лактобифадол в лечебной дозе 0,4 г на 1 кг массы птицы ежедневно в течение 10 суток, а далее 0,2 г — на 1 кг массы в течение 20 суток. При использовании бивалентного бактериофага и лактобифадола методом селективной деконтаминации успешно оздоровлена птица разных видов (фазаны, утки, индоутки, павлины и др.) в вольерах передвижного зоопарка «Ташир».

Длительная иммунологическая защита от возбудителя сальмонеллеза возможна только при эффективной вакцинопрофилактике. По мнению ряда экспертов ВОЗ, проблема сальмонеллеза не может быть решена без применения эффективных средств специфической иммунопрофилактики сальмонеллеза.

Предложенные живые, инактивированные и химические вакцины против сальмонеллеза кур не содержат антигена *S. typhimurium*. Живая вакцина против сальмонеллеза водоплавающей птицы из аттенуированного штамма *S. typhimurium* ограничена в применении в связи с трудностью дифференциации вакцинного штамма от патогенных, возможностью осложнений и суперинфекции при вакцинации по инфицированному фону. До настоящей работы в России не было сертифицированных инактивированных вакцин против сальмонел-

леза голубей (где применение живой вакцины чревато снижением яйценоскости), не предложено унифицированных средств иммунопрофилактики, составляющих комплекс антигенов по нескольким эпизоотическим штаммам и серовариантам для разводимых птиц разных видов.

Для решения насущной задачи совершенствования профилактики сальмонеллеза птиц нами была создана инактивированная ассоциированная полиэтиленгликолевая вакцина «Виросальм» против сальмонеллеза и болезни Ньюкасла птиц. Применение инактивированной вакцины продиктовано соображениями высокой эффективности и контроля иммунизации, особенно на небольших поголовьях высокоценной птицы, ареактогенности, безвредности и безопасности применения, удобства дозирования и длительности иммунитета.

Вакцина «Виросальм» представляет из себя суспензию антигенов, инактивированных 0,3%-ным раствором формалина и осажденных полиэтиленгликолем высокоиммуногенных штаммов *Salmonella typhimurium* М-5в т-ДЕП, *Salmonella typhimurium* Д-1в т-ДЕП и *Salmonella enteritidis* 25Яв е-ДЕП с итоговой концентрацией каждого 2 млрд мкр. кл. в 1 см³ препарата, и суспензию вируса болезни Ньюкасла штамм «Н» или его аналог — парамиксовирус 1 типа голубиный вариант, штамм «PN-T» с инфекционным титром 9 lg, инактивированный 0,2%-ным раствором формалина. Штаммы сальмонелл и парамиксовируса типа 1 (Ньюкасла) «PN-T» выделены и депонированы нами, являются производственными и производственно-контрольными.

Вакцину контролировали проверкой на безвредность и ареактогенность для белых мышей и голубей, антигенную активность и иммуногенность. Обширными испытаниями установлено, что вакцина «Виросальм» обладает выраженными антигенными и иммуногенными свойствами. Титры антител к вирусу ньюкаслской болезни у привитых голубей составили 6,4–2,05 log₂ в течение 320 суток наблюдения, у уток, фазанов, мускусных уток, гусей, индеек, цесарок 7–3,5 log₂, у цыплят, перепелов — 9,10–5,15 log₂ соответственно. Антигенная активность по сальмонеллезным компонентам характеризовалась выраженной агглютинацией сывороток крови с антигенами *S. typhimurium* и *S. enteritidis* в реакции агглютинации. Отмечена 90–100%-ная сохранность вакцинированных голубей при инфицировании контрольными штаммами сальмонелл в летальных дозах 5LD₅₀.

В рамках доклинических и клинических испытаний отмечена выраженная эффективность применения вакцины «Виросальм» в условиях КФК «Барбасов» Наро-Фоминского района Московской области на голубях, курах, утках, гусях, ОАО «Птицефабрика «Тульская» Ленинского района Тульской области на цыплятах кросса Ломанн-браун, на неблагополучных голубятнях ЗАО г. Москвы, в условиях индивидуальных подсобных хозяйств деревни Мошок Гусевского района Владимирской области на индоутках, утках, гусях, цесарках и индейках. Антигенная активность вакцины «Виросальм» к *S. typhimurium* и *S. enteritidis* на голубях в «полевых» условиях составила 8–5 log₂ в течение 210 дней наблюдения. Контрольное инфицирование по окончании срока наблюдения выявило сохранность 83,3% вакцинированной птицы при сохранности 16,7% в контроле. Данные исследования позволили сертифицировать и зарегистрировать вакцину «Виросальм» на территории Российской Федерации как эффективное средство профилактики сальмонеллеза и болезни Ньюкасла голубей и декоративных птиц.

Комплекс мероприятий по борьбе с сальмонеллезом птиц, включающий в себя селективную деконтаминацию с использованием бивалентного энтеритидистифимуриум бактериофага и лактобифадола, дезинфекцию 1%-ным раствором виркона, вакцинацию вакциной «Виросальм» в зоопарке ООО «Парк живой природы «До-До» Краснодарского края позволил оздоровить птицу разных видов в течение 6–8 суток до исключения сальмонеллоносительства со 100%-ной эффективностью. Новых случаев заболевания сальмонеллезом не отмечали в течение 3-летнего периода наблюдения.

Заключение. Применение бактериофага тифимуриум и бивалентного бактериофага совместно с пробиотиком Лактобифадол позволяет проводить оздоровительно-профилактические мероприятия в пунктах, неблагополучных по сальмонеллезу птиц, и угрожаемых зонах с более высокой эффективностью, чем традиционные методы с применением антибиотиков. Новый препарат вакцина «Виросальм» ассоциированная инактивированная против сальмонеллеза и болезни Ньюкасла голубей и декоративных птиц, созданная нами, позволяет на длительные сроки обеспечивать иммунитет у привитых птиц к сальмонеллезу. Ее внедрение в практику вет-

еринарной медицины в голубеводстве, мелкофермерском птицеводстве, вольерном содержании птиц способствует нераспространению инфекции, препятствуя инфицированию восприимчивого поголовья.

Таким образом, предложено совершенствование системы противоэпизоотической борьбы с сальмонеллезом птиц переориентированием медикаментозных подходов от антибиотикотерапии к селективной деконтаминации и иммунизации с применением разработанных нами препаратов. Включение в систему противоэпизоотических мероприятий по борьбе с сальмонеллезом предложенных средств и методов их применения, особенно в условиях непромышленного производства, индивидуальных частных хозяйств, мелких ферм, голубятен, вольеров, зоопарков позволит повысить эффективность ветеринарных мероприятий против сальмонеллеза, повысить сохранность птицепоголовья, продуктивных, служебных и декоративных качеств.

Контактная информация:

Пименов Н.В.

E-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

Тел.: 8 (495) 377 69 73 (служ.).

УДК 619:616.995.132

М.Г. ГАЗИМАГОМЕДОВ, А.М. АТАЕВ, Н.Т. КАРСАКОВ

ФГБОУ ВПО «Дагестанская государственная сельскохозяйственная академия имени М.М. Джамбулатова»

ФАУНА ГЕЛЬМИНТОВ ОВЕЦ И КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ДАГЕСТАНЕ

Представлены данные по видовому составу гельминтов овец и крупного рогатого скота, показателям зараженности, особенностям распространения в разрезе высотной поясности Дагестана.

Ключевые слова: фауна, гельминт, экстенсивность, интенсивность, инвазия, овца, крупный рогатый скот, Дагестан.

M.G. GAZIMAGOMEDOV, A.M. ATAEV, N.T. KARSAKOV

FSBEE HPE «Dagestan State Agricultural Academy of M.M. Dzhambulatov»

FAUNA OF HELMINTHES OF HORNED CATTLE IN DAGESTAN

Data on specific structure of helminthes of horned cattle is presented, to contamination indicators, features of distribution in a cut of high-rise belt of Dagestan.

Keywords: fauna, helminth, extensiveness, intensity, an invasion, a horned cattle, Dagestan.

Дагестан является одним из немногих регионов Российской Федерации, где происходит постоянный рост численности поголовья овец и крупного рогатого скота. Указанное способствует росту численности поголовья домашних жвачных на 1г площади пастбищ, до 8 голов овец и 5-6 крупного рогатого скота. Бесспорно такая тенденция приводит к «истощению» флоры угодий и резкому увеличению обсемененности их инвазионным началом гельминтов. Если принять во внимание, что продолжительность пастыби жвачных животных в равнинном, предгорном Дагестане достигает 11 месяцев в году и инвазия гельминтов развивается в течение 210-220 дней, то становится ясной возможность постоянного риска заражения скота гельминтами.

Гельминтозы являются наиболее распространенными патологиями домашних жвачных в равнинном и предгорном Дагестане. Исследователи [1–6] отмечают, что домашние жвачные интенсивно инвазированы

возбудителями опасных гельминтозов — фасциолеза, дикроцелиоза, парамфистоматидозов, аноплочефалатозов, в основном мониезиоза, личиночных тениидозов (лавральный эхинококк и тениа гидатигенный), стронгилятозов дыхательного и пищеварительного трактов, трихоцефаллеза, гонгилонемоза, телязиоза (очагово), онхоцеркоза, стефанофиляриоза и слабо сетариоза, парафиляриоза (К.Р.С.).

Основной мерой борьбы с гельминтозами в настоящее время является проведение профилактических дегельминтизаций, которыми, по нашим многолетним наблюдениям и ветеринарной отчетности, охватывается около 50-60% поголовья и только однократно, за исключением преимагинальных трехкратных дегельминтизаций ягнят против аноплочефалатозов.

Комплексное исследование видового состава гельминтов овец и особенно крупного рогатого скота в Дагестане не проведено, что очень важно в эпизоотологическом отношении. Для правильной оценки эпизоотиче-

Зараженность домашних жвачных гельминтами в разрезе высотной поясности Дагестана

Вид гельминта	Овцы — 90 голов						Крупный рогатый скот — 90 голов					
	Равнина 30 гол.		Предгорье — 30 гол.		Горы — 30 гол.		Равнина 30 гол.		Предгорье — 30 гол.		Горы — 30 гол.	
	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ
1												
<i>F.hepatica</i> L., 1758	8/26,3	5-34	4/13,3	2-17	2/6,6	1-7	6/20,0	4-43	2/6,6	2-14	1/3,3	2-7
<i>F.gigantica</i> (Cobbold, 1856)	9/30,0	6-38	1/3,3	3-5	-	-	5/16,6	3-56	1/3,3	4-18	-	-
<i>D.lanceatum</i> (Stiles et Hassal, 1896)	22/73,3	31-2360	24/8,0	38-2440	6/20,0	22-147	14/46,6	116-2850	15/5,0	78-3100	3/10,0	36-175
<i>P.cervi</i> (Zeder, 1990)	5/16,6	13-56	-	-	-	-	6/20,0	29-96	-	-	-	-
<i>C.calicophorum</i> (Fichoeder, 1901)	4/13,3	9-31	-	-	-	-	5/16,6	14-78	-	-	-	-
<i>M.expansa</i> (Rud., 1810)	13/43,3	8-43	14/46,6	7-39	3/10,0	5-16	1/3,3	4	1/3,3	3	-	-
<i>M.benedeni</i> (Moniez, 1879)	12/40,0	7-29	11/36,6	4-18	4/13,3	3-11	1/3,3	3	1/3,3	2	-	-
<i>A.centripunctata</i> (Rivolta, 1874)	5/16,6	4-9	3/10,0	2-6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T.giardii</i> (Moniez, 1879)	6/20,0	5-12	4/13,3	3-8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.granulosus</i> Rud., 1801 (1)	8/26,6	5-29	9/30,0	4-33	3/10,0	2-11	6/20,0	8-43	7/23,3	5-34	2/6,6	2-8
<i>C.tenuicollis</i>	9/30,0	2-17	8/26,3	3-12	4/13,3	1-8	3/10,0	2-8	4/13,3	3-9	2/6,6	1-5
<i>T.saginata</i> (Goeze, 1782)	-	-	-	-	-	-	1/3,3	12	1/3,3	14	1/3,3	9
<i>S.papillosus</i> (Wedl., 1856)	-	-	-	-	-	-	7/23,3	14-67	6/20,0	9-38	3/10,0	5-13
<i>Ch.ovina</i> (Fabricius, 1788)	8/26,6	14-76	9/30,0	9-42	2-6,6	5-11	3/10,0	8-14	2/6,6	5-9	2/6,6	2-4
<i>B.trigonocephalum</i> (Rud., 1808)	10/33,3	17-114	8-26,3	10-65	4/13,3	4-19	6/20,0	23-145	5/16,6	12-59	4/13,3	6-27
<i>B.phlebotomum</i> (Railliet, 1900)	2/6,6	8-11	2/6,6	3-6	-	-	1-1,6	5-8	1/1,6	3-5	-	-
<i>Oe.radiatum</i> (Rud., 1803)	2/6,6	5-9	1/3,3	3-5	-	-	1/3,3	2-4	1/3,3	1-5	-	-
<i>Oe.venulosum</i> (Rud., 1809)	2/6,6	4-7	1/3,3	2-4	-	-	1/3,3	1-3	1/3,3	2-3	-	-
<i>Oe.columbianum</i> (Curtice, 1890)	1/3,3	2-3	1/3,3	1-3	-	-	1/3,3	2-5	-	-	-	-
<i>T.axei</i> (Cobbold, 1879)	8/26,6	17-96	7/23,3	12-53	4/13,3	8-24	5/16,6	20-73	4/13,3	17-62	3/10,0	7-24
<i>T.capicola</i> Ransom, 1907	4/13	14-56	5/16,6	9-36	2/6,6	5-12	1/3,3	3-7	1/3,3	2-6	-	-
<i>T.colubriformis</i> (Giles, 1829)	3/10,0	11-47	4/13,3	10-23	1/3,3	4-5	1/3,3	2-6	-	-	-	-
<i>T.skrjabini</i> Kalantarjan, 1928	4/13,3	9-32	3/10,0	5-19	2/6,6	5-9	1/3,3	4	-	-	-	-
<i>T.vitrinus</i> Looss, 1905	8/26,6	18-86	5/16,6	14-54	4/13,3	6-17	6/20,0	18-84	3/10,0	15-42	3/10,0	9-18
<i>O.ostertagi</i> (Stiles, 1892)	5/16,0	12-23	3/10,0	4-8	-	-	2/6,6	7-12	-	-	-	-
<i>O.leptospicularis</i> Assadov, 1953	2/6,6	4-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O.antipini</i> Matschulsky, 1950	4/13,3	11-17	2/6,6	3-9	-	-	2/6,6	5-9	1/3,3	2-4	-	-
<i>M.daghestanica</i> Altaev, 1952	3/10,0	8-11	2/6,6	2-5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M.marshalli</i> (Ransom, 1907)	4/13,3	9-27	3/10,0	6-17	-	-	1/3,3	11	-	-	-	-
<i>M.schikobalovi</i> Altaev, 1952	5/16,6	11-22	2/6,6	7-13	-	-	1/3,3	7	-	-	-	-
<i>H.contortus</i> (Rud., 1803)	7/23,3	63-319	8/26,3	48-116	3/10,0	23-39	5/16,6	27-78	3/10,0	19-38	-	-
<i>C.oncophara</i> (Railliet, 1898)	4/13,3	17-49	3/10,0	13-28	-	-	2/6,6	7-12	1/1,6	9	-	-
<i>C.punctata</i> (Linstow, 1906)	5/16,6	18-52	4/13,3	12-34	2/6,6	5-7	1/3,3	7	1/3,3	4	-	-
<i>C.zurnabada</i> Antipin, 1931	2/6,6	4-7	1/3,3	5	-	-	1/3,3	4	1/3,3	3	-	-
<i>N.filicollis</i> (Rud., 1802)	4/13,3	11-18	3/10,0	9-15	2/6,6	3-6	6/20,0	23-114	5/16,6	12-73	3/10,0	7-27
<i>N.helvetianus</i> May, 1920	6/20,0	23-84	7/23,3	17-62	3/10,0	7-13	3/10,0	8-11	2/6,16	5-7	1/1,6	5
<i>N.oiratianus</i> Rajevskaja, 1929	7/23,3	14-53	5/16,0	10-34	2/6,6	4-7	2/6,6	3-7	1/3,3	5	1/1,6	3
<i>N.spathiger</i> (Railliet, 1896)	8/26,6	44-98	7/23,3	35-82	4/13,3	13-24	6/20,0	19-47	4/13,3	14-35	3/10,0	8-29
<i>N.abnormalis</i> May, 1920	2/6,6	4-11	2/6,6	2-7	-	-	2/6,6	5-9	1/3,3	4	-	-
<i>N.dogeli</i> Sokolova, 1948	2/6,6	3-9	1/6,6	8	-	-	1/3,3	7	1/3,3	3	-	-
<i>N.andreevi</i> Popova, 1952	2/6,6	2-5	1/6,6	4	-	-	1/3,3	4	-	-	-	-

Таблица (окончание)

Вид гельминта	Овцы — 90 голов						Крупный рогатый скот — 90 голов					
	Равнина 30 гол.		Предгорье — 30 гол.		Горы — 30 гол.		Равнина 30 гол.		Предгорье — 30 гол.		Горы — 30 гол.	
	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ	Зар-но %	ИИ
<i>D. viviparus</i> (Bloch, 1782)	-	-	-	-	-	-	2/6,6	8-11	1/6,6	5	-	-
<i>D. filaria</i> (Rud., 1809)	6/20,0	14-36	5/16,6	11-24	2/6,6	5-9	-	-	-	-	-	-
<i>P. kochi</i> (Schulz, Orlov et Kutass, 1933)	2/6,6	10-19	2/6,6	8-14	1/3,3	4	-	-	-	-	-	-
<i>P. hobmaieri</i> (Sch., Orlov et Kut, 1933)	3/10,0	7-13	2/6,6	3-8	1/3,3	3	-	-	-	-	-	-
<i>C. nigrescens</i> (Jerke, 1911) Sch., Orlov et Kut, 1933	4/13,3	12-23	3/10,0	7-15	2/6,6	4-6	-	-	-	-	-	-
<i>M. capillaris</i> (Mul., 1889) Camer., 1927	3/10,0	5-9	3/10,0	4-7	1/3,3	3	-	-	-	-	-	-
<i>N. vitulorum</i> (Goeze, 1782)	-	-	-	-	-	-	4/13,3	4-13	3/10,0	6-17	2/6,6	3-5
<i>Th. rhodesi</i> (Desmarest, 1827)	-	-	-	-	-	-	3/10,0	5-11	3/10,0	3-8	3/6,6	2-4
<i>Th. gulosa</i> Railliet et Henry, 1910	-	-	-	-	-	-	4/13,3	3-15	2/6,6	2-7	1/3,3	3
<i>Th. skrjabini</i> Erschov, 1928	-	-	-	-	-	-	2/6,6	2-4	1/3,3	3	-	-
<i>G. pulchrum</i> (Molin, 1857)	6/20,0	5-11	5/16,6	3-9	2/6,6	2-5	5/16,6	6-10	4/13,3	5-9	2/6,6	3-5
<i>S. labiato-papillosa</i> (Alessandrini, 1838)	2/6,6	2-7	1/3,3	3	-	-	8/26,6	2-5	1/6,6	4	-	-
<i>T. ovis</i> Abilgard, 1795	5/16,6	8-12	4/13,3	3-10	1/3,3	3	8/26,6	5-7	1/3,3	5	-	-
<i>T. skrjabini</i> (Boskakov, 1924)	4/13,3	6-9	3/10,0	4-7	1/3,3	4	2/6,6	3-5	1/3,3	6	-	-
<i>O. gutturosa</i> (Neumann, 1910)	-	-	-	-	-	-	5/16,6	4-11	2/6,6	2-5	-	-
<i>O. lienalis</i> (Stiles, 1892)	-	-	-	-	-	-	4/13,3	3-9	2/6,6	1-4	-	-
<i>S. assamensis</i> Pande, 1936	-	-	-	-	-	-	3/10,0	2-5	2/6,6	2-7	-	-
<i>S. stilesi</i> Chitwood, 1934	-	-	-	-	-	-	2/6,6	2-4	1/3,3	1-4	-	-
<i>B. bovicola</i> Tubangui, (1934)	-	-	-	-	-	-	3/10,0	5-8	1/3,3	5	-	-

ской обстановки по гельминтозам необходимо ежегодно проводить мониторинг ситуации по зараженности животных гельминтами, по показателям экстенсивности [ЭИ] и интенсивности [ИИ] инвазии, по соотношению видов возбудителей во множественных инвазиях.

Целью нашей работы явилось изучение фауны гельминтов овец и крупного рогатого скота в разрезе высотной поясности, показателей зараженности, выяснение доминирующих видов в разных соотношениях множественных инвазий.

Материал и методы. В 2001-2010 годы исследовано посмертно по 90 голов овец и крупного рогатого скота в равнинном, предгорном и горном Дагестане. Сбор гельминтов проводили первые три часа после вскрытия животного.

На обсемененность изучены 80 проб растительности, 60 проб почвы, 30 проб воды из источников водопоя, 600 экз. орибатидных клещей, 300 экз. сухопутных, 700 экз. пресноводных моллюсков и 600 экз. муравьев.

Исследовано по 600 проб фекалий овец и крупного рогатого скота в разрезе высотной поясности.

В работе использованы методы полного гельминтологического вскрытия, последовательного промывания фекалий, флотации с насыщенным раствором аммиачной селитры, Бермана–Орлова.

Результаты исследований. Нами установлено, что домашние жвачные животные заражены на территории Дагестана 61 видом гельминтов, в том чис-

ле: овцы 48, крупный рогатый скот 51. Общими для домашних жвачных животных являются 40 видов (65,5%). В горном Дагестане не зарегистрированы *F.gigantica*, *P.cervi*, *C.calicophorum*, *A.centripunctata*, *Th.giardii*, *B.phlebotomum*, *Oe.radiatum*, *Oe.venulosum*, *Oe.columbianum*, *O.ostertagi*, *O.leptospicularis*, *O.antipini*, *M.dagestanica*, *M.marshalli*, *M.schikobalovi*, *C.oncophara*, *C.zurnabada*, *N.abnormalis*, *N.andreevi*, *N.dogeli*, *D.viviparus*, *S.labiato-papillosa*, *O.gutturosa*, *O.lienalis*, *S.assamensis*, *S.stilesi*, *P.bovicola* (27 видов — 44,8%). Общая зараженность овец в равнинном, предгорном поясах достигает 93,5%, при ИИ 2-2440 экз., в горном 53,0% и 1-147 экз., соответственно крупного рогатого скота 80,0% и 2-2850 экз. и 44,0%, 1-175 экз.

Зараженность овец отдельными видами гельминтов в равнинном, предгорном поясах колеблется: ЭИ 3,3-73,3%, ИИ 2-2440 экз., крупного рогатого скота — соответственно 3,3-46,6% и 2-2850 экз., в горном Дагестане 3,3-20,0%, 1-147 экз. и 3,3-10,0%, 1-175 экз.

В высотном разрезе отмечается снижение количественных и качественных показателей зараженности домашних жвачных гельминтами более 42,0%, что связано с жестким природным «прессом» для развития инвазионного начала в горах выше 2500 м. н.у.м. На этих высотах и выше инвазионное начало развивается в биотопах пастбищ в течение 120 дней в году.

Наиболее высокие показатели зараженности ЭИ 20,0-73,3%, ИИ 5-2440 экз. отмечены среди овец в рав-

нинном, предгорном Дагестане: *F.hepatica*, *F.gigantica*, *M.expansa*, *M.benedeni*, *Th.giardii*, *E.granulosus* (I), *C.tenuicollis*, *Ch.ovina*, *B.trigonocephalum*, *T.axei*, *T.vitrinus*, *H.contortus*, *N.spathiger*, *D.filaria*, *G.pulchrum*. Крупный рогатый скот интенсивно инвазирован ЭИ 16,6-46,6%, ИИ 8-2850 экз. *F.hepatica*, *F.gigantica*, *D.lanceatum*, *P.cervi*, *C.calicophorum*, *E.granulosus* (I), *S.papillosus*, *B.trigonocephalum*, *T.axei*, *T.vitrinus*, *H.contortus*, *N.filicollis*, *N.spathiger*, *G.pulchrum*, *O.gutturosa*.

Овцы инвазированы слабо *B.phlebotomum* видами родов *Oesophagostomum*, *Protostrongylus*, *Mullerius*, *Cysticercus*, *O.leptospicularis*, *C.zurnabada*, *N.abnormalis*, *N.dogeli*, *N.andreevi*, *S.labiato-papillosa*, ЭИ 3,3-6,6%, ИИ 2-9 экз., соответственно крупный рогатый скот *M.expansa*, *M.benedeni*, *C.bovis*, *B.phlebotomum*, видами рода *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, (кроме *T.axei*, *T.vitrinus*) *Ostertagia*, *Maramastrongylus*, *Marshallagia*, *Cooperia*, *Th.gulosa*, *Th.skrjabini*, *N.oiratianus*, *N.abnormalis*, *N.dogeli*, *N.andreevi*, *Trichocephalus ovis*, *T.skrjabini*, *S.stilesi*, ЭИ 3,3-6,6%, ИИ 2-7 экз.

Во множественных инвазиях часто встречаются *F.hepatica*, *D.lanceatum*, *M.expansa*, *M.benedeni* (у овец), *E.granulosus* (I), *B.trigonocephalum*, *T.axei*, *T.vitrinus*, *H.contortus*, *N.filicollis*, *N.spathiger*, *G.pulchrum*, *O.gutturosa*, *S.assamensis* (у крупного рогатого скота) в разных сочетаниях. Одновременно в ассоциациях гельминтов у овец встречаются от 4 до 13 видов, чаще 4-8, у крупного рогатого скота соответственно 4-9, чаще 4-6.

Таким образом, домашние жвачные животные в условиях Дагестана заражены 61 видом гельминтов, где доминируют фасциолы, дикроцелии, мониезии, личинки

эхинококкусов, тениюкольного цистицерка, буностомы, трихостронгилюсы, хаберитии, гемонхусы, нематоды, гонгилономы.

Общность фауны гельминтов овец и крупного рогатого скота благоприятствует интенсивному накоплению инвазионного начала в биотопах пастбищ и заражению животных ими.

Множественные инвазии являются основной формой паразитирования гельминтов в экосистемах Дагестана.

Список литературы

1. Алтаев А.Х. Изучение гельминтофауны овец и коз Дагестана и наблюдение по биологии *Trichostrongylus skrjabini*: Дисс... канд. биол. наук. – М.: 1953, 132с.
2. Анаев М.С. Эпизоотологические особенности фасциолеза жвачных и меры борьбы с ними в условиях Дагестанской АССР: Автореф. дисс... канд. вет. наук. – М., 1974, 25с.
3. Атаев А.М. Эпизоотическая ситуация по паразитозам животных в Дагестане // Ветеринария, 2002, № 4. – С. 23-29.
4. Атаев А.М. Эколого-эпизоотологический анализ фасциолеза жвачных и совершенствование мер борьбы с ними в юго-восточном регионе Северного Кавказа: Дисс... докт.вет. наук. – М. – 1990, 408с.
5. Карсаков Н.Т. Гельминтозы овец в юго-восточном регионе Северного Кавказа и совершенствование мер борьбы. – Дисс. докт.вет.наук. – М., 2010, 309 с.
6. Магомедов О.А. Эпизоотология эзофагостомоза, буностомоза и нематодироза овец и меры борьбы с ними в Прикаспийском регионе: Дисс... докт.вет.наук. – М., 2007, 316с.

Контактная информация:
тел.: 8 (495) 377-69-87 (служ.)

УДК 619.616.9.-036.2636.7

Б.К. ИЛЬЯСОВ, А.Б. ИЛЬЯСОВ, С. НУРАЛИЕВ.

Южно-казахстанский государственный университет им. М. Ауезова, Казахстан,
Институт экспериментальной биологии, г. Алматы

ЛЕПТОСПИРОНОСИТЕЛЬСТВО ГРЫЗУНОВ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Исследованиями установлено, что на севере Актюбинской, Кызылординской и Западно-Казахстанской областей выявлены природные очаги лептоспироза. Отмечена выраженная приуроченность очагов к заболоченным, сырым участкам с застойной водой при высокой концентрации в них водяной полевки. В выявленных очагах отмечалась циркуляция преимущественно одного серотипа лептоспир — *L.grippotyphsa* (в редких случаях *L.hebdomadis* *L.icterohaemorrhagiae*).

Ключевые слова: Казахстан, лептоспироз, грызуны, серотипы возбудителя лептоспироза

В. К. ILIASOV, А. В. ILIASOV, S. NYRALIEV

South-Kazakhstan state university named M. Auevov, Kazakhstan
Institute of experimental biology, Almaty

RODENS AS CARRIERS OF LEPTOSPIROSIS

The native foci of Leptospirosis were revealed as a result of many studies of numerous species of mammals in southwest region of Republic of Kazakhstan. The circulation mainly of one serotype — *L. grippotyphsa* was observed in revealed foci.

Keywords: Kazakhstan, leptospirosis, rodents, pathogen serotypes of leptospirosis

Лептоспироз человека и животных подвергли всестороннему изучению во всем мире. Борьба с этой инфекцией стала одной из важных проблем ветеринарии и медицины, так как она имеет широкое распространение, наносит огромный экономический ущерб и представляет большую угрозу для здоровья людей.

Помимо сельскохозяйственных животных в создании резервуара возбудителей лептоспир участвуют:

мышь домовая и лесная, различные полевки, суслик, ондатра, хомяк, крыса, еж и другие мелкие млекопитающие.

Мы исследовали на лептоспирозительство эти виды животных в Кызылординской, Западно-Казахстанской, Актюбинской и Атырауской областях.

В последние годы в Кызылординской области обводнены значительные территории плодородных пойменных земель для использования под рисосеяние. Пред-

Таблица 1

Серогруппы	Серовиды	Штамм
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg
Canicola	Canicola	Каширский
Iavanica	Iavanica	Vedat- Batovia 46
Australis	Erinacci europaci	Еж-1
Bataviae	Bataviae	Van- Tienen _л
Hebdomadis	Wolffi	3705
Pyrrhones	Pyrrhones	Saline
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Pomona	Pomona	Pomona
Ballum	Castelloni	Castellon-3
Cynopteri	Butembo	Butembo
Grippytyphosa	Grippytyphosa	Москва-5
Tarassovi	Tarassovi	Перепелицин



Фото. 1

стояло выявить места обитания зараженных грызунов, пути передачи лептоспир и т.д. Для этой цели был выбран Шиелинский район, имеющий по почвенно-климатическим условиям много общего с остальными рисоводческими районами области.

На пораженность лептоспирозом обследовались мелкие млекопитающие, отловленные в основном на поливных землях, прилегающих к берегам Сырдарьи, и по закрепленным пескам, окаймляющим поливные земли. Долина реки — наиболее обжитая и освоенная в хозяйственном отношении часть района. Здесь сосредоточены заливные сенокосы, круглогодичные пастбища сельскохозяйственных животных, основные массивы орошаемых посевов, значительную часть которых занимают рисовые поля.

На этой территории выявлено 9 видов млекопитающих с низкой численностью, относящихся к 7 видам.

Бактериологическое и микробиологическое исследование почечной ткани и мочи зверьков во всех случаях дало отрицательные результаты.

Серологическим методом (табл. 1) установлена зараженность пяти ушастых ежей (*Hemilichnus aurutus*) лептоспирами типа *Grippytyphosa* и *Akiyami*. Титры антител во всех сыворотках были высокими (1:400–1:1280).

Из отмеченных нами видов зверьков, заселяющих культурные земли Шиелинского района, только 3 вида обитают в хорошо увлажненных биотопах, а именно: ондатра, гребенщикова песчанка, домовая мышь

Ондатра (*Ondatra zibetika*) в ограниченном количестве обитает в р.Чиилинке и одноименном водохранилище (фото 1). В силу постоянного колебания уровня воды в реке и водохранилище (воды которых используются для орошения рисовых полей) популяция ондатры находится на грани исчезновения, вследствие чего заметной роли в сохранении и передаче лептоспироза играть не может.

Гребенщикова песчанка (*Meriones tamariscinus*), являясь типичным пустынным видом, встречается и по берегам оросительных каналов и рек (фото 2). Обитает обычно в некотором удалении от воды на более возвышенных и сухих участках. Встречается редко (табл. 2).

Таким образом, указанные виды грызунов, возможные лептоспираносители орошаемых и культурных земель Шиелинского района, ввиду малочисленности, даже при наличии среди них бактерионосительства вряд ли могут иметь серьезное эпидемиологическое и



Фото. 2



Фото. 3

эпизоотологическое значение в инфицировании лептоспирозом сельскохозяйственных животных и населения.

Что касается ушастых ежей (фото 3), давших положительный результат с *L. grippytyphosa* и *L. akiyami*, то все они были отловлены на территории поселков (Джулек, окрестности Шиели), и их инфицированность может иметь прямую связь с антропоургическими очагами лептоспироза.

Результаты лептоспиросительства у грызунов
в Юго-Западном регионе Республики Казахстан (в 1998-2008гг.).

№	Виды грызунов	Кол-во обследованных	Положительный результат		Положительная РМАИ с лептоспирами				Выделенно штаммов L.grippyphosa
			Число	%	Grippytyphosa (1:400-1:1280)	AuStralis ' (1:20)	Interohaemorrhagiae (1:200)	Hebdomadis (1:20-1:40)	
1	Полевка обыкновенная	195	4	2	4		.		
2	Мышь лесная	438							
3	Мышь домовая	136	5	3,6				5	
4	Полевка рыжая	334							
5	Полевка-экономка	19							
6	Ондатра	28							
7	Полевка водяная	125	10	8	6				4
8	Крыса серая	26	2				2		
9	Хомяк обыкновенный	99							
10	Гребенщикова песчанка	198							
11	Еж ушастый	21	5	23,1	5				
12	Горностай	3	2			2			
13	Полуденная песчанка	298							
14	Прочие виды	178							
	ВСЕГО:	2100	28		15	2	2	5	4

В дальнейшем наши работы проводились в Денгизском районе Атырауской области западнее поселка Ганюшкино. Здесь, как и в Кызылординской области, фоновыми видами были представители пустынной фауны — полуденные и гребенщикообразные песчанки. Домовые мыши, водяные полевки и ондатры, наиболее вероятные носители лептоспир, составили лишь 2% отлова. Результаты обследования на лептоспироз зверьков во всех случаях были отрицательными.

Таким образом, в Атырауской области, как и в Кызылординской области, не удалось установить природные очаги лептоспироза. Вместе с тем нельзя исключать возможность их формирования, особенно в приморье, где в отдельные годы отмечается высокая численность водяной полевки и домовых мышей, известных как носителей лептоспир серогрупп *Grippytyphosa* и *Hebdomadis*.

Из отловленных зверьков в Западно-Казахстанской области зараженность лептоспирозом выявлена серологически у серой крысы. Тип возбудителя *L.icterohaemorrhagiae* — титр антител 1:200 в сыворотках крови у 5 домовых мышей, выявлены антитела к лептоспирам серогруппы *Hebdomadis* (штамм 3705) в титрах 1:20.

Культуры лептоспир серотипа *L.grippytyphosa* выделены нами от десяти водяных крыс. Положительные результаты получены с сывороткой крови 2 горностая (титр антител 1:20 к *L.erinaceus* № 1). Положительная серологическая реакция со штаммом *L.grippytyphosa* (1:400) получена при исследовании сыворотки крови обыкновенной полевки, отловленной на берегу р. Малая Анкета, в 3 км от озера Урал. Здесь встречаемость обыкновенной полевки составила 16%, домовых мышей — 12%.

Кроме перечисленных выше млекопитающих на стационаре добыты: европейский еж в пойме, 2 ушастых ежа в поселке, 4 зайца-русака в лесополосах и 5 слепу-

шонок в степи. Результаты исследования на лептоспироз всех этих зверьков были отрицательными.

На стационаре отлов грызунов проводили и вне поймы. Попадаемость в ловушки в различных биотопах была хорошей. Зверьков, зараженных лептоспирами, не обнаружено.

Таким образом, высокая концентрация зверьков разных видов наблюдалась в прибрежных биотопах. Численность влаголюбивых видов была низкой. В большинстве биотопов доминировали зверьки, не имеющие широкой связи с *L.grippytyphosa* — лесная мышь (фото 4) и обыкновенный хомяк.

При общей низкой численности основных видов лептоспиросителей установлена прирученность очагов инфекции к местам наибольшего скопления грызунов.

В Актюбинской области стационарные наблюдения, учеты численности мелких млекопитающих и обследование на лептоспиросительство проводились на территории, расположенной к северо-западу от среднего течения реки Жаксы-Каргалы, в окрестностях поселков Родниковского, Березовки, Петропавловки и АО «Пригородный Центрального района». Зараженность лептоспирами серогруппы *L.grippytyphosa* установлена у 4 водяных полевок, причем от одной из них выделена культура лептоспир и выявлены антитела в титре 1:1000, у остальных зараженность лептоспирозом подтверждена серологически (титры антител от 1:320 до 1:1000).

Среди грызунов, отловленных в этом биотопе, зараженность *L.grippytyphosa* выявлена у водяной полевки (титр 1:640) и обыкновенной полевки (1:20). У остальных видов зверьков инфицированность лептоспирами не обнаружена. Отрицательные результаты на зараженность лептоспирозом получены при исследовании зверьков, добытых и в других биотопах стационара,



Фото 4



Фото 5

вблизи Актюбинска (лесополосы, луга с кустарниками, пойма р. Жаксы-Каргалы).

При исследовании этих зверьков зараженность лептоспирозом не установлена.

Исследованиями установлено, что на севере Актюбинской, Кызылординской и Западно-Казахстанской областей выявлены природные очаги лептоспироза. Отмечена выраженная приуроченность очагов к заболоченным, сырым участкам с застойной водой при высокой концентрации в них водяной полевки (фото 5). В выявленных очагах отмечалась циркуляция преимущественно одного серотипа лептоспир — *L.grippotyphosa* (в редких случаях *L.hebdomadis*, *L.icterohaemorrhagiae*).

Эпизоотии не имели разлитого характера, в них были вовлечены, по существу, лишь полевки (водяные, обыкновенные), что, по-видимому, связано с доминированием по численности в обследованных местностях видов грызунов, менее восприимчивых к циркулирующему в данной местности серотипу *L.grippotyphosa* (лесные мыши, хомяки, домовые мыши и пр.).

В местах выявления очагов лептоспироза природного или антропогенного характера отловлено и обследовано на лептоспироз птиц из Кызылординской и Западно-Казахстанской областей более 250 особей и 39 видов. При изучении птиц на зараженность лептоспирозом пользовались бактериологическим и серологическим методами. Все проведенные исследования дали отрицательные результаты на лептоспироз.

По нашему мнению, малая зараженность птиц объясняется некоторыми физиологическими особенностями их физиологий. Желудочный сок хищных птиц обладает высокой кислотностью и убивает лептоспиры. Кроме того, нормальная температура тела птиц около 41°C, а лептоспиры при такой температуре устойчивы не более 24 часов. Поэтому считается, что птицы не имеют большого значения в эпизоотологии и эпидемиологии лептоспирозов, они могут быть лишь звеном, способствующим переносу патогенных лептоспир на значительные расстояния. В тех случаях, когда лептоспиры находят восприимчивых хозяев, они укореняются в новой местности.

Выводы

1. В результате неоднократных исследований многочисленных зверьков (млекопитающих) установлено, что

в Юго-западном регионе Республики Казахстан выявлены природные очаги лептоспироза.

2. При этом в Кызылординской области серологическим методом установлена зараженность 5 ушастых ежей (*Hemilchunus aurutus*) лептоспирами типа *Grippotyphosa* и *Akiyami*. Титры антител во всех сыворотках были высокими (1:400–1:1280).

3. В Западно-Казахстанской области зараженность лептоспирозом выявлена серологически у серой крысы. Тип возбудителя — *L.icterohaemorrhagiae*, титр антител 1:200. В сыворотках крови 5 домовых мышей выявлены антитела к лептоспирам серогруппы *Hebdomadis* (штамм 3705) в титрах 1:20.

4. На берегу р. Малая Анкета (около р. Урал) установлена положительная серологическая реакция со штаммом *L.grippotyphosa* (1:400) при исследовании сыворотки крови обыкновенной полевки. Здесь же выделены культуры лептоспир серотипа *L.grippotyphosa* от десяти водяных крыс. Получены положительные результаты с сывороткой крови 2 горностаев (титр антител 1:20).

5. В Актюбинской области (вблизи р.Жаксы-Каргалы) установлена зараженность лептоспирами серогруппы *L.grippotyphosa* у 4 водяных полевок, причем от одной из них выделена культура лептоспир и выявлены антитела 1:1000, у остальных зараженность лептоспирозом подтверждена серологически (титр антител от 1:320 до 1:1000). При этом в выявленных очагах отмечалась циркуляция преимущественно одного серотипа лептоспир — *L.grippotyphosa*.

Список литературы

1. Шамардин В. А., Рудь Н.В. Новый способ иммунологической диагностики лептоспироза: Тез. межд. конф. по аллергологии и клинической иммунологии. -Алма-Ата. 1992. -Т.Б. – С. 138
2. Ильясов Б.К., Рудь Н.В. Диагностическая эффективность определения антител при лептоспирозе: Тез.докл. I Межд. конф. по аграрным проблемам. – Алматы. 1993. – С. 275–276.

Контактная информация:
тел.: 8 (495) 377-69-87 (служ.).

С. НЯМДОРЖ, ЯН ЧЖЕН ЦИ
Северо-западный университет сельского и лесного хозяйства, Народная Республика Китай
В. БАТБААТАР, Ж. ЭРДЭНЭБААТАР
Департамент здравоохранения, Институт ветеринарной медицины, Монголия

КИНЕТИКА ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИМЕНЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БРУЦЕЛЛЕЗА СКОТА

Бруцеллез, вызванный *Brucella* spp., поражает домашних и диких животных по всему миру, а также опасен для людей, которые контактируют с инфицированными животными или при употреблении загрязненных молочных продуктов. В современной эпидемиологической ситуации в Монголии также неспокойно, в частности, бруцеллез широко распространен.

Ключевые слова: бруцеллез животных, вакцинация, метод глазных капель.

S. NYAMDORJ, YANG ZHENG QI
Northwest A&F University, People's Republic of China

V. BATBAATAR, J. ERDENEBAATAR
Department of Public health, Institute of veterinary medicine, Mongolia

THE KINETICS RESEARCH STUDY OF USE OF VACCINE AGAINST BRUCELLOSIS FOR LIVESTOCK

Brucellosis, which is caused by *Brucella* spp., infects domestic and wild animals worldwide, as well as humans who have contact with infected animals or contaminated dairy products. In present-day epidemiological situation in Mongolia is not quiet, especially, zoonosis such as brucellosis have been broadly spread.

Key words: animal brucellosis; vaccination, eye drop method.

Бруцеллез — заболевание, вызываемое *Brucella* spp., поражает домашних и диких животных по всему миру, а также опасно для людей, имеющих контакты с инфицированными животными или загрязненными молочными продуктами.

Современной эпидемиологической ситуацией также неблагоприятна и в Монголии, в частности, был широко распространен бруцеллез.

Перед нами стояла задача оценить влияние глазных капель путем вакцинации (В. бруцеллез Rev-1, Б. выкидыш S-19 вакцин) на бруцеллез крупного рогатого скота, яков, верблюдов, овец и коз.

Определение иммунологического эффекта на всех видах животных при введении под кожу инъекции вакцины. Разработка методологий и руководящих принципов для глазных капель-вакцин, установить дозы и соответствующего времени т.д.

Использование вакцины путем ее закапывания в глаза животным позволяет избежать риска заражения использованием инъекции шприцем, чтобы сделать профилактической меры для скота против бруцеллеза, что ответ на современным требованиям.

INTRODUCTION. The human brucellosis disease is the one which to be become epidemic in the world, zoonosis contamination and this infection may contaminate to the many through approaching infected livestock, animal's blood, dignitaries and fetus and vaginal secretion and through infected food stuff.

The BRUCELLOSIS is become epidemic in Mediterranean countries, Arabia, America and central and eastern area of Asia, and African countries.

BY the WHO every year there registered over 500.000 man brucellosis cases but hadn't been register total cases is becoming one of the hot issues.

It reports that by the brucellosis sickness rate per 1.000.000 population Syria, Kirgizstan and Mongolia countries more than 500 cases for every year. The herders and farmers, veterinarian specialists, workers of slaughtering house and laboratories are infected more by man brucellosis.

Goal: Evaluate the effect of eye-drop vaccination (B. melitensis Rev-1, B. abortus S-19 vaccine) for Brucellosis in Mongolian cattle, yak, camel, sheep and goat.

SELECTION OF RESEARCH ANIMALS. Total of 889 head livestock of 36 herding families from Taragt, Baruunbayan-Ulaan, Bayangol, Bat-Ulzii soums of Uvurkhangai province have been included in the study. During the study 168 Mongolian cattle, 175 yaks, 174 camels, 173 sheep and 199 goats were vaccinated.

METHODOLOGY.

The Research was carried out through questionnaires towards the herders and the livestock. The families involved in the research were chosen for their interest and will to participate in the research. Blood samples from both big and small animals have collected for the research. The sampling was done in infection free environment with the vacuum tainer. The blood after centrifuge extracted serum. Then the serum was analyzed according to the methodology which has been proven by the standard reaction of Rose Bengal test. After that I have chosen herding family whose results for livestock is negative. Those livestock were registered and ear-tagged.

Livestock were divided into 4 groups. The group 1 and 2 were vaccinated with standard dose and reduced dose; group 3 was vaccinated with standard dose of eye-drop vaccine; and the group 4 was the surveillance group.

Immunology tests were carried out on all four groups after 2 week of vaccination for 8 months and extracted blood serum 9 times. According to the OIE recommendation, the samples were analyzed with Rose Bengal reaction and SAT to reveal antibody in the blood.

Also postmortem examination has been carried out on few animals after two week, one month and two months after the vaccination to identify antibody on some of the organs.

Medical examination has been carried out in each animal type on their immunity organs, some lymph node and spleen after 2 weeks, 1 month and 2 months respectively. The analysis was carried out at the Microanatomy laboratory of the Veterinary institute of Mongolia.

The effect of the vaccine was tested in common methodology after 1 year in 5 types of animals, who have been had eye-drop vaccine. Animals were infected with fervency of viral.

RESULT: FOR SHEEP. Standard dose of vaccine dropped into eyes: total of 41 sheep were included in the study, of which 25 were shown positive reaction after five months and 18 remained so after six months, 10 after seven months and 7 after eight months (41–17.1%).

Injected under skin with reduced dose (diluted vaccine): total of 40 sheep were included in the study, of which 26 were shown positive reaction after five months and 22 remained so after six months, 18 after seven months and 11 after eight months (65–27.5%).

Injected under skin with standard dose: total of 40 sheep were included in the study, of which 27 were shown positive reaction after five months and 24 remained so after six months, 20 after seven months and 17 after eight months (65.9–41.5%).

Therefore, it is evident that animals who were vaccinated with eye-drop vaccine show greater number of antibody than the injected animals by 1.5–2.4 times.

FOR GOATS. Standard dose of vaccine dropped into eyes: total of 52 goats were included in the study, of which 175 were shown positive reaction after five months and 15 remained so after six months, 7 after seven months and 6 after eight months (42.5–12.2%).

Injected under skin with reduced dose (diluted vaccine): total of 50 goats were included in the study, of which 29 were shown positive reaction after five months and 27 remained so after six months, 14 after seven months and 11 after eight months (58–22%).

Injected under skin with standard dose: total of 51 goats were included in the study, of which 31 were shown positive reaction after five months and 32 remained so after six months, 17 after seven months and 15 after eight months (63.3–30.6%).

Therefore, it is evident that animals who were vaccinated with eye-drop vaccine show greater number of antibody than the injected animals by 1.4–2.5 times.

FOR YAKS. Standard dose of vaccine dropped into eyes: total of 42 yaks were included in the study, of which 31 were shown positive reaction after five months and 17 remained so after six months, 8 after seven months and 4 after eight months (77.5–10%).

Injected under skin with reduced dose (diluted vaccine): total of 43 yaks were included in the study, of which 32 were shown positive reaction after five months and 24 remained

so after six months, 13 after seven months and 9 after eight months (78–22%).

Injected under skin with standard dose: total of 44 goats were included in the study, of which 38 were shown positive reaction after five months and 24 remained so after six months, 12 after seven months and 11 after eight months (88.4–25.6%).

Therefore, it is evident that animals who were vaccinated with eye-drop vaccine show greater number of antibody than the injected animals by 1.1–2.5 times.

FOR CATTLE. Standard dose of vaccine dropped into eyes: total of 42 Mongolian cattle were included in the study, of which 15 were shown positive reaction after five months and 10 remained so after six months, 4 after seven months and 3 after eight months (55.7–7.3%).

Injected under skin with reduced dose (diluted vaccine): total of 44 Mongolian cattle were included in the study, of which 20 were shown positive reaction after five months and 19 remained so after six months, 9 after seven months and 5 after eight months (47.6–11.9%).

Injected under skin with standard dose: total of 42 Mongolian cattle were included in the study, of which 29 were shown positive reaction after five months and 27 remained so after six months, 14 after seven months and 10 after eight months (63.3–30.6%).

Therefore, it is evident that animals who were vaccinated with eye-drop vaccine show greater number of antibody than the injected animals by 1.9–3.2 times.

FOR CAMEL. Standard dose of vaccine dropped into eyes: total of 42 camel were included in the study, of which 20 were shown positive reaction after five months and 12 remained so after six months, 6 after seven months and 1 after eight months (47.6–2.4%).

Injected under skin with reduced dose (diluted vaccine): total of 46 camel were included in the study, of which 27 were shown positive reaction after five months and 23 remained so after six months, 7 after seven months and 4 after eight months (58.7–8.7%).

Injected under skin with standard dose: total of 46 camel were included in the study, of which 37 were shown positive reaction after five months and 32 remained so after six months, 27 after seven months and 12 after eight months (82.2–26.7%).

Therefore, it is evident that animals who were vaccinated with eye-drop vaccine show greater number of antibody than the injected animals by 1.7–11.1 times.

Post eye-drop vaccination pathogenic study has been carried out at the Pathogenic pathogenic laboratory of the Veterinary institute. Few animals were slaughtered after two weeks, a month and two months after the vaccination for pathogenic and bacteriological study, i.e. samples were collected from their liver, spleen, kidneys, lymph nodes. The samples were first fixated in 10% formalin solution then in Carney solution and after that in poured into paraffin to form 5mm thick slice. The slice was painted with hematoxylin and eosin and analyzed under the microscope.

CONCLUSION.

Prophylaxis of livestock against the brucellosis: to drip the of *B. abortus* S 19, *B. melitensis* REV 1 vaccines into the eyes of livestock is a safety method recommended by the OIE.

It is proven that after 5–8 months as drip the vaccine into eyes or injection under the skin of livestock to protect against brucellosis it is increased positive reaction for the Mongolian cattle by 1.9–3.2 times, camel 1.7–11.1 times, yak 1.1–2.5 times, goat 1.4–2.5 times, sheep 1.5–2.4 times

each separately after vaccination with a specific content of RBT negative bodies in the blood.

By method to drip the vaccine into eyes with a purpose to make prophylactics against brucellosis the responsiveness of liquid immunity takes the negative value in short term that decrease cross reaction of serology to make diagnosis on the disease and reduce emergency of the disease that has high impact on diagnosis.

Using vaccine to drip the vaccine into eyes of livestock allows one to avoid the infection risk using injection syringe to make prophylactic measures for livestock against brucellosis that answer to the current requirements.

Список литературы (Reference list)

1. Bankirane A. Ovine and caprine brucellosis: Word distribution and control/erudication strategies in West Asia/North Africa region // Small Ruminant Research 62, 2006. – P. 19-25.
2. Alton G.G. Brucella melitensis / In: Neilsen, K.N., Duncan, J.R., editors. // Animal brucellosis. Boca Raton (FL): CRC Press; 1990. – P. 384-404.
3. Corbell J.M. Recent advances in the study of Brucella antigens and their serological cross-reactions // Vet.Bull. 55: 1985. – P. 927-942.
4. Corbell J.M. Brucellosis: an overview // Emerg. Infect. Dis. 2: 1997. – P. 213-221.
5. Denes B. Serological findings obtained in cattle herds immunized with the Brucella melitensis Rev-1 and the B. abortus B19 vaccine in Mongolia // Acta. Vet. Hung. 45: 1. 1997. – P. 33-43.

6. Jimenez de Bagues M.P., Marin C.M., Blasco J. et al. An ФХЭБУ with Brucella lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of B. melitensis infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival B. melitensis Rev-1 vaccination // Vet. Microbiol. 30: 1992. – P. 233-241.

7. Diaz-Aparicio E., Marin C., Alonso-Urmeneta B. et al. Evaluation of serological tests for diagnosis of Brucella melitensis infection of Goats // Journal of Clinical Microbiology, May, 1994. – P. 1159-1165.

8. Jimenez de Bagues M.P., Marin C.M., M. Barberan and J.M. Blasco. Responses of ewes to B. melitensis Rev 1 vaccine administrated by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy // Ann. Rech.Vet., 1989. 20. – P. 205-213. Elsevier/INRA

9. Pilar-Maria Munoz, Maria-Jesus de Miguel, Maria-Jesus Grillo et al. Immunopathological responses and kinetic of Brucella melitensis Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctive vaccination in rams. Vaccine, 2008. 26. – P. 2562-2569.

10. Blasco J.M. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants // Small Ruminant research 62, 2006. – P. 33-37.

11. Blasco J.M. A review of the use of B. melitensis Rev 1 vaccine in adult sheep and goats // Preventive Veterinary Medicine 31, 1997. – P. 275-283.

Контактная информация:
E-mail: nyamich_0623@yahoo.com;
E-mail: enee304@yahoo.com

ТРЕБОВАНИЯ К СТАТЬЯМ, ПУБЛИКУЕМЫМ В ЖУРНАЛЕ «ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА»

1. Для публикации статьи необходимо предоставить следующий пакет документов:

- текст статьи в электронном виде (на любом носителе или прислать по электронной почте);
- экземпляр, распечатанный на бумаге и подписанный авторами;
- сопроводительное письмо организации.

2. Научные статьи излагаются по следующей схеме:

- УДК;
- название статьи (на русском и англ. языках), сведения об авторах (обязательное указание места работы всех авторов, ученой степени, их должностей и контактной информации: тел.рабочий (с указанием кода города), эл.почта),
- Ф.И.О. авторов, место работы, резюме, ключевые слова должны быть представлены на русском и английском языках;
- **Резюме** (как на русском, так и на английском языке) нужно рассматривать как самостоятельный законченный материал. Размер резюме должен составлять 200 слов. Резюме не должно начинаться с

названия статьи, в нем не должно быть общих фраз. Нужно отразить цель исследований, при необходимости оригинальную часть методики, результаты (обязательно с приведением количественных данных), и выводы.

- краткая постановка вопроса, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение, заключение (выводы).
- Пристатейные библиографические списки должны быть оформлены по ГОСТу Р 7.0.5-2008.

3. Заголовок статьи следует формулировать кратко и четко.
4. Единицы измерений и размерности даются по ГОСТу «Единицы физической величины» (в соответствии с Международной системой СИ).
5. Максимальный объем 4 страницы, кегль (размер шрифта) 11, межстрочный интервал одинарный. Количество таблиц не более трех. Фотографии принимаются только хорошего качества.
6. Статья должна иметь две рецензии.

7. Плата с аспирантов за публикацию рукописей не взимается.



ООО «АГРОВЕТ»

109472, г.Москва, ул. Ташкентская, д.34, к.5
тел.: +7 (495) 638-52-74, 377-69-87, 377-69-97
факс: +7 (495) 377-90-35

Компания "Агровет" – одно из ведущих научно-производственных предприятий в области ветеринарной биотехнологии, инфекционной патологии и иммунологии. Более 20 лет мы работаем со всеми крупными биофабриками и научно-исследовательскими институтами. Собственные лаборатории и производственная база, оснащенные современным оборудованием, расположены в Москве и Кировской области. Высокий уровень компетентности и ответственности удовлетворит все ваши запросы, позволит уложиться в отведенные сроки и достигнуть поставленных целей. В нашем ассортименте более 200 наименований биопрепаратов. Подробная информация на нашем сайте.
www.agrovet.ru





ООО «АГРОВЕТ»

Агровет—одно из ведущих научно-производственных предприятий в области ветеринарной биотехнологии, инфекционной патологии и иммунологии.

Более 20 лет мы работаем со всеми крупными биофабриками и научно-исследовательскими институтами. Собственные лаборатории и производственная база, оснащенные современным оборудованием, расположены в Москве и Кировской области.

Высокий уровень компетентности и ответственности удовлетворит все ваши запросы, позволит уложиться в отведенные сроки и достигнуть поставленных целей.

ВАКЦИНЫ

ДИАГНОСТИКУМЫ

ГЛОБУЛИНЫ

СЫВОРОТКИ

ФАРМПРЕПАРАТЫ

ОБОРУДОВАНИЕ

109472, г.Москва, ул. Ташкентская, д.34, к.5
тел.: 8 (495) 638-52-74 (м/к),
377-69-87, 377-69-97
факс: 8 (495) 377-90-35
www.agrovet.ru; info@agrovet.ru





ООО «АГРОВЕТ»

Агровет—одно из ведущих научно-производственных предприятий в области ветеринарной биотехнологии, инфекционной патологии и иммунологии.

Более 20 лет мы работаем со всеми крупными биофабриками и научно-исследовательскими институтами. Собственные лаборатории и производственная база, оснащенные современным оборудованием, расположены в Москве и Кировской области.

Высокий уровень компетентности и ответственности удовлетворит все ваши запросы, позволит уложиться в отведенные сроки и достигнуть поставленных целей.

ВАКЦИНЫ

ДИАГНОСТИКУМЫ

ГЛОБУЛИНЫ

СЫВОРОТКИ

ФАРМПРЕПАРАТЫ

ОБОРУДОВАНИЕ

109472, г.Москва, ул. Ташкентская, д.34, к.5
тел.: 8 (495) 638-52-74 (м/к),
377-69-87, 377-69-97
факс: 8 (495) 377-90-35
www.agrovet.ru; info@agrovet.ru

