

Никулин, И. А. Синдромный принцип диагностики болезней печени у крупного рогатого скота / И. А. Никулин, Г. Е. Копытина, М. Н. Кочура // Ветеринария. – 2008. – № 1. – С. 41-43. 3. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и терапии гепатопатий у крупного рогатого скота / Ю. Н. Алехин, С. В. Шабунин, М. И. Рецкий [и др.]. – Воронеж, 2009. – 86 с. 4. Кротов, Л. Н. Характеристика обмена веществ у высокопродуктивных молочных коров в хозяйствах Ленинградской области / Л. Н. Кротов // Современные проблемы ветеринарного акушерства и биотехнологии воспроизведения животных : материалы междунауч.-практ. конф., посвящ. 85-летию со дня рожд. проф. Г. А. Черемисинова и 50-летию создания Воронежской школы ветеринарных акушеров. – Воронеж : Истоки, 2012. – С. 303-306. 5. Лейбова, В. Б. Метаболическое состояние в конце периода раздоя высокопродуктивных коров черно-пестрой породы / В. Б. Лейбова, И. Ш. Шапиев, И. Ю. Лебедева // Сельскохозяйственная биология. – 2011. - № 6. – С. 103-109. 6. Никулин И. А. Метаболическая функция печени у крупного рогатого скота при силосно-концентратном типе кормления и ее коррекция гепатотропными препаратами : автореф. дис. ... докт. вет. наук / И.А. Никулин. – Воронеж, 1987. – 2002. – 46 с. 7. Гепатозы сельскохозяйственных животных и препараты для их лечения и профилактики / И. А. Никулин, Н. И. Кузнецов, Б. М. Анохин [и др.] // Вестник Воронежского ГАУ. – 1999. – № 2. – С. 297-311. 8. Алехин, Ю. Н. Болезни печени у высокопродуктивных коров (диагностика, профилактика и терапия) / Ю. Н. Алехин // Ветеринария. – 2011. – № 6. – С. 3-7. 9. Методические рекомендации по диагностике, терапии и профилактике нарушений обмена веществ у продуктивных животных / М. И. Рецкий, А. Г. Шахов, В. И. Шушлебин [и др.]. – Воронеж : Истоки, 2005.

Статья передана в печать 12.10.2018 г.

УДК 619:577.11:579.6:616-001.28/29

МИЕЛОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОПОЛИМЕРА - АПИЗАНА И БИФИДОБАКТЕРИЙ НА ФОНЕ РАДИОГЕННОГО СТРЕССА

Шарифуллина Д.Т., Низамов Р.Н., Титов А.С., Шакуров М.М.

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация

Описаны принципы получения композиций на основе продуктов метаболизма бифидобактерий в комбинации с биополимером - апизаном, и изучены реакции костного мозга при стимуляции бифидобактериями и апизаном. Из проведенных экспериментов явствует, что необходимо провести опыты по конструированию композиционного препарата на основе *B. bifidum*, обладающего как профилактическим, так и лечебным эффектом, а апизан и бифидумбактерин обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами, но более действенную иммуноморфологическую перестройку в костном мозге вызывает их комплексное применение. **Ключевые слова:** бифидобактерии, апизан, острая лучевая болезнь, продукты метаболизма, иммуномодуляторы.

MIELOPROTECTIVE EFFECT OF BIOPOLYMER - APIZAN AND BIFIDOBACTERIA ON THE BACKGROUND OF RADIOGENIC STRESS

Sharifullina D.T., Nizamov R.N., Titov A.S., Shakurov M.M.

FSBSI «Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological safety», Kazan, Russian Federation

We describe the principles of obtaining compositions on the basis of products of metabolism of bifidobacteria in combination with biopolymer - apizana and studied the reaction of bone marrow in the stimulation of bifidobacteria and apizanon. From the conducted experiments it is evident that it is necessary to conduct experiments on the design of composite preparation on the basis of *B. bifidum*, possessing both preventive and curative effect, and apizan and bifidumbacterin have strong immunomodulatory properties, but a more effective immunomorphological changes in the bone marrow causes their complex application. **Keywords:** bifidobacteria, apizan, acute radiation syndrome, metabolites, immunomodulators.

Введение. В процессе жизнедеятельности бифидобактерии продуцируют антибактериальные вещества, обладающие радиозащитными свойствами в отдельности и в сочетании друг с другом, а именно: антигены, антибактериальные субстанции, биосурфактанты, ферменты и цитокины [Зароза В.Г., 1991; Дуплищева А.П., 1965; Мальцев В.Н., 1994].

В облученном организме под влиянием микробных агентов происходит активация процессов кроветворения, проявляющаяся снижением панцитопении в разгар заболевания, увеличением гранулоцитов и тромбоцитов и более высоким содержанием гемоглобина в период восстановления [Ермолаев З.В., 1972], усилением пролиферации и миграции стволовых клеток костного мозга, ускорением дифференцировки клеточных элементов, увеличением количества очагов кроветворения в селезенке и костном мозге иммунизированных животных [Конопляников А.Г., 1980].

Учитывая, что миелопротекторные свойства микробных препаратов достаточно высокие, введение в организм значительного количества микробных клеток как до, так и после действия миелотоксических агентов приводит к увеличению антигенной и бактериальной нагрузки на организм. Поэтому перспективным является использование препаратов на основе метаболитов микроорганизмов: ферментов, аминокислот, медиаторов иммуногенеза - цитокинов и других сурфактантов, имеющих наноразмеры, которые обеспечивают надежную и эффективную защиту при радиацион-

ном поражении путем восстановления нормального микробного пейзажа организма, нарушенного при лучевой болезни.

В настоящее время пристальное внимание ученых вызывает биополимер - хитозан, находящий практическое применение для заживления ран и как антимикробное средство [Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П., 2002] и, будучи слабым аллергеном, обладает достаточно низкой токсичностью и пирогенностью [Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П., 2002; Быкова В.М., Немцев С.В., 2002; Allan G.G., 1984].

При поражении организма миелотоксическими агентами, в частности, ионизирующим излучением, в механизме действия хитозана важную роль играет способность последнего ускорять начало и интенсивность процессов восстановления кроветворной ткани [Ильин Л.А., Андрианова И.Е., Глушков В.А., 2004]. Но технология получения биополимера хитозана из панциря крабовых моллюсков является очень сложной и многоступенчатой, сырье для его получения - малодоступным, при этом наиболее удобным и технологичным является получение иммуномодулятора из продуктов пчеловодства, в частности, из подмора пчел. Пчелиный хитозан - аписан (N-ацетил-β-D-глюкозамин) низкомолекулярный, пригоден к употреблению в чистом виде, для него не требуется дополнительная переработка, и он беспрепятственно проникает через все клеточные барьеры.

Исходя из вышеизложенного, целью работы является получение и апробирование миелозащитных препаратов на основе биологически активных веществ - продуктов метаболизма бифидобактерий в сочетании с биополимером, полученным из продуктов пчеловодства - аписаном, а также изучение реакции одного из периферических органов иммуногенеза - костного мозга при стимуляции бифидобактериями и аписаном.

Материалы и методы исследований. Объектами исследования служили: пробиотические штаммы-продуценты - *B. bifidum*, *B. subtilis*, *Lactobacteria acidophilus*, которые выращивали в анаэробной среде Блаурокка в условиях термостата при температуре 38°C для получения продуктов микробного метаболизма (культуральная жидкость и смесь микроорганизмов), конъюгировали их с природным биополимером (полисахаридом) на основе продуктов пчеловодства - аписаном (N-ацетил-β-D-глюкозамин) в концентрации 500 мг/100 см³ культуральной среды.

Основными показателями биологической активности полученных вариантов культуральной жидкости и сурфактантов являлись: величина pH, выход биомассы (%), концентрация клеток ($\times 10^9$ м.к./см³), каталазная (КАТ), супероксиддисмутазная (СОД), формиатдигидрогеназная (ФДГ) и антибактериальная (АВА) активности.

Использовали жидкую питательную среду Блаурокка и лабораторных животных (белые мыши). Моделирование поражения костного мозга проводили путем облучения мышей гамма-лучами на установке «Пума» в дозе 7,7 Гр. В качестве лечебно-профилактических средств использовали экспериментальные образцы потенциальных миелопротекторов - препаратов на основе бифидобактерий - *B. bifidum* БПА.

Количество ядродержащих клеток в бедренной кости определяли по методу И. Лефковитса и Б. Пернуса [1988].

Результаты исследований. В результате сравнительного изучения различных методов технологии получения хитозана и аписана установили, что наиболее технологичным и эффективным методом получения указанных биополимеров является методика получения аписана [Немцев С.В., 2001], включающая следующие технологические этапы: заготовку хитинсодержащего сырья (подмор пчел); сушку подмора пчел в термостате при температуре 37°C; измельчение подмора пчел в центробежной мельнице «ZM 200» размером частиц 4 мм; депротеинирование измельченного подмора пчел в 30%-ном растворе гидроксида натрия (NaOH) в течение 5-6 часов в сушильном шкафу при температуре 75°C; промывку полученного материала дистиллированной водой; просушивание исходного материала; деминерализацию исходного материала 1,5%-ным раствором соляной кислоты (HCl) в течение 16 часов при комнатной температуре; промывку полученного материала дистиллированной водой; удаление пигментов и липидов уксусно-этиловым эфиром; промывку полученного материала дистиллированной водой (получили *хитин*); деацетилирование полученного хитина 50%-ным раствором гидроксида натрия (NaOH) в сушильном шкафу при температуре 180-190°C в течение 2-3 часов (получили *хитозан*); обработку комплексом хитинолитических ферментов микробного происхождения. В результате проведенных исследований нами отработана технология получения потенциального иммуномодулятора из класса природных биополимеров - аписана.

При изучении влияния природного биополимера - аписана - на рост и развитие бифидобактерий в зависимости от концентрации аписана в культуральной жидкости были приготовлены навески аписана по 100, 200, 300, 400, 500 и 1000 мг. Их заключали в марлевые мешочки и подвергали радиостерилизации на гамма-установке «Исследователь» в дозе 5000 Гр, затем в стерильных условиях помещали навески аписана во флаконы и заливали средой Блаурокка, засеивали их бифидобактериями и инкубировали в течение 24, 48, 96 и 120 часов. Установлено, что из испытанных концентраций оптимальной являлась 0,5%-ная концентрация аписана (500 мг на 100 мл культуральной жидкости), которая обеспечивала 1,2-4,0-кратное увеличение биомассы бифидобактерий соответственно. Полученные вышеописанным образом образцы культуральных жидкостей *B. bifidum* с содержанием 100, 200, 300, 400 и 500 мг аписана, испытывали на миелопротекторный эффект при

профилактическом и лечебном применении на летально облученных лабораторных животных (белых мышах). Для оценки миелопротекторной активности полученных препаратов были проведены опыты на 30 белых мышах, разделенных на 3 группы по 10 животных в каждой. Моделирование поражения костного мозга проводили путем облучения мышей на гамма-установке «Пула» в дозе 7,7 Гр.

Животным 1-й группы за 24 часа до облучения однократно подкожно вводили препарат на основе бифидобактерий (*B. bifidum* БПА) (профилактический вариант); мышам 2-й группы через 24 часа после облучения однократно подкожно вводили препарат с бифидумбактерином (лечебный вариант). Облученным мышам 3-й группы препарат не вводили, они служили контролем облучения.

Установлено, что однократное подкожное введение белым мышам препарата с аписаном (*B. bifidum*) через 24 часа (лечение) после летального (7,7 Гр) облучения предохраняло 40%; а при профилактике (за 24 часа) - 60%, при 100%-ной гибели контроля облучения. Полученные данные свидетельствуют о необходимости создания единого композиционного лечебно-профилактического препарата на основе использованного тест-штамма и природного биополимера, определения оптимальной дозы и разработки оптимальной схемы лечебно-профилактического применения препарата.

Следующая экспериментальная серия опытов была проведена для изучения иммунного статуса лабораторных животных (белых мышей) под влиянием изучаемого иммуномодулятора - аписана и пробиотических бифидобактерий с целью исследования реакции костного мозга.

Опыты проводили на 40 белых мышах, которых по принципу аналогов разделили на 4 группы по 10 животных в каждой. Мыши 1-й группы были контрольными. Они находились в одинаковых условиях кормления и содержания с животными остальных опытных групп, но никакие манипуляции с ними не проводились. Мышам 2-й группы 1 раз в день с водой выпаивали раствор аписана, 3-й группе - разведенный порошок бифидумбактерина и животным 4-й группы - раствор аписана в комплексе с бифидумбактерином.

Срок иммуностимуляции составил 8 дней.

До проведения экспериментов, а затем через 3, 7, 14, 21, 35 и 60 дней от начала опытов брали материал для иммуноморфологических исследований.

Количество ядросодержащих клеток в бедренной кости определяли по методу И. Лефковитса и Б. Перниса [1988]. У убитых мышей удаляли бедренную кость, помещали ее в холодную КС-А или КС-Б в чашки Петри и до забора костного мозга хранили во льду. Далее бедренную кость переносили во 2-ю чашку Петри с содержанием холодной среды и споласкивали. Кость крепко зажимали стерильным пинцетом посередине и осторожно удаляли скальпелем коленный сустав. Костномозговую пробку вымывали 1,5-2 мл среды, используя шприц на 5 мл и иглу № 25. Чтобы полностью вымыть костный мозг, внутреннюю поверхность кости скоблили иглой. Клетки собирали в стерильные пробирки, центрифугировали при 200 G 10 минут, промывали СР и ресуспендировали в концентрации 10^8 жизнеспособных ядерных клеток на 5 мл среды RPMI 1640, содержащей 20% СПК [Лефковитс И., Пернис Б., 1988].

Изучение миелограммы костного мозга показало, что применение в качестве иммуномодулятора аписана способствовало повышению количества в костном мозге клеток зернистого и эритроидного ростка, моноцитов и плазматических клеток. Увеличение роста клеток зернистого ростка наблюдали до 21 дня эксперимента. На данный срок их уровень превысил контрольный показатель в 1,2 раза. К 60 дню эта разница составила 1,19 раза. Процент лимфоидных клеток был максимальным к 21 и 35 дням опыта, превышая контроль в 1,22 и 1,44 раза соответственно. Моноциты и плазматические клетки к этому же сроку были выше контрольного значения в 1,78 раза, а к 60 дню - в 1,62 раза.

В 3-й группе мышей интенсивность роста лимфоидных клеток костного мозга была также активной, но уступала их уровню 2-й опытной группы.

В 4-й опытной группе наблюдали самые выраженные иммуноморфологические изменения: клетки зернистого ростка имели максимальный показатель к 35 дню опыта, который превышал показатель мышей 1-й группы в 1,39 раза, 2-й - в 1,15 и 3-й - в 1,18 раза. Процент лимфоидных клеток был максимальным к 21 дню эксперимента. На этот срок их число было выше по сравнению с мышами 1-й группы в 2,1, 2-й - в 1,18 и 3-й - в 1,33 раза.

Таким образом, аписан и бифидумбактерин обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами, но более действенные иммуноморфологические перестройки в костном мозге вызывает их комплексное применение.

Заключение. Установлено, что однократное подкожное введение белым мышам препарата с аписаном (*B. bifidum*) через 24 часа (лечение) после летального (7,7 Гр) облучения предохраняло 40%; а при профилактике (за 24 часа) - 60%, при 100%-ной гибели контроля облучения.

Из проведенных исследований вытекает, что в дальнейшем необходимо провести исследования по конструированию композиционного препарата на основе *B. bifidum*, обладающего как профилактическим, так и лечебным эффектом, а аписан и бифидумбактерин обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами, но более действенные иммуноморфологические перестройки в костном мозге вызывает их комплексное применение.

Литература. 1. Зароза, В. Г. Эшерихиоз телят / В. Г. Зароза. - Москва : Агропромиздат, 1991. - 239 с. 2. Дуплищева, А. П. Влияние антигенов продуктов их деградации на радиорезистентность облученных животных / А. П. Дуплищева, Н. Г. Синилова, К. К. Иванов // Радиобиология. - 1965. - Т. 5. - Вып. 2. - С. 243-252. 3. Мальцев, В. Н. Влияние бактериальных препаратов и сывороточных глобулинов на дисбактериоз кишечника при острой лучевой болезни / В. Н. Мальцев, Б. В. Пинегин, В. М. Коршунов // Иммунотерапия экспериментальной острой лучевой болезни. - Москва : Энергоиздат, 1994. - С. 61-73. 4. Влияние пострадиационного применения продигозана на выживаемость и систему крови облученных животных / З. В. Ермолаев [и др.] // Антибиотики, 1972. - Т. 17. - № 6. - С. 517-522. 5. Конопляников, А. Г. Стеоловые клетки самообновляющихся систем как детерминанты выживаемости животных в острый период поражения / А. Г. Конопляников // Итоги науки и техники, ВИНТИ, радиационная биология, 1980. - Т. 3. - С. 5-38. 6. Скрябин, К. Г. Хитин и хитозан: получение, свойства, применение / Под ред. К. Г. Скрябина, Г. А. Вихоревой, В. П. Варламова. - Москва : Наука, 2002. - 368 с. 7. Быкова, В. М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана / В. М. Быкова, С. В. Немцев. - Москва : Наука, 2002. - С. 7. 8. Chitin, chitosan and related enzymes / G.G. Allan [et.al.]. - Orlando : Acad. press. inc., 1984. - P. 119-134. 9. Ильин, Л. А. / Л. А. Ильин, И. Е. Андрианова, В. А. Глушков // Радиационная биология, радиозоология, 2004. - Т. 44. - № 2. - С. 176-178. 10. Получение апизана из подмора пчел / С. В. Немцев, О. Ю. Зуева, Р. Г. Хисматуллина [и др.] // Пчеловодство. - 2001. - № 5. - С. 50-51. 11. Иммунологические методы исследований / Под редакцией И. Лефковитса и Б. Пернуса. - Москва : Мир, 1988. - 528 с.

Статья передана в печать 03.10.2018 г.

УДК 619:[616.34-008.87]:612.015.3:616-053.3]:632.2

МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ТЕЛЯТ С СИНДРОМОМ ИНТРАНАТАЛЬНОЙ АСФИКСИИ.

Шахов А.Г., Сашнина Л.Ю., Владимирова Ю.Ю., Карманова Н.В., Тараканова К.В.
ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

В опытах на телятах, перенесших интранатальную асфиксию ($n=8$), установлено, что у них по сравнению с животными без интранатальной патологии ($n=8$), более длительно происходит заселение кишечника лактобациллами и буфидумбактериями, и количество их было на 19,8 и 23,4% (1 сутки), 23,8 и 17,4% (2 сутки), 22,7 и 20,8% (4 сутки) и на 17,4 и 18,6% (7 сутки) ниже, а содержание цитробактеров, энтеробактеров, стрептококков и эшерихий, в том числе энтеропатогенных вариантов, являющихся одними из бактериальных возбудителей желудочно-кишечных болезней, выше. Используемые в исследованиях экологические показатели свидетельствуют о некоторых особенностях формирования микробиоты кишечника и взаимоотношений ее представителей у телят, перенесших асфиксию, по сравнению с животными без интранатальной патологии. **Ключевые слова:** микробиота кишечника, телята, интранатальная асфиксия, микроэкологические показатели.

MICROECOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE INTESTINAL MICROBIOTA IN CALVES WITH THE SYNDROME OF INTRAPARTUM ASPHYXIA

Shakhov A.G., Sashnina L.Yu., Vladimirova Yu.Yu., Karmanova N.V., Tarakanova K.V.
SSI All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy of the RAAS, Voronezh, Russian Federation

In the experiments on calves after intrapartum asphyxia ($n=8$), it was found that they compared with the animals without intrapartum pathology ($n=8$) long-term colonization of the intestine with lactobacilli and bifidumbacteria occurs and their number was 19.8 and 23.4% (1 day), 23.8 and 17.4% (2 day), 22.7 and 20.8 percent (4 day) and 17.4 and 18.6% (day 7) was lower. The content of citrobacters, enterobacters, streptococci and *E. coli*, including enter pathogenic options among the bacterial agents of diarrhoeal diseases was higher. The ecological indicators used in the studies show some features of the formation of intestinal microbiota and the relationship of its representatives in calves with asphyxia, compared with the animals without intrapartum pathology. **Keywords:** intestinal microbiota, calves, intrapartum asphyxia, micro-ecological parameters.

Введение. В основе асфиксии новорожденных телят, регистрируемой чаще всего при патологических родах, лежит острая кислородная недостаточность [1, 2].

Изучению этиологии, патогенеза, клинического проявления асфиксии интранатальной у телят, разработке средств и методов терапии и профилактики посвящено значительное количество работ [3, 4, 5, 6, 7].

Однако вопросы, касающиеся микроэкологических особенностей микробиоты кишечника у таких животных, недостаточно изучены.

Цель исследований - изучение микроэкологических особенностей микробиоты кишечника у телят с синдромом асфиксии интранатальной в молозивный период.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены в условиях молочно-