

Журнал включен в список Высшей Аттестационной Комиссии (ВАК) Беларуси по отраслям: ветеринарные науки, биологические науки, сельскохозяйственные науки, приказ коллегии ВАК, протокол № 17/7 от 19.06.2008 г.

Учредители: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАН»

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Красочко П.А. – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор

ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Якубовский М.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент ААН РБ

СЕКРЕТАРЬ:

Щемелёва Н.Ю. – кандидат ветеринарных наук

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Кучинский М.П. – доктор ветеринарных наук, профессор

Насонов И.В. – доктор ветеринарных наук, доцент

Ястребов А.С. – доктор ветеринарных наук, доцент

Журавлёва Е.С. – кандидат ветеринарных наук

Новикова О.Н. – кандидат ветеринарных наук

НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:

Ларькова А.Е.

Ответственность за достоверность данных несут авторы статей. Опубликованные материалы отражают точку зрения авторов и не всегда совпадают с точкой зрения редколлегии.

При использовании авторами материалов журнала «Экология и животный мир» ссылка на журнал **обязательна**

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ

Красочко И.А. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Минск)

Члены редакционного совета:

Албулов А.И. – доктор биологических наук, профессор (г. Щёлково РФ)

Белова Л.М. – доктор биологических наук, профессор (г. Санкт-Петербург)

Головко А.Н. – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент НААН Украины (г. Киев)

Голушко В.М. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси (г. Жодино)

Денисов А.А. – доктор биологических наук, профессор (г. Щёлково РФ)

Лысенко Н.П. – доктор биологических наук, профессор (г. Москва)

Пестис В.К. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси (г. Гродно)

Стекольников А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН (г. Санкт-Петербург)

Субботин А.М. – доктор биологических наук, профессор (г. Минск)

Титов Л.П. – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси (г. Минск)

Чистенко Г.Н. – доктор медицинских наук, профессор (г. Минск)

Шейко И.П. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик НАН Беларуси (г. Жодино)

Ярыгина Е.И. – доктор биологических наук, профессор (г. Москва)

Ятусевич А.И. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (г. Витебск)

Все статьи рецензируются

© «Экология и животный мир»

СО Д Е Р Ж А Н И Е	C O N T E N T S
Амосова Л.А., Ломако Ю.В., Zubovskaya I.V., Новикова О.Н., Ананчиков М.А., Карпович В.К. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ТОКСИНЫ (КРАТКИЙ ОБЗОР)	Amosova L.A., Lomako J.V., Zubovskaya I.V., Novikova O.N., Ananchikov M.A., Karпович V.K. BACTERIAL TOXINS (OVERVIEW)
Гольнец В.Г., Жалдыбин В.В., Луцевич О.И. О НЕКОТОРЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ ПРОВЕДЕНИЯ И ОСОБЕННОСТЯХ ВЕТЕРИНАРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ПРИМЕНЕНИЮ ЛОШАДЕЙ В ОХРАНЕ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ГРАНИЦЫ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ	Golynets V.G., Zhaldybin V.V., Lutsevich O.I. ABOUT SOME RESULTS OF VETERINARY SOFTWARE AND FEATURES OF EXPERIMENTAL USE OF HORSES IN THE PROTECTION OF THE STATE BORDER OF THE REPUBLIC OF BELARUS
Дудин В.И., Ушаков А.С., Грищук С.В. α -ТОКОФЕРИЛХИНОН, НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО РЕГУЛЯЦИИ БРОЖЕНИЯ У ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (ОБЗОР)	Dudin V.I., Ushakov A.S., Grishchuk S.V. α -TOCOPHEROLQUINONE, NEW DATA ON THE REGULATION OF FERMENTATION IN YEAST <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (REVIEW)
Зайцева В.В. ДИНАМИКА РОСТА ГРИБА ТРИХОФИТОНА НА ПЛОТНЫХ СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА	Zaitseva V.V. THE DYNAMICS OF THE FUNGUS TRICHOPHYTON GROWTH ON SOLID MEDIA OF DIFFERENT COMPOSITION
Гудзь В.П., Белявский В.Н. К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ РАЗВИТИЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ У ЖИВОТНЫХ (ОБЗОР)	Gudz P.V., Belyavsky V.N. TO THE QUESTION ABOUT THE MECHANISM OF DEVELOPMENT OF STRESS-INDUCED PATHOLOGY IN ANIMALS (REVIEW)
Айшпур Е.Е., Сапон Н.В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ЭНТЕРОПАТИИ СВИНЕЙ В СВИНОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ УКРАИНЫ	Ishpor E.E., Sapon N.V. DIAGNOSTIC MONITORING OF PROLIFERATIVE ENTEROPATHY OF PIGS IN PIG FARMS OF UKRAINE
Кузнецов И.Н., Ручай Н.С. ПОВЫШЕНИЕ КАЧЕСТВА БЕЛОКСОДЕРЖАЩЕГО КОРМОВОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ВЗВЕШЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЫ ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКЕ	Kuznetsov I.N., Ruchai N.S. IMPROVING THE QUALITY BLACKSTEREO COR POUND OF THE PRODUCT ON THE BASIS OF WEIGHTED -WEIGHTED SUBSTANCES DDGS ENZYMATIC-MICROBIOLOGICAL PROCESSING
Красочко П.А., Ковалев Н.А., Бучукури Д.В., Усеня М.М. РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК «ПАРВОВАК»	Krasochko P.A., Kovalev N.A., Buchukuri D.V., Usenya M.M. DEVELOPMENT AND STUDY OF EFFICIENCY INACTIVATED VACCINE AGAINST PARVOVIRAL ENTERITIS OF DOGS «PARVOVAK»
Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М. ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДА PRO-LEU НА ОБУЧЕНИЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОМУ ОБОРОНИТЕЛЬНОМУ РЕФЛЕКСУ ИНБРЕДНЫХ КРЫС SHR	Kravchenko E.V., Olgomets L.M. EFFECT OF DIPEPTIDE PRO-LEU ON THE TRAINING OF INBRED SHR RATS DEFENSIVE INSTRUMENTAL REFLEX
Темный Н.В., Богач Н.В., Корчан Л.Н. ПАРАЗИТАРНЫЕ СИСТЕМЫ ОВЕЦ И КОЗ В ЛЕСО-СТЕПНОЙ ЗОНЕ УКРАИНЫ	Temnyy N.V., Bogach N.V., Korchan L.N. PARASITIC SYSTEMS OF SHEEP AND GOATS IN THE FOREST-STEPPE ZONE OF UKRAINE

Компьютерная верстка: ЛУКЪЯНОВА И. А.

Подписано в печать 10.12.2015 г.

Формат 60x84^{1/8} Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.

Уч.-изд. л. , усл. печ. л 7,5 Тираж 100 экз. Заказ №

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28. E-mail: bievm@tut.by; KNIR@tut.by

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».

Свидетельства о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий №1/161 от 27.01.2014, №2/41 от 29.01.2014.

Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

Амосова Л.А., кандидат ветеринарных наук
Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук, доцент
Зубовская И.В., кандидат ветеринарных наук
Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук
Ананчиков М.А., кандидат ветеринарных наук
Карпович В.К., ветеринарный врач

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ТОКСИНЫ (КРАТКИЙ ОБЗОР)

Резюме

Токсины – белковые вещества, обладающие ядовитым действием и образуемые микроорганизмами и животными. Микробные токсины подразделяют на два больших класса – экзотоксины, выделяемые в окружающую среду, и эндотоксины, связанные с бактериальной клеткой. Некоторые свойства токсинов нашли применение в медицине. Применение анатоксинов предупреждает развитие заболеваний, вызываемых возбудителями, продуцирующими экзотоксины.

Summary

The toxins are proteins having toxic effect and formed by microorganisms and animals. Microbial toxins are divided into two major classes - exotoxins released into the environment, and endotoxins associated with the bacterial cell. Some properties of the toxins have been used in medicine. Application toxoids prevents diseases caused by pathogens that produce exotoxins.

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

Токсины – белковые вещества, обладающие ядовитым действием и образуемые микроорганизмами и животными [1]. В микробиологии данный термин появился в 1884 г благодаря Roux и Yersin.

В настоящее время бактериальные токсины разделяют на два больших класса на основании их химической природы независимо от их клеточной локализации. Выделяют бактериальные белковые токсины (экзотоксины) и липополисахаридно-белковые комплексы, которые находятся на поверхности клеточной стенки грамотрицательных бактерий (эндотоксины). Они имеют разнообразный химический состав и представлены более тремястами различными химическими субстанциями. Около 25% белковых бактериальных токсинов относятся к эндотоксинам, они прочно связаны с клеточной стенкой. Их выход за пределы бактериальной клетки происходит при ее разрушении. Остальные 75% пред-

ставлены экзотоксинами и, как правило, вырабатываются в результате жизнедеятельности бактерий и выделяются в окружающую среду.

Экзотоксины – термолабильные субстанции: большинство из них разрушается при температуре 60–80°C в течение 10–20 мин. Эндотоксины устойчивы к нагреванию: разрушаются при более высокой температуре или при длительном кипячении. Экзотоксины менее стойки к действию различных физико-химических факторов по сравнению с эндотоксинами. Замораживание и оттаивание токсинов не оказывает заметного влияния на их силу. Действие формалина и тепла на экзотоксины лишает их ядовитых свойств, но сохраняет иммуногенность. На этом принципе основано получение так называемых анатоксинов, применяемых для профилактики ряда инфекций. Попытки получения анатоксинов из эндотоксинов оказались безуспешными.

Характерной особенностью для экзотоксинов является выраженная антигенность – способность вызывать при введении в организм образование антител, обладающих высокой степенью специфичности. Это обстоятельство позволяет вырабатывать в производственных условиях лечебные и профилактические сыворотки против заболеваний, вызываемых возбудителями, продуцирующими экзотоксины [1, 2].

Экзотоксины, в зависимости от *прочности их соединения с микробной клеткой* подразделяются на:

- полностью секретируемые (собственно экзотоксины) в окружающую среду;

- частично секретируемые;

- несекретируемые.

По механизму действия токсины могут быть разделены на 5 групп: повреждающие мембраны, ингибиторы белкового синтеза, активаторы иммунного ответа, протеазы, активаторы вторичных мессенджеров.

Порообразующие токсины

Некоторые бактериальные токсины формируют функционирующие трансмембранные поры (каналы) посредством вставки в плазматическую мембрану хозяина, приводящие клетку к лизису. Такие токсины еще называют RTX-семейством (repeats in toxin) из-за наличия в их молекулах большого количества повторов. К порообразующим токсинам относят альфа-токсин *S. aureus*, гемолизин *E. coli* (HlyA), аденилатциклазу *B. pertussis*, лейкотоксин *Mannheimia haemolytica*.

Следует отметить, что способность формировать белковые каналы в клеточной мембране не является уникальным свойством бактериальных токсинов. Посредством поры осуществляется транспорт специфических ионов через мембраны эукариотических и прокариотических организмов. К образованию пор способны белки слияния вирусов. Аналогичным образом «действуют» цитолитические белки ядов животных [3, 4, 5].

Токсины, ингибирующие синтез белка

Цитотоксины, которые блокируют синтез белка на субклеточном уровне (шига-токсин (Stx-токсин) продуцируется *S. dysenteriae* первого серотипа и Stx-продуцирующими штаммами *E. coli* (STEC), золотистых стафилококков, дерматонекротоксины стафилококков, палочек сибирской язвы, сине-зеленого гноя и возбудителя коклюша). В эту же группу включены так называемые элонгаторы – вещества, препятствующие элонгации (наращиванию) или транслокации, т.е. передвижению и-РНК вдоль рибосомы, что приводит к нарушению синтеза белка (дифтерийный токсин, токсин *Pseudomonas*) [6, 7].

Токсины, генерирующие образование вторичных мессенджеров (посредников)

Бактериальные токсины могут влиять на функцию отдельных белков эукариотической клетки, не приводя ее к гибели. Для этого они активируют так называемых вторичных посредников, способных в большой степени усиливать и искажать клеточную реакцию на внеклеточные сигналы. К данному типу токсинов относят цитотоксический некротический фактор (CNF). Эукариотические клетки, подвергнутые воздействию CNF1, приобретают характерный вид. У них наблюдается «рифление» мембраны, формируется локальное сжатие актиновых нитей. Репликация ДНК при отсутствии клеточного деления приводит к образованию многоядерных клеток. Внутрикожное введение CNF1 вызывает длительное воспаление и образование некротического очага [7].

Протеолитические токсины

В эту группу входят ботулинистический и столбнячный токсины бактерий рода *Clostridium*. Они блокируют передачу нервных импульсов в синапсах (в клетках спинного и головного мозга).

Ботулинистические токсины связываются с рецепторами на поверхности пресинаптической мембраны двигательных нейронов периферической нервной системы и вызы-

вают протеолиз белков в нейронах. Это приводит к ингибированию высвобождения ацетилхолина и к предотвращению мышечных сокращений – возникает вялый паралич. Столбнячный токсин сначала связывается с рецепторами на пресинаптической мембране моторных нейронов, но затем, с помощью ретроградного везикулярного транспорта, он перемещается в нейроны спинного мозга. Спастический паралич возникает из-за того, что расщепление везикуло-ассоциированных белков и синаптобrevина в нейронах нарушает высвобождение глицина и гамма-аминобутириковой кислоты, прекращающих мышечное сокращение [8, 9].

Активаторы иммунного ответа

Отдельные бактериальные токсины могут действовать непосредственно на Т-клетки и антигенпрезентирующие клетки иммунной системы. Самое большое семейство токсинов данного типа называют пирогенными токсинами-суперантигенами (PTSAg). Это стабильные, секретруемые токсины с ММ в пределах от 22 до 30 кДа. К ним относятся стафилококковые энтеротоксины серотипов А-Е, G и H; пирогенные экзотоксины стрептококков группы А серотипов А-С и F; стафилококковый TSST-1. Следствием Т-клеточной экспансии является массивное высвобождение интерлейкинов (1, 2 и 6 типов), гамма-интерферона, факторов некроза опухолей (альфа и бета) и др. Совместно эти цитокины вызывают гипотензию, высокую температуру и диффузные эритематозные высыпания [7, 10].

Особое внимание следует уделить токсинам, которые являются причиной пищевых отравлений. Их еще называют энтеротоксинами. Большинство энтеротоксинов действуют на клетках слизистой кишечного тракта. Тем не менее, есть и другие пищевые токсины, такие как нейротоксины (ботулотоксин), не являющиеся энтеротоксическими.

В токсикологии бактерии, участвующие в пищевых отравлениях, можно разделить на четыре класса на основе клини-

ческих признаков:

- бактерии, вызывающие инфекцию (*Salmonella*, *Shigella enterica*, *Campylobacter*, энтеропатогенные *Yersinia*, *Listeria*, некоторые *E.coli* и *Aeromonas*);

- бактерии, колонизирующие клетки-мишени хозяина, до продуцирования токсинов (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *E.coli* и некоторые *Aeromonas spp.*);

- бактерии, продуцирующие энтеротоксины без прямого взаимодействия ткани самой бактериальной клетки (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*);

- бактерии, образующие токсины в пище: токсические вещества не вырабатываются в организме, а попадают в организм с кормом (*Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* (рвотный тип), *Staphylococcus aureus*).

Таким образом, многие бактерии могут образовывать не один, а несколько белковых токсинов, которые обладают разным действием – нейротоксическим, цитотоксическим, гемолитическим.

В то же время некоторые бактерии – кишечная палочка, холерный вибрион – могут одновременно образовывать как белковые экзотоксины, так и эндотоксины [11].

Структурная организация токсинов

Структурно токсины бактерий представляют собой либо отдельные белки, либо олигомерные белковые комплексы, организованные в А-В-структуры. Такая структура молекулы токсина предполагает наличие двух компонентов: А- и В-субъединиц, поэтому их еще называют бинарными. А-субъединица обладает энзиматической (токсической) активностью в клетке. В-субъединица доставляет А-субъединицу в клетку-мишень. В-субъединица состоит из двух функциональных доменов: рецептор-связывающего домена, определяющего тропизм молекулы токсина к определенным клеткам, и транслокационного домена, доставляющего А-субъединицу через липидный бислой либо на плазматическую мембрану, либо в эндосо-

му клетки-мишени. Структура В-доменов тесно связана со структурой рецепторов-мишеней, с которыми взаимодействует токсин. А-субъединицы более консервативны, чем В-субъединицы, особенно в участках, критических для проявления их ферментативной активности [10]. Для бактериальных токсинов характерно сходство их субъединиц на молекулярном и макромолекулярном уровнях. Оказалось, что хотя холерный токсин и относящийся к его семейству термолабильный энтеротоксин кишечной палочки (LT-токсин) имеют по пять идентичных В-субъединиц, а коклюшный токсин имеет четыре различных В-субъединицы, две из В-субъединиц коклюшного токсина свертываются аналогично В-субъединичным пентамерам семейств холерного токсина и шига-токсина [5].

Проведенные нами исследования 13 коллекционных штаммов *E. coli* показали, что у 23% отсутствует способность продуцировать токсины, 46% способны выраба-

тывать термолабильный энтеротоксин, 23% термостабильный и 8,0% – оба энтеротоксина (термостабильный и термолабильный). Полученные данные говорят о необходимости включения анатоксинов *E. coli* в препараты специфической профилактики колибактериоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробные токсины являются весьма опасными для живого организма. Они часто приводят к необратимым повреждениям эукариотических клеток путем повреждения мембран, проявления ферментативной активности клетки и изменения ее жизнедеятельности. Бактериальные токсины хорошо изучены, и этот процесс все еще продолжается. Так, некоторые свойства токсинов нашли применение в медицине. Около 77% эшерихий способны к продукции экзотоксинов, что делает необходимым включение анатоксинов *E. coli* в препараты специфической профилактики [1, 2].

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Сунотницкий, М.В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии / М.В. Сунотницкий //– М., 2005.
- 2 <http://www.medical-enc.ru/18/toxin.shtml>.
- 3 Филдс, Б.– Вирусология: в 3 т./ Б. Филдс, Д. Найн, Р. Ченок [и др.] // Пер. с англ. под ред. Н.В. Каверина, Л.Л. Киселева. – М., 1989.
- 4 Finlay, B. Common themes in microbial pathogenicity / B. Finlay, S. Falkow // *Microbiol. Rev.* – 1997. – Vol. 53. – № 2. – P. 210–230.
- 5 Антонов, Н.С. Химическое оружие на рубеже двух столетий / Н.С. Антонов – М., 1994.
- 6 Mandal, C.C., Gayen, S., Basu, A. [et al.]. Prediction based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects// *Prot. Eng. Design. Selec.* – 2007. –Vol. 20. – P. 599–606.
- 7 Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки: в 3 т. / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис [и др.] // Пер. с англ. под ред. Г.П. Георгиева и Ю.С. Ченцова. – М., 1994.
- 8 Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A. [et al.]. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins // *Arch. Microbiol.* –1996. – Vol. 165.– № 1. – P. 73–79.
- 9 Lobet, Y., Cieplak, W., Smith, S.G. [et al.]. Effects of mutations on enzyme activity and immunoreactivity of the S1 subunit of pertussis toxin // *Infec. Immun.* –1989. – Vol.57. – №11. – P. 3660–1668.
- 10 <http://kakbeololo.narod.ru/index/0-31>.
- 11 Henkel J.S., Baldwin M.R., Barbieri J.T. Toxins from bacteria // *EXS.* – 2010. – № 100. – P. 1–29.

Голынец В.Г., кандидат ветеринарных наук*

Жалдыбин В.В., кандидат ветеринарных наук, доцент**

Луцевич О.И., кандидат педагогических наук, доцент**

*Государственный пограничный комитет Республики Беларусь, г. Минск

**ГУО «Институт пограничной службы Республики Беларусь», г. Минск

О НЕКОТОРЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ ПРОВЕДЕНИЯ И ОСОБЕННОСТЯХ ВЕТЕРИНАРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ПРИМЕНЕНИЮ ЛОШАДЕЙ В ОХРАНЕ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ГРАНИЦЫ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Резюме

В статье приведены данные о результатах проведения и особенностях ветеринарного обеспечения эксперимента по применению лошадей в охране Государственной границы Республики Беларусь. Анализируются направления и проблемы дальнейшего развития применения лошадей в пограничной службе.

Summary

The article shows the results of the veterinary and features to ensure the experiment on the application of the horses in the protection of the State border of the Republic of Belarus. Analyzes the trends and issues of further development of the use of horses in the border service.

Поступила в редакцию 06.10.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Современное развитие органов пограничной службы Республики Беларусь характеризуется активным внедрением в оперативно-служебную деятельность по обеспечению пограничной безопасности новейших технических средств охраны границы, обладающих искусственным интеллектом, тепловизионных и оптико-электронных модулей, беспилотных авиационных комплексов и автожиров. С помощью данных средств легко решаются вопросы обнаружения нарушителей границы. Однако физико-географические особенности Республики Беларусь и отсутствие развитой дорожной сети на приграничной территории не всегда обеспечивают своевременное выдвижение пограничных нарядов к месту нарушения пограничного законодательства. В целях решения данной проблемы ведется строительство пограничных дорог, принимаются на вооружение транспортные средства повы-

шенной проходимости: «внедорожники», «болотоходы», «квадроциклы» и др. Данные способы влекут за собой высокие материальные затраты, что обусловило необходимость исследования вопросов применения в охране границы иных средств передвижения, в частности лошадей.

Исторический анализ показывает, что лошади издавна применялись в охране Государственной границы, но развитие инженерной инфраструктуры пограничных застав и применение автомобильной техники постепенно вытеснили лошадей как средство передвижения. После распада СССР Государственная граница Республика Беларусь была оборудована в инженерном отношении только на польском направлении, на прибалтийском и украинском рубежах дорожная сеть на приграничной территории развита слабо вплоть до настоящего времени. Поэтому использование лошадей для передвижения пограничных нарядов в подразделениях на тех

участках, где по природным условиям применение других транспортных средств затруднено или невозможно, актуально и в наше время. Особое значение имеет использование лошадей при снежных заносах, в осеннее и весеннее бездорожье. Лошадь способна проходить значительные расстояния по пересеченной местности, смело и легко преодолевать всевозможные преграды и препятствия. Умелое использование природных и выработанных качеств значительно повышает маневренность и скрытность пограничных нарядов, что в общей системе мер положительно влияет на обеспечение надежной охраны Государственной границы [1, 2].

В период с 2012 по 2014 годы в органах пограничной службы Республики Беларусь был проведен эксперимент по применению лошадей в качестве средства передвижения пограничных нарядов и резерва подразделения.

Основными **задачами** проведения эксперимента являлись:

- определение целесообразности и степени эффективности применения лошадей в охране Государственной границы;
- проведение анализа и оценки применения лошадей в различных погодных условиях, времени суток и времени года.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В войсковом эксперименте применялись 4 лошади породы «Белорусская упряжная» на участке пограничной заставы «Савейки» Полоцкого пограничного отряда; 3 лошади породы «Гоноверская» и 1 лошадь породы «Белорусская упряжная» на участке Пограничной заставы им. Усова Гродненской пограничной группы.

Вышеназванные породы лошадей обладают высокой работоспособностью, выносливостью, преданностью только одному хозяину, хорошо приспособлены к местным условиям природной среды, устойчивы к заболеваниям.

В участвующих в войсковом эксперименте подразделениях были созданы места

для содержания лошадей, соответствующие зооигиеническим и ветеринарно-санитарным правилам, определен порядок ухода, кормления и водопоя. Была проведена подгонка экипировки кавалеристов и специального снаряжения для лошадей.

За каждой лошастью закрепили отдельных военнослужащих, имеющих зооветеринарное образование и практические навыки работы с лошадьми.

Сотрудники ГУО «Институт пограничной службы Республики Беларусь» разработали нормативно-правовые документы, регламентирующие порядок применения лошадей в подразделениях, связанных с охраной Государственной границы, и программу проведения войскового эксперимента.

В охране Государственной границы лошади применялись только в светлое время суток в пограничных нарядах «Дозор», «Подвижный пограничный пост» и «Тревожная группа».

Доставка пограничных нарядов для охраны Государственной границы осуществлялась на лошадях.

Ветеринарное обслуживание лошадей во время проведения эксперимента было организовано в соответствии с нормативно-правовыми актами Государственного пограничного комитета Республики Беларусь.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

В результате эксперимента установлено:

- повысилась плотность выставления пограничных нарядов на 25% ;

- сократилось время выдвижения пограничных нарядов к месту несения службы на 35% , что позволило увеличить продолжительность нахождения пограничных нарядов на охраняемом участке за счет увеличения скорости передвижения пограничных нарядов и сокращения времени на выдвижение к месту несения службы (в отличие от пешего пограничного наряда);

- снизилась физическая нагрузка на

личный состав пограничной заставы;

- усилился контроль за соблюдением режимов, установленных пограничным законодательством;

- повысилась маневренность пограничных нарядов и способность оперативно реагировать при изменениях обстановки на участке пограничной заставы;

- появилась возможность выдвигаться на лошадях в районы, недоступные для прохождения техники и неудобные для движения в пешем порядке пограничными нарядами.

Также было отмечено, что лошади хорошо ориентируются на местности, запоминают маршруты движения и опасные места, что при должной подготовке военнослужащих упрощает управление лошадью.

Экономический эффект от использования лошадей в ходе проведения эксперимента за счет экономии мото-ресурсов автомобильной техники и горюче-смазочных материалов составил 2 тонны 346 литров (при прогоне автомобиля для доставки пограничных нарядов на автомобиле УАЗ 31519 расход топлива летом – 15 л, зимой – 16,5 л).

Кроме того было зарегистрировано, что применение лошадей при минусовых температурах и гололедах затруднительно и небезопасно в связи с тем, что лошади не подковывались по причине отсутствия специального инвентаря по уходу за копытами (подковы, гвозди, рашпиль, ножи, копытные ножницы и др.) и специалистов по ковке лошадей. Данных специалистов не готовит ни одно учебное заведение Республики Беларусь.

В свою очередь эксперимент показал о необходимостиковки, о чем свидетельствуют и данные литературы [3]. Это наиболее характерно для лошадей, передвигающихся по дорогам с песчаным и гравийным покрытием, а также в зимний период.

Вместе с тем, чаще лошади применялись только в светлое время суток на от-

дельных участках Государственной границы, т.к. не весь участок Государственной границы пограничной заставы оборудован тропами для верховых лошадей, а применение лошадей на необорудованных тропах затрудняет их передвижение и может привести к травматизму как лошадей, так и военнослужащих. В дальнейшем необходимо предусмотреть оборудование по всему участку пограничной заставы троп для верховых лошадей как вдоль линии Государственной границы (на наиболее вероятных маршрутах движения нарушителей границы), так и в тылу участка в пределах пограничной полосы. Это позволит применять лошадей по всему участку и в светлое, и в темное время суток.

Из ветеринарно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий за время проведения эксперимента в отношении лошадей было выполнено следующее.

В Полоцком пограничном отряде проходит ежегодная вакцинация против бешенства и сибирской язвы; два раза в год – дегельминтизация; в весеннее-летний период – обработка против кровососущих насекомых; в зимний период – витаминизация; два раза в год – дезинфекция мест содержания, снаряжения и предметов ухода. Также ежеквартально осуществлялись расчистка и обрезка копыт.

В Гродненской пограничной группе проводится ежегодная вакцинация лошадей против бешенства; ежеквартальная дегельминтизация; в весеннее-летний период – обработка против кровососущих насекомых; в зимний период – витаминизация. Кроме того ежеквартально осуществлялись расчистка и обрезка копыт, что отмечается и в литературе [5].

Из анализа заболеваемости лошадей, используемых в эксперименте, следует, что большая часть регистрируемых болезней приходилась на заболевания конечностей и копыт.

В Полоцком пограничном отряде у всех лошадей отмечались такие заболевания, как трещины копыт, наминка подош-

вы копыта, потертости или раны в области холки. Кроме того, у одной из лошадей отмечалось проявление хронической бронхиальной астмы, возникающей периодически,

в результате физических нагрузок, а также воспаление околушных лимфоузлов, которое носило сезонный характер.

В Гродненской пограничной группе основными болезнями лошадей были бурсит, асептическое воспаление венчика, тендовагинит переднего скакательного сустава, синовит. Помимо этого у одной лошади имели место кишечные колики.

Четкой взаимосвязи между сезонами года и заболеваемостью лошадей в ходе эксперимента не установлено. В то же время основная заболеваемость приходилась на весенне-летний период, что вероятней всего связано с повышенной интенсивностью использования лошадей в данный период.

При проведении лечения больных лошадей им также назначалось и диетиче-

ское кормление, что рекомендовано и в литературе [4].

ВЫВОДЫ

1 Эффективность применения лошадей очевидна на труднодоступных и непроходимых участках Государственной границы.

2 Полученные результаты указывают на перспективу применения лошадей в охране Государственной границы в органах пограничной службы Республики Беларусь и требуют организации создания современной научно-методической базы для соответствующей подготовки как организаторов пограничной службы, так и кавалеристов, изучения целого ряда проблем и направлений, связанных с содержанием и сбережением служебных животных.

3 Четкой взаимосвязи между сезонами года и заболеваемостью лошадей не установлено. Основными заболеваниями лошадей являются болезни конечностей и копыт.

ЛИТЕРАТУРА

1 Жалдыбин, В.В. Коневодство, исторический опыт развития, состояние и перспективы применения лошадей в Республике Беларусь / В.В. Жалдыбин, А.Ю. Финогенов // *Международный научно-практический журнал «Экология и животный мир»*. – 2011. – №2. – С. 15–19.

2 Афанасьев, П.Е. Седлай коня: учебное пособие / П.Е. Афанасьев [и др.]. – М.: Граница, 1993. – 247 с.

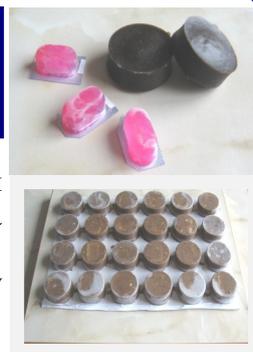
3 Зубко, В.Н. Ковка лошади: учебник / В.Н. Зубко, Ю.Ф. Вершинин. – М.: Воениздат, 1972. – 95 с.

4 Ионов, П.С. Основы диетического кормления больных лошадей / П.С. Ионов. – М.: Воениздат, 1946. – 111 с.

5 Шакалов, К.И. Болезни конечностей лошадей / К.И. Шакалов. – М.: Печатный двор. – 1949. – 423 с.

ПРИМАНКА ВАКЦИНОСОДЕРЖАЩАЯ АНТИРАБИЧЕСКАЯ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ДИКИХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ

- ⇒ применяется в осенне-зимний и зимне-весенний периоды: образцы раскладываются в местах обитания животных в количестве из расчета 15–20 штук на 1 км²;
- ⇒ в течение 25–30 суток после поедания вызывает у животных выработку иммунитета к бешенству, который сохраняется до 1 года.



Дудин В.И., доктор биологических наук*

Ушаков А.С., кандидат биологических наук*

Гришук С.В., кандидат биологических наук, доцент**

*ГНУ ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных, г. Боровск

**УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно

α-ТОКОФЕРИЛХИНОН, НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО РЕГУЛЯЦИИ БРОЖЕНИЯ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (ОБЗОР)

Резюме

*В предлагаемом обзоре литературы рассмотрены вопросы теоретически возможных предпосылок участия α-токоферилхинона (EPI-A0001), являющегося продуктом свободно радикального окисления α-токоферола (витамин E), в биологических объектах: в частности в процессах ферментации углеводов за счет дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* или в процессе гликолиза в организме млекопитающих животных. Определена точка приложения α-токоферилхинона в качестве эффектора нерепрессируемой алкогольдегидрогеназы I при ферментативном распаде глюкозы. Предложена авторская точка зрения по вопросу о биологической функции α-токоферола и α-токоферилхинона у млекопитающих животных.*

Summary

*In the proposed review of the literature reviewed issues theoretically possible prerequisites for the participation of α-tocopherylquinone (EPI-A0001), which is the product of free radical oxidation of α-tocopherol (vitamin E) in biological objects, in particular in the processes of fermentation of carbohydrates by yeast *Saccharomyces cerevisiae* or in the process of glycolysis in mammals animals. A point of application of α-tocopherylquinone as effector depression alcohol dehydrogenase I enzymatic glucose decomposition. The author's point of view on the question of the biological function of α-tocopherol and α-tocopherylquinone in mammals.*

Поступила в редакцию 08.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

К началу 20-х годов XX в науке уже были известны несколько витаминов. Их добавление к получищенным рационам приводило к удовлетворительным результатам, однако часто животные страдали нарушениями функции размножения. В 1922 году Ивенс и Бишеп опубликовали ряд работ, в которых продемонстрировано существование жирорастворимого фактора, присутствующего в зародышах пшеницы, салате латук и в муке из люцерны, который был способен предотвращать гибель и рассасывание плодов у беременных крыс и который в 1936 году получил название витамина E [1]. Активностью витамина E обладает целый ряд веществ (α-, β-, γ-, δ-токоферолы и α-, β-, γ-, δ-токоориенолы). α-Токоферол является не

только самым активным, но и самым распространенным в природе витамином E.

Несмотря на почти 100-летнюю историю изучения функции витамина E, она до сих пор доподлинно не установлена. Наиболее продвинутой выглядит антиоксидантная гипотеза, которая впервые была предложена американским химиком Таппелем [2]. По химическому строению токоферолы являются фенольными антиоксидантами, поэтому антиоксидантная гипотеза механизма их действия в отсутствие общепризнанной точки зрения кажется наиболее предпочтительной, несмотря на критику, оставшуюся в прошлом практически без ответа. Изначально было установлено, что дефицит витамина E приводит к гибели и рассасыванию эмбрионов у беременных крыс. В то же вре-

мя парентеральное введение α -токоферилхинона, являющегося продуктом окисления α -токоферола, тоже вызывает гибель и рассасывание эмбрионов у мышей. Сложилось представление о том, что α -токоферилхинон является антивитамином Е. Эта точка зрения господствовала в науке довольно долго, пока не стало известно, что α -токоферилхинон восстанавливается в дыхательной цепи митохондрий у животных, и, таким образом, он может выступать в качестве одного из сильнейших биологических антиоксидантов.

Из неантиоксидантных объяснений было предложено, что хронический дефицит витамина Е за счет снижения активности регуляторных ферментов биосинтеза гема приводит к снижению активности гем-содержащих ферментов [3]. Кроме того, дефицит витамина Е существенно снижает в периферийной крови число Т-клеток-помощников и соответственно их соотношения с Т-клетками-супрессорами [4]. В опыте на цыплятах мы обнаружили, что отсутствие витамина Е в рационе ведет к нарушению закономерностей роста, характеризующимся усилением его относительной скорости в период от 2-х до 4-х недельного возраста, как результат гиперреакции, возникающей вследствие дефицита витамина Е в период до 2-недельного возраста. При этом нормализация процессов роста зависит от добавок препарата витамина Е, но не синтетического антиоксиданта, что хорошо объясняется степенью удовлетворенности потребности в витамине Е у цыплят до 2-недельного возраста, более высокой, чем в последующий период. Эти материалы не позволяют заключить, насколько близко витамин Е стоит к механизмам гиперреакции или к поддержанию кривой роста в норме, но то, что он обладает специфической жизненно важной функцией, эти сведения подтверждают однозначно [5].

Ни α -токоферилхинон, ни его гидрохинон в заметных количествах не превращаются в тканях животных в α -токоферол [6]. Может быть это связано с тем, что у

животных концентрация α -токоферилхинона в тканях находится на невысоком уровне. Считается, что у животных α -токоферилхинон образуется, в основном, в свободно радикальных процессах [7, 8]. У растений это происходит двумя путями, один из которых лежит через α -токоферол [9], а другой связан с синтезом продукта *denovo* [10]. В ряде работ сообщено о нетокоферольном происхождении большей части α -токоферилхинона в интактных растительных тканях на основании того, что свет эффективно стимулирует синтез α -токоферилхинона у *Euglenagracilies*, кукурузы и ячменных ростках, тогда как на уровень α -токоферола он влияет незначительно. В растительном мире биосинтез производных α -токоферола определяется функциональной активностью хлоропластов. В этой связи α -токоферол и α -токоферилхинон могут проникать в дрожжевую клетку по мере поступления в нее питания. α -Токоферилхинон и α -токоферилгидрохинон обнаружены в 56 из 93 обследованных штаммов микроорганизмов [11]. Организмы, которые содержат эти соединения, включают редкие виды эукариотических морских представителей (синезеленые водоросли). У бактерий и дрожжей уровни α -токоферилхинона и его гидрохинона примерно одинаковы и составляют 3 н-моль на 1 г клеток. α -Токоферилхинон может выполнять функцию синергиста витамина Е за счет того, что он восстанавливается в дыхательной цепи, хотя неизменно участником классической электронно-транспортной системы он не является, так как его восстановление не ингибируется ротеноном или антимицином А. Широкое распространение α -токоферилхинона подтверждает его возможное участие во многих других окислительно-восстановительных циклах. Это согласуется с тем, что α -токоферилхинон активно восстанавливается в присутствии НАДН или НАДН-генерирующих веществ. Таким образом, α -токоферилхинон может участвовать в метаболизме дрожжей, обуславливая его широкое распространение в при-

роде. У большинства микроорганизмов, в том числе у дрожжей, внутреннее осмотическое давление весьма небольшое, 3–6 атмосфер, что определяет высокую проницаемость его клеточной мембраны, осмотический тип питания и интенсивное протекание метаболических процессов [12].

Поводом для наших последующих исследований явились убедительные сведения о том, что в рубце жвачных животных происходит усиление окисления α -токоферола при увеличении включения в рацион легкоусвояемых углеводов. Помимо этого витамин Е предложен в качестве лечебного средства при кетозах молочных

коров [13]. Лечение коров в течение 3–8 дней приводит к исчезновению кетоновых тел из мочи. В связи с тем, что α -токоферилхинон вполне может играть важную роль в метаболизме глюкозы, мы провели предварительные исследования на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Поскольку дрожжи с их хорошо изученной генетической системой обладают чертами, характерными для эукариотических клеток, они могут служить идеальной моделью для изучения регуляторных систем клеток животных и человека, в отличие от классического объекта клеточной биологии – *E. coli*, являющейся прокариотом [14].

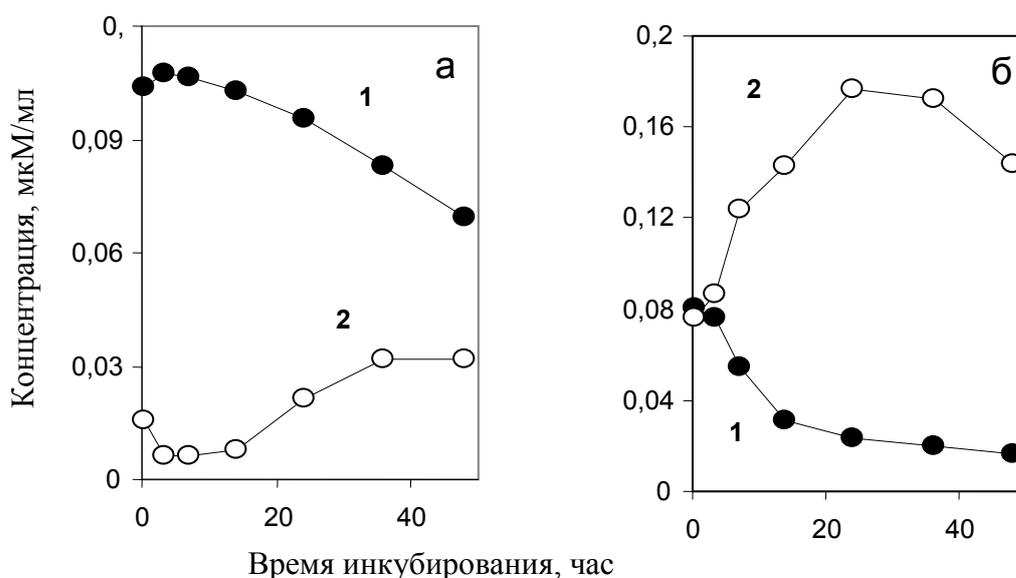


Рисунок 1 – Распределение введенного в инкубационную среду аутэнтичного α -токоферилхинона, между оставшимся в среде (1) и появляющимся в осадках (2) при использовании в качестве субстрата глюкозы (а) или пирувата (б) в зависимости от времени инкубирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

При использовании D-глюкозы в качестве субстрата для брожения проникновение α -токоферилхинона из среды в клетки дрожжей происходит менее интенсивно, чем в случае пирувата, когда этот переход α -токоферилхинона из среды в клетки был куда более интенсивным. Мы не обнаружили в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* α -токоферола или других его природных производных.

Однако, когда мы в процессе опытов вводили в нее аутэнтичный α -токоферил-

хинон, мы наблюдали синтез из него неполярного α -токоферилхинона, являющегося дезокси- α -токоферилхиноном, объем удерживания которого при выбранных нами условиях высокоэффективной хроматографии составляет 398 мкл против 900 мкл у аутэнтичного α -токоферилхинона [15]. Это производное α -токоферола тоже, как и исходное, может восстанавливаться в тканях в присутствии НАДН или НАДН-генерирующих веществ (рисунок 2). Этот метаболит витамина Е поступает в клетки из нату-

рального растительного сырья, в частности на начальных этапах аэробного разло-

жения силоса, протекающего за счет дрожжей.

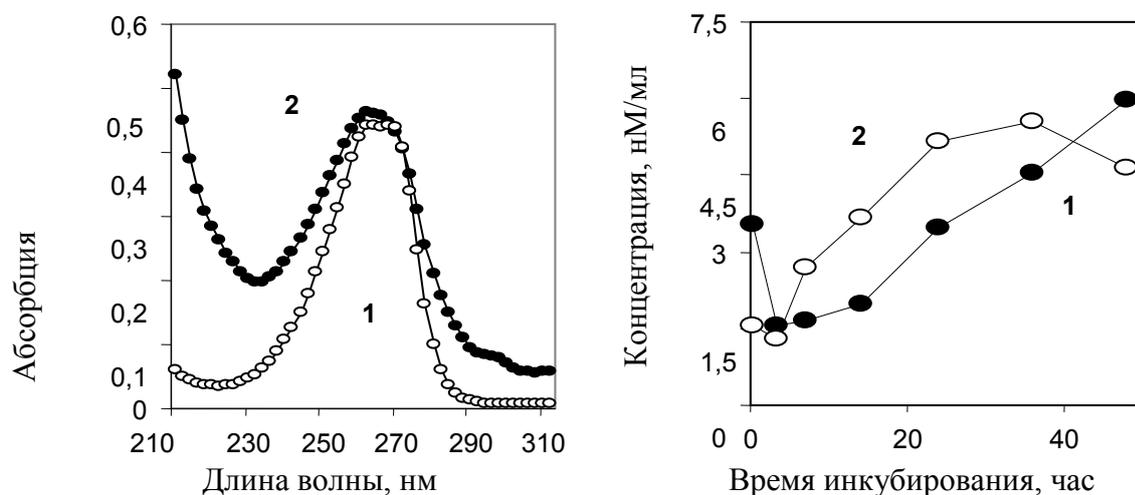


Рисунок 2 – УФ-спектры аутэнтичного α -токоферилхинона (1) и дезоксиальфа-токоферилхинона (2) в остановленном потоке элюента (слева); концентрация дезокси-альфа-токоферилхинона в осадках при использовании субстрата глюкозы (1) или пирувата (2) при добавках в среду α -токоферилхинона в зависимости от времени инкубирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (справа)

Возможно из-за того, что мы работали на обедненных питательных средах, активность синтезов в дрожжевых клетках вообще находилась на пониженном уровне, а синтез аутэнтичного α -токоферилхинона в заметных количествах не осуществлялся. Тот факт, что α -токоферилхинон в случае инкубирования дрожжей в смеси с глюкозой в качестве субстрата проникает в дрожжевые клетки гораздо менее интенсивно, чем в случае с пируватом, может свидетельствовать о том, что синтез соединения сдвинут в конец ферментативной последовательности. В целом, E-витаминная активность дрожжей может проявляться за счет ресурсов внешней среды, что может послужить основой для обсуждения этого аспекта дрожжевого действия.

В исследованиях мы обычно используем коммерческие сухие пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, являющиеся продуктом мирового лидера в этой области – фирмы LESAFFRE (Франция).

Мягкое окисление перекисью водорода сульфгидрильных групп активных центров фосфорилирующей D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД, КФ 1.2.1.12) ведет к снижению дегидрогеназной и к появлению ацилфосфатазной активностей, что в итоге ускоряет гликолиз в связи с обходом фосфоглицераткиназной реакции, которая сопровождается пониженным выходом АТФ [16]. Окисление сульфгидрильных групп в активных центрах ГАФД может происходить в результате взаимодействия с окисью азота, а ускорение гликолиза происходит и в случае замены фосфата на арсенат [17]. Арсенат подобно фосфату образует промежуточное соединение с фосфоглицериновым альдегидом, но продукт окисления, содержащий арсенат, в отличие от 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, быстро расщепляется в водном растворе, поэтому для арсената необходимость в акцепторе не возникает.

В наших исследованиях окисленные дрожжи ускоряют образование пирувата, но только под влиянием α -токоферилхинона. В этих опытах ГАФД мы не выделяли, и в таком случае ускорение брожения не связано с активностью фермента. Речь идет о специфическом влиянии α -токоферилхинона, которое может быть обеспечено за счет ферментативной активности

дрожжевой нерепрессируемой глюкозой алкогольдегидрогеназы (АДГ). Судя по полученным данным, образование пирувата из глюкозы в случае окисленных сухих дрожжей происходит с большей скоростью, чем в сухих свежих дрожжах (рисунок 3). Использование пирувата в качестве исходного субстрата вместо глюкозы в случае окисленных дрожжей также ускоряется.

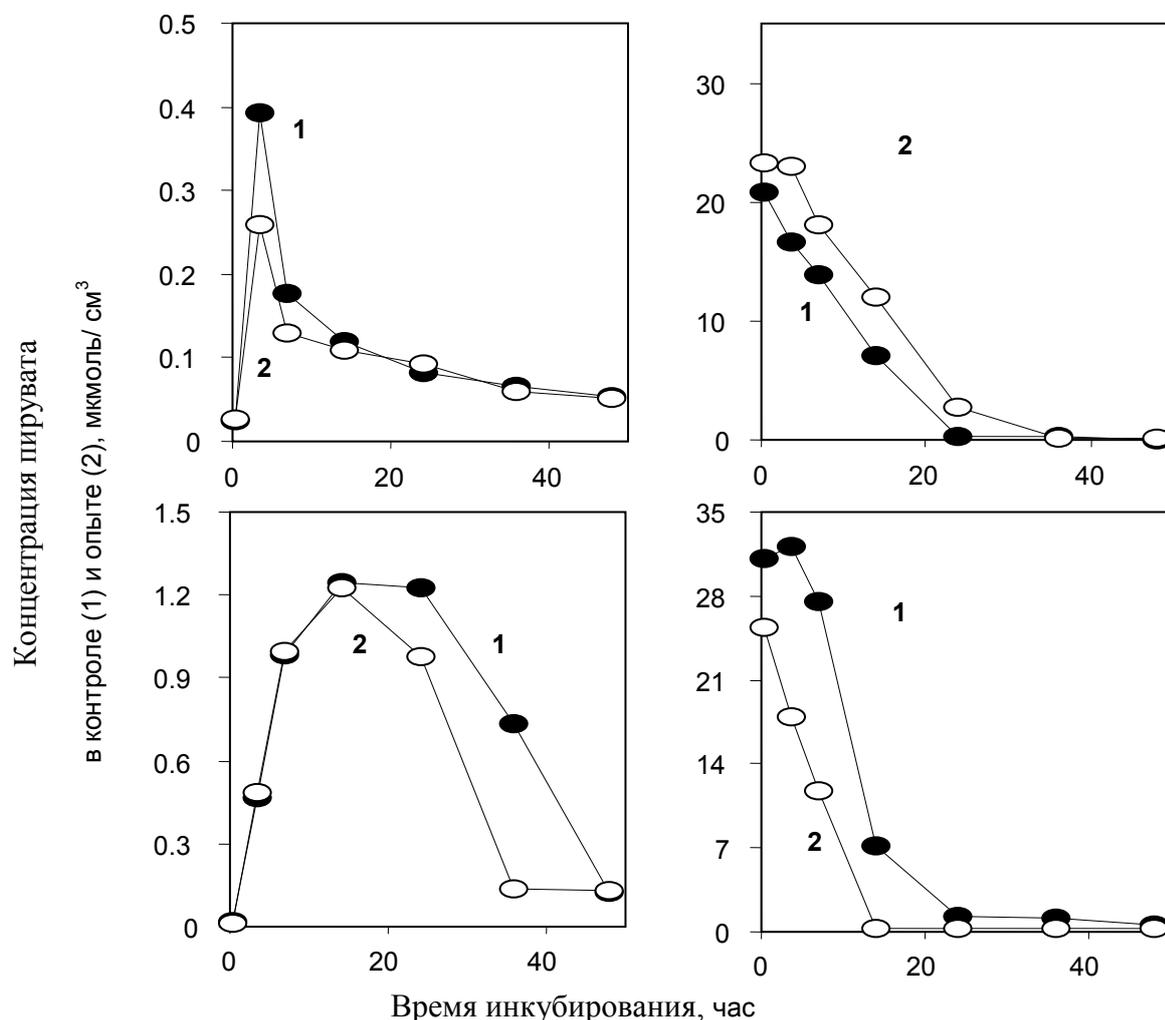


Рисунок 3 – Концентрация пирувата в среде с глюкозой (слева) и пируватом (справа) для сухих свежих (вверху) и подвергнутого длительному хранению в кислородных условиях (внизу) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в связи со временем инкубирования (1 – без введения; 2 – с введением в среду α -токоферилхинона)

На следующем этапе мы изучали влияние α -токоферилхинона на процесс сбраживания глюкозы сухими пекарскими дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* при включении в инкубационную среду НАД+

[18]. Введение в питательную среду НАД+ приводит к тому, что концентрация глюкозы по позициям глюкоза–пируват–ацетальдегид оказывается гораздо большей, чем при добавке в среду α -токофе-

рилхинона. Эти сведения по сумме 3-х первых экспозиций, по концентрациям глюкозы и ацетальдегида в среде статистически достоверны ($34,82 \pm 1,14$ против $40,38 \pm 0,8$ мкмоль/см³ в НАД-контроле для глюкозы и $0,768 \pm 0,050$ против $1,129 \pm 0,046$ мкмоль/см³ в НАД-контроле для ацетальдегида). Таким образом, ускорение сбраживания D-глюкозы дрожжами под действием α -токоферилхинона подтверждается.

Алкогольдегидрогеназа (АДГ) дрожжей (алкоголь : НАД⁺ -оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.1) представляет собой тетрамер с молекулярной массой 150 кДа, содержащий 8 ионов цинка. В активный центр каждой субъединицы входит 2 иона цинка, один из которых необходим для выполнения каталитической функции, другой – для поддержания конформации АДГ. После удаления ионов цинка фермент теряет способность к кооперативному разворачиванию [19]. В присутствии НАД⁺ связь между мономерами упрощается, в то время как НАДН прочность этой структуры ослабляет. Все изоферменты содержат одинаковое количество цинка.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* имеют 3 генетических локуса, кодирующих различные изоферменты АДГ: АДС1-ген, который кодирует классический не репрессируемый конститутивный изофермент АДГ1; АДР2-ген, который кодирует репрессируемый глюкозой изофермент АДГ2 и АДМ-ген, который кодирует репрессируемый глюкозой митохондриальный изофермент АДГ3 [20]. Когда дрожжи выращиваются на глюкозе, экспрессируется ген АДС1, а ген АДР2 репрессируется и наоборот – рост на неферментируемом источнике углерода, таком как этанол или глицерол, проявляется в дерепрессии АДР2 и в репрессии АДС1. При выращивании дрожжей в периодическом режиме запас глюкозы истощается и рост дрожжей останавливается, но затем после лаг-периода вновь возобновляется. В течение этого периода времени дрожжевые клетки синтезируют ферменты, необ-

ходимые для аэробной утилизации накопившегося этанола. Фруктозо-1,6 бисфосфатаза, катализирующая финальную стадию глюконеогенеза, и алкогольдегидрогеназа (АДГ2), находящаяся в цитозоле у дрожжей, согласованно репрессируются аэробным ростом дрожжей при добавлении высоких уровней глюкозы и стимулируются в минимальной среде при добавках экстракта дрожжей. Ферментируемые сахара, если их добавить к клеткам *Saccharomyces cerevisiae*, растущих на не ферментируемых источниках углерода, являются причиной репрессии синтеза некоторых ферментов (катаболитная репрессия), меньшая группа ферментов инактивируется (катаболитная инактивация). Ниже перечислены ферменты, подверженные катаболитной инактивации: это цитоплазматическая малатдегидрогеназа, аминопептидаза I, фруктозо-1,6-бисфосфатаза (ФВР-аза), фосфоенолкарбоксикиназа, изоцитратлиаза. За исключением аминопептидазы I, это ключевые ферменты глюконеогенеза у *Saccharomyces cerevisiae*. Механизм катаболитной инактивации имеет протеолитическую природу. У штамма дрожжей, устойчивых к глюкозной репрессии, одновременно изменяли ферментативные и окислительные свойства. Потеря дрожжами АДГ1 и суперпродукция ими цитохрома $a+a_3$ делают их нечувствительными к действию глюкозы. При этом развивается поток вторичных электронов. Антимидин А усиливает частичное ингибирование окисления НАДН, при полном ингибировании фосфорилирования. Амитап частично ингибирует окисление НАДН, но не фосфорилирование. KCN угнетает окисление НАДН двухфазным путем (первая фаза на уровне 0,1 мМ, вторая – на уровне 5 мМ), причем фосфорилирование ингибируется полностью. Эти результаты поддерживают уверенность, что имеет место существование у штамма альтернативного митохондриального пути, идущего от внешней НАДН-дегидрогеназы к оксидазе, отличающейся от нормальной НАДН-дегидрогеназы убихинонового пути. Катаболитная

репрессия является универсальным явлением, найденным во всех живущих организмах. Механизм включает циклическую АМФ и его рецепторный протеин и был обнаружен у *E. coli*, в ней этот механизм признан в качестве прототипа феномена катаболитной репрессии для любых организмов [21].

В наших опытах первый максимум ацетальдегида проявляется в результате образования этанола в процессе ферментации D-глюкозы (рисунок 4, слева). Влияние α -токоферилхинона на этой стадии

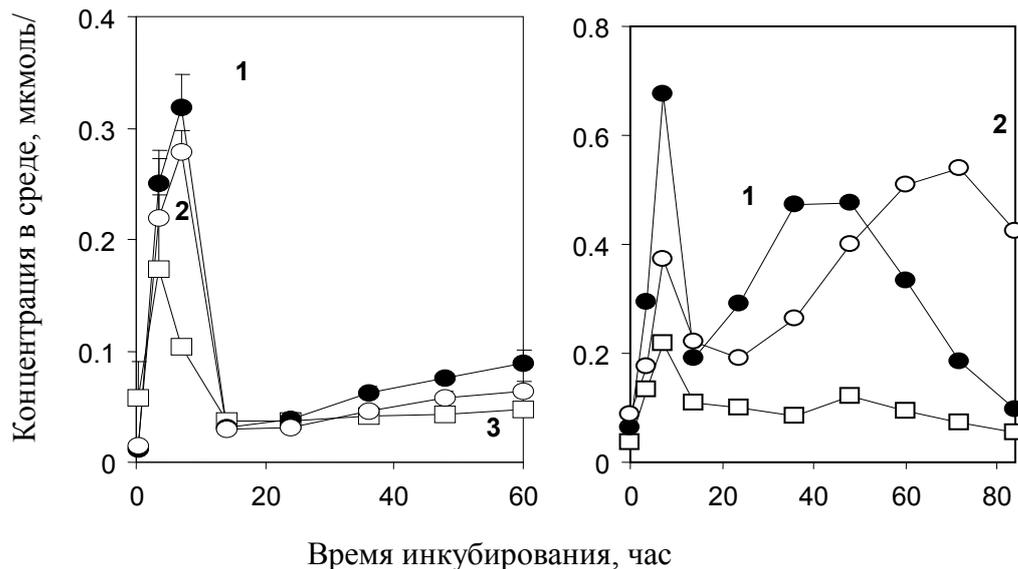


Рисунок 4 – Динамика концентрации пирувата (слева) и уксусного альдегида (справа) при инкубировании с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* штамма S11M (FXV) в среде с D-глюкозой (1–базовый состав+НАД⁺; 2–базовый состав+НАД⁺+ α -токоферилхинон; 3–фон, без добавок НАД и α -токоферилхинона)

Введение α -токоферилхинона в среду вызывает увеличение лаг-периода для синтеза репрессируемого глюкозой фермента АДГII. Интерес представляет лаг-период, вполне возможно, что он сочетанно регламентируется глюкозой и кислородом, а не только глюкозой. Лаг-период начинается гораздо позже, чем уровень глюкозы выходит на очень низкие концентрации гексоз в среде.

Во многих организмах кислород окружающей среды способствует дыханию, в то время как потеря кислорода усиливает гликолиз (эффект Пастера). Во многих случаях глюкоза сама по себе мо-

оказывается самым сильным и проявляется в статистически достоверной депрессии АДС1, гена кодирующего изофермент АДГI. Второй максимум повышения концентрации уксусного альдегида при добавлении в среду НАД⁺ без добавок α -токоферилхинона (рисунок 4, справа) объясняется аэробной утилизацией этанола, накопившегося в процессе сбраживания глюкозы при окислении этанола в ацетальдегид за счет НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы (АДГII).

жет подавлять дыхание (эффект Кребтри). Недавно, на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, стало известно, что в пролиферирующих клетках проявляется эффект беспрецедентного подавления дыхания кислородом и глюкозой [22]. В этой связи обнаружена новая роль старого антиокислительного фермента (Cu/Zn-зависимая супероксиддисмутаза), который предотвращает деструкцию двух гомологичных казеинкиназ СК1 γ , необходимых для подавления дыхания, происходящего за счет превращения супероксида в перекись. Эти результаты подтверждают, что супероксиддисмутаза действует как коор-

динатор интеграции O₂, глюкозы и супероксида в энергетический метаболизм. При этом стабильность дрожжевого и человеческого ферментов СК1γ также регулируется супероксиддисмутазой.

С недавних пор метаболизм опухолевых клеток стал рассматриваться в качестве возможной цели для терапии рака. Общепризнано, что опухоли проявляют повышенную гликолитическую активность и связаны с нарушениями окислительного фосфорилирования (эффект Варбурга). Поэтому кажется разумным, что нарушения гликолиза могут служить перспективной основой для разработки конкретных методов противораковой терапии. Тем не менее, взятие за основу концепции аэробного гликолиза в качестве парадигмы метаболизма опухолевых клеток была поставлена под угрозу, поскольку некоторые опухолевые клетки обладают высокой скоростью окислительного фосфорилирования. Центральная роль в процессах апоптоза делает митохондрию перспективной для избирательного удаления опухолевых клеток. С метаболической точки зрения брожение дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеет ряд особенностей, связанных с эффектами Кребтри и Варбурга.

В 30-х годах прошлого столетия Нойбергом и Кобелем был описан четвертый тип брожения, который наблюдается при применении высушенных препаратов или бесклеточных экстрактов дрожжей. При этом типе брожения накапливается пировиноградная кислота и глицерин. В этой связи мы изучали поведение характеристик брожения без добавок и с добавками ингибитора дыхания – азида натрия. Использование дыхательных ядов брожения не останавливает, но существенно его видоизменяет. Наши исследования показали, что при отравлении дрожжей азидом натрия образование пирувата минимально при нормальных значениях образования ацетальдегида. Таким образом, примененные нами сухие дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, как объект дыхания, жизнеспособность свою сохраняют.

Дискуссия по поводу механизма действия витамина Е у млекопитающих животных ведется уже давно. Теперь поиск перешел на выяснение биологической функции продукта его первичного окисления в свободнорадикальных процессах, каковым является α-токоферилхинон. В рубцовой анаэробной микрофлоре присутствует бактерия *Butyrivibrio fibrisolvens*, в которой найден α-токоферол. Кроме α-токоферола в бактерии обнаружен α-токоферилхинол, который может служить донором электронов, выступающим в качестве кофактора, участвующего во второй стадии биогидрогенизации линолевой кислоты (гидрогенизация в транс-11-октаде-ценоат). На первом этапе он изомеризуется в цис-9, транс-11-октаде-кадиеновую кислоту (руменовая кислота). Таким донором оказался полу-α-токоферилгидрохинон (рисунок 5). Помимо этого, экстракт из бактерии *Butyrivibrio fibrisolvens* содержит 2- [3, 7, 11, 15-тетраметил-бензохинолгекса-децил] -3, 5, 6-триметил-бензохинол, который является дезокси-α-токоферилгидрохиноном и может служить альтернативным донором электронов при биогидрогенизации линолевой кислоты [23]. Неполярный α-токоферилхинон мы нашли в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* после введения в питательную среду аутэнтичного α-токоферилхинона (рисунок 2).

Иная функция, кроме участия в биогидрогенизации линолевой кислоты, для α-токоферилхинона состоит в его участии в качестве кофактора митохондриальной десатуразы. Ее дефицит ведет к недостаточности полиеновых жирных кислот, таких, как C22: 4(n-6) и C22:6(n-3) [24]. Перенос электронов, изначально происходящих из НАДН, протекает от цитохрома b5 к десатуразе и к 2-м молекулам α-токоферилхинона через ФАДН2 и к железо-серным или железо-селеновым кластерам с помощью механизма, подобного тому, который существует у НАДН-зависимой убихинонредуктазы дыхательной цепи (рисунок 6).

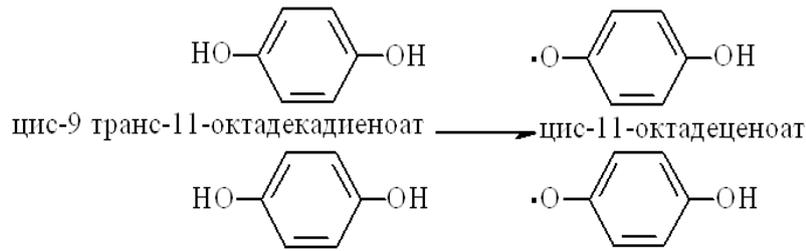


Рисунок 5 – Участие α -токоферилхинола в биогидрогенизации линолевой кислоты в рубцовой бактерии *Butyrivibrio fibrisolvens* в качестве кофактора редуктазы cis-9, транс-11 – октадекадиеноата (Hughes P.E., Hunter W.J., Tove S.B., 1982)

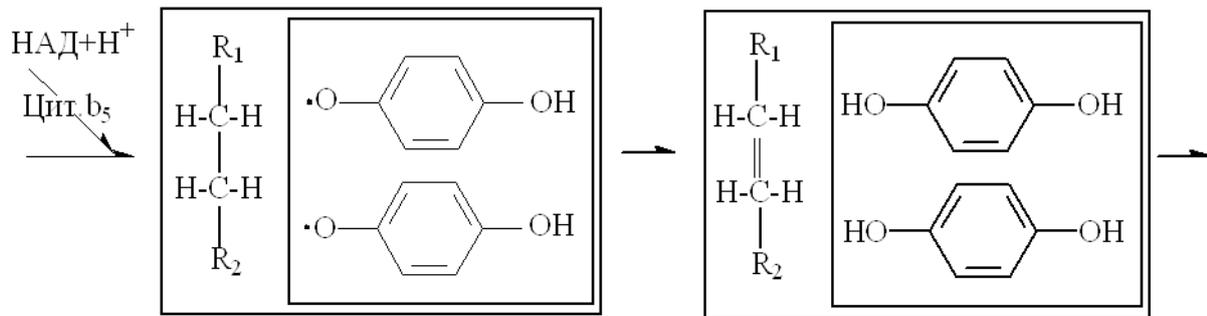


Рисунок 6 – Участие α -токоферилхинола в качестве кофактора митохондриальной десатуразы у млекопитающих животных (Infante J.P., 1999)

Семихиноновые радикалы α -токоферилхинона активны и легко протонируются за счет углеродной цепи по предлагаемой автором схеме. Этот процесс им предложен в качестве универсального, в том числе для млекопитающих животных.

Из исследований, проведенных нами, следует, что при включении в инкубационную смесь α -токоферилхинона на фоне добавок НАД⁺ статистически достоверно снижается образование первого максимума ацетальдегида, проявившегося

в процессе анаэробного сбраживания глюкозы (рисунок 7). Второй максимум ацетальдегида обусловлен утилизацией этанола, которая наступает после лаг-периода, необходимого для биосинтеза аэробных ферментов. Как мы уже сообщали, больше всего известно об антиоксидантной роли витамина Е, который защищает молекулы и ткани от разрушения свободными радикалами. При этом витамин Е вмешивается в регуляцию ряда ферментов, вполне возможно за счет влияния на экспрессию генов.

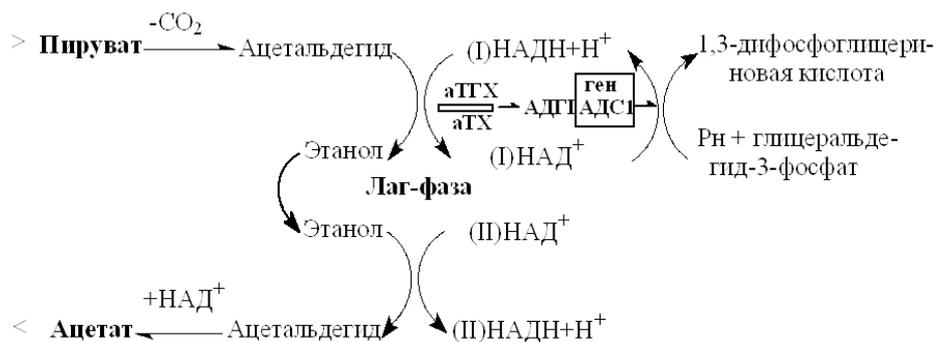


Рисунок 7 – Предполагаемое участие α -токоферилхинона в поддержании активности алкогольдегидрогеназы I в процессе распада глюкозы (*Saccharomyces cerevisiae*)

Гетерогенность медиаторов для проявления действия α -токоферола на экспрессию генов подтверждает необходимость в общих элементах, ими могут быть рецепторы или корецепторы, способные взаимодействовать с токоферолом и факторами транскрипции, указывающими специфическую зону промоторных последовательностей чувствительного гена. α -Токоферол способен выступать в качестве лиганды, однако пока не определены специфические белки, способные регулировать сигнал трансдукции и экспрессии генов [25]. Исследования последнего десятилетия указывают на серьезную поддержку специфической роли α -токоферола в сигнализации и регуляции экспрессии генов. Он оказывает существенное воздействие на воспаление, клеточную пролиферацию и апоптоз. Эти свойства α -токоферола отличаются от свойств всех других токоферолов и токотриенолов. Таким образом, в литературе постепенно развивается генетическое направление исследований в отношении витамина E и его производных.

Кроличьи антитела к НАДН-зависимым ферментам, таким как лактатдегидрогеназа и дрожжевая алкогольдегидрогеназа, ингибируют активность других, не имеющих к ним отношения дегидрогеназ (например, малатдегидрогеназы) в зависимости от концентрации антител и от времени измерения активности. У каждого из этих ферментов антигенная зона находится вблизи от НАДН-связывающего локуса. При изучении связывания нуклеотидного кофермента НАД⁺-зависимой дрожжевой алкогольдегидрогеназой и свиной сердечной лактатдегидрогеназой в обоих случаях степень конформационных изменений, оцененная по задержке скорости обмена протона и дейтерия, была выше для НАД⁺ по сравнению с НАДН [26].

В наших опытах добавки в среду НАДН по сравнению с добавками НАД⁺ резко уменьшают концентрацию пирувата в начале инкубирования с сильным ее нарастанием сутки спустя, причем это увеличение (аэробный гликолиз) в присутст-

вии α -токоферилхинона было на 27% еще более выраженным [15].

Изучение метаболизма ретиноидов привело к идентификации многочисленных ретиноидных дегидрогеназ, которые способствуют метаболизму различных изомеров ретиноидов, приводящему к синтезу их активных форм. Эти ферменты распадаются на три больших семейства. Дегидрогеназы катализируют реверсибельное окисление/восстановление ретинола и ретиналя, являются либо членами семейства алкогольдегидрогеназ, либо членами семейства короткоцепочковых дегидрогеназ/редуктаз, тогда как дегидрогеназы, катализирующие окисление ретиналя в ретиноевую кислоту, относятся к семейству альдегиддегидрогеназ. Компиляция известных ретиноидных дегидрогеназ выявило существование 17 форм ферментов. В частности, экстрагепатический изофермент алкоголь-дегидрогеназы АДГ4 участвует в биохимической судьбе этанола в сопряжении с метаболизмом ретинола. АДН1 и АДН4 активно снижают содержание 4-гидроксиксоненаля, 2-гексенала и гексаналя, которые являются токсикантами, образующимися в процессе липидной пероксидации, в то время как АДН3 в отношении этих альдегидов проявляет слабую активность. Для АДН4 известна роль, заключающаяся в обезвреживании цитотоксических альдегидов в тканях, способных к перекисному окислению: кожа, роговица, мукоза дыхательных путей в местах, где этот фермент локализуется. Окисление омега-гидрооксикислот для фермента АДН3 крыс является физиологической функцией, кроме того у этого фермента остается также способность, определяющаяся его свойствами формальдегиддегидрогеназы. Класс АДН4 играет решающую роль в синтезе ретиноевой кислоты в эпителии, где это вещество включается в рост и в дифференцировку клеток. Таким образом, алкогольдегидрогеназа является ферментом с несколькими функциями, что обеспечивается вариабельностью его специфичности и особенностями его между тканевой локализации. Пече-

ночная АДГ1 является одной из первых идентифицированных ретиноидных дегидрогеназ, катализирующих в НАД-зависимой реакции превращение ретинола в ретиналь. Человек обладает тремя изоформами АДГ1 (АДГ1А, В и С). Очищенные крысиная АДГН1 и человеческая АДГ1А катализируют окисление полностью транс-ретинола, тогда как другие изоформы АДГ1 человека обладают меньшей активностью. Истинные физиологические субстраты этого фермента неизвестны, но он эффективно катализирует не только взаимопревращение полностью транс-ретинола и полностью транс-ретиноля в соответствующие производные, но также окисление полностью транс-ретиноля в полностью трансретиновую кислоту. Ретинальдегид и другие производные витамина А играют фундаментальную роль во многих процессах, особенно в процессе зрения. Ретиновая кислота используется в дерматологии для предотвращения различных форм рака. Было подтверждено, что состояние гидридного переноса обременено частичным отрицательным зарядом на кислороде ретинолоксида. Спектральные доказательства для интермедиатов, таких как Е-НАД (+)-ретинолоксид, были получены с энзимом, в котором активный центр цинк (II) был замещен кобальтом (II). Тройной комплекс образуется в процессе реакции бинарного комплекса фермента Е-НАД (+) с ретинолом (витамин А спирт) и ведет к образованию ретиноля (витамин А альдегид), освобождая фермент с бинарной структурой Е-НАДН. Ретинальдегид в дальнейшем метаболизируется через тройной комплекс Е-НАД(+)-ретиналь в ретиновую кислоту (витамин А кислота) [27].

Патология алкогольного поражения печени развивается при отсутствии недостаточности питания. Токсичность спирта объясняется действием НАД-зависимой дегидрогеназы, превращающей НАД+ в НАДН, что сопровождается гипохлоремией, гипогликемией, печеночным стеатозом с ингибируемым окисления липидов и уси-

лением липогенеза. Авторы определили новый путь метаболизма этанола, как систему микросомального окисления. Этот путь ассоциируется с генерацией свободных радикалов, и, как следствие, ведет к усилению липидного перекисления и нарушения в мембранах вследствие истощения митохондриального глутатиона и его предшественника метионина, активированного путем синтеза S-аденозилметионина. Восстановление этих фондов сберегает функцию печени. Добавки полиенилфосфатидилхолина, смеси ненасыщенных фосфатидилхолинов, экстрагированных из соевых бобов, приводят к сохранению структуры мембран и функций соответствующих ферментов. Этанол ухудшает конверсию бета-каротина в витамин А и истощает печеночный витамин А. При этом обнаружено весьма заметное взаимное перекрывание метаболизма ретинола и алкоголя. Мыши с недостатком экспрессии альфа-рецепторов X для ретиновой кислоты (RXRальфа) в печеночной ткани чувствительны к болезни алкогольной печени. Для выяснения характера взаимодействия между рецепторами RXRальфа и болезнью алкогольной печени был изучен метаболизм этанола в гепатоцитах у дефицитных по RXRальфа рецепторам мышей. Гепатоциты с дефицитом рецепторов RXRальфа проявляют существенное повышение активности алкогольдегидрогеназы. Активности ферментов ADH2 и ADH3 не изменяются при дефиците рецептора RXRальфа. Обе активности альдегиддегидрогеназы, митохондриальная 2 и цитозольная, снижены у мутантных мышей в сравнении с диким типом. Эти результаты указывают на центральную роль рецептора RXRальфа в метаболизме этанола [28]. Взаимосвязи этанола и ретинола был посвящен симпозиум в Йокогаме (Япония) в 2000 году. На этом форуме были представлены материалы о роли витамина А, ретиновой кислоты и ретиноидных рецепторов в экспрессии алкогольдегидрогеназы. Рассматривался также вопрос неблагоприятной взаимосвязи алкоголя, витамина А и

и бета-каротина в организме животных. Этанол является ингибитором окисления ретинола в печени и толстом кишечнике крыс. Активность печеночной алкогольдегидрогеназы в отношении экзогенных субстратов после частичной гепатэктомии снижается за счет эндогенных субстратов, действующих как ингибиторы этого фермента. В связи с этим ретиноиды могут быть такими же эндогенными субстратами. Частичное ингибирование алкогольдегидрогеназы (скорее всего типа 1) представляется опосредованным через метаболизм ретиноидов в процессе печеночной пролиферации. Эти данные подтверждают роль алкогольдегидрогеназы в метаболизме ретиноидов при регенерации печени крыс [29]. Липидное перекисление, вызываемое частичной гепатэктомией, качественно зависит от субклеточных фракций, что является необходимым физиологическим сигналом для печеночной регенерации. α -Токоферол оказывает эффект ингибирования частичной гепатэктомии и снижения экспрессии циклина D1. Данные подтверждают, что индуцированные частичной регенерацией процессы могут участвовать в активации преобразователя сигнала (быстрая и очень организованная серия биохимических реакций перед клеточной пролиферацией) и активатора транскрипции факторов метаболизма в клеточном редос-статусе в процессе пролиферации клеток печени и что в этом проявляется похожесть между α -токоферолом и ретинолом в метаболизме.

Таким образом, проблема функции α -токоферилхинона у млекопитающих животных в первую очередь состоит во взаимосвязи в метаболизме этанола и витамина А. Витамин А *in vivo* действует двумя путями: абсорбция света в процессах зрения и генетическая регуляция роста и развития. Функции витамина А регулируются батареей ферментов, контролирующих превращения ретинола в активные ретиноиды, альдегиды или карбоксильные кислоты необходимые для процессов зрения или для роста и развития. Метаболитом,

необходимым для процессов зрения, является изомер 11-цис ретинола. С другой стороны, для регуляции экспрессии генов ретинол может превращаться в карбоксильную кислоту, являющуюся полностью транс-ретиноевой или 9-цис ретиноевой кислотой, которые могут быть лигандами двух семейств ретиноидных рецепторов, напрямую регулирующих экспрессию генов, в том числе рецепторов ретиноевой кислоты (RAR) и X рецепторов ретиноидов (RXR). Изучен мутант (АДГ2Pro47His), который обеспечивает в 100 раз более высокую активность в отношении ретиноидов печени человека [30]. В опыте на самцах крыс было установлено, что при дефиците α -токоферола в рационе содержание в печени н-пентанала, н-гексанала и 4-гидрокси-2-ноненала было существенно выше, чем в контроле. Эти результаты показывают, что некоторые альдегиды, возможно появляющиеся из липидных перекисей, продуцируются и обнаруживаются в плазме и печени крыс в условиях, подобных дефициту витамину Е. Авторы нашли, что активность печеночной альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3) была существенно измененной через 5 и 8 недель после начала опыта, она была наиболее низкой у крыс с дефицитом витамина Е. Снижение ферментной активности сочетается с повышением количества альдегидов, таких как н-гексаналь в печени. Количество альдегидов повышалось в плазме дефицитных по витамину Е крыс, что наводит на мысль об усилении повреждения клеток, жестком гемолизе эритроцитов крови крыс, получающих диету по витамину Е. Ацетальдегид – самый заметный метаболит этанола, который много токсичнее и реакционноспособнее, чем исходное вещество и в метаболизме он отвечает за клеточную патологию. Транс-генкодирующий человеческую альдегиддегидрогеназу-2, которая превращает ацетальдегид в ацетат, был сконструирован под цыплячьим бета-актиновым промотором и перенесен в эндотелиальные клетки человеческой пупочной вены. Линейная корреляция наблюдалась

между апоптозом и индуцированной реагирующей с кислородом генерацией клеток. Авторами представлены доказательства, что сверхэкспрессия альдегиддегидрогеназы-2 в эндотелиальных клетках человеческой пупочной вены существенно уменьшается при индуцированном ацетальдегидом оксидативном стрессе. Активация стресса и апоптоза протекают в одинаковой манере с α -токоферолом, что согласуется с терапевтическим эффектом фермента в обезвреживании ацетальдегида, ответственного за клеточные нарушения. Трансфекция альдегиддегидрогеназы 2 или антиоксидант α -токоферол (5мкг/мл) предотвращают повышение количества за счет ацетальдегида активных форм кислорода, в том и другом случае облегчается метаболизм ацетальдегида, а α -токоферол может еще уменьшать его клеточную токсичность [31].

В кормленческом опыте на крысах сравнивали влияние на активность митохондриальной альдегиддегидрогеназы 2 добавок витамина Е с добавками 3,4-дигидроксибензилгликоля и других побочных продуктов, получаемых при обработке оливок и содержащих фенольные продукты. Как оказалось, активность фермента, синтез его протеина и уровень его активности регулируются d- α -токоферолом и другими фенолами. Продукция малонового диальдегида и ответ цитозольной альдегиддегидрогеназы были определены в тканях печени крыс после кормления различными количествами витамина Е, селена и полиненасыщенного жира в течение 12–18 недель. Продукция малонового диальдегида была существенно повышена при дефиците витамина Е или при потреблении высоких уровней ненасыщенного жира, но не при дефиците селена. Активность цитозольной альдегиддегидрогеназы повышалась с увеличением продукции малонового диальдегида после 12–16 недель скормливания диеты, возбуждающей перекисидацию липидов. Несмотря на это, активность альдегиддегидрогеназы была подавлена после 38 недель скормли-

вания недостаточной по витамину Е диеты. Результаты показывают, что печеночная альдегиддегидрогеназа цитозола может включаться в метаболизм малонового диальдегида в течение относительно кратковременного повышения перекисидения липидов, но эта ферментная активность становится подавленной после более существенной липидной перекисидации *in vivo* [32]. Витамин Е (d,l- α -токоферилацетат) защищает альдегиддегидрогеназу, фермент очень чувствительный к окислительным нарушениям. Ферментная активность коррелирует с восстановленным глутатионом и находится в обратной связи между логарифмами данных по активности фермента и количеством веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Результаты показывают, что витамин Е и восстановленный глутатион функционируют совместно для защиты чувствительных ферментов от окислительного стресса.

Решение проблемы метаболизма трех взаимосвязанных групп веществ этанола, ретинола и α -токоферилхинона – поможет установить функцию соединений семейства производных α -токоферола у млекопитающих животных. Первые две группы веществ тесно увязаны между собой в метаболизме за счет многочисленных дегидрогеназ, катализирующих превращение этанола и ретинола в определенных соотношениях. Термин антиоксидант вышел из теории цепных реакций, тогда как понятие восстановитель применяется в общей химии. При этом антирадикальная реакция неспецифична и протекает с образованием безвредных продуктов. Группа производных α -токоферола, одним из которых является α -токоферилхинол, проявляет по сравнению с α -токоферолом гораздо большую антирадикальную активность. Восстановление α -токоферилхинона может происходить в частности за счет менадионредуктазы. При этом известна его способность восстанавливаться в дыхательной цепи.

При этом восстановление α -токоферилхинона не является частью классичес-

кой митохондриальной электроннотранспортной системы. Восстановленный α -токоферилхинон является мощным антиоксидантом EPI-A0001 и в настоящее время он находится в разработке для лечения симптомов, связанных с наследованием митохондриальных болезней. Препарат хорошо переносится, у него нет серьезных отрицательных свойств и дозозависимой токсичности. EPI-A0001 имеет выгодный фармакокинетический профиль при его приеме с кормом [33]. Через четыре недели после начала лечения атаксии Фридрайха различия между субъектами, получавшими EPI-A0001 или плацебо в отношении Индекса Предрасположенности, не были статистически значимыми. Хотя EPI-A0001 не изменяет Индекс Предрасположенности, он улучшает метаболизм глюкозы и вызывает дозозависимое повышение неврологической функции, как было определено по шкале рейтинга атаксии Фридрайха. Это генетическое заболевание, связанное с наследственной мутацией 9-ой хромосомы, поражает 2–7 человек на 100 000 населения. Необходимо дифференцировать от наследственной атаксии, вызываемой дефицитом витамина E, связанным с нарушением взаимосвязи между витамином E и ЛПОНП. Интересно, что этому заболеванию не подвержено негритянское население. При заболевании нарушена экспрессия белка фратаксина, ответственного за удаление железа из околомитохондриального пространства. При этом *in vitro* α -токоферилхинол мощно ингибирует гибель

клеток на модели этого заболевания [34].

Как мы сообщали, семейство витаминов E участвует в регуляции целого ряда ферментов путем влияния на экспрессию некоторых генов [25]. В связи с этим нашей основной задачей является изучение механизма, включающего α -токоферилхинон в систему, связывающую дыхательную цепь с дегидрогеназной активностью, использующей его в качестве фактора. α -Токоферилхинон, будучи восстановленным в дыхательной цепи до α -токоферилхинола, является, по-видимому, самым эффективным природным биологическим антиоксидантом, синтезирующимся из α -токоферола. Прогнозируемое участие α -токоферилхинола в метаболизме млекопитающих исходит из результатов, полученных в опытах с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* и проиллюстрированных в схеме, представленной на рисунке 7. На наш взгляд обезвреживание свободных радикалов протекает на двух уровнях. Сначала α -токоферол реагирует со свободными радикалами, при этом образуется α -токоферилхинон, который затем после восстановления в дыхательной цепи в α -токоферилхинол активизируется в митохондриях параллельно с увеличением свободнорадикальной опасности. Затухание цепной реакции ведет к быстрому освобождению ткани от α -токоферилхинона, и обезвреживание свободных радикалов выходит на стационарный уровень, который поддерживается за счет α -токоферола.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Evans, H.M. *The Pioneer History of Vitamin E. Vitamins and Applications / Simposiums on Vitamin E and Metabolism in Honour of Professor H.M. Evans // Vitamins, Hormones. A.P. N.Y., London. – 1962. – Vol. 20. – P. 397–387.*
- 2 Tappel, A.L. *Vitamin E and free radical peroxidation of lipid // Int. conf. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1972. – Vol. 203. – P. 12–28.*
- 3 Caasi, R.M. *Biosynthesis of heme in vitamin E deficiency / R.M. Caasi, J.W. Hauswirth, P.P. Nair // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1972. – Vol. 203. – P. 93–102.*
- 4 Purkins, L. *The effect of vitamin E Deficiency on Cellular Immune Function in Wistar Rats / L. Purkins, J. Kelleher, R.V. Healtley. - 8-th European Fat Soluble Vitamins Group Meeting (Abstracts) // Intern. J. Vitam. Nutr. Res., 1990. – Vol. 60. – N.2. – P. 193–194.*
- 5 Дудин, В.И. *Биохимия витамина E и связанных с ним биологически активных веществ / В.И. Дудин // Изд. РАСХН. – 2004. – 255 с.*

- 6 Chow, C.K. The metabolism of C14- α -tocopherylquinone and C14- α -tocopherylhydroquinone / C.K. Chow, H.H. Draper, M. M. Chiu // *Lipids*. – 1967. – Vol. 2. – P. 390–6.
- 7 Liebler, D.C. Oxidation of vitamin E: Evidence for competing autoxidation and peroxy radical trapping reactions of the tocopheroxyl radical / D.C. Liebler, P.E. Baker, K.L. Kaysen // *J. Am. Chim. Soc.*, 1990. – Vol. 112. – P. 6995–7000.
- 8 Liebler, D.C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Vitamin E and its Oxidation Products / D.C. Liebler, J.A. Burr, L. Philips, A.J.L. Ham. // *Anal. Biochem.*, 1996. – Vol. 236. – P. 27–34.
- 9 Kruk, J. Occurrence and Function of α -Tocopherolquinone in Plants / J. Kruk, K. Strzalka // *J. Biochem.*, 1967. – Vol. 103. – P. 589–600.
- 10 Griffiths, W.T. Nature, intracellular distribution and formation of torpedoed quinones in maize and barley shoots / W.T. Griffiths [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.*, 1996. – Vol. 4. – P. 1129–34.
- 11 Hughes, P.E. Occurrence of alpha-tocopherolquinone and alpha-tocopherolquinol in microorganisms / P.E. Hughes, S.B. Tove // *J. Bacteriol.*, 1982. – Sep. 151. N. 3. – P. 1397–402.
- 12 Коновалов, С.А. Биохимия дрожжей / С.А. Коновалов – М.: Пищепромиздат, 1962. – 272 с.
- 13 Кэн, И. Лечение кетоза молочных коров с помощью витамина Е / И. Кэн, О. Ясуо, Х. Кацуюки // *Animal Husbandry*. – 1963. – Vol. 17. – N. 9. – P. 1223–1224.
- 14 Берри, Д. Биология дрожжей / Д.Р. Берри; пер. с англ.: В.Г. Горбулев; под ред.: М.Н. Мейсель. – М.: Мир, 1985. – 95 с.
- 15 Дудин, В.И. Сбраживание глюкозы дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* при введении в среду экзогенного НАД⁺ и α -токоферилхинона / В.И. Дудин // *Сельскохозяйственная биология*. – 2011. – № 6. – С. 41–46.
- 16 Рэкер, Э. Биоэнергетические механизмы. / Э. Рэкер. – М.: 1967. – 292 с.
- 17 Уайт, А. Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. – М.: Мир, 1981. – Т. 1. – 539 с.
- 18 Дудин, В.И. Об участии α -токоферилхинона в НАД⁺-зависимой регуляции финальной стадии распада глюкозы / В.И. Дудин // *Сельскохозяйственная биология*. – 2011. – № 2. – С. 57–62.
- 19 Янг, И. Влияние ионов цинка на конформационную стабильность дрожжевой алкогольдегидрогеназы / И. Янг, Х-М. Жоу // *Биохимия*. – 2001. – Т. 66, ч. 1. – С. 61–70.
- 20 Russell, D.W. DNA sequences of two yeast promoter-up mutants / D.W. Russell, M. Smith, D. Cox, V.M. Williamson, E.T. Young // *Nature*. – 1983. – Vol. 304. – N. 5927. – P. 652–4.
- 21 Saier, M.H. Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria / M.H. Saier, et al // *Biotechnol. Bioeng.*, 1998. – Vol. 58. – N. 2–3. – P. 170–4.
- 22 Reddi, A.R. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration / A.R. Reddi, V.C. Culotta // *Cell*. – 2013. – Vol. 152. – N. 1–2. – P. 224–35.
- 23 Hughes, P.E. Identification of Deoxy- α -tocopherolquinol as Another Endogenous Electron Donor for Biohydrogenation / P.E. Hughes, S.B. Tove // *J. Biol. Chem.*, 1980. – Vol. 255. – N. 24. – P. 11802–06.
- 24 Infante, J.P. A function for the vitamin E metabolite alpha-tocopherolquinone as an essential enzyme cofactor to the mitochondrial fatty acid desaturases / J.P. Infante // *FEBS Letters* – 1999. – Vol. 5. – N. 446(1). – P. 1–5.
- 25 Azzi, A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action / A. Azzi // *Free Radic. Biol. Med.*, 2007. – Vol. 43. – N. 1. – P. 16–21.
- 26 De Weck, Z. Interdependence of coenzyme- induced conformational work and porcine heart lactate dehydrogenases: a hydrogen-deuterium exchange study. Hoppe- Seylers / Z. De Weck, J. Pande, J.H. Kuegi // *J. Biol. Chem.*, 1986. – Vol. 367. – N. 9. – P. 969–980.
- 27 Pocker, Y. Bioinorganic and bioorganic studies of liver alcohol dehydrogenase // *Chem. Biol. Interact.*, 2001. – Vol. 130–132. – N. 1–3. – P. 383–93.
- 28 Lieber, C.S. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years // *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, 2005. – Vol. 50. – P. 7–20.
- 29 Crabb, D.W. Alcohol and retinoids / D.W. Crabb, J. Pinairs, R. Hasandka, M. Fang, M.A. Leo, C.S. Lieber, H. Tsukamoto, K. Motomuro, T. Miyahara, M. Ohata, W. Bosron, S. Sanghani, N. Kedishvili, H. Shiraiishi, H. Yokoyama, M. Miyagi, H. Ishii, I. Bergheim, I. Menzl, A. Parlesak, C. Bode // *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2001. – Vol. 25. – N. 5. – P. 207–217.
- 30 Sanchez-Sevilla, L. High dosing of α -tocopherol inhibits rat liver regeneration by modifying signal transducer and activator of transcription protein expression and its correlation with cell redox state and

retinoid metabolism / L. Sanchez-Sevilla, E. Mendieta-Condado, R. Hernandez-Munoz // *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 2012. – Vol. 237. – N. 7. – P. 811–21.

31 Li, S.Y. Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) transgene prevents acetaldehyde-induced cell injury in human umbilical vein endothelial cells: role of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase / S.Y. Li, M. Gomelsky, J. Duan, Z. Zhang, L. Gomelsky, X. Zhang, P.N. Epstein // *J. Biol. Chem.*, 2004. – Vol. 279. – N. 12. – P. 11244–52.

32 Rodrigues-Gutierrez, G. Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats a proteomics and network analysis approach / G. Rodrigues-Gutierrez, G.G. Duthie, S. Wood, P. Morrice, F. Nicol, M. Reid, L.L. Cantlay, T. Kelder, G.W. Horgan, J. Fernandes-Bolanos Guzman, B. de Roos // *Mol. Nutr. Food Res.*, 2012. – Vol. 56. – N. 7. – P. 1137–47.

33 Hawi, A. Use of an adaptive study design in single ascending-dose pharmacokinetics of A0001 (α -tocopherylquinone) in healthy male subjects / A. Hawi, S. Heald, T. Sciascia // *J. Clin. Pharmacol.*, 2012. – Vol. 52. – N. 1. – P. 65–67.

34 Linch, D.R. A0001 in Friedreich ataxia: biochemical characterization and effects in a clinical trial. / D.R. Linch, S.M. Willi, R.B. Wilson, M.G. Coticelli, K.W. Brigatti, E.C. Deutsch, O. Kucheruk, W. Shrader, P. Rioux, G. Miller, A. Hawi, T. Sciascia // *Moy Disord.*, 2012. – Vol. 27. – N. 8. – P. 1026–33.

УДК 619:597.22

Зайцева В.В., директор ф-ла РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»

Ф-л РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Витебск

ДИНАМИКА РОСТА ГРИБА ТРИХОФИТОНА НА ПЛОТНЫХ СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

Резюме

В ходе проведенных исследований изучена динамика роста колоний гриба *Tr. verrucosum* № 130 и *Tr. mentagrophytes* № 135 на сусло-агаре и средах, содержащих оптимальные концентрации компонентов куриного яйца, сухого молока, препаратов «Бионорм Б», «Бионорм В», «ПулСал» и «Флоравит», сухого экстракта дрожжей и автолизата пивных дрожжей.

В результате исследований установлено, что для интенсификации роста биомассы и спорогенеза у *Tr. verrucosum* № 130 и *Tr. mentagrophytes* № 135 при производстве вакцин в сусло-агар целесообразно добавлять 2,5% компонентов куриного яйца или 5,0% Бионорм Б, или 5,0% Бионорм В, или 5,0% ПулСала, или 1,0% сухого молока, или 2,0% автолизата пивных дрожжей. При этом технологичнее выращивать трихофитон в течение 15 суток, так как к этому времени отмечается максимальный спорогенез гриба.

Summary

In the course of the research the dynamics of the growth of fungal colonies *Tr. verrucosum* № 130 and *Tr. mentagrophytes* № 135 on wort agar and media containing optimal concentrations of the components of chicken eggs, powdered milk, medications Bionorm B Bionorm V, PulSal and Floravit, dry autolyzed yeast extract and brewer's yeast were studied.

The studies found that for the intensification of biomass growth and sporogenesis in *Tr. verrucosum* № 130 and *Tr. mentagrophytes* № 135 in the production of vaccines in the wort agar it is advisable to add 2,5% of the components of chicken eggs or 5,0% Bionorm B, or 5,0% Bionorm V, or 5,0% PulSal, or 1,0% of dry milk, or 2,0% autolyzed brewer's yeast. In this technologically trichophyton to grow for 15 days, as indicated by the time the maximum sporogenesis fungus.

Поступила в редакцию 10.11.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Главной целью выращивания микроорганизмов на определенных питательных субстратах является изучение их морфоло-

гии и физиологии, а также накопление бактериальной массы, используемой в различных направлениях исследований.

В настоящее время для выращивания

культур вида *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* в качестве питательной среды у нас в стране, используется сусло-агар, основным компонентом которого является неохмеленное пивное сусло, являющееся природным компонентом и имеющее сложный и непостоянный состав. В результате многочисленных работ было установлено, что на партиях сусло-агара из различных сортов пивного сусла рост и спорообразование культур гриба рода *Trichophyton* резко отличается [2, 4]. Культурально-морфологические свойства микроорганизма обычно характеризуются по следующим признакам: форма и размер колоний, цвет, характер роста, профиль, консистенция, структура [5].

Следует отметить, что колонии гриба *Trichophyton verrucosum* отличаются чрезвычайно высоким разнообразием свойств. На твердой агаризованной среде, в зависимости от плотности посева, встречаются изолированные и слившиеся колонии, с обильным ростом, чаще округлой формы, непрозрачные, диаметр колоний до 30–50 мм, края ровные, цвет белый, профиль выпуклый, поверхность мучнистая, складчатая, консистенция плотная.

По данным некоторых исследователей при микроскопии наблюдается септированный мицелий, а на 5–10 сутки развития обычно появляются концевые хламидоспоры. У старых культур, через месяц и более после посева, встречаются также артроспоры, которые располагаются по ходу мицелия по 2–3.

Для культивирования гриба могут быть использованы различные специальные питательные среды, но большинство из них является модификацией питательной среды Сабуро. При посеве патологического материала, содержащего споры этого гриба, на 10–20-е сутки при температуре 26–28°C в аэробных условиях появляются кожистые, гладкие, складчатые колонии, иногда с периферической мучнистой зоной. Грибы дают глубокие, мощные ветвления в субстрат [3, 7–9].

В зависимости от преимущественной локализации поражения (эпидермис, ногти, волосы) дерматомикозы делят на эпидермомикозы, онихомикозы и трихомикозы. В частности, субстратом питания для этих грибов является кератин, содержащийся в коже и ее придатках [6]. Поэтому во многих странах мира отработан метод культивирования дерматомицетов на волосах, для чего используют волосы человека (детский, женский) и животных [1].

Цель работы – изучить динамику роста гриба рода *Trichophyton* при поверхностном культивировании на плотных средах разного состава.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на филиале РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и ОАО «Бел Витунифарм».

Объекты исследований – штаммы гриба *Trichophyton verrucosum* № 130 (*Tr. verrucosum* № 130) и *Trichophyton mentagrophytes* № 135 (*Tr. Mentagrophytes* № 135).

В качестве питательной основы использовали сусло, приготовленное из пропущенного пивного ячменя. Полученное неохмеленное пивное сусло разливали в стеклянные баллоны и стерилизовали при температуре 115–117°C в течение 40 мин. Далее пивное сусло разбавляли очищенной водой до 6,0% содержания сахаров по Баллингу. Значение pH сусла до стерилизации устанавливали в пределах 7,6–7,8 путем добавления 10,0%-го раствора бикарбоната натрия.

Исследования проводили на агаризованных питательных средах, приготовленных на основе известных прописей и разработанных нами в ходе исследований.

Оптимизацию компонентного состава питательной среды проводили традиционными микробиологическими и биохимическими методами, основанными на законах, описывающих протекание фундаментальных процессов микробиосинтеза (процесс размножения несовершенного

гриба рода *Trichophyton*, накопления биомассы и микроконидий, изменение содержания компонентов в питательной среде).

Для определения динамики развития гриба трихофитон на средах разного состава в сусло-агар вносили следующее: 2,5% компонентов куриного яйца, 5% Бионорма Б (препарат, содержащий биологически активные компоненты торфа), 5% Бионорма В (препарат, содержащий биологически активные компоненты бурых водорослей), 1,0% сухого молока, 5% ПулСала (препарат, изготовленный на основе полисахаридов сальмонелл), 2% Флоравита (препарат, полученный из мицелиального гриба *Fusarium sambucinum*), 0,2% сухого экстракта дрожжей, 2,0% автолизата пивных дрожжей.

Культивирование проводили в течение 25 суток, при этом диаметр колонии измеряли каждые 5 суток, фиксируя и сравнивая полученные результаты для определения наиболее оптимального времени, необходимого для максимального спорогенеза гриба трихофитон.

Для приготовления суспензии клеток дерматофитов и подсчета количества микроконидий в пробирку с культурами гриба, выращенными на косяках сусло-агра и опытных средах, вносили по 5 см³ стерильного физиологического раствора и готовили взвесь биомассы трихофитона.

Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Для этого из тщательно перемешанной суспензии брали пробу, разводили стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:10, 1:20 и 1:40 в зависимости от ее густоты. Затем готовили 4 пробирки: в первую наливали 4,5 см³ физиологического раствора, в остальные – по 2,0 см³. В первую из них добавляли 0,5 см³ испытуемой суспензии и тщательно перемешивали, после чего 2,0 см³ взвеси переносили во вторую и т.д. Для подсчета количества клеток содержимое из каждого разведения заряжали в камеру Горяева. Подсчет вели в 5 больших квадратах (4 по углам и 1 в центре).

Содержание клеток в 1см³ суспензии определяли по формуле (1):

$$K = \frac{\Pi + B}{2} * p * 10^4 * 5, \text{ где} \quad (1),$$

К – искомое число клеток;

Π – количество клеток в 5 больших квадратах первой сетки;

В – число клеток в 5 больших квадратах второй сетки;

p – разведение (в 10, 20 или 40 раз).

С целью определения количества жизнеспособных микроконидий культуры гриба разных штаммов, выращенных на средах разного состава, их ресуспендировали в физиологическом растворе и гомогенизировали в течение 5 мин в стерильной камере гомогенизатора. Проверку проводили через 30 минут после ресуспендирования культур гриба. Предварительно в шесть пробирок наливали по 4,5 см³ стерильного растворителя. Пипеткой брали 0,5 см³ суспензии гриба и вносили в первую пробирку, перемешивали содержимое пробирки и новой пипеткой брали 0,5 см³ содержимого из первой пробирки и переносили во вторую пробирку и т.д., то есть готовили разведения от 10⁻¹ до 10⁻⁶.

Из разведений культуры гриба 10⁻⁴, 10⁻⁵ и 10⁻⁶ производили посев на сусло-агар в чашках Петри. Для чего из каждого разведения культуру гриба набирали пипеткой по 0,5 см³ суспензии и засеивали в каждую из трех чашек Петри с сусло-агаром. Легким покачиванием чашки равномерно распределяли суспензию по поверхности питательной среды.

Засеянные чашки помещали в термостат при температуре 26–28°C на 8–9 суток.

Количество выросших колоний гриба подсчитывали на 8–9 сутки визуально. Затем суммировали количество выросших колоний в трех чашках Петри. Полученную сумму делили на 3 и умножали на степень разведения, при этом полученный результат соответствует количеству жизне-

способных микроконидий в культуре гриба.

Накопление биомассы гриба в динамике развития контролировали методом доведения до постоянного веса в сушильном шкафу при температуре 105°C. Для чего культуры гриба, выращенные на средах разного состава, снимали скребком. Затем сушили биомассу гриба до постоянного значения при температуре 105°C и взвешивали на электронных весах.

Размер колоний устанавливали с помощью миллиметровой линейки. Замер колоний производили через 5, 10, 15, 20 и 25 суток роста гриба при температуре 28±2°C.

Утилизацию углеводов в динамике развития гриба контролировали с помощью антронового метода. Антроновый реактив готовили следующим образом: в мерную колбу через воронку добавляли 0,2 г антрона, а затем серную кислоту до метки (объем колбы 1,0 дм³). Далее определяли количество сахаров: в химически чистые пробирки вносили антроновый реактив в количестве 2,0 дм³ и 1,0 см³ среды до засева и после смыва грибной массы. Далее пробы ставили на водяную баню на 15–20 минут. Пробы охлаждали и определяли оптическую плотность при 620–625 нм на спектрофотометре РД-303 UV.

Важным элементом оптимизации технологического процесса является выбор критерия эффективности. В качестве критерия эффективности использовали такие показатели, как количество мицелия и микроконидий в единице среды, жизнеспособность микроконидий, индекс мицелле- и спорообразования, содержание микроконидий в единице биомассы сухого мицелия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе проведенных исследований установлено, что культура гриба *Tr. verrucosum* № 130 видимый рост проявляет в виде белого незначительного налета на

всех средах на 5 сутки. На 5 сутки *Tr. verrucosum* № 130 обеспечивает рост колоний размером 1,87–2,2 мм на сусло-агаре, содержащем 5,0% ПулСала, 2,5% компонентов куриного яйца, 5,0% Бионорм Б, 5,0% Бионорм В, 1,0% сухого молока и 2,0% автолизата пивных дрожжей.

Минимальный рост гриба через 5 суток был отмечен у *Tr. verrucosum* № 130 на сусло-агаре и составил 1,07 мм.

Промежуточное положение на 5 сутки по ростовой активности проявлял *Tr. verrucosum* № 130 на сусло-агаре, содержащем 2,0% Флоравита и 0,2% сухого экстракта дрожжей.

К 10-ым суткам рост колоний на всех питательных средах был ярко выражен в виде белого налета. Вместе с тем, наиболее высокую ростовую активность *Tr. verrucosum* № 130 проявлял на средах, содержащих 2,5% компонентов куриного яйца, 5,0% Бионорм Б, 5,0% Бионорм В, 5,0% ПулСала, 1,0% сухого молока, 2,0% автолизата пивных дрожжей (19,0–20,7 мм).

На 10 сутки минимальный рост (8,7 мм) проявлял *Tr. verrucosum* № 130 на сусло-агаре. Промежуточное положение по ростовой активности на этом отрезке времени отмечен у *Tr. verrucosum* № 130 на сусло-агаре, содержащем экстракт дрожжевой и Флоравит.

К 15 суткам *Tr. verrucosum* № 130 обеспечивал интенсивный рост колоний на среде, обогащенной компонентами куриного яйца, Бионорм Б, Бионорм В, сухим молоком, ПулСалом и автолизатом пивных дрожжей (45,3–51,7 мм). На этом отрезке времени *Tr. verrucosum* № 130 обеспечил рост на среде, обогащенной Флоравитом и экстрактом дрожжей (33,3–37,0 мм). Низкий рост к 15 суткам был отмечен у *Tr. verrucosum* № 130 на сусло-агаре, он составил 30,3 мм.

Результаты оценки динамики развития гриба трихофитон в виде отдельных колоний на плотных средах разного состава представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Динамика роста гриба *Tr. verrucosum* № 130 на средах разного состава

Состав среды	Диаметр колоний (мм)					
	Время культивирования (сут)					
	1	5	10	15	20	25
сусло-агар + 2,5% компонентов куриного яйца	0	1,97	20,0	50,0	58,3	62,3
сусло-агар+5,0% Бионорм Б	0	2,1	20,7	51,7	60,3	63,3
сусло-агар+5,0% Бионорм В	0	2,0	20,7	51,7	59,7	63,0
сусло-агар+1,0% сухого молока	0	1,87	19,3	49,3	56,3	61,3
сусло-агар+5,0% ПулСала	0	2,2	22,3	53,7	61,3	64,0
сусло-агар+2,0% Флоравита	0	1,27	14,7	33,3	45,7	54,3
сусло-агар+0,2% сухого экстракта дрожжей	0	1,43	15,3	37,0	45,3	56,3
сусло-агар+2,0% автолизата пивных дрожжей	0	2,0	19,0	45,3	56,0	61,3
сусло-агар (контроль)	0	1,07	8,7	30,3	42,7	51,3

Из данных таблицы 1 видно, что для культивирования трихофитона важным является временной отрезок 15 суток, так как отмечается наиболее интенсивный спорогенез.

В дальнейшем к 25 суткам *Tr. verrucosum* № 130 увеличивает диаметр колоний на средах, обогащенных компонентом куриного яйца, Бионорм Б, Бионорм В, ПулСалом и сухим молоком на 21,9–24,6%.

С 15 по 25 сутки более интенсивный рост колоний отмечен у *Tr. verrucosum*

№ 130 на сусло-агаре, среде, содержащей Флоравит, сухой экстракт дрожжей и автолизат пивных дрожжей.

Так, увеличение диаметра колоний у *Tr. verrucosum* № 130 на сусло-агаре, среде с Флоравитом, среде с автолизатом пивных дрожжей и с экстрактом дрожжей к 25 суткам отмечалось соответственно на 69,3; 63,1; 61,3 и 52,2%.

Примерно аналогичная динамика роста отмечена у *Tr. mentagrophytes* № 135 (таблица 2).

Таблица 2 – Динамика роста гриба *Tr. mentagrophytes* № 135 на средах разного состава

Состав среды	Диаметр колоний (мм)					
	Время культивирования (сут)					
	1	5	10	15	20	25
сусло-агар + 2,5% компонентов куриного яйца	0	1,8	17,7	46,0	58,0	62,0
сусло-агар+5,0% Бионорм Б	0	1,97	21,7	49,3	58,7	62,7
сусло-агар+5,0% Бионорм В	0	2,0	20,3	47,7	56,7	59,7
сусло-агар+1,0% сухого молока	0	1,9	18,0	44,3	53,7	60,0
сусло-агар+5,0% ПулСала	0	1,97	21,3	49,0	60,0	62,7
сусло-агар+2,0% Флоравита	0	1,27	14,0	35,0	45,3	56,0
сусло-агар+0,2% сухого экстракта дрожжей	0	1,5	13,7	36,3	45,3	54,0
сусло-агар+2,0% автолизата пивных дрожжей	0	1,8	17,3	47,0	57,0	60,7
сусло-агар (контроль)	0	1,0	9,3	30,3	42,7	52,3

Из данных, представленных в таблице 2 видно, что к 5 суткам на средах, обогащенных компонентами куриного яйца, Бионорм Б, Бионорм В, сухим молоком и автолизатом пивных дрожжей, диаметр колоний у *Tr. mentagrophytes* № 135 составил 1,8–2,0 мм. На простом сусло-агаре к 5 суткам *Tr. mentagrophytes* № 135 вырастает на

1,0 мм. Промежуточное положение по интенсивности роста в этот отрезок времени отмечается у *Tr. mentagrophytes* № 135 на средах, обогащенных Флоравитом и сухим экстрактом дрожжей.

К 10 суткам отмечен достаточно выраженный рост у *Tr. mentagrophytes* № 135 на всех испытанных средах. Максималь-

ный рост колоний у *Tr. Mentagrophytes* № 135 был на сусло-агаре, содержащем Бионорм Б, Бионорм В и ПулСал, – 20,3–21,7 мм. На сусло-агаре за этот отрезок времени у *Tr. mentagrophytes* № 135 диаметр колоний был лишь 9,3 мм. Промежуточное положение по интенсивности роста к 10 суткам отмечена у *Tr. mentagrophytes* № 135 на средах, содержащих компоненты куриного яйца, сухое молоко, Флоравит, экстракт и автолизат дрожжей (13,7–17,7 мм).

К 15 суткам инкубации *Tr. Mentagrophytes* № 135 проявил максимальный рост на средах, обогащенных компонентом куриного яйца, Бионорм Б, Бионорм В, сухим молоком, ПулСалом и автлизатом пивных дрожжей (44,3–49,3 мм). Более скудный рост проявлял к 15 сут *Tr. Mentagrophytes* № 135 на сусло-агаре (30,3 мм).

Промежуточное положение по интенсивности роста отмечено у *Tr. Mentagrophytes* № 135 на среде с Флоравитом и экстрактом дрожжей.

К 25 суткам инкубации *Tr. Mentagrophytes* № 135 максимально увеличивал диаметр колоний на сусло-агаре, т.е. на 72,6%.

На среде, содержащей Флоравит, к 25 суткам рост *Tr. mentagrophytes* № 135 увеличивал диаметр колоний на 60,0%. К это-

му отрезку времени диаметр колоний у *Tr. mentagrophytes* № 135 увеличивался на средах, содержащих Бионорм Б, Бионорм В, ПулСал и автолизат пивных дрожжей на 25,2–29,1%, а средах с молоком и компонентами яйца – на 34,8–35,4%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В сравнительном опыте изучена динамика роста колоний гриба *Tr. verrucosum* № 130 и *Tr. mentagrophytes* № 135 на сусло-агаре и средах, содержащих оптимальные концентрации компонентов куриного яйца, сухого молока, препаратов Бионорм Б, Бионорм В, ПулСал и Флоравит, сухого экстракта дрожжей и автолизата пивных дрожжей.

Установлено, что для интенсификации роста биомассы и спорогенеза у *Tr. verrucosum* № 130 и *Tr. mentagrophytes* № 135 при производстве вакцин в сусло-агар целесообразно добавлять 2,5% компонентов куриного яйца или 5,0% Бионорм Б, или 5,0% Бионорм В, или 5,0% ПулСала, или 1,0% сухого молока, или 2,0% автолизата пивных дрожжей, при этом технологичнее выращивать трихофитон в течение 15 суток, так как к этому времени отмечается максимальный спорогенез гриба.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Кухар, Е.В. Поверхностное культивирование дерматофитов в целях лабораторной диагностики / Е.В. Кухар, А.У. Байдуйсенова, А.К. Акимбаева // Вестник науки Казахского аграрного университета им. С. Сейфуллина. – 2006. – № 2 (41). – С. 149–156.
- 2 Насер, А.А. Трихофития крупного рогатого скота в Сирийской Арабской Республике (САР) / А.А. Насер // Бюллетень ВИЭВ. – М., 1991. – Вып. 75–76. – С. 142–145.
- 3 Овчинников, Р.С. Изучение изменчивости морфологических характеристик дерматофитов / Р.С. Овчинников // Вестник РАСХН. – М., 1999. – № 5. – С. 37–39.
- 4 Одноволик, Ю.В. Рост и спорогенез грибов вида *Trichophyton* на партиях сусло-агара, приготовленных из различных сортов пивного сусла / Ю.В. Одноволик // Селекция, кормление, содержание сельскохозяйственных животных и технология производства продуктов животноводства. – 1997. – Вып. 2. – С. 151–154.
- 5 Ajello, L. Cultural methods for human pathogenic fungi / L. Ajello // J. Chronic Diseases. – 1989. – № 5 – P. 5.
- 6 Odds, F. 5 th Conference on Candida and Candidiasis, March 1-4, 1999 in Charlestons South Carolina / F. Odds // Mycology Newsletter. – 1999. – № 1. – P. 9–14.
- 7 Rabel, G., Taplin, D. Dermatophytes the recognition identification. Florida, 1974. – P. 124.
- 8 Scott, D.B. A new variety of *Trichophyton verrucosum* / D.B. Scott // Transaet of the British mycological society. – 1976. – Vol. 67, part 2. – P. 342–344.
- 9 Star, R. Colony formation in algae / R. Star // Cell. Interact. Berlin. – 1984. – P. 261–282.

Гудзь В.П., кандидат ветеринарных наук

Белявский В.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ РАЗВИТИЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ У ЖИВОТНЫХ (ОБЗОР)

Резюме

В статье представлена современная теория развития стресс-индуцированной патологии у животных. Основная роль принадлежит активизации процессов свободнорадикального окисления и перестройке нейроэндокринного регуляторного звена с последующим развитием иммунодефицитного состояния, ведущего к возникновению нозологически дифференцированной патологии.

Summary

The article presents a modern theory of development of animal stress-induced diseases. The main role belongs to the activation of free radical oxidation and restructuring neuroendocrine regulatory link with the subsequent development of immune deficiency, leading to the emergence of differentiated nosologically pathology.

Поступила в редакцию 01.12. 2015 г.

Согласно современным представлениям, стресс определяется как стереотипная, эволюционно-древняя, генетически детерминированная, адаптационная реакция живой системы, наиболее совершенная у высших млекопитающих и включающаяся в ответ на воздействие разнообразных экстремальных агентов [1].

В развитии стрессового состояния в организме выделяют три последовательные стадии: тревоги (мобилизации), резистентности и истощения [25].

Реакция тревоги у животных – первая кратковременная стадия стресса длительностью от 6 до 48 часов – характеризуется развитием определенных процессов в лимфатической и эндокринной системах. В этой стадии происходит усиленное выделение в кровь адренокортикотропного гормона (АКТГ), который стимулирует секрецию глюкокортикоидных гормонов, усиливаются процессы катаболизма, мобилизуются энергетические ресурсы организма. Изменяется клеточный состав крови, происходит сгущение ее на случай возможных ран, в крови количество нейтрофилов увеличивается, а лимфоцитов – уменьшается. Реакция тревоги состоит из двух фаз: шока и противошока. В фазу шока происходит на-

рушение ряда функций, а в фазу противошока в результате усиления гормональной активности системы гипофиз – кора надпочечников происходит нормализация нарушенных функций [18; 24].

В этот период защитные силы организма мобилизуются для противодействия отрицательным факторам среды. После этого организм животного погибает (если очень сильный стрессор) или переходит в следующую стадию [25].

Если защитные силы организма справились с воздействием стрессоров, то наступает вторая стадия – резистентности, или успешного сопротивления, которая начинается с 3-х суток. Кора надпочечников разрастается и секретирует большое количество глюкокортикоидов. Уменьшаются размеры зубной железы и лимфатических узлов. Происходит восстановление объема внутрисосудистого русла. В этот период наблюдается умеренная гиперплазия щитовидной железы и нормализация обмена веществ в организме [23].

Если стрессор сильный и действует длительно, а защитно-адаптационные возможности организма слабые, то наступает стадия истощения (стадия пониженной устойчивости). В этой стадии развивается

«дистресс» (страдание). Количество лимфоцитов увеличивается, происходит распад белков и жиров в тканях с резким снижением массы тела. Наблюдаются функциональные нарушения печени, расстройства желудочно-кишечного тракта, поражения центральной нервной системы (невроз). В случае продолжающегося действия стресс-фактора наблюдаются необратимые изменения обмена веществ, нарушаются механизмы адаптации и, в конечном счете, происходит гибель животного [18].

Развитие в организме адаптивных реакций в ответ на действие различных стресс-факторов происходит по общему механизму через гипоталамо-симпато-адреналовую и гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему с участием гормонов и медиаторов симпато-адреналовой системы – катехоламинов (адреналин, норадреналин и дофамин). При этом возбуждение, возникающее при воздействии стресс-фактора на периферические нервно-рецепторные анализаторы (зрительные, слуховые, обонятельные и т.д.), по афферентным путям передается в кору головного мозга, которая приводит в действие соматомоторную, висцеромоторную и эндокринную системы. Далее по нервным путям информация поступает в гипоталамус. Супраоптические и паравентрикулярные ядра передней части гипоталамуса, проявляющие основную нейросекреторную активность, выделяют гипоталамические гормоны, так называемые реализующие факторы (релизинги). При стрессе особое значение имеет кортикотропин-релизинг-гормон, который, действуя на переднюю часть гипофиза, стимулирует секрецию кортикотропина (АКТГ), который в свою очередь стимулирует кору надпочечников, вырабатывающую кортикостероиды. Одновременно от гипоталамуса по симпатическим нервным путям импульс передается на мозговое вещество надпочечников, стимулируя в них синтез и выделение адреналина. В свою очередь адреналин стимулирует секрецию АКТГ гипофизом, являясь одним из факторов, включающих ко-

ру надпочечников при стрессе. Адреналин, кроме того, стимулирует секрецию тиреотропного и гонадотропного гормонов, оказывающих через соответствующие железы значительное влияние на многие функции организма [6].

Кроме того, выделяют «неспецифические» общие фазы изменения обмена катехоламинов и активности симпато-адреналовой системы. Первая фаза – быстрой активации – появляется сразу после воздействия стрессора, при этом в гипоталамусе и других отделах ЦНС происходит выделение норадреналина, что приводит к активации адренергических элементов головного мозга и стимуляции систем гуморально-гормональных механизмов регуляции. Это проявляется усилением деятельности мозгового слоя надпочечников и усиленным поступлением адреналина в сердце. Во второй фазе – быстрой активации – продолжается активная секреция адреналина в кровь и одновременное снижение его количества в надпочечниках, увеличивается его содержание в печени, что вызывает усиленный распад гликогена и повышение концентрации глюкозы в органах и тканях. Третья фаза – истощения функций: симпато-адреналовая активность снижается, стремительно снижается концентрация в надпочечниках адреналина и поступление его в кровь [13, с.10].

Патологическая реакция организма в свою очередь имеет четыре стадии. Первая стадия сопровождается сужением сосудов как следствие спазма артерий и служит причиной ишемии жизненноважных органов (легких, сердца и мозга). Вторая стадия характеризуется дезактивацией основных путей обмена веществ, дефицитом аденозинтрифосфорной кислоты и нарушением баланса клеток. На третьей стадии происходит поражение клеточных мембран. Четвертая стадия характеризуется чрезмерной концентрацией катехоламинов и, как следствие, полным разрушением и некрозом клеток сосудов и тканей, что, как правило, заканчивается летальным исходом [14].

Предрасположенность и устойчивость к стрессорным повреждениям зависит от функционального состояния стрессреализующей (надпочечники) и стресслимитирующей (инсулярный аппарат поджелудочной железы) систем организма, а также степенью их мобилизации под влиянием стрессора. При этом «существует 3 гипотетических сценария гибели в терминальной фазе истощающего стресса: 1) срыв адаптации из-за функционального истощения надпочечников; 2) фатальная гипогликемия, вызванная нарушением гуморальной регуляции, приводящей к гиперпродукции инсулина; 3) несовместимые с жизнью стрессорные кардиопатии, обусловленные гиперактивностью симпато-адреналовой системы» [5, С.12–55].

Существуют возрастные и половые особенности развития стрессовых реакций. Так, новорожденные реагируют не на все стрессоры, действующие на взрослых животных, что наиболее вероятно обусловлено функциональной незрелостью нейроэндокринных органов, особенно гипоталамуса. У старых животных в стрессовых ситуациях деятельность системы гипоталамус – кора надпочечников резко ослаблена, несмотря на такое же количество вырабатываемых эндокринными железами гормонов, как и у взрослых животных. Адаптационный синдром у самцов выражен в большей степени, чем у самок. Значительная роль в стрессустойчивости и стрессчувствительности животных принадлежит типу высшей нервной деятельности [9; 16; 21, с. 138].

Многочисленными исследованиями доказано, что в процессе стресс-реакции активизируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые являются ведущим пусковым механизмом стрессорных повреждений [2].

В фазу шока стадии тревоги стресс-реакции тревожное, лихорадочное возбуждение сопровождается появлением значительного количества активных форм кислорода (супероксидный радикал, гидропероксидный радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород и перекись водоро-

да), которые включаются в свободнорадикальные самоиницирующиеся реакции, что в итоге на фоне недостаточности антиоксидантной системы может привести к избыточному накоплению в организме продуктов ПОЛ (альдегиды, пероксиды, кетоны и высокотоксичные металлокомплексы) и вызывать состояние, которое еще именуют «свободнорадикальная патология» или «окислительный стресс» [3].

Механизм синдрома перекисидации при стрессе заключается в следующем: стресс-реакция, включая эндокринное звено (гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников), сопровождается выбросом катехоламинов и, как следствие, повышением оксигенации крови, активацией через аденилатциклазную систему липолиза в жировой ткани и мобилизации большого количества жирных кислот. Избыток кислорода, субстрата, торможение аэробного окисления и потребления жирных кислот в клетках способствует вспышке свободнорадикального окисления. В результате и происходит накопление в тканях гидроперекисей, ненасыщенных альдегидов, малонового диальдегида и других токсических агентов, которые подавляют активность гликолиза, окислительного фосфорилирования и сопряженного с ним дыхания, ингибируют синтез белка, мембрансвязывающих ферментов и нуклеиновых кислот, повреждают мембранные структуры и нарушают их проницаемость. При этом усиление процессов ПОЛ ведет к интенсивному расходу антиоксидантов, срыву физиологической антиоксидантной системы и вторичной активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, что усугубляет нежелательные последствия стресса [19].

Развитие окислительного стресса сопровождается снижением концентрации в организме антиоксидантов неферментной природы. При этом хронический дефицит в рационе антиоксидантов вызывает снижение в крови уровня общего глутатиона, падение резистентности мембран эритроцитов к ПОЛ, что является следствием недостатка токоферола и других антиоксидан-

тов в эритроцитах и в конечном итоге ведет к усилению процессов ПОЛ в тканях и органах стрессируемого организма [7].

Окислительный стресс составляет биохимический механизм свободнорадикальной патологии, которая лежит в основе этиопатогенеза беломышечной болезни, токсической дистрофии печени, алиментарной энцефаломалиции и экссудативного диатеза цыплят, болезней нервной системы, сахарного диабета собак и злокачественных опухолей. При этом для патологии, возникающей при стрессе, характерны дистрофические процессы не только в желудочно-кишечном тракте, мускулатуре, печени и поджелудочной железе, но и в костном мозге, а именно: происходит замедление процессов образования миелоидных стволовых клеток, эритропоэза и синтеза гемоглобина. Активности процессов ПОЛ в нервной ткани способствует высокое содержание в ее составе фосфолипидов, холестерина, жирных кислот, цереброзидов и триацилглицеролов, а также высокая концентрация катализаторов свободнорадикальных реакций – ионов железа и меди. На фоне недостатка микроэлемента селена происходит нарушение процессов тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования в связи с недостаточностью глутатион-глутатионпероксидазной системы и, как следствие, накапливаются недоокисленные продукты обмена, нарушающие липидный и углеводный обмен, наступает инфильтрация и дистрофия печени, дистрофические изменения в скелетной и сердечной мускулатуре [11].

В процессе развития стрессового состояния накапливающиеся в организме высокоактивные продукты свободнорадикального окисления липидов являются одной из причин, приводящих к супрессии неспецифической иммунологической резистентности организма. В дальнейшем чрезмерная активация свободнорадикальных процессов, вследствие повышенного образования активных форм кислорода, сопровождается нарушением рецепторных взаимодействий и деструктивными изменениями в системе

клеточного и гуморального иммунитета [10].

Выделяют самостоятельную форму иммунодефицита – стрессорный иммунодефицит, крайним проявлением которого является состояние, при котором на непродолжительное время иммуноглобулины сыворотки крови исчезают полностью под влиянием протеаз в условиях резкого закисления внутренней среды организма, а фрагменты иммуноглобулинов сорбируются на форменных элементах [4].

Стрессорные гормоны (кортикостероиды) ингибируют миграцию стволовых клеток и В-клеток из костного мозга, взаимодействие Т- и В-клеток, вызывая транзиторную лимфопению. При стрессе, наряду с изменением количественного состава лимфоцитов, изменяется общая масса лимфоидной ткани в организме (атрофия тимуса, инволюция селезенки и т. д.), что является морфологической предпосылкой развития иммунодефицита [5, с.172].

Широкое распространение в промышленном животноводстве получили вторичные (приобретенные) иммунодефициты, которые неотделимы от стресса и сопутствуют большинству заболеваний. Основными механизмами развития вторичных иммунных дефицитов является потеря и гибель клеток иммунной системы путем некроза и апоптоза, а также инактивация клеток иммунной системы путем адсорбирования на их поверхности или накоплением внутри клетки ингибиторов (медиаторов воспаления, антибиотиков тетрациклиновой группы, аутоантител к лимфоцитам и др.). Иммунные дефициты проявляются желудочно-кишечным, респираторным, септическим синдромами, а также высокой предрасположенностью к злокачественным новообразованиям, аутоиммунным, инфекционным и инвазионным заболеваниям [12].

Стресс и иммунодефицитное состояние, с одной стороны, дополняют друг друга, с другой – не обходятся друг без друга. Резкое уменьшение иммуноглобулина А, Т-лимфоцитов, ослабление фагоцитоза в слизистой кишечника и увеличение в крови

ПОЛ, глюкозы и других веществ являются характерными как для стресса, так и для иммунодефицита. Нервная, эндокринная и иммунная системы в организме животных функционируют по принципу взаимной регуляции. Стресс-обусловленные нарушения нейроэндокринных механизмов могут играть важную роль в патогенезе расстройств иммунной системы, а иммунологические механизмы могут участвовать в патогенезе нервных и эндокринных болезней. При этом центральным звеном, координирующим нейроэндокринно-иммунные взаимоотношения, является гипоталамо-гипофизарная система [8; 22].

Синдром стрессорного ответа и иммунная система в силу общности реакций на действие разных стрессоров имеют двухсторонние связи: нейрональные структуры влияют на иммунокомпетентные клетки в той же степени, как и иммунная система на синдром стрессорного ответа. При этом гипоталамус является ключевой структурой регуляции как синдрома стрессорного ответа, так и (по сути его части) функции иммунокомпетентных клеток, и эти структуры используют одни пути эфферентной информации от периферических сенсоров. Иммунокомпетентные клетки также располагают рецепторами к ацетилхолину, глюкокортикоидам, катехоламинам и нейропептидам. Существует определенное сходство ответа гипоталамуса и других отделов стрессорной системы на действие экзогенных антигенов, т.е. стрессоров. В ответ на внедрение иммунного антигена повышается активность ядер гипоталамуса, усиливается продукция кортикотропин-релизинг-фактора, аргенина-вазопрессина, окситоцина и происходит активация оси гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников. За усилением центрального звена следует активация симпатической нервной системы, периферической адренергической иннервации, повышение секреторной активности коркового и мозгового вещества надпочечников [23].

Регуляция функции иммунной системы нейрогуморальными медиаторами осущест-

вляется гуморальным путем, и каждый медиатор стимулирует или угнетает активность макрофагов, Т- и В- лимфоцитов в зависимости от дозы вещества и вида антигена. Иммуносупрессивное действие оказывают адреналин и норадреналин, серотонин, гистамин и терапевтические дозы глюкокортикоидов. Кроме того, имеются данные о том, что количество Т-хелперов при различных стрессорных ситуациях снижается иногда на фоне повышения количества супрессоров и их активности, ведущих к уменьшению активности Т-системы. В свою очередь Т-супрессоры также чувствительны к действию глюкокортикоидных гормонов, что может приводить к стимуляции иммунологических реакций. Чрезмерное повышение иммунологических реакций лежит в основе патологических процессов аллергического характера и аутоиммунных заболеваний [15].

Существует прямая зависимость между стрессорными воздействиями, процессами ПОЛ, снижением иммунобиологической активности и повреждением сурфактанта легких, гемодинамики и секреторной деятельности слизистой верхних дыхательных путей с последующим развитием пост-стрессовых пневмоний у животных. Гормоны стресса кортизол и АКТГ снижают устойчивость животных к бактериальным, вирусным, риккетсиозным и грибковым инфекциям, протозойным заболеваниям, гельминтозам. Кроме того, вызывают активацию латентных инфекций и обуславливают гибель животных от обычно непатогенной для них флоры слизистых оболочек респираторного тракта и кишечника [24; 26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, основная роль в стрессовой дезадаптации принадлежит активизации процессов свободнорадикального окисления и перестройке нейроэндокринного регуляторного звена с последующим развитием иммунодефицитного состояния, ведущего к возникновению нозологически дифференцированной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Барабой, В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В.А. Барабой // *Успехи современной биологии*. – 1991. – Т. 111, вып. 6. – С. 923–931.
- 2 Белявский, В.Н. Патоморфологические изменения в органах крыс при хроническом эмоционально-болевым стрессе (ЭБС) и различной антиоксидантной обеспеченности / В.Н. Белявский, В.В. Малашко, Л.Б. Заводник // *Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сб. науч. тр. / ГрГАУ; под ред.: В.К. Пестиса*. – Гродно, 2004. – Т. 3. – С. 17–21.
- 3 Бузлама, В.С. Активные формы кислорода, антиоксиданты, адаптогены / В.С. Бузлама // «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных»: *Междунар. науч.-практ. конф.*, 21–23 сентября 2004 г. / Воронежский гос. унив. – Воронеж, 2004. – С. 183–186.
- 4 Виденин, В.Н. Профилактика и лечение послеоперационных осложнений / В.Н. Виденин // *Ветеринарный консультант*. – 2005. – № 11 – 12. – С. 8–11.
- 5 Виноградов, В.В. Стресс и патология / В.В. Виноградов. – Минск: Белорус. наука, 2007. – 351 с.
- 6 Голиков, А.Н. Адаптационный синдром у коров в молочном комплексе / А.Н. Голиков // *Актуальные проблемы ветеринарной науки: тезисы докладов*. – Москва, 1999. – С. 186–187.
- 7 Девяткина, Т.А. Антиоксидантная недостаточность и реакция тканей на острый эмоционально-болевым стресс / Т.А. Девяткина, Л.М. Тарасенко, Э.Г. Коваленко // *Вопросы медицинской химии*. – 1989. – Т. 35. – Вып. 5. – С. 45–49.
- 8 Динамика поведенческих реакций и уровня кортизола у мышей под влиянием комбинированного применения мексидола, диазепама, тимогена и гипербарической оксигенации в условиях иммобилизационного стресса / В.Г. Подсевакин [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2008. – Т. 71. – № 1. – С. 22–25.
- 9 Ефимов, И.А. Стрессоустойчивость коров различных пород / И.А. Ефимов // *Аграрная наука*. – 2002. – № 7. – С. 16–17.
- 10 Жаркой, Б.Л. Влияние активных форм кислорода на функциональную активность компонентов иммунной системы / Б.Л. Жаркой, М.И. Рецкий // «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных»: *Междунар. науч.-практ. конф.*, Воронеж, 21–23 сентября 2004 г. / Воронежский гос. унив. – Воронеж, 2004. – С. 40–44.
- 11 Кармолиев, Р.Х. Биохимические процессы при свободнорадикальном окислении и антиоксидантной защите. Профилактика окислительного стресса у животных: обзор / Р.Х. Кармолиев // *Сельскохозяйственная биология. Серия биология животных*. – 2002. – № 2. – С. 19–27.
- 12 Карпуть, И.М. Механизм развития вторичных иммунных дефицитов / И.М. Карпуть // *Ученые записки УО ВГАВМ: по материалам междунар. науч. - практ. конф.: «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии» посвящ. 80-летию основания УО ВГАВМ 4–5 ноября 2004 года; под ред. А.И. Ятусевича*. – Витебск, 2004. – Т. 40. – Ч.1. – С. 69–70.
- 13 Коган, Б.М. Стресс и адаптация / Б.М. Коган. – М.: Знание, 1980. – 64 с.
- 14 Козак, В.Л. Влияние стресса на здоровье животных и человека / В.Л. Козак // *Практик*. – 2007. – № 4. – С. 6–9.
- 15 Корнеева, Е.А. Стресс и функции иммунной системы / Е.А. Корнеева, Э.К. Шхинек // *Успехи физиологических наук*. – 1989. – Т.20. – С. 3–20.
- 16 Кузнецов, А.И. Новый способ определения стрессовой чувствительности рысистых лошадей / А.И. Кузнецов, С.В. Надоленко // *Коневодство и конный спорт*. – 2007. – № 4. – С. 17–20.
- 17 Кузнецов, А. Поросята и стресс: как решить проблему / А. Кузнецов // *Животноводство России*. – 2005. – № 2. – С. 27.
- 18 Кузнецов, А. Решение проблемы стресса у поросят / А. Кузнецов // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. – 2008. – № 10. – С. 20–21.
- 19 Любина, Е.Н. Влияние добавок препарата В-каротина на содержание микроэлементов и окислительные процессы в тканях молодняка свиней / Е.Н. Любина // *Актуальные вопросы аграрной науки и образования: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА 20–22 мая 2008 г. / Ульян. ГСХА*. – Ульяновск, 2008. – С. 86–89.
- 20 Муруев, А.В. Стимуляция гипоталамо-гипофизарной системы у крупного-рогатого скота на ранней стадии постнатального онтогенеза / А.В. Муруев, Ж.Н. Жапов, П.С. Лиханов // *Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: материалы Междунар. науч. конф., к 100-летию со дня рожд. Засл. деят. науки д.в.н. проф., акад. ВАСХНИЛ Я.Р. Коваленко*.

16–17 мая 2006 г. / ГНУ «ВНИИЭВ им. Я.П. Коваленко». – Москва, 2006. – С. 559–560.

21 Плященко, С.И. Стрессы у сельскохозяйственных животных / С.И. Плященко, В.Т. Сидоров // М.: Агропромиздат, 1987. – 192 с.

22 Соколов, В.Д. Необходимость постоянной фармако-коррекции стрессов и иммунодефицитов животных / В.Д. Соколов // Новые ветеринарные препараты и кормовые добавки: экспресс-информация / Санкт-Петербург. гос. акад. вет. мед. – Санкт-Петербург, 2001. – Вып. № 9. – С. 3–4.

23 Титов, В.Н. Биологическая функция стресса, врожденный иммунитет, реакция воспаления и артериальная гипертония / В.Н. Титов // Клинич. лабор. диагностика. – 2008. – № 12. – С. 3–16.

24 Хаитов, Р.М. Иммунитет и стресс / Р.М. Хаитов, В.П. Лесков // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87. – № 8. – С. 1060–1072.

25 Шилкина, Л.В. Стресс / Л.В. Шилкина // Ветеринария с/х животных. – 2007. – № 8. – С. 12.

26 Effect of transportation on fatal fibrinous pneumonia and shrinkage in calves arriving at a large feedlot / C.S. Ribble [et al.] // J. Am. Vet. Med. Assoc. – 1995. – Vol. 207. – P. 612–615.

УДК 619: 636: 615: 331: 339

Айшпур Е.Е., кандидат ветеринарных наук

Сапон Н.В., младший научный сотрудник

Институт ветеринарной медицины Национальной академии аграрных наук, г. Киев

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ЭНТЕРОПАТИИ СВИНЕЙ В СВИНОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ УКРАИНЫ

Резюме

Учитывая культуральные особенности *Lawsonia intracellularis*, техника изоляции бактерий в чистой культуре для диагностики не используется. Чаще применяются для этого гистологические, гистохимические и цитологические методы, иммуноферментный анализ и молекулярно-генетические исследования. Используя эпизоотологические, клинические, патологоанатомические, гистологические, микроскопические, серологические исследования, установлено наличие илеита свиней в свиноводческих хозяйствах Украины.

Всего проведено 167 исследований сывороток крови свиней разного возраста из 13 хозяйств 7 областей Украины, 36,5 % сывороток дали положительную реакцию на наличие антител к *Lawsonia intracellularis*. При гистологическом исследовании найдены изменения, характерные для илеита. Из 48 микроскопических исследований биоматериалов, в том числе фекалий свиней, получено 10 положительных результатов (20,8 %).

Summary

Due to cultural properties of *Lawsonia intracellularis* methods and techniques of isolation bacteria in pure culture for diagnostic are not generally used. The methods of histological, histochemical, ELISA and molecular genetic investigations have been of more routine application in this case. Due to performance of epizootic, clinical, pathoanatomic, histological, microscopic, serological tests and investigations, persisting of the ileitis in Ukrainian pigfarms has been established.

167 sera samples have been investigated from pigs of different age in 13 pigfarms of 7 Ukrainian regions and 36,5% serum samples were seropositive to *Lawsonia intracellularis*. Characteristic ileitis changes were found during histological investigations. 10 positive results (20,8 %) of 48 samples (including feces samples) were received after microscopic examinations.

Поступила в редакцию 12.10.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Пролиферативная энтеропатия свиней (ПЭС) (региональный илеит, кишечный аденоматоз, геморрагическая энтеропатия, некротический энтерит) – инфекци-

онная болезнь, характеризующаяся расстройствами деятельности кишечника и прогрессирующим похудением свиней в группах доращивания и откорма.

Болезнь недостаточно изучена в нашей

стране, поэтому при обнаружении ее в свиноводческих хозяйствах специалисты ветеринарной медицины не имеют возможности вовремя диагностировать и дифференцировать болезнь, а, следовательно, и предупредить экономический ущерб от нее [1, 2].

Возбудителем пролиферативной энтеропатии свиней является *Lawsonia intracellularis* – грамотрицательная бактерия семьи *Desulfovibrio*, которая имеет в общем изогнутую форму, иногда бывает прямой размером 0,3–0,4×1,5–2,0 мкм, неподвижная, микроаэрофильная, облигатный внутриклеточный паразит, который не растет на питательных средах [3–5]. *Lawsonia intracellularis* паразитирует в цитоплазме энтероцитов пролиферативного эпителия слизистой оболочки кишечных бляшек подвздошной и других участков тонкого и толстого отделов кишечника.

По данным зарубежных исследователей 85 % из 45 обследованных хозяйств в европейских странах серопозитивные к *Lawsonia intracellularis*, а в 37 хозяйствах провинции Онтарио (Канада) уровень серопозитивности достигал 90 % из свиноматок и 56 % из подсвинков в период окончания откорма [6]. Были серопозитивные и 65 % сывороток крови из 2250 исследованных в свиноводческих хозяйствах Китая [7]. Серологические исследования доказывают широкую распространенность пролиферативной энтеропатии свиней в США, как и в Европе, где положительные стада составляют от 60 до 100 % [3, 4].

В странах Евросоюза при полном запрете стимуляторов роста с января 2006 года и требования ограничить использование антибиотиков в терапевтических целях, бактерия *Lawsonia intracellularis*, которая вызывает пролиферативную энтеропатию свиней, получила еще большее распространение.

Целью нашей работы было на основе мониторинговых диагностических исследований изучить распространение пролиферативной энтеропатии свиней в свиноводческих хозяйствах Украины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в лаборатории бактериальных болезней животных Института ветеринарной медицины Национальной академии аграрных наук Украины и в свиноводческих хозяйствах Украины. Всего проведено 167 исследований сывороток крови свиней разного возраста в 13 хозяйствах 7 областей Украины (Донецкая, Харьковская, Днепропетровская, Полтавская, Киевская, Кировоградская, Черкасская).

Диагноз на пролиферативную энтеропатию свиней устанавливали комплексно на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических, гистологических, микроскопических, бактериологических, серологических исследований.

Материалом для исследования служили больные, вынужденно убитые и погибшие свиньи разных возрастных групп (начиная от подсосного возраста и до окончания откорма) с признаками отставания в росте, характерной диареи, а также пробы фекалий животных.

Для гистологического исследования отбирали кусочки пораженной кишки, фиксировали их 10 % нейтральным водным раствором формалина и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Для серологического мониторинга использовалась тест-система bioScreen Ileitis Antibody ELISA, представленная нам компанией Bioscreen European Veterinary Disease Management Center GmbH (Германия).

При микроскопическом исследовании биоматериалов использовали методы окрашивания по Граму и Дифф-Квику (специальное быстрое окрашивание биопрепаратов), Циль-Нильсену.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При клиническом обследовании свиноводческих хозяйств Украины в последнее время было обнаружено, что у поросят, преимущественно в возрастной группе от 35 до 100 дней, отмечались такие довольно неясные симптомы, как снижение

или отсутствие аппетита, потеря массы, похудение, бледность кожи, апатия, рвота; часто они сопровождались диареей, температурой тела в пределах 38,8–39,5 °С; наблюдались летальные случаи.

При патологоанатомических исследованиях находили поражения подвздошной, слепой и, иногда, ободочной кишок. Проплиферативные изменения варьировали, но всегда проявлялись утолщением стенки подвздошной кишки и общим увеличением ее диаметра за счет значительного разрастания слизистой оболочки. По-

верхность слизистой оболочки влажна, но без слизи, в ней наблюдались петехиальные кровоизлияния. У некоторых поросят обнаруживали коагуляционный некроз слизистой оболочки ободочной кишки, при этом слизистая оболочка была в состоянии геморрагического воспаления с участками, покрытыми серовато-желтой творожистой массой, которая плотно прилипала к ее поверхности. В просвете кишечника часто находили сгустки крови, его содержание темно-красного или черного цвета.

Рисунок 1 – Утолщение стенки подвздошной кишки в результате пролиферативных изменений, общее увеличение ее диаметра при разрастании слизистой оболочки (патматериал отобран от павших свиней группы откорма возрастом 145–150 дней)



Гистологические изменения исследованных кусочков подвздошной кишки были разнообразными. В одних участках они были характерны для язвенно-некротического илеита, а в других – для пролиферативной энтеропатии. В цитоплазме пролиферирующих клеток, преимущественно в их апикальной части, обнаруживали микроорганизмы, которые очень слабо воспринимали краску и имели вид крупных, иногда согнутых палочек.

достаточную информацию о циркуляции возбудителя в хозяйствах, которую можно использовать при оценке акклиматизации ремонтных свиноматок и хряков, введенных в стадо. Результаты исследований представлены на рисунке 2.

В обследованных хозяйствах при патологоанатомическом вскрытии павших животных обнаружены патологоанатомические изменения, характерные для пролиферативной энтеропатии свиней.

Серологические исследования дают

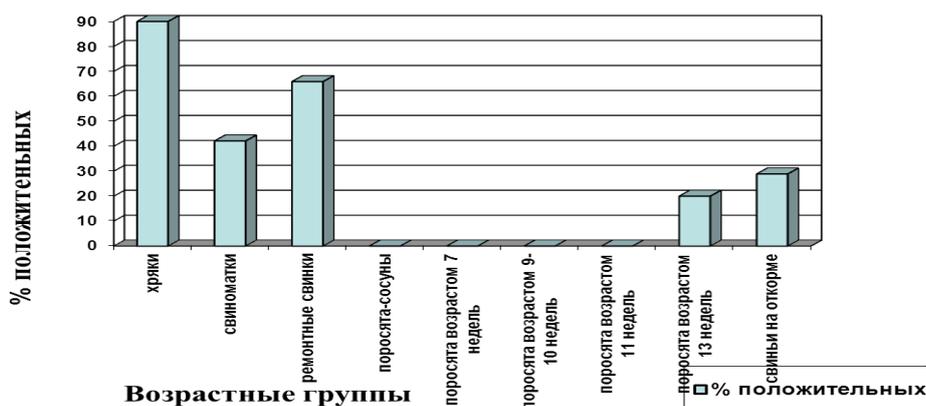


Рисунок 2 – Серопозитивность разных групп свиней к *Lawsonia intracellularis*

Согласно приведенным данным 36,5 % сывороток крови дали положительную реакцию на наличие антител к *Lawsonia intracellularis*. Это, в основном, сыворотки от свиноматок, ремонтных свинок и свиней на откорме, которые могут служить источниками инфекции для всего поголовья хозяйства. Эти данные совпадают с данными зарубежных исследователей [3, 4, 6, 7].

Очень трудно получить корректное заключение по стаду при небольшом количестве отобранных проб. Обобщая результаты наших наблюдений, мы рекомендуем такой оптимальный вариант взятия проб крови от разных возрастных групп свиней при исследовании на наличие антител к *Lawsonia intracellularis* – от ремонтных свинок, свиноматок (супоросных и / или лактирующих), хряков, поросят-сосунов, поросят возрастом 7–11 недель, поросят возрастом 13 недель, свиней на откорме. Такой объем исследований позволяет установить серологический профиль стада и провести предварительную оценку эпизоотической ситуации в комплексе с другими данными эпизоотического статуса стада.

При проведении микроскопических исследований 48 биоматериалов, в том чис-

ле фекалий свиней, получено 10 положительных результатов (20,8 %). В мазках при цитологических исследованиях выявляли внутриклеточные микроорганизмы, которые имели вид прямых или изогнутых палочек, локализованных в цитоплазме эпителиальных клеток кишечника.

ВЫВОДЫ

1 Впервые в Украине серологически в ИФА подтверждено наличие антител к возбудителю илеита и соответственно циркуляция возбудителя у свиноголовья Украины. В свиноводческих хозяйствах инфекция имеет тенденцию к широкому распространению у поросят на откорме (28,9%), источник инфекции – основное стадо (хряки – 90,0% серопозитивные, ремонтные свинки – 65,9%, свиноматки – 42,1%).

2 В свиноводческих хозяйствах Украины пролиферативная энтеропатия свиней имеет признаки хронического течения, особое распространение она имеет в свинокомплексах, которые завозят ремонтное поголовье из-за границы, где существуют ограничения применения антибиотиков в хозяйствах-донорах.

ЛИТЕРАТУРА

1 Павлов, Е.Г. Проявление пролиферативной энтеропатии в свиноводческих хозяйствах Украины [Текст] / Е.Г. Павлов, А.Е. Айшпур, Н.В. Сапон // Научное издание «Ветеринарная биотехнология». Бюллетень. – 2009. – №15. – С.285–290.

2 Березовский, А.В. К диагностике, лечению и профилактике пролиферативной энтеропатии свиней [Текст] / А.В. Березовский, А.И. Поживил, В.В. Сенча // Ветеринарная практика. – 2008. – №11. – С.28–29.

3 Keller, C. A blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis* [Text] / C. Keller, V. F. Ohlinger, A. Nordengran, M. Merza // Proc. of the 18th Congress of the International Pig Veterinary Society, June 27 – July 1 – 2004 – Hamburg, Vol. 1 – P.253.

4 Keller, C. Enterisol® Ileitis ELISA provides accurate test results for the detection of antibodies against *L. intracellularis* using plasma or serum [Text] / C. Keller, H. Schoeder, V.F. Ohlinger // Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, Denmark. – 2006.

5 Динев, И. Случай пролиферативной энтеропатии свиней в Болгарии и испытание ряда альтернативных методов ее диагностики [Текст] / И. Динев, М. Лютсканов, И. Никифоров, В. Урмова // Российский ветеринарный журнал. – «Колос». – 2006. – № 4. – С. 20 – 23.

6 Corzo, C.A. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in Ontario swine herds [Text] / C.A. Corzo, R.M. Friendship [et al.] // J Swine Health Prod. – 2005. – Vol.13. – P. 314–317.

7 Hardge, T. Serological prevalence of *Lawsonia intracellularis* across European pig herds [Text] / T. Hardge, C. Keller, R. Steinheuer [et al.] // Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, Denmark. – 2006.

Кузнецов И.Н., кандидат технических наук
Ручай Н.С., кандидат технических наук, доцент

УО «Белорусский государственный технологический университет», г. Минск

ПОВЫШЕНИЕ КАЧЕСТВА БЕЛОКСОДЕРЖАЩЕГО КОРМОВОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ВЗВЕШЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЫ ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКЕ

Резюме

Послеспиртовая барда является отходом производства этанола. Уровень накопления барды в Республике Беларусь составляет около 1,3 млн. т в год. Использование барды в качестве жидкой кормовой добавки ограничивается сроками хранения и остаточным содержанием этилового спирта. Актуальным является глубокая комплексная переработка барды с получением импортозамещающей белоксодержащей кормовой добавки. Традиционная сухая барда (DDGS) имеет невысокое содержание истинного белка и усвояемость на уровне 50–55%. Актуальным является повышение качества сухого кормового продукта за счет ферментативного расщепления полисахаридных компонентов барды (клетчатки) с целенаправленным культивированием специальных штаммов дрожжей.

Исследования направлены на изучение эффективности ферментативного расщепления взвешенных веществ барды с целью повышения качества готового продукта. В исследованиях были использованы комплексные ферментные препараты различных производителей, присутствующие на рынке Республики Беларусь. Все ферментные препараты показали хорошую эффективность с расщеплением клетчатки на уровне 25–39%.

Summary

Alcohol stillage is a waste of ethanol production. Level of stillage production in Belarus is near 1,3 million ton per year. The using od this waste as a feed are limited by shelf life and residual alcohol content. The complex processing of stillage with protein containing feed additive production is an actual. Traditional DDGS has not high protein content with low digestability on the level of 50–55%.

The actual question is to increase of quality of dry feed additive by carbohydrates of stillage (first of all cellulose) zymolysis with purposeful cultivation of special strains of yeasts.

The research is aimed at studying the efficiency of enzymatic degradation stillage of suspended solids to improve the quality of the finished product. In the study used complex enzymes from different manufacturers which present in the market of the Republic of Belarus. All enzymes have shown good performance with splitting cellulose at 25–39%.

Поступила в редакцию 03.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Послеспиртовая барда является отходом производства этилового спирта. Производство этанола – самое крупнотоннажное биотехнологическое производство в мире. В Республике Беларусь спиртовая отрасль бурно развивается, практически все спиртовые заводы модернизируются, что позволяет не только повысить качество конечного продукта, но и увеличить производственные мощности. Однако увеличение объемов производства основного продукта – этилового ректификованного спирта – приводит к

накоплению значительных объемов отхода – послеспиртовой барды, которой на сегодняшний день в Беларуси вырабатывается около 1,3 млн. т в год. Барда является продуктом переработки зерна злаковых (рожь, тритикале, пшеница).

Крахмал зерна подвергается микробиологической переработке в ходе спиртового брожения с получением этанола, в то время как остальные компоненты, в том числе растительный белок, остаются в неизменном виде и переходят в барду. Данный отход представляет собой густую жидкость, содержащую остатки зерна,

имеющую влажность 92–94% и содержащую, кроме белка, биомассу клеток спиртовых дрожжей, биологически активные вещества, клетчатку. Традиционно, барда используется в качестве жидкой кормовой добавки, однако высокая влажность ограничивает сроки хранения (до 2 суток), а остаточное содержание этилового спирта неблагоприятно влияют на здоровье сельскохозяйственных животных.

В мировой практике наибольшее распространение получила технология сухой

барды (DDGS). Схема процесса представлена на рисунке 1. Взвешенные вещества барды отделяются центрифугированием. Фугат упаривается в 3-х или 4-х корпусной выпарной установке до концентрации сухих веществ 30–35%. Концентрат смешивается с кеком и высушивается в сушилке. Технология требует значительных энергетических затрат на обезвоживание барды, при этом усвояемость продукта составляет 50–55% [1].

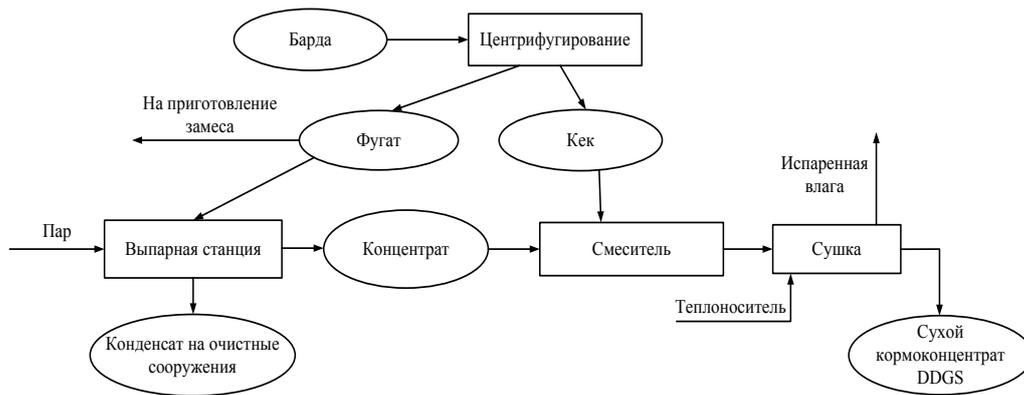


Рисунок 1 – Технология сухой барды

Существенной проблемой является высокое содержание клетчатки (13–18%) при невысокой доле истинного белка (до 20%). Этот показатель может быть увеличен до 45–50% обогащением барды белком в результате аэробного культивирования на барде дрожжей рода *Candida*. При этом резко возрастает кормовая ценность барды из-за обогащения ее, кроме белка, витаминами группы В и другими биологически активными веществами. Появляется возможность получения полноценной кормовой белково-витаминной добавки. Однако технология получения кормового белка одноклеточных является энергозатратным производством и по стоимости не может конкурировать с соевым белком.

Таким образом, в условиях Республики Беларусь целесообразным является не только комплексное использование зернового сырья, но и импортозамещение соевого белка за счет местных белковых

компонентов.

На кафедре биотехнологии и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета была разработана технология комплексной переработки послеспиртовой барды с получением обогащенного белком сухого кормового продукта [2], включающая ферментативную обработку послеспиртовой барды комплексным ферментным препаратом с целью расщепления полисахаридных компонентов (прежде всего клетчатки), целенаправленное культивирование специального термотолерантного штамма дрожжей рода *Lachancea* в анаэробных условиях с последующим отделением и сушкой обогащенных одноклеточным белком взвешенных веществ барды с получением белоксодержащей кормовой добавки.

Лабораторное моделирование процессов ферментативно-микробиологической переработки барды показало существен-

ное повышение качества сухого кормового продукта на основе взвешенных веществ послеспиртовой бардой в сравнении с традиционной сухой бардой. Доля истинного белка увеличилась с 20 до 30% [3].

Целью настоящего исследования являлось сравнение активности различных ферментных препаратов по отношению к клетчатке взвешенных веществ барды с выбором наиболее эффективного.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объектом исследования являлись ржаная послеспиртовая барда ОСП ПЦ «Березинский спиртовой завод» ОАО «Минск Кристалл». Проведенные исследования состава послеспиртовой барды показали, что сухие вещества барды на 57% представлены взвешенными веществами, содержащими, главным образом, протеин (31,3%) и клетчатку (18,1%). Высокое содержание клетчатки обусловило целесообразность изучения эффективности ферментативного расщепления полисахаридных компонентов барды с использованием различных ферментных препаратов, обладающих целлюлазной активностью. Технология комплексной переработки послеспиртовой барды должна обеспечить максимальное использование сухих веществ барды для получения кормового продукта, качество которого значительно выше в сравнении с традиционной сухой бардой.

Эффективность ферментативной обработки анализировали на накоплению редуцирующих веществ в фугате барды и по степени биотрансформации клетчатки.

Для расщепления полисахаридных компонентов барды использовали следующие кормовые ферментные препараты:

- «Rovabio Excel AP» (производитель «Adisseo» (Франция)), основные ферменты – глюканоаза, ксиланаза, целлюлаза;

- «Фекорд-2004» (производитель ООО «Фермент» (Беларусь)), основные

ферменты – ксиланаза, целлюлаза, амилаза;

- «Целлолюкс А» (производитель ООО «Сиббиофарм» (Россия)), основные ферменты – целлюлаза, ксиланаза, глюканоаза;

- «Натузим» (производитель «БИО-PROTON» (Австрия)), основные ферменты – целлюлаза, фитаза, протеаза, амилаза.

Ферментный препарат в виде 1%-го раствора вносили в послеспиртовую барду в количестве 0,25–1,0 мл на 100 мл барды с последующей выдержкой в течение суток при температуре 42°C. Степень ферментативного расщепления полисахаридов барды оценивали по содержанию редуцирующих веществ в растворе и доле клетчатки во взвешенных веществах (кеке).

В таблице 1 и 2 представлены результаты ферментативной обработки барды по изменению содержания клетчатки в кеке и накоплению редуцирующих веществ в фугате барды соответственно.

По результатам исследования эффективности расщепления клетчатки различными ферментными препаратами (таблица 1) наилучший результат был достигнут при использовании Rovabio Excel AP с достижением степени биотрансформации 39%. Все остальные ферментные препараты дали сравнительно одинаковые результаты (25–27%), что также является хорошим показателем.

Накопление редуцирующих веществ в фугате барды (таблица 2) также свидетельствует об эффективности ферментативного расщепления компонентов взвешенных веществ барды. Наилучший результат был получен при использовании ферментных препаратов Rovabio Excel AP и Целлолюкс-А. При этом стоит отметить, что редуцирующие вещества накапливаются не только за счет расщепления клетчатки, но и других компонентов ввиду комплексной ферментативной активности ферментных препаратов.

Таблица 1 – Изменение содержание клетчатки в кеке барды

Фермент	Объем 1%-го раствора ферментного препарата, мл	Содержание клетчатки, %	Изменение содержания клетчатки по сравнению с исходной бардой, %
Rovabio Excel AP	0,25	13,4±0,1*	26
	0,50	12,8±0,1*	29
	0,75	12,1±0,1*	33
	1,00	11,1±0,1*	39
Фекорд - 2004	0,25	15,5±0,1*	14
	0,50	14,4±0,1*	20
	0,75	14,3±0,1*	21
	1,00	13,3±0,1*	27
Целлолюкс-А	0,25	16,4±0,1*	10
	0,50	15,9±0,1*	12
	0,75	14,5±0,1*	20
	1,00	13,4±0,1*	26
Натузим	0,25	16,1±0,1*	11
	0,50	15,8±0,1*	13
	0,75	14,7±0,1*	19
	1,00	13,6±0,1*	25
Исходная барда	0,00	18,1±0,1*	–

Примечание – * $P < 0,05$; $R^2 > 0,95$

Таблица 2 – Содержание редуцирующих веществ в фугате барды

Фермент	Объем 1%-ого раствора ферментного препарата, мл	Содержание редуцирующих веществ, %
1	2	3
Rovabio Excel AP	0,25	0,40±0,01**
	0,50	0,45±0,02**
	0,75	0,52±0,01**
	1,00	0,53±0,01**
Фекорд - 2004	0,25	0,37±0,02**
	0,50	0,39±0,01**
	0,75	0,43±0,01**
	1,00	0,44±0,01**
Целлолюкс-А	0,25	0,38±0,01**
	0,50	0,42±0,01**
	0,75	0,47±0,01**
	1,00	0,55±0,01**
Натузим	0,25	0,34±0,01**
	0,50	0,35±0,01**
	0,75	0,37±0,01**
	1,00	0,38±0,01**
Исходная барда	0,00	0,27±0,01**

Примечание – ** $P < 0,01$; $R^2 > 0,95$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительное расщепление полисахаридных компонентов (в первую очередь клетчатки) позволяет не только повысить удельную долю белка в готовом кормовом продукте на основе взвешенных веществ барды, но и позволяет за счет перевода взвешенных веществ в растворенное состояние осуществлять целенаправленное культивирование специальных штаммов дрожжей. Вещества, находящиеся в растворенном состоянии, являются питанием для микроорганизмов и дают возможность накопить биомассу, что не только повышает долю истинного белка в готовом продукте, но и дает возможность использовать труднорасщепляемые компоненты (клетчатку) с переводом за счет микробиологических процессов в более ценные компоненты. Различия в эффективности ферментативной обработки взвешенных

веществ барды связаны, в первую очередь, не с качеством комплексных ферментных препаратов, а с активностью конкретных ферментов в их составе, обусловлены спецификой задач, под которые они производятся. Кроме этого, характеристики послеспиртовой барды на разных спиртовых предприятиях существенно отличаются в зависимости от технологий производства суслу для получения этанола и используемых видов зернового сырья. Результаты исследований показали, что для разработанной на кафедре биотехнологии и биоэкологии БГТУ технологии можно использовать различные кормовые ферменты с подбором оптимальных вводимых доз. Взаимозаменяемость препаратов, обладающих комплексной ферментативной активностью, дает возможность их выбора в зависимости от стоимости и наличия на рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1 Кузнецов, И.Н. Анализ мирового опыта в технологии переработки послеспиртовой барды / И.Н. Кузнецов, Н.С. Ручай // Труды БГТУ. Сер. 4, Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2010 – Вып. 18. – С.294–301.

2 Кузнецов, И.Н. Технология переработки послеспиртовой барды с получением кормового продукта и биогаза / И.Н. Кузнецов, Н.С. Ручай, А.И. Лембович, М.А. Сазановец // Известия НАН Беларуси. Сер. Физ.-техн. наук. – 2012. – №4. – С. 119–124.

3 Кузнецов, И.Н. Микробиологическая переработка послеспиртовой барды / И.Н. Кузнецов, Н.С. Ручай // Производство спирта и ликероводочных изделий – 2013. – №3. – С. 7–10.

**Средство антисептическое
«ЭКСТРАФИТОМАСТ»**
для санитарной обработки вымени лактирующих коров
и профилактики маститов

содержит жидкие экстракты лекарственных трав - цветы ромашки, календулы и листья крапивы

оказывает антимикробное действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии (эшерихии, стафилококки, стрептококки), дрожжи

не раздражает кожу, не обладает аллергенными свойствами, оказывает смягчительное действие

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор
Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, академик НАН Беларуси
Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук
Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК «ПАРВОВАК»

Резюме

В работе приводятся данные литературы и собственные исследования авторов по проблеме парвовирусного энтерита собак в мире и Республике Беларусь, а также методические подходы при конструировании вакцины и ее эффективности при лабораторных и производственных испытаниях.

Summary

In work these literatures and own researches of authors on a problem of parvoviral enteritis of dogs are given in the world and Republic of Belarus, and also methodical approaches when designing a vaccine and its efficiency at laboratory and production researches.

Поступила в редакцию 24.11.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Парвовирусный энтерит собак – широко распространенная контагиозная болезнь, проявляющаяся рвотой, геморрагическим гастроэнтеритом, миокардитом, дегидратацией и гибелью щенков возрастом до 5 месяцев.

К инфекции восприимчивы не только собаки, но и волки, енотовидные собаки, лисицы, песцы, кошки, тигры, гепарды, бурые медведи.

Впервые заболевание было зарегистрировано в Бельгии в 1976 г., затем в США, Австралии, Канаде, Франции, ФРГ, Англии и других странах. Заболевание встречается также в Российской Федерации и странах СНГ, в том числе в Беларуси [1–6]. В Беларуси официальная статистика по этому заболеванию не ведется, поэтому истинные размеры его распространения не известны. Однако нами выявлено несколько его случаев в г. Минске среди домашних собак.

Парвовирусный энтерит представляет серьезную угрозу для служебных собакопитомников и индивидуальных собаководов, а также потенциальную опасность для пушного звероводства. Вопросы эпизоото-

логии, клинико-морфологического проявления, диагностики и профилактики указанного заболевания достаточно изучены. Однако со стороны государственной ветеринарной службы Республики Беларусь этому заболеванию уделяется недостаточное внимание, не ведется его официальная статистика, не производятся диагностикумы и вакцины.

В зарубежных странах такие препараты разработаны и производятся. Закупкой и реализацией их в нашей стране в ограниченных масштабах занимаются частные ветеринарные клиники и аптеки, что значительно удорожает стоимость препаратов, объемы и эффективность их применения, а также требует затраты валютных средств.

Поэтому разработка и налаживание производства отечественных диагностикумов и вакцин против парвовирусного энтерита собак является важной практической задачей.

Наши исследования были посвящены конструированию жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против парвовирусного энтерита собак и разработке рациональной технологии ее производства.

Для реализации указанной цели решались следующие задачи:

1 Изыскание рациональных способов получения вирусного сырья для изготовления вакцины.

2 Отработка методов и режимов инактивации вируса.

3 Определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине.

4 Конструирование вакцины и изучение ее безвредности, стерильности и иммуногенности.

5 Изучение срока годности вакцины.

6 Разработка ТНПА на вакцину.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на нелинейных белых мышах, кроликах породы Шиншилла, преимущественно самцах массой 2–3 кг и серонегативных собаках различных пород массой 10–15 кг.

В работе использовали вирус парвовирусного энтерита собак штамм КМИЭВ-14в, который селекционирован из выделенного от собак эпизоотического штамма и адаптирован к культурам клеток CRFK. Указанную культуру клеток использовали и для накопления вирусного сырья при производстве вакцины.

Для выявления и титрования вируса парвовирусного энтерита собак применяли диагностические наборы «Парво-тест» и ИФА производства компании «Нарвак» (Россия).

Для инактивации вакцинного вируса использовали теотропин по ТУ 931004200495549-М производства ООО «Веда М» ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, в качестве адьюванта – гидроксал по ГОСТ 18287.

Титрацию вируса парвовирусного энтерита собак проводили в РГА со свинными эритроцитами и с помощью ИФА, титрацию антител к парвовирусу в РТГА с этими же эритроцитами с 4–8 гемагглютинирующими единицами вируса по общепринятым методикам [5].

Определение контаминации вирусных материалов и вакцины бактериями и

грибами проводили по ГОСТ 28085-89 и ГФ 11, вып. 2, с. 196–197, 2000–2001. На питательных средах с посевами роста колоний бактерий и грибов не допускалось.

Определение безвредности вакцины. Объединенную пробу из двух флаконов после тщательного смешивания вводили 10 мышам в область подкожной клетчатки спины в объеме 0,5 см². Наблюдение за животными проводили в течение 10 дней. Результаты учитывали по отсутствию местных реакций и выживаемости животных.

Определение срока годности вакцины. Для установления срока годности сконструированной вакцины три ее серии были проверены на иммуногенную активность, бактериальную и грибковую стерильность и безвредность через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения при температуре плюс 10°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение вирусного сырья для изготовления вакцины. Культивирование вируса парвовирусного энтерита собак (ПВЭС) на культуре клеток CRFK со средой Игла проводили в статических условиях в 1,5 литровых матрасах и в 2-литровых роллерах при температуре 37±0,5°C. Заражающая доза вируса составляла 0,0005 ГАЕ/кл. Вирус вносили одновременно с клетками. Контроль состояния зараженного клеточного монослоя осуществляли ежедневно путем просмотра матрасов и роллеров под микроскопом. Урожай вируса собирали через 3–4 суток культивирования. С целью разрушения клеток и высвобождения вирусных частиц в культуральную жидкость, матрасы и роллеры замораживали при температуре минус 18–20°C в течение 18 и более часов.

Наибольшее накопление вакцинного вируса происходило при роллерном способе культивирования (8,0±0,25 log₂). Существенной разницы в титрах вируса через 3 и 4 суток культивирования не выявлено.

Отработка метода и режима инактивации вируса. Для инактивации вируса

теотропин добавляли до конечной концентрации 0,05; 0,1 и 0,15% и выдерживали в термостате при температуре +37°C, периодически перемешивая. Через 0, 12, 24 и 36 часов отбирали пробы материала и тестировали на инфекционную активность путем заражения культуры клеток CRFK в дозе 4–8 ГАЕ на пробирку. Опыт повторяли в 3 повторностях.

В результате было установлено, что теотропин в концентрации 0,1 и 0,15% через 24 и 36 часов при температуре 37°C полностью инактивировал вирус. В меньшей концентрации и в более короткие сроки препарат лишь снижал титр вируса. В дальнейшей работе для инактивации вируса ПВЭС мы использовали интервал 24 часа и 0,15%-ную концентрацию теотропина.

Определение оптимальной концентрации гидроксида для конструирования вакцины. В культуральную жидкость вируса ПВЭС добавляли гидроксид в концентрации 5 и 10 об%. Смесь вируса с различной концентрацией гидроксида выдерживали, помешивая в течение 18 часов, в холодильнике при температуре 4°C и центрифугировали при 4000 об/мин. в течение 20 минут. Надосадочную жидкость вируса ПВЭС титровали в РГА. С целью контроля титрации одновременно подвергали и исходный вирус без добавления гидроксида. Оптимальной считалась та концентрация гидроксида, при которой он максимально сорбировал вирус. Опыт проводили в 3-х повторностях.

В результате установлено, что оптимальной концентрацией гидроксида для сорбции вируса является 10 об.%. Титр вируса при этом в надосадочной жидкости по сравнению с контролем снижался на 6,0 log₂. В дальнейшем указанная концентрация гидроксида использовалась нами при изготовлении вакцины.

Конструирование вакцины и изучение ее стерильности, безвредности и иммуногенности. Вакцина представляет собой жидкость светло-розового цвета со

слабой опалесценцией. Для конструирования вакцины в качестве вирусосодержащего материала использовали вирус ПВЭС КМИЭВ-14в в титре 7,0–8,0 log₂, выращенный в культуре клеток CRFK, в качестве инактиватора вируса – теотропин в 0,15% концентрации, в качестве адьюванта – гидроксид в концентрации 10 об%.

Способ изготовления вакцины включал репродукцию вируса, его инактивацию и конструирование вакцины.

Вирус ПВЭС репродуцировали на культуре клеток CRFK со средой Игла и 10% сыворотками эмбрионов крупного рогатого скота в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в 2-литровых роллерных флаконах при температуре +37°C. Заражающая доза вируса составляла 0,0005 ГАЕ/кл. Урожай вируса собирали через 3–4 суток культивирования после предварительного замораживания и оттаивания матрасов и флаконов.

Вирусное сырье инактивировали теотропином в 0,15%-ной концентрации в течение 24 часов при температуре +37°C и добавляли гидроксид до конечной концентрации 10 об%. Вакцина была стерильной в отношении бактериальной и грибковой микрофлоры. При подкожном введении по 0,5 см³ белым мышам не вызывала их гибели и патологических изменений в месте введения.

Для установления срока годности сконструированной вакцины три ее серии были проверены на иммуногенную активность, бактериальную и грибковую стерильность и безвредность через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения при температуре 10–18°C.

При этом установлено, что вакцина оставалась стерильной и безвредной в течение 24 месяцев (срок наблюдения). Однако иммуногенная активность ее после 18-месячного срока хранения снижалась. Поэтому в условиях хранения при плюс 10–18°C оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления (таблица 1).

Таблица 1 – Биологическая активность, стерильность и безвредность жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против ПВС в зависимости от срока хранения (n-3)

№ п/п	Показатели	Сроки хранения, месяцев			
		6	12	18	24
1	иммуногенная активность	8,0	8,0	7,0	5,0
2	стерильность	+	+	+	+
3	безвредность	+	+	+	+

Примечание – « + » положительный результат; титры антител к ПВС в \log_2

Первоначальные исследования были посвящены определению рациональной иммунизирующей дозы вакцины.

В опыт было взято 4 группы кроликов, по 7 в каждой. Животных 2-х групп иммунизировали инактивированным вирусом с 10% гидроксала. Первой группе животных ввели вирус в объеме $1,0 \text{ см}^3$, второй – в объеме $2,0 \text{ см}^3$. Третью группу кроликов с целью сравнения иммунизировали российской вакциной «Мультикан-8» в дозе по $2,0 \text{ см}^3$. Четвертая группа неиммунизированных кроликов служила контролем.

Вакцины вводили подкожно двукратно с интервалом 21 день. Через 14 и 28 дней после иммунизации от животных были получены пробы крови и определен титр антител против вируса ПВЭС.

В результате у всех животных получен положительный иммунный ответ уже к 14 дню после введения вакцины. Наиболее высокие титры антител имели животные, вакцинированные по $2,0 \text{ см}^3$ сконструированной вакциной против ПВЭС и вакциной «Мультикан-8». К 28 дню после иммунизации вышеуказанные животные имели защитные титры антител 1:256. В местах введения вакцин припухлостей и болезненности в течение всего опыта не отмечалось.

Изучение иммунологической эффективности вакцины против парвовирусного энтерита проведено также в опыте на собаках. Для этого были подобраны серонегативные животные, которых распределили на четыре группы по принципу

аналогов, по 6 животных в каждой. Животных первой группы вакцинировали конструируемой вакциной двукратно по $1,0 \text{ см}^3$ с интервалом 21 день. Вакцину вводили внутримышечно с внутренней поверхности бедра.

Животных второй группы иммунизировали по такой же схеме по $2,0 \text{ см}^3$, а животных третьей группы – вакциной Мультикан-8 по $2,0 \text{ см}^3$. Невакцинированные животные четвертой группы служили контролем.

До вакцинации, через 21 день после первого введения вакцины и через 14 дней после второго введения у всех вакцинированных животных были отобраны пробы крови с целью определения титров антител. Титры антител против парвовирусного энтерита определяли в РТГА.

За всеми животными вели наблюдение в течение 21 дня после вакцинации.

В результате у животных, вакцинированных вакциной против ПВЭС, титры антител к парвовирусу на 21-й день после первого введения вакцины и на 14 день после второго введения были относительно высокими и практически не отличались от титров антител у животных, вакцинированных вакциной Мультикан-8 (против чумы, парвовируса, аденовируса, коронавируса, лептоспироза и бешенства) ($6,0-8,0 \log_2$). Все животные в течение 21 дня после вакцинации оставались клинически здоровыми, имели хороший аппетит, какие либо местные реакции на месте введения вакцины отсутствовали.

В производственном опыте иммунологическая эффективность экспериментальной серии вакцины проверялась согласно программе, утвержденной начальником Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Минсельхозпрода Республики Беларусь.

В Брестской горветстанции было привито сконструированной вакциной 68 собак разных возрастов и пород, принадлежащих гражданам Бреста. Вакцину вводили подкожно за лопаткой дважды с интервалом 21 день: для собак крупных пород в дозе 2,0 см³, для собак мелких пород – 1,0 см³. Жалобы со стороны владельцев собак, осложнения или заболевания после прививок животных в течение месячного патронажа не отмечены.

ВЫВОДЫ

1 Вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против парвовирусного энтерита собак «Парвовак» является безвредным, стерильным и высоко иммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческим вакцинам зарубежного производства.

2 При иммунизации указанной вакциной кроликов и собак двукратно с интервалом 14–21 день в объеме 2,0 см³ через 28–35 дней от начала иммунизации они имели более высокие титры антител 1:128–1:256, чем при иммунизации коммерческой вакциной Мультикан-8 1:64–1:256.

3 Сконструированная вакцина в каче-

стве вирусосодержащего материала включает вирус ПВЭС КМИЭВ-14в в титре 7,0–8,0 log₂, выращенный в культуре клеток CRFK, в качестве инактиватора вируса – теотропин в 0,15%-ной концентрации, в качестве адьюванта – гидроксал в концентрации 10 об%.

4 Способ изготовления вакцины включает репродукцию вируса, его инактивацию и конструирование вакцины.

Вирус ПВЭС репродуцируют на культуре клеток CRFK со средой Игла и 10% сыворотками эмбрионов крупного рогатого скота в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в 2-литровых роллерных флаконах при температуре 37°C. Заражающая доза вируса составляла 0,0005 ГАЕ/кл. Урожай собирают через 3–4 суток культивирования после предварительного замораживания и оттаивания матрасов и флаконов.

Вирусное сырье инактивируют теотропином в 0,15%-ной концентрации в течение 24 часов при температуре 37°C и добавляют гидроксал до конечной концентрации 10 об%.

5 Хранение при температуре 4–10°C обеспечивает годность вакцины в течение 18 месяцев со дня изготовления.

6 На основании проведенных исследований разработаны ТНПА (ТУ, опытно-промышленный регламент, инструкция по применению) на вакцину жидкую культуральную инактивированную сорбированную против парвовирусного энтерита собак «Парвовак».

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных./ В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина //М., 1998. – 927 с.
- 2 Шуляк, Б.Ф. Вирусные инфекции собак / Б.Ф. Шуляк //М: ОПИТА.– 2004. – 560 с.
- 3 Castro, T.X. Canine parvovirus and intestinal parasites Laboratory diagnosis and clinical signs from puppies with gastroenteritis/ T.X Castro, C.M. Uchoa, N.V. Laborthe // Intern J. Apple Res . Vet. Med. Vol. 5.– N2. – 2007.
- 4 Savigny, M. Canine parvovirus enteritis /M. Savigny, K.M. Douglass // Standards of care .December 2007. – Vol. 9. 11
- 5 Prittie, J. Canine parvovirus enteritis. A review of diagnosis, management and prevention// Journal of veterinary Emergency and critical care. Vol. 14. Issue 3, September 2004. – P. 167–176
- 6 Vippan, K. Canine parvovirus enteritis in papp / K. Vippan, P. Heigo, K. Parveen, S. Hanish, V. Mohanwadhavan // Animals of veterinary and animal Science. Aug-Oct. – 2015.

Кравченко Е.В., кандидат биологических наук*
Ольгомец Л.М., научный сотрудник**

* Государственное предприятие «Академфарм», г. Минск

**ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск

ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДА PRO-LEU НА ОБУЧЕНИЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОМУ ОБОРОНИТЕЛЬНОМУ РЕФЛЕКСУ ИНБРЕДНЫХ КРЫС SHR

Резюме

Сопоставлены эффекты стандартного ноотропного средства пирацетам и дипептида Pro-Leu (Sigma, США): оценено их возможное влияние на выработку условнорефлекторного навыка (с аверсивным подкреплением) и уровень тревожности крыс SHR. Длительное применение пролил-лейцина (ИФБ-30; 25-29 или 88 введений, в/ж, 0,5 мг/кг) облегчает обучение крыс SHR инструментальному УР нажатия на педаль в оперантной камере (с аверсивным электроболевым подкреплением). Эталонный ноотроп пирацетам (25-29 или 88 введений, в/ж, 250 мг/кг) оказывает статистически значимо менее выраженное действие, чем пролил-лейцин. При этом эффективная доза пирацетама в 500 раз превышает таковую тестируемого дипептида. В условиях длительного применения (56 введений в/ж) ни дипептид Pro-Leu (0,5 мг/кг), ни пирацетам (250 мг/кг) в тесте темной/светлой камеры не оказывали статистически значимого анксиолитического эффекта (т.е. не снижали уровень тревожности).

Summary

Psychotropic effects of the standard nootropic piracetam and Pro-Leu (Sigma, USA) in relation to generation of conditional reflex (with aversive reinforcement) in SHR rat were compared. In addition, we studied the influence of Pro-Leu and piracetam on the level of anxiety of SHR rat. Prolonged use of Pro-Leu (administration per os, 25-88 fold, 0.5 mg/kg) improves learning of rats SHR instrumental conditional reflex of pressing a pedal in an operant chamber. The nootropic effect of dipeptide was statistically significantly higher, and effective dose was 500 times lower than the dose of a reference nootropic. In conditions of prolonged use (administration per os, 56 fold) nor the Pro-Leu (0.5 mg/kg), neither piracetam (250 mg/kg) in dark/bright camera test had not statistically significant anxiolytic effect (i.e., did not reduce the level of anxiety).

Поступила в редакцию 09.12.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Сосудистые заболевания головного мозга сопровождаются двигательными и сенсорными нарушениями, а также когнитивными нарушениями, которые могут достигать уровня деменции; у пациентов отмечаются делирий, личностные изменения, аффективные расстройства, галлюцинации, а также более ограниченные дефекты высших мозговых функций (апраксия, афазия, мнестические расстройства) [2]. По некоторым данным, сосудистая деменция (СД) по распространенности уступает лишь болезни Альцгеймера (БА) [17]. Артериальная гипертензия (АГ) является известным фактором риска возникновения

инсульта и сосудистых когнитивных нарушений, в том числе СД. У пациентов с ишемической СД значительно чаще встречается АГ по сравнению с лицами, страдающими БА [9]. В случаях, когда АГ встречается у лиц среднего возраста, вероятность возникновения когнитивных нарушений выше, чем при более позднем ее развитии [9]. В связи с вышесказанным, высоко актуально проведение исследований с использованием адекватных экспериментальных моделей, ведущих к разработке эффективных лекарственных средств (ЛС) для профилактики и терапии когнитивных расстройств, связанных с сосудистыми заболеваниями головного моз-

га. Такое ЛС могло бы применяться для улучшения когнитивных функций у лиц с АГ, рутинно выполняющих сложнокординационные виды деятельности (операторская деятельность, управление транспортными средствами и т.д.), в т.ч. осуществляемых в стрессогенных ситуациях.

Спонтанно гипертензивные крысы SHR – лабораторные крысы с генетически обусловленной патологией. В настоящее время особи указанной линии рассматриваются в качестве экспериментальной модели АГ и церебральных сосудистых нарушений [9]. Крысы линии SHR являются нормотензивными при рождении, однако у них постепенно (уже в первые 2–4 месяца) жизни развивается тяжелая гипертензия [9]. В 6 месяцев у инбредных крыс SHR развивается устойчивая гипертензия [9]. SHR – экспериментальная модель, наиболее широко используемая для оценки причин нарушений мозгового кровообращения и разработки способов его лечения [9]. У крыс SHR отмечено повышение с течением времени артериального давления, возникновение атрофии мозга, гибель нервных клеток, а также глиальные реакции – эти явления имеют много общего с нарушениями, возникающими на фоне АГ у человека [9]. Вышесказанное позволяет рассматривать крыс SHR как экспериментальную модель морфологических повреждений, индуцируемых АГ. Микроанатомические, поведенческие и нейрохимические изменения (в том числе дефицит холинергической нейротрансмиссии [9]) подкрепляют возможность использования животных указанной линии для моделирования СД [9]. Учитывая ранее полученные данные о позитивном влиянии дипептида Pro-Leu на процессы обучения [3, 5, 6], перспективна экспериментальная оценка его возможного облегчающего действия на оперантную деятельность инбредных крыс SHR.

Известно, что на когнитивные функции существенное влияние может оказывать эмоциональный статус тестируемого животного [23]. По данным Ferguson S.A.,

Gray E.P. (2005) [15], поведение инбредных самцов и самок крыс SHR (в сравнении с крысами Wistar-Kyoto (WKY) и Sprague-Dawley) характеризуется меньшими проявлениями тревожности в тестах открытое поле (ОП) и приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), причем эти различия усиливаются по мере старения [15].

Недостаточно полная информация по оценке уровня тревожности (УТ) лабораторных грызунов может затруднить анализ и привести к (частично или полностью) неверной интерпретации данных [11]. Bouwknecht J.A., Paylor R. (2008) подчеркивают: необходимо понимание того, что определение УТ невозможно с использованием одного только параметра одной единственной парадигмы [11]. Ранее нами было показано наличие анксиолитического действия дипептида Pro-Leu в условиях слабо выраженного «стресса новизны» – в аппаратах «ОПТО-МАХ» и Contextual Place Preference Box, а также в методике конфликтной ситуации (вариант Vogel) – в условиях стресса высокой интенсивности [8]. При оценке возможного влияния Pro-Leu на УТ в тесте «темная/светлая камера» крысам SHR и Wistar вводили дипептид однократно; в этих условиях пролиллейцин не влиял на УТ грызунов [8]. Поскольку нельзя исключить, что отсутствие эффекта дипептида было связано с недостаточной продолжительностью введения, нами была проведена оценка влияния Pro-Leu на УТ крыс SHR в тесте темной/светлой камеры на фоне длительного (свыше 2 месяцев) внутрижелудочного (в/ж) введения.

Целью исследования явилась оценка влияния длительного в/ж введения дипептида Pro-Leu на успешность выработки и воспроизведения условно рефлекторного навыка нажатия на рычаг в оперантной камере у инбредных крыс SHR, а также определение возможного воздействия пролиллейцина на уровень тревожности (УТ) крыс SHR в темной/светлой камере.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе исследования проводили оценку эффективности оперантной деятельности крыс, сопряженной с выработкой условного рефлекса (УР) нажатия на рычаг в режиме FR1 в оперантных камерах с 2 рычагами. Безусловным стимулом служило электрокожное раздражение лап через решетку пола. Если крыса не нажимала на педаль, то через каждые 1000 мс она получала электрокожное раздражение (10 импульсов, 0,4 мА, продолжительность – 500 мс). В том случае, если крыса нажимала на педаль во время действия аверсивного стимула, электроболовой шок немедленно прерывался (число полученных импульсов снижалось, и, в зависимости от скорости реакции животного, могло составлять от 1 до 9) – «число избавлений». Таким образом, животное, обучившееся манипулировать рычагами, могло сократить продолжительность электрокожного воздействия. Если животное осуществляло манипуляцию любым из рычагов до подачи электрического тока, это отставляло удар током на 60 с. Эффективность оперантной деятельности крыс оценивали по критериям: а) «число пропущенных ударов током»; б) общее число нажатий на рычаги во время электрошока, «число избавлений». Значения показателя «число пропущенных ударов током» представляет собой сумму значений параметра «число избавлений» (выработан инструментальный УР; применив этот навык, крыса сокращает продолжительность электрокожной стимуляции) и числа ударов током, не сопровождавшихся манипуляцией рычагами».

Оценивали оперантную деятельность крыс на протяжении 5 последовательных дней обучения. Обучение навыку нажатия на педаль проводили в режиме 5 дней в неделю, воспроизведение выработанного навыка осуществляли однократно спустя 82 дня (около 2,7 мес.) после 5-го обучающего сеанса. Продолжительность каждого из сеансов составляла

2 ч. Эксперименты осуществляли в утренние и дневные часы (в период 10.00–17.30). Исследования проводили на 23 белых инбредных крысах-самцах SHR; в начале обучения навыку нажатия на педаль возраст животных составлял 2–2,5 месяца, в конце эксперимента – от 4,7 месяцев до 5,2 месяцев.

Образцы применяли в/ж длительно, преимущественно в режиме 5–6 дней в неделю; в дни обучения и воспроизведения образцы применяли за 60 мин до высадки в оперантные камеры. При этом 1–5 дни обучения соответствовали 25–29 кратному применению тестируемых образцов, а воспроизведение навыка осуществлялось после 88 введений. Особям контрольной группы 1 (n=7) назначали растворитель (вода дистиллированная), крысам основной группы 2 (n=7) – пролил-лейцин (Sigma, США) в дозе 0,5 мг/кг, основной группы 3 (n=9) – пирацетам в дозе 250 мг/кг. Объем вводимого раствора составлял 1,0 мл на 100 г массы тела животного.

На втором этапе исследования определяли латентный период (ЛП) захода крыс SHR в темное отделение темной/светлой камеры. Указанный тест – один из батареи общепринятых методик, позволяющих оценить УТ лабораторных грызунов [1, 22]. Методика оценки поведения в темной/светлой камере основана на естественном стремлении грызунов избегать ярко освещенных мест [1, 10, 23]. Крысы, которые предпочитают проводить время в темноте и демонстрируют низкую амбулаторную активность, являются более эмоционально реактивными [10, 23]. Известно, что анксиолитики увеличивают ЛП захода в темное отделение [21].

Для оценки УТ крыс SHR в парадигме темной/светлой камеры использовали установку «PACS-30» (Columbus Instruments, США). «PACS-30» представляет собой камеру размером 24×23×23 см с электродным полом, разделенную перегородкой со встроенной автоматической гильотинной дверью на 2 отсека, один из ко- то-

рых освещался сверху лампой (150 люкс).

Параметры освещенности и аверсивного подкрепления устанавливались с использованием оригинального программного обеспечения «Pacs-30». Светлый отсек сообщался с темным отсеком прямоугольным отверстием размером 7×8 см. Животное помещали в освещенный (150 люкс) отсек двухсекционной камеры хвостом к отверстию и на протяжении 180 с регистрировали ЛП перехода из «опасного» светлого в «безопасный» темный отсек – ЛПперех. Если за этот период крыса не переходила в темный отсек, считали, что ЛПперех составляет 180 с. Увеличение значений названного показателя на фоне введения тестируемых образцов относительно таковых в контроле трактовали как анксиолитический эффект [21].

Возможные противотревожные свойства дипептида Pro-Leu изучали с использованием 23 половозрелых крыс SHR (возраст животных в период тестирования составлял около 3,5 месяцев). УТ в темной/светлой камере определяли у всех особей, которые были включены в эксперименты по выработке УР нажатия на педаль в оперантной камере. Грызунам контрольной группы 1 (n=7) назначали в/ж растворитель (вода дистиллированная), крысам основной группы 2 (n=7) – пролил-лейцин (Sigma, США) в дозе 0,5 мг/кг, основной группы 3 (n=9) – пирацетам; всего животным осуществлялось 56 введений тестируемых образцов, последнее введение – в день постановки эксперимента (за 1–3 ч до тестирования).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение способности к обучению у инбредных крыс SHR с ранее полученными нами в аналогичных условиях результатами у аутбредных крыс Wistar (условная норма) указывает на сопоставимое число пропущенных ударов током во 2 и 3 сеансах обучения у животных, получавших растворитель [4]. Однако у особей SHR от-

мечалось гораздо более низкое (в 2–8 раз) число избеганий ударов током и избавлений от аверсивного воздействия по сравнению с нормотензивными особями Wistar [4]. Эти данные могут быть интерпретированы как результат различий стратегий у особей Wistar и SHR в условиях аверсивного воздействия [20].

Число пропущенных ударов током. В контрольной группе у крыс SHR обучение не сопровождается статистически значимым снижением числа пропущенных ударов током от 1 к 6 сеансам ни в один из анализируемых периодов времени (0–0,5 ч, 0–1,0 ч, 0–1,5 ч, 0–2,0 ч). Уменьшение числа пропущенных ударов током от 1 к 6 сеансу (в период 0–2 ч) составило 22,1% (таблица 1). Статистически значимое снижение числа пропущенных ударов током (относительно исходного уровня в 1 сеансе обучения) при введении Pro-Leu отмечено в сеансе обучения 3 (периоды 0–0,5 ч, 0–1 ч), а также в сеансах 4 (0–1,5 часов), 5 (0–1 ч, 0–1,5 ч) и 6 (0–1,5 ч, 0–2 ч) (таблица 1). Применение пирацетама сопровождалось существенным (относительно исходного) уменьшением числа пропущенных ударов током в интервалы наблюдения 0–0,5 ч (только для сеансов 3 и 6) и 0–2,0 ч (только для сеанса 6) (таблица 1). Снижение числа пропущенных ударов током за 2 часа тестирования (от 1 к 6 сеансу) в случае применения Pro-Leu составило 50,7%, пирацетама – 49,6%. В наиболее «стрессовый» период эксперимента («стресс новизны» – первый сеанс, первые полчаса обучения) выявлены статистически значимые различия между пирацетамом и Pro-Leu (таблица 1). Число пропущенных ударов током на фоне дипептида в интервале обучения 0–0,5 ч было статистически значимо ниже в сравнении со стандартным ноотропом (на 19%).

Число избавлений от действия электрошока. У животных контрольной группы, а также у особей, получавших пирацетам в периоды 0–0,5 ч, 0–1,0 ч, 0–1,5 ч, 0–2,0 ч, отмечено сопоставимое чис-

ло избавлений от ударов током (таблица 2). Число соответствующих поведенческих реакций у крыс SHR, которым применяли Pro-Leu, несколько превышало контрольный уровень во все указанные периоды времени ($P>0,05$). Статистически значимых изменений показателя «число избавлений» в сравнении с исходным уровнем не выявлено ни в одной из групп сравнения.

Влияние дипептида Pro-Leu на поведение крыс SHR в темной/светлой камере. Показано, что ни дипептид, ни стандартный ноотроп существенно не влияют на значения ЛПперех крыс основных групп в сравнении с контролем – $P>0,05$. Ранее нами опубликованы данные [8] касательно сравнительной оценки поведения в темной/светлой камере инбредных крыс

SHR и аутбредных Wistar: особи, относящиеся к «условной норме» (крысы Wistar), несколько быстрее переходят в темное отделение камеры и проводят там больше времени ($P>0,05$). Заслуживает внимания следующий факт: в экспериментах с использованием крыс SHR и равно-активных нормотензивных крыс Wistar EPM-1 (в возрасте 4 мес.) в тестах ОП социального взаимодействия и ПКЛ «анксиолитическое поведение» крыс SHR (в сравнении с нормотензивным контролем) не связано с различиями в уровне подвижности [16]. Не исключено, что тенденция к более медленному переходу в темное отделение крыс SHR ($P>0,05$) на фоне введения Pro-Leu может косвенно указывать на анксиолитическое действие дипептида (что согласуется с данными [7, 8]).

Таблица 1 – Влияние Pro-Leu на динамику снижения числа пропущенных ударов током

Число пропущенных ударов током/группа	Приобретение навыка нажатия на рычаг					Воспроизведение навыка
	1 сеанс	2 сеанс	3 сеанс	4 сеанс	5 сеанс	
0 – 0,5 часа						
Растворитель (n=7)	22,9±1,3	22,6±1,5	19,7±2,0	20,4±2,7	21,0±2,6	18,0±3,9
Пролил-лейцин (n=7)	21,0±1,2	19,9±1,7	15,0±2,0*	15,3±2,6	15,9±1,8	16,9±2,4
Пирацетам (n=9)	25,1±0,7 ⁺	22,2±2,1	19,3±1,9*	21,4±2,1	20,3±2,1	18,9±2,5*
0 – 1 час						
Растворитель (n=7)	45,6±2,3	43,7±4,0	40,9±5,0	42,3±5,5	39,6±4,7	38,3±8,6
Пролил-лейцин (n=7)	41,6±1,7	41,1±3,1	31,9±4,2*	29,4±5,3	31,3±3,6*	32,1±5,1
Пирацетам (n=9)	46,0±1,8	45,0±3,9	39,4±4,1	43,3±4,5 ⁰	39,6±3,8	34,9±5,4
0 – 1,5 часа						
Растворитель (n=7)	67,6±3,6	65,0±5,8	61,7±7,9	61,1±7,5	61,1±7,2	56,7±11,9
Пролил-лейцин (n=7)	65,9±4,4	56,1±5,7	51,1±5,9	42,6±6,9* ^x	48,7±5,8*	48,7±7,4*
Пирацетам (n=9)	67,7±2,7	66,6±6,2	59,1±6,8	59,8±6,1	62,0±5,2	49,0±8,1 ^{x@}
0–2 часа						
Растворитель (n=7)	90,7±6,0	87,3±7,8	81,6±11,0	81,3±10,1	82,3±9,9	74,3±15,7
Пролил-лейцин (n=7)	87,4±3,3	74,3±7,9	66,7±7,8	56,6±10,1* ^x	66,0±7,7	58,0±8,3* ^x
Пирацетам (n=9)	90,2±4,5	88,1±8,0	79,0±9,0	79,8±8,2	82,0±6,8	60,3±10,4* ^{x0#@}

Примечания:

1 различия статистически значимы по сравнению: * – с исходным уровнем, критерий Даннета, ^x – с уровнем в день 2; ⁰ – с уровнем в день 3; [#] – с уровнем в день 4; [@] – с уровнем в день 5 (для дней 2–5 применен критерий Ньюмена-Кейлса); ⁺ – с основной группой 2 (пролил-лейцин);

2 осуществляли 25–29 введений (сеансы 1–5, выработка УР) или 88 введений (воспроизведение УР) тестируемых образцов: растворителя (в/ж), пролил-лейцина (0,5 мг/кг, в/ж) или пирацетама (250 мг/кг, в/ж).

Выявленное нами облегчение обучения оперантной деятельности на фоне применения Pro-Leu может объясняться как способностью дипептида нормализовать нарушенную холинергическую нейротрансмиссию [6], так и другими свойствами – в частности, ингибированием активности ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) [12]. Как известно, ингибиторы АПФ препятствуют образованию ангиотензина II [25] и обладают ноотропным действием [25]. Ангиотензин II характеризуется негативным влиянием на формирование памяти в условиях неассоциативного обучения [13] и препятствует высвобождению ацетилхолина в коре головного мозга [14].

Полученные данные могут быть полезны также и с учетом того, что инбредные крысы SHR являются моделью синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) [9, 18, 24]; указанное заболевание сопровождается нарушениями процессов кодирования информации, в том числе изменениями рабочей или крат-

косрочной памяти [18, 19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительное применение пролил-лейцина (ИФБ-30; 25–29 или 88 введений, в/ж, 0,5 мг/кг) облегчает обучение крыс SHR инструментальному условному рефлексу нажатия на педаль в оперантной камере (с аверсивным электроболевым подкреплением) и воспроизведение навыка оперантной деятельности. Эталонный ноотроп пирацетам (25–29 или 88 введений, в/ж, 250 мг/кг) оказывает статистически значимо менее выраженное действие, чем пролил-лейцин. При этом эффективная доза пирацетама в 500 раз превышает таковую тестируемого дипептида.

В условиях длительного применения (56 введений в/ж) ни дипептид Pro-Leu (0,5 мг/кг), ни пирацетам (250 мг/кг) в тесте темной/светлой камеры не оказывали статистически значимого анксиолитического эффекта (т.е. не снижали уровень тревожности).

ЛИТЕРАТУРА

1 Воронина, Т.А., Островская, Р.У. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под ред. Р.У. Хабриева)*. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 308–319.

2 Дамулин, И.В. *Когнитивные нарушения при сосудистых заболеваниях головного мозга: некоторые аспекты диагностики и терапии // Фарматека*. – 2011. – № 19. – С. 20–28.

3 Кравченко, Е.В., Максимова, Л.В. *Изучение ноотропной активности соединения ИФБ-30 в отношении дисгабитуации у инбредных мышей VALB/c // Новости медико-биологических наук*. – 2009. – № 1–2. – С. 82–86.

4 Кравченко, Е.В., Ганжурова, Л.В. *Влияние ноопепта на эффективность оперантной деятельности крыс Wistar, неустойчивых к действию стресса // Экология и животный мир*. – 2009. – № 1. – С. 18–23.

5 Кравченко, Е.В., Максимова, Л.В. *Изучение эффектов соединения ИФБ-30 при нарушениях неассоциативного обучения, вызванных пентилентетразолом // Новости мед.-биол. наук*. – 2009. – № 4. – С. 68–71.

6 Кравченко, Е.В., Максимова, Л.В. *Эффекты соединения ИФБ-30 на холинергическую нейротрансмиссию при нарушениях неассоциативного обучения, вызванных скополамином // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біял. навук*. – 2010. – № 4. – С. 91–94.

7 Кравченко, Е.В. *Влияние ИФБ-30 на выработку навыка доставания корма у инбредных мышей VALB/c / Е.В. Кравченко, И.В. Понтелеева // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы Междунар. научно-практ. конф., Гродно, 29–30 сентября 2011 г. / Гос. учреждение «Науч.-произв. центр «Ин-т фармакологии и биохимии Нац. акад. наук Беларуси»; редкол.: П.С. Пронько (отв. ред.), П.Т. Петров, В.А. Аверин*. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – С. 109–113.

8 Понтелеева, И.В., Кравченко, Е.В. *Анксиолитические эффекты дипептида ИФБ-30 с ноо-*

тропными свойствами // *Новости мед.-биол. наук.* – 2012. – Т. 6. – № 4. – С. 190–196.

9 Amenta, F., Tomassoni, D. 30. *Spontaneously Hypertensive Rat (SHR): An Animal Model of Vascular Brain Disorder // Animal Models of Dementia. Neuromethods.* – 2011. – Vol. 48 – P. 577–611.

10 Aulich, D. *Escape versus exploratory activity: An interpretation of rats' behaviour in the open field and a light-dark preference test // Behav. Processes.* – 1976. – V. 1. – P. 153–164.

11 Bouwknecht, J.A., Paylor, R. *Pitfalls in the interpretation of genetic and pharmacological effects on anxiety-like behaviour in rodents // Behav. Pharmacol.* – 2008 Sep. – V.19 (N 5–6). – P.385–402.

12 Byun, H.G., Kim, S.K. *Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from alaskan pollack skin // J. Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – Vol.35.– № 2. – P. 239–243.

13 Chalas, A., Conway, E.L. *No evidence for involvement of angiotensin II in spatial learning in water maze in rats // Behav. Brain Res.* – 1996. – Vol. 81.– N 1–2. – P. 199–205.

14 Domeney, A.M. *Angiotensin converting enzyme inhibitors as potential cognitive enhancing agents // J.Psychiatr.Neurosci.* – 1994. – V. 19. – N 1.–P. 46–50.

15 Ferguson, S.A., Gray, E.P. *Aging effects on elevated plus maze behavior in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley male and female rats. // Physiol. Behav.* – 2005. – V. 85–(N5). – P.621–628.

16 Goto, S.H. [et al.]. *Comparison of anxiety measured in the elevated plus-maze, open-field and social interaction tests between spontaneously hypertensive rats and Wistar EPM-1 rats // Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1993 Sep. – V.26 (N 9). – P.965–969.

17 Jiwa, N.S. [et al.]. *Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review // J. Neurochem.* – 2010. – Vol. 115, Issue 4. – P. 814–828.

18 Johansen, E.B. [et al.]. *Behavioral changes following PCB 153 exposure in the Spontaneously Hypertensive rat – an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity disorder/Behavioral and Brain. Fuct.* – 2014. – 10(1) – [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: <http://behavioralandbrainfunctions.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-9081-10-1>. – Дата доступа: 22.11.2015.

19 Meneses, A. [et al.]. *Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview // Rev. Neurosci.* – 2011. – V.22 (N 3). – P. 365–371.

20 Mikulecká, A. [et al.]. *Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. I. Cognitive-like behavior // Front. Behav. Neurosci.* – 2014. – V. 8:101. – [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00101/full>. – Дата доступа: 22.11.2015.

21 Ostrovskaya, R.U. [et al.] *On the problem of memory-anxiety interaction: anxiolytic effects of memory-improving dipeptide GVS-111 // Animal models in biological psychiatry / Ed. A.V. Kalueff. – N -Y: Nova Science Publishers, Inc., 2006. – P. 165–182.*

22 Ramos, A. [et al.]. *Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial // Behav Brain Res.* – 2008. – V.193 (N 2). – P.277–288.

23 Van der Staay, F.J. [et al.]. *Emotional reactivity and cognitive performance in aversively motivated tasks: a comparison between four rat strains.// Behavioral and Brain Functions.* – 2009. – V 5 (50). – [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа: <http://behavioralandbrainfunctions.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-9081-5-50>. – Дата доступа: 24.11.2015.

24Thanos, P.K. [et al.]. *Dissociation between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats in baseline performance and methylphenidate response on measures of attention, impulsivity and hyperactivity in a Visual Stimulus Position Discrimination Task // Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* – 2010. – V. 94. – P. 374–379.

25 Wright, J.W. [et al.]. *Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets // Progress in Neurobiology.* – 2008. – Vol. 84.– no. 2. – P. 157–181.

Темный Н.В., кандидат ветеринарных наук*
Богач Н.В., доктор ветеринарных наук, доцент**
Корчан Л.Н., кандидат ветеринарных наук***

*ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

**Одесская опытная станция ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Одесса

***Полтавская государственная аграрная академия, г. Полтава

ПАЗИТАРНЫЕ СИСТЕМЫ ОВЕЦ И КОЗ В ЛЕСОСТЕПНОЙ ЗОНЕ УКРАИНЫ

Резюме

В статье представлены результаты паразитологических исследований овец и коз личных подсобных хозяйств граждан, малых фермерских и крупных овцеводческих хозяйств трех областей лесостепной зоны Украины. Установлено в организме мелкого рогатого скота функционируют достаточно стабильные паразитарные системы, представленные класами гельминтов *Nematoda* ЭИ 2,5–91 %, *Trematoda* – 4,7–80 %, *Cestoda* – 22–80 % и простейшими семейства *Eimeriidae* – 34–100 %. Доминирующими сочленами функционирующих паразитарных систем являются стронгиляты пищеварительного канала ЭИ– 34–100 % в ассоциации с эймериями – 24–100 %, у молодняка хозяйств южных районов стронгиляты и мониезии соответственно 88–95% и 22–80 %. Паразитарные системы в популяциях мелкого рогатого скота функционируют круглогодично без выраженных клинических признаков характерных для отдельного заболевания.

Summary

The article presents the results of parasitological research of sheep and goats of private farms of citizens, small farms and large farms of the three areas of the forest-steppe zone of Ukraine. It has been established that in the body of small ruminants the relatively stable parasitic system represented by the class of worms *Nematoda* EI (2,5–91)%, *Trematoda* – (4,7–80)%, *Cestoda* – (22–80)% and the elementary family *Eimeriidae* – (34–100)% is functioning. Dominating articulated parasitic systems which functioning are digestive tract EI– strongylatos (34–100)% in association with eimerias – (24–100)% in juveniles cattle of the households in southern regions strongylatos and moniezioze (88–95)% and (22–80)% respectively. The parasitic systems in the populations of small ruminants are preset all year round without the expressed clinical symptoms which are typical for the separate disease.

Поступила в редакцию 04.12.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в условиях глобальной трансформации окружающей среды резко нарушаются структура и функции эволюционно сформированных паразитарных систем, возникают новые закономерности их существования, меняются экологические свойства компонентов паразитоценоза, рост инвазированности хозяйев и обострение паразитарной ситуации на отдельных территориях [3]. О распространении полиинвазий среди поголовья мелкого рогатого скота свидетельствуют сообщения исследователей из Украины,

Белоруссии, России, Франции, Кении и других стран [2, 4, 5, 7–9].

Большинство поголовья овец и коз лесостепной зоны Украины в последние годы содержится в малых фермерских и личных подсобных хозяйствах населения, где уровень инвазированности скота остается малоизвестным.

В связи с вышеизложенным нами поставлена цель определить распространение возбудителей наиболее экономично значимых гельминтозно-эймериозных ассоциаций среди овец и коз лесостепной зоны Украины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили фекалии овец и коз, которые постоянно содержались на пастбищах различного типа Полтавской, Харьковской и Донецкой областей. Отобранные пробы фекалий, травы и почвы на пастбищах исследовали на наличие яиц и личинок гельминтов, используя стандартизованные общеизвестные методы [7]. Выявленные при исследовании виды яиц и личинок гельминтов и ооцисты эймерий определяли используя справочную литературу [1, 10]. По результатам исследований анализировали экстенсивность и интенсивность инвазии гельминтами и эймериями с учетом количества животных на выпасаемых участках. Обследуемые пастбища по гидрологическим и географическим показателям условно разделили на два типа:

- низинные – долины рек и участки лугов, где на протяжении летнего периода сохраняются влажные, а в отдельных случаях и заболоченные участки за счет паводковых, грунтовых и атмосферных вод с богатой растительностью в течение всего пастбищного сезона;

- суходольные – размещены на возвышенных сухих берегах малых рек, на супесчаных и песчаных почвах, холмах, где талые и дождевые воды не задерживаются, а для отдельных участков пастбищ характерна бедность травостоя, особенно в засушливые годы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью определения степени поражения животных в течение 2006–2015 гг. исследовали 14488 образцов фекалий от овец и коз двух крупных (более 4 тыс. гол. овец), 5 фермерских (150–500 гол.) и 45 приусадебных хозяйств (3–15 гол. овец или коз). В результате копроларвоскопических исследований, а также 60 гельминтологических вскрытий кишечника, легких и печени от павших и вынужденно убитых животных установлено, что в организме овец и коз обследованных хозяйств лесостепной зоны Украины паразитирует 24 вида наи-

более распространенных эндопаразитов, из которых класс *Nematoda* включал 15 представителей подряда *Strongylata*, один подряд *Trichocephalata* и *Rhabdidata*, два представителя класса *Cestoda*; подряда *Anoplocephalata* рода *Moniezia expansa* и подряда *Taenia (larvae) Coenurus cerebralis* рода *Multiceps multiceps*. Класс *Trematoda* представлен *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceatum*, поражающие печень и *Paramphistomum ichikawai*, паразитирующих в рубце животных. Кроме гельминтофауны, как сочленов паразитарной системы, выявлены простейшие семейства *Eimeriidae*, из которых наиболее распространенными были *E. arloingi*, *E. intricata* *E. faurei*, *E. ninaekohljakimove*.

Анализ результатов проведенных исследований свидетельствует о том, что в личных подсобных хозяйствах граждан, небольших фермерских, а также подсобных хозяйствах промышленных предприятий и крупных овцеводческих хозяйствах лесостепной зоны Украины эпизоотология основных эндопаразитозов имеет свои особенности, которые обусловлены системой проведения противопаразитарных мероприятий, плотностью пребывания животных на различных пастбищах.

Результаты экстенсивности инвазии у овец фермерских и подсобных хозяйств предприятий при пасьбе животных на суходольных пастбищах отдельных областей лесостепной зоны Украины приведены в таблице 1.

Суходольные пастбища ЧАФ «Подолья» занимают прифермские территории, непригодные для земледелия, ПХ «Савинское ХПП» – на опушках лесных насаждений с супесчаной почвой, недалеко от водоемов с низкими берегами. На 1 га территории данных пастбищ насчитывали от 10 до 60 муравейников, а также находили различные виды моллюсков (3–8) экз. на площади в 10 м². Овцы ФХ «Елена» содержатся на территории молочно-товарной фермы и выпасаются отдельной группой на природных сухих участках, не имеющих водоемов. Пастбищные угодия данно-

го хозяйства по географическому расположению представляют северные районы Донецкой области, прилегающие с юга к Харьковской. Животные ФХ «Елена» были свободны от дикроцелий и трихурисов, но поражены мониезиями ЭИ (42 %), что свидетельствует о значительном заселении биотопов южных пастбищ арибатитными клещами *M. expansa* и *M. benedeni*, (промежуточными хозяевами мониезий)

при существенно низком количестве моллюсков (промежуточных хозяев дикроцелий) по сравнению с биотопами пастбищ в более северных районах Харьковской и Полтавской областей. Экстенсивность инвазии овец эймериями в хозяйствах трех обследованных областей регистрировали на высоком уровне (таблица 1). Степень инвазированности овец на низинных пастбищах приведена в таблице 2.

Таблица 1 – Экстенсивность инвазии у овец фермерских и подсобных хозяйств на сухоходельных пастбищах

Хозяйства	Экстенсивность инвазии, %				
	дикроцелии	стронгиляты пищеварительного канала	трихурисы	мониезии	эймерии
Полтавская область					
частная агрофирма «Подольяка»	73±0,4	100	75±1,02	–	100
Харьковская область					
подсобное хозяйство «Савинское ХПП»	61,5±1,3	100	23,0±1,01	–	60±0,11
Донецкая область					
фермерское хозяйство «Елена»	–	85±0,32	–	42±0,26	78±0,14

Таблица 2 – Экстенсивность инвазии у овец фермерских и подсобных хозяйств на низинных пастбищах

Хозяйства	Экстенсивность инвазии, %							
	дикроцелии	фасциолы	парафистомы	стронгиляты пищеварительного канала	диктиокаулы	мюллерии	стронгилоиды	эймерии
Полтавская область								
ФХ«Украина»	–	–	14±0,2	100	2,2±0,3	20±0,3	–	100
Харьковская область								
ФХ«Борщивка»	28±0,3	4,7±0,2	–	56±0,3	66±0,2	–	33±0,3	24±0,3

В пробах фекалий овец ФХ «Украина» Полтавской области, которые пасутся на низинных заболоченных лугах у опушки леса, в ассоциации паразитофауны доминировали стронгиляты пищеварительного канала и эймерии – 100 %, мюллерии – 20 %. В фекалиях 14 % обследованных животных выявляли яйца парамфистом. У овец ФХ «Борщивка», которые по постоянно содержатся на низинных лугах в пойме реки Балаклея Харьковской области, доминировали легочные и желудочно-кишечные стронгилятозы ЭИ

соответственно 66 % и 56 %, а затем дикроцелии – 28 %. Во всех обследованных хозяйствах среди ассоциации гельминтов регистрировали эймериозную инвазию, ЭИ которой составляла 24–100%.

По результатам исследований проб фекалий от овец крупных хозяйств ООО Агрофирма «Барвинківська» Барвенковского района Харьковской области и филиала «Ильичевка» ДП Агрофирма «Шахтер», АП «Шахта им. А.Ф. Засядько» Славянского района Донецкой области регистрировали четырнадцать различных вари-

антов ассоциаций гельминтов в сочетании с эймериями. По результатам наших исследований в крупных хозяйствах при довольно высокой концентрации овец на природных пастбищах эпизоотический процесс развивается с участием наиболее

экономически значимых гельминтов и эймерий тех же видов, которые выявлены у животных приусадебных и фермерских хозяйств, только с большей степенью экстенсивности и интенсивности инвазии. Данные поданы в таблице 3.

Таблица 3 – Полиинвазии у овец крупных хозяйств

Половозрастные группы	Экстенсивность инвазии, %						
	дикроцелии	стронгиляты жкт	нематоды	трихурисы	стронгилоиды	мониезии	эймерии
АФ «Барвинкивська» Харьковской области							
овцематки	80±1,32	30±1,22	50±0,13	–	–	35±0,18	53±0,42
рембараны	43±1,12	63±0,42	74±0,24	10±1,22	–	80±1,26	43 ±1,14
молодняк 10 мес.	65±0,46	88±0,12	23±1,32	90±0,42	10±0,22	80±3,28	85±0,32
Филиал «Ильичневка» ДП АФ «Шахтер» Донецкой области							
овцематки	84±1,02	100	50±0,18	7,6±1,44	–	22±3,32	84±0,44
плембараны	66±1,08	86±4,22	49±1,3	6,6±1,02	20±2,02	–	53±0,12
молодняк 10 мес	14±0,02	95±3,12	71±2,16	10±1,12	23±1,64	–	95±1,26

У овцематок и племенных баранов в конце пастбищного сезона доминировала полиинвазия, представляющая 5–6 видов гельминтов в сочетании с эймериями. Чаще ассоциации представляли: стронгиляты жкт+эймерии – 51 %, дикроцелии+стронгиляты+трихурисы+стронгилоиды+мониезии+эймерии – 15 %, дикроцелии+стронгилят+стронгилоиды+мониезии+эймерии – 18%, стронгиляты+трихурисы+мониезии+эймерии – 16 %.

Кроме гельминтозов системы пищеварения у 10 % ягнят текущего года рождения, начиная с октября месяца, регистрировали клинические признаки нарушения координации движения. При вскрытии черепа от вынуждено убитых животных находили различных размеров (от 5 мм до 12 мм) пузыри – *larvae Coenurus cerebralis* подрода *Taenia* рода *Multiceps multiceps*.

Во всех обследованных хозяйствах у овец различных половозрастных групп количественный и качественный состав возбудителей инвазии изменялся по сезонам года. Зимой доминировала тетраинвазия дикроцелиями, стронгилятами и мониезиями в ассоциации с эймериями: дикроцелии+стронгиляты+эймерии – 50 %, дикроцелии + стронгиляты + трихурисы + эйме-

рии – 50 %. Весной после окончания окота с мая происходит снижение инвазии дикроцелиями в среднем до 12,5 %, яиц мониезий не выявляли до июня.

Инвазия стронгилятами пищеварительного канала и эймериями стабильно остается на высоком уровне (94–100%). В таких хозяйствах новорожденный молодняк овец переболевает острой формой эймериоза. У ягнят трехмесячного возраста уже до выхода на пастбища регистрировали два вида возбудителей инвазии: эймерии – 15–30 %, и стронгилоиды 13–16 %. В конце мая, в зависимости от погодных условий, у молодняка текущего года рождения клинически проявляется острая форма мониезиоза. В это время из фекалий (18–45%) больных животных выделяли только одиночные яйца стронгилят пищеварительного канала и ооцисты эймерий. При вскрытии погибших или вынуждено убитых ягнят в тонком отделе кишечника находили неполовозрелых мониезий, достигших длины 50–80 см. В первой декаде июня из фекалий 93–100 % инвазированного молодняка выделяли яйца и членики мониезий. Инвазия нематодами и цестодами в ассоциации с эймериями достигала пика во второй половине августа. В сентябре из фекалий (1,2–3 %) овец текущего

года рождения выделяли первые яйца дикроцелий. Согласно полученных результатов исследований наиболее устойчивой ассоциацией эндопаразитов является сочетание стронгилят пищеварительного канала и эймерий. Необходимо отметить, что с тенденцией к жаркому и сухому лету, начиная с 2011 года, экстенсивность

инвазии фасциолами и парамфистомами заметно снижалась и на протяжении 2014–2015 гг. яиц данных трематод из фекалий мелкого рогатого скота не выделяли.

Распространение возбудителей инвазии у коз подсобных хозяйств граждан на суходольных пастбищах представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Экстенсивность инвазии при пасьбе коз на суходольных пастбищах

Области	Экстенсивность инвазии по видам паразитов, %					
	дикроцелии	стронгиляты ЖКТ	трихурисы	диктиокаулы	мониезии	эймерии
Полтавская	–	11,5±3,16	10±1,12	–	–	80±1,26
Харковская	37,5±3,1	100	33±2,06	85,7±1,02	14±3,06	83±1,16
Донецкая	–	100	15±3,14	12±1,24	20±3,22	45±1,24

В пригородной зоне коз, как правило, выпасают на прилегающих к населенным пунктам пустырях, парковых зонах. В сельской местности коз на пастбищах содержат на индивидуальных привязях или пасут небольшими по 5–10 голов группами у рек, прудов, по обочинам дорог или на полях после сбора зерновых культур.

Ассоциации возбудителей стронгилят пищеварительного канала+ диктиокаулы+трихурисы+дикроцелии+эймерии составляли 15,1 %, стронгиляты пищева-

тельного канала + трихурисы + диктиокаулы + мониезии + эймерии – 13,3 %; стронгилят пищеварительного канала+трихурисы + эймерии – 9,1%; стронгилят пищеварительного канала + дикроцелии + эймерии – 20,5 %; стронгилят пищеварительного канала+диктиокаулы – 13,7%; стронгиляты пищеварительного канала+эймерии – 28,3 %.

Экстенсивность инвазии сочленов паразитарной системы при пасьбе коз на низинных пастбищах приведена в таблице 5.

Таблица 5 – Экстенсивность инвазии при пасьбе коз на низинных пастбищах

Районы	Экстенсивность инвазии по видам паразитов, %							
	дикроцелии	фасциолы	стронгиляты пищеварительного канала	диктиокаулы	цистокаулы	мюллерии	стронгилоиды	эймерии
Полтавская область								
Шишацкий	–	–	70±0,2	–	–	96±1,6	–	58±0,4
Гадяцкий	–	–	68±0,8	–	–	85±2,2	–	88±1,2
Харьковская область								
Харьковский	30±1,1	80±0,1	100	15±2,1	20±1,6	–	10±2,4	100
Балаклеийский	–	60±3,1	66±0,4	–	25±4,2	–	15±1,6	25±0,2

На низинных пастбищах ассоциации гельминтов у коз представлены тетраинвазией: фасциолы+стронгиляты пищеварительного канала+ диктиокаулы+эймерии – 30,4%, стронгиляты пищеварительного канала+стронгилоиды+фасциолы+эймерии – 15,6 %; триинвазией – стронгиляты пищеварительного канала + мюллерии + эйме-

рии – 32,2%, стронгиляты пищеварительного канала+фасциолы+цистокаулы– 8,8%, двойной инвазией – фасциолы + цистокаулы – 4,7%, фасциолы+стронгилят пищеварительного канала – 8,3 %.

В результате обследования пастбищных биотопов на площади 1 м² обнаруживали от 2 до 6 экз. различных видов мол-

люсков: *Deroceram reticulatum*, *Zonitoides nitidus*, *Succinea putris*, *Chondrula tridens*, *Trichia hispida* и другие.

Паразитарная система у коз, содержащихся в приусадебных хозяйствах населения без выпаса, заметно отличалась от таковой на пастбищах и состояла из представителей стронгилят пищеварительного канала – буностом – 80% и стронгилоидов – $7,6 \pm 3,16$ % при интенсивности инвазии $12 \pm 0,22$ экз. яиц гельминтов в 1 г фекалий, а так же эймерий, ЭИ – $20 \pm 0,32$ %, ИИ – $12 \pm 0,1$ экз. ооцист в поле зрения микроскопа.

Таким образом гельминтозы и эймериозы овец и коз в лесостепной зоне Украины чаще встречаются в виде ассоциаций и остаются серьезной преградой для эффективного использования пастбищ жвачными животными.

ВЫВОДЫ

1 У овец и коз, содержащихся в условиях личных подсобных, малых фермерс-

ких и крупных хозяйств, функционируют достаточно стабильные паразитарные системы, представителями которой являются классы гельминтов *Nematoda* ЭИ – 2,5–100 %, *Trematoda* – 4,7–80 % и *Cestoda* – 22–80 %, простейшие семейства – *Eimeriidae* – 34–100 %.

2 При всех типах содержания овец и коз доминирующими сочленами функционирующих паразитарных систем являются стронгиляты пищеварительного канала ЭИ – 34–100 % в ассоциации с эймериями – 24–100 %. В хозяйствах южных районов Лесостепной зоны Украины доминирующими сочленами паразитарной системы у молодняка в пастбищный сезон являются стронгиляты и мониезии соответственно ЭИ – 88–95 % и 22–80%.

3 Паразитарные системы овец и коз функционируют круглогодично, чаще в хронической форме без выраженных клинических признаков, характерных для острого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Атлас гельмінтів тварин [Текст] / І.С. Дахно, А.В. Березовський, В.Ф.Галат та ін. // – К.: Ветінформ, 2001. – 118 с.
- 2 Вербицкая, Л.А. Паразитоценозы овец и меры борьбы с ними [Текст] / Л.А.Вербицкая // III научно-практ. конф. Международной ассоциации паразитологов, 14–17 октября 2008 г. Паразитологов / Витебск редкол. А.И. Ятусевич (отв.ред.). – Витебск ВГАМ, 2008 – С. 25–27.
- 3 Волошина, Н.О. Паразитарна система: її екологічна сутність [Текст] / Н.О. Волошина // Вісник Львівського університету. Серія біологічна, 2012. – В. 60. – С. 215–221.
- 4 Hoste, A. Distribution and repeatability of nematode fecal egg. Counts in dairy goats: a form survey and implications form control [Text] / A. Hoste, J. Le Frilex, C. Gondcon [et all] // Res. in Veter. Se. – 2002. Vol. 72. – № 3 – P. 211–215.
- 5 Євстаф'єва, В.О. Еймеріоз кіз в умовах особистих підсобних господарств міста Полтава [електронний ресурс] / В.О. Євстаф'єва, Л.М. Корчан, М.І. Корчан, О.М. Мордовцева // Вісник Полтавської державної аграрної академії, 2014 – № 1. С. 43–46.
- 6 Котельников, Г. А. Гельминтологические исследования окружающей среды [Текст] / Г. А. Котельников / Москва: Росагропромиздат, 1991. – 144 с.
- 7 Магомедов, О.А. Рекомендации по профилактике и лечению овец при основных нематодозах в условиях Прикаспийского региона РФ [Текст] / О.А. Магомедов, В.М. Шамхалов, М.А. Мусаев, А.З. Джамалова // Российский паразитологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 76–80.
- 8 Mbor, C.K. The prevalence gastrointestinal nematodes in small ruminants in semi – orid urcana. Distrigit of Kenya [Text] / C.K. Mbor, S.M.Giftiga, E.M. Njoroge [et all]. //Bull. anim. Health Peaducht in Africa. – 2004. – Vol. 52. – P. 85–90.
- 9 Приходько, Ю.О. Мюлеріоз кіз: епізоотологія, діагностика і лікування [Текст] / Ю.О. Приходько, Л.М. Корчан, М.І. Корчан // Ветеринарна медицина України, 2012. – №1 – С.13–17.
- 10 Хейсин Е.М. Жизненные циклы кокцидий домашних животных Полтава [Текст] / Е.М. Хейсин. – Ленинград : Наука, 1967. – 194 с.