

На правах рукописи



Онищенко Артем Романович

**ОЦЕНКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ
В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ
«МАТЬ – ПЛОД – НОВОРОЖДЕННЫЙ»
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ
МАТЕРЕЙ АНТИГЕНАМИ ПЛОДА**

4.2.1 – патология животных, морфология, физиология,
фармакология и токсикология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет»

- Научный руководитель:** **Агарков Александр Викторович,**
доктор биологических наук, доцент,
профессор кафедры терапии и фармакологии
ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»
- Официальные оппоненты:** **Семенов Владимир Григорьевич,**
доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры морфологии, акушерства и терапии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный аграрный университет»,
заведующий кафедрой морфологии, акушерства и терапии
- Кляпнев Андрей Владимирович,**
кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, хирургии и внутренних незаразных болезней ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный агротехнологический университет»
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»

Защита диссертации состоится 7 июля 2023 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.036.02 при ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на официальном сайте ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» <http://www.stgau.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 года и размещен на сайтах ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> «__» _____ 2023 г. ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ» <http://www.stgau.ru> «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Шулунова Ангелина Николаевна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы и степень ее разработанности. Интенсификация животноводства на промышленной основе в настоящий момент требует разработки комплекса мероприятий превентивной диагностики и ветеринарной тактики как комплекса мероприятий, являющихся важной составной частью в профилактике заболеваний различной этиологии и повышении ветеринарно-санитарного профиля предприятий агропромышленного комплекса (Pere M., 2001; Жучаев К. В., 2008; Thekkoot D., Kemp R., Rothschild M., Plastow G., Dekkers J., 2016).

Важной составляющей продовольственной безопасности, согласно Указу Президента Российской Федерации от 21 января 2020 г. № 20 «Об утверждении Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации», является сельское хозяйство, в частности – отрасль продуктивного животноводства, перед которой стоит задача выращивания здорового молодняка с высоким потенциалом жизнеспособности, а именно полноценного функционирования всех систем организма животного в основные периоды перинатального и постнатального развития (Дроздова Л. И., Татарникова Н. А., 2003).

Современная отрасль свиноводства ставит перед ветеринарными работниками новые задачи по профилактике заболеваний животных различной этиологии. Существенной причиной, тормозящей разработку эффективных методов профилактики, является слабая изученность биологических основ иммунологической реактивности в онтогенезе, поэтому снижение перинатальной заболеваемости и смертности – основная задача современной ветеринарной науки (Киреева Н. В., Козлова В. А., 2000; Rossant J. A., Cross J. C., 2001).

В настоящее время установлено, что иммунологические патологии новорожденного животного обусловлены воздействиями экстремальных факторов в период внутриутробного развития (Kanitz E., Otten W., Tuchscherer M., Manteuffel G., 2003; Дроздова Л. И., 2004).

Многочисленными исследованиями (Koch E., 1985; Фёдоров Ю. Н., 2005; Каласава Е. А., Артюхов В. Г., Каласов В. Н., 2016) доказано наличие иммунобиологических взаимосвязей между организмами матери и плода, которые несут приспособительный характер и обеспечивают создание оптимальных условий развития организма. В условиях патологии эти реакции оказываются недостаточными, поэтому процесс адаптации в основном обеспечивается материнским организмом.

Иммунологическая реактивность в постнатальный период считается основой физиологического состояния организма и отвечает на воздействия окружающей среды, активируя защитные механизмы. Это объясняется тем, что в период внутриутробного развития у плода дифференцируются важнейшие процессы жизнедеятельности, определяющие его переход после рождения в новое качественное состояние, которое можно рассматривать как своеобразный «критический» период развития (Колчина А. Ф., 1999; Сидоркин В. А., Гавриш В. Г., Егунова А. В., Убираев С. П., 2008).

Следовательно, остается актуальной проблема изучения чувствительности плода на ранних стадиях онтогенеза к действию повреждающих агентов, которая объясняется его функциональной незрелостью, сниженной реактивностью и недостаточно развитыми механизмами адаптации при многоплодной беременности. Значительное расширение имеющихся знаний о функциональной системе «мать – плод – новорожденный», а также наличие широких возможностей по изучению функций систем в норме и патологии создали предпосылки для оценки ответных

иммунологических реакций в зависимости от степени сенсибилизации материнского организма антигенами плода.

Область и объект исследования – в качестве объекта исследования были определены беременные свиньи крупной белой породы в зависимости от степени сенсибилизации их антигенами плода и полученное потомство.

Предмет исследования – повышенная специфическая чувствительность свиноматок при многоплодной беременности и изменение цитокинового профиля под воздействием антигенов потомства.

Гипотеза исследования – оценка степени сенсибилизации материнского организма антигенами потомства и его иммунологической реактивности позволяет прогнозировать уровень функциональной зрелости и жизнеспособность молодяка сельскохозяйственных животных.

Цель исследования: изучить морфологические и функциональные изменения иммунологических реакций материнского организма под воздействием антигенов плода и разработать научно обоснованные критерии оценки жизнеспособности аллоиммунизированного потомства в ранний постнатальный период.

Задачи исследования:

1. Изучить состояние иммунологической реактивности материнского организма по отношению к антигенам собственного потомства.
2. Установить характер проявления клеточных и гуморальных защитных реакций, а также статус морфофункционального развития новорожденных поросят в зависимости от степени сенсибилизации материнского организма.
3. Выяснить факторы, влияющие на формирование иммунологической реактивности новорожденных поросят.
4. Оценить иммунореактивный и цитокиновый профиль крови у новорожденных поросят в постнатальном онтогенезе при аллоиммунизации.
5. Разработать способы тестирования иммунологической толерантности и диагностики изоиммунизации у животных.

Научная новизна. Концепция исследований, касающихся мониторинга фетоплацентарного комплекса в норме и при патологии у продуктивных животных разработана с учетом изменения физиологических показателей организма животного в виде алгоритма программы (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611421 от 25.01.2022) и программного модуля прогнозирования жизнеспособности животных.

Впервые разработаны критерии для проведения оценки и мониторинга иммунологической реактивности функциональной системы «мать – плод – новорожденный» в зависимости от степени сенсибилизации матерей антигенами плода с учетом приобретения материнским организмом специфической повышенной чувствительности (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611601 от 27.01.2022) и апробирована оценка внутриутробного инфицирования с предотвращением ранних репродуктивных потерь у животных.

Для определения и оценки иммунологической реактивности организма животных был разработан алгоритм программы по определению и оценке иммунологической реактивности организма животных при аллогенной стимуляции эмбриональными антигенами (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611873 от 02.02.2022).

Впервые апробирован способ тестирования иммунологической толерантности у животных (патент на изобретение РФ № 2743363 от 17.02.2021), который обеспечивает возможность повышения достоверности лабораторного исследо-

вания (неинвазивного пренатального скрининга изоиммунизационных эффектов у потомства) за счет выявления состояния реакции агглютинации между полученной иммунной сывороткой крови потомства и семенем биологического самца производителя, что позволяет сформировать группу животных с высоким риском развития иммунологической толерантности.

Предложен способ диагностики изоиммунизации животных (патент на изобретение РФ № 2749026 от 03.06.2021, Евразийский патент № 042483 от 17.02.2023), направленный на более релевантное определение иммуногенности антигенов материнского организма в отношении аллоиммунизированных факторов у потомства, позволяющий в относительно короткие сроки определить уровень развития иммунологической толерантности.

Материалы диссертации вошли в разработку электронных учебных ресурсов для ветеринарных специалистов: «Оценка индексов формирования естественной резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612557 от 28.02.2022); «Цифровой модуль для выявления цитокинов методом точной флуориметрии» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612656 от 28.02.2022); «Цифровой модуль для определения фенотипа иммунокомпетентных клеток крови» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612847 от 01.03.2022); «Цифровой модуль для определения иммунохимических свойств субклеточных фракций и антигенов» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022613185 от 01.03.2022); «Цифровой модуль для выявления цитокинов иммуноферментным методом» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022614232 от 17.03.2022); «Цифровой модуль для определения уровня эффекторной продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 202261435721 от 21.03.2022).

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты позволили создать теоретические основы и методологические принципы оценки иммунологической реактивности новорожденных поросят на ранних сроках постнатального развития в зависимости от степени сенсибилизации свиноматок антигенами плода.

Рассматривая разработанные критерии оценки иммунологической реактивности новорожденных поросят, установлено влияние плацентарных условий развития в фетальный период на морфофункциональное развитие организма, которое указывает на важную роль сенсибилизации в возникновении патологических процессов.

Разработан способ тестирования иммунологической толерантности у животных (патент на изобретение РФ № 2743363 от 17.02.2021, Евразийский патент № 042483 от 17.02.2023), который используется для выявления нарушений фетоплацентарного комплекса при массовом обследовании животных в условиях товарных хозяйств промышленного типа.

Разработан способ диагностики изоиммунизации животных (патент на изобретение РФ № 2749026 от 03.06.2021) с определением научно обоснованных методов оценки жизнеспособности новорожденных животных и мероприятий по повышению их сохранности.

Внедрены в работу научно-исследовательских учреждений и высших учебных заведений 9 свидетельств для программы ЭВМ: свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611421 от 25.01.2022, свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611601

от 12.01.2022, свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611873 от 02.02.2022, свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612557 от 28.02.2022, свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612656 от 28.02.2022, свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612847 от 01.03.2022, свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022613185 от 01.03.2022, свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022614232 от 17.03.2022, свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 202261435721 от 21.03.2022.

Ценность полученных данных, с точки зрения теоретической и практической значимости, заключается в возможности их использования для прогнозирования продуктивных и племенных качеств молодняка в процессе интенсивной технологии выращивания и использования, что составляет основу превентивной профилактики болезней новорожденных поросят и повышения сохранности их здоровья.

Методология и методы исследования. Основные принципы получения достоверной информации основывались на методах стандартизации и тщательного учета специальных условий проведения лабораторных исследований. Утвержденные принципы оценки иммунологической реактивности новорожденных поросят на ранних сроках постнатального развития в зависимости от степени сенсибилизации свиноматок антигенами плода объективно отражают основную методологию диссертационной работы.

Спецификой диссертации является сравнение эффективности различных методов клинической иммунологии как экспериментальной области выполнения исследований при иммунологическом мониторинге.

Научные данные получены с использованием иммунологических, иммунобиологических, цитохимических, морфологических, биохимических, гематологических и функциональных методов исследования. Используемые аспекты научного поиска и статистического анализа обеспечили достоверность полученных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В процессе беременности отмечается сенсибилизация материнского организма антигенами плода с характерным проявлением у значительной части потомства иммунологической ареактивности.

2. Состояние сенсибилизации свиноматок оказывает существенное влияние на процессы морфофункционального развития плода и становление иммунобиологического потенциала у новорожденного потомства.

3. Клеточный иммунный ответ после аллоиммунизации у новорожденных поросят от свиноматок, подверженных сенсибилизации, характеризовался значительным изменением иммунореактивного и цитокинового профиля крови с увеличением процента IFN-γ-позитивных клеток в различных субпопуляциях Т-клеток (Th, Tm, Tcyto) и NK-клеток.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных научных данных, основные положения, методы и методология исследований, выводы и практические рекомендации доложены и обсуждены на заседаниях учебно-методических комиссий факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Ставропольского ГАУ (2020–2022 гг.), на межкафедральных заседаниях профессорско-преподавательского состава СтГАУ (2021–2023 гг.), на рассмотрении научно-технического совета Управления ветеринарии Ставропольского края (2020–2022 гг.), на научно-производственных совещаниях руководителей и

специалистов ветеринарных учреждений агропромышленного комплекса Ставропольского края (2020–2023 гг.). Объективность материалов диссертационной работы подтверждены использованием сертифицированного оборудования в научно-исследовательских лабораториях.

Результаты работы представлены на следующих научных конференциях: VIII Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии в науке и образовании – Innovative technologies in science and education ITSE 2020» (с 19 по 30 августа 2020 г., г. Ростов-на-Дону); 85-й научно-практической конференции «Молодые аграрии Ставрополя» (23 апреля 2020 г., г. Ставрополь); 85-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – Северо-Кавказскому федеральному округу» (15 мая 2020 г., г. Ставрополь); 86-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – Северо-Кавказскому федеральному округу» (15 мая 2021 г., г. Ставрополь).

Основные положения диссертационной работы реализованы в заявочной кампании по Гранту ректора ФГБОУ ВО Ставропольского государственного аграрного университета в области науки и инноваций молодых ученых (приказ № 01 от 11 января 2022 года, г. Ставрополь).

Результаты исследований поддержаны Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фондом содействия инновациям) по программам «УМНИК-17» на тему «Разработка информационной системы для мониторинга и прогнозирования жизнеспособности новорожденных сельскохозяйственных животных» (договор № 12578ГУ/2017 от 18.04.2018).

Апробация работы проведена на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых вузов Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в номинации «Ветеринарные науки»: победитель I этапа (Приказ Ректора ФГБОУ ВО Ставропольского государственного аграрного университета № 15-20/12-991 от 28 марта 2022 года, г. Ставрополь), победитель II этапа (ФГБОУ ВО Горский ГАУ, 13 апреля 2022 года, г. Владикавказ), призер 2 места в III этапе (Приказ № И-2022/194 от 23.06.2022, г. Москва).

Материалы проведенных исследований представлены в научно-практических методических рекомендациях «Оценка иммунологических критериев ранней адаптации у новорожденного потомства животных», утвержденных комиссией научно-технического совета секции животноводства Министерства сельского хозяйства Ставропольского края (выписка из протокола № 1 заседания комиссии научно-технического совета секции животноводства Министерства сельского хозяйства Ставропольского края от 1 марта 2021 года).

Научные результаты исследований апробированы в условиях Московской испытательной лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» (ФГБУ ЦНМВЛ), Научно-диагностическом и лечебном ветеринарном центре Ставропольского ГАУ (НДиЛВЦ СтГАУ), ФГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория», ветеринарных лабораторий, подведомственных Управлению ветеринарии по Ставропольскому краю, ВНИИОК – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ», свиноводческого комплекса ООО «СВК», ООО «Агроальянс Инвест», ООО «ЭкоНива-АПК Холдинг», КФХ «Великородный», ООО «ВетПрофи», ветеринарных клиник «Колибри».

Личный вклад соискателя. Диссертация является результатом самостоятельных научных исследований автора в период 2020–2023 гг. Представленные в диссертации современные и классические гематологические, иммунологические, гистологические, морфометрические методики исследования проведены диссертантом самостоятельно. По теме диссертационной работы выявлена проблема, выполнены задачи исследований и проведена статистическая обработка полученных результатов. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85 %.

Публикации результатов исследований. Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 24 работах, из них 4 статьи в российских журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации («Вестник КрасГАУ», «Ветеринарная патология», «Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии»), и 1 статья, индексируемая в международной базе научного цитирования Scopus («E3S Web of Conferences»). Опубликовано методические рекомендации, получено 3 патента на изобретение и 9 свидетельств о государственной регистрации программ для ЭВМ.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 150 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Диссертация иллюстрирована 10 таблицами, 28 рисунками. Список литературы содержит 241 источника, в том числе 119 зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследования

Опытная часть исследований проводилась в условиях промышленных свиноводческих хозяйств Ставропольского края: ООО «СВК», КФХ Великородный. Методика исследований отрабатывалась в сертифицированных научно-испытательных лабораториях Ставропольского, Краснодарского края и Московской области – ФГБУ Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория, ГБУ Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория, лаборатория иммуногенетики и ДНК-технологий ВНИИОК – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ», лаборатория биохимического и гематологического анализа крови Научно-диагностического и лечебного ветеринарного центра ФГБОУ ВО Ставропольского ГАУ (рисунок 1).

Объектом исследования служили экспериментальные животные: свиноматки в количестве 40 голов и полученное потомство – поросята в количестве 200 голов (возрастом 1–180 дней жизни) породы крупная белая, самцы-производители в количестве 10 голов.

Оценка иммунологической реактивности поросят в зависимости от степени сенсибилизации материнского организма проводилась за счет выявления состояния повышенной чувствительности материнского организма к антигенам плода реакцией эритрогемолиза в присутствии специфических белков новорожденного организма. Выполняли исследование крови с дополнительным проведением биологического теста, в качестве которого использовали реакцию эритрогемолиза, а по показателям СОЭ и гемолиза – более 20 % исследуемых животных относят к особям с повышенной иммунологической толерантностью среди однородной выборки.



Рисунок 1 – Схема исследований

Оценка динамики становления иммунобиологического статуса у потомства, полученного от материнского организма с высоким уровнем изоиммунных антител в отношении изоантигенов, а также исследование изоиммунизационных отношений материнского организма, плода и новорожденного с проекцией в условиях многоплодной беременности у свиней проводилась с учетом следующих параметров: уровню иммуноглобулинов (А, G, М); динамическому изменению количества эритроцитов (RBC), гемоглобина (HGB), лейкоцитов (WBC), общего белка и показателей естественной резистентности (фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН %); бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови (БАСК % и ЛАСК %); гемолитической активности комплемента (ГАК), спонтанной и стимулированной НСТ-теста, содержанию Т- и В-лимфоцитов в периферической крови с помощью Е- и ЕАС-розеткообразования), циркулирующих иммунных комплексов (Кондрахин И. П. с соавт., 2004).

Фагоцитарную активность нейтрофилов исследовали по отношению к лабораторному штамму *Staphylococcus aureus* (лабораторный штамм № 209 на физиологическом растворе в концентрации 1×10^6 клеток/мл). Оценка бактерицидной активности сыворотки крови определялась модифицированным методом (Созыкин В. Л., Бухарин О. В., 1999).

Исследование рецепторов/маркеров лимфоцитов выполняли для изучения иммунологической реактивности у опытных и контрольных животных. Анализ рецепторов лимфоцитов проводился методом двойной иммунофлюоресценции, используя панель моноклональных антител, отмеченных фикоэритрином (цитофлуориметр BD FACSCalibur (BD Biosciences, США)). Популяции лимфоцитов были идентифицированы следующими комбинациями: метки – CD45/CD1, содержание лимфоцитов CD19 и рецепторов – CD3/CD56. Опытные группы состояли из животных с повышенной изоантигенной нагрузкой.

Исследование крови на содержание рецепторов CD+ проводили стандартными методами через 1, 2, 6, 8, 12 недель. Применяли метод двухцветной проточной цитометрии. Полученные данные были обработаны с помощью непараметрического анализа (t-критерий Стьюдента). Основные параметры антигенного взаимоотношения в функциональной системе «мать – плод – новорожденный» определяли в реакциях связывания комплемента преципитации в теле и основанных на феномене гемагглютинации.

Для изучения морфофункционального состояния органов новорожденных поросят, полученных от свиноматок, подверженных изоиммунизации в период беременности, исследовались внутренние органы новорожденных поросят ($n = 30$). Материалом для исследований послужили образцы легких, кишечника, почек, тимуса, исследовался только свежий материал. Отбор проб размером $0,5 \text{ см}^3$ для гистологического исследования осуществляли после вынужденного убоя.

Материалом для оценки степени изоиммунизации материнского организма послужили плаценты 20 свиноматок крупной белой породы, которые отбирали сразу после родов с фиксацией в 10 %-ном водном растворе нейтрального формалина. После фиксации осуществляли проводку через спирты возрастающей концентрации (70° , 96°), ксилол и ксилол-парафин. После заливки и формирования парафиновых блоков готовили гистологические срезы (толщиной 4–6 мкм) и окрашивали их гематоксилином и эозином (Семченко В. В. с

соавт., 2006), а также окраской по Маллори (модификация методики окраски по Ф. Маллори 2015 года). Микроскопию выполняли на световом микроскопе Olympus BX45 (Япония) при увеличении объектива $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$.

Оценка иммунного и цитокинового профиля крови у новорожденных поросят (n = 60) в критические периоды развития, а именно в пренатальный и неонатальный, которые были подвержены изоантигенной нагрузке в утробе матери, основана на технологии рекомбинантных белков.

Цитокиновый профиль включал: содержание интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-10 (IL-10), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), γ -интерферона (IFN- γ), который определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с последующим учетом результатов на спектрофотометре «Униплан-ТМ» в соответствии с утвержденными наставлениями к диагностическим наборам. В диссертационном исследовании изучены комплексные свиные рекомбинантные цитокины I типа-альфа и II типа-гамма и смесь альфа- и гамма-интерферонов.

Цитокиновый профиль крови оценивали следующим образом: стабилизированную гепарином кровь собирали у опытных и контрольных поросят. Затем проводили разбавление стабилизированной крови 1:1 PBS в течение 2 ч после отбора проб и добавляли в пробирку LeucoserTM, содержащую 60 % градиента плотности FICOLL-PAQUETM Plus, для выделения мононуклеарного профиля клеток периферической крови. Оставшиеся эритроциты, которые часто присутствуют после выделения в крови новорожденных свиней, лизировали буфером GibcoTM ACK. Клетки помещали в 96-луночные планшеты с $0,5 \times 10^6$ клеток/луноку в среде RPMI 1640 (Gibco®) с 10 %-ной фетальной сывороткой. Через 1 ч инкубации клетки стимулировали теми же агонистами TLR, что и в адьюванте с изоантигенами: агонистом TLR 1/2 (10 мкг/мл Pam3Cys L2000 из микроколлекции EMC), агонистом TLR 7/8 (5 мкг/мл R848, Resiquimod от InvivoGen), агонистом TLR 9 (5 мкг/мл последовательности CpG ODN-типа A D32, 5'-ggTGCCTGCAGCAGGggggg-3', от Eurofins Genomics.), смесью агонистов TLR 1/2, 7/8 и 9 (с 10 мкг/мл, 5 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно), смесью агонистов TLR 1/2 и 9 (10 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно), или клетки оставляли не стимулированными в качестве отрицательного контроля. Для критериальной оценки цитокинового профиля иммунологической реактивности были использованы одиночные агонисты TLR следующих комбинаций: TLR 1/2 + TLR 7/8 + TLR 9 и TLR 1/2 + TLR 9.

После изоиммунизации место инъекции контролировали в течение 4 дней на предмет местной реакции. При изоиммунной реакции мы оценивали покраснение и отек кожи по разработанной нами шкале от 0 до 3 (без изменений) для каждой тазовой конечности (максимальная общая оценка 6).

Полученные научные данные обрабатывались с помощью компьютерных программ Statistica 6.0 (Stat Soft Inc., США) и Microsoft Excel (в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки средней ($M \pm m$)). Сравнения полученных цифровых данных из совокупностей проводили путем оценки нормального распределения с использованием t-критерия Стьюдента.

2.2. Результаты исследований и их анализ

2.2.1. Оценка иммунологической реактивности поросят в зависимости от степени сенсибилизации свиноматок

Анализ рецепторов лимфоцитов проводился методом двойной иммунофлюоресценции, используя панель моноклональных антител, отмеченных фикоэритрином. Популяции лимфоцитов были идентифицированы следующими комбинациями метки: CD45/CD14, содержание лимфоцитов CD19 и рецепторов CD3/CD56.

Исследование крови на содержание рецепторов CD+ проводили стандартными методами через 1, 2, 6, 8, 12 недель, применяли метод двухцветной проточной цитометрии. Контролируя действие аутоантител, выявленных у потомства, мы исследовали сыворотку крови подопытных поросят в РДСК с материнским антигеном в течение 4 месяцев через каждые 30 дней. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследования сыворотки крови поросят опытной группы в РДСК

№ животного	После рождения	Через 30 дней	Через 60 дней	Через 90 дней	Через 105 дней
182	1:320	1:160	1:80	1:10	–
174	1:80	1:80	1:40	1:5	–
245	1:640	1:160	1:80	1:20	–
277	1:640	1:160	1:80	1:20	–
198	1:640	1:80	1:40	1:20	–
184	1:80	1:80	1:40	1:20	–
201	1:160	1:80	1:40	1:5	–
195	1:580	1:160	1:40	1:5	–
137	1:580	1:320	1:80	1:20	–
140	1:320	1:320	1:160	1:80	1:80

По результатам исследований все поросята опытной группы были отнесены к животным с признаками изоиммунизации в фетальный период. В сыворотке крови особой контрольной группы изоантитела в диагностических титрах на протяжении всего периода наблюдения практически не обнаружены.

2.2.2. Морфофункциональные изменения фетоплацентарного комплекса при сенсибилизации в период беременности

Морфофункциональная оценка патологических изменений органов новорожденных поросят, полученных от свиноматок, сенсибилизированных антигенами плода в период беременности, осуществлялась на опытной (n = 10) и контрольной группах поросят (n = 10), полученных от свиноматок, у которых не установлен эффект сенсибилизации.

Патоморфологические изменения в тощей кишке характеризовались дистрофическими изменениями каемчатого эпителия верхушек и нижнебоковых поверхностей некоторых ворсинок, серозной, а иногда и круглоклеточной инфильтрацией их соединительнотканной стромы (рисунок 2). Гистологическая структура плаценты из опытной группы свиноматок по отношению к контрольной имеет проявления воспалительных реакций и изменения в виде некротических участков (рисунок 3). У опытной группы наблюдались поврежденные стенки сосудов плаценты с процессом тромбообразования. Выявлены существенные лимфоидно-лимфоцитарные инфильтраты.

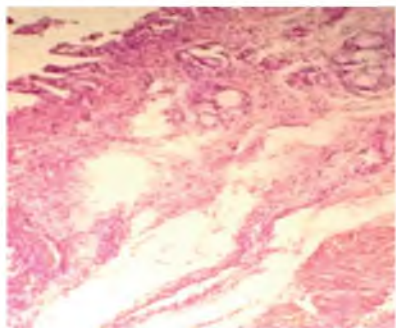


Рисунок 2 – Дистрофические изменения каемчатого эпителия тощей кишки опытной группы поросят (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 40$)

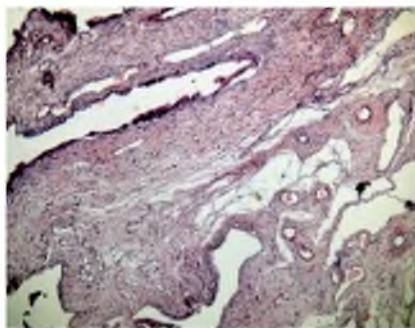


Рисунок 3 – Плацента опытной группы свиноматок. Очаговая атрофия, разрыхление стромальной основы (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$)

Стенка хориона опытных животных характеризовалась присутствием очаговых некрозов ворсин с наличием инфарктов, которые являются признаком нарушений материнского кровообращения.

При микроскопическом анализе отмечены многочисленные фокусы отложения солей кальция в тканях хориона в виде обособленных образований, кист, которые, по нашему мнению, являются нормой, так как служат депо для обмена и поступления кальция в ткани плода (рисунок 4).

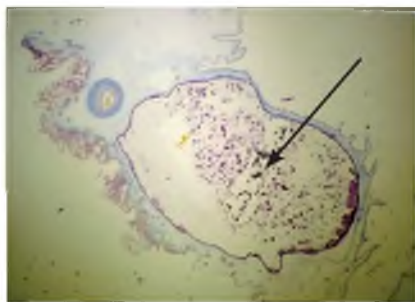
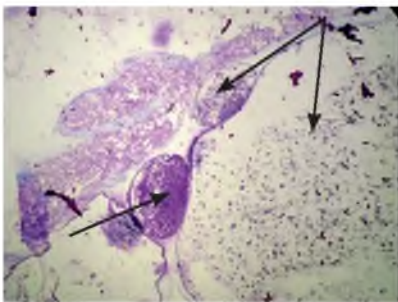


Рисунок 4 – Кисты петрификатов в строме хориона плаценты свиноматок опытной группы (окраска по Маллори, ув. $\times 40$)



Обнаружены существенные изменения при формировании фетоплацентарного комплекса в виде порока развития (рисунок 5), связанного с нарушением структуры плодных оболочек в процессе формирования плаценты, а именно: эмбриональная эвентрация пупочного канатика хориона.

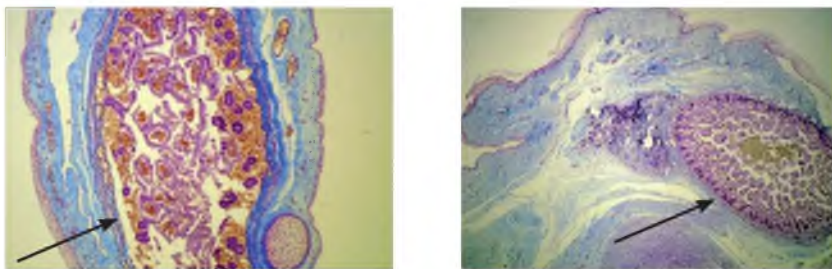


Рисунок 5 – Эмбриональная эвентрация пупочного канатика хориона плода

2.2.3. Оценка иммуннореактивного и цитокинового профиля крови у новорожденных поросят в постнатальном онтогенезе при аллоиммунизации

Динамику формирования иммунологической реактивности поросят оценивали по интенсивности образования антиэритроцитарных антител при аллоиммунизации.

Гемолитические тесты сыворотки крови, полученные от поросят до начала опыта, не обнаруживали естественных антител к эритроцитарным антигенам свиньи-донора. Не было антител и в сыворотке крови поросят, полученных через 7 суток после введения первой донорской крови, и только спустя 7 суток после второй инъекции в сыворотке крови некоторых поросят проявлялась гемолитическая активность (таблица 2).

Таблица 2 – Гемолитическая активность сыворотки крови поросят после второй иммунизации

Группа	№ группы	№ жив-го	Возраст поросят, сут	Титр антител при разведении сыворотки					
				Н	2	4	8	16	32
Опыт	I	1079	27	0	0	0	–	–	–
Контроль		5674	27	0	0	0	–	–	–
Опыт		5649	38	44	44	0	–	–	–
Контроль		5651	38	0	0	0	–	–	–
Опыт	II	5624	45	44	44	0	0	–	–
Контроль		5625	45	44	44	0	0	–	–
Опыт		5622	46	44	44	0	0	–	–
Контроль		5627	46	44	44	44	0	–	–
Опыт	III	5541	82	0	0	0	0	–	–
Контроль		5539	82	0	0	0	0	–	–
Опыт		5535	85	44	44	44	0	–	–
Контроль		5532	85	44	44	44	0	–	–
Опыт	IV	5474	114	44	44	44	0	0	–
Контроль		5488	114	0	0	0	0	0	–
Опыт		5490	119	44	44	44	44	0	–
Контроль		5476	119	44	44	44	0	0	–
Опыт	V	5245	193	44	44	44	44	44	44
Контроль		5265	193	44	44	44	44	0	0
Опыт		5250	197	44	44	0	0	0	0
Контроль		5237	197	44	44	44	44	0	0

Примечание. Значение 44 обозначает полный лизис эритроцитов донора при двукратной реакции; 0 – отсутствие лизиса.

В подтверждение проведенного исследования установлена устойчивая выраженная местная кожная реакция на аллоиммунизацию у опытных групп поросят после введения изоантигенов путем внутрикожных инъекций, характеризующихся локальным покраснением (рисунок 6).

Однако у некоторых групп животных (в возрасте 21 дня) наблюдалось более выраженная кожная реакция (степень 2 и 3) (рисунок 7), чем после первичной аллоиммунизации. Эта кожная реакция, от умеренной до тяжелой, была заметна через 5 дней после аллоиммунизации (рисунок 8), но полностью исчезла через две недели после повторной аллоиммунизации. Местной реакции после в/м введения не наблюдалось.



Рисунок 6 – Первичная кожная реакция на подкожное введение изоантигена



Рисунок 7 – Выраженная кожная реакция на подкожное введение изоантигена через 1 день



Рисунок 8 – Выраженная кожная реакция на подкожное введение изоантигена через 7 дней

Клеточный иммунный ответ после аллоиммунизации и контрольного введения изоантигенов оценивали по проценту положительных клеток, окрашивающих IFN- γ или TNF, в различных субпопуляциях Т-клеток (Th, Tm, Tcyto) и NK-клеток, повторно стимулированных *in vitro*.

Цитокиновый ответ оценивали после стимуляции изоантигенными агонистами TLR у новорожденных свиной, 3-дневных поросят, 7-дневных поросят, 21-дневных поросят ($n = 15$) при установлении различных агонистов Toll-подобных рецепторов (TLR 1/2, TLR 7/8 или TLR 9), и комбинацию агонистов TLR (TLR 1/2 + 7/8 + 9 и TLR 1/2 + 9) использовали для стимуляции неонатальных мононуклеаров периферической крови для определения их активности *in vitro* в отношении индукции цитокинов. Супернатанты тестировали на IFN- γ , IL-12p40, IFN- α , IL-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-8 и TNF с помощью мультиплекса Luminex.

Ответы IFN- γ и IL12p40 в основном вырабатывались после стимуляции TLR 7/8 и 9 и после стимуляции обеими комбинациями (TLR 1/2 + 9 и TLR 1/2 + 7/8 + 9), где уровни IL-12p40 были высокими, но ниже уровня IFN- γ по сравнению с не стимулированными контрольными образцами (рисунок 9).

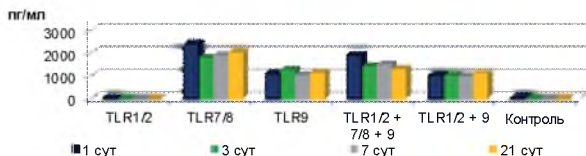


Рисунок 9 – Тестирование супернатантов на IFN- γ

Высокие уровни IFN- α наблюдались только после стимуляции TLR 9 и комбинации TLR 1/2 + 9. Однако ответ уменьшился, когда TLR 1/2 и TLR 7/8 были добавлены к стимуляции TLR 9 (рисунок 10).

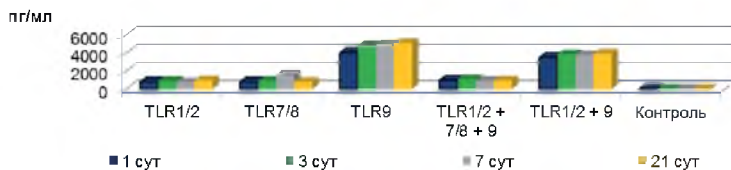


Рисунок 10 – Тестирование супернатантов на IFN- α

Нами выявлено, что общий ответ IL-4 был низким, но значительно увеличился у опытной группы поросят в различных возрастных периодах, за исключением стимуляции TLR 1/2. Значительно повышенные уровни IFN- γ , IL-12p40, IL-4, IL-1 β , IL-6 и IL-10 индуцировались при наличии TLR 7/8, по сравнению с нестимулированными контрольными образцами.

2.2.4. Оценка динамики становления иммунобиологического статуса свиноматок с высоким уровнем изоиммунных антител

У животных с пониженной иммунологической реактивностью (опытная группа) меньше содержалось эритроцитов на 15,6 %, гемоглобина – на 8,5 % и лейкоцитов – на 55,4 %, чем у контрольной группы.

Установлено, что бактерицидная активность у свиноматок опытной группы была выше, чем у контрольной, на 75,9 % и составляла 45,2 %, а по лизоцимной активности различия между группами животных были незначительными.

В опытной группе индекс иммунологической реактивности составил $0,62 \pm 0,05$, а в контрольной (условно здоровые животные) – $0,78 \pm 0,02$. Значение критерия разности средних величин составило 2,04 при вероятности суждения $P < 0,05$.

Гемоцитологический коэффициент (отношение зернистых лейкоцитов к незернистым) у опытной группы был ниже ($0,14 \pm 0,03$), чем у животных контрольной группы ($0,56 \pm 0,09$), в 4 раза.

Полученные результаты исследования биохимического и морфологического состава крови у свиноматок, подверженных сенсibilизации антигенами плода, имели существенные различия (таблица 3).

Таблица 3 – Биохимические и морфологические показатели крови животных опытной и контрольной групп свиноматок

Показатель	Ед. изм.	Контрольная группа	Опытная группа	P
GLUC	ммоль/л	$2,46 \pm 0,07$	$1,90 \pm 0,08$	$>0,05$
RBC	$1 \cdot 10^{12}/л$	$5,53 \pm 0,07$	$3,67 \pm 0,21$	$<0,001$
RDW	мкм	$5,34 \pm 0,05$	$5,64 \pm 0,08$	$<0,01$
MCV	фл	$58,33 \pm 1,20$	$62,74 \pm 1,22$	$>0,05$
HCT	л/л	$0,32 \pm 0,01$	$0,123 \pm 0,010$	$<0,001$
HGB	г/л	$110,70 \pm 2,50$	$75,3 \pm 4,1$	$<0,001$
MCH	пг	$19,26 \pm 0,36$	$20,64 \pm 0,85$	$>0,05$
MCHC	г/дл	$34,32 \pm 0,69$	$32,90 \pm 1,10$	$>0,05$
CPB	фл	$1,10 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,05$	$>0,05$

P – достоверность различий с контрольной группой

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что у опытных свиноматок отмечается более выраженная гипогликемия.

У опытных групп животных наблюдались более выраженные нарушения в морфологическом составе крови. Число эритроцитов у этих свиноматок, по сравнению с контрольными, было ниже на 50,7 % ($P < 0,001$), гематокритная величина – на 162,6 % ($P < 0,001$), а уровень гемоглобина – на 47,6 % ($P < 0,001$).

При исследовании гематологических показателей крови у поросят опытных и контрольных групп установлены различия по содержанию гемоглобина, гематокриту, содержанию эритроцитов (таблица 4).

Таблица 4 – Биохимические показатели крови свиноматок и поросят

Показатель	Ед. изм.	Группа животных			
		Контрольная		Опытная	
		в день опороса (рождения)	через 10 дней	в день опороса (рождения)	через 10 дней
Свиноматки					
Каротин	мг %	0,25±0,04	0,284±0,032	0,320±0,075	0,316±0,032
Резервная щелочность	об % CO ₂	32,56±0,35	36,69±0,46	40,57±0,49	43,57±0,98
Глюкоза	мг %	36,90±1,96	38,60±1,28	41,70±1,20	44,60±2,17
Кальций	мг %	9,33±0,82	9,80±0,84	10,60±0,48	10,73±0,74
Неорганический фосфор	мг %	3,80±0,52	3,97±0,44	4,37±0,47	4,60±0,33
Общий белок	г %	6,30±0,35	7,20±0,33	7,25±0,44	8,20±0,94
Поросята					
Каротин	мг %	–	0,048±0,019	–	0,125±0,02
Резервная щелочность	об % CO ₂	46,48±2,87	48,48±1,75	50,59±2,84	51,17±3,44
Глюкоза	мг %	35,60±1,86	37,20±1,52	43,30±2,27	46,60±2,18
Кальций	мг %	7,20±1,43	9,2±0,27	9,60±0,33	11,44±1,33
Неорганический фосфор	мг %	4,40±0,36	4,66±0,32	4,10±0,66	4,84±0,66
Общий белок	г %	5,80±0,66	6,10±0,80	6,55±0,33	6,41±0,52
* $P \leq 0,05$ – достоверность различий с контрольной группой					

2.2.5. Результаты изучения напряженности иммунитета у поросят от свиноматок различной степени сенсибилизации антигенами плода

Изучение напряженности иммунитета у исследованных животных (опытная группа (n = 12) и контрольная группа (n = 12) проводили по оценке поствакцинального иммунитета у новорожденных поросят от групп свиноматок разной степени сенсибилизации плодовыми антигенами. Исследования выполняли на группах животных с 7-дневного возраста до 6 месяцев с использованием антигена ORF2 инактивированной вакцины против цирковирусной инфекции свиней.

С учетом этого факта в сравнительном опыте была исследована сыворотка крови двух групп животных через 30, 60, 180 дней после однократной вакцинации. При этом отмечено, что средние показатели титров антител по группам отличались значительно: 4,05±0,36 лог² в контроле и 5,97±0,29 лог² у опытных особей, а индивидуальные показатели колебались от 1,36±0,19 до 6,15±0,41 лог² среди животных контрольной группы и от 3,07±0,49 до 8,25±0,21 лог² у животных опытной группы (таблица 5).

Таблица 5 – Вируснейтрализующая активность сыворотки крови однократно иммунизированных поросят

Титры антител (лог ²)							
№ ж-ных	Контрольная группа			№ ж-ных	Опытная группа		
	дни				дни		
	30-й	60-й	180-й		30-й	60-й	180-й
0238	4,28±0,59	4,5±0,26	5,31±0,52	0198	5,66±0,24	6,23±0,39	7,02±0,14
0411	1,36±0,19	1,63±0,14	4,69±0,31	0344	4,48±0,19	5,78±0,31	8,11±0,12
0495	2,18±0,35	5,35±0,55	4,65±0,22	0279	4,76±0,37	5,83±0,11	6,67±0,16
0373	3,78±0,39	6,33±0,45	6,15±0,41	0407	4,48±0,36	5,56±0,18	8,25±0,21
0175	2,57±0,41	5,59±0,21	6,06±0,37	0074	4,78±0,44	5,75±0,39	7,54±0,37
0369	3,12±0,37	4,78±0,54	5,98±0,27	0223	4,23±0,13	6,78±0,49	7,07±0,23
0146	3,75±0,17	5,82±0,42	4,66±0,51	0401	5,02±0,17	6,22±0,44*	6,98±0,41*
0452	1,42±0,26	3,08±0,53	4,28±0,24	0212	5,17±0,15	6,23±0,16	6,89±0,54
0171	1,72±0,46	4,33±0,15	4,06±0,31	0166	3,78±0,33	5,52±0,41	8,09±0,51
0442	2,05±0,21	2,34±0,39	5,26±0,11	0354	3,13±0,29	6,33±0,32	6,95±0,19
0378	2,84±0,48*	5,69±0,55*	4,32±0,47	0092	3,07±0,49	5,5±0,12	7,81±0,27
0422	2,92±0,29	3,75±0,39	5,04±0,46	0127	4,41±0,56	6,90±0,16	7,96±0,21
<i>M±m</i>	<i>2,67±0,35</i>	<i>4,43±0,38</i>	<i>5,04±0,35</i>	<i>M±m</i>	<i>4,41±0,31</i>	<i>6,05±0,29</i>	<i>7,45±0,28</i>

* $P \leq 0,05$ – достоверность различий с контрольной группой

Количество животных, титры антител в сыворотке крови которых были ниже $3,0 \log^2$ в контрольной группе на 30 день после вакцинации, составляло 66 %, в то время как в опытной группе не имелось животных с таким показателем. Установлено, что через 1, 2 и 6 месяцев все опытные животные имели средние показатели титров антител $4,41 \pm 0,31$; $6,05 \pm 0,29$ и $7,45 \pm 0,28 \log^2$ соответственно.

Статистически достоверное увеличение титров вируснейтрализующих антител отмечено, в основном, у животных с исходным титром до иммунизации в пределах $1,15-2,0 \log^2$, что способствует динамическому повышению уровня иммунитета и формированию достаточно напряженного иммунитета до 6-месячного возраста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунологическая реактивность новорожденного животного во многом определяется состоянием материнского организма и зависит от плацентарных условий развития в фетальный период. Факт обнаружения аллогенной стимуляции эмбриональными антигенами потомства свидетельствует о нарушении плацентарных условий развития.

По результатам проведенных исследований установлено, что степень морфофункциональных нарушений обусловлена иммунологической нагрузкой высокими титрами изоантител. Для определения ареактивного состояния животных необходимо использовать комплекс взаимосвязанных иммунобиологических показателей, отражающих состояние матери и плода, что снижает риск рождения потомства с признаками пониженной жизнеспособности.

Выявленные различия в специфичности образования эмбриональных изоантител являются существенными и зависят, по-видимому, от особенностей методов и конкретных условий определения такой специфичности.

На основании полученных результатов нами проведена разработка научно обоснованных методов оценки степени сенсibilизации матерей антигенами

плода животных при беременности и мероприятий по исследованию фетоплацентарных условий развития плода. Последние определяют интенсивность роста, развития и состояние устойчивости потомства в постнатальном периоде онтогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Сформированные адаптивные процессы в группе животных с высокой степенью сенсибилизации антигенами плода проявлялись реактивными изменениями в тканях трофобласта. Обнаружены существенные изменения при формировании фетоплацентарного комплекса в виде пороков развития, связанных с нарушением плодных оболочек в процессе формирования плаценты, а именно – омфалоптеле.

2. Клеточный иммунный ответ после аллоиммунизации и контрольного введения изоантигенов характеризовался высоким процентом IFN- γ до 2400 пг/мл по супернатанту TLR7/8 в различных субпопуляциях Т-клеток (Th, Tm, Tcyto) и НК-клеток, повторно стимулированных *in vitro*.

3. Процентное содержание (относительный уровень) различных популяций и субпопуляций Т-клеток (Tm и Tcyto), НК-клеток и В-клеток в нестимулированных антигенами животных через 7 дней не увеличилось, но процент клеток Tm значительно увеличился между 14 и 21 днями после введения изоантигенов в опытных группах животных, тем самым отражая их ареактивное состояние.

4. Процент положительных IFN- γ клеток в различных субпопуляциях Т-клеток (CD4+ (Th), CD4+ CD8+ (Tm), CD4 – CD8+ (Tcyto)) и НК-клеток (CD3– CD8+) был проанализирован за 21 день с установлением иммунологического сдвига CD4+ и CD8+ Tcyto до значения $1,42 \pm 0,13$ пг/мл.

5. У 33,5% поросят, рожденных свиноматками, сенсибилизированными эмбриональными антигенами, выявлены изоантитела в преколостральной сыворотке. Стадия ареактивности у поросят обусловлена взаимодействием сенсибилизированных Т-лимфоцитов с изоантигеном, при которой наблюдается прямая зависимость между индексом иммунологической реактивности и степенью клеточно-опосредованной трансформации.

6. Поросята, в преколостральной сыворотке которых установлены изоантитела, существенно отличались от своих сверстников сниженным уровнем показателей морфологического состава крови (количество эритроцитов – на 33,6 %, гематокрита – на 61,9 %, гемоглобина – на 31,9 %) и уровнем естественной резистентности (БАСК – бактерицидная активность сыворотки крови – на 43,1%).

7. При изучении напряженности иммунитета у поросят, полученных от свиноматок различной степени сенсибилизации антигенами плода, отмечено, что средние показатели титров антител по группам значительно отличались: $4,05 \pm 0,36 \log^2$ в контроле и $5,97 \pm 0,29 \log^2$ опытных особей, а индивидуальные показатели колебались от $1,36 \pm 0,19$ до $6,15 \pm 0,41 \log^2$ среди животных контрольной группы и от $3,07 \pm 0,49$ до $8,25 \pm 0,21 \log^2$ у животных опытной группы.

8. Разработан способ тестирования иммунологической толерантности у животных для выявления нарушений фетоплацентарного комплекса при массовом обследовании животных в условиях товарных свиноводческих хозяйств.

9. Разработан способ диагностики изоиммунизации животных при массовом обследовании поголовья свиней, включающий инкубирование проб крови животного с тестирующей биологической жидкостью в капиллярах, а результаты реакции учитывают по степени цитолиза клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Оценку фетоплацентарного комплекса в норме и при патологии у продуктивных сельскохозяйственных животных рекомендуется проводить по разработанной методике (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611421 от 25.01.2022) с использованием программного модуля прогнозирования жизнеспособности продуктивных животных.

2. Для проведения иммунологического мониторинга в период беременности у продуктивных сельскохозяйственных животных рекомендуется использовать методику (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611601 от 27.01.2022) и осуществлять оценку внутриутробного инфицирования с предотвращением ранних репродуктивных потерь у продуктивных животных.

3. Определение и оценку иммунологической реактивности организма животных при аллогенной стимуляции эмбриональными антигенами предлагаем выполнять с помощью разработанного алгоритма программы для ЭВМ (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611873 от 02.02.2022).

4. Разработанный способ (патент на изобретение РФ № 2743363 от 17.02.2021, Евразийский патент № 042483 от 17.02.2023) может быть использован для определения животных с высоким риском развития иммунологической толерантности.

5. Степень иммуногенности антигенов материнского организма в отношении аллоиммунизированных факторов у потомства предлагается осуществлять согласно полученным результатам иммунологического исследования по способу диагностики изоиммунизации животных (патент на изобретение РФ № 2749026 от 03.06.2021).

6. Для повышения квалификации и профессиональной подготовки специалистов ветеринарного профиля могут быть использованы следующие учебно-методические разработки: «Оценка индексов формирования естественной резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612557 от 28.02.2022); «Цифровой модуль для выявления цитокинов методом проточной флуориметрии» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612656 от 28.02.2022); «Цифровой модуль для определения фенотипа иммунокомпетентных клеток крови» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612847 от 01.03.2022); «Цифровой модуль для определения иммунохимических свойств субклеточных фракций и антигенов» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022613185 от 01.03.2022); «Цифровой модуль для выявления цитокинов иммуноферментным методом» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022614232 от 17.03.2022); «Цифровой модуль для определения уровня эффекторной продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 202261435721 от 21.03.2022).

7. Применять разработанные методические рекомендации для практикующих ветеринарных специалистов «Оценка иммунологических критериев ранней адаптации у новорожденного потомства животных», утвержденные и одобренные комиссией научно-технического совета секции животноводства Министерства сельского хозяйства Ставропольского края (протокол № 1 от 1 марта 2021 года).

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие этапы расширения выбранной тематики диссертационного исследования направлены на установление основных иммунологических параметров для реализации репродуктивного потенциала на фоне высокой степени сенсибилизации антигенами плода при многоплодной беременности продуктивных животных.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ

1. Оценка антигенной нагрузки свиноматок во время беременности и выявления признаков изоиммунизации у полученного потомства / А. В. Агарков, А. Ф. Дмитриев, А. Н. Квочко, Н. В. Агарков, **А. Р. Онищенко** // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 3. – С. 95–99.
2. Оценка морфофункциональных изменений новорожденных поросят в раннем постнатальном онтогенезе, осложненном признаками изоиммунизации / А. В. Агарков, А. Ф. Дмитриев, А. Н. Квочко, В. В. Михайленко, Н. В. Агарков, **А. Р. Онищенко** // Ветеринарная патология. – 2020. – № 4 (74). – С. 30–37.
3. Оценка морфофункциональных изменений в плаценте свиней при беременности, осложненной изоиммунизацией / А. В. Агарков, А. Ф. Дмитриев, А. Н. Квочко, В. В. Михайленко, Н. В. Агарков, **А. Р. Онищенко** // Вестник КрасГАУ. – 2020. – № 12. – С. 110–116.
4. Иммунореактивный профиль у поросят в постнатальном онтогенезе при аллоиммунизации / А. В. Агарков, Н. В. Агарков, **А. Р. Онищенко**, В. В. Бондаренко // Ветеринарная патология. – 2022. – № 2 (80). – С. 29–35.

Публикации в изданиях, индексируемых в Scopus, Web of Science

5. Specific immunological areactivity formation during gestation period in pregnant sows / A. Agarkov, A. Dmitriev, A. Kvochko, E. Grudeva, N. Agarkov, **A. Onishchenko** // E3S Web of Conferences (Rostovon-Don, 19–30 august 2020). – Rostovon-Don, 2020. – P. 06002.

Патенты на изобретение

6. Патент № 042483 Евразийский патент. Способ тестирования иммунологической толерантности у животных : заявл. 12.02.2023 ; опубл. 17.02.1998 / Дмитриев А. Ф., Агарков А. В., Агарков Н. В., Онищенко А. Р. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».
7. Патент № 2749026 Российская Федерация, МПК G01N 33/53. Способ диагностики изоиммунизации животных : № 2020119204 : заявл. 03/06/2020 ; опубл. 03/06/2021 / А. Ф. Дмитриев, А. В. Агарков, Н. В. Агарков, **А. Р. Онищенко** ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ – Бюл. № 16. – 17 с.
8. Патент № 2743363 Российская Федерация, МПК A61B 5/00 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01). Способ тестирования иммунологической толерантности у животных : № 2020119229 : заявл. 03/06/2020 ; опубл. 17/02/2021 / Дмитриев А. Ф., Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.** ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ – Бюл. № 5. – 2 с.

Свидетельства на программы ЭВМ

9. Свидетельство 2022611421 Российская Федерация. Программа оценки и мониторинга фетоплацентарного комплекса в норме и при патологии у продуктивных сельскохозяйственных животных : программа для ЭВМ : № 2022610658 : заявл. 12.01.2022 : опубл. 25.01.2022 / Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.** – Бюл. № 2. – 128 Мб.

10. Свидетельство 2022611601 Российская Федерация. Программа оценки и мониторинга иммунологической реактивности в функциональной системе «мать-плод-новорожденный» в зависимости от степени сенсibilизации матерей антигенами плода : программа для ЭВМ : № 2022610595 : заявл. 12.01.2022 : опубл. 27.01.2022 / Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.** – Бюл. № 2. – 128 Мб.

11. Свидетельство 2022611873 Российская Федерация. Программа для определения и оценки иммунологической реактивности организма животных при аллогенной стимуляции эмбриональными антигенами : программа для ЭВМ : № 2022610655 : заявл. 12.01.2022 : опубл. 02.02.2022 / Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.** – Бюл. № 2. – 105 Мб.

12. Свидетельство 2022612847 Российская Федерация. Электронное учебное пособие «Цифровой модуль для определения фенотипа иммунокомпетентных клеток крови» : программа для ЭВМ : № 2022611793 : заявл. 11.02.2022 : опубл. 01.03.2022 / Дмитриев А. Ф., Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.**, Онищенко О. Н. – Бюл. № 3. – 72,81 Мб.

13. Свидетельство 2022612656 Российская Федерация. Учебное пособие «Цифровой модуль для выявления цитокинов методом проточной флуориметрии» : программа для ЭВМ : № 2022611942 : заявл. 15.02.2022 : опубл. 28.02.2022 / Дмитриев А. Ф., Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.**, Онищенко О. Н. – Бюл. № 3. – 60,28 Мб.

14. Свидетельство 2022612557 Российская Федерация. Учебное пособие «Оценка индексов формирования естественной резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса» : программа для ЭВМ : № 2022612200 : заявл. 21.02.2022 : опубл. 28.02.2022 / Дмитриев А. Ф., Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.**, Онищенко О. Н. – Бюл. № 3. – 64 Мб.

15. Свидетельство 2022613185 Российская Федерация. Учебное пособие «Цифровой модуль для определения иммунохимических свойств субклеточных фракций и антигенов» : программа для ЭВМ : № 2022612169 : заявл. 21.02.2022 : опубл. 01.03.2022 / Дмитриев А. Ф., Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.**, Онищенко О. Н. – Бюл. № 3. – 76,64 Мб.

16. Свидетельство 2022614232 Российская Федерация. Учебное пособие «Цифровой модуль для выявления цитокинов иммуноферментным методом» : № 2022612203 : программа для ЭВМ : заявл. 21.02.2022 : опубл. 17.03.2022 / Дмитриев А. Ф., Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.**, Онищенко О. Н. – Бюл. № 3. – 59 Мб.

17. Свидетельство 2022614357 Российская Федерация. Учебное пособие «Цифровой модуль для определения уровня эффекторной продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками» : программа для ЭВМ : № 2022612204 : заявл. 21.02.2022 : опубл. 21.03.2022 / Дмитриев А. Ф., Агарков А. В., Агарков Н. В., **Онищенко А. Р.**, Онищенко О. Н. – Бюл. № 4. – 56,42 Мб.

Работы, опубликованные в сборниках научных трудов

18. **Онищенко, А. Р.** Особенности иммунобиологического статуса у новорожденных поросят в неонатальном периоде / **А. Р. Онищенко** // Молодые аграрии Ставрополя : сб. ст. науч. трудов по материалам 85-й науч.-практ. конф. (Ставрополь, 23 апреля 2020 г.). – Ставрополь, 2020. – С. 55–58.

19. Агарков, А. В. Научно-обоснованные принципы оценки иммунологической реактивности животных / А. В. Агарков, **А. Р. Онищенко** // Инновационные технологии в сельском хозяйстве, ветеринарии и пищевой промышленности : сб. науч. ст. по материалам 85-й Междунар. науч.-практ. конф. «Аграрная наука Северо-Кавказскому федеральному округу» (Ставрополь, 15 мая 2020 г.). – Ставрополь, 2020. – С. 268–272.

20. Динамика гематологических показателей у свиноматок в различные периоды беременности в зависимости от антигенной нагрузки / А. В. Агарков, А. Ф. Дмитриев, Н. В. Агарков, **А. Р. Онищенко**, В. В. Бондаренко // Инновационные технологии в сельском хозяйстве, ветеринарии и пищевой промышленности : сб. науч. ст. по материалам 86-й Междунар. науч.-практ. конф. «Аграрная наука – Северо-Кавказскому федеральному округу» (Ставрополь, 15 мая 2021 г.). – Ставрополь, 2021. – С. 278–281.

21. Показатели естественной резистентности новорожденных поросят, полученных от свиноматок с выявленным изоиммунизационным эффектом в процессе беременности / А. В. Агарков, А. Ф. Дмитриев, Н. В. Агарков, **А. Р. Онищенко**, В. В. Бондаренко // Инновационные технологии в сельском хозяйстве, ветеринарии и пищевой промышленности : сб. науч. статей по материалам 86-й Междунар. науч.-практ. конф. «Аграрная наука – Северо-Кавказскому федеральному округу» (Ставрополь, 15 мая 2021 г.). – Ставрополь, 2021. – С. 273–277.

22. **Онищенко, А. Р.** Патология антенатального и раннего постнатального развития животных / **А. Р. Онищенко** // Достижения молодых ученых в области ветеринарии и ветеринарно-санитарной экспертизы : сб. тр. Всерос. науч.-практ. конф. (Ставрополь, 17–18 февраля 2022 г.). – Ставрополь, 2022. – С. 5–8.

23. **Онищенко, А. Р.** Критерии оценки и прогнозирования жизнеспособности новорожденных животных / **А. Р. Онищенко** // Достижения молодых ученых в области ветеринарии и ветеринарно-санитарной экспертизы : сб. тр. Всерос. науч.-практ. конф. (Ставрополь, 17–18 февраля 2022 г.). – Ставрополь, 2022. – С. 26–29.

Методические рекомендации

24. Оценка иммунологических критериев ранней адаптации у новорожденного потомства животных и сельскохозяйственной птицы : методические рекомендации / А. В. Агарков, А. Ф. Дмитриев, В. С. Скрипкин, В. А. Оробец, **А. Р. Онищенко**. – Ставрополь : АГРУС Ставропольского гос. аграрного ун-та, 2021. – 115 с.

Подписано в печать 28.04.2023. Формат 60x84 ¹/₁₆. Гарнитура «Таймс».
Бумага офсетная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100. Заказ № 173.

Отпечатано в типографии издательско-полиграфического комплекса СтГАУ
«АГРУС», г. Ставрополь, ул. Пушкина, 15.