На правах рукописи

ДЕНИСОВА НАТАЛИЯ ИГОРЕВНА

РАЗРАБОТКА ИММУНОТРОПНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ПРИ ДИСПЕПСИИ У ТЕЛЯТ

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Саратов - 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

Научный руководитель: **Козлов Сергей Васильевич,**
доктор ветеринарных наук, доцент

Официальные оппоненты: **Топурия Лариса Юрьевна,**
доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет», профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы и фармакологии, г. Оренбург

Решетникова Татьяна Ивановна,
кандидат ветеринарных наук, доцент ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет Н.П. Огарева», доцент кафедры морфологии, физиологии и ветеринарной патологии», г. Саранск

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина», г. Москва

Защита диссертации состоится 6 декабря 2024 г. в 09-00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.02 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколовая, 335, учебный комплекс №3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловский университет и на сайте https://www.vavilovsar.ru/

Отзывы на автореферат направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3. ФГБОУ ВО Вавиловский университет; e-mail: vetdust@mail.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2024 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Егунова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТРЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из основных причин заболеваемости молодняка сельскохозяйственных животных, до сих пор остается нарушение обмена веществ и низкий уровень иммунитета (Балан П., 2019; Далтон Т., 2012; Язвинская Е.С., 1988; Прево Дж., 2020). Чтобы изменить данную тенденцию в настоящий момент идет активное использование препаратов относящихся к группе иммуномодуляторов, которые в некоторой степени помогают стимулировать рост и развитие животных (Придыбайло Н.Д., 1991; Тарасов И.И., 1990; Хаитов Р.М., 2003; Ниренберг М., Ледер П. и др, 1965). Многими учёными велось подробное изучение иммуноглобулинов и препаратов иммуноглобулинового ряда, наиболее подробные работы были представлены учёными Э.Н. Шляховым, В.Ф. Кику, А.А. Сохиным, Л.В. Ковальчуком, А.Н. Чердеевым, Ю.Н. Федоровым и В.И. Соколовым. Препараты глобулинового ряда играют большую роль в предупреждении и лечении животных, пораженных заболеваниями различной этиологии (Соколов В.Д., Андреева Н.Л., Мухина З.Н., 1998; Федоров Ю.Н., 2005).

В каждом живом организме в микроколичествах присутствуют микронутриенты, которые участвуют в образовании ферментов, также влияют на их активность, и включаются в синтез и процессы метаболизма гормонов (Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., 2020; Тингги У., 2008). Первоначально селен считали токсичным элементом, но впоследствии в своих экспериментах учёный Макконел показал, что изотоп Se75 включается в лейкоциты, что в дальнейшем подтвердило положительную роль селена для иммунной системы организма (Бейнбридж Д.Р., 1976; Беккет Дж., 2003; Бене Д., 1983; Бхаскарам П., 2002; Браун К.М., 2001; Громер С., 2005; Киремиджян-Шумахер Л., 1998; Маккензи Р.К., 2002; Шпалльхольц Дж. и др., 1990). Общедоступный факт, что такой микроэлемент, как селен является необходимым нутриентом для нормального функционирования живого организма, в связи с тем, что он входит в состав большого количества гормонов и ферментов, помимо этого, он так же активно участвует в процессе обмена веществ (Меньшаков П.Г., 2015; Староверов С.А., 2016, 2017,2020; Коэн С., Чанг А., Бойер Х., Хеллинг Р., 1973; Паттисон Д.Дж., Уиньярд П.Г., 2008; Пуэртольяно М. А., 2011; Чунг Дж.С., Ву М., Вонг К.С. и др., 2019). В своих работах ученые Дхингра С., Бансал М.П., Флеминг Дж., Гоуз А., Харрисон П., утверждали, что соединения селена входят в состав антиоксидантных систем организма. Так же многие ученые в том числе Кисленко В.Н., 2018; Бреннейзен П., Штайнбреннер Х., Сиес Х., 2005 доказывали, что селен противодействует развитию раковых клеток в живом организме. В своих работах ученые Джозеф К. Эйвери, Питер Р. Хоффманн, Чжи Хуан, Аарон Х.Роуз показали, что селен принимает активное участие в действии физиологических процессов организма, что в свою очередь оказывает активное влияние на иммунную систему.

Именно поэтому разработка новых ветеринарных препаратов является весьма актуальным вопросом, а создание иммуномодулирующих препаратов с новыми составами, которые будут доступны в разных ценовых сегментах остаётся важным этапом в развитии фармакологического ветеринарного рынка.

Степень разработанности темы. Иммуноглобулины интересовали ученых очень давно, так в 1960-е годы был открыт иммуноглобулин Е, что в свою очередь имело большое влияние на диагностику и лечение аллергических заболеваний, того времени (Шамджи М.Н., Валента Р., Джардецки Т., и др. 2021). Использование препаратов с иммуноглобулинами имеет историю более чем в 100 лет. Первыми применяемыми препаратами с иммуноглобулинами были препараты, которые помогали лечить инфекции, но вопрос об их разделении на группы остро стоял на протяжении многих лет (Данкли Х., Проперт Д.Н., Гейтенби П.А., 1988). Одной из первых была классификация ученых P.J. Grob и A. Fontana ими было предложено классифицировать препараты по происхождению, Сохин А.А. предлагал деление препаратов, так же по происхождению, но уже на 5 групп, более подробная классификация была предложена учеными Климовым В.В., Кологривовой Е.Н., Червенко Н.А. они предложили деление на группы и подгруппы (Климов В.В., Кологривова Е.Н., Черевенко Н.А. и др., 2006; Сохин А.А., 1984; Гроб П.Дж., Фонтана А., 1982).

Так как рынок иммуномодулирующих препаратов имеет большой спрос, производство и синтез препаратов, имеющих в составе иммуноглобулины в комплексе с другими веществами, является актуальным вопросом в ветеринарии в настоящее время. Поэтому создание нового препарата, который будет стимулировать иммунную систему животных и составило предмет данного исследования.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования являлась разработка и клинико-экспериментальное обоснование эффективности нового препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена для коррекции иммунной системы у сельскохозяйственных животных.

Для достижения поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

1. Разработать новый лекарственный препарат на основе иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена, для коррекции иммунной системы у сельскохозяйственных животных;
2. Обосновать безопасность применения нового лекарственного препарата на основе иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена;
3. Изучить биологическую активность препарата на основе иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена;
4. Изучить терапевтическую эффективность нового лекарственного препарата на основе иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена;
5. Обосновать экономическую эффективность нового лекарственного препарата на основе иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена.

Объект исследования. Лабораторные животные – белые нелинейные мыши, крысы линии Wistar, кролики породы Шиншилла, а также телята голштинской породы.

Предмет исследования. Физико-химические, биодинамические и общетоксические свойства нового разработанного лекарственного препарата на

основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена. Его терапевтическая эффективность при патологических состояниях у сельскохозяйственных животных. Кровь лабораторных животных– крыс, мышей, кроликов, а также телят, моча лабораторных животных.

Научная новизна. Впервые:

●разработан новый иммуномодулирующий, водорастворимый препарат на основе иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена для коррекции иммунной системы у сельскохозяйственных животных, изучены его физико-химические, биодинамические и общетоксические свойства (Пат. №RU 2798268 C1);

●изучено влияние наночастиц селена в качестве носителя высокомолекулярных биологически активных веществ на иммунологическую реактивность организма;

●установлена терапевтическая эффективность нового лекарственного препарата на основе иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена и его комбинированное действие на иммунную систему и антиоксидантную защиту организма животных в схеме терапевтических мероприятий больных диспепсией телят.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в исследовании и рассмотрении механизмов действия комплекса иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена, как препарата для коррекции иммунной системы животных. Изучена роль иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена для коррекции иммунной системы организма животных.

Практическая значимость заключается в том, что представлен новый препарат для коррекции иммунной системы животных при патологических состояниях проявляющимся снижением резистентности организма (Пат. № 2798268). В представленной работе установлены параметры токсичности и аллергизирующих свойств исследуемого препарата. Установлено, что данный препарат не является токсичным и относится к 5 классу опасности по ГОСТ 32644-2014, согласно ГОСТ 12.1.007-76-2021 относится к 4 классу опасности и не обладает местно-раздражающим и аллергизирующим действием по ГОСТ ISO 10993-10-2011. Препарат обладает высокой терапевтической эффективностью при диспепсии у телят в качестве иммуномодулирующего и антиоксидантного средства, внедрен в работу ИП Кваскова Марина Валерьевна.

Методология и методы исследования. Методический подход к решению поставленных задач выражался в комплексе изучении объектов исследования, анализе и сборе полученных в ходе экспериментов данных. Подход к проводимым исследованиям был основан на применении современного и сертифицированного оборудования. Все исследования проведены с учетом комплексного подхода, и охвата всех аспектов необходимых при получении результатов при поставленном эксперименте. Обоснование подхода к проведению экспериментов проводилось с учетом актуальности, цели и задач исследований, анализа данных разнообразных источников, то есть журналов, отчетов, книг, как отечественных, так и зарубежных, и использования результатов собственных исследований. Результаты эксперимента

обрабатывались при помощи стандартной программы Microsoft Excel 2019, а также при помощи t–критерия Стьюдента для оценки достоверности полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

●новый лекарственный препарат на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена;

●физико-химические свойства нового лекарственного препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена;

●оценка безопасности нового лекарственного препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена;

●комплекс лечебных мероприятий при диспепсии у телят с применением препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена.

Степень достоверности и апробации результатов. Основные положения, заключение и практические предложения, представленные в диссертации, отвечают целям и задачам данной работы, а все эксперименты проведены на сертифицированном оборудовании. Достоверность полученных данных была подвергнута статистической обработке.

Материалы проведенных исследований представлены и обсуждены на научно-практических конференциях различного уровня: Международная научно-практическая конференция обучающихся, аспирантов и молодых ученых, посвященная памяти заслуженного деятеля науки, доктора ветеринарных наук, профессора кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Колесова Александра Михайловича «Проблемы и пути развития ветеринарной и зоотехнической наук» (Саратов, 2022 год); Научно-практическая конференция по итогам научно-исследовательской деятельности и производственной работы студентов за 2021 год (Саратов, 2022 год); Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы ветеринарной фармации и патологии животных» (Саратов, 2022 год); Конференция профессорско-преподавательского состава (Саратов, 2022 год); Международная научно-практическая конференция «Современные научные тенденции в ветеринарии» (Саратов, 2022 год); Конференция профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской работы за 2022 год (Саратов, 2023 год); Научно-практическая конференция для аспирантов «Иностранный язык как средство научной коммуникации» (Саратов, 2023 год); Научно-практическая конференция по итогам научно-исследовательской работы и производственной работы студентов за 2022 год (Саратов, 2023 год); Международная научно-практическая конференция аспирантов и молодых ученных «Современные научные тенденции в ветеринарии» (Пенза, 2023 год); Международная научно-практическая конференция «Инновации, современные тенденции развития животноводства и зоотехнической науки: методы, технологии, экологическая безопасность производства и переработки сельскохозяйственной продукции» (Саратов, 2024 год); Международный научно-исследовательский конкурс «Технологические инновации и научные открытия» (Уфа, 2024 год).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, в том числе 3 статьи, включенных в журналы, рецензируемые перечнем ВАК РФ, получен 1 патент на изобретение. Общий объем печатных

листов составляет 4,82 печатных листа, лично соискателю принадлежит 3,62 печатных листа.

Объем и структура диссертации. Данная работа изложена на 195 листах компьютерного текста и включает: введение, обзор научной литературы, собственные исследования в которые входят: материалы и методы, результаты собственных исследований, заключение, рекомендации производству, перспективы дальнейшей разработки, список литературы, и приложения. Список литературы состоит из 184 источников, 49 из которых представлено русскими авторами, 135 иностранными. В работе содержится 34 таблицы, 31 рисунок и 67 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в период с 2021 по 2024 год, на базе Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, согласно научной программе № 01201151794, «Тема 3. Разработка инновационных методов диагностики, коррекции, профилактики и лечения животных, птиц и рыбы», на факультете Ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий в ЦКП «Молекулярная биология», также исследования были проведены в Учреждении Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН) и на базе животноводческого предприятия, ИП Кваскова Марина Валерьевна.

Экспериментальная часть работы была разделена на 6 этапов (Рисунок 1).

Рисунок 1 – План экспериментальной части работы

Предметом исследования являлся препарат, исследование его физико-химических, биодинамических, фармако-токсических свойств.

Объектом исследования являлись лабораторные животные, а именно: белые нелинейные мыши, крысы линии Wistar, кролики породы Шиншилла, а также телята голштинской породы.

На первом этапе исследования было произведено конструирование препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена.

На втором этапе проводилось изучение физико-химических свойств полученного препарата.

На анализаторе Zetasizer Nano-ZS, при помощи динамического рассеивания света (ДРС) был определен диаметр синтезированных наночастиц селена.

Концентрацию общего белка определяли на биохимическом анализаторе BioChem SA, с использованием набора реагентов Диакон ДС при помощи ПГК метода и Биуретовой реакции.

На третьем этапе проводилось исследование общетоксических свойств препарата на испытуемых лабораторных животных, впоследствии подтверждение его безопасности для применения сельскохозяйственным животным.

Определение и оценивание общетоксических свойств на испытуемых лабораторных животных проводились согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации №708 от 23.08.2010 г.», а также согласно методическим указаниям «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1 от 2021 года». Экспериментальная часть работы на животных была проведена по правилам, принятым «Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей».

Все проведенные исследования были исполнены по утвержденному письменному протоколу и в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП).

Оценка острой токсичности препарата проводилась на белых нелинейных мышах, согласно ГОСТ 32644-2014. Каждая мышь в группе была весом 20-21 г, на момент введения препарата. Каждая группа состояла из трех испытуемых животных. Также на крысах линии Wistar, согласно ГОСТ 12.1.007-76-2021. Каждая крыса в группе была весом 200-220 г.

Для исследования хронической токсичности были взяты лабораторные крысы линии Wistar, 2-4 месячного возраста. Каждая экспериментальная группа состояла из десяти животных массой по 200-220 г, масса животных на период начала эксперимента, то есть в момент введения препарата.

Препарат и раствор натрия хлорида вводились животным соответствующих групп раз в сутки на протяжении 14 дней. Спустя 14 дней прекращалось поступление препарата в организм животных, из каждой группы выбиралось по 3 животных для убоя и определения коэффициента массы внутренних органов. У оставшихся животных производилось взятие крови, из которой была получена сыворотка. По окончанию эксперимента животные подвергались эвтаназии при помощи метода цервикальной транслокации с предварительным введением в наркоз, и оценивалось влияние препарата на изменение коэффициента массы

внутренних органов, таких как: печень, почки, селезенка, и сердце.

При помощи метода «Открытое поле» был произведен учет поведенческих реакций учитывались показатели динамической и статистической работоспособности животных.

Для оценки иммунотоксичности препарата, были взяты белые лабораторные нелинейные мыши весом 20-21 г.

Учет оценки Т–клеточного звена иммунитета был проведен по выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа и аутологичным розеткообразующим клеткам (ауто-РОК).

Для изучения пирогенного действия препарата использовались кролики породы Шиншилла весом 3,5-4 кг. Исследуемый препарат был введен трем испытуемым внутримышечно в лапу с внутренней стороны, в объеме 0,2 мл.

Для оценки местно-раздражающего действия и аллергизирующих свойств препарата использовались кролики породы Шиншилла. Эксперимент был проведен согласно ГОСТ ISO 10993-10-2011.

На четвертом этапе проводилось изучение биоактивности препарата, согласно плану на рисунке 2.

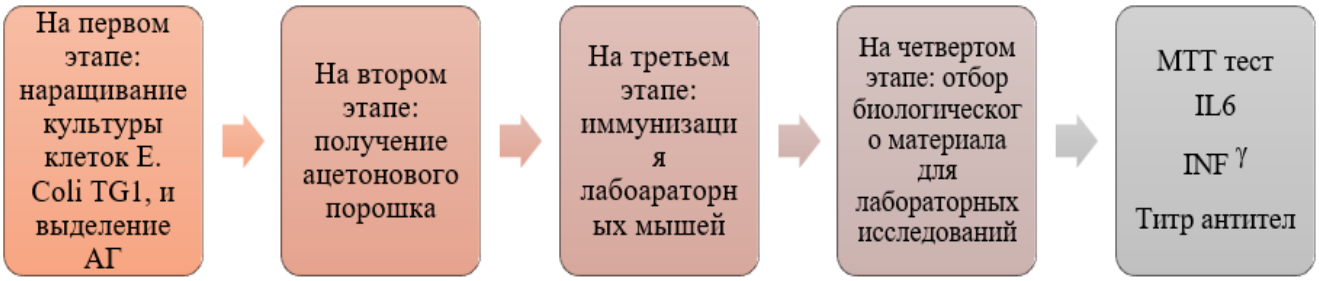

Рисунок 2 – План эксперимента по изучению биоактивности исследуемого препарата

На пятом этапе проводились научно-производственные эксперименты по изучению терапевтической эффективности полученного препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена при диспепсии у телят голштинской породы.

Научно-производственные эксперименты по изучению терапевтической эффективности проводились в ИП Кваскова Марина Валерьевна, Саратовская область, Аткарский район, село Озёрное.

Подбор животных в испытуемые группы осуществлялся по методу аналогов при этом учитывался: возраст, масса тела, порода, клинические признаки, такие как: отсутствие аппетита, вялость, слабость, диарея.

Испытуемые телята имели живую массу от 38-50 кг и имели нежную конституцию.

Телята были разделены на три группы: первая – опытная группа, в которой применялась базовая терапия при диспепсии совместно с исследуемым препаратом; вторая – контрольная группа, в которой применялась базовая терапия; третья группа – клинически здоровые животные.

Базовая терапия включала: антибиотик «Лексофлон» в дозе 1,3 мл на 40 кг

живой массы теленка, комплексный регидрант «Диастатин» в дозе 10 мл на 40 кг живой массы теленка. Дополнительно первой группе телят применялся препарат, растворенный в физиологическом растворе, в дозе 100 мг на 1 кг живой массы теленка 1 раз в день.

На шестом этапе проводилась оценка экономической эффективности и целесообразности разработанного препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Для приготовления 25 мМ раствора солянокислого гидразина ($N_2H_4(HCl)_2$) в 80 мл дистиллированной воды растворялось 0,208 г гидразина, и ставилось на магнитную мешалку в водяную баню. После подогрев отключался и к раствору гидразина добавлялся 1 г лиофильно высушенных иммуноглобулинов, до их полного растворения (Раствор А).

Для приготовления раствора селенита натрия (Na_2SeO_3) в 20 мл дистиллированной воды растворялось 0,86 г селенита натрия, порошок добавлялся по 20 мг до его полного растворения (Раствор Б).

Два полученных раствора смешивались путем медленного приливания раствора А к раствору Б. Если все правила и условия были соблюдены правильно в результате получался прозрачно-желтый раствор, если раствор получался кирпично-красного цвета, то это означало, что селен выпал в осадок, и была нарушена технология смешивания компонентов.

После раствор ставится на диализ дважды против 0,01М раствора PBS на 96 часов. После диализа очищенный препарат подвергался лиофилизации, в результате чего был получен препарат в виде порошка желтого цвета.

Таким образом стабильная форма препарата получалась при следующем соотношении компонентов: иммуноглобулинов 623 мг/г, селена 377 мг/г.

Физико-химические свойства препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Для определения диаметра синтезированных наночастиц селена использовался метод динамического рассеивания света (ДРС) на анализаторе Zetasizer Nano-ZS.

По данным, полученным в результате проведенного эксперимента, было установлено, что диаметр синтезированных наночастиц варьировался в пределах от 20 до 100 нм. Проведя анализ литературных источников, было установлено, что для использования наночастиц в приготовлении препаратов данный размер является наиболее актуальным, так как частицы такого размера имеют меньшую токсичность и большую биологическую активность.

Концентрация общего белка в препарате при исследовании на биохимическом анализаторе BioChem SA составила 623 мг/г.

Физико-химические свойства препарата указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические показатели препарата

Наименование показателя	**Содержание в препарате**
Внешний вид, цвет	Раствор, желто-оранжевого цвета
РН	7,0-7,4
Относительная вязкость	4,6-5,1
Массовая доля селенита натрия (Na2SeO3), мг/мл	8,6
Плотность при 20 ^{0}С, г/см3	1, 03-1,07

Доклинические исследования препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Оценка острой токсичности препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Исследование острой токсичности препарата на белых нелинейных мышах было проведено согласно ГОСТ 32644-2014. Исходя из того, что наночастицы селена и иммуноглобулины, по отдельности имеют низкую токсичность была выбрана доза 2000 мг/кг, как начальная доза для введения препарата. В первой группе наблюдался падеж в виде одной головы, во второй группе падеж не был зафиксирован.

Проведенные исследования указывают на то, что препарат относится к 5 классу опасности и имеет относительно низкую опасность острой токсичности, при исследовании его на белых нелинейных мышах согласно ГОСТ 32644-2014 года. Летальной являлась доза свыше 2000 мг/кг.

Исследование острой токсичности препарата на крысах линии Wistar было проведено согласно ГОСТ 12.1.007-76 2021.

Для проведения эксперимента лабораторным крысам линии Wistar внутрибрюшинно вводился препарат в следующих дозах, по действующему веществу:

1 группа $\Rightarrow$ 2000 мг/кг

2 группа $\Rightarrow$ 4000 мг/кг

3 группа $\Rightarrow$ 6000 мг/кг

4 группа(контроль) $\Rightarrow$ 5 мл раствора натрия хлорида

Клиническая картина, падеж и уровень интоксикации зависели от вводимой дозы.

Так в первой группе изменений не наблюдалось, во второй группе был падеж в количестве двух голов, и животные находились в состоянии угнетения, в третьей группе наблюдался падеж в количестве шести голов, были выявлены признаки интоксикации, животные находились в состоянии угнетения, в четвертой группе изменений и падежа выявлено не было.

Из полученных данных можно сделать вывод, что переносимой дозой исследуемого препарата для крыс является доза ниже 2000 мг/кг. Значение $ЛД_{50}$ указано в таблице 2.

Таблица 2 – Значение $ЛД_{50}$ при исследовании острой токсичности препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена на крысах линии Wistar

Вид животного	**$ЛД_{16}$**	**$ЛД_{50}$**	**$ЛД_{84}$**
Крысы линии Wistar	3779,96±729,36	5462,71±659,94	7894,59±2186,36

Согласно ГОСТ 12.1.007-76 2021 года при исследовании препарата на крысах линии Wistar препарат относится к 4 классу опасности.

Оценка хронической токсичности препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Для оценки хронической токсичности в первой испытуемой группе животным ежедневно внутрибрюшинно вводился препарат в дозе 546,2 мг/кг, что сопоставимо с 1/10 $ЛД_{50}$, животным во второй группе внутрибрюшинно вводился исследуемый препарат, но уже в дозе 54,62 мг/кг, что соответствовало 1/100 от $ЛД_{50}$.

В контрольной группе животных внутрибрюшинно вводился раствор натрия хлорида.

Во время эксперимента активность животных не была снижена, каждая особь хорошо принимала корм и не отказывалась от питьевой воды, увеличение массы тела шло постепенно. В первой испытуемой группе по истечению 14 дней было отмечено незначительное угнетение, и небольшое отсутствие интереса к корму.

Было проведено исследование общего анализа крови, из которого следует, что при введении исследуемого препарата в дозе 1/10 ЛД50 приводило к снижению концентрации в периферической крови гемоглобина, а также количества эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов. Но после отмены дачи препарата все показатели приходили в норму в течении 30 дней. Параллельно с данными показателями у группы с исследуемой дозой 1/100 ЛД50 было выявлено снижение эритроцитов, гемоглобина и тромбоцитов, но после окончания дачи препарата показатели приходили в норму по прошествии 16 суток. В последующие две недели полученные показатели не имели расхождений с контрольными. Исходя из этого можно сделать вывод, что применение исследуемого препарата в течении долгого времени в больших дозах приводило к лейкоцитопении, тромбоцитопении и анемии у испытуемых животных. Но данные изменения в показателях не сохранялись на длительное время и приходили в норму после отмены препарата.

При подведении результатов, функционального состояния печени, было видно, что при проведении исследования функционального состояния печени после введения исследуемого препарата испытуемым животным, было выявлено повышение индикаторных ферментов печени, а также снижение общего белка в сыворотке крови. Данные показатели указывают на малую гепатотоксичность исследуемого препарата в завышенных дозах. Но несмотря на данные показатели, они приходили в норму спустя три недели после окончания введения препарата. На всем протяжении эксперимента значительных отличий контрольной и опытных групп обнаружено не было.

Исходя из показателей функционального состояния почек, следует, что при долгосрочном введении больших доз препарата наблюдалось снижение

функциональной активности почек. Но данные изменения не являются постоянными, так как активность почек приходит в норму спустя три недели отмены введения препарата животным.

Исследование центральной нервной системы было проведено при помощи метода удержания животного на горизонтальном стержне и оценке двигательной активности.

Состояние ЦНС и работоспособность животных испытуемых групп приходила в норму спустя три недели после окончания введения препарата животным, и данные не отличались от данных контрольной группы животных.

При введении больших доз препарат на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена имеет отрицательное влияние на некоторые системы органов, такие как: пищеварительная, мочевыделительная, и ЦНС, а также на функциональную активность кроветворной системы, но по истечению трех недель состояние животных приходит в физиологическую норму.

Оценка иммунотоксичности препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Оценку клеточного иммунитета проводили с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при введении в качестве антигенов эритроцитов барана.

После однократного введения исследуемого препарата в дозе 546,2 мг/кг мышам первой группы проводилась подкожная иммунизация в межлопаточную область 10% суспензией эритроцитов барана (ЭБ) в дозе 0,1 мл. Испытуемые животные во второй группе служили контролем, им была введена 10% суспензия эритроцитов барана. По прохождению 5 дней после конечного введения исследуемого препарата, каждому животному была введена разрешающая доза 2% суспензии ЭБ в объеме 0,02 мл в правую лапку, и 0,02 мл раствора натрия хлорида в левую лапку. Спустя сутки животные были подвержены эвтаназии, у них отрезались лапки на уровне голеностопного сустава и взвешивались на аналитических весах для учета индекса стимуляции.

Определение числа АОК было изучено для оценки влияния исследуемого препарата на гуморальный иммунный ответ, после иммунизации эритроцитами барана лабораторных мышей.

Индекс реакции в обоих группах не имел достоверных различий.

Исследование результатов по влиянию исследуемого препарата на гуморальный иммунный ответ методом определения числа АОК после иммунизации эритроцитами барана лабораторных мышей, также не показало достоверной разницы.

Исходя из полученных в ходе эксперимента данных можно сделать вывод, что введение препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена не оказало стимулирующего действия на иммунную систему при исследовании его влияния на гуморальный иммунитет в реакции локального гемолиза.

Оценка пирогенности препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Для исследования пирогенного действия препарата его вводили испытуемым животным, с последующим измерением температуры тела 5 раз с промежутком в пол часа. Границы повышения температуры не достигали значения более 0,63 ℃, что в соответствии с Государственной фармакопеей не превысило допустимую величину (Таблица 3).

Таблица 3 – Оценка результатов пирогенного действия препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Время (мин)	**Изменение температуры у кроликов, ℃**					
	Кролик 1		**Кролик 2**		**Кролик 3**	
	t, ℃	**отклонение**	**t, ℃**	**отклонение**	**t, ℃**	**отклонение**
До введения препарата	38,3	0	38,8	0	39,0	0
30	38,3	0	38,8	0	39,0	0
60	38,5	0,2	39,1	0,3	39,3	0,3
90	38,4	0	39,0	0,2	39,2	0,1
120	38,4	0	39,0	0	39,0	0
150	38,6	0,2	38,8	0,2	39,0	0
∑ Δt	38,4	0,2	38,9	0,23	39,1	0,2

В соответствии с полученными данными можно сделать вывод, что исследуемый препарат является апирогенным, исходя из того, что сумма полученных максимальных температур у испытуемых животных на первом этапе исследования показала разницу менее 1,2 ℃.

Оценка местно-раздражающего действия и аллергизирующих свойств препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Сенсибилизацию животных осуществляли исходя из, предполагаемого способа введения в клинических испытаниях, кроликам на протяжении 5 дней вводился исследуемый препарат в дозе 100 мкл/1 кг.

Для проведения исследования местно-раздражающих и аллергизирующих свойств, был подобран метод максимального сенсибилизирующего воздействия, так как он является наиболее чувствительным. Данное исследование было проведено для определения возможной способности препарата оказывать сенсибилизирующее действие на кожные покровы кроликов.

Шерсть на испытуемых участках у животного аккуратно выстригалась до начала эксперимента.

Учет кожной реакции у первой группы проводился по шкале оценки кожных проб.

Учет быстрой реакции производился спустя 15 минут, а учет гиперчувствительности замедленного типа велся спустя 1-е;5-е и 7-е сутки.

Оценка сенсибилизирующего действия проводилась посредствам внесения 1 капли исследуемого препарата под верхнее веко правого глаза испытуемым животным второй группы, а под верхнее веко левого глаза в качестве контроля

вносилась дистиллированная вода.

Согласно данной классификации, испытуемые участки имели 0 баллов, и было доказано, что препарат не обладает местно-раздражающим действием на кожу испытуемых животных после 20 дневного наложения препарата.

По результатам проведенного исследования при внесении испытуемого препарата в конъюнктивальный мешок, никакой реакции не было обнаружено.

Биоактивность препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Эквивалентное количество антигена и лизата цельных клеток из E. coli TG-1, анализировали вестерн-блоттингом с использованием поликлональной сыворотки, полученной от кроликов, иммунизированных полученным нами антигеном E. coli. Полученная сыворотка специфически распознает белки в интервале от 35 мМ до 45 мМ.

Проводя анализ полученных данных, можно отметить, что дыхательная активность перитонеальных макрофагов мышей повышается при иммунизации конъюгатами АГ/препарат (на основе наночастиц селена и иммуноглобулинов) на 62%, АГ/ПАФ на 40% в сравнении с контрольной группой, которой вводился физиологический раствор.

Проводя оценку пролиферативной функции лимфоцитов, использовали антигенную стимуляцию спленоцитов, которые были выделены от иммунизированных мышей in vitro.

Исходя из полученных данных можно отметить, что пролиферативная активность мононуклеарных клеток мышей повысилась в 1,7 раз при иммунизации конъюгатами АГ/Препарат и в 2,2 раза при иммунизации АГ/ПАФ по сравнению с контрольной группой, которой был введен физиологический раствор.

Анализ адаптивного звена иммунитета показал, что самый высокий титр антител был после иммунизации комплексом АГ/ПАФ, в среднем он составил 1:5765 при p=0,0001 относительно АГ.

Так же высокий и средний титр показала иммунизация АГ/Препарат 1:2134, который превышает титр антител фактически 24 %. Сам АГ показал средний титр антител 1:529.

Анализируя данные, полученные в ходе исследования цитокиновой активности, можно увидеть, что самый интенсивный рост наблюдался в испытуемой группе, которая была иммунизирована АГ/ПАФ уровень интерферона в этой группе, составил 270±24 pg/ml. При иммунизации мышей АГ/Препаратом уровень интерферона составил 210±63 pg/m. Так же небольшой рост интерферона показала иммунизация в группе АГ, уровень составил 114±33 pg/ml.

Анализируя данные полученные в ходе исследования интерлейкина 6, можно увидеть, что уровень IL-6 у группы животных, которые были иммунизированы АГ/ПАФ, составил 33±2 pg/ml, в группе, иммунизированной АГ/Препарат 35±4 pg/ml, в группе, иммунизированной АГ 21±5 pg/ ml соответственно.

Терапевтическая эффективность препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Для определения терапевтического эффекта исследуемого препарата исходя из проведенных исследований было подобрано три группы животных.

Спустя 5-6 суток после рождения у некоторых телят начинались развиваться признаки диспепсии, эти телята в количестве 20 голов были отобраны для исследования в опытную и контрольную группы. У телят отмечалась диарея, фекалии были жидкие, с гнилостным запахом, желтоватого цвета, но у большинства телят сохранялся аппетит, наблюдалась небольшая вялость и слабость, телята больше лежали, некоторые телята не вставали совсем.

После назначения терапевтических мероприятий в первой опытной группе на вторые сутки у некоторых телят наблюдалось снижение диареи. На третьи сутки у 50% телят данной группы диарея отсутствовала. На 4 сутки видимые признаки диареи оставались только у двух телят остальные испытуемые чувствовали себя удовлетворительно. В данной группе диарея у телят полностью прекращалась на пятый день. На протяжении всего эксперимента в фекалиях у телят не наблюдалось наличие крови и слизи, не было изменения в аппетите и температуре тела.

После проведения терапевтических мероприятий во второй группе диарея у телят начала прекращаться только на третий день, полностью в данной группе диарея прекратилась только на седьмой день. В данной группе также не наблюдалось никаких примесей и инородных предметов в фекалиях у телят.

Температура тела в среднем на начало эксперимента в опытной группе составила 38,9±0,21 ℃.

С момента применения исследуемого препарата с физиологическим раствором 1 раз в день, диарея у телят прекращалась на 5 сутки, фекалии имели вид сформированной лепешки, коричневого цвета, тестообразной консистенции. Состояние животных было удовлетворительным. В среднем в группе температура тела не изменилась и составила 39,1±0,24 ℃.

Данные гематологических показателей, указывают, что в первой группе у животных наблюдалось повышение общего количества эритроцитов на 23 %, а также гемоглобина, относительно клинически здоровых животных, при физиологических значениях показателей среднего содержания гемоглобина в эритроците и среднего объема эритроцита. Во второй группе, на момент начала эксперимента наблюдалась аналогичная картина, отклонение эритроцитов от клинически здоровых животных составило 24%, разница между первой и второй группой не достоверна, что указывает на обезвоживание организма в результате диареи, это согласуется клиническими симптомами.

Данные, биохимического анализа крови, показали, что у животных первой и второй группы были изменения в показателях при исследовании крови за 24 часа до начала эксперимента. В первой группе были выделены такие изменения, как: повышение АЛТ на 54 %, АСТ на 46 %, щелочной фосфатазы на 53 %, по отношению к клинически здоровым животным что указывает на реактивные изменения гепатоцеллюлярной системы в результате всасывания токсинов из желудочно-кишечного тракта на фоне дегидратации организма, а также

уменьшение общего белка на 4 %, альбуминов на 28 % и глобулиновой фракции белка на 9 %, по отношению к третьей группе клинически здоровых телят, что указывает на нарушение всасывания из желудочно-кишечного тракта аминокислот.

Данные получены из цитокинового профиля телят больных диспепсией, показали, что у телят в начале эксперимента в опытных группах было повышение показателей изучаемого нами цитокинового профиля, но уже спустя пять суток после начала терапевтических мероприятий данные показатели снижались до уровня клинически здоровых животных. Данный факт указывает на купирование острых воспалительных процессов в пищеварительной системе экспериментальных животных.

В первой группе телят, которые в качестве лечения получали препарат на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена совместно с базовой терапией в течении пяти дней, видно состояние иммунного статуса испытуемых, он показал, что большинство показателей естественной резистентности снижены по сравнению с первым исследованием и они близки к показателям клинически здоровых телят. Исходя из полученных данных эта группа телят находится в наилучшем клиническом состоянии, так как применение данного вида терапии дало заметно хорошие результаты.

На начало эксперимента показатели гуморальных факторов в первой и второй группе были понижены, по сравнению с третьей группой клинически здоровых животных, на пятый день показатели в первой группе имели тенденцию к повышению, так как в этой группе использовался препарат, повышающий естественную резистентность организма, показатели во второй группе были все ещё ниже показателей в группе клинически здоровых телят. Спустя четырнадцать дней показатели всех трех групп были на одной границе, так как животные первой и второй группы пришли в состояние физиологической нормы и являлись здоровыми, а показатели животных в третьей группе оставались неизменными, так как животные были клинически здоровыми.

Чтобы определить антиоксидантный статус и уровень окислительного стресса подопытных телят у них производилось взятие крови для определения глутатионпероксидазы и малонового диальдегида. Малоновый диальдегид накапливается в результате перекисного окисления липидов, являясь продуктом метаболизма, повышение которого у подопытных телят может быть следствием высвобождения активных форм кислорода на фоне усиленного фагоцитоза, который утилизируется при помощи глутатионпероксидазы, последняя в свою очередь является частью антиоксидантной системы защиты организма. Изначальные результаты исследования указывали на то, что показатели глутатионпероксидазы у первой и второй группы были ниже показателей клинически здоровых телят, а показатели малонового диальдегида выше, на фоне накопления активных форм кислорода в очаге воспаления, что подтверждается увеличением фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови подопытных телят в данной группе, в третьей группе концентрация глутатионпероксидазы составила 5±0,31 ммоль/л, а концентрация малонового диальдегида составила 2±0,25 мкмоль/л. При исследовании крови спустя 5 суток, после назначения терапевтических мероприятий, наблюдались изменения у первой

группы животных показатели глутатионпероксидазы увеличивались на 18,9% по отношению к первому исследованию и стали даже выше, чем у клинически здоровых телят, разница в показателях исследуемой группы и группы клинически здоровых животных составила 7,65 %. Данный факт указывает на включение в метаболический цикл содержащегося в разработанном нами препарате, селена, который включается в состав глутатионпероксидазы.

Увеличение глутатионпероксидазы в первой группе стало результатом действия исследуемого препарата, так как он содержит наночастицы селена, которые входят в состав данного фермента участвующего в антиоксидантной защите организма путем присоединения свободных радикалов, что указывает на улучшенную работу антиоксидантной системы в результате чего стабилизацию метаболических процессов, также на уменьшение токсических веществ в организме телят, что подтверждается снижением малонового диальдегида в крови на 32,2% по отношению к первому дню, относительно показателей клинически здоровых животных разница составляла 13,7%. Показатели второй группы спустя 5 дней оставались практически неизменными, и разница в показателях глутатионпероксидазы составила 16,4%, а малонового диальдегида 29,1% по сравнению с клинически здоровыми животными. Спустя 14 дней показатели метаболического профиля телят в первой и третьей группе были в одинаковых границах и составили в первой группе глутатионпероксидаза 4,9±0,44 ммоль/л, а в третьей группе 5,1±0,29 мкмоль/л, показатели малонового диальдегида составили в первой группе 1,9±0,25 ммоль/л, а в третьей группе 1,8±0,28 мкмоль/л. Показатели же второй группы были ниже, чем у двух других групп глутатионпероксидаза 3,9±0,36 моль/л и малонового диальдегида 1,7±0,33 мкмоль/л.

Из представленных выше данных следует, что применение препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена при диспепсии у телят способствует ускорению купирования клинических симптомов таких как: диарея уже на 5 сутки, снижение эритроцитов, лейкоцитов, до физиологических значений, что говорит о восполнении жидкости в организме, повышению общего белка, альбуминов и глобулинов, до физиологических значений, что является следствием нормализации желудочно-кишечного пищеварения, а также способствует повышению резистентности организма.

Экономическая эффективность препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена

Себестоимость исследуемого препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена на 1 день 1 введение составила 7 рублей, было проведено 5 введений на сумму 35 рублей, на одно животное. По окончанию проведения курса было затрачено 350 рублей на 10 животных.

Таким образом экономический эффект составил 3580 рублей, а эффективность ветеринарных мероприятий в пересчете на 1 рубль затрат 2,30 рубля.

Исходя из полученных данных в условиях производства была подтверждена

высокая эффективность при использовании комплексной схемы лечения, которая включала базовую терапию совместно с препаратом на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена растворенном в физиологическом растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан новый ветеринарный препарат на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена содержащий: 623 мг/г иммуноглобулинов и селена 377 мг/г.

2. Препарат на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена при исследовании острой токсичности на белых нелинейных мышах относится к 5 классу опасности при $ЛД_{50}$ более 2000 мг/кг согласно ГОСТ 32644-2014 и имеет относительно низкую опасность острой токсичности, при исследовании на крысах линии Wistar, согласно ГОСТ 12.1.007-76 2021, относится к 4 классу опасности при $ЛД_{50}$ 5462,71±659,94 г/кг массы тела, и относится к малоопасным веществам, также препарат не обладает местно-раздражающим, аллергизирующим действием, согласно ГОСТ ISO 10993-10-2011.

3. Биологическая активность препарата на основе иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена показала, что пролиферативная активность мононуклеарных клеток мышей повысилась в 1,7 раз при иммунизации конъюгатами АГ/Препарат и в 2,2 раза при иммунизации АГ/ПАФ по сравнению с контрольной группой. При анализе адаптивного звена иммунитета было видно, что самый высокий титр антител был после иммунизации комплексом АГ/ПАФ, в среднем он составил 1:5765 относительно АГ, так же высокий и средний титр показала иммунизация АГ/Препарат 1:2134, который превышает титр антител фактически 24 %. Сам АГ показал средний титр антител 1:529. анализ цитокиновой активности показал, что самый интенсивный рост наблюдался в испытуемой группе, которая была иммунизирована АГ/ПАФ уровень интерферона в этой группе, составил 270±24 pg/ml. При иммунизации мышей АГ/Препарат уровень интерферона составил 210±63 pg/m. Так же небольшой рост интерферона показала иммунизация в группе АГ, уровень составил 114±33 pg/ml. Уровень IL-6 у группы животных, которые были иммунизированы АГ/ПАФ, составил 33±2 pg/ml, в группе, иммунизированной АГ/Препарат 35±4 pg/ml, в группе, иммунизированной АГ 21±5 pg/ ml.

4. Терапевтическая эффективность при применении препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена показала 100% эффект при продолжительности лечения сроком в 5 дней с полным купированием симптомов. Значительное улучшение гематологических показателей на 5 день, а именно снижению числа: эритроцитов с 11,5±0,42 до 8,1±0,37 $\times 10^{12}$/L; гемоглобина с 165,9±7,15 до 133,7±3,75 g/L; гематокрита с 53,6±2,77 до 43,4±2,54 %, что говорит о регидратации организма телят. Также применение исследуемого препарата привело к улучшению биохимических показателей крови, а именно повышению: общего белка с 56,2±1,81 до 72,9±2,38 г/л; альбуминов с 25,5±1,71 до 36,4±1,13 г/л; глобулинов с 30,6±2,18 до 36,4±2,23 г/л и понижению активности щелочной фосфатазы с 255±17,47 до 134,3±4,82 Ед/л; АЛТ с 80,8±8,91 до 25,6±2,44 Ед, АСТ с 184,2±4,77 до 83,3±2,08 Ед, что указывает на нормализацию пищеварения у телят.

5. Препарат на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена показал хорошие биоактивные свойства, усиливая ответную реакцию организма и оказал положительное воздействие, как на клеточный, так и на гуморальный иммунитет. Применение исследуемого препарата показало наилучшие результаты у испытуемой группы при исследовании клеточных факторов естественной резистентности организма, фагоцитарная активность на 5 день изменилась с 94,9±2,08 до 85,7±2,15%, также изменился и индекс фагоцитоза с 9,1±0,53 до 6,4±0,67. Цитокиновый профиль телят в 1 группе показал отсутствие воспалительных процессов на 5 день эксперимента, что подтвердилось изменением IL1 с 15,1±0,22 до 13,3±0,15; IL6 с 7,2±0,37 до 4,5±0.2; INF ɣ с 70 ±0,56 до 67,3±0,83. Также наблюдалось увеличение гуморальных факторов сыворотки крови, а именно повышение бактерицидной активности сыворотки крови с 54,7±4,7 до 86±1,78 %; лизоцимной активности с 15,5±2,63 до 31,6±2,34 %. Показатели метаболического профиля телят увеличивались в связи с регидратацией организма и улучшением работы антиоксидантной системы глутатионпероксидаза восстановилась с 3,4±0,62 до 5,3±0,79 ммоль/л, а показатели окислительного стресса в виде малонового диальдегида снижались с 2,8±0,51 до 1,9±0,42 мкмоль/л.

6. Экономическая эффективность от применения комплексной схемы препарат на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена + базовая терапия в дозе исследуемого препарата 100 мг на 1 кг живой массы, при внутримышечном введении 1 раз в день на протяжении 5 дней, была эффективной для применения в хозяйстве. На рубль затрат при проведении лечебных мероприятий выгода составила 2,30 рубля прибыли.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

Для лечения диспепсии у телят рекомендуется применять препарат на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена совместно с физиологическим раствором, при помощи внутримышечного введения 1 раз в день в течении 5 дней в объеме 100 мг на 1 кг живой массы теленка.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В ходе проведенных исследований было изучено взаимодействие коллоидных частиц селена и иммуноглобулинов в качестве компонентов лекарственного средства, что позволяет целенаправленно разрабатывать терапевтические мероприятия по коррекции иммунной системы, при заболеваниях различной этиологии, у животных.

В результате проведенных исследований была доказана низкая токсичность и высокая биологическая активность препарата, усиление иммунобиологического действия иммуноглобулинов конъюгированных с наночастицами селена, что показывает дальнейшие перспективы применения данного препарата в качестве иммуномодулирующего, иммуностимулирующего средства при заболеваниях, как заразной, так и незаразной этиологии у животных.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК РФ

1. **Скворцова, Н.И.**, Полиэтиологичность возникновения неонатального гастроэнтерита у телят / И. И. Калюжный, И. А. Никулин, Л. В. Анникова, Н.И. Скворцова, [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Т. 248, № 4. – С. 86–92.
2. **Скворцова, Н.И.**, Конструирование и изучение свойств ветеринарного лечебного препарата на основе силимарина и наночастиц золота / Д. А. Солдатов, Н. И. Скворцова, А. Д. Клюкина [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2023. – № 8. – С. 92–96.
3. **Скворцова, Н.И.**, Разработка иммуномодулирующего ветеринарного препарата и его доклинические исследования / С. В. Козлов, С. А. Староверов, Е. В. Силина, Н.И. Скворцова, [и др.] // Известия Международной академии аграрного образования. – 2023. – № 66. – С. 5–9.

Патент

4. Патент № 2798268 C1 Российская Федерация, МПК A61K 33/04, A61K 39/395, A61P 37/02. Способ получения ветеринарного препарата на основе неспецифических иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена для коррекции иммунной системы: № 2022110790: заявл. 21.04.2022: опубл. 20.06.2023 / С. В. Козлов, С. А. Староверов, **Н. И. Скворцова** [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова".

В других изданиях

5. **Скворцова, Н.И.**, Создание нового ветеринарного препарата и оценка его уровня токсичности на лабораторных животных / Н. И. Скворцова, М. А. Чекунов, Д. А. Солдатов [и др.] // Проблемы и пути развития ветеринарной и зоотехнической наук : Международная научно-практическая конференция обучающихся, аспирантов и молодых ученых, посвященная памяти заслуженного деятеля науки, доктора ветеринарных наук, профессора кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Колесова Александра Михайловича, Саратов, 21–22 апреля 2022 года. – Саратов: Издательство "Саратовский источник", 2022. – С. 415– 420.
6. **Денисова, Н.И.** Изучение иммунотоксичности препарата на основе неспецифического иммуноглобулина и коллоидных частиц селена / Н.И. Денисова, С.В. Козлов, Е.С. Козлов [и др.] // Инновации, современные тенденции развития животноводства и зоотехнической науки: методы, технологии, экологическая безопасность производства и переработки сельскохозяйственной продукции: Сборник статей Международной научно-практической конференции, Саратов, 24.04.2024. – С. 136–140.
7. **Денисова, Н.И.** Изучение пирогенности препарата на основе неспецифического иммуноглобулина и коллоидных частиц селена / Н.И. Денисова, С.В. Козлов, Е.С. Козлов [и др.] // Инновации, современные тенденции развития

животноводства и зоотехнической науки: методы, технологии, экологическая безопасность производства и переработки сельскохозяйственной продукции: Сборник статей Международной научно-практической конференции, Саратов, 24.04.2024. – С. 140–143.

8. **Денисова, Н.И.** Изучение хронической токсичности препарата на основе неспецифического иммуноглобулина и коллоидных частиц селена / Н.И. Денисова, С.В. Козлов, Е.С. Козлов [и др.] // Инновации, современные тенденции развития животноводства и зоотехнической науки: методы, технологии, экологическая безопасность производства и переработки сельскохозяйственной продукции: Сборник статей Международной научно-практической конференции, Саратов, 24.04.2024. – С. 143– 147.

9. **Денисова, Н.И.** Конструирование нового ветеринарного препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена / Н.И. Денисова, Е.С. Козлов, Раххо Ваэль [и др.] // Сборник трудов по материалам XVIII Международного конкурса научно-исследовательских работ, Уфа, 21.07.2024 – С. 51–57.

10. **Денисова, Н.И.** Оценка местно-раздражающего действия препарата на основе иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена / Н.И. Денисова, Е.С. Козлов, Ю.В. Манаенкова [и др.] // Сборник трудов по материалам XVIII Международного конкурса научно-исследовательских работ, Уфа, 21.07.2024 – С. 57– 63.

11. **Денисова, Н.И.** Применение иммуномодулирующих препаратов в коррекции патологий у животных / Н.И. Денисова, Е.С. Козлов, Ю.В. Манаенкова [и др.] // Сборник трудов по материалам XVIII Международного конкурса научно-исследовательских работ, Уфа, 21.07.2024 – С. 63– 69.

12. **Денисова, Н.И.**, Получение термостабильного антигена E. coli для создания диагностической тест-системы / Е. С. Козлов, **Н. И. Денисова**, А. А. Шелковая [и др.] // Современные научные тенденции в ветеринарии: Сборник статей II Международной научно-практической конференции, Саратов, 07–08 декабря 2023 года. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2024. – С. 81– 83.

13. **Денисова, Н.И.**, Синтез наночастиц селена стабилизированных бычьими сывороточными иммуноглобулинами / Е. С. Козлов, **Н. И. Денисова**, А. А. Шелковая [и др.] // Современные научные тенденции в ветеринарии: Сборник статей II Международной научно-практической конференции, Саратов, 07–08 декабря 2023 года. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2024. – С. 83– 86.

Примечание: фамилия автора Скворцова Н.И. была изменена на Денисова Н.И. в связи с заключением брака. Свидетельство № 687590 от 9 августа 2023 года.